



TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
MARMARA ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ

**HEPATİK ENSEFALOPATİ TEDAVİSİ İÇİN RİFAKSİMİN VE  
LAKTULOZ KULLANAN SİROZ HASTALARININ BARSAK  
MİKROBİYOTALARININ TEDAVİ İLE DEĞİŞİMİNİN  
İNCELENMESİ**

DR. Ali Arınç HARMAN

UZMANLIK TEZİ

İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI: PROF.DR. OSMAN CAVİT ÖZDOĞAN

İSTANBUL 2020



TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
MARMARA ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ

**HEPATİK ENSEFALOPATİ TEDAVİSİ İÇİN RİFAKSİMİN VE  
LAKTULOZ KULLANAN SİROZ HASTALARININ BARSAK  
MİKROBİYOTALARININ TEDAVİ İLE DEĞİŞİMİNİN  
İNCELENMESİ**

DR. Ali Arınç HARMAN

UZMANLIK TEZİ

İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI: PROF.DR. OSMAN CAVİT ÖZDOĞAN

İSTANBUL 2020

## İÇİNDEKİLER

|                                                                                        |      |
|----------------------------------------------------------------------------------------|------|
| SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ:.....                                                   | iii  |
| TABLOLAR DİZİNİ.....                                                                   | iv   |
| ŞEKİLLER DİZİNİ .....                                                                  | v    |
| ÖZET:.....                                                                             | vi   |
| ABSTRACT .....                                                                         | vii  |
| TEŞEKKÜR.....                                                                          | viii |
| 1.GİRİŞ ve AMAÇ: .....                                                                 | 1    |
| 2.GENEL BİLGİLER.....                                                                  | 2    |
| 2.1. Siroz ve Komplikasyonları .....                                                   | 2    |
| 2.1.1. Tanım .....                                                                     | 2    |
| 2.1.2. Siroz etiyojisi ve sınıflaması.....                                             | 2    |
| 2.1.3. Siroz patogenezi .....                                                          | 4    |
| 2.1.4. Sirozun klinik bulguları .....                                                  | 5    |
| 2.1.5. Sirozun komplikasyonları .....                                                  | 6    |
| 2.1.6. Hepatik ensefalopati .....                                                      | 11   |
| 2.1.7. Sirozda prognoz ve evreleme .....                                               | 18   |
| 2.2.Mikrobiyota ve Mikrobiyom .....                                                    | 21   |
| 2.2.1. İntestinal Mikrobiyotanın gelişimi .....                                        | 22   |
| 2.2.2. İntestinal mikrobiyotanın önemi.....                                            | 25   |
| 2.2.3. İntestinal Mikrobiyota, Mikrobiyom ile ilişkili hastalıklar .....               | 30   |
| 2.2.4. Siroz ve mikrobiyota, mikrobiyom ilişkisi.....                                  | 33   |
| 2.2.5. Sirozda mikrobiyom ve prognostik değişiklikler, siroz disbiyoz oranı (CDR)..... | 34   |
| 2.2.6. Hepatik ensefalopati ve tedavisinde mikrobiyota mikrobiyom ilişkisi .....       | 35   |
| 3. MATERYEL METOD.....                                                                 | 39   |
| 3.1. Çalışma Tasarımı .....                                                            | 39   |
| 3.2. Çalışmaya Dahil Edilme Kriterleri .....                                           | 40   |
| 3.3. Çalışmadan Dışlanma kriterleri .....                                              | 40   |
| 3.4. Barsak Mikrobiyota Tayini.....                                                    | 40   |
| 3.4.1. Feçes Toplanması .....                                                          | 40   |
| 3.4.2. Mikrobiyal DNA ekstraksiyonu .....                                              | 41   |
| 3.4.3. DNA Yoğunluğu ve Saflığı Ölçümü.....                                            | 41   |
| 3.4.4. Hedef Gen Bölgesinin Amplifikasyonu ve Kütüphane Hazırlama .....                | 41   |
| 3.4.5. PCR Aşaması: Amplikon PCR .....                                                 | 42   |

|                                                                                |    |
|--------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.4.6. PCR Aşaması: İndeks PCR .....                                           | 43 |
| 3.4.7. Kütüphane Kantifikasyonu Normalizasyonu ve Kütüphane Havuzu Oluşturma.. | 44 |
| 3.4.8. Dizileme.....                                                           | 44 |
| 3.5. Veri Kalite Kontrolü ve Biyoinformatik Analiz .....                       | 44 |
| 3.5.1. Alfa ve Beta Çeşitlilik Analizi .....                                   | 45 |
| 3.6. Gruplar Arası Karşılaştırma .....                                         | 45 |
| 4. BULGULAR.....                                                               | 46 |
| 4.1. Taksonomi .....                                                           | 48 |
| 4.1.1. Filum(phylum) .....                                                     | 48 |
| 4.1.2. Sınıf (Clas).....                                                       | 48 |
| 4.1.3. Takım (Order) .....                                                     | 49 |
| 4.1.4. Aile (Family).....                                                      | 49 |
| 4.1.5. Cins (Genus) .....                                                      | 50 |
| 4.1.6. Tür (Species).....                                                      | 50 |
| 4.2. Mikrobiyota ve Mikrobiyom Analizi .....                                   | 51 |
| 4.2.1. Gruplar arasındaki alfa-diversity analiz sonuçları .....                | 53 |
| 4.2.2. Gruplar Arasında Beta-diversity Analiz Sonuçları .....                  | 54 |
| 4.3. CDR Oranlarının Karşılaştırılması .....                                   | 55 |
| 5. TARTIŞMA ve SONUÇ .....                                                     | 56 |
| 6. REFERANSLAR .....                                                           | 63 |
| 7. EKLER.....                                                                  | 72 |
| 7.1.Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul Onay Formu .....             | 72 |

## **SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ:**

KC-S: Karaciğer Sirozu

ALT: Alanin aminotrasferaz

AST: Aspartat aminotrasferaz

ALP: Alkalen fosfataz

GGT: Gama-glutamil traspeptidaz

HE: Hepatik Ensefalopati

SBP: Spontan bakteriyel peritonit

KS: Kompanse siroz

DS: Dekompanse siroz

DNA: Deoksiribonükleik asit

RNA: Ribonükleik Asit

rRNA: Ribozomal Ribonükleik Asit

rDNA: Ribozomal deoksiribonükleik asit

PZR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

HBV: Hepatit B virüsü

HCV: Hepatit C virüsü

NAFLD: Non alkolik yağlı karaciğer hastalığı

NASH: Non alkolik steatohepatit

BCAA: Dallı zincirli amino asitler

CDR: cirrhosis dysbiosis ratio(siroz disbiyoz oranı)

GUT mikrobiyotası: Gastrointestinal sistem mikrobiyotası

## TABLÖLAR DİZİNİ

|                                                                                                                                                                                                                            |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tablo 1. Siroz Etiyolojisi (7). ....                                                                                                                                                                                       | 3  |
| Tablo 2. Siroz Komplikasyonları (4).....                                                                                                                                                                                   | 6  |
| Tablo 3. Asitte evreleme .....                                                                                                                                                                                             | 8  |
| Tablo 4. Altta yatan nedene bağlı olarak hepatik ensefalopatinin sınıflaması .....                                                                                                                                         | 15 |
| Tablo 5. Hepatik ensefalopatide evreleme .....                                                                                                                                                                             | 15 |
| Tablo 6. Hepatik ensefalopatiyi presipite eden durumlar.....                                                                                                                                                               | 16 |
| Tablo 7. CHİLD-PUGH Sınıflaması .....                                                                                                                                                                                      | 19 |
| Tablo 8. MELD-Na skoru ve mortalite ilişkisi .....                                                                                                                                                                         | 20 |
| Tablo 9. Mikrobiyota da değişimler ve ilişkili olduğu hastalıklar (125). ....                                                                                                                                              | 32 |
| Tablo 10. Amplikon PCR aşaması .....                                                                                                                                                                                       | 42 |
| Tablo 11. İndeks PCR aşaması .....                                                                                                                                                                                         | 43 |
| Tablo 12. Çalışmaya katılan siroz hastalarının cinsiyet, yaş, etyoloji, CHİLD, MELDNa skorları ve gruplandırılması. NOT: M2 kodu M1 hastasının; M4, M3 hastasının ve M6, M5 hastasının 3. aydaki kontrolünü gösterir. .... | 46 |
| Tablo 13. DS, KS, HE-I ve HE-II hasta gruplarında alfa-diversity karşılaştırmasının istatistiksel değerleri .....                                                                                                          | 54 |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

|                                                                                                                                                                                                                                                                                      |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Şekil 1.</b> Hepatik ensefalopati patogenezinde katkıda bulunan faktörler ve tedavi mekanizmaları (3) . .                                                                                                                                                                         | 14 |
| <b>Şekil 2.</b> Portal hipertansiyon veya karaciğer fonksiyon yetmezliği sebebiyle siroz komplikasyonları..                                                                                                                                                                          | 18 |
| <b>Şekil 3.</b> MELD ve MELDNa skorlaması .....                                                                                                                                                                                                                                      | 19 |
| <b>Şekil 4.</b> İntestinal mikrobiyotanın gelişimi .....                                                                                                                                                                                                                             | 24 |
| <b>Şekil 5.</b> Sağlıklı erişkinden, kompanse siroz, dekompanse siroz, akut on kronik karaciğer yetmezliği ve transplantasyon sonrası intestinal alandaki temel değişiklikler .....                                                                                                  | 34 |
| <b>Şekil 6.</b> Laktuloz uygulaması öncesinde ve sonrasında bağırsak mikrobiyotasında çeşitli bakteri gruplarının bolluğu. Açıklama: filum (a) ve aile (b) seviyelerinde laktuloz öncesi(kırmızı) ve sonrasında (mavi) karaciğer sirozu olan hastalarda bağırsak mikrobiyotası ..... | 37 |
| <b>Şekil 7.</b> Rifaksimin tedavisinin insan GUT mikrobiyomundaki değişimine etkisi A: filum düzeyinde B: sınıf düzeyinde .....                                                                                                                                                      | 38 |
| <b>Şekil 8.</b> 16S rDNA ve türler arası dizi benzerliği .....                                                                                                                                                                                                                       | 41 |
| <b>Şekil 9.</b> Çalışmaya katılan siroz hastalarının etiyolojik dağılımı %100=13 hasta .....                                                                                                                                                                                         | 46 |
| <b>Şekil 10.</b> Çalışmaya katılan hastaların gruplara göre MELDNa skorları .....                                                                                                                                                                                                    | 47 |
| <b>Şekil 11.</b> Çalışmaya katılan hastaların grupları ile MELDNa skorlarını gösteren grafik .....                                                                                                                                                                                   | 47 |
| <b>Şekil 12.</b> Metagenomik analiz sonucunda tüm örneklerde tespit edilen filumlar .....                                                                                                                                                                                            | 48 |
| <b>Şekil 13.</b> Metagenomik analiz sonucunda tüm örneklerde tespit edilen ilk 30 sınıf .....                                                                                                                                                                                        | 48 |
| <b>Şekil 14.</b> Metagenomik analiz sonucunda tüm örneklerde tespit edilen ilk 30 takım .....                                                                                                                                                                                        | 49 |
| <b>Şekil 15.</b> Metagenomik analiz sonucunda tüm örneklerde tespit edilen ilk 30 aile .....                                                                                                                                                                                         | 49 |
| <b>Şekil 16.</b> Metagenomik analiz sonucunda tüm örneklerde tespit edilen ilk 30 cins .....                                                                                                                                                                                         | 50 |
| <b>Şekil 17.</b> Metagenomik analiz sonucunda tüm örneklerde tespit edilen ilk 30 tür .....                                                                                                                                                                                          | 50 |
| <b>Şekil 18.</b> Dekompanse siroz (DS), Hepatik ensefalopati tedavi öncesi (HE-I), hepatik ensefalopati tedavi sonrası (HE-II), kompanse siroz (KS) hasta gruplarının mikrobiyotası (filum düzeyinde) .....                                                                          | 51 |
| <b>Şekil 19.</b> DS, HE-I, HE-II ve DS hasta gruplarında mikrobiyotaların aile (family) düzeyinde birleşimi ..                                                                                                                                                                       | 52 |
| <b>Şekil 20.</b> KS ve DS grupları arasında enterobacteriaceae .....                                                                                                                                                                                                                 | 52 |
| <b>Şekil 21.</b> Gruplar arasındaki alfa-diversity analizi .....                                                                                                                                                                                                                     | 53 |
| <b>Şekil 22.</b> KS ve DS hasta gruplarının beta-diversity karşılaştırılmasının Bray-Curtis grafiği Yeşil: KS (Kompanse siroz) Kahverengi:DS (Dekompanse siroz) .....                                                                                                                | 54 |
| <b>Şekil 23.</b> HE-I ve HE-II grubundaki hastaların beta-diversity karşılaştırılmasının Bray-Curtis grafiği Kırmızı HE-I (Hepatik ensefalopati tedavi öncesi) Mavi: HE-II (Hepatik ensefalopati tedavi sonrası) ..                                                                  | 54 |

## ÖZET:

**Amaç:** Karaciğer sirozu (KC-S) toplumda sık görülen çeşitli etiyolojileri olan kronik bir hastalık olup en önemli komplikasyonlarından birisi hepatik ensefalopatidir. Hepatik ensefalopatinin patogeneğinde barsak mikrobiyotasında olan değişimler önem kazanmıştır ve tedavisinde kullanılan ilaçların mikrobiyotada ne gibi değişimler oluşturduğu konusu tartışmalıdır. Bu çalışma hepatik ensefalopati tedavisi ve profilaksisinde rifaksimin ve laktuloz kullanımının, gastrointestinal (GİS) mikrobiyotaki değişiminin incelenmesini ve diğer siroz hastalarıyla karşılaştırılmasını amaçlamıştır.

**Gereç Yöntem:** Çalışmaya gastroeneroloji polikliniğine başvuran veya gastroenteroloji kliniğine interne edilen hastalarda 5 hepatik ensefalopati hastasının (HE-I grubu) tanı anında ayrıca 4 kompanse siroz (KS grubu) ve 4 dekompanse siroz (DS grubu) hastalarının başvuru sırasında dışkıları alındı. Hepatik ensefalopatili 5 hastaya 3 ay laktuloz ve rifaksimin tedavisi verilip, tedavi sonunda 3 tanesinden (HE-II grubu) tekrar dışkı örneği alınabildi. Alınan dışkılardan, bakteriyel 16S rDNA gen analizi yapılarak bakteri popülasyonlarının tayini ve yoğunluğu ölçüldü. Bu yoğunluklar ve bakterilerin birbirine oranları ile HE hastalarının ilişkileri karşılaştırıldı.

**Bulgular:** Çalışmaya katılan siroz hastalarının mikrobiyotalarında dekompanse siroz (DS) grubunda; kompanse siroz ve diğer gruptaki hastalara kıyasla Enterobacteriaceae artışı dikkati çekmiş olup istatistiksel olarak anlamlıdır. Hepatik ensefalopati grubunda ilk alınan dışkılar (HE-I) ile tedavi sonrasında alınan dışkılar (HE-II) arasında istatistiksel olarak anlamlı mikrobiyal farklılık saptanmamıştır. Siroz disbiyozis oranı gruplar arasında anlamlı olmamıştır.

**Sonuç:** Dekompense siroz hastalarında kompanse siroz hastalarına kıyasla mikrobiyomda anlamlı değişimler gözlenmiş olup siroz disbiyozis oranı (CDR) hesaplanmasında kullanılan mikrobiyal topluluğun farklı popülasyonlarda farklılık gösterebileceği, CDR hesaplanmasında kullanılan bakteri ailelerinin tekrar gözden geçirilebileceği önerilmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Karaciğer sirozu, hepatik ensefalopati, intestinal mikrobiyota

## ABSTRACT

**Objective:** Liver cirrhosis is a common chronic disease which has various aetiologies and hepatic encephalopathy is one of the most significant complications of this disease. Alteration of gut microbiota has become an issue in terms of pathogenesis of hepatic encephalopathy; moreover it is controversial as to what kind of alterations are being caused by the drugs used for its treatment. The aim of this study is to investigate gastrointestinal microbiota alteration on patients using rifaximin and lactulos as treatment and prophylaxis of hepatic encephalopathy and to compare it with other cirrhosis patients.

**Material and method:** This study includes hepatic encephalopathy patients who have visited gastroenterology inpatient and outpatient clinics. 5 hepatic encephalopathy patient's (HE-1 group) gaita examples were collected at the time of diagnosis, 4 compensated cirrhosis (CS group) and 4 decompensated cirrhosis (DC group) patient's gaita examples were collected on admission. 3 months of lactulos and rifaximin treatment was given to the hepatic encephalopathy patient group and 3 of the 5 patients control samples (HE-II) were able to be collected again at the end of the 3 months. The bacterial population's specifications and densities of the collected gaita samples were evaluated using 16S rDNA genetic analysis. Bacteria densities and ratio of bacteria classes and their relationship with HE patient's was compared.

**Results:** Among cirrhosis patients' included in this study, microbiota investigations revealed an increase in enterobacteriaceae that was statistically significant in decompensated cirrhosis patients compared with compensated cirrhosis and all other groups. In the hepatic encephalopathy patient group, no statistically significant difference was detected between pre-treatment collected gaita samples (HE I) and the post-treatment collected gaita samples (HE II). The cirrhosis disbiosis ratio was not found to be significant among any of the groups.

**Conclusion:** Significant alteration of the microbiome was observed in decompensated cirrhosis patients compared with compensated cirrhosis patients. Microbial populations used in the cirrhosis disbiosis ratio (CDR) calculation can vary.

**Keywords:** Cirrhosis, hepatic encephalopathy, intestinal microbiota

## TEŞEKKÜR

2015-2020 yılları arasında uzmanlık eğitimini aldığım akademik destekten kaçınmayan, bilgi ve beceri edinmemde büyük katkıları olan Marmara Üniversitesi İç Hastalıkları Ana Bilim Dalındaki tüm değerli hocalarıma teşekkürü borç bilirim.

Bana verdiği güven, anlayış yeri geldiğinde yol gösterici olan bilimsel olarak da örnek aldığım tez danışmanım Prof. Dr. Osman Cavit ÖZDOĞAN hocama saygılarımı ve teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışmanın moleküler ayağında ve istatistiksel analizinde bana yardımcı olan ve ön ayak olan Tıbbi Biyoloji bölümü değerli hocası Doç. Dr. Fatih EREN hocama çok teşekkür ederim.

Gastroenteroloji anabilim dalı yan dal uzmanı Dr. Haluk Tarık KANİ'ye

Uzmanlık eğitimim boyunca bana eşlik eden birlikte çalıştığım tüm arkadaşlarıma özellikle eşkıdemlerim Dr. Ahmet Mert Yanık, Dr. Rabia Gökçen UMURCA, Dr. Beyza US, Dr. Yasin İZGİ, Dr. Abdullah Fatih DEMİRCİ, Dr. Begüm KÜVER, Dr. Zeynep ALACA TOPÇU, Dr. Tuba KAYA, Dr. Betül ÇETİN; Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda görevli Dr. Demet Yılmaz'a ayrıca Dr. Cem Armağan TURAN, Dr. Çağlayan KEKLİKKIRAN ve Dr. İpek AYDIN'a teşekkürlerimi borç bilirim.

Yine bu çalışmanın biyoenformatik ayağında yardımcı olan Acıbadem Üniversitesi Biyoistatistik Anabilim Dalı'na ve Dr. Deniz Ece KAYA'ya teşekkür ederim.

Bu tez çalışması Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Biriminin desteği ile yapılmıştır. Bu sebeple Marmara Üniversitesi BAPKO birimine teşekkür ederim.

Dr. Ali Arınç Harman

İstanbul

2020

## 1.GİRİŞ ve AMAÇ:

Siroz toplumda sık görülen kronik hastalıklardan biri olup en önemli komplikasyonlarından birisi hepatik ensefalopatidir. Hepatik ensefalopati tedavisinde birçok ilaç kullanılmakta olup bazı ilaçların yararlı olduğu görülmüştür. Fakat bu ilaçların hangi etki mekanizması üzerinden işe yaradığı netleşmemiştir. Son yıllarda kronik hastalıklarla beraber gastrointestinal sistem mikrobiyotası araştırılmakta olup, bu araştırmalar siroz hastalarında da olmaktadır. Özellikle hepatik ensefalopatili hastalarda intestinal mikrobiyotadaki değişim araştırılmakta, ensefalopatinin şiddetiyle mikrobiyotanın değişimi arasındaki ilişki sorgulanmaktadır. GUT mikrobiyotasındaki değişim siroz ve HE gelişiminde önemli bir rol oynamaktadır (1). Bu değişimin en önemli etkilerinden biri intestinal mikrobiyotadaki bozulma nedeniyle amonyak üretimi yapan bakterilerin sayısal üstünlüğünün ve barsakta bulunan diğer bakterilere göre oranının artmasıdır (2). Hepatik ensefalopati tedavisinde en önemli basamak altta yatan nedenin tedavisidir. Hepatik ensefalopati tedavisi genelde inflamasyonun ve beraberinde hiperamonyeminin azaltılmasını hedeflemektedir (3). Bu amaçla laktuloz, rifaksimin, antibiyotikler, L-ornitine-L-aspartat gibi ajanlar tedavi amaçlı kullanılmaktadır. Bu tedavilerin etki mekanizmaları çeşitlidir. Fakat HE tedavisinin mikrobiyotayı etkilediği düşünülmektedir. Bir çalışmada minimal hepatik ensefalopati tedavisi ve profilaksisinde kullanılan rifaksiminin intestinal mikrobiyotadaki değişime neden olmadan kognitif fonksiyonları geliştirdiği görülmüştür (1). Aynı zamanda laktuloz ve rifaksimin kullanan hepatik ensefalopatili hastalarda mikrobiyotanın sınırlı olarak değiştiği görülmüştür (1).

Bu çalışmada, HE olan siroz hastalarının barsak mikrobiyotasının diğer siroz hastalarından farkını görmek ayrıca laktuloz ve rifaksimin gibi standart tedavilerin mikrobiyota üzerindeki etkilerini incelemek amaçlanmıştır.

## **2.GENEL BİLGİLER**

### **2.1. Siroz ve Komplikasyonları**

#### **2.1.1. Tanım**

Siroz normal karaciğer yapısının yerini fibrozise ve anormal rejeneratif nodüllere bırakması ile karakterize, kronik karaciğer hastalığının son evresi olarak tanımlanmaktadır. Bu hastalarda karaciğerde;

- Vasküler distorsiyon
- Fibrozis
- Normal karaciğer yapısının bozulması görülür.

Siroz oluşumu diffüz olarak karaciğeri kapsar ve genelde geri dönüşümsüz bir süreçtir. Son zamanlarda altta yatan etyolojik nedenlere bağlı olarak reversibl (Örn. Hemokromatozis, hepatit C, alkolik karaciğer hastalığı) olabileceği de görülmüştür (4). Siroz karaciğerin hastalığı olmasına rağmen birçok sistemi ve tüm vücudu ilgilendiren bir hastalıktır. Siroz ve komplikasyonları dünya genelinde önemli sağlık sorunlarından biridir ve önemli bir ölüm sebebidir (5).

#### **2.1.2. Siroz etiyolojisi ve sınıflaması**

Siroz etiyolojisi farklı coğrafyalarda farklılıklar göstermektedir. Dünyada sirozun en sık nedenleri hepatit B (HBV), hepatit C (HCV) enfeksiyonu ve alkol tüketimidir (6). Son yıllarda özellikle ikinci dünya ülkelerinde artan obezite ve metabolik sendrom nedeniyle non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı(NAFLD) önemli bir etiyolojik faktör olmaktadır (6). Karaciğer sirozu etiyolojisi tablo 1 de gösterilmiştir.

**Tablo 1. Siroz Etiyolojisi (7).**

| <b>Sirozun sebepleri</b>                                                |
|-------------------------------------------------------------------------|
| Kronik viral hepatitler (HBV, HCV)                                      |
| Alkolik karaciğer hastalığı                                             |
| Hemakromatozis                                                          |
| Non alkolik yağlı karaciğer hastalığı (NAFLD)                           |
| Kriptojenik                                                             |
| Otoimmün hepatitler                                                     |
| Primer ve sekonder bilier siroz                                         |
| Primer sklerozan kolanjit                                               |
| İlaçlar (metotreksat, izoniazid, amiodaron, alfa-metil dopa)            |
| Wilson hastalığı                                                        |
| Alfa-1 antitripsin eksikliği                                            |
| Çölyak hastalığı                                                        |
| İdiyopatik erişkin duktopeni                                            |
| Granulomatöz karaciğer hastalıkları                                     |
| İdiopatik portal fibroz                                                 |
| Polikistik karaciğer hastalığı                                          |
| Enfeksiyonlar (brucella , sifiliz, ekinokok veya şistozoma enfeksiyonu) |
| Sağ kalp yetmezliği                                                     |
| Hereditör hemorajik telanjektazi                                        |
| Venooklüzif hastalıklar                                                 |

Karaciğer sirozu morfolojik olarak mikronodüler, makronodüler ve miksnodüler siroz olarak gruplandırılır. Sirotik nodüllerin 3 mm den küçük olduğu durumlarda mikronodüler, birçoğunun 3 mm den büyük olduğu nodüller makronodüler olarak adlandırılır (8).

Klinik olarak kompanse ve dekompanse siroz olarak sınıflandırılır. Karaciğer hastalığı kaynaklı komplikasyon geliştiren hastalar (Örn.: asit, varis kanaması, hepatik ensefalopati, hepatorenal sendrom, sarılık vs.) dekompanse siroz olarak sınıflandırılırlar.

### **2.1.3. Siroz patogenezi**

Karaciğer fibroz ve takibinde siroz öncesinde, bu süreci başlatan etiyolojik bir nedene bağlı olarak hepatosit hasarı söz konusudur. Bu kronik hasar devam ederken karaciğer hücrelerinde apoptoz ve rejenerasyon da devam eder. Bu hasarın direkt sitotoksik etkisi veya hasara eşlik eden inflamasyon sebebiyle karaciğerde nekroz , apoptozis ve inflamasyon artarak devam eder.

Bu süreç devam ettikçe karaciğer içerisindeki bağ dokusu dengesi ve yapısı bozulur. Karaciğer içerisinde fibrozis başlar. Bu fibrozisin süreci haftalar veya aylar sürmektedir. Ayrıca mekanik bilier obstruksiyonlarda fibrozisin daha hızlı gelişebildiği bilinmektedir.

Fibrozisin başlamasındaki en önemli etken karaciğerin Disse aralığında bulunan stellat hücrelerdir (Ito hücresi veya perisinüzoidal hücreler de denir). Normalde stellat hücreler disse aralığında hepatositler ve endotelyal sinüzoidal hücreler arasında yer almaktadır. Bu hücreler A vitamini depolar ve disse aralığında Tip IV kollajen üretirler. Kronik karaciğer hasarı ile beraber kupfer hücrelerinden gelen artmış sitokinler ve disse aralığındaki ekstrasellüler alanın değişimi ile aktiveleşen stellat hücreler; tip I ve tip III kollajen üretimi, sülfatlı proteoglikan ve glikoprotein gibi çeşitli ekstrasellüler matriks elemanlarını üretirler (9). Bu değişiklikler ve stellat hücrelerin miyofibroblast hücrelerine dönüşümü sonrasında kollajen sentezi ve inflamasyonun artmasıyla karaciğer yapısı ve çatısı bozulmaya başlar ve karaciğer hepatositlerinde nodülleşmeler meydana gelir (10, 11).

Bütün bu durumun devam etmesi karaciğer çatısı ve normal yapısını bozar, siroz gelişimi gerçekleşir.

#### **2.1.4. Sirozun klinik bulguları**

Siroz hastaları evrelerine göre çeşitli bulgular gösterebilirler. Başlangıçta asemptomatik olabileceği gibi ilerleyen dönemlerde konfüzyon, kas güçsüzlüğü, ikter ve asit gibi çeşitli semptom ve bulgular görülebilir. Sirozun klinik özellikleri patolojik değişikliklerin sonucudur ve karaciğer hastalığının şiddetini yansıtır (4).

##### **2.1.4.1. Sirozun semptomları**

Siroz hastalarında semptomlar değişkendir. Nonspesifik semptomlar (iştahsızlık, halsizlik, kilo kaybı) görülebilir. Dekompanse siroz hastalarında sarılık, kaşıntı, asit nedeniyle olan abdominal distansiyon, üst gastrointestinal sistem kanaması semptomları, hepatik ensefalopati nedeniyle olan konfüzyon ve bilinç bozuklukları görülebilir. Bozulmuş ince barsak permeabilitesi, barsaklarda gelişen bakteriyel aşırı çoğalma, safra asidi eksikliği gibi nedenlerle diyare görülebilir (12).

Erkeklerde hipogonadizm ve impotans gelişebilir. Seksüel disfonksiyon, testiküler atrofi özellikle alkolik karaciğer sirozunda ve hemakromatozisli hastalarda daha yaygın olarak bulunur. Sirozlu hastalarda gelişen protein-enerji malnütrisyonu ve azalmış fiziksel aktivite nedeniyle sarkopeni görülebilir ve bu durum kötü prognoza katkıda bulunur (13).

Kadınlarda anovulasyon yaygındır, irregüler menstrasyon kanamaları veya amenore görülebilir (14).

Sirozlu hastalarda baskılanmış immun sistem ve intestinal disbiyozis nedeniyle çeşitli enfeksiyonlar görülür. Enfeksiyona bağlı semptomlar görülebilir.

### 2.1.5. Sirozun komplikasyonları

Sirozlu hastalarda bozulan karaciğer fonksiyonlarına bağlı olarak çeşitli komplikasyonlar görülür ve bu komplikasyonlar nedeniyle hastaların sağkalımında azalma meydana gelir. Genelde karaciğer sirozunun altında yatan nedenden bağımsız olarak gelişir. Sirozun komplikasyonları portal hipertansiyon kaynaklı, karaciğer fonksiyon yeteneğinin azalması kaynaklı veya her ikisinin etkisi ile olabilir.

**Tablo 2. Siroz Komplikasyonları (4).**

| <b>SİROZ KOMPLİKASYONLARI</b>        |                                  |
|--------------------------------------|----------------------------------|
| <i>Portal Hipertansiyon</i>          | <i>Koagülopati</i>               |
| <i>Gastroözofagial varisler</i>      | <i>Faktör eksiklikleri</i>       |
| <i>Portal hipertansif gastropati</i> | <i>Fibrinolizis</i>              |
| <i>Splenomegali ve hipersplenizm</i> | <i>Trombositopeni</i>            |
| <i>Asit</i>                          | <i>Kemik hastalıkları</i>        |
| <i>Spontan bakteriyel peritonit</i>  | <i>Osteopeni</i>                 |
| <i>Hepatorenal sendrom</i>           | <i>Osteoporoz</i>                |
| <i>Tip I</i>                         | <i>Osteomalazi</i>               |
| <i>Tip II</i>                        | <i>Hematolojik Anormallikler</i> |
| <i>Hepatik ensefalopati</i>          | <i>Anemi</i>                     |
| <i>Hepatopulmoner sendrom</i>        | <i>Hemoliz</i>                   |
| <i>Portopulmoner hipertansiyon</i>   | <i>Trombositopeni</i>            |
| <i>Malnütrisyon</i>                  | <i>Nötropeni</i>                 |

Siroz zemininde gelişen neoplaziler de (hepatosellüler karsinom) sirozun bir komplikasyonu olarak kabul edilmektedir.

#### **2.1.5.1. Portal hipertansiyon**

Portal hipertansiyon, kompanse sirozlu hastaların dekompanse hale gelmesinin ve sirozlu hastalarda mortalite artışının en büyük nedenidir (15). Hepatik venöz basınç gradientinin (HVPG)(portal ven ile vena cava inferior arası basınç farkı)  $\geq 5$  mmHg olması portal hipertansiyon olarak tanımlanır (4). Genelde portal ven kan akımında artmış bir dirençle başlar. Bu direnç karaciğerin yapısal bozukluğu, karaciğer içi mikrosirkülasyonda bozulma ve fibrozis nedeniyle oluşur. Sirozda aynı zamanda splanknik vazodilatasyon ve hiperdinamik ekstrahepatik sirkülasyon ile artmış kardiak output nedeniyle de portal sisteme gelen kan akımı artar. Bu durum portal hipertansiyon artışına katkıda bulunur (16). Portal hipertansiyon genelde hepatik nedenlerle olur fakat karaciğer kaynaklı olmayan prehepatik (Örn.portal ven trombozu) veya post hepatik (Örn:Budd-Chiari Sendromu) gibi non-sirotik sebepler de olabilir.

**Gastroözofagial varisler ve varis kanaması:** Sirozlu hastaların yıllık %5-%15'nin varis geliştireceği bunlarında 3'te birinin varis kanaması yaşayacağı düşünülür. Sirozun en ciddi komplikasyonlarından biridir ve mortalitesi yüksektir (17). Hastalar genelde hematemez ve/veya melena şikayetleri ile başvururlar. **HVPG  $\geq 10$  mmHg** olduğunda hastada varis oluşturma riski artar ve **HVPG  $\geq 12$  mmHg** olduğunda genelde varis kanaması gözlenir (17-19).

Varis ve varis kanaması tanısında kullanılan altın standart yöntem özofagogastroduodenoskopidir (20).Varis kanaması acil bir durumdur; hemodinamik bozuklukluğu düzeltmek ve bakteriyel infeksiyonlardan kaçınmak için antibiyotik profilaksisi uygulanır. Farmakolojik olarak vazokonstriksiyon sağlamak amacıyla somatostatin veya analogları (oktreotid) tedavisi 3-5 gün süre ile uygulanır (20). Varis kanaması tanısı alındığında 12 saat içinde endoskopik bant ligasyonu ve skleroterapi ile de tedavi uygulanmalıdır (20). Endoskopik tedaviye kadar hastanın kanamasını kontrol altına alınması için geçici olarak balon tamponadı uygulanabilir. Endoskopik varis ligasyonu aynı zamanda profilaktik tedavide de uygulanabilir. Endoskopik bant ligasyonu ve nonselektif beta blokorler profilaktik tedavide uygulanır. Farmakolojik veya endoskopik olarak kontrol altına alınamayan kanamalarda "Transjuguler intrahepatik portosistemik şant (TIPS)" başka bir tedavi seçeneğidir (21).

**Asit:** Peritoneal boşlukta sıvı birikmesine asit denir. Karaciğer sirozunun en yaygın komplikasyonudur ve kompanse sirozlu hastaların %50 sinin 10 yıl içinde asit geliştireceği düşünülür (22-24). Portal hipertansiyon nedeniyle splanknik damarlarda vazodilatasyon ve renin-anjiotensin-aldosteron sistemi aktivitesinde artma görülür (22). Splanknik vazodilatasyona ve RAA sistemi aktivasyonuna nitrik oksit gibi salınan vazoaktif aminlerin de katkısı olur. Sonuçta artmış sodyum retansiyonu ve inefektif intravasküler volüm artışı olur. Bu değişimler nedeniyle asit gelişir. Asit oluşumu sirozlu bir hastanın kompanse sirozdan dekompanse siroza geçtiğinin göstergesidir ve mortalitesinin 2 yılda %50 olduğu düşünülür. Bu nedenle bu hastaların karaciğer nakli için aday olduğu düşünülmektedir (25).

İlk kez asit tanısı ile başvuran hastalarda asit sıvısının karakteristiğini belirlemek amacıyla diagnostik paracentez önerilmektedir. Asitin en sık nedeni KC-S olmasına rağmen sirozlu olmayan hastalarda peritona invaze malignite , enfeksiyöz durumlar vs. ekarte edilmelidir. Sirozun asit sıvısı açık renkli, berrak, transuda karakteristiğindedir. Protein konsantrasyonu düşüktür ve birçoğunda <1 g/dL dir (4).

Serum asit-albumin gradienti  $\geq 1.1$  g/dL portal hipertansiyon, siroz sebebiyle oluşan asit olduğu düşünülür. (transuda vasfında)

Serum asit-albumin gradienti  $\leq 1.1$  g/dL ise enfeksiyöz veya malign sebeplerden asit olduğu düşünülür.

Asit şiddetine göre evrenlenmiştir.

**Tablo 3. Asitte evreleme**

|                |                                                           |
|----------------|-----------------------------------------------------------|
| <b>Grade 1</b> | <i>FM ile saptanamayan USG ile saptanabilen asit</i>      |
| <b>Grade 2</b> | <i>FM ile saptanabilen asit</i>                           |
| <b>Grade 3</b> | <i>Belirgin abdominal distansiyona yol açan tens asit</i> |

Asit tedavisinde öncelikle günlük tuz alımının 2000 mg/gün düşürecek şekilde kısıtlanması önerilmektedir (26). Tedavide ilk basamak diüretik tedavisidir. 100mg/gün(max:400mg/gün) sprinolakton ve 40mg/gün(max:160mg/gün) furosemid önerilmektedir (27). Yüksek dozlarda medikal tedaviye yanıt alınamayan refrakter asitli hastalarda 5 LT ye kadar yüksek volümlü parasentez veya TİPS önerilmektedir (4, 26). 5lt'den fazla sıvının alınması gerekiyorsa albümin gibi plazma genişleticilerinin intravenöz olarak uygulanması önerilmektedir.

**Spontan bakteriyel peritonit:** Asit sıvısının, herhangi bir intraabdominal odağı saptanmaksızın olan bakteriyel enfeksiyonudur (28). Hastalar asemptomatikten; abdominal ağrı, ateş, mental durumda bozulmaya kadar olan geniş bir aralıkta kliniği değişkendir. Enfeksiyon odağı başka bir yerden bakteriyemi yoluyla gelebilmekle beraber, hastalığın en önemli sebeplerinden birinin bu hastalarda gelişen bakteriyel overgrowth olduğu düşünülmektedir (28, 29). Burada mekanizma GUT florasının intestinal mezenterik lenf nodlarına geçmesi buradan da asit sıvısına geçmesi ve bakteriyemiye yol açması olarak düşünülmektedir. Bu translokasyondan dolayısıyla SBP den sorumlu başlıca mikroorganizmalar E.coli ve diğer enterobacteriaceae ailesi; yine enterokoklar ve streptokoklar gibi gram (+) bakterilerdir (30, 31).

SBP düşünülen hastalarda parasentez sıvısının değerlendirilmesi önemlidir. Asit sıvısında milimeteküp kanda WBC>750 veya milimeteküp kanda >250 polimorfonükleler hücre görülmesi ile tanı konur. Fakat SBP ye sebep mikroorganizma yaklaşık %50 hastada kültürlerde saptanamaz. Kanda veya asit sıvısında polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) kullanılarak bakteriyel DNA saptamak (bactDNA) oldukça sensitif kabul edilir (32-34).

Tedavide 3. Kuşak sefalosporinler veya kinolon grubu antibiyotikler kullanılabilir. Antibiyoterapi direnç koşullarına göre uygulanmalı, 3. Kuşak sefalosporinlere direnç düşünülüyorsa piperasilin-tazobaktam veya karbapenem grubu antibiyotikler de tedavide yer alabilir (35).

**Hepatorenal Sendrom:** Sirozlu hastalarda asit ve hiponatreminin yol açtığı ciddi bir sekonder komplikasyondur. Sistemik sirkülasyonda bozulma ve portal hipertansiyon sonucu renal arterlerde vazokonstriksiyon olur. Bunun sonucunda glomerüler filtrasyon hızında azalma ve hiponatremi gelişir (36, 37). Hepatorenal sendrom fonksiyonel bir bozukluktur ve renal histoloji normaldir. Genelde siroz hastalarının terminal dönemlerinde görülür ve kötü prognozla ilişkilidir.

Hepatorenal sendromun böbrek fonksiyon bozukluğunun hızına dayanılarak 2 tipi tanımlanmıştır (37-39).

-Tip-I HRS daha ciddi bir formu olup, 2 hafta içinde serum kreatininin 2 katın üstüne çıkması veya GFR de  $>50\%$  azalma ile serum kreatinin  $>2.5\text{mg/dL}$  üzerine çıkması olarak tanımlanır.

-Tip-II HRS daha hafif formu olup renal fonksiyonlarda haftalar veya aylar içinde bozulma meydana gelir. Genelde diüretiğe dirençli asitin sebep olduğu bir durum olarak düşünülür.

AASLD(Amerikan karaciğer hastalıkları araştırma derneği) önerisi tip-I ve tip-II hepatorenal sendromda küretif tedavi karaciğer transplantasyonudur (40). Renal fonksiyonların düzelmesi veya transplantasyona zaman kazanmak amacıyla farmakolojik tedaviler uygulanır. Bazı vazoaktif ilaçlar ile birlikte albümin infüzyonu uygulaması yapılır. Vazopressin analogu olan terlipressin veya nöradrenalin vazokonstriksiyon amacıyla uygulanmaktadır. Oktreotid ve midodrin de tercih edilebilecek ilaçlar arasındadır ve kısa süreli hastanın survivini iyileştirdiği gösterilmiştir (41).

### 2.1.6. Hepatik ensefalopati

Hepatik ensefalopati kronik karaciğer hastalığının en önemli ve ciddi komplikasyonlarından biridir. Karaciğer yetmezliği varlığında mental durumda ve bilişsel işlevlerde bozulma olarak tanımlanmaktadır (4). Akut karaciğer hasarı olan hastalarda ensefalopati gelişimi fulminan hepatik yetmezlik tanısı için gereklidir. Fakat HE daha sık olarak kronik karaciğer hastalığında gelişmektedir. Kronik karaciğer hastalığında gelişen HE genelde geri dönüşümlü olabilen ve yönetilebilen bir durumdur (42). Sirozlu hastalarda şiddetli HE ilk bir yıl içinde >%50 mortaliteyle ilişkilidir (43, 44).

**Hepatik ensefalopati patofizyolojisi:** Hepatik ensefalopati patogenezinin multifonksiyonel olduğu düşünülmüş fakat mekanizma halen tam olarak açıklanamamış olup çeşitli teoriler öne sürülmüştür.

Hepatik ensefalopatide en önemli sebebin vücutta amonyak artışı olduğu düşünülmektedir. Amonyak, barsakta enterositlerden glutaminin kullanılması ile aynı zamanda barsak bakterilerinin üre ve proteinleri yıkması nedeniyle üretilmektedir. Son yıllarda amonyağın en önemli kaynağının barsak mikrobiyotası ve ince barsaktaki bakteriyel aşırı çoğalma (Small Intestinal Bacterial Overgrowth)(SIBO) olduğu düşünülmektedir (45). Bozulmuş intestinal mikrobik flora intestinal alanda üreaz üreten bakterilerin (genellikle gram negatif Enterobacteriaceae'dir, ancak anaeroblar veya gram pozitif bakteriler de olabilir) artışı sonucudur (46). Bozulmuş mikrobik flora(disbiyoz) aynı zamanda intestinal bariyerin zayıflamasına sebep olur ve buradan bakteriyel ürünlerin, endotoksinlerin, amonyak translokasyonunun artışı görülür. Endotoksinlerin artışı sonuçta inflamasyonun artışı da HE gelişimine katkı sunar.

Akut karaciğer yetmezliği olan hastalarda hızlı oluşan hiperamonyemi ile birlikte beyin ödemi görülebilir (47).

İntestinal alandan portal vene gelen amonyak karaciğer yetmezliğinde metabolize olamaz; ayrıca karaciğer etrafındaki şantlar sebebiyle karaciğeri by-pas eder. Sonuç yüksek kan amonyak düzeyi olmaktadır. Yüksek kan amonyak düzeyi kan beyin bariyerini geçip glutamin-sentaz enzimi ile glutamin sentezini artırmaktadır. Sonuçta astrositlerde artan glutaminin hücre içindeki osmolariteyi de artırarak beyin ödemi gelişimine katkıda bulunduğu tahmin edilmektedir.

Amonyanın artışı glutamat salınımı artışı ve glutamat klerensinin bozulmasını beraberinde getirir. Sonuçta hücre dışı glutamat düzeyleri artar ve böylece N-metil-D-aspartat (NMDA) glutamat reseptörlerinin aşırı uyarılmasına neden olur. NMDA reseptör aktivasyonu kalmoduline bağlı mekanizma üzerinden nitrik oksit sentetaz (n-NOS)'ı tetikler. NOS; nitrik oksit sentezini katalize ederek vazodilatasyon oluşturur. Bu da serebral hiperemiye yol açar ve beyin ödemeine katkıda bulunur.

Hepatik ensefalopati de amonyak en önemli nörotoksinlerden biri olarak düşünülmektedir. Hepatik ensefalopatide beyin hücre zarlarında nörotransmitter uptakeinde bozulma, enzim aktivitesi değişiklikleri ve bazı nörotransmitter reseptör ekspresyonunda değişiklikler gözlenmiştir.

Hepatik ensefalopati gelişiminde inhibitör gama-amino butirik asit GABA-benzodiazepin nörotransmitter sisteminde tonus artışı olduğu ileri sürülmektedir. GABA-A-erjik nörotransmisyon aktivasyonunda rol oynayan endojen benzodiazepinlerde artış saptanmıştır.

Hiperamonyeminin aynı zamanda kan beyin bariyeri arasında bazı amino asit taşıyıcılarının aktivitesini artırarak nötral amino asitlerin serebral alımını artırdığı görülmüştür. Kanda artan serbest triptofan düzeyleri nedeniyle de kan beyin bariyerine giren aromatik amino asitlerde artış olur. Bunun sonucunda beyinde dopamin, norepinefrin, serotonin ve yalancı nörotransmitterler olan oktapamin, tiramin üretiminde dengesizlik meydana gelir (48-50).

Amonyak detoksifikasyonunun alternatif bir bölgesi kas dokusudur. Kas dokusunda amonyak, BCAA kullanılarak glutamine detoksifiye edilir. Bu yüzden sarkopenili hastaların HE'ye eğilimi olduğu görülmüştür (51). Bir çalışmada siroz nedeniyle sarkopenisi olan ve HE'li hastaların düşük BCAA düzeylerine sahip olduğunu göstermiştir (51-53).

Amonyak düzeyinin artışı aynı zamanda oksidatif stresi artırmasıyla da HE oluşumuna katkıda bulunmaktadır.

Bununla birlikte hepatik ensefalopatinin ağırlığı ile amonyak düzeyinin korelasyonu arasında bir ilişki bulunamamıştır. Ayrıca HE tansında amonyak düzeyinin bakılması da kullanılmamaktadır (4).



**Klinik:** Hepatik ensefalopatinin kliniği değişken bir spektrum içinde yer alan nöropsikiyatrik bozukluklardır. HE altta yatan nedene, kliniğin ağırlığına, oluşma zamanına ve sebep olan duruma göre sınıflandırılmıştır.

**Tablo 4. Altta yatan nedene bağlı olarak hepatik ensefalopatinin sınıflaması**

|              |                                                                                         |
|--------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Tip A</b> | Akut karaciğer yetmezliği nedeniyle HE                                                  |
| <b>Tip B</b> | Karaciğer hastalığı olmaksızın portal sistemik şant nedeniyle olan HE                   |
| <b>Tip C</b> | Sirozun sebep olduğu porto-sistemik şant veya portal hipertansiyon nedeniyle gelişen HE |

**Tablo 5. Hepatik ensefalopatide evreleme**

|                   |                                                                                       |
|-------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Minimal HE</b> | <i>Klinik bulgu olmayabilir, anormal psikometrik ve nörofizyolojik testler</i>        |
| <b>Grade I</b>    | <i>Davranış değişiklikleri, hafif konfüzyon, konuşma bozukluğu, uyku bozuklukları</i> |
| <b>Grade II</b>   | <i>Letarji, orta derece konfüzyon, flapping tremoru</i>                               |
| <b>Grade III</b>  | <i>Stupor, anlamsız konuşmalar, uyandırılabilir uyku hali</i>                         |
| <b>Grade IV</b>   | <i>Ağırlı uyarana yanıtızlık, koma</i>                                                |

Hepatik ensefalopati nörolojik bulguların ortaya çıkış zamanına göre epizodik, rekürren (6 ay veya daha kısa süre içinde olan HE atakları) veya persistan (sürekli olarak davranış paterni değişikliği olan aralarda HE atakları olan durum) olarak sınıflandırılırlar.

HE atağını presipite edici faktörlerin olup olmamasına göre de presipitan veya non-presipitan olabilir.

HE atağını presipite eden faktörler çok çeşitlidir, tabloda özetlenmiştir (50, 54-56).

**Tablo 6. Hepatik ensefalopatiji presipite eden durumlar**

|                                                                               |
|-------------------------------------------------------------------------------|
| <i>Gastrointestinal kanamalar</i>                                             |
| <i>Konstipasyon</i>                                                           |
| <i>Enfeksiyonlar (spontan bakteriyel peritonit dahil)</i>                     |
| <i>Hipokalemi ve diğer elektrolit bozuklukları</i>                            |
| <i>Metaabolik asidoz/alkaloz</i>                                              |
| <i>Hipoksi</i>                                                                |
| <i>Hipovolemi</i>                                                             |
| <i>Böbrek yetmezliği</i>                                                      |
| <i>Sedatif ve hipnotikler (Örn. Bezodiazepin türevleri), bazı narkotikler</i> |
| <i>Alkol</i>                                                                  |
| <i>Hipoglisemi</i>                                                            |
| <i>Portal ven trombozu/hepatik ven trombozu</i>                               |
| <i>Hepatosellüler karsinom</i>                                                |
| <i>Diyette aşırı protein alımı</i>                                            |

#### **Tedavi:**

HE li hastada klinik ve evreleme hasta triajı açısından önemlidir. Grade 1 HE'li hasta ayaktan tedavi edilebilir. Grade 2 ensefalopati de hastanın laterjik ve konfü haline göre internasyon kararı verilir. Daha ağır ensefalopatili hastalar (Grade 3- 4) genelde yoğun bakım ünitelerinde tedavi edilmelidir.

HE tedavisinde 2 temel amaç vardır. Birincisi HE yi presipite eden faktörün yani altta yatan sebebin tedavisidir. İkinci amaç amonyak üretiminin azaltılması ve düzeyinin düşürülmesidir.

Hastaneye yatırılan hastalarda uygun beslenme desteği sağlanmalı, elektrolit bozuklukları ve dehidratasyon önlenmelidir. Günlük 35-40 kkal/kg/gün kalori alımı ve 1,2 ile 1,5 gr/kg/gün protein alımı önerilir. HE li hastalar genelde malnütre olduğundan ve protein yıkımı mortaliteyi artırdığından protein alımının kısıtlanması önerilmemektedir (57, 58).

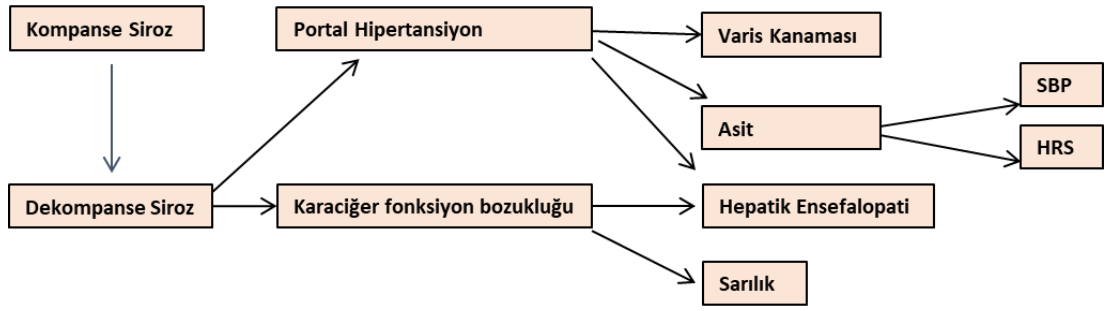
HE li hastalar ajite olduğunda genelde non-farmakolojik yöntemler tercih edilmelidir. Hepatik ensefalopatide hasta benzodiazepin reseptörlerine daha duyarlı hale geldiğinden ajitasyon için farmakolojik tedavide haloperidolün, benzodiazepinden daha iyi bir tercih olduğu düşünülmektedir (59).

**Laktuloz veya laktitol** disakkaritlerdir ve tedavide ana ilaçlardan biridir. 40-45ml günde 2-4 kez verilebilir. Barsak pH ını düşürerek amonyak üretimini azaltmaktadırlar. Aynı zamanda kolonik florayı değiştirir; üreaz üreten bakterilerin yerine üreaz üretmeyen lactobacillus artışı sağlar. Katartik etkili olduğundan amonyak emilimi için geçen süreyi kısaltır. Potansiyel olarak toksik olabilen kısa zincirli yağ asitleri üretimini azaltır (60). Laktuloz kullanımı ile ilgili çoğu çalışmalar aşikar hepatik ensefalopati için yapılmıştır fakat laktulozun minimal hepatik ensefalopatili hastalarda da yararlı olduğu düşünülmektedir (61, 62). Bu yararı mikrobiyotayı değiştirerek etki etmesi üzerinden düşünülerek çalışmalar yapılmıştır. Fakat çalışmalar laktulozun barsak mikrobiyotalarında değişiklik yapmayıp bazı bakterilerin fonksiyonlarında değişme yaptığını düşündürecek sonuçlar ortaya koymuştur (63).

**Rifaksim** HE tedavisinde en sık kullanılan non absorbl antibiyotiktir. Günlük 2x550 mg veya 3x400 mg şeklinde kullanılır ve laktuloza kombine edilebilir. Rifaksim kullanan hastalarda mental fonksiyonlarda düzelme, endotokseminde ve amonyak düzeylerinde azalma görülür. **AASLD ve EASL (Avrupa Karaciğer Çalışmaları Derneği) rekürren hepatik ensefalopatinin önlenmesinde ve profilaksisinde laktuloz ile rifaksim kombinasyonunu önermektedir (64-68).**

**L-ortintine-L-aspartat** Karaciğerde üre sentezi, L-Ornitin L-Aspartat tarafından stimule edilebilir. Amonyak karaciğerde periportal hepatositlerde üreye, perivenüler hepatositlerde ise glutamine çevrilerek detoksifiye edilir ve amonyak düzeyi azalır. Ornitin ayrıca üre sentezindeki enzimlerin etkisini özellikle karboamil fosfat basamağında artırır.

**Dallı zincirli amino asitler (BCAA)** laktuloz ve rifaksimine cevap vermeyen, ciddi protein intoleransı olan hastalarda kullanılabilir.



**Şekil 2.** Portal hipertansiyon veya karaciğer fonksiyon yetmezliği sebebiyle siroz komplikasyonları

### 2.1.7. Sirozda prognoz ve evreleme

Sirozun prognozu etiyolojik sebebe, hastalığın ağırlığına, ortaya çıkan komplikasyonlara ve komorbid hastalığın olmasına bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. Siroz dekompanse olduğunda mortalite belirgin yükselmektedir. Varis geliştiren hastalar eğer varis kanaması geçirmemişse kompanse olarak kabul edilirler, fakat varis geliştirmeyen kompanse siroz hastalarına kıyasla prognozu daha kötüdür (69).

#### 2.1.7.1. Kompanse siroz

Henüz majör komplikasyon oluşmamış hastalardır. Ortalama yaşam süresi >12 yıldır (69).

#### 2.1.7.2. Dekompanse siroz

Asit, varis kanaması, hepatorenal sendrom, hepatik ensefalopati, spontan bakteriyel peritonit, hepatosellüler karsinom v.s. majör komplikasyonlara sahip olan hastaları kapsamaktadır. Bu hastalarda prognozu tahmin etmek amacıyla 2 önemli model tanımlanmıştır. Bunlar child-pugh klasifikasyonu ve MELD (Model for end-stage liver disease) skora sistemidir.

**Child-Pugh klasifikasyonu:** Sirozlu hastalarda şant harici operasyonların prognozunu tahmin etmek için kullanılmaktadır. Şant operasyonları prognozunu tahmin etmek için yapılan Child-Turcotte sınıflandırılmasından modifiye edilmiştir.

Albumin, bilirubin, asit, ensefalopati, protrombin zamanı(INR) içeren 5 kriteri vardır.

**Tablo 7. CHİLD-PUGH Sınıflaması**

| PARAMETRE                           | PUANLAMA        |                     |                 |
|-------------------------------------|-----------------|---------------------|-----------------|
|                                     | 1               | 2                   | 3               |
| Asit                                | Yok             | Hafif               | Belirgin        |
| Bilirubin                           | <2 mg/dL        | 2-3 mg/dL           | >3 mg/dL        |
| Albümin                             | >3,5 g/dL       | 2,8-3,5 g/dL        | <2,8 g/dL       |
| Protrombin zamanında uzama veya INR | <4 sn veya <1,7 | 4-6 sn veya 1,7-2,3 | >6 sn veya >2,3 |
| Ensefaloapati                       | Yok             | Grade 1-2           | Grade 3-4       |

CHİLD skorlamasından 5-6 puan alanlar klas A, 7-9 puan alanlar klas B, 10-13 puan alanlar klas C olarak sınıflandırılmaktadır. Child A grubu hastalar kompanse sirozluları içermektedir. Child skoru artışı olan hastanın mortalitesinde ve komplikasyon gelişiminde artış görüldüğü belirlenmiştir. 1 yıllık yaşam oranı Child A grubunda %100, Child B’de %80, Child C’de ise %45 olarak saptanmıştır. Sistemik bir çalışmada hastanede yatan komplikasyonlu siroz hastalarında CHİLD skoru  $\geq 12$  MELD  $\geq 18$  olanlarda median surviv 6 ay olarak görülmüştür.

**MELD Skoru (Model for End-Stage Liver Disease):** Prognozu belirlemek için kullanılan diğer skorlama sistemidir. Bilirubin düzeyleri, kreatinin, INR, ve etiyolojiyi içeren parametreler kullanılır. 2016 yılında serum sodyum (Na) düzeyleri de parametrelere eklenmiştir. (MELDNa skoru)

$$\text{MELD} = 3.78 \times \log (\text{Bil mg/dl}) + 11.2 \times \log (\text{INR}) + 9.57 \times \log (\text{Cr mg/dl}) + 6.4$$
$$\text{MELD Na} = \text{MELD} - \text{Na} - [0.025 \times \text{MELD} \times (140 - \text{Na})] + 140$$

**Şekil 3. MELD ve MELDNa skorlaması**

**Tablo 8. MELD-Na skoru ve mortalite ilişkisi**

| <b>MELD-Na skoru</b> | <b>90 günlük mortalite</b> |
|----------------------|----------------------------|
| <17                  | <%2                        |
| 17-20                | 3-4%                       |
| 21-22                | 7-10%                      |
| 23-26                | 14-15%                     |
| 27-31                | 27-32%                     |
| ≥32                  | 65-66%                     |

## 2.2.Mikrobiyota ve Mikrobiyom

İnsan vücudunda yaklaşık 10 trilyon kadar vücut hücresi olduğu tahmin edilmektedir. Fakat doğumdan itibaren hatta intrauterin yaşamda bile vücudumuzda sadece vücut hücreleri değil aynı zamanda çeşitli farklı canlılar da yaşamaktadır. İnsan vücudunda çoğunluğunu bakterilerin oluşturduğu arkeler(bakteri aleminden olmayan, ökaryot hücrelere benzerlikleri bulunan prokaryot tek hücreli canlılardır), virüs, mantar ve protozoaları içeren tüm mikroorganizmaların tamamına mikrobiyota denmektedir (70). Bu mikrobiyal popülasyonun insan vücut hücrelerinden yaklaşık 10 kat daha fazla olduğu düşünülmektedir (71, 72).

Bu popülasyon insan vücudunda, insan vücudu ile ilişkisine istinaden 3 farklı biçimde kategorileştirilmiştir.

**Simbiyont:** Birlikte yaşadığı mikroorganizma ile karşılıklı yarar ilişkisi mevcuttur.

**Patobiyontlar:** Çoğaldığında vücutta hastalık oluşturabilen canlılardır.

**Kommensaller:** Beraber yaşadığı canlıdan fayda görürken canlıya zararı dokunmayan ilişki türüdür.

Çoğunluğu bakterilerin oluşturduğu bu mikroorganizma topluluğunun genetik materyaline ise mikrobiyom denmektedir. Mikrobiyom terimini ilk kez nobel ödüllü Joshua Lederberg, kendimize özgü mikroorganizmaların veya mikrobiyotanın kolektif genomu olarak tanımlamıştır (73). Bazı bilim insanları metogenom terimini de kullanmaktadır (74). Çoğunluğunu kommensal bakterilerin oluşturduğu bu genetik materyal insan genetik materyalinden yaklaşık 150 kat daha fazladır (75, 76). İnsan ve bu mikrobiyotanın genomunun topluluğuna hologenom denmektedir. İnsan, üzerinde kendi hücrelerinden yaklaşık 10 kat daha fazla mikroorganizma barındırdığı ve bu organizmalarla bir ilişki içerisinde olduğundan holobiont(yani süperorganizma) olarak tanımlanmaktadır. Bu mikroorganizma çeşitliliği, insanın çeşitli genetik kompozisyonlara sahip karmaşık bir canlı olduğunu göstermektedir.

Son on yılda insan mikrobiyotası ve mikrobiyom tanımı üzerine ilgi giderek artmaktadır. İnsan sağlığının sadece insan hücrelerine bağlı olmadığını; aynı

zamanda vücudumuzda yaşayan bu mikroorganizmalara ve bunlarla olan ilişkilerine bağlı olduğunu düşünmekte olan bilim insanı sayısı giderek artmaktadır. İnsan genomu projesinden sonra Science Dergisi'ne yazılan bir mektupta, Julian Davies insan biyolojisini tam olarak anlamak için insan genetik kodunun yeterli olmadığını çünkü insan vücudu üzerinde 1000'den fazla bakteri yaşadığını ve bu bakterilerin insan sağlığını etkilediğini aynı zamanda bu bakterilerle insan hücrelerinin de etkileşim içinde olabileceğini belirtti. Takip eden zamanda bu konuda çeşitli çalışmalar yapıldı. 2007 yılında ABD'de NIH(National Institutes of Health)(ABD Ulusal Sağlık Enstitüsü), "İnsan Mikrobiyomu Projesi"ni resmen başlattı (77). Bu proje hem sağlıklı hem de hasta insanlarda mikrobiyomun nasıl değiştiğini ve ilişkisini incelemeyi amaçlanmış genişçaplı ve multidisipliner bir proje olmuştur.

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda mikrobiyom ve mikrobiyota gittikçe anlaşılmaya başlanmış; çeşitli hastalıklarla ilişkilendirilmiştir. Mikrobiyotanın insanın hastalık durumlarında ve sağlıklı olarak kalmasında önemli rolü mevcuttur.

Mikrobiyota bir organ olarak düşünülmekte ve ortalama 2 kg kadar olduğu tahmin edilmektedir. İnsan mikrobiyotası çeşitli yerlerde kolonize olmuştur.

- Başlıca kaynak sindirim sitemidir. Ağızdan anüse kadar en fazla popülasyon gastrointestinal sistemdedir. Yine distale gidildikçe yoğunluğu artmaktadır.
- Deri
- Nasal bölge ve üst solunum yolları
- Genitorüner sistem (Örn: vajina)

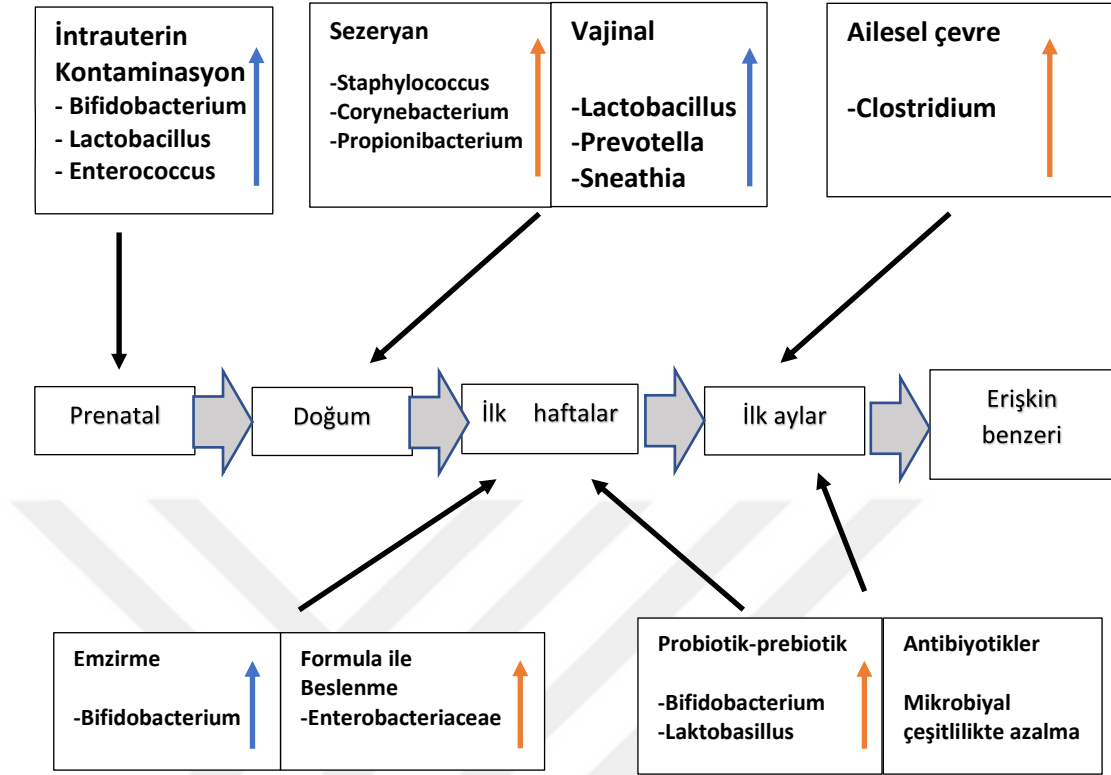
### ***2.2.1. İntestinal Mikrobiyotanın gelişimi***

İnsan hücreleri mitokondri hücreleri de dahil olmak üzere vertikal geçiş gösterir. Fakat mikrobiyota daha az spesifik olarak fakat tutarlı bir şekilde aktarılır, bu da mikrobiyomda farklı jenerasyonlarda ortak bir çekirdek mikrobiyomunda farklı varyasyonlar oluşmasına olanak sağlar (78). Mikrobiyom, binlerce farklı bakteriyel

taksonomik birimi ve dolayısıyla aralarındaki milyonlarca bağlantıyı içeren oldukça karmaşık bir yapısı olduğundan, bu karmaşıklığın nasıl miras alınacağı önemlidir.

Mikrobiyotanın oluşumu doğumdan hemen sonra başlamaktadır (79). Doğum öncesi intestinal alan steril kabul edilmesine rağmen son yıllarda intrauterin dönemde de bakteriler gösterilmiştir (80, 81). Doğum şekli mikrobiyotanın gelişimi için önemlidir. İnsanlarda, vajinal doğum sırasında annenin genitoüriner sistemiyle karşılaşması nedeniyle *Lactobacillus*, *Prevotella* ve *Sneathia* gibi bakterileri edinilebilir (79, 82). Sezaryen sırasında ise mikrobiyota kompozisyonuna deri mikroorganizmaları karışabilmektedir. Muhtemelen diğer öncü popülasyonlar emzirme yoluyla alınabilmektedir (83).

İnfant döneminde mikrobiyota olgunlaşması çeşitli etkileşimlerle olmaktadır. Bu dönemde mikrobiyotayı belirlemede beslenme şekli, antibiyotik kullanımı, pre-probiyotik kullanımı, gestasyonel yaş, çevresel etmenler hatta kişinin yaşadığı coğrafya ve gelenekleri bile etkili olmaktadır (84). Örneğin anne sütü ile beslenen çocuklarda mikrobiyomun çoğunu bifidobakteriler oluştururken, formül mama ile beslenenlerde *enterobacteriaceae*, *lactobacillus*, *clostridium difficile* (firmicuteslerden), *bacteroides fragilis*, gibi bakteriler baskındır (85). Genel olarak infant dönemde baskın bakteri bifidobacteriumlardır (86, 87).



**Şekil 4.** İntestinal mikrobiyotanın gelişimi .(84).

Yaşamın ilk yıllarında mikrobiyota dengeye ulaşana kadar hızla değişir ve 3-4 yaşlarında erişkine benzer mikrobiyota oluşmaya başlar. Sağlıklı bir insan mikrobiyotasında çeşitli mikroorganizmalar belli bir denge ve oran içinde bulunmaktadır. İnsan mikrobiyotasında başlıca bulunan bakteri soyları; firmicutes, bacteroidetes, actinobacteria ve proteobacteria lardır.

### İnsan mikrobiyotasındaki başlıca bakteriler:

- **Firmicutes:** Gram (+)
  - Clostidiales (örn. **Clostridium**),
  - Lactobacillales(**streptococcus,lactobacillus**),
  - Bacillales(**staphylococcus, Listeria, Bacillus**)
- **Bacteroidetes:** Gram (-) anaerop basiller
  - Bacteroidales (**Bacteroides, provotella**)
  - Cytophagales
  - Flavobacteriales
  - Sphingobacteriales
- **Actinobacteria:** Gram (+) filamentöz basiller
  - Actinomycetales
  - **Bifidobacteriales**
- **Proteobacteria:** Gram (-), geniş bir gruptur. Bakterilerin 16s RNA sekanslama teknolojilerine dayanarak 9 alt gruba ayrılmıştır. Bu filumda **Escherichia, Salmonella, Vibrio, Helicobacter, Yersinia, Legionella** (gamma proteobacteria sınıfı) gibi patojenik bakterilerin çoğu yer almaktadır (88).

16S rRNA sekanslama teknolojisi insan mikrobiyomunun yaklaşık %92 sinin Bacteroidetes ve Firmicutes'lerden oluştuğunu göstermiştir (89).

#### 2.2.2. İntestinal mikrobiyotanın önemi

Gastrointestinal sistem 200 m<sup>2</sup> lik bir yüzey alanına sahiptir ve insan mikrobiyotasının çoğuna ev sahipliği yapmaktadır. İntestinal sistemde distale gidildikçe mikrobiyal yoğunluk artmaktadır. İnsandaki tüm mikrobiyotanın >%70 kısmı kolonda bulunmaktadır (90). İntestinal mikrobiyotanın önemi son yıllarda daha fazla anlaşılmıştır ve birçok fonksiyonunun olduğu görülmüştür. İntestinal mikrobiyotanın bozulduğu disbiyozis durumunun birçok hastalıkla ilgili olduğu görülmüştür.

### ***2.2.2.1. İmmün sistem üzerine mikrobiyotanın önemi***

Omurgalı canlıların en büyük bağışıklık sistemi komponenti barsak mikrobiyomuyla direkt ilişkili olan intestinal immün sistemdir. İnsan intestinal sistemi doğumdan itibaren birçok bakteri ve diyet içeriğinden gelen antijenlerle temas halindedir. Bu yüzden gastrointestinal sistem normal mikrobiyota bakterilerini ve diyet içeriklerini, koruyucu bir bağışıklık yanıtı vermesi gereken patojenlerden ayırt etmek zorundadır (91). İntestinal bölgede en yoğun mikrobiyal topluluk kommensal bakterilerdir. Simbiyoz süreci de bu kommensal bakterilerle patolojik bakterilerin arasındaki dengeyle gerçekleşmektedir(84). Bu denge de barsak epitel hücreleri, mukozal immün sistem (Örn. Antimikrobiyal peptidler) ve mikrobiyota arasındaki etkileşim ile gerçekleşir. Kommensal bakterilerin yoğunluğu barsak lümenine, barsak epitel hücreleri ve immün sistem hücrelerinden thymic stromal lymphopoietin (TSLP), IL-33, IL-25, ve tumor growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), immünglobülin A gibi çeşitli kemokinler ve mediatörlerin salınımını gerçekleştirir. Bu mediatörler tolerojenik dentrik hücreler ve tolerojenik makroajların gelişimini uyarır (92, 93). Tolerojenik DC'ler, T düzenleyici hücrelerin gelişimini uyararak TGF-y ve retinoik asit (RA) üretir. Böylece, Tregülatör hücreleri (çeşitli düzenleme mekanizmaları kullanır); makrofajlar (IL10 üretir) ve tolerojenik DC'ler yoluyla, bağırsak bağışıklık sisteminde bir anti-enflamatuar ortam oluşturabilir ve burayı koruyabilir (94). Disbiyozis de kommensal ve patojenik bakterilerin arasındaki etkileşim ve denge bozulur. Bu bozulma ile makroaj olgunlaşması, ayrıca ortamda IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, ve IL-23 artışı olur. Bu sitokinler de CD4 Thelper 1 ve TH 17 hücrelerinin gelişimini artırır. Bu hücreler de IL-17 ve IL-22 salınımı ile kronik inflamasyona sebep olur(92).

İntestinal mikrobiyota dengesinin oluşumu immün sistemin gelişimine doğrudan bağlıdır. Neonatal dönemde oluşan gastrointestinal mikrobiyota bağışıklık sistemi gelişiminde önemli bir rol oynar (95). Bu dönemde oluşan disbiyozis ileride immün yetmezlikle, otoimmün hastalıklarla ilişkili olabilir. Ayrıca gut mikrobiyotasının disbiyozu obezite (96), tip-2 diabetes mellitus (97), hipertansiyon (98), nekrotizan enterokolit (99), inflamatuvar bağırsak hastalıkları (100), vb. yaygın bir çok hastalıkla yakından ilişkilidir.

İntestinal mikrobiyota ve barsak epitel ilişkisi intestinal lümende mukozal bariyer oluşumuna katkıda bulunmaktadır. İntestinal hücrelerinin altında bulunan lamina propria tabakasında B ve T hücreleri bulunmaktadır. T hücreleri intestinal lümeninden gelen sinyallere göre hızla inflamatuvar veya antienflamatuvar yanıt vermede görevlidir. İntestinal mikrobiyom naif CD8 t lenfosit ve CD4 t lenfositlerin dönüşümünde etkilidir (101). Lamina propria da bulunan CD4 T hücreleri de IL-17 ve IL-22 sekrete ederek intestinal inflamasyonu düzenlemeye katkıda bulunur (102). Enterik intestinal hücreler ve mikrobiyota arasında TLR (toll like reseptör) ilişkisi ile antimikrobiyal peptit üretimi gerçekleşir.

Gram negatif bakteriler sebebiyle peptidoglikanlar ve lipopolisakkaritler üretimi gerçekleşir. Bu da sekretuar Ig A ve intestinal alkalen fosfataz üretimini artırarak immün sistem gelişimine katkıda bulunurlar.

#### ***2.2.2.2. Gastrointestinal epitel üzerine etkileri***

Barsak epitel hücreleri sadece konak-mikrobiyal ilişkisini düzenlemekle kalmaz aynı zamanda patojenik mikrobiyal ajanlara karşı bir savunma görevi görür. Bunu hem bir bariyer olarak hemde mukus ve antimikrobiyal peptidleri(AMP) salgılayarak yapmaktadır. Mikrobiyota gastrointestinal epitel hücrelerinin maturasyonunda önemli rol üstlenmektedir. Örneğin Bacteroides Thetaiotaomicron barsak epiteline glukoz girişine yardımcı olarak beslenmesini sağlamaya ve barsak peristaltizmini düzenlemeye yardımcı olur (103). B. thetaiotaomicron insan bağırsak florasının en yaygın bileşenlerinden biridir.

#### ***2.2.2.3. Beslenme üzerine etkileri***

İnsan enzimleri birçok kompleks karbonhidrat ve bitki polisakkaritlerinin sindirimini gerçekleştiremez. Selüloz, ksilanlar, sindirime dirençli nişasta ve inülin gibi bu karbonhidratlar mikrobiyotanın enerji ihtiyacı ve kısa zincirli yağ asitleri üretimi için kaynak oluştururlar. Asetat, bütirat ve propiyonat gibi bu yağ asitleri aynı zamanda inflamatuvar mediatör, vazodilatör olarak ayrıca barsak motilitesinin düzenlenmesi ve yara iyileşmesinde görev alırlar. Ek olarak bütirat kolon epitelini için; asetat ve propionat periferik dokular için enerji kaynağıdır (104). Karaciğer tarafından

lipogenez, glukoneogenez ve VLDL sentezi için kullanılırlar (105). Özellikle B. thetaiotaomicron ve Bifidobacterium genusu bu fonksiyonda etkilidir.

Mikrobiyota bilier asit metabolizmasında da etkilidir. Özellikle ileum bölgesindeki mikrobiyal popülasyon geri emilimden kurtulan safra asitlerini ve sekonder safra asitlerini dekonjuge eder. Safra asitleri ayrıca sinyal molekülleri olarak işlev görür (106). Safra asidi sentezi kontrol eden nükleer reseptör farnesoid X reseptörü(FXR) ve TGR-5 denilen resptörlere etki gösterir (107). Bu iki reseptör farelerde glukoz metabolizmasının modülasyonunda rol oynamaktadır; FXR primer safra asitleriyle aktive olur ve glukoz metabolizmasını bozarken TGR-5 ise sekonder safra asitleriyle aktive olmakta, glukoz metabolizmasına iyi yönde etki etmektedir (108-110). TGR-5 enterendokrin hücrelerden GLP-1 salınımını artırmaktadır. Bağırsak mikrobiyotası, safra asitlerinin etkileri; FXR ve TGR5 sinyal modülasyonu yoluyla lipid ve glikoz metabolizmasını kontrol ederek obezite ve tip 2 diyabet hastalıklarına etki etmektedir.

Mikrobiyota aynı zamanda kolin metabolizmasında etkilidir. İnsan dışkı mikrobiyotasındaki gama-proteobakteriler ve yüksek seviyelerde Erysipelotrichi hepatosteatoz ile ilişkilidir (111). Değiştirilmiş bağırsak mikrobiyal kompozisyonu ve kolini metabolize etme kapasitesi, NAFLD'nin yanı sıra glikoz homeostazını modüle etmede önemli bir rol oynayabilir. Kolesterol ve kolini işlemek için farklı kapasitelere sahip bağırsak mikrobiyomu kardiyovasküler hastalıkların gelişimine katkıda bulunmaktadır.

Yağda eriyen vitaminlerin emilimine mikrobiyota katkıda bulunmaktadır.

Oral yoldan verilen probiyotik ve prebiyotik içerikli ürünler birçok hastalığın tedavisinde kullanılabilmektedir.

- **Probiyotikler:** Konağın sağlığını olumlu yönde etkilediği düşünülen canlı mikroorganizmalardır. Lactobacillus ve Bifidobacterium cinsindeki birçok bakteri suşunun probiyotik olduğu düşünülmektedir. (yoğurt, kefir, ayran, turşu, tarhana, bira mayası)
- **Prebiyotikler:** Tüketildiklerinde barsak mikrobiyotasındaki konakçıya yarar sağlayan bir veya sınırlı sayıda mikrobiyal cins yada türün büyümesini, aktivitesini veya her ikisini seçici olarak uyaran sindirilemeyen gıda bileşenleridir (112). Kısaca probiyotiklerin çoğalmasını kolaylaştıran intestinal alanda fermente olan besinlerdir. Örneğin İnülin ve trans-galakto-oligosakkaritler bifidobacteriumların artışını sağlar. (Meyve, sebze, soğan, sarımsak, muz, tam tahıl ürünleri, kurubaklagiller)

#### ***2.2.2.3. Santral sinir sistemi ve nöropsikiyatride mikrobiyotanın önemi***

Son yıllarda yapılan çalışmalarda intestinal mikrobiyom ile nöropsikiyatrik hastalıklar arasındaki ilişkiler araştırılmıştır. Bağırsak bakterileri konakçı organ ve sistemleri için aktif metabolitler üretebilmektedir. Örneğin lactobacillus ve bifidobacterialar, monosodyum glutamattan gama-amino butirik asit (GABA) sentezleyebilmektedir (113). İntestinal bölgede bakteriler tarafından nörepinefrin, dopamin, serotonin gibi nörotransmitterlerin sentezi yapılmaktadır (114). Bifidobacterium İnfantis'in oral yoldan verildiği fare deneylerinde plazma triptofan düzeylerinde artış görülmüştür (115). Lactobacillus acidophilusun beyin sapındaki kannabinoid reseptörlerinin ekspresyonunu arttırdığı düşünülmektedir (116).

İnsan mikrobiyotası aynı zamanda ksenebiyotikler ve ilaç metabolizmasında da etkili olup çeşitli ilaçların metabolizasyonuna katkıda bulunur.

Endokrin sistemde çeşitli fonksiyonları vardır, hipotalamohipofizer aksın strese verdiği yanıtta görev üstlenmektedir.

### ***2.2.3. İntestinal Mikrobiyota, Mikrobiyom ile ilişkili hastalıklar***

İnsan mikrobiyotası ve mikrobiyomu çok sayıda ve çeşitlikte mikroorganizmalardan oluşmuş karmaşık bir sistemdir. Bu sistem bir vücut organı gibi düşünülmektedir. Diğer organlar gibi mikrobiyomun da fizyolojisi ve patolojisi vardır. Bu patoloji içeriğindeki popülasyonun kollektif veya bireysel olarak değişmesi, zarar görmesi şeklinde olmaktadır. Bu mikrobiyal patolojiler metagenomik çalışmalarla belirlenmektedir (117). Sağlıklı insanın mikrobiyotasına öbiyozis, hastalık durumunda oluşan sağlıklı mikrobiyotaya disbiyozis denmektedir (118). Birçok hastalıkta mikrobiyal bozulmalar saptanmıştır. Bu mikrobiyolojik hastalıkların teşhisi full metagenomik DNA sekanslama yöntemleriyle araştırılmaktadır (119, 120). Eskiden kültür bazlı çalışmalarda belli bir grup organizma disbiyozislerde saptanırken yeni nesil sekanslama yöntemleriyle daha ayrıntılı olarak çalışmalar yapılmaktadır. Bazı hastalıklarla disbiyozise sebep olan bakteri ailesi tür ve alttürlerine kadar saptanmaktadır.

Mikrobiyotayla arasında ilişkisi en çok araştırılan hastalıklar

- İrritabl barsak hastalıkları
- Obezite ve tip-2 DM gibi metabolik hastalıklar
- Hipertansiyon
- İnflamatuar barsak hastalıkları
- Depresyon, anksiyete bozukluğu
- Otoimmün ve alerjik hastalıklar (Örn:Çölyak)
- Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı
- Siroz ve komplikasyonları
- Kolon kanseri
- Meme kanseri
- Nekrotizan enterokolit
- Kalp hastalıkları

**Mikrobiyota ve inflamatuvar barsak hastalıkları:** İntestinal disbiyozis ile artmış inflamatuvar yanıt ve endotoksinler nedeniyle aktif olan immün sistem ile inflamatuvar barsak hastalıkları arasında ilişki olduğu düşünülmektedir. Yapılan insan çalışmalarının çoğunda inflamatuvar barsak hastalarında (hem crohn hem ülseratif kolit) bakteriyel mikrobiyotanın genelinde bir çeşitlilik kaybı ve Firmicuteslerde azalma (100, 121, 122), Proteobacteria miktarında artış görülmüştür (123, 124). Birçok çalışmada ortak bulgulara rağmen farklılıklar da mevcuttur. Genel olarak aktif inflamatuvar barsak hastalarında düşük *C. coccoides*, *C. Leptum*, *F. prausnitzii*, ve *Bifidobacterium* düzeyleri bulunmuştur.

**Obezite mikrobiyota ilişkisi:** Son zamanlarda yapılan çalışmalarda Tip-2 DM ve obezite gibi metabolik hastalıklarla mikrobiyota ilişkilendirilmiştir. Obezite mikrobiyotada disbiyozise sebep olmakla birlikte diyetten daha fazla enerji üretim yapabilen mikroorganizmaların artışı da görülmüştür. Bunun nedeni konakçı tarafından sindirilemeyen polisakkaritleri ayrıştırma, monosakkarit ve kısa zincirli yağ asidi (SCFA) üretimini arttırma kapasitesidir. Bununla birlikte, yağ kütlesindeki artış sadece daha fazla enerji üretiminden kaynaklanmakla kalmaz, aynı zamanda mikrobiyota endotoksemi, bağırsak geçirgenliği, insülin direnci, hormonal çevre, lipogenezi düzenleyen genlerin ekspresyonu, safra asitleri ile etkileşimdeki değişiklikler de bu duruma etki eder.

**Depresyonda** *Lactobacillus farciminis* gibi probiyotik bakteriler barsaklardan translokasyonu engelleyip, barsak-beyin ekseninde rol oynayan stres bağımlı moleküllerin etkilerini tersine çevirmektedir. Diğer taraftan *Lactobacillus helveticus*, **anksiyete** benzeri davranışların etkilerinin azaltılmasında ve serum kortizol seviyesinin düşmesinde rol oynamaktadır.

**Stres** ve onunla ilişkili olan hipotalamus-hipofiz-adrenal eksen, barsak mikrobiyotasının kompozisyonunu etkilemektedir.

**Tablo 9. Mikrobiyota da değişimler ve ilişkili olduğu hastalıklar (125).**

| <b>İntestinal mikrobiyotanın değişikliği ile ilişkili hastalıklar</b> |                                                 |                                                                                                                                                     |
|-----------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Hastalık</b>                                                       | <b>Değişiklik</b>                               |                                                                                                                                                     |
| <b>Allerji</b>                                                        | Lactobacillus spp. azalma                       | Erken kolonizasyon, allerjik mediyatörlerin oluşumunda/azalmasında önemlidir.                                                                       |
|                                                                       | Bifidobacterium adolescentis azalma             |                                                                                                                                                     |
|                                                                       | Clostridium difficile azalma                    |                                                                                                                                                     |
|                                                                       | Helicobacter pylori azalma                      |                                                                                                                                                     |
| <b>Çölyak Hastalığı</b>                                               | Bacteroides vulgatus artış                      | Erken yaşta kolonizasyon oranları, glutene oral toleransa sebep olabilmektedir.                                                                     |
|                                                                       | Escherichia coli azalma                         |                                                                                                                                                     |
|                                                                       | Clostridium coccoides azalma                    |                                                                                                                                                     |
| <b>Gastrik Kanser</b>                                                 | Helicobacter pylori artış                       | Adenokarsinom gelişiminde önemli etkiye sahiptir                                                                                                    |
| <b>Otizm</b>                                                          | Bacteroidetes artış                             | Kontrol grubuyla karşılaştırma sonucu azalmış bakteriyel çeşitlilik mevcuttur.                                                                      |
|                                                                       | Proteobacteria artış                            |                                                                                                                                                     |
|                                                                       | Actinobacteria azalma                           |                                                                                                                                                     |
|                                                                       | Firmicutes azalma                               |                                                                                                                                                     |
| <b>Obezite</b>                                                        | Bacteroidetes azalma                            | Bağırsakta artan Gram negatif bakteri oranı, dolaşımda lipopolisakkarit artışına sebep olur. Bu da kronik endotoksemi ve insülin direncini doğurur. |
|                                                                       | Lactobacillus artış                             |                                                                                                                                                     |
|                                                                       | Firmicutes/Bacteroidetes oranı azalma           |                                                                                                                                                     |
|                                                                       | Methanobrevibacter smithii azalma               |                                                                                                                                                     |
| <b>Tip-2 DM</b>                                                       | Firmicutes azalma                               | Bağırsakta artan Gram negatif bakteri oranı, dolaşımda lipopolisakkarit artışına sebep olur. Bu da kronik endotoksemi ve insülin direncini doğurur. |
|                                                                       | Clostridium azalma                              |                                                                                                                                                     |
|                                                                       | Bacteroides-Prevotella artış                    |                                                                                                                                                     |
|                                                                       | Clostridia coccoides-Eubacterium rectale azalma |                                                                                                                                                     |
|                                                                       | Betaproteobacteria artış                        |                                                                                                                                                     |
|                                                                       | Bacteroidetes/Firmicutes oranı artış            |                                                                                                                                                     |
| <b>Romatoid Artrit</b>                                                | Bifidobacteria azalma                           | Bağırsaklık sistemi üzerine etkilidir. Bazı bakteriyel metabolitler, pro-inflamatuvar moleküllerin üretilmesini tetikleyebilir.                     |
|                                                                       | Bacteroidetes azalma                            |                                                                                                                                                     |
| <b>Tip-1 DM</b>                                                       | Bacteriodes artış                               | Azalmış intestinal permeabilite ve inflamasyon sonrası, pankreas beta hücre hasarı oluşur.                                                          |
|                                                                       | Firmicutes azalma                               |                                                                                                                                                     |
|                                                                       | Akkermansia azalma                              |                                                                                                                                                     |
| <b>Hipertansiyon</b>                                                  | Veillonellaceae azalma                          | Artmış plazma asetat ve heptanoat seviyeleri ile mikrobiyota kompozisyonu, kan basıncı artışı ile ilişkilidir                                       |

#### **2.2.4. Siroz ve mikrobiyota, mikrobiyom ilişkisi**

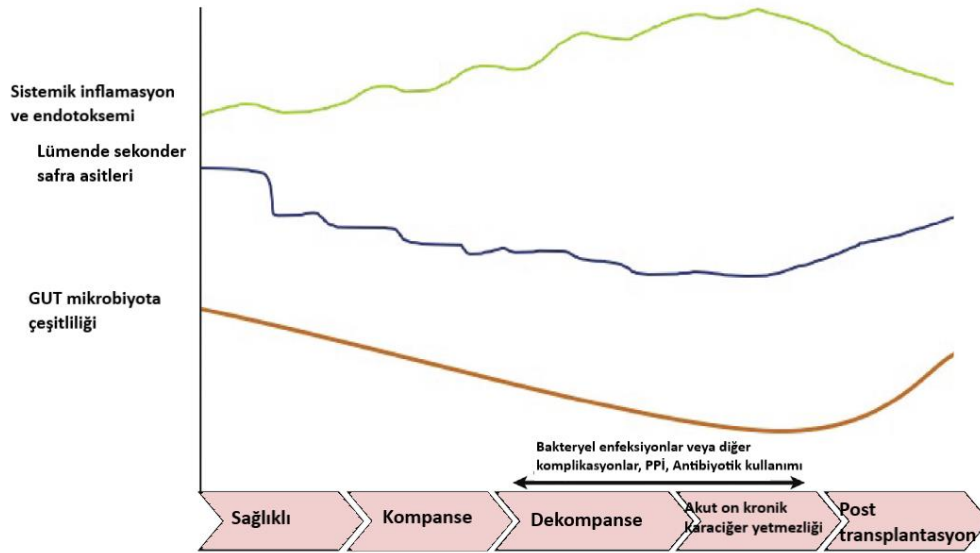
Siroz hastalarında sağlıklı popülasyondan farklı olarak mikrobiyotada değişiklikler gözlenir. Aynı zamanda siroz hastalığının tedavisinde sık kullanılan laktuloz, rifaksim, antibiyotikler veya asit baskılayıcı ajanların da kullanımı barsak ortamını değiştirmektedir (126, 127). Enterik disbiyoz, bakterilerin ve bakteri ürünlerinin barsak epitelinden traslokasyonunu artırır bu da sirozun kötüleşmesine katkıda bulunur (128-130). Bu bakteri ürünleri sonucuyla oluşan endotoksemi, periferik vazolitasyonu ve hiperdinamik sirkülasyonu artırarak dekompanasyona eğilimi artırır. Bu mikrobiyota değişikliklerini araştırmak için dışkıdan toplanan veya kolon mukozasından alınan (Örneğin sigmoid kolon) örneklerin ileri sekanslama yöntemleriyle bakterilerin 16S rRNA bölgesini kodlayan DNA sı hedef alınarak mikrobiyomun belirlenmesi yolu kullanılmaktadır.

Son çalışmalar, sirozu olan hastaların dışkı mikrobiyomunda, sağlıklı kişilerle karşılaştırıldığında, özellikle de yerleşik veya otokutanöz bakterilerin varlığı konusunda farklılıklar olduğunu göstermiştir (131). Otokutanöz bakteriler (özellikle firmicutes) vücudun hemostazından sorumlu bakterilerdir. Örneğin bu bakteriler kısa zincirli yağ asitleri(bütirat, palmitat, asetat) sentezi yaparlar ve sonuçta lokal intestinal bariyerin devamlılığına katkıda bulunurlar (132). Aynı zamanda kolon epitel hücrelerine besin kaynağı sağlarlar. Otokutanöz bakteriler primer safra asitlerinin sekonder safra asitlerine dönüşümünde görev alır. Safra asitleri de intestinal antimikrobiyal peptit sentezini sağlar ve bazı bakteriler için deterjan görevi görürler (133-135). Siroz hastalığında ortak bir özellik mikrobiyotadaki yararlı bakterilerin azalması ve potansiyel patojenik bakterilerin artmasıdır, sonuçta homeostaz bozulur. Otokutanöz bakteri oranının azaldığı özellikle gram (-) E.coli yada klebsiella gibi bakterilerin arttığı disbiyozis durumunda barsak epitel geçirgenliğinde artış ve savunma mekanizmalarında azalma, inflamasyon artışı, endotoksemi ve bunun sonucunda hipermetabolik sirkülasyon meydana gelmektedir.

Farklı etyolojilerdeki siroz hastalarında mikrobiyom benzerlik göstermektedir. Fakat alkolik karaciğer sirozunda bakılan fekal mikrobik toplulukta 16s rRNA gen bölgesi sekanslama metoduna göre yapılan kıyaslamalarda, prevotellaceae

familyasındaki bakterilerde, HBV ile ilişkili siroz hastalarından ve sağlıklı erişkinlerden önemli derecede fazlalık saptanmıştır (136). Son yapılan çalışmalarda bu disbiyozisin siroza sebep olan etyolojik faktör nedeniyle, henüz siroz gelişmeden oluşmaya başladığını öne sürmektedir.

Sirozlu hastalarda Bacteroidetes'lerin yoğunluğunun azaldığı buna karşın Proteobacteria ve Fusobacteria topluluklarının göreceli olarak arttığı görülmüştür. Gamma-proteobacteria sınıfı içindeki Enterobacteriaceae ve Pasteurellaceae'ların, çoğunlukla Proteobacteria'nın zenginleşmesine katkıda bulunduğu görülmüştür (136). 2014 yılında yapılan sirozlu hastaların mikrobiyotalarının incelenmesinde majör çalışmalardan olan 98 sirozlu ve 93 kontrol grubunun dışkısının alındığı bir çalışmada Bacteroidetes'lerde azalma, Proteobacteria düzeylerinde artış saptanmıştır (63).



**Şekil 5.** Sağlıklı erişkinden, kompanse siroz, dekompanse siroz, akut on kronik karaciğer yetmezliği ve transplantasyon sonrası intestinal alandaki temel değişiklikler

### 2.2.5. Sirozda mikrobiyom ve prognostik değişiklikler, siroz disbiyoz oranı (CDR)

Sirozdaki mikrobiyal disbiyoz paterni, otokutanöz taksonda bir düşüş ve patojenik taksonda (özellikle Proteobacteria) bir artışı takip etme eğilimindedir. Bu mikrobiyal disbiyoz paternini sirozda tanı ve prognostik tahmin için biyobelirteç olarak

kullanmak mantıklı olabilir. Sirozdaki disbiyoz derecesinin böyle bir ölçüsü siroz-disbiyozis oranıdır (CDR)(cirrhosis dysbiosis ratio) (137).

**CDR: Lachnospiraceae + Ruminococcaceae + Clostridiales incertae sedis XIV + Veillonellaceae ların, Enterobacteriaceae + Bacteroidaceae lara oranıdır.**

2014 de Bejaj ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, 219 sirozlu hasta ve 25 kontrol grubu sağlıklı hastanın dışkı mikrobiyotası incelenmiş. CDR, kontrol hastalarında (2.05) en yüksek, bunu kompanse (0.89), dekompanse (0.66) ve yatan hastalar (0.32,  $p < 0.0001$ ) izlemiştir (137). Aynı zamanda CDR, endotoksin ile negatif korelasyon göstermiştir (137). Düşük CDR'nin 30 günlük organ yetmezliği ve ölümle ilişkili olduğu görülmüştür. Dışkıda Bacteroidaceae ve Clostridiales XIV; MELD skorunun, HE öyküsünden bağımsız olarak 90 günlük hastaneye yatışları öngördüğü sonucuna varılmıştır. Hastaneye yatırılan hastalarda daha yüksek Enterococcaceae ve Enterobacteriaceae ancak daha düşük Bacteroidaceae, Clostridiales XIV, Lachnospiraceae ve Ruminococcaceae seviyeleri görülmüştür (138).

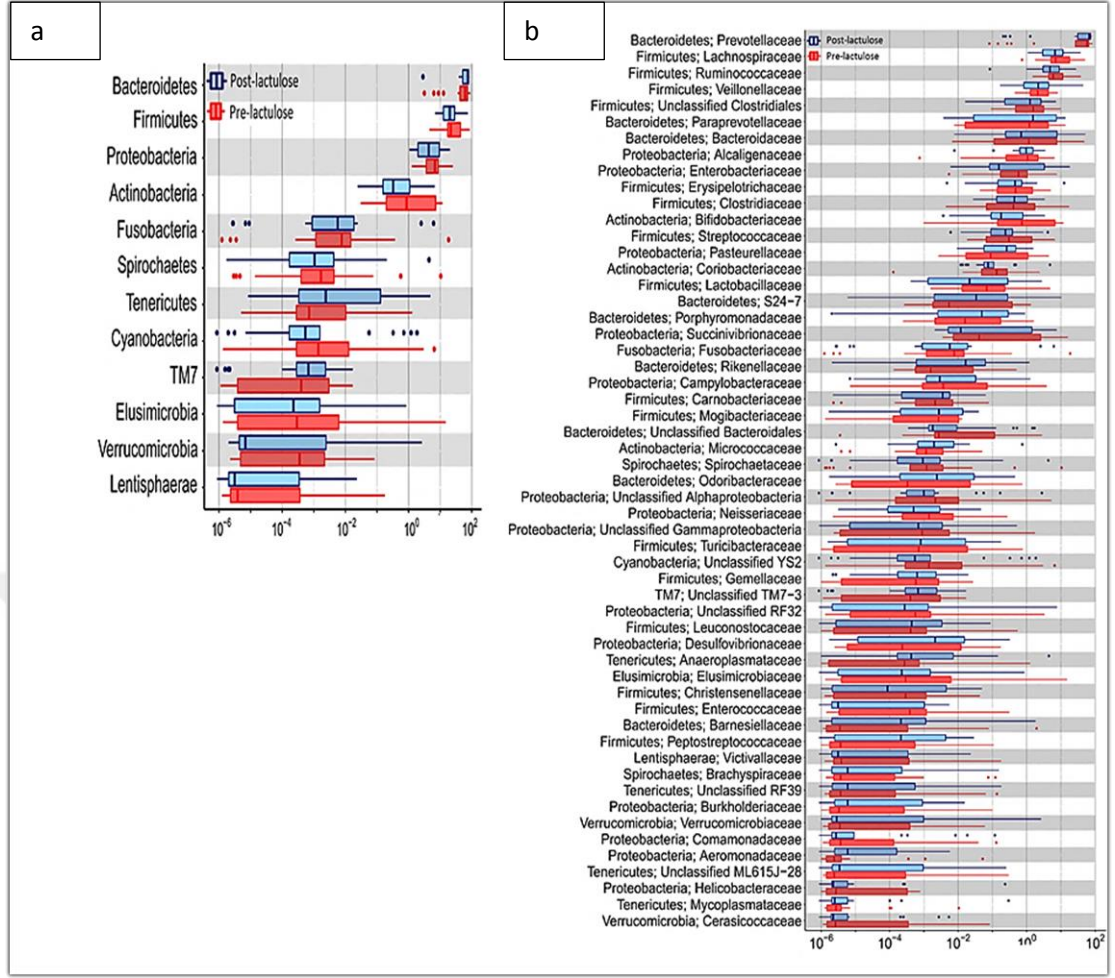
#### **2.2.6. Hepatik ensefalopati ve tedavisinde mikrobiyota, mikrobiyom ilişkisi**

Barsak mikrobiyotasının son dönem karaciğer sirozu komplikasyonlarında, sirozun dekompanse hale gelmesinde, özellikle spontan bakteriyel peritonit ve hepatik ensefalopati gelişiminde önemi büyüktür (64, 139). Örneğin Child-Pugh skoru artışı ile *Streptococcaceae* familyası artışının korele olduğu görülmüştür (136). Birçok klinik çalışmanın sonucuna göre, *Escherichia coli* ve *Streptococcus* sirozlu hastalarda bakteriyel enfeksiyonun ana nedenleridir. Sirozlu hastaların fekal mikrobiyotalarında Enterobacteriaceae ve Streptococcaceae artışı bu fenomeni açıklayabilir. Dekompanse sirozlu hastaların asit sıvısında, spontan bakteriyel peritonit olmadan da bakteriyel DNA translokasyonu görülmüştür; bu da hastalarda sistemik inflamatuvar yanıtı, endotoksemiye ve kliniğin kötüleşmesine sebep olmuştur (32, 33). Benzer mekanizma hepatik ensefalopati için de geçerlidir. Hepatik ensefaopatide intestinal disbiyozis nedeniyle ortamda üreyi parçalayan (üreaz aktif) bakterilerde artış olduğu görülmüştür (140). Bu bakteriler üreyi yıkıp ortamdaki amonyağı artırır. Değişen barsak motilitesi de bu durumun şiddetinin artmasını sağlar (141, 142). Hepatik

ensefalopati için yapılan tedavilerin çoğu bu amonyak üreten bakterileri hedeflemiştir (140, 143).

Barsak karaciğer arasındaki bu ilişkiyi anlamak, komplikasyonları tedavide ve önlemede bize yardımcı olmaktadır. Hepatik ensefalopati tedavisinde kullanılan laktülozun en önemli etkilerinden biri konakçı için faydalı olabilecek lactobacillus bakterilerini artırmak dolayısıyla üreaz üreten bakterilerin görece miktarını azaltmak yani bir çeşit prebiyotik olarak görev yapmaktır (144).

Buna karşın Sarangi ve arkadaşlarının 35 sirozlu hastalarda laktuloz tedavisi sonrası 21 hastadan alınan kontrol dışkı örnekleri 16S ribozomal RNA'nın V3 bölgesini hedefleyen DNA bölgesine illumina sekanslama tekniği uygulanmış. Laktuloz uygulamasının ardından mikrobiyotada anlamlı değişiklik olmadığı görülmüştür (145). (Şekil-6)



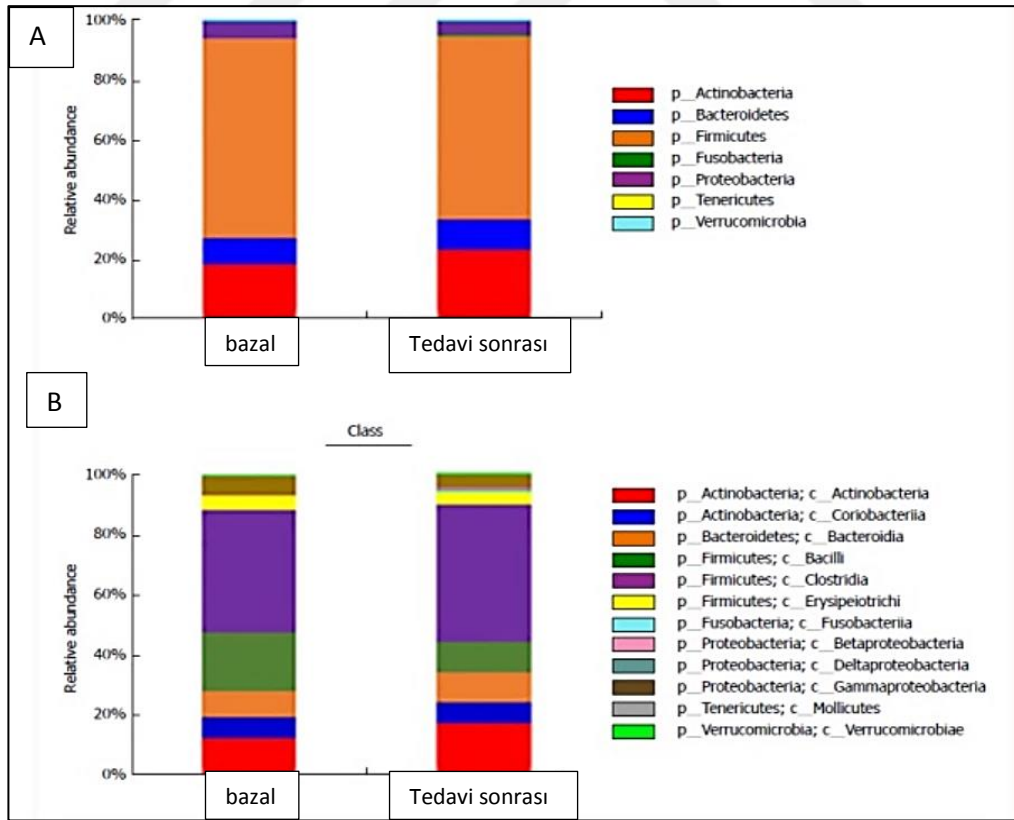
**Şekil 6.** Laktuloz uygulaması öncesinde ve sonrasında bağırsak mikrobiyotasında çeşitli bakteri gruplarının bolluğu. Açıklama: filum (a) ve aile (b) seviyelerinde laktuloz öncesi(kırmızı) ve sonrasında (mavi) karaciğer sirozu olan hastalarda bağırsak mikrobiyotası

Tabloda Veriler, kutu grafikleri(box-plots)(25. ila 75. persentiller) ve log 10 persentil ölçeğine göre değerlendirilmiş. Kutuların solundaki veya sağındaki noktalar uç değerleri gösterir. Hiçbir bakteri grubu arasında anlamlı bir farklılık gözlenmemiş. (p cut off değeri = 0.05; Benjamini-Hochberg prosedürü ile eşleştirilmiş t testi) (145).

Yine Bajaj ve arkadaşları, HE geliştiren hastalarda laktuloz tedavisine rağmen, daha düşük CDR ve gram negatif otokton dışı (Enterobacteriaceae, Bacteroidaceae) bakterilerin göreceli olarak fazlalığı nedeniyle olan disbiyozisde artış olduğunu göstermiştir (137). Bu, sirozlu hastalarda laktuloz uygulamasından sonra artmış otokton bakterileri (Lactobacillaceae) gösteren önceki kültür temelli çalışmaların aksini göstermektedir (144).

Hepatik ensefalopati tedavisinde kullanılan non-absorbl bir antibiyotik olan rifaksimin mikrobiyomu etkileyebilir ve HE'nin hafiflemesini sağlar (146). Birtakım çalışmalarda da probiyotiklerin minimal hepatik ensefalopatili hastalarda kognitif fonksiyonları iyileştirmekle birlikte endotoksemi ve inflamasyonu azalttığı gösterilmiştir (147, 148). Yapılan başka bir çalışmada Veillonellaceae'deki ılımlı bir azalma ve Eubacteriaceae'deki artış dışında, rifaximin ile tedaviden sonra önemli bir mikrobiyal değişiklik olmamıştır. Sonuç olarak rifaximin'in bilişsel gelişime yol açan etki mekanizmasının, sadece yararlı veya zararlı bakterilerin sayısını değiştirmek yerine mikrobiyota ile ilişkili metabolik fonksiyonlarının değişmesi ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir (149).

Yine Kosuko Kaji ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada 20 hepatik ensefalopati hastasına 4 hafta süre ile günde 3 kez 400 mg rifaksimin uygulaması gerçekleştirilmiş. 4 hafta sonunda hastalarda hiperamonyeminin iyileştiği, endotokseminin hiperamonyemi ile korele olarak azaldığı fakat mikrobiyomun majör komponentlerinde değişim görülmediği saptanmış (Şekil-7) (150).



**Şekil 7.** Rifaksimin tedavisinin insan GUT mikrobiyomundaki değişimine etkisi A: filum düzeyinde B: sınıf düzeyinde

Sirozlu hastalarda fekal ve kolonik mukozal örneklerden mikrobiyomu karakterize etmek için multitag pirosequencing tekniğini kullanan son randomize kontrollü çalışmalar, probiyotiklerin, laktuloz ve rifaksimın gibi spesifik antibiyotiklerin, disbiyozis ve HE'de iyileşmeye neden olduğunu ileri sürmekte, bu konuda farklı sonuçlar elde edilmekte ve çalışmalar devam etmektedir (151).

Bizim çalışmamızda amaç laktüloz ve rifaksimını birlikte kullanan hepatik ensefalopati hastalarının mikrobiyal değişiminin incelenmesidir, bu iki ilacın kombine kullanımı ile mikrobiyota değişikliği üzerine çalışma sayısı çok azdır.

### **3. MATERYEL METOD**

#### **3.1. Çalışma Tasarımı**

Marmara Üniversitesi Hastanesi Gastroenteroloji polikliniğine ve acil servise başvuran veya gastroenteroloji servisinde yatmakta (yatışının ilk 48 saati içinde) 5 hepatik ensefalopati, 4 kompanse siroz, 4 dekompanse siroz (ensefalopati harici) hastası çalışmaya dahil edilmiştir. Her bir hastaya çalışma detaylı olarak anlatılmış, hastanın çalışma ile ilgili soruları cevaplanmış ve aydınlatılmış onam formu imzalatılmıştır. Hastaların sosyodemografik ve antropometrik verileri, takibinde Child ve MELDNa skorları, varsa ensefalopati düzeyleri prospektif olarak kaydedildi. Her bir hastadan, günün ilk dışkılamasında, defekasyon sonrasında 1 dakika içinde 3-5 gr taze dışkı örneği alındı. Dışkı örneği steril olarak alındı ve yine steril ependorfa konularak daha sonra mikrobiyom analizinde kullanılmak üzere -80 santigrat derecede saklandı. Çalışmaya dahil edilen 5 hepatik ensefalopati hastasının ikinci veya daha sonraki ensefalopati atağı ile başvuran hastalardan seçildiğinden bu hastalara endikasyon dahilinde tedavi ve sonrasında profilaktik laktuloz (hasta özelliklerine göre 20-30gr/gün, 2-4 bölünmüş dozda, P.O.) ve rifaksimın (günde 2 kez 550mg dozunda, P.O.) başlandı ve 3 ay tedaviye devam

edildi. 3 ay takip sonrasında 5 hepatik ensefalopati hastasının 3 tanesinden tekrar dışkı örneği alınabildi. Diğer iki hasta tedavi tamamlanmasından önce ex olduğundan örnek alınamadı. Hastalar ilk dışkı alınan hepatik ensefalopatiler (HEI), 3.ayda dışkı alınabilen HE li hastalar (HEII), kompanse siroz grubu (KS), dekompanse siroz grubu (DS) olarak 4 gruba ayrıldı. 3 ay arayla alınan her iki dışkı örneğinin mikrobiyotası karşılaştırıldı. Aynı zamanda önceden alınan 4 kompanse (KS) ve 4 dekompanse (DS) hastaların mikrobiyotaları da karşılaştırıldı.

### **3.2. Çalışmaya Dahil Edilme Kriterleri**

- Aydınlatılmış onam formunu imzalamayı kabul etmesi, 18 yaş ve üzeri, 75 yaş ve altı olması
- Karaciğer sirozu ile takip edilmesi
- Hepatik ensefalopati grubuna dahil edilen hastaların en az 2. atağı şeklinde başvurması

### **3.3. Çalışmadan Dışlanma kriterleri**

- Son 3 ay içinde antibiyotik, prebiyotik veya probiyotik kullanımı
- Geçirilmiş abdominal operasyon.
- 2 hafta içinde laktuloz kullanılması
- Hepatosellüler karsinom mevcudiyeti
- Gastrointestinal sistem malignitesi mevcudiyeti
- Yatan hastaların yatışından 48 saatten fazla geçmesi

### **3.4. Barsak Mikrobiyota Tayini**

#### **3.4.1. Feçes Toplanması**

Çalışmaya Katılan tüm bireylerden feçes örnekleri “ZymoResearch DNA/RNA Shield™” koruyucu solüsyon içine alınmış ve barsak mikrobiyota tayini -86 °C’de muhafaza altında saklanmaktadır. Fekal örnekleri saklanırken koruyucu içinde tamamen çözünene dek vortekslenmiştir. Koruyucu ile çözünmüş fekal örnekleri oda sıcaklığında iki yıla kadar korunarak kalabilir.

### 3.4.2. Mikrobiyal DNA ekstraksiyonu

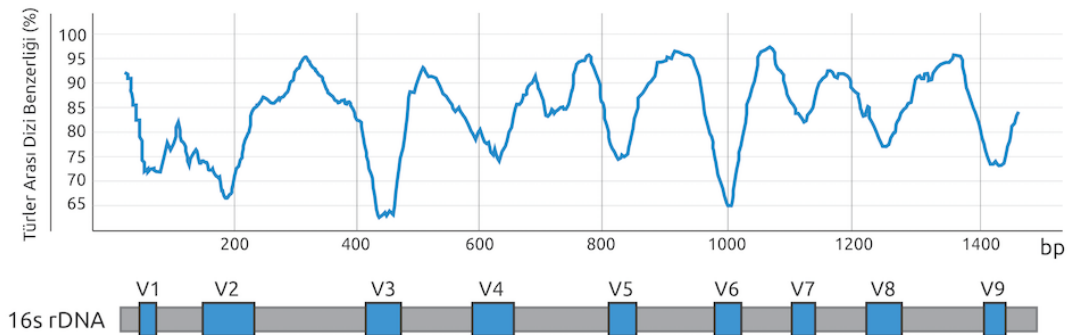
Koruyucu solüsyonda saklanmış feçes örneklerinden “QIAmp DNA Mini Kit” (Qiagen, Germany) ile üretici firmanın talimatnamesine göre bakteriyel DNA izolasyonu yapılmıştır.

### 3.4.3. DNA Yoğunluğu ve Saflığı Ölçümü

İzole edilen DNA’ların optik yoğunlukları (OD) 260 nm’de Qubit floremetrede “Qubit DSDNA BR Assay Kit” ile ölçülerek stoklardaki DNA miktarları tayin edilmiştir. Elde edilen değerlere göre tüm DNA örneklerinin son konsantrasyonu 5 ng/μl olacak şekilde DNA sulandırılmaları hazırlanmıştır. Böylece PZR ile çoğaltılacak tüm başlangıç konsantrasyonları eşitlenmiş ve stoklar korunmuş oldu. Ayrıca DNA ekstraksiyonu kontaminasyon varlığı ve saflık tayini için %0,5’luk standart agaroz jelde yürütüldü. Yetersiz miktarda ya da uygun olmayan DNA ekstraksiyonu durumunda tekrar dokulardan ekstraksiyon yapıldı.

### 3.4.4. Hedef Gen Bölgesinin Amplifikasyonu ve Kütüphane Hazırlama

Genellikle 16S rDNA olarak adlandırılan ve ribozomal RNA kodlanmasını sağlayan 1500 baz uzunluğundaki gen, büyük oranda tüm bakterilerde bulunmaktadır. Gen içerisinde son derece korunmuş bölgeler yer almakla beraber, aynı zamanda farklı bakteri türlerinin filogenetik olarak sınıflandırılmasına olanak verecek kadar değişken bölgeler de bulunmaktadır. Farklı türler arasındaki 16S rDNA bölgelerindeki dizi farklılıkları, evrimsel uzaklığa orantılı olarak artmaktadır. Bu sebeple 16S rDNA dizisi, farklı bakteri türlerinin belirlenmesinde bir belirteç olarak kullanılmakta ve bakteri popülasyonların hızlı bir şekilde tayin edilmesine olanak sağlamaktadır (şekil 8).



Şekil 8. 16S rDNA ve türler arası dizi benzerliği

Şu ana kadar yapılmış çok sayıda çalışma ile kültür ve çevresel örneklerde yer alan sayısız bakteriyel türün 16S rDNA dizileri çıkarılmıştır. Bu diziler, GreenGenes, Ribosomal Database Project ve SILVA da dahil olmak üzere daha bir çok veri tabanında kayıt altına alınmıştır. Yeni nesil dizileme gibi yöntemlerle elde edilen yüksek hacimli dizi verileri, bu veritabanları ile kıyaslanarak tespit edilen DNA parçalarının hangi türe ait olduğu tespit edilebilmektedir.

16S rRNA genlerinin V3-V4 değişken bölgeleri aşağıda dizisi verilen Forward ve Reverse primerleri kullanılarak PCR ile amplifiye edildi. 16S rDNA V3-V4 bölgelerinin zenginleştirilmesi için 16S Forward ve 16S Reverse kodlu 16S Universal Eubakteriyal primerler kullanıldı. İlgili primerler Klindworth vd. (gerçekleştirdiği kapsamlı çalışmada, en yüksek etkinliğe sahip primer seti olarak saptanmış primerlerdir.

- 16S Amplicon PCR Forward Primer:

5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG-3'

- 16S Amplicon PCR Reverse Primer:

5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC-3'

Projede, kütüphane hazırlığı sırasında 2 basamaklı PCR işlemi gerçekleştirilmiştir. Her bir PCR aşamasında KAPA HiFi HotStart ReadyMix kullanıldı.

### 3.4.5. PCR Aşaması: Amplikon PCR

**Tablo 10. Amplikon PCR aşaması**

| PCR Bileşenleri                  | Miktarı (1X)           |
|----------------------------------|------------------------|
| Mikrobiyal DNA (5 ng/µl)         | 2.5 µl                 |
| Amplikon PCR Forward Primer 1 µM | 5 µl                   |
| Amplikon PCR Reverse Primer 1 µM | 5 µl                   |
| 2x KAPA HiFi HotStart ReadyMix   | 12.5 µl                |
| Total                            | 25 µl                  |
|                                  |                        |
| PCR Isısal Döngü Sıcaklıkları    |                        |
|                                  |                        |
| 95°C'de 3 dakika                 | Başlangıç Denatürasyon |
| PCR Döngüsü                      |                        |

|                    |           |                 |          |
|--------------------|-----------|-----------------|----------|
| 95°C               | 30 saniye | Denatürasyon    | 25 döngü |
| 55°C               | 30 saniye | Bağlanma        |          |
| 72°C               | 30 saniye | Uzama           |          |
|                    |           |                 |          |
| 72°C               | 5 dakika  | Son uzama       |          |
| Amplikon büyüklüğü |           | Yaklaşık 550 bp |          |

Amplikon PCR sonrasında, PCR ürünleri agaroz jel üzerinde 100bp DNA marker ile birlikte yürütülerek görüntülendi. Doğru hedef bölge büyüklüğünü işaret eden ve “non-spesifik” bant içermeyen PCR ürünleri, “SERA-MAG SELECT” manyetik boncuk temelli yöntem kullanılarak “magnetic stand” üzerinde saflaştırıldı.

#### 3.4.6. PCR Aşamaları: İndeks PCR

**Tablo 11. İndeks PCR aşaması**

| PCR Bileşenleri                  |           | Miktarı (1X)           |         |
|----------------------------------|-----------|------------------------|---------|
| PCR ürünü DNA (5 ng/μl)          |           | 5 μl                   |         |
| Nextera XT Index Primer 1 (N7xx) |           | 5 μl                   |         |
| Nextera XT Index Primer 2 (S5xx) |           | 5 μl                   |         |
| 2x KAPA HiFi HotStart ReadyMix   |           | 25μl                   |         |
| PCR grade su                     |           | 10                     |         |
| Total                            |           | 50 μl                  |         |
|                                  |           |                        |         |
| PCR Isısal Döngü Sıcaklıkları    |           |                        |         |
|                                  |           |                        |         |
| 95°C’de                          | 3 dakika  | Başlangıç Denatürasyon |         |
| PCR Döngüsü                      |           |                        |         |
| 95°C                             | 30 saniye | Denatürasyon           | 8 döngü |
| 55°C                             | 30 saniye | Bağlanma               |         |
| 72°C                             | 30 saniye | Uzama                  |         |
|                                  |           |                        |         |
| 72°C                             | 5 dakika  | Son uzama              |         |
| Amplikon büyüklüğü               |           | Yaklaşık 630 nükleotit |         |

İndeks PCR sonrasında, PCR ürünleri agaroz jel üzerinde 100bp DNA marker ile birlikte yürütülerek görüntülendi. Doğru hedef bölge büyüklüğünü işaret eden ve “non-spesifik” bant içermeyen PCR ürünleri, “SERA-MAG SELECT” manyetik boncuk temelli yöntem kullanılarak “magnetic stand” üzerinde saflaştırıldı.

#### **3.4.7. Kütüphane Kantifikasyonu Normalizasyonu ve Kütüphane Havuzu Oluşturma**

İndeks PCR sonrası, PCR ürünleri manyetik boncuk temelli yöntem ile saflaştırıldıktan sonra “Qubit dsDNA HS Assay Kit” ile florometrik olarak çift zincirli DNA ürünlerini konsantrasyon ölçümleri yapıldı. Hazırlığı tamamlanan ve kalite kontrolü geçen bireysel kütüphanelerin her biri eşit molariteye getirildikten sonra tek bir tüp içinde birleştirildi. Birleştirilen kütüphane, 30-50 pM konsantrasyon aralığına getirilerek, yeni nesil dizileme platformuna yüklenmeye hazır hale getirildi.

#### **3.4.8. Dizileme**

Dizileme basamağında, illumina iSeq yeni nesil dizileme platformu kullanılmış olup dizileme reaksiyonu “iSeq il Reagent Kit”in talimatlarına göre yapıldı. Her bir örnek için okuma sayısı>100.000 oldu.

### **3.5. Veri Kalite Kontrolü ve Biyoinformatik Analiz**

Analiz QIIME2 versiyon 2019.10 kullanılarak yapıldı. Fastq dataları paired-end demux kullanılarak demultiplex yapıldı. Q2vsearch kullanılarak okumalar birleştirildi. Sekansın biyolojik olmayan kısımları (primer gibi) okumalarımızdan çıkarıldı.

Kalite kontrol analizi için Deblur kullanıldı. Kalite skorları eklenerek, kalite filtrelemesi yapıldı. Bu filtreleme için QIIME’in quality-filter q-score özelliği kullanıldı. Analizin denoising kısmı için Qiime deblur denoising-16S methodu kullanıldı.

Geriye kalan okumalar OTU tablosuna dönüştürüldü. Vsearch ve uclust analizi kullanılarak oluşturulan OTU tablomuzda kapalı referans olarak Silva-132-99-nb databazı kullanılarak taksonomik analiz yapıldı. FastTree tool kullanılarak filogenetik ağaç oluşturuldu.

### **3.5.1. Alfa ve Beta Çeşitlilik Analizi**

Alfa ve Beta çeşitlilik metriklerinin hesaplanması için Qiime2'nin çeşitlilik analizleri kullanıldı (q2 diversity)

Alfa çeşitliliği

- Shannon'ın çeşitlilik endeksi (topluluk zenginliğinin nicel bir ölçüsü)
- Gözlemlenen OTU'lar (topluluk zenginliğinin nitel bir ölçüsü)
- Faith's Filogenetik Çeşitliliği (özellikler arasında filogenetik ilişkileri içeren zenginliği ölçüsü)
- Eşitlik (veya Pielou'nun Eşitliği; topluluk eşitliğinin bir ölçüsü)

Beta çeşitliliği

- Bray-Curtis mesafesi (topluluk farklılığının nicel bir ölçüsü)

## **3.6. Gruplar Arası Karşılaştırma**

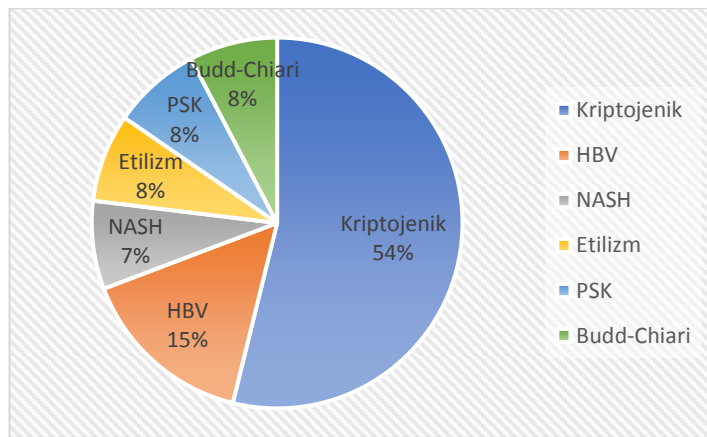
İstatistik analiz için R programı kullanıldı. Parametrik olmayan numerik datalarımız için iki grup karşılaştırılmalarında Mann-Whitney U test (wilcoxon test) kullanıldı.  $P < 0.05$  alındı. İki'den fazla grubun karşılaştırıldığı analizlerde Kruskal-Wallis Test yapıldı ve ggplot kullanılarak grafik oluşturuldu.

#### 4. BULGULAR

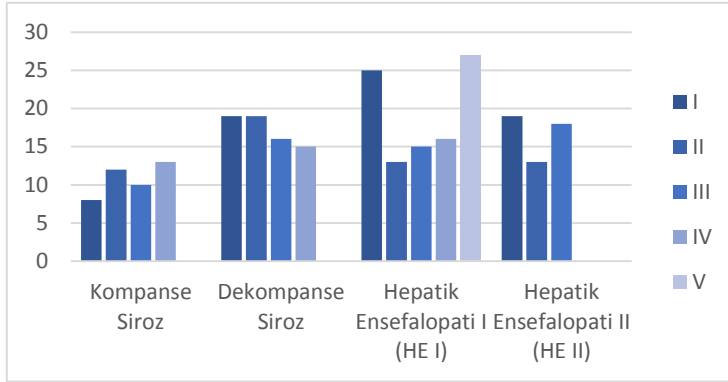
Çalışmaya dahil edilen 13 hastanın yaş ve cinsiyet dağılımları, siroz etyolojileri, hepatik ensefalopati gradeleri, CHİLD ve MELDNa skorları tabloda gösterilmiştir.

**Tablo 12. Çalışmaya katılan siroz hastalarının cinsiyet, yaş, etyoloji, CHİLD, MELDNa skorları ve gruplandırılması. NOT: M2 kodu M1 hastasının; M4, M3 hastasının ve M6, M5 hastasının 3. aydaki kontrolünü gösterir.**

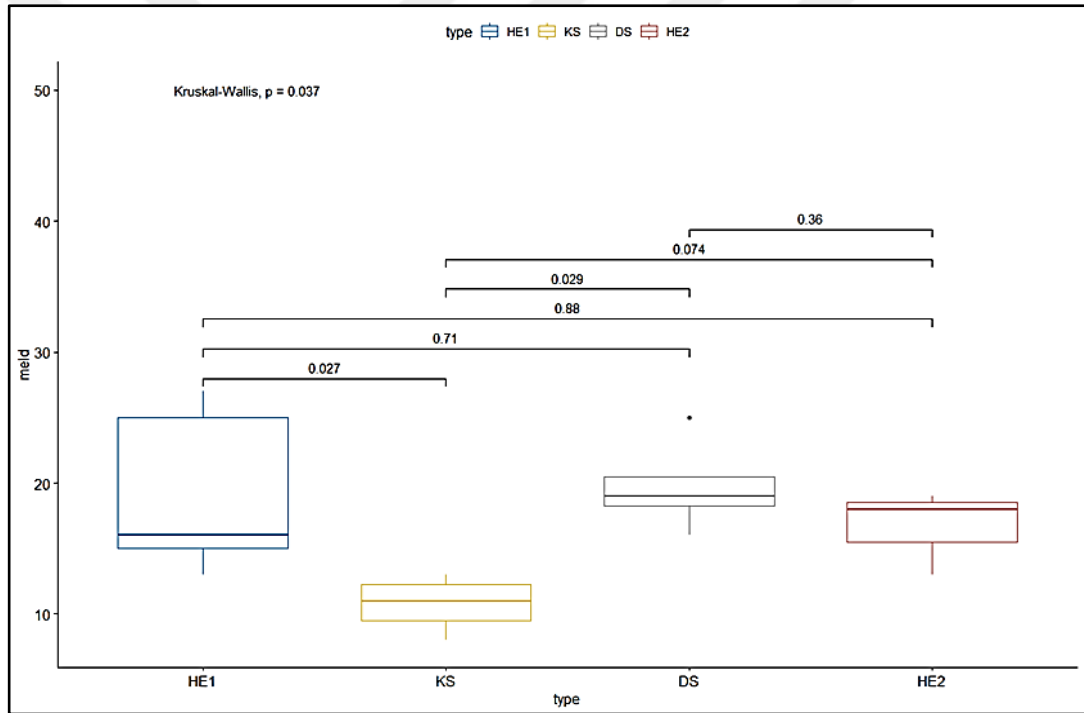
| KODLAR |       | Cinsiyet | Etyoloji    | Yaş | HEPATİK ENSEFALOPATİ GRADE | MELD Na | CHİLD |
|--------|-------|----------|-------------|-----|----------------------------|---------|-------|
| M1     | HE I  | K        | KRİPTOJENİK | 63  | GRADE 2                    | 25      | C     |
| M2     | HE II | K        |             | 63  | -                          | 19      | B     |
| M3     | HE I  | E        | KRİPTOJENİK | 40  | GRADE 1                    | 13      | B     |
| M4     | HE II | E        |             | 40  | -                          | 13      | B     |
| M5     | HE I  | E        | KRİPTOJENİK | 75  | GRADE 3                    | 15      | C     |
| M6     | HE II | E        |             | 75  | -                          | 18      | B     |
| M7     | KS    | K        | KRİPTOJENİK | 58  | -                          | 8       | A     |
| M8     | KS    | E        | PSK         | 66  | -                          | 12      | A     |
| M9     | KS    | E        | ETİLİZM     | 52  | -                          | 10      | A     |
| M10    | DS    | E        | BUDD-CHİARİ | 31  | -                          | 19      | B     |
| M11    | HE I  | E        | HBV         | 74  | GRADE 3                    | 16      | C     |
| M12    | KS    | E        | KRİPTOJENİK | 39  | -                          | 13      | A     |
| M13    | HE I  | K        | KRİPTOJENİK | 72  | GRADE 2                    | 27      | C     |
| M14    | DS    | K        | NASH        | 61  | -                          | 19      | B     |
| M15    | DS    | E        | HBV         | 32  | -                          | 16      | B     |
| M16    | DS    | E        | KRİPTOJENİK | 25  | -                          | 25      | C     |



**Şekil 9. Çalışmaya katılan siroz hastalarının etiyolojik dağılımı %100=13 hasta**



**Şekil 10.** Çalışmaya katılan hastaların gruplara göre MELDNa skorları



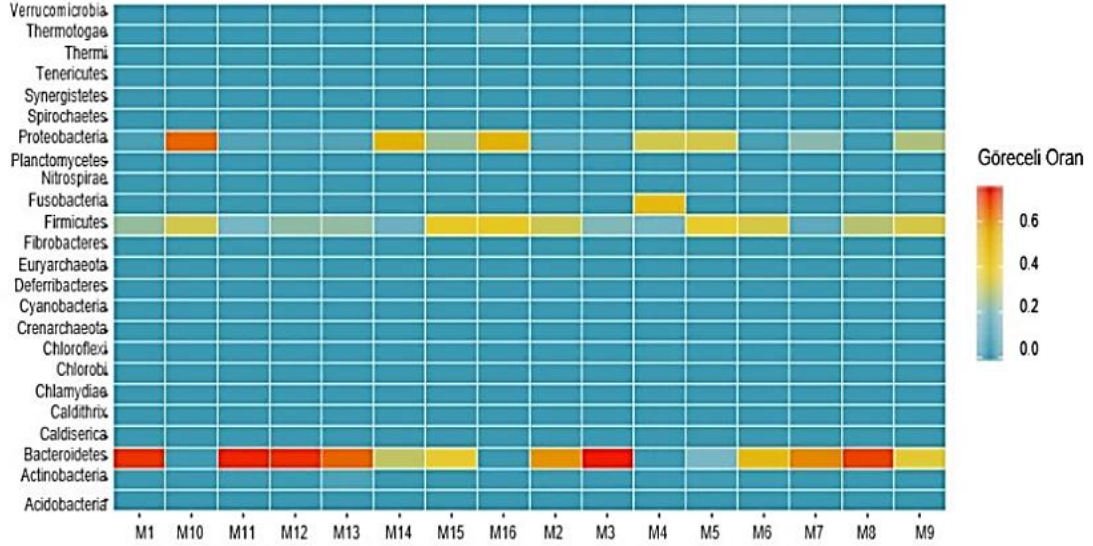
**Şekil 11.** Çalışmaya katılan hastaların grupları ile MELDNa skorlarını gösteren grafik

Hepatik ensefalopati hasta grubunun (HE-I) ve dekompanse siroz (DS) grubunun MELDNa skorları, KS grubu hastaların MELDNa skorlarından istatistiksel olarak anlamlı derece yüksek görüldü (sırasıyla  $p=0,027$  ve  $p=0,029$ ). Yine HE-I hasta grubunun, HE-II grubu ve dekompanse siroz grubuyla arasında anlamlı bir MELDNa skoru farkı görülmedi (sırasıyla  $p=0,88$ ,  $p=0,71$ ).

## 4.1. Taksonomi

### 4.1.1. Filum(phylum)

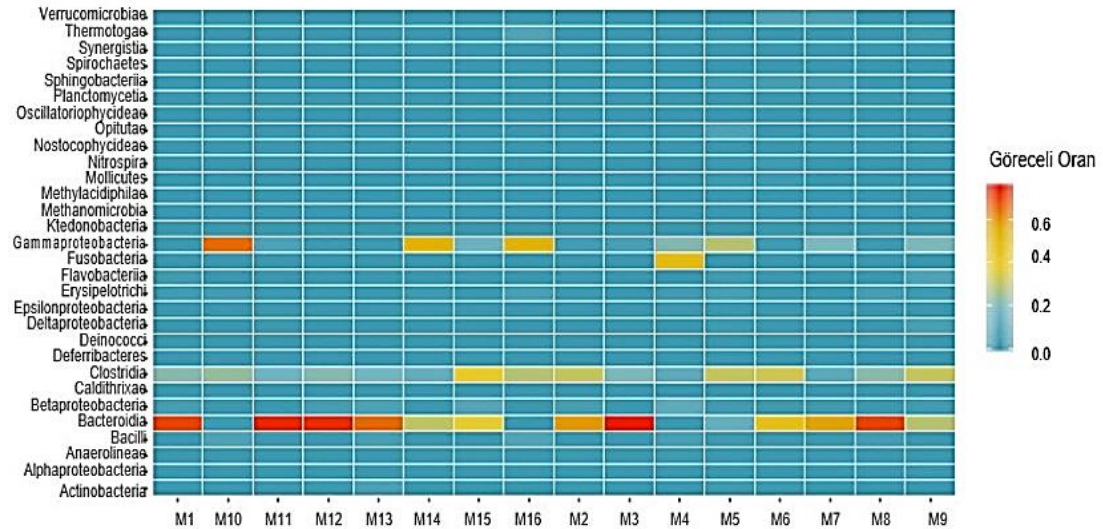
Metagenomik analiz sonucunda, tüm örneklerde toplamda 24 filum tespit edilmiştir. 24 filum aşağıdaki grafikte gösterilmiştir.



Şekil 12. Metagenomik analiz sonucunda tüm örneklerde tespit edilen filumlar

### 4.1.2. Sınıf (Clas)

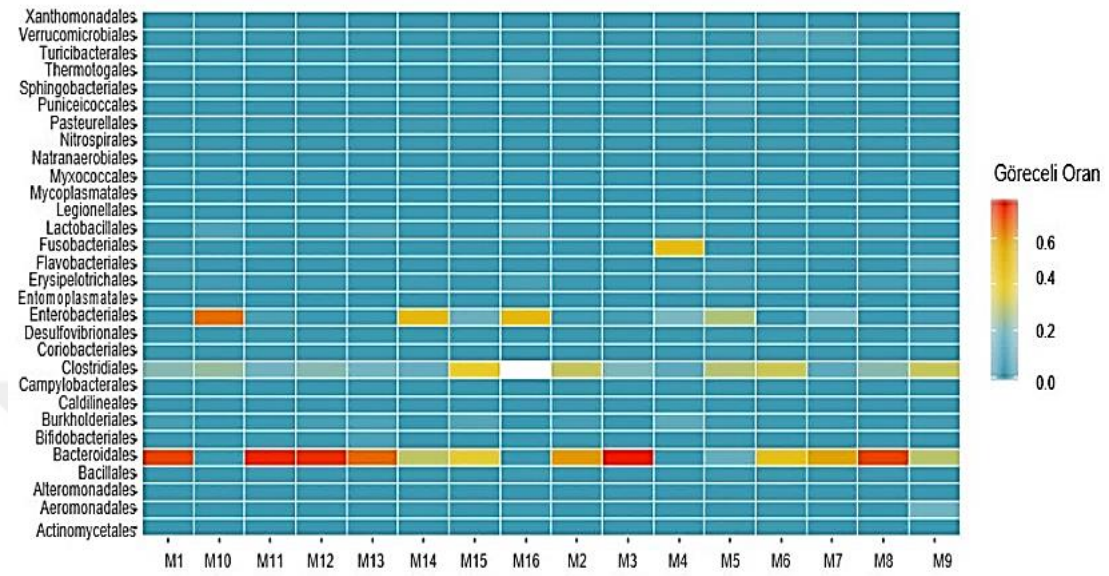
Metagenomik analiz sonucunda, tüm örneklerde toplamda 49 sınıf tespit edilmiştir. En yüksek oranda görülen ilk 30 sınıf aşağıdaki grafikte gösterilmiştir.



Şekil 13. Metagenomik analiz sonucunda tüm örneklerde tespit edilen ilk 30 sınıf

#### 4.1.3. Takım (Order)

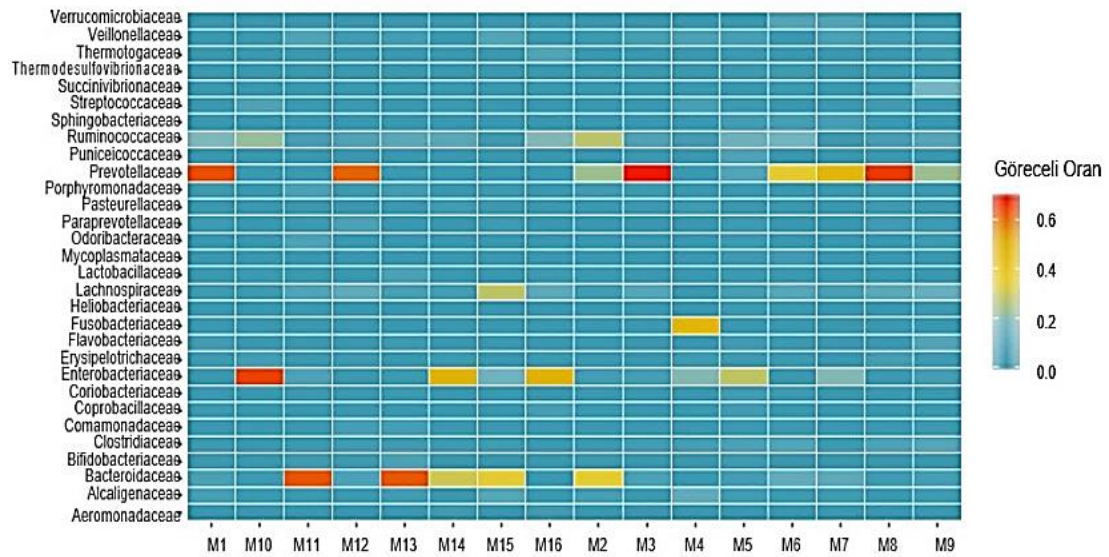
Metagenomik analiz sonucunda, tüm örneklerde toplamda 100 takım tespit edilmiştir. En yüksek oranda görülen ilk 30 takım aşağıdaki grafikte gösterilmiştir.



Şekil 14. Metagenomik analiz sonucunda tüm örneklerde tespit edilen ilk 30 takım

#### 4.1.4. Aile (Family)

Metagenomik analiz sonucunda, tüm örneklerde toplamda 217 aile tespit edilmiştir. En yüksek oranda görülen ilk 30 aile aşağıdaki grafikte gösterilmiştir.

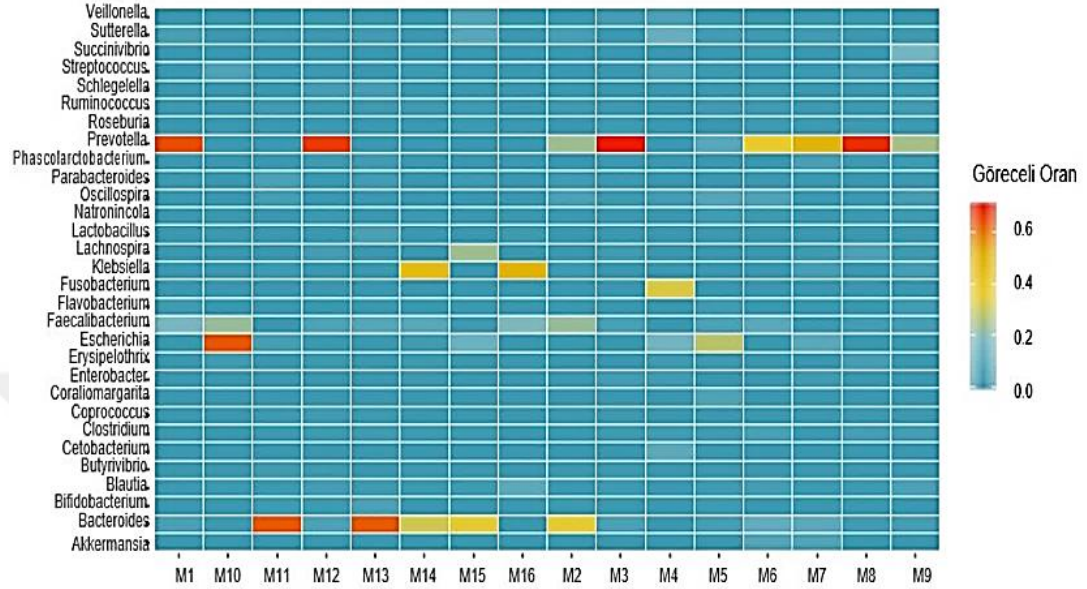


Şekil 15. Metagenomik analiz sonucunda tüm örneklerde tespit edilen ilk 30 aile

#### 4.1.5. Cins (Genus)

Metagenomik analiz sonucunda, tüm örneklerde toplamda 541 cins tespit edilmiştir.

En yüksek oranda görülen ilk 30 cins aşağıdaki grafikte gösterilmiştir.

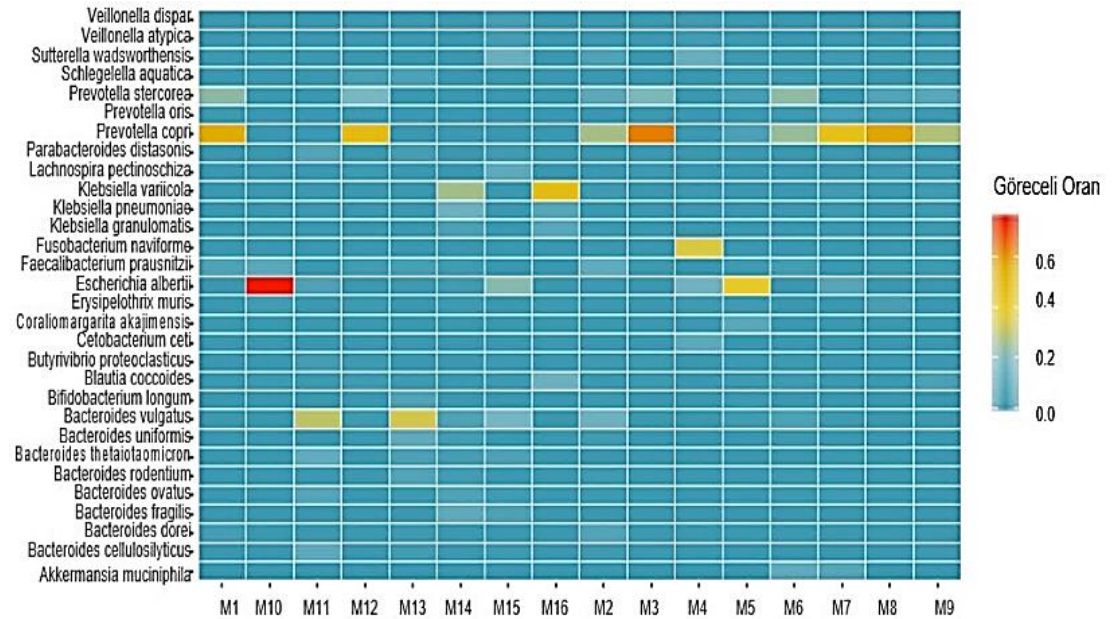


Şekil 16. Metagenomik analiz sonucunda tüm örneklerde tespit edilen ilk 30 cins

#### 4.1.6. Tür (Species)

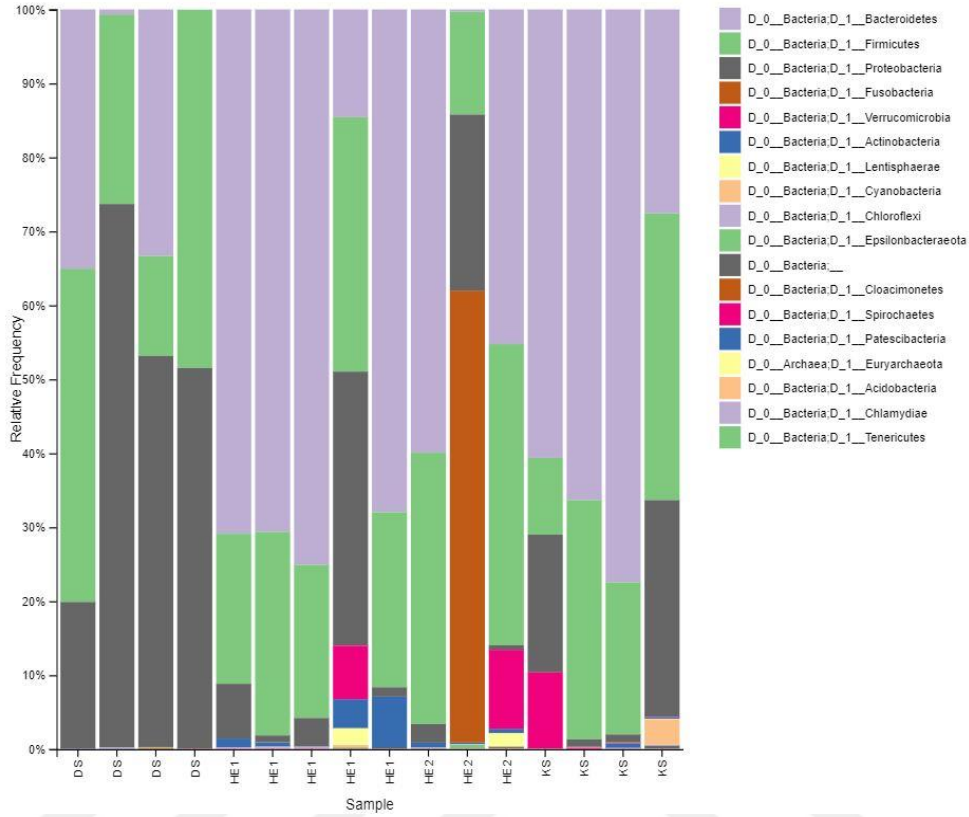
Metagenomik analiz sonucunda, tüm örneklerde toplamda 932 tür tespit edilmiştir.

En yüksek oranda görülen ilk 30 tür aşağıdaki grafikte gösterilmiştir.



Şekil 17. Metagenomik analiz sonucunda tüm örneklerde tespit edilen ilk 30 tür

## 4.2. Mikrobiyota ve Mikrobiyom Analizi



**Şekil 18.** Dekompanse siroz (DS), Hepatik ensefalopati tedavi öncesi (HE-I), hepatik ensefalopati tedavi sonrası (HE-II), kopmanse siroz (KS) hasta gruplarının mikrobiyotası (filum düzeyinde)

Çalışma gruplarındaki hastaların dışkılarının oluşturduğu bakteri gruplarının filum düzeyinde görünümü yukarıdaki grafikte gösterilmiştir. Grafiğe göre dekompanse siroz hastalarında proteobacteria filumundaki artış dikkati çekmiştir. DS grubundaki tüm hastalar göz önünde bulundurulduğunda mikrobiyotalarının ortalama %49'u Proteobacteria'lerden oluşturmuştur. HE-I grubunda proteobacterilerin ortalama oranı %10, HE-II grubunda %9 ve KS grubunda %12 dir.

HE-I hastalarında Bacteroidetesler de ortalama yoğunluğu %60 iken tedavi sonrası HE-II grubu dışkılarında mikrobiyotanın ortalama %35 düzeyinde görülmüştür. Yine tedavi sonrasında firmicutes filumunun oranı HE-I de %25 iken HE-II grubunda %30 a yükselmiştir.

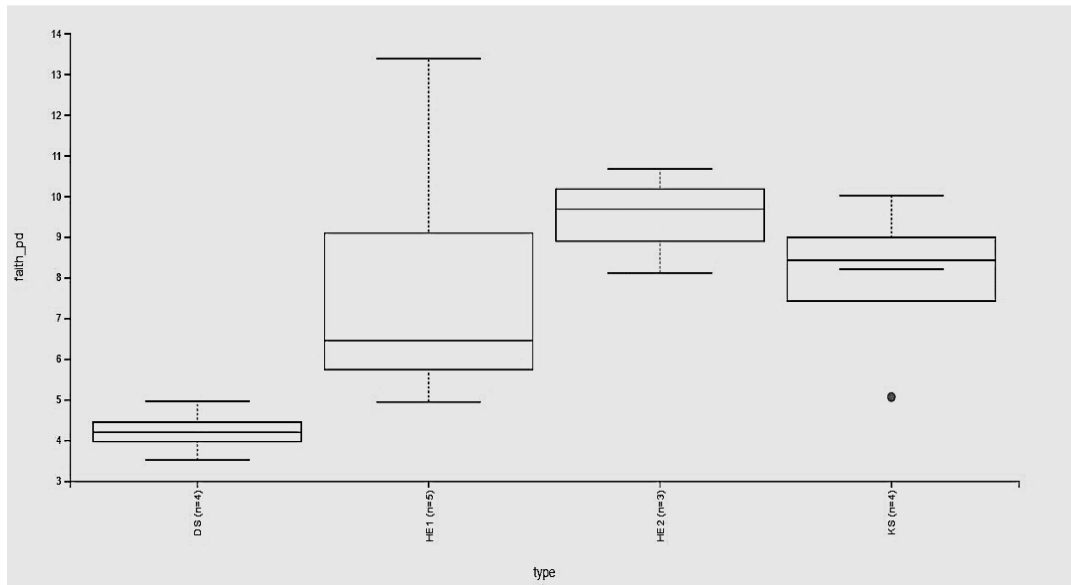
Ayrıca HE-I grubunda, HE-II grubuna ve diğer hasta gruplarına kıyasla actinobacteria filumunda artış tespit edilmiştir.



Şekilde ve grafikte de görüldüğü üzere KS ve DS grupları arasında enterobacteriaceae lar karşılaştırıldığında DS grubunda mikrobiyotada enterobacteriaceae artışı istatistiksel olarak anlamlı görülmüştür.( $p=0,029$ ). HE-I ve HE-II grupları arasında enterobacteriaceae veya başka bir bakteri ailesinde anlamlı bir farklılık görülmemiştir.

#### 4.2.1. Gruplar arasındaki alfa-diversity analiz sonuçları

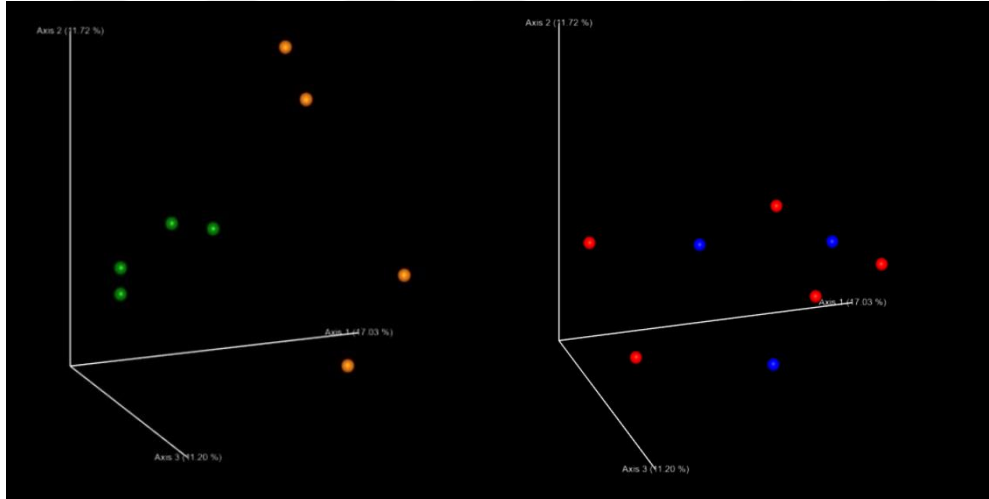
Kompanse siroz, dekompanse siroz, hepatik ensefalopati-I ve Hepatik ensefalopati-II grupları arasında bakteri tür çeşitliliğinin niceliksel olarak karşılaştırılması Qiime-2 programı kullanılarak yapılmıştır. Analiz sonucunda dekompanse siroz grubunda (DS) ki bakteri tür çeşitliliğinin kompanse siroz grubuna göre anlamlı olarak azaldığı saptanmıştır. ( $p=0,02$ ). Benzer şekilde DS li hastalardaki bakteri tür çeşitliliği; HE-I ve HE-II ye göre de anlamlı olarak azaldığı görülmüştür (sırasıyla,  $p=0,027$ ,  $p=0,033$ ). Bunula birlikte tedavi sonrası hepatik ensefalopatili hastalarda (HE-II) bakteri tür ve çeşitliliği yükselmiş olmasında rağmen tedavi öncesine göre (HE-I) anlamlı bir farklılık saptanmamıştır( $p=0,29$ ). Hepatik ensefalopatili hastalarda tedavi öncesi ve sonrası mikrobiyotada kompanse siroz hastalarında göre anlamlı bir farklılık saptanmamıştır ( $p=0,80$ ,  $p=0,47$ ). Bu sonuçlar box-plots şekil olarak (şekil-21) ve istatistiksel karşılaştırmalarla (tablo-13) gösterilmiştir.



**Tablo 13. DS, KS, HE-I ve HE-II hasta gruplarında alfa-diversity karşılaştırmasının istatistiksel değerleri**

|           |           | H         | p-değeri | q-değeri |
|-----------|-----------|-----------|----------|----------|
| Grup 1    | Grup 2    |           |          |          |
| DS (n=4)  | HE1 (n=5) | 4.860.000 | 0.027486 | 0.067790 |
|           | HE2 (n=3) | 4.500.000 | 0.033895 | 0.067790 |
|           | KS (n=4)  | 5.333.333 | 0.020921 | 0.067790 |
| HE1 (n=5) | HE2 (n=3) | 1.088.889 | 0.296718 | 0.445076 |
|           | KS (n=4)  | 0.060000  | 0.806496 | 0.806496 |
| HE2 (n=3) | KS (n=4)  | 0.500000  | 0.479500 | 0.575400 |

#### 4.2.2. Gruplar Arasında Beta-diversity Analiz Sonuçları



**Şekil 22.** KS ve DS hasta gruplarının beta-diversity karşılaştırılmasının Bray-Curtis grafiği Yeşil: KS (Kompanse siroz) Kahverengi:DS (Dekompanse siroz)

**Şekil 23.** HE-I ve HE-II grubundaki hastaların beta-diversity karşılaştırılmasının Bray-Curtis grafiği Kırmızı HE-I (Hepatik ensefalopati tedavi öncesi) Mavi: HE-II (Hepatik ensefalopati tedavi sonrası)

Kompanse siroz grubuyla dekompanse siroz grubu Beta-diversity açısından karşılaştırıldığında her iki hasta grubuna özelleşmiş bakteri gruplarının olduğu

saptanmıştır. Nitekim alfa diversity yapılan analizde KS ve DS grubu arasında bakteriyel çeşitlilik ve fark bakımından anlamlı bir fark bulunmuştur. Bu fark KS ve DS arasında Proteobacteria şubesine ait Enterobacteriaceae'ların DS grubundaki aşırı artışıyla paraleldir. Bir başka deyişle Proteobacteria grubu dekompanse siroz için spesifiktir. Ancak HE-I ve HE-II grubunda belli bir bakteri lehine anlamlı bir farklılık grafikte gözlenmemektedir.

#### 4.3. CDR Oranlarının Karşılaştırılması

Örneklem büyüklüğümüz düşük olduğundan CDR ya etki edebilecek ve gruplar arasında saptanabilir düzeyde olabilecek tüm prevelan olan bakteri ailelerini, şubelerine göre daha önceki formülasyonlar optimize edilerek CDR hesaplanmıştır.

**Optimize edilen CDR:** Clostridiales Family XIV+Lachnospiraceae+ Ruminococcaceae+ Erysipelotrichaceae+ Acidaminococcaceae+ Veillonellaceae+ Akkermansiaceae/ Bacteroidaceae+Prevotellaceae+Enterobacteriaceae+Pasteurellaceae oranı olarak hesaplanmıştır.

Bu şekilde hesaplanan siroz disbiyoz oranı ortalaması HE-I grubunda 0,37 olarak görülürken HE-II grubunda 0,74 olarak görülmüştür. Artış görülmesine rağmen istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır ( $p=0,14$ ). Yine kompanse siroz ve dekompanse siroz grubunda hesaplanan ortalama CDR KS:0,59 , DS: 0,56 olarak arada anlamlı fark saptanmamıştır ( $p>0,99$ ).

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Birçok çalışmada sirozlu hastalarda dışkı mikrobiyomunda değişimler ile tedavi sonrası farklılıklar araştırılmıştır. Bu çalışmaların çoğu küçük örneklem boyutlu çalışmalar olduğundan kısmen anlaşılmıştır. Ayrıca eskiden kültüre dayalı çalışmalarda barsak mikrobiyotasını üretmek daha güçtü. Kolon bakterilerinin %60-80 arası topluluğu kültürde üretmek mümkün değildi (152). Yani mikroorganizma çalışmaları kültüre ekilebilir türlerle sınırlandırılmıştı. Son yıllarda dekompanse hastaların patogenezi ve yüksek prognozu açısından insan mikrobiyomu ileri moleküler tekniklerle araştırılmaktadır (153). Bu moleküler-biyolojik tekniklerin uygulanmaya başlanması mikroorganizmaların çoğunu göstermeye hatta tür ve alttürler kadar belirlemeye olanak sağlamıştır.

Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde Gastroenteroloji ve İç hastalıkları kliniğinde yatan veya ayaktan tedavi alan toplam 13 hasta incelendi. 13 hastanın 4 tanesi kompanse siroz (KS), 4 tanesi dekompanse siroz (DS), 5 tanesi hepatik ensefalopati(HE-I) olarak gruplandırıldı. 5 hepatik ensefalopati hastasına tedavi ve sonrasında profilaksi için 3 ay boyunca rifaksimin ve laktuloz tedavisi uygulandı. Profilaksi amaçlı endikasyon dahilinde 3 ay tedavi alması için HE-I grubuna en az ikinci hepatik ensefalopati atağı geçiren hastalar seçildi. Bu hastalardan tedavi sonunda 3 tanesinden tekrar dışkı örneği alınabildi ve alınan dışkı örnekleri(HE-II) olarak gruplandırıldı. Bu örneklerde 16s rDNA sekanslama yöntemiyle mikrobiyom analizleri yapıldı. Bu gruplar arasında mikrobiyotada değişim olup olmadığı karşılaştırıldı. Yapılan karşılaştırmada HE-II hastalarında HE-I hastalarına göre mikrobiyota da anlamlı bir değişiklik görülmedi. HE-II hastalarında bakteri çeşitliliği HE-I grubuna göre yüksek olarak görüldü fakat istatistiksel olarak anlamlı değildi. Dekompense siroz hastalarında(bu gruptaki hastalar içinde HE tanılı hasta bulunmamakta), diğer tüm gruplara göre bakteri çeşitliliğinin istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmış olduğu görüldü. Ayrıca Optimize ettiğimiz siroz disbiyozis oranını karşılaştırdığımızda, HE-II grubunda HE-I grubuna göre yüksek olarak görüldü fakat istatistiksel olarak anlamlı değildi.

Siroz hastalarında komplikasyonların ortaya çıkması ve dekompanse siroz hastalarında mikrobiyotaya değişiminin ilişkili olduğu düşünülmektedir (154). Özellikle sirozlu hastalarda kliniğin kötüleşmesi ile disbiyozisin arttığı ve bu disbiyozisin artışındaki en önemli nedenlerden birinin de proteobakteriaların artışından kaynaklandığını açıklayan çalışmalar yapılmıştır.

Bizim çalışmamızda da dekompanse siroz hastalarıyla kompanse siroz hastalarında karşılaştırma yapıldığında, DS hastalarında KS hastalarına göre mikrobiyotada anlamlı derecede gamma-proteobacteriae sınıfına ait olan Enterobacteriaceae ailesi artışı saptanmıştır. 2015 yılında Bajaj ve ark. dekompanse siroz ve mikrobiyom ilişkisini araştırmak için 45 sağlıklı gönüllü, 171 kompanse ve 141 dekompanse siroz hastasının dışkı mikrobiyomları karşılaştırılmış sonuçta dekompanse siroz ile kompanse siroz hastalarının mikrobiyomunda önemli farklılıklar keşfetmiştir (155). Dekompanse sirozlu hastalarda proteobacteriae larda artış saptanmıştır. Bu artıştan özellikle Enterobacteriaceae'ların artışının neden olduğu görülmüştür (155).

Jhen ve ark. 79 akut alevlenme saptanan kronik karaciğer sirozlu ve 50 sağlıklı kontrol olarak yaptığı çalışmada, 16s rDNA analizi kullanarak dışkı mikrobiyomlarını karşılaştırmış. Toplam mikrobiyal çeşitliliğin akut alevlenme saptanan kronik siroz hastalarında sağlıklı kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede azaldığını saptamış. Filum düzeyindeki karşılaştırmada Proteobacteria filumunun sağlıklı kontrollere göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğunu ayrıca Bacteroidetes filumunda azalma ve Firmicutes'ler de artış tespit etmiştir. Aile seviyesinde ise akut alevlenmesi olan kronik siroz hastaları mikrobiyotalarında sağlıklı kontrol grubuna göre daha düşük Bacteroidaceae, **Ruminococcaceae** ve **Lachnospiraceae** varken; Pasteurellaceae, Streptococcaceae ve Enterococcaceae daha yüksek düzeylerde görülmüş. Akut alevlenmesi olan siroz hastalarının hepatik ensefalopati tanılı olanlarında ise diğerlerine göre **Lachnospiraceae**'ların belirgin şekilde azaldığı görülmüş (156).

Bizim çalışmamızda benzer olarak DS hastalarında Lachnospiraceae ortalaması %15 iken HE-I grubunda %4,7 görüldü ancak KS grubunda ve tedavi almış olan HE-II grubunda da düşük oranlarda bulundu(sırasıyla %9,4 ve %3,3).

Bizim çalışmamızda siroz hastalarından alınan dışkı örneklerini CHİLD skoruna göre kıyasladığımızda **ruminococcaceae** ların mikrobiyotalardaki ortalama oranları CHİLD A da %7,6 iken CHİLD B de %14,4 ve CHİLD C hastalarda 15,4 olarak görüldü. Diğer bakteri aile gruplarında bir ilişki gösterilemedi. Yine sağlıklı kontrol grubumuz olmasa da dekompanse siroz hastalarında sağlıklı kontrollere göre ruminococcaceae'ların azaldığı sonucunu bu durum desteklemeyebilir. Çünkü bizim çalışmamızda tümü Child-A olan KS grubu hastalarda ruminococcaceae DS grubuna göre daha düşük görüldü. (KS:%7,6 , DS:%12,9).

Sağlıklı kontrol grubumuzun olmaması ve hasta gruplarımızdaki hasta sayılarının düşük olması da bu farklılığı açıklıyor olabilir.

Siroz hastalarının dekompanse hale gelmesinin en önemli nedenlerinden birisi hepatik ensefalopati olduğundan mikrobiyal çalışmalar hepatik ensefalopati hastalarında da sıklıkla yapılmaktadır.

Hepatik ensefalopatinin tedavisinde kullanılan laktuloz ve rifaksimin gibi ilaçların da tedavideki etkinliğini ayrıca etkilerini araştırmak için son yıllarda mikrobiyotaya dikkat çekilmiştir.

Kosuke kaji ve arkadaşlarının Child-pugh skoru>7 olan 20 dekompanse siroz hastasında yaptığı bir çalışmada hastaların fekal mikrobiyomunu, 4 hafta günde 3 defa 400 mg rifaksimin uygulaması sonrasındaki fekal mikrobiyomuyla karşılaştırmış. 4 hafta sonunda hastalarda hiperamonyeminin düzelmesi ve endotokseminin azalmasına rağmen 16s rRNA sekanslama yöntemiyle incelenen fekal örneklerde mikrobiyomdaki majör komponentlerinde önemli bir değişim saptanmamış fakat *Veillonella* and *Streptococcus* yoğunluğunda azalma görmüştür (150).

Jasmohan S. Bajaj ve ark. yaptığı bir çalışmada 20 minimal hepatik ensefalopati hastasında 8 hafta boyunca günde iki kez 550 mg rifaksimin tedavisi verilmiş. Sonuçta rifaksimin öncesi ve sonrası bakılan dışkı mikrobiyomunda anlamlı bir değişiklik saptanmamıştır (157). Ayrıca **Veillonellaceae** düzeylerinde düşüş ve Eubacteriaceae düzeylerinde yükselme görülmüştür. Bizim çalışmamızda da 5 tedavi öncesi hepatik ensefalopati hastasının (HE-I) mikrobiyotalarının ortalama %3

**Veillonellaceae** oluşturuken, tedavi sonrası hastalarda mikrobiyotanın oluşturduğu **Veillonellaceae** ortalaması %1,9 olarak görülmüştür(Şekil 19). Fakat bizim HE hastalarımız arasında(HE-I) minimal HE hastası bulunmamaktadır.

Benzer çalışmalar laktüloz üzerine de yapılmıştır. Sarangi ve ark. 35 siroz hastası ve 18 sağlıklı hasta üzerinde yaptığı çalışmada, 35 hastanın 21 tanesine 42-77 gün arası (median:55 gün)laktuloz uygulaması sonrası tekrar bakılan dışkıların mikrobiyotaları karşılaştırıldığında laktuloz uygulanmadan alınmış dışkılarla laktuloz sonrası alınan dışkılarda alfa çeşitliliği açısından değişiklik göstermemiş (145). Yine sağlıklı insanlar ile sirozlu hastalar arasında farklılıklar gözlenmiş olup özellikle sağlıklı insanlarda mikrobiyotada daha fazla bakteri çeşitliliği ve mikrobiyom zenginliği görülmüş (145).

Öte yandan Wang ve ark. Çinde 11 farklı merkezde, 98 minimal hepatik ensefalopati hastasında 67 hastayı laktuloz ile tedavi etmiş, 31 hastayı tedavisiz izlemiştir. Çalışma sonunda minimal hepatik ensefalopatili hastalarda sağlıklı gönüllülere göre proteobacteriaları daha yüksek bulmuştur (158). Aynı zamanda tedavi alan MHE hastalarında Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, ve Proteobacteria filumlarında anlamlı farklılık göstermiş (158). Bizim çalışmamızda da bakterilerin alfa çeşitliliği(alfa diversity) açısından laktuloz ve rifaksimin kullanımı sonrası istatistiksel anlamlı fark görülmemiştir (Şekil 21, Tablo 13). Fakat sağlıklı popülasyondan alınan kontrol hastalarımız olmadığından sağlıklı dışkı mikrobiyotasının çeşitliliği açısından veri yoktur. Ayrıca çalışmaya minimal hepatik ensefalopatili hastalar alınmamıştır.

Siroz hastalarında hastalığın yaygınlığı için bilgi verebilecek ve sirozda disbiyozis ile sirozun ağırlığının ilişkisini araştırmak için de mikrobiyal çalışmalar yapılmaktadır. Sirozda otokutanöz bakterilerin azalması ve patolojik olabilecek (non-otokutanöz) bakterilerin aşırı çoğalması yaygın gözükmemektedir (159). Bu patolojik bakterilerin intestinal bölgedeki translokasyonu ve endotoksin üretiminin spontan bakteriyel peritonit ve hepatik ensefalopati gelişiminde önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir (160). Dolayısıyla bu otokutanöz bakterilerin non-otokutanöz bakterilere oranı azaldıkça siroz hastalığının yaygınlığı ve bu hastalarda komplikasyonların ortaya çıkma sıklığının arttığı düşünülmektedir. Bu yüzden siroz

disbiyoz oranı hesaplanmaya başlanmıştır. Siroz disbiyozis oranı aslında patolojik olmayan bakteriler ile patolojik bakterilerin yoğunluğunun birbirine oranı olarak kabul edilmektedir. Siroz disbiyoz oranı Lachnospiraceae, Ruminococcaceae, ve Clostridiales Incertae Sedis XIV (artık ismi Clostridiales XIV) /Enterobacteriaceae ve Bacteroidaceae olarak hesaplanmaktadır.

Bajaj ve ark. 219 sirotik (121 kompanse ve ayakta takip edilen, 54 dekompanse ayakta takip edilen, 44 hastanede yatan hasta) ve 25 kontrol grubu hastasının dışkı mikrobiyotalarından siroz disbiyoz oranını (CDR)(cirrhosis dysbiosis ratio) karşılaştırdı. CDR en yüksek 2,05 olarak kontrol grubunda görüldü. Sonrasında sırasıyla kompanse siroz(0,89), dekompanse (0,66) ve hastanede yatan hastalar (0,32) olarak hesapladılar. Aynı zamanda endotoksin düzeyleri ile negatif korelasyon olduğunu saptadılar (160).

Fakat burada kullanılan bakteri ailelerinin bizim çalışmamızda uygun olmayacağı düşünülmüş ve CDR optimize edilmiştir. Daha önceki çalışmalarda da CDR nin optimizasyonu için daha fazla çalışma yapılması önerilmiştir (137). Biz çalışmamızda CDR optimizasyonu ile: Clostridiales Family XIV+Lachnospiraceae+Ruminococcaceae+Erysipelotrichaceae+Acidaminococcaceae+Veillonellaceae+Akkermansiaceae / Bacteroidaceae+Prevotellaceae+Enterobacteriaceae+Pasteurellaceae oranı hesapladık. HE-II grubunda yani tedavi sonrası hepatik ensefalopatili hastalarda optimize CDR da yükselme görülmüş fakat istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Ayrıca KS grubunda optimize CDR nin DS grubuna göre anlamlı bir yüksekliği görülmemiştir. (HE-I CDR: 0,37, HE-II CDR: 0,74 p=0,14) (KS CDR: 0,59 DS CDR: 0,56 p>0,99)

Sonuç olarak;

Mikrobiyom ve mikrobiyota üzerinde siroz hastalarının ağırlığını araştırmak, siroz komplikasyonlarını araştırmak ve tedavide kullanılan ilaçların etkilerini gözlemlemek için çalışmalar devam etmektedir. Siroz ve komplikasyonlarında özellikle hepatik ensefalopati ve spontan bakteriyel peritonit gibi durumlarda intestinal mikrobiyotanın bakteriyel değişimi ve disbiyozunun bu gibi komplikasyonlara neden olduğu veya durumunu ağırlaştırdığı ortak bir düşüncedir. Sirozda ve komplikasyonlarında barsaklarda non-otokutanöz bakterilerin

mikrobiyotadaki çoğunluğunun arttığı ve bunun sonucunda ortaya çıkan bakteriyel translokasyon ve endotoksemi gibi bakteriyel ürünlerin bu ağırlaşmaya neden olduğu ortak bir düşüncedir.

Bizim çalışmamızda da kompanse, dekompanse, HE ve tedavi verilen HE hastalarında mikrobiyota özellikleri çalışılmıştır. Siroz hastalarında hastalık ağırlaştığında ve komplikasyonlar ortaya çıktığında barsaklardaki mikrobiyal çeşitlilik azalmaktadır.

Rifaksimisin ve laktuloz kullanımı ile barsak bakteri çeşitliliği arasında anlamlı bir yükselme saptanmamıştır. Hepatik ensefalopati tedavisinde kullanılan laktuloz ve rifaksimisin tedavisi ile intestinal mikrobiyotada ufak değişiklikler yaptığı görülmüş fakat major bir değişim gösterilememiştir.

Dekompanse siroz ile kompanse siroz hastalarında mikrobiyota farklı olup özellikle proteobacteria (enterobacteriaceae leri içeren filum) artışı dekompanse sirozlu hastalarda daha belirgindir.

Siroz disbiyoz oranı hesaplamada kullanılan bakteri aileleri çalışmanın yapıldığı coğrafya, beslenme şartları göz önünde bulundurularak farklı popülasyonlarda optimize edilmeli ve daha fazla çalışma yapılmalıdır.

Bizim çalışmamızın zayıf taraflarından biri çalışmaya katılan hasta sayısının azlığıdır. Bu hem istatistiksel verileri hesaplamada zorluk yaşanması hemde anlamlı sonuçların elde edilmesini zorlaştırmaktadır.

Ayrıca yaptığımız çalışmada sağlıklı bir kontrol grubunun olmaması nedeniyle sağlıklı popülasyon ile hastalarımız arasında mikrobiyomdaki farklılıklar gösterilememiştir. Özellikle yaşadığımız coğrafyada otokutan bakterilerin diğer coğrafyalara göre farklılıklarını belirlemek ve buradan bir temel alarak siroz disbiyoz oranı gibi formülleri tekrar optimize etmek gerekmektedir.

Bu sonuçların tutarlılığının kontrolü ve geliştirilmesi için daha çok sayıda hastalarla çalışmaların devam etmesi önerilmektedir.

Bu alışma Türkiye’den örnek toplanarak mikrobiyom karşılaştırması ve biyoinformatik analizlerinin de kendi olanaklarımızla yapıldığı ilk çalışma olduğundan bir pilot çalışma özelliğindedir. Siroz hastaları ve mikrobiyom çalışmaları son yıllarda ileri sekanslama teknolojilerinin kullanımının artması nedeniyle gelecekte daha fazla bilgi edineceğimiz bir konudur.



## 6. REFERANSLAR

1. Bajaj JS. The role of microbiota in hepatic encephalopathy. *Gut Microbes*. 2014;5(3):397-403.
2. Swaminathan M, Ellul MA, Cross TJ. Hepatic encephalopathy: current challenges and future prospects. *Hepatic medicine: evidence and research*. 2018;10:1.
3. Hadjihambi A, Arias N, Sheikh M, Jalan R. Hepatic encephalopathy: a critical current review. *Hepatology International*. 2018;12(1):135-47.
4. Jameson JL, Kasper DL, Longo DL, Fauci AS, Hauser SL, Loscalzo J. *Harrison's principles of internal medicine* 2018.
5. Mokdad AA, Lopez AD, Shahrz S, Lozano R, Mokdad AH, Stanaway J, et al. Liver cirrhosis mortality in 187 countries between 1980 and 2010: a systematic analysis. *BMC medicine*. 2014;12(1):145.
6. Lim Y-S, Kim WR. The global impact of hepatic fibrosis and end-stage liver disease. *Clinics in liver disease*. 2008;12(4):733-46.
7. Heidelbaugh JJ, Bruderly M. Cirrhosis and chronic liver failure: part I. Diagnosis and evaluation. *American family physician*. 2006;74(5):756-62.
8. Anthony PP, Ishak KG, Nayak NC, Poulsen HE, Scheuer PJ, Sobin LH. The morphology of cirrhosis. Recommendations on definition, nomenclature, and classification by a working group sponsored by the World Health Organization. *Journal of Clinical Pathology*. 1978;31(5):395-414.
9. Hernandez-Gea V, Friedman SL. Pathogenesis of liver fibrosis. *Annual review of pathology*. 2011;6:425-56.
10. Friedman SL. Liver fibrosis -- from bench to bedside. *J Hepatol*. 2003;38 Suppl 1:S38-53.
11. Guzman G. On the origin of hepatic fibrosis. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 2004;128(11):1212-4.
12. Kalaitzakis E. Gastrointestinal dysfunction in liver cirrhosis. *World journal of gastroenterology*. 2014;20(40):14686-95.
13. Toshikuni N, Arisawa T, Tsutsumi M. Nutrition and exercise in the management of liver cirrhosis. *World journal of gastroenterology: WJG*. 2014;20(23):7286.
14. Burra P, Germani G, Masier A, De Martin E, Gambato M, Salonia A, et al. Sexual dysfunction in chronic liver disease: is liver transplantation an effective cure? *Transplantation*. 2010;89(12):1425-9.
15. Ripoll C, Groszmann R, Garcia-Tsao G, Grace N, Burroughs A, Planas R, et al. Hepatic venous pressure gradient predicts clinical decompensation in patients with compensated cirrhosis. *Gastroenterology*. 2007;133(2):481-8.
16. Bosch J, Groszmann RJ, Shah VH. Evolution in the understanding of the pathophysiological basis of portal hypertension: how changes in paradigm are leading to successful new treatments. *Journal of hepatology*. 2015;62(1):S121-S30.
17. O'Brien J, Triantos C, Burroughs AK. Management of varices in patients with cirrhosis. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*. 2013;10(7):402-12.
18. Poca M, Puente A, Graupera I, Villanueva C. Prognostic markers in patients with cirrhosis and portal hypertension who have not bled. *Disease markers*. 2011;31(3):147-54.
19. D'Amico G, Garcia-Pagan JC, Luca A, Bosch J. Hepatic vein pressure gradient reduction and prevention of variceal bleeding in cirrhosis: a systematic review. *Gastroenterology*. 2006;131(5):1611-24.

20. Garcia-Tsao G, Sanyal AJ, Grace ND, Carey W. Prevention and management of gastroesophageal varices and variceal hemorrhage in cirrhosis. *Hepatology*. 2007;46(3):922-38.
21. Loffroy R, Estivalet L, Cherblanc V, Favelier S, Pottecher P, Hamza S, et al. Transjugular intrahepatic portosystemic shunt for the management of acute variceal hemorrhage. *World journal of gastroenterology*. 2013;19(37):6131-43.
22. Hsu SJ, Huang HC. Management of ascites in patients with liver cirrhosis: recent evidence and controversies. *Journal of the Chinese Medical Association : JCMA*. 2013;76(3):123-30.
23. McPherson S, Lucey MR, Moriarty KJ. Decompensated alcohol related liver disease: acute management. *Bmj*. 2016;352:i124.
24. Perri GA. Ascites in patients with cirrhosis. *Canadian family physician Medecin de famille canadien*. 2013;59(12):1297-9; e538-40.
25. Poordad FF. Presentation and complications associated with cirrhosis of the liver. *Current medical research and opinion*. 2015;31(5):925-37.
26. Runyon BA. Management of adult patients with ascites due to cirrhosis: an update. *Hepatology*. 2009;49(6):2087-107.
27. Gordon FD. Ascites. *Clin Liver Dis*. 2012;16(2):285-99.
28. Pinzone MR, Celesia BM, Di Rosa M, Cacopardo B, Nunnari G. Microbial translocation in chronic liver diseases. *International journal of microbiology*. 2012;2012.
29. Casafont Morencos F, de las Heras Castano G, Martin Ramos L, Lopez Arias MJ, Ledesma F, Pons Romero F. Small bowel bacterial overgrowth in patients with alcoholic cirrhosis. *Digestive diseases and sciences*. 1996;41(3):552-6.
30. Steffen EK, Berg RD, Deitch EA. Comparison of translocation rates of various indigenous bacteria from the gastrointestinal tract to the mesenteric lymph node. *Journal of Infectious Diseases*. 1988;157(5):1032-8.
31. Berg RD, Garlington AW. Translocation of certain indigenous bacteria from the gastrointestinal tract to the mesenteric lymph nodes and other organs in a gnotobiotic mouse model. *Infection and immunity*. 1979;23(2):403-11.
32. Francés R, Zapater P, González-Navajas JM, Muñoz C, Caño R, Moreu R, et al. Bacterial DNA in patients with cirrhosis and noninfected ascites mimics the soluble immune response established in patients with spontaneous bacterial peritonitis. *Hepatology*. 2008;47(3):978-85.
33. Zapater P, Francés R, González-Navajas JM, de la Hoz MA, Moreu R, Pascual S, et al. Serum and ascitic fluid bacterial DNA: a new independent prognostic factor in noninfected patients with cirrhosis. *Hepatology*. 2008;48(6):1924-31.
34. Frances R, Munoz C, Zapater P, Uceda F, Gascon I, Pascual S, et al. Bacterial DNA activates cell mediated immune response and nitric oxide overproduction in peritoneal macrophages from patients with cirrhosis and ascites. *Gut*. 2004;53(6):860-4.
35. Fernandez J, Prado V, Trebicka J, Amoros A, Gustot T, Wiest R, et al. Multidrug-resistant bacterial infections in patients with decompensated cirrhosis and with acute-on-chronic liver failure in Europe. *J Hepatol*. 2019;70(3):398-411.
36. Lata J. Hepatorenal syndrome. *World journal of gastroenterology*. 2012;18(36):4978-84.
37. Gines P, Schrier RW. Renal failure in cirrhosis. *The New England journal of medicine*. 2009;361(13):1279-90.
38. Arroyo V, Gines P, Gerbes AL, Dudley FJ, Gentilini P, Laffi G, et al. Definition and diagnostic criteria of refractory ascites and hepatorenal syndrome in cirrhosis. *International Ascites Club. Hepatology*. 1996;23(1):164-76.

39. Salerno F, Gerbes A, Gines P, Wong F, Arroyo V. Diagnosis, prevention and treatment of hepatorenal syndrome in cirrhosis. *Gut*. 2007;56(9):1310-8.
40. Runyon BA. Management of adult patients with ascites due to cirrhosis: update 2012. *AASLD Practice Guideline, AASLD*. 2012;3(1):5-8.
41. Skagen C, Einstein M, Lucey MR, Said A. Combination treatment with octreotide, midodrine, and albumin improves survival in patients with type 1 and type 2 hepatorenal syndrome. *J Clin Gastroenterol*. 2009;43(7):680-5.
42. Wijdicks EF. Hepatic encephalopathy. *New England Journal of Medicine*. 2016;375(17):1660-70.
43. Fichet J, Mercier E, Genée O, Garot D, Legras A, Dequin PF, et al. Prognosis and 1-year mortality of intensive care unit patients with severe hepatic encephalopathy. *Journal of critical care*. 2009;24(3):364-70.
44. Garcia-Martinez R, Simon-Talero M, Cordoba J. Prognostic assessment in patients with hepatic encephalopathy. *Disease markers*. 2011;31(3):171-9.
45. Sawhney R, Jalan R. Liver: the gut is a key target of therapy in hepatic encephalopathy. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*. 2015;12(1):7-8.
46. Collins CM, D'Orazio SE. Bacterial ureases: structure, regulation of expression and role in pathogenesis. *Molecular microbiology*. 1993;9(5):907-13.
47. Bernal W, Wendon J. Acute liver failure. *The New England journal of medicine*. 2013;369(26):2525-34.
48. Holecek M. Ammonia and amino acid profiles in liver cirrhosis: effects of variables leading to hepatic encephalopathy. *Nutrition*. 2015;31(1):14-20.
49. Romero-Gómez M, Montagnese S, Jalan R. Hepatic encephalopathy in patients with acute decompensation of cirrhosis and acute-on-chronic liver failure. *Journal of Hepatology*. 2015;62(2):437-47.
50. Palomero-Gallagher N, Zilles K. Neurotransmitter receptor alterations in hepatic encephalopathy: a review. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2013;536(2):109-21.
51. Hanai T, Shiraki M, Watanabe S, Kochi T, Imai K, Suetsugu A, et al. Sarcopenia predicts minimal hepatic encephalopathy in patients with liver cirrhosis. *Hepatology Research*. 2017;47(13):1359-67.
52. Davuluri G, Krokowski D, Guan B-J, Kumar A, Thapaliya S, Singh D, et al. Metabolic adaptation of skeletal muscle to hyperammonemia drives the beneficial effects of l-leucine in cirrhosis. *Journal of hepatology*. 2016;65(5):929-37.
53. Gluud LL, Dam G, Les I, Cordoba J, Marchesini G, Borre M, et al. Branched-chain amino acids for people with hepatic encephalopathy. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2015(9).
54. Onyekwere CA, Ogbera AO, Hameed L. Chronic liver disease and hepatic encephalopathy: clinical profile and outcomes. *Nigerian journal of clinical practice*. 2011;14(2):181-5.
55. Maqsood S, Saleem A, Iqbal A, Butt JA. Precipitating factors of hepatic encephalopathy: experience at Pakistan Institute of Medical Sciences Islamabad. *Journal of Ayub Medical College, Abbottabad : JAMC*. 2006;18(4):58-62.
56. Mumtaz K, Ahmed US, Abid S, Baig N, Hamid S, Jafri W. Precipitating factors and the outcome of hepatic encephalopathy in liver cirrhosis. *Journal of the College of Physicians and Surgeons--Pakistan : JCPSP*. 2010;20(8):514-8.
57. Cordoba J, Lopez-Hellin J, Planas M, Sabin P, Sanpedro F, Castro F, et al. Normal protein diet for episodic hepatic encephalopathy: results of a randomized study. *J Hepatol*. 2004;41(1):38-43.
58. Bajaj JS. Review article: the modern management of hepatic encephalopathy. *Aliment Pharmacol Ther*. 2010;31(5):537-47.

59. Prabhakar S, Bhatia R. Management of agitation and convulsions in hepatic encephalopathy. *Indian journal of gastroenterology : official journal of the Indian Society of Gastroenterology*. 2003;22 Suppl 2:S54-8.
60. Mortensen PB, Holtug K, Bonnen H, Clausen MR. The degradation of amino acids, proteins, and blood to short-chain fatty acids in colon is prevented by lactulose. *Gastroenterology*. 1990;98(2):353-60.
61. Prasad S, Dhiman RK, Duseja A, Chawla YK, Sharma A, Agarwal R. Lactulose improves cognitive functions and health-related quality of life in patients with cirrhosis who have minimal hepatic encephalopathy. *Hepatology*. 2007;45(3):549-59.
62. Watanabe A, Sakai T, Sato S, Imai F, Ohto M, Arakawa Y, et al. Clinical efficacy of lactulose in cirrhotic patients with and without subclinical hepatic encephalopathy. *Hepatology*. 1997;26(6):1410-4.
63. Qin N, Yang F, Li A, Prifti E, Chen Y, Shao L, et al. Alterations of the human gut microbiome in liver cirrhosis. *Nature*. 2014;513(7516):59.
64. Bass NM, Mullen KD, Sanyal A, Poordad F, Neff G, Leevy CB, et al. Rifaximin treatment in hepatic encephalopathy. *New England Journal of Medicine*. 2010;362(12):1071-81.
65. Vilstrup H, Amodio P, Bajaj J, Cordoba J, Ferenci P, Mullen KD, et al. Hepatic encephalopathy in chronic liver disease: 2014 Practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases and the European Association for the Study of the Liver. *Hepatology*. 2014;60(2):715-35.
66. Mullen KD, Sanyal AJ, Bass NM, Poordad FF, Sheikh MY, Frederick RT, et al. Rifaximin is safe and well tolerated for long-term maintenance of remission from overt hepatic encephalopathy. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 2014;12(8):1390-7. e2.
67. Kimer N, Krag A, Møller S, Bendtsen F, Gluud L. Systematic review with meta-analysis: the effects of rifaximin in hepatic encephalopathy. *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 2014;40(2):123-32.
68. Agrawal A, Sharma BC, Sharma P, Sarin SK. Secondary prophylaxis of hepatic encephalopathy in cirrhosis: an open-label, randomized controlled trial of lactulose, probiotics, and no therapy. *Am J Gastroenterol*. 2012;107(7):1043-50.
69. D'Amico G, Garcia-Tsao G, Pagliaro L. Natural history and prognostic indicators of survival in cirrhosis: a systematic review of 118 studies. *J Hepatol*. 2006;44(1):217-31.
70. Tuğ A, Hancı İ, Balseven A. İnsan genom projesi: Umut mu, kabus mu. *Sürekli Tıp Eğitimi Dergisi*. 2002;11(2):56-7.
71. Zhu B, Wang X, Li L. Human gut microbiome: the second genome of human body. *Protein & cell*. 2010;1(8):718-25.
72. Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *nature*. 2010;464(7285):59.
73. Lederberg J, McCray AT. Ome SweetOmics--A genealogical treasury of words. *The Scientist*. 2001;15(7):8-.
74. Handelsman J. Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2005;69(1):195-.
75. Cenit MC, Matzaraki V, Tigchelaar EF, Zhernakova A. Rapidly expanding knowledge on the role of the gut microbiome in health and disease. *Biochimica et biophysica acta*. 2014;1842(10):1981-92.
76. Walker AW, Lawley TD. Therapeutic modulation of intestinal dysbiosis. *Pharmacological research*. 2013;69(1):75-86.
77. Peterson J, Garges S, Giovanni M, McInnes P, Wang L, Schloss JA, et al. The NIH human microbiome project. *Genome research*. 2009;19(12):2317-23.

78. Gonzalez A, Stombaugh J, Lozupone C, Turnbaugh PJ, Gordon JI, Knight R. The mind-body-microbial continuum. *Dialogues in clinical neuroscience*. 2011;13(1):55.
79. Dominguez-Bello MG, Costello EK, Contreras M, Magris M, Hidalgo G, Fierer N, et al. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010;107(26):11971-5.
80. Jiménez E, Marín ML, Martín R, Odriozola JM, Olivares M, Xaus J, et al. Is meconium from healthy newborns actually sterile? *Research in microbiology*. 2008;159(3):187-93.
81. DiGiulio DB, Romero R, Amogan HP, Kusanovic JP, Bik EM, Gotsch F, et al. Microbial prevalence, diversity and abundance in amniotic fluid during preterm labor: a molecular and culture-based investigation. *PloS one*. 2008;3(8):e3056.
82. Reid G, Younes JA, Van der Mei HC, Gloor GB, Knight R, Busscher HJ. Microbiota restoration: natural and supplemented recovery of human microbial communities. *Nature Reviews Microbiology*. 2011;9(1):27.
83. Robinson CJ, Bohannan BJ, Young VB. From structure to function: the ecology of host-associated microbial communities. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2010;74(3):453-76.
84. Matamoros S, Gras-Leguen C, Le Vacon F, Potel G, de La Cochetiere M-F. Development of intestinal microbiota in infants and its impact on health. *Trends in microbiology*. 2013;21(4):167-73.
85. Penders J, Thijs C, Vink C, Stelma FF, Snijders B, Kummeling I, et al. Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics*. 2006;118(2):511-21.
86. Harmsen HJ, Wildeboer-Veloo AC, Raangs GC, Wagendorp AA, Klijn N, Bindels JG, et al. Analysis of intestinal flora development in breast-fed and formula-fed infants by using molecular identification and detection methods. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*. 2000;30(1):61-7.
87. Turrone F, Peano C, Pass DA, Foroni E, Severgnini M, Claesson MJ, et al. Diversity of bifidobacteria within the infant gut microbiota. *PloS one*. 2012;7(5):e36957.
88. MADIGAN MT, Martinko J. *Brock Biology of Microorganisms*, 11th edn. SciELO Espana; 2005.
89. Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, et al. Diversity of the human intestinal microbial flora. *science*. 2005;308(5728):1635-8.
90. Whitman WB, Coleman DC, Wiebe WJ. *Perspective Prokaryotes: The unseen majority* 95, no. June; 1998.
91. Wershil BK, Furuta GT. 4. Gastrointestinal mucosal immunity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2008;121(2):S380-S3.
92. Maynard CL, Elson CO, Hatton RD, Weaver CT. Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system. *Nature*. 2012;489(7415):231.
93. Kamada N, Seo S-U, Chen GY, Núñez G. Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease. *Nature Reviews Immunology*. 2013;13(5):321.
94. Maranduba CMdC, De Castro SBR, Souza GTd, Rossato C, da Guia FC, Valente MAS, et al. Intestinal microbiota as modulators of the immune system and neuroimmune system: impact on the host health and homeostasis. *Journal of immunology research*. 2015;2015.
95. Romano-Keeler J, Moore DJ, Wang C, Brucker RM, Fonnesbeck C, Slaughter JC, et al. Early life establishment of site-specific microbial communities in the gut. *Gut microbes*. 2014;5(2):192-201.
96. Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *nature*. 2006;444(7122):1027.

97. Qin J, Li Y, Cai Z, Li S, Zhu J, Zhang F, et al. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature*. 2012;490(7418):55.
98. Yang T, Santisteban MM, Rodriguez V, Li E, Ahmari N, Carvajal JM, et al. Gut dysbiosis is linked to hypertension. *Hypertension*. 2015;65(6):1331-40.
99. Mai V, Young CM, Ukhanova M, Wang X, Sun Y, Casella G, et al. Fecal microbiota in premature infants prior to necrotizing enterocolitis. *PloS one*. 2011;6(6):e20647.
100. Frank DN, Amand ALS, Feldman RA, Boedeker EC, Harpaz N, Pace NR. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007;104(34):13780-5.
101. Lui JB, Devarajan P, Teplicki SA, Chen Z. Cross-differentiation from the CD8 lineage to CD4 T cells in the gut-associated microenvironment with a nonessential role of microbiota. *Cell reports*. 2015;10(4):574-85.
102. Muñoz M, Heimesaat MM, Danker K, Struck D, Lohmann U, Plickert R, et al. Interleukin (IL)-23 mediates *Toxoplasma gondii*-induced immunopathology in the gut via matrixmetalloproteinase-2 and IL-22 but independent of IL-17. *Journal of Experimental Medicine*. 2009;206(13):3047-59.
103. Sonnenburg JL, Xu J, Leip DD, Chen C-H, Westover BP, Weatherford J, et al. Glycan foraging in vivo by an intestine-adapted bacterial symbiont. *Science*. 2005;307(5717):1955-9.
104. Bergman E. Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. *Physiological reviews*. 1990;70(2):567-90.
105. Velagapudi VR, Hezaveh R, Reigstad CS, Gopalacharyulu P, Yetukuri L, Islam S, et al. The gut microbiota modulates host energy and lipid metabolism in mice. *Journal of lipid research*. 2010;51(5):1101-12.
106. Hylemon PB, Zhou H, Pandak WM, Ren S, Gil G, Dent P. Bile acids as regulatory molecules. *Journal of lipid research*. 2009;50(8):1509-20.
107. Sinal CJ, Tohkin M, Miyata M, Ward JM, Lambert G, Gonzalez FJ. Targeted disruption of the nuclear receptor FXR/BAR impairs bile acid and lipid homeostasis. *Cell*. 2000;102(6):731-44.
108. van Dijk TH, Grefhorst A, Oosterveer MH, Bloks VW, Staels B, Reijngoud D-J, et al. An Increased Flux through the Glucose 6-Phosphate Pool in Enterocytes Delays Glucose Absorption in Fxr<sup>-/-</sup> Mice. *Journal of Biological Chemistry*. 2009;284(16):10315-23.
109. Prawitt J, Abdelkarim M, Stroeve JH, Popescu I, Duez H, Velagapudi VR, et al. Farnesoid X receptor deficiency improves glucose homeostasis in mouse models of obesity. *Diabetes*. 2011;60(7):1861-71.
110. Thomas C, Gioiello A, Noriega L, Strehle A, Oury J, Rizzo G, et al. TGR5-mediated bile acid sensing controls glucose homeostasis. *Cell metabolism*. 2009;10(3):167-77.
111. Spencer MD, Hamp TJ, Reid RW, Fischer LM, Zeisel SH, Fodor AA. Association between composition of the human gastrointestinal microbiome and development of fatty liver with choline deficiency. *Gastroenterology*. 2011;140(3):976-86.
112. Roberfroid M, Gibson GR, Hoyles L, McCartney AL, Rastall R, Rowland I, et al. Prebiotic effects: metabolic and health benefits. *British Journal of Nutrition*. 2010;104(S2):S1-S63.
113. Barrett E, Ross R, O'toole P, Fitzgerald G, Stanton C.  $\gamma$ -Aminobutyric acid production by culturable bacteria from the human intestine. *Journal of applied microbiology*. 2012;113(2):411-7.
114. Lyte M. Probiotics function mechanistically as delivery vehicles for neuroactive compounds: microbial endocrinology in the design and use of probiotics. *Bioessays*. 2011;33(8):574-81.

115. Desbonnet L, Garrett L, Clarke G, Kiely B, Cryan JF, Dinan TG. Effects of the probiotic *Bifidobacterium infantis* in the maternal separation model of depression. *Neuroscience*. 2010;170(4):1179-88.
116. Muccioli GG, Naslain D, Bäckhed F, Reigstad CS, Lambert DM, Delzenne NM, et al. The endocannabinoid system links gut microbiota to adipogenesis. *Molecular systems biology*. 2010;6(1).
117. Baquero F, Nombela C. The microbiome as a human organ. *Clinical Microbiology and Infection*. 2012;18:2-4.
118. Whitman WB, Coleman DC, Wiebe WJ. Prokaryotes: the unseen majority. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1998;95(12):6578-83.
119. Caporaso JG, Lauber CL, Costello EK, Berg-Lyons D, Gonzalez A, Stombaugh J, et al. Moving pictures of the human microbiome. *Genome biology*. 2011;12(5):R50.
120. Bogaert D, Keijser B, Huse S, Rossen J, Veenhoven R, Van Gils E, et al. Variability and diversity of nasopharyngeal microbiota in children: a metagenomic analysis. *PloS one*. 2011;6(2):e17035.
121. Sokol H, Seksik P, Rigottier-Gois L, Lay C, Lepage P, Podglajen I, et al. Specificities of the fecal microbiota in inflammatory bowel disease. *Inflammatory bowel diseases*. 2006;12(2):106-11.
122. Manichanh C, Rigottier-Gois L, Bonnaud E, Gloux K, Pelletier E, Frangeul L, et al. Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach. *Gut*. 2006;55(2):205-11.
123. Baumgart M, Dogan B, Rishniw M, Weitzman G, Bosworth B, Yantiss R, et al. Culture independent analysis of ileal mucosa reveals a selective increase in invasive *Escherichia coli* of novel phylogeny relative to depletion of *Clostridiales* in Crohn's disease involving the ileum. *The ISME journal*. 2007;1(5):403.
124. Gophna U, Sommerfeld K, Gophna S, Doolittle WF, van Zanten SJV. Differences between tissue-associated intestinal microfloras of patients with Crohn's disease and ulcerative colitis. *Journal of clinical microbiology*. 2006;44(11):4136-41.
125. Yılmaz K, Altındış M. SİNDİRİM SİSTEMİ MİKROBİYOTASI VE FEKAL TRANSPLANTASYON. *Nobel Medicus Journal*. 2017;13(1).
126. Schuppan D, Afdhal NH. Liver cirrhosis. *The Lancet*. 2008;371(9615):838-51.
127. Chavez-Tapia NC, Tellez-Avila FI, Garcia-Leiva J, Valdovinos MA. Use and overuse of proton pump inhibitors in cirrhotic patients. *Medical science monitor*. 2008;14(9):CR468-CR72.
128. Wiest R, Garcia-Tsao G. Bacterial translocation (BT) in cirrhosis. *Hepatology*. 2005;41(3):422-33.
129. Nolan JP. The role of intestinal endotoxin in liver injury: a long and evolving history. *Hepatology*. 2010;52(5):1829-35.
130. Gill SR, Pop M, DeBoy RT, Eckburg PB, Turnbaugh PJ, Samuel BS, et al. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *science*. 2006;312(5778):1355-9.
131. Bajaj JS, Ridlon JM, Hylemon PB, Thacker LR, Heuman DM, Smith S, et al. Linkage of gut microbiome with cognition in hepatic encephalopathy. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2011;302(1):G168-G75.
132. Peng L, Li Z-R, Green RS, Holzman IR, Lin J. Butyrate enhances the intestinal barrier by facilitating tight junction assembly via activation of AMP-activated protein kinase in Caco-2 cell monolayers. *The Journal of nutrition*. 2009;139(9):1619-25.
133. Begley M, Gahan CG, Hill C. The interaction between bacteria and bile. *FEMS microbiology reviews*. 2005;29(4):625-51.
134. Vlahcevic Z, Buhac I, Bell C, Swell L. Abnormal metabolism of secondary bile acids in patients with cirrhosis. *Gut*. 1970;11(5):420-2.

135. Swann JR, Want EJ, Geier FM, Spagou K, Wilson ID, Sidaway JE, et al. Systemic gut microbial modulation of bile acid metabolism in host tissue compartments. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011;108(Supplement 1):4523-30.
136. Chen Y, Yang F, Lu H, Wang B, Chen Y, Lei D, et al. Characterization of fecal microbial communities in patients with liver cirrhosis. *Hepatology*. 2011;54(2):562-72.
137. Bajaj JS, Heuman DM, Hylemon PB, Sanyal AJ, White MB, Monteith P, et al. Altered profile of human gut microbiome is associated with cirrhosis and its complications. *Journal of hepatology*. 2014;60(5):940-7.
138. Bajaj JS, Betrapally NS, Hylemon PB, Thacker LR, Daita K, Kang DJ, et al. Gut microbiota alterations can predict hospitalizations in cirrhosis independent of diabetes mellitus. *Scientific reports*. 2015;5:18559.
139. Wiest R, Krag A, Gerbes A. Spontaneous bacterial peritonitis: recent guidelines and beyond. *Gut*. 2012;61(2):297-310.
140. Hansen BA, Vilstrup H. Increased intestinal hydrolysis of urea in patients with alcoholic cirrhosis. *Scandinavian journal of gastroenterology*. 1985;20(3):346-50.
141. van Thiel DH, Fagiuoli S, Wright HI, Chien MC, Gavaler JS. Gastrointestinal transit in cirrhotic patients: effect of hepatic encephalopathy and its treatment. *Hepatology*. 1994;19(1):67-71.
142. Gupta A, Dhiman RK, Kumari S, Rana S, Agarwal R, Duseja A, et al. Role of small intestinal bacterial overgrowth and delayed gastrointestinal transit time in cirrhotic patients with minimal hepatic encephalopathy. *Journal of hepatology*. 2010;53(5):849-55.
143. Romero-Gómez M, Jover M, Galán JJ, Ruiz A. Gut ammonia production and its modulation. *Metabolic brain disease*. 2009;24(1):147-57.
144. Riggio O, Varriale M, Testore G, Di RR, Di ER, Merli M, et al. Effect of lactitol and lactulose administration on the fecal flora in cirrhotic patients. *Journal of clinical gastroenterology*. 1990;12(4):433-6.
145. Sarangi AN, Goel A, Singh A, Sasi A, Aggarwal R. Faecal bacterial microbiota in patients with cirrhosis and the effect of lactulose administration. *BMC gastroenterology*. 2017;17(1):125.
146. Bajaj J. potential mechanisms of action of rifaximin in the management of hepatic encephalopathy and other complications of cirrhosis. *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 2016;43:11-26.
147. Bajaj JS, Heuman DM, Hylemon PB, Sanyal AJ, Puri P, Sterling RK, et al. Randomised clinical trial: Lactobacillus GG modulates gut microbiome, metabolome and endotoxemia in patients with cirrhosis. *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 2014;39(10):1113-25.
148. Dhiman RK, Rana B, Agrawal S, Garg A, Chopra M, Thumburu KK, et al. Probiotic VSL# 3 reduces liver disease severity and hospitalization in patients with cirrhosis: a randomized, controlled trial. *Gastroenterology*. 2014;147(6):1327-37. e3.
149. Bajaj JS, Heuman DM, Sanyal AJ, Hylemon PB, Sterling RK, Stravitz RT, et al. Modulation of the metabiome by rifaximin in patients with cirrhosis and minimal hepatic encephalopathy. *PloS one*. 2013;8(4):e60042.
150. Kaji K, Takaya H, Saikawa S, Furukawa M, Sato S, Kawaratani H, et al. Rifaximin ameliorates hepatic encephalopathy and endotoxemia without affecting the gut microbiome diversity. *World journal of gastroenterology*. 2017;23(47):8355.
151. Rai R, Saraswat VA, Dhiman RK. Gut microbiota: its role in hepatic encephalopathy. *Journal of clinical and experimental hepatology*. 2015;5:S29-S36.
152. Langendijk PS, Schut F, Jansen GJ, Raangs GC, Kamphuis GR, Wilkinson M, et al. Quantitative fluorescence in situ hybridization of Bifidobacterium spp. with genus-specific 16S rRNA-targeted probes and its application in fecal samples. *Appl Environ Microbiol*. 1995;61(8):3069-75.

153. Patel VC, Shawcross DL. Salivary microbiota-immune profiling in cirrhosis: Could this be the noninvasive strategy that will revolutionize prognostication in hepatology? *Hepatology*. 2015;62(4):1001-3.
154. Quigley EM, Stanton C, Murphy EF. The gut microbiota and the liver. Pathophysiological and clinical implications. *Journal of hepatology*. 2013;58(5):1020-7.
155. Bajaj JS, Betrapally NS, Gillevet PM. Decompensated cirrhosis and microbiome interpretation. *Nature*. 2015;525(7569):E1-E2.
156. Chen Y, Guo J, Qian G, Fang D, Shi D, Guo L, et al. Gut dysbiosis in acute-on-chronic liver failure and its predictive value for mortality. *J Gastroenterol Hepatol*. 2015;30(9):1429-37.
157. Bajaj JS, Heuman DM, Sanyal AJ, Hylemon PB, Sterling RK, Stravitz RT, et al. Modulation of the metabiome by rifaximin in patients with cirrhosis and minimal hepatic encephalopathy. *PloS one*. 2013;8(4).
158. Wang JY, Bajaj JS, Wang JB, Shang J, Zhou XM, Guo XL, et al. Lactulose improves cognition, quality of life, and gut microbiota in minimal hepatic encephalopathy: A multicenter, randomized controlled trial. *Journal of digestive diseases*. 2019;20(10):547-56.
159. Fukui H. Role of Gut Dysbiosis in Liver Diseases: What Have We Learned So Far? *Diseases (Basel, Switzerland)*. 2019;7(4).
160. Bajaj JS, Heuman DM, Hylemon PB, Sanyal AJ, White MB, Monteith P, et al. Altered profile of human gut microbiome is associated with cirrhosis and its complications. *Journal of hepatology*. 2014;60(5):940-7.

## 7. EKLER

### 7.1.Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul Onay Formu



Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

|                          |                                      |                                                                                                                                                    |
|--------------------------|--------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>BAŞVURU BİLGİLERİ</b> | <b>PROTOKOL KODU</b>                 | <b>09.2018.316</b>                                                                                                                                 |
|                          | <b>PROJE ADI</b>                     | Hepatik ensefalopati tedavisi için rifaksimin ve laktuloz kullanan siroz hastalarının barsak mikrobiyotalarının tedavi ile değişiminin incelenmesi |
|                          | <b>SORUMLU ARAŞTIRICI ÖNVANI/ADI</b> | Prof. Dr. Osman Cavit ÖZDOĞAN                                                                                                                      |

|                        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>KARAR BİLGİLERİ</b> | Tarih: 06.04.2018<br>Yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gereke, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve gerçekleştirilmesinde sakınca bulunmadığı için Kurulumuzca onaylanmasına ay kılığı ile karar verilmiştir. Onay sonrasında yapılacak her türlü proje değişiklikleri (katilmeslar, başlık vb.) veya protokol değişikliklerinin Etik Kurulu bildirilerek proje onayının yenilenmesi gerekmektedir. |
|------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

| <b>ÜYELER</b>                  |                               |                                       |                                                           |                                                              |      |
|--------------------------------|-------------------------------|---------------------------------------|-----------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|------|
| Unvanı / Adı / Soyadı          | Uzmanlık Dalı                 | Kurumu / EK Üyeligi                   | Onaylanan Proje ile İlişkisi                              | Toplantıya katılım                                           | İmza |
| Prof.Dr. Haner DİRESKENELİ     | Romatoloji                    | M.Ü Tıp Fakültesi/ Başkan             | <input type="checkbox"/> Var <input type="checkbox"/> Yok | <input type="checkbox"/> Evet <input type="checkbox"/> Hayır |      |
| Prof.Dr. Tülin ERGÜN           | Dermatoloji                   | M.Ü Tıp Fakültesi/Başkan Yrd.         | <input type="checkbox"/> Var <input type="checkbox"/> Yok | <input type="checkbox"/> Evet <input type="checkbox"/> Hayır |      |
| Prof. Dr. Şefik GÖRKEY         | Tıp Tarihi ve Etik            | M.Ü Tıp Fakültesi/Üye                 | <input type="checkbox"/> Var <input type="checkbox"/> Yok | <input type="checkbox"/> Evet <input type="checkbox"/> Hayır |      |
| Prof.Dr. Handan KAYA           | Patoloji                      | M.Ü Tıp Fakültesi/Üye                 | <input type="checkbox"/> Var <input type="checkbox"/> Yok | <input type="checkbox"/> Evet <input type="checkbox"/> Hayır |      |
| Prof.Dr. M.Bahadır GÜLLÜOĞLU   | Genel Cerrahi                 | M.Ü Tıp Fakültesi/Üye                 | <input type="checkbox"/> Var <input type="checkbox"/> Yok | <input type="checkbox"/> Evet <input type="checkbox"/> Hayır |      |
| Prof.Dr. Atilla KARAALP        | Farmakoloji                   | M.Ü Tıp Fakültesi/Üye                 | <input type="checkbox"/> Var <input type="checkbox"/> Yok | <input type="checkbox"/> Evet <input type="checkbox"/> Hayır |      |
| Prof.Dr. Semra SARDAS          | Eczacı                        | M.Ü Eczacılık Fak./Üye                | <input type="checkbox"/> Var <input type="checkbox"/> Yok | <input type="checkbox"/> Evet <input type="checkbox"/> Hayır |      |
| Prof.Dr. Başak DOĞAN           | Diş Hekimi                    | M.Ü Diş Hekimliği Fak./Üye            | <input type="checkbox"/> Var <input type="checkbox"/> Yok | <input type="checkbox"/> Evet <input type="checkbox"/> Hayır |      |
| Prof. Dr. Beste Melek ATASOY   | Radyasyon Onkolojisi          | M.Ü Tıp Fakültesi/Üye                 | <input type="checkbox"/> Var <input type="checkbox"/> Yok | <input type="checkbox"/> Evet <input type="checkbox"/> Hayır |      |
| Doç. Dr. Ertan KARAKOC AYDINER | Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları | M.Ü Tıp Fakültesi/Üye                 | <input type="checkbox"/> Var <input type="checkbox"/> Yok | <input type="checkbox"/> Evet <input type="checkbox"/> Hayır |      |
| Doç.Dr. Meltem KORAY           | Diş Hekimi                    | İstanbul Üniv. Diş Hekimliği Fak./Üye | <input type="checkbox"/> Var <input type="checkbox"/> Yok | <input type="checkbox"/> Evet <input type="checkbox"/> Hayır |      |
| Doç. Dr. Gürkan SERT           | Hukukçu                       | M.Ü Tıp Fakültesi/Üye                 | <input type="checkbox"/> Var <input type="checkbox"/> Yok | <input type="checkbox"/> Evet <input type="checkbox"/> Hayır |      |
| Doç.Dr. Figen DEMİR            | Halk Sağlığı                  | Acıbadem Üniv. Tıp Fak.               | <input type="checkbox"/> Var <input type="checkbox"/> Yok | <input type="checkbox"/> Evet <input type="checkbox"/> Hayır |      |
| Doç.Dr. Pınar Mega TİBER       | Biyofizik                     | M.Ü Tıp Fakültesi/Üye                 | <input type="checkbox"/> Var <input type="checkbox"/> Yok | <input type="checkbox"/> Evet <input type="checkbox"/> Hayır |      |
| Gülden Aymer MİRZA             | Sağlık Mensubu olmayan kişi   | Serbest                               | <input type="checkbox"/> Var <input type="checkbox"/> Yok | <input type="checkbox"/> Evet <input type="checkbox"/> Hayır |      |