



ARAŞTIRMA / RESEARCH

Melatoninin bağırsak mikrobiyotasını düzenleyici etkileri aracılığıyla sıçanlarda asetik asitle oluşturulmuş mide ülserinde hafifletici etkileri

The ameliorative effects of melatonin on acetic acid-induced gastric ulcer in rats via its modulatory effects on gut microbiota

Sevil Arabacı Tamer¹, Alper Yıldırım¹, Özge Çevik², Burak Aksu³, Meral Yüksel⁴, Ekin Kuntsal Dertsiz⁵, Serap Şırvancı⁵, Berrak Ç. Yeğen¹

¹Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Fizyoloji Anabilim Dalı, ²Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, ³Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Turkey

²Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Aydın, Turkey

⁴Marmara Üniversitesi Sağlık Meslek Yüksekokulu, İstanbul, Turkey

Cukurova Medical Journal 2021;46(1):186-200

Abstract

Purpose: The aim of this study was to observe the possible protective effects of melatonin pretreatment on oxidative damage and microbiota alteration due to gastric ulcer in rats.

Materials and Methods: Wistar-albino rats were given (n=32) melatonin (4 mg/kg/day), antibiotic mixture (AB; 1g/L ampicillin + 1g/L neomycin + 1g/L metronidazole), melatonin+AB in drinking water for 12 days or tap water for 15 days (control group; n=8). Subsequently, ulcer was induced. All treatments were continued for three days. Gastric tissues were obtained for biochemical and histopathological examinations, and fecal samples from the rectum were stored for bacteriological measurements.

Results: MPO and MDA levels were increased in untreated ulcer groups compared to the control group. In addition, the levels of luminol-lucigenin chemiluminescence (CL) and 8-OHdG and TNF- α and IL-8 protein expressions were also increased, while TNF- α , IL-8, MDA, 8-OHdG, luminol and lucigenin CL levels were significantly decreased in the melatonin-treated ulcer groups. However, melatonin+AB pretreatment increased antioxidant GSH levels and anti-inflammatory IL-10 levels, and suppressed caspase-3 activity and reduced MPO back to control level.

Conclusion: We anticipate that melatonin treatment, which is an effective antioxidant and radical scavenger, can accelerate ulcer healing along with antibiotics and increase the variety of bacteria impaired by antibiotics in the colon.

Keywords: Stomach ulcer, acetic acid, melatonin.

Öz

Amaç: Bu çalışmada melatonin ön-tedavisinin, sıçanlarda mide ülserine bağlı gerçekleşen mikrobiyota değişimine ve oksidatif hasara karşı koruyucu etkilerini araştırmak hedeflenmiştir.

Gereç ve Yöntem: Wistar albino sıçanlara (n=32) 12 gün boyunca içme suyu, melatonin (4mg/kg/gün), antibiyotik karışımı (AB; 1 g/L ampicilin + 1 g/L neomisin + 1 g/L metronidazol), melatonin+ AB içme suyunda verildi. Ardından ülser oluşturuldu. Katkısız içme suyu alan sıçanların yarısına cerrahi işlem yapıldı ama asetik asit uygulanmadı (kontrol grubu; n=8). Cerrahi sonrasındaki 3 gün boyunca uygulanan tüm tedavilere devam edildi. Mide dokuları biyokimyasal ve histopatolojik incelemeler için çıkarıldı. Rektumdan alınan fekal örnekler bakteriyolojik ölçümler için uygun koşullarda saklandı.

Bulgular: Tedavi almayan ülser grubunun mide dokusunda MDA, MPO, 8-OHdG, luminol ve lusigenin kemilüminesans seviyeleri, TNF- α ve IL-8 protein ekspresyonları kontrol grubuna göre anlamlı derecede artarken, antioksidan GSH seviyesinin azaldığı gözlemlendi. Melatonin+AB ön-tedavi uygulaması antioksidan GSH seviyesini ve anti-inflamatuvar IL-10 miktarını artırmış, kaspaz-3 aktivitesini baskılamış ve dokuya nötrofil göçünü kontrol düzeyine incecik şekilde azaltmıştır.

Sonuç: Etkin bir antioksidan ve radikal süpürücü olan melatoninin antibiyotik ile birlikte verilmesinin, ülser iyileşmesini hızlandırmada ve kolondaki dağılımı bozulan bakteriyel çeşitliliği düzeltmede daha etkili olacağı öngörülmektedir.

Anahtar kelimeler: Mide ülseri, asetik asit, melatonin.

Yazışma Adresi/Address for Correspondence: Dr. Sevil Arabacı Tamer, Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Fizyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Turkey E-mail: sevilarabaci@gmail.com

Geliş tarihi/Received: 14.08.2020 Kabul tarihi/Accepted: 10.10.2020 Çevrimiçi yayın/Published online: 10.01.2021

GİRİŞ

Mide veya duodenumun kas katmanlarına kadar nüfuz edebilen, çevresinde akut ya da kronik inflamasyon bulunan bir kaviteye yol açabilen mukozal hasar “peptik ülser” olarak tanımlanmaktadır¹. Mide ülseri sıklıkla korpustan antruma geçiş bölgesindeki mukozada ve küçük kurvatürde yer alırken, duodenum ülseri duodenum bulbusunda oluşur. Her ne kadar mide ülserinin patofizyolojisi tam olarak anlaşılammış olsa da, mide ülseri patogenezinin temelini mide mukozasını koruyucu faktörler ve zarar verici faktörler arasındaki dengesizliğin oluşturduğu düşünülmektedir². Savunma faktörleri arasında hücre yenilenme kapasitesi, yeterli mukus ve bikarbonat üretimi ile yeterli kan akışı yer alırken, mukozaya zarar verici faktörler arasında artmış mide asidi ve pepsin sekresyonu ile reaktif oksijen türlerinin üretimindeki artış bulunmaktadır³. Aşırı alkol tüketimi, uzun süreli non-steroidal anti-inflamatuvar (NSAİİ) ilaç kullanımı, stres ve *Helicobacter pylori* enfeksiyonu da, koruyucu/zarar verici faktörler arasındaki dengesizliği desteklemekte ve dolayısıyla mide ülseri oluşumuna yol açmaktadır⁴. Tüm dünyada yılda yaklaşık 4 milyon insanı etkileyen peptik ülserin tedavisinde yeni seçeneklere gereksinim duyulmaktadır⁵.

Melatonin (N-asetil-5-metoksitriptamin) pineal bez tarafından sentezlenen ve salgılanan bir molekül olup, sirkadiyen ritmin düzenlenmesi başta olmak üzere çeşitli endokrin, parakrin ve otokrin fonksiyonlara sahiptir^{6,7}. Doğrudan serbest radikal süpürücü etkisi nedeniyle güçlü bir antioksidan olan melatonin, oksidatif stres varlığında glutatyon peroksidaz, süperoksit dismutaz ve katalaz gibi antioksidan enzimlerin mRNA seviyelerini ve aktivitelerini de artırarak koruyucu rol oynamaktadır^{8,9}. Melatoninin, klinik çalışmalarda ve farklı deneysel ülser modellerinde, reaktif oksijen türlerinin (ROT) neden olduğu oksidatif hasara karşı mide mukozasını koruduğu ya da ülseri iyileştirici etki gösterdiği belirlenmiştir¹⁰⁻¹³. Ancak, melatoninin mide ülserine karşı bu koruyucu etkisinde bağırsak mikrobiyotasının rol oynayıp oynamadığı bilinmemektedir.

Mikrobiyota, vücut boşluklarını paylaşan komensal, simbiyotik ve patojenik mikroorganizmaların ekolojik topluluğu olarak tanımlanabilir¹⁴. Mikrobiyotanın konakçı işlevlerinde ve çeşitli hastalıklarda önemli

rolleri olduğu kabul edilmektedir. *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria* ve *Verrucomicrobia* baskın olmak üzere farklı filumların bağırsak mikrobiyomunun fonksiyonel rolüne katkıda bulunduğu düşünülmektedir^{15,16}. Gastrointestinal mukozadaki başlıca fonksiyonları arasında, enerji metabolizmasının düzenlenmesi, epitel hücrelerinin çoğalması ve farklılaşması, ekzojen patojen enfeksiyonuna karşı koruma ve bağışıklık sisteminin gelişimi yer almaktadır^{17,18}. Bağırsak mikrobiyotasının çeşitliliğinde memeli konakçı genomunun önemi olduğu gibi, çevresel faktörler (antibiyotik kullanımı, diyet, stres, hastalık ve yaralanma gibi) de mikrobiyotayı sürekli olarak etkilemektedir. Bağırsak mikrobiyotasının bozulması (disbiyozis), mide ülseri de dahil olmak üzere, inflamatuvar bağırsak hastalığı, kolon kanseri, huzursuz bağırsak sendromu gibi birçok gastrointestinal hastalık ile ilişkili bulunmuştur¹⁹.

Marshall ve Warren tarafından 1984 yılında peptik ülserin etiolojisinde bakterilerin önemli bir faktör olabileceğinin ortaya konulmasıyla birlikte, tedavi amaçlı antibiyotik uygulamaları başlamış ve enfeksiyonu kanıtlanan duodenum veya mide ülseri hastalarında *Helicobacter pylori*’ye karşı antimikrobiyal tedavi endike hale gelmiştir²⁰⁻²³.

Ancak, antimikrobiyal tedavi nedeniyle tüm dünyada antibiyotik direncinin artmaya devam ettiği bilinmektedir²⁴. Ayrıca, *Helicobacter pylori* tedavisi amacıyla proton pompa inhibitörü ve antibiyotik kombinasyonunu kullanan hastalarda bağırsak mikrobiyotasında bozulma olduğu bildirilmiştir^{25,26}. Bu nedenle, ülser tedavisinde antibiyotik-ilişkili diyare gibi yan etkileri azaltmak ve bağırsak mikrobiyotasını korumak veya düzeltmek amacıyla, antibiyotik tedavisine probiyotik eklenmesinin yararlı olduğu önerilmiştir²⁷.

Daha önce yaptığımız bir deneysel çalışmada, normal diyetle beslenen sağlıklı sıçanlarda antibiyotik tedavisine melatonin eklenmesinin, kolon motilitesini azalttığını ve antibiyotiğe bağlı gözlenen hepatik ve intestinal inflamasyonu hafiflettiğini göstermiştik²⁸. Bu bilgilerin ışığında, öncelikle melatonin ön-tedavisinin sıçanlarda mide ülserine bağlı gerçekleşen mikrobiyota değişimine ve oksidatif hasara karşı koruyucu etkilerini araştırmak hedeflenmiştir. Ayrıca, ülserde oluşan değişikliklerin antibiyotikle oluşturulan disbiyozisle nasıl değişeceği ve antibiyotik ile birlikte melatonin uygulanmasının ülserle ilgili oksidatif hasara

ve etkilerini araştırmak amacıyla bu çalışma planlanmıştır.

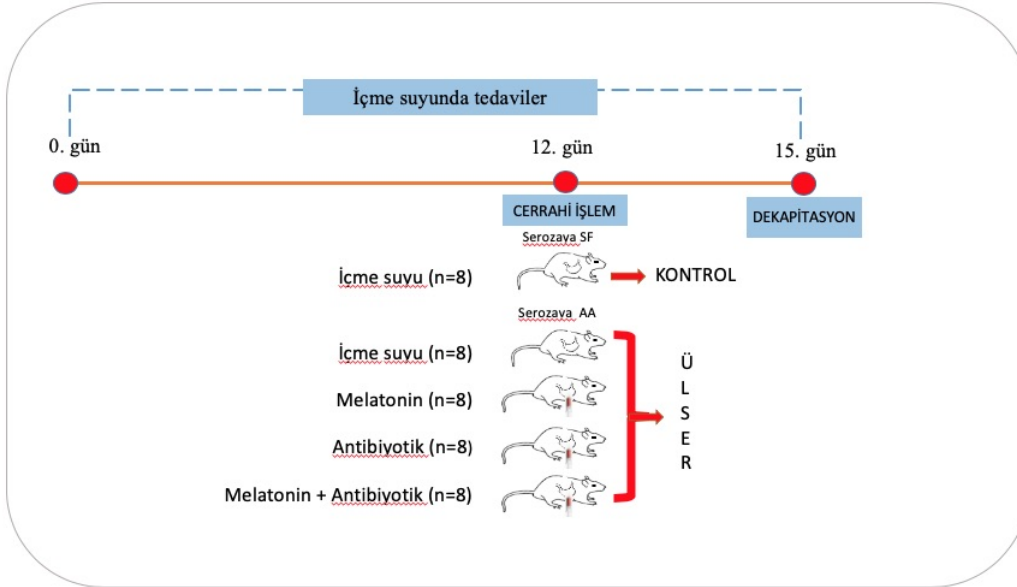
GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmada kullanılan Wistar albino dişi ve erkek sıçanlar (240-300gr) Marmara Üniversitesi Deneysel Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden (DEHAMER) temin edilerek sıcaklığı 22 ± 2 °C ve nem oranı %65-70 olan ve 12 saat aydınlık-12 saat karanlık döngüsüne sahip laboratuvar koşullarında standart hayvan yemiyle beslendiler. Dişi ve erkek sıçanlar ayrı kafeslerde tutuldular. Çalışma, New York

Academy of Sciences ve ARRIVE rehberleri ile, laboratuvar hayvanlarının bakımı ve kullanımına dair ulusal mevzuata uygun olarak planlandı ve Marmara Üniversitesi Deneysel Hayvanları Araştırma Etik Kurulu'ndan onay alındı (onay tarihi:09 Eylül 2017; onay no: 67.2017.mar).

Deneysel tasarım

Sıçanlar rastgele olarak 4 gruba ayrılarak, 15 gün boyunca içme sularında melatonin, antibiyotik (AB) karışımı, melatonin + antibiyotik karışımı veya sadece içme suyunu *ad libitum* olarak aldılar (şekil 1).



şekil 1. Deney tasarımı

Deney protokolü boyunca uygulanan prosedürlerin zaman çizelgesi

Melatonin, midede antioksidan etkinliği gösterilmiş olan^{28,29} dozda (4 mg/kg/gün; Sigma), iki günde bir taze olarak hazırlandı ve ışıktan korunması amacıyla melatonin eklenen içme suyu şişeleri alüminyum folyo ile kaplandı. Antibiyotik karışımındaki neomisin (Vilsan Veteriner İlaçları) Gram-negatif bakterilere karşı yüksek bakterisidal aktiviteye, Gram-pozitif bakterilere karşı da kısmi bakterisidal aktiviteye sahiptir. Ampisilin (Actavis İlaçları) Gram-pozitif bakterilere ve bazı Gram-negatif bakterilere etkilidir. Metronidazol (Fresenius Kabi İlaç) ise anaerob

organizmalar ve protozoalara karşı kullanılmaktadır. Bu üçlü AB karışımının (1 g/L ampisilin + 1 g/L neomisin+ 1 g/L metronidazol) bağırsak mikrobiyotasında disbiyoz geliştirdiği gösterilmiştir^{28,30}. İçme suyu alımlarının 12. gününde, katkısız içme suyu alan sıçanların yarısında (n=8) ve içme-sularında antibiyotik karışımı (n=8), melatonin (n=8) ve melatonin + antibiyotik karışımı (n=8) tedavisi alan tüm sıçanlarda cerrahi işlem ile asetik asit uygulanarak ülser oluşturuldu. Katkısız içme suyu alan sıçanların diğer yarısında ise, cerrahi işlem yapıldı ama asetik asit uygulanmadı (kontrol grubu; n=8). Cerrahi sonrasındaki 3 gün boyunca da tedavileri devam eden sıçanlara 15. günde dekapitasyon ile

ötenazi uygulanarak mide dokuları çıkarıldı. Mide dokuları biyokimyasal ve histopatolojik incelemeler için ve rektumdan alınan fekal örnekler de bakteriyolojik ölçümler için uygun koşullarda saklandı.

Mide ülseri oluşturulması

Deneyin 12. günü, Okabe ve Pfeiffer tarafından tanımlanan asetik asit modeli kullanılarak ülser oluşturuldu³¹. Bu modelle indüklenen ülserlerin 2-3 gün içinde kronik hale geldiği bilinmektedir. Gece açlığını takiben intraperitoneal ketamin (100 mg/kg) ve klorpromazin (0,75 mg/kg) enjeksiyonu ile anestezi uygulandıktan sonra, orta hat laparotomisi ile sıçanların mideleri açığa çıkarıldı. Mide korpusunun serozal yüzeyine 3 ml'lik bir şırınganın tüp kısmı kullanılarak 0,5 ml asetik asit (%80, v/v) 60 saniye boyunca uygulandı. Ardından, fazla sıvı aspire edilerek mide yüzeyi serum fizyolojik ile yıkandı. Kontrol grubunda da aynı anestezi ve cerrahi işlemler uygulandı, ancak mide serozası asetik asit yerine serum fizyolojik uygulamasına maruz bırakıldı.

Mide dokusunda malondihaldehit ve glutatyon düzeylerinin ölçülmesi

Mide doku örnekleri Ultra Turrax doku homojenizatörü kullanılarak trikloroasetik asit (%10, TCA) ile homojenize edildi. Oksidatif hasara bağlı oluşan lipid peroksidasyonunun göstergesi olan malondialdehit (MDA) seviyeleri, tiyobarbitürik asit reaktif madde oluşumu gözlemlenerek ölçüldü ve $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ tükenme katsayısı kullanılarak sonuçlar nmol MDA/gram doku cinsinden belirlendi³². Modifiye Ellman prosedürü kullanılarak glutatyon (GSH) seviyeleri 412 nm absorbans değerinde spektrofotometrik olarak ölçüldü³³.

Mide dokusunda miyeloperoksidaz aktivitesinin ölçümü

Miyeloperoksidaz (MPO) aktivitesi, dokuya nötrofil infiltrasyonunu belirlemek için yaygın olarak kullanılır³⁴. Alınan doku örnekleri %0,5 heksadesiltrimetilamonyum bromürde (HETAB; pH 6'da 50 mM potasyum fosfat tamponu) homojenize edildi ve ardından santrifüj edildi (12.000 rpm, 4 °C). Elde edilen pelet 50 mM K2HP04 solüsyonu (HETAB; %0,5) ve etilen diamin tetra-asetik asit (EDTA, 10 mM; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, ABD) içinde homojen hale getirildi. MPO aktivitesi, o-dianisidin-2HCl'nin H2O2'ye bağlı

oksidasyonunun spektrofotometrede 460 nm'de ölçülmesi ile belirlendi. MPO aktivitesi miktarı U/gram doku olarak ifade edildi.

Mide dokusunda kemilüminesans ölçümü

Güçlendirici luminol ve lusigenin problemlerinin kullanıldığı bu yöntem yardımı ile mide dokusunda reaktif oksijen türlerinin (ROT) düzeyi ölçüldü. Luminol hidroksil radikalini, hidrojen peroksit ve hipoklorit radikallerini spesifik olarak tespit ederken, lusigenin seçici olarak süperoksit radikallerinin varlığını gösterir. Luminol (0,2 mM) veya lusigenin (0,2 mM) eklenen örnekler luminometre (Mini Lumat LB 9509; EG&G Berthold) ile ölçüldü. Ölçümler oda sıcaklığında ve birer dakika aralıklı olarak toplamda 5 dakikada yapıldı. Sonuçlar mg doku başına nispi ışık birimleri (relative light units, rlu) olarak ifade edildi³⁵.

Mide dokusunda 8-hidroksi-2-deoksiguanozin ölçümü

Midede 8-hidroksi-2-deoksiguanozin (8-OHdG) seviyelerini belirlemek için genomik DNA, üreticinin prosedürü (Invitrogen, ABD) doğrultusunda DNA ekstraksiyon kiti kullanılarak doğrudan mide numunelerinden ekstrakte edildi. Mide dokusunun 8-OHdG seviyeleri ELISA kiti kullanılarak ölçüldü (OxiSelect Oksidatif DNA Hasarı ELISA Kiti, Cell Biolabs, ABD)³⁶.

Mide dokusunda kaspaz-3 aktivitesinin ölçülmesi

Kaspaz-3 aktivite deneyi, kaspaz-3 hücresel aktivite test kiti (Calbiochem, San Diego, ABD) kullanılarak üreticinin talimatlarına göre yapıldı. DEVDpNA klevaj aktivitesi pmol / dk / mg protein olarak hesaplandı. Gastrik doku örneklerindeki protein konsantrasyonu Bradford yöntemi kullanılarak belirlendi.

Mide dokusunda Western Blot ile protein düzeylerinin ölçümü

Mide doku örnekleri, RIPA hücre liziz tamponu (Thermo Fisher) kullanılarak homojenize edildikten sonra protein konsantrasyonları Bradford yöntemi ile belirlendi (Bradford, 1976). % 4-12 sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jelin her bir kuyusuna 25µg protein yüklenerek elektroforez gerçekleştirildi. Bu işlemten sonra proteinler poliviniliden florür membranına aktarıldı ve membran Tris-tamponlu

serum fizyolojik (TBS) içinde %5 yağsız süt tozu ile bloke edildi. Membran Tween-20 (%0,1) içeren TBS içinde yıkandıktan sonra gece boyunca birincil antikorlar ile inkübe edildi (1: 500 seyreltme anti-TNF alfa, anti-interlökin (IL)-6, anti- IL-8, anti-IL10, anti-beta aktin) ve ardından Tween-20 içeren TBS (%0,1) ile yıkandı. Yıkanan membran 2 saat boyunca uygun HRP konjuge ikincil antikorlar ile inkübe edildi. Blotlama, kemilüminesans reaktifleri ile gerçekleştirilerek kemilüminesans görüntüleme sistemleri ile analiz edildi. Veriler, "Image J Programme Optical Density Analysis Software" yazılımı kullanılarak ve her bir bandı üç kez ölçerek analiz edildi. Sinyaller beta aktin'e göre normalize edildi.

Mide dokusunda histopatolojik incelemeler

Mide dokuları %4'lük paraformaldehit solüsyonunda fikse edilmesinin ardından, yükselen alkol serilerinden geçirilerek (%70, %90, %96, %100) dehidrate edildi. Toluene ile şeffaflaştırılan dokular parafine gömülerek bloklandı. Parafin doku bloklarından 5-µm kalınlığında kesitler (Leica RM2125RT, Wetzlar, Almanya) alınarak, histopatolojik değerlendirmeler için hematoksilin ve eozin boyası ile boyandı. Boyanan tüm kesitler kamera eklentisi (Olympus DP72, Tokyo, Japonya) bulunan ışık mikroskopunda (Olympus BX51, Tokyo, Japonya) örneklerin hangi deney gruplarına ait olduğu kendileri ile paylaşılmayan araştırmacılar tarafından değerlendirildi.

Mide dokusunda apoptozun değerlendirilmesi

Mide mukozasındaki apoptoz, çift sarmallı DNA kopmalarında 3'-OH terminalini etiketleyen, terminal deoksinükleotid olarak transferaz dUTP nick end etiketleme (TUNEL) yöntemi ile değerlendirildi. Alınan 5-µm kalınlığında kesitler ksilen ile deparafinize edilerek %96'lık etanol ile yıkandı ve oda sıcaklığında proteinaz K ile muamele edildi. Fosfat tamponlu tuzlu su ile yıkandıktan ve dengeleme tamponu ile muamele edildikten sonra TdT enzimi uygulandı ve bir saat 37 °C'de inkübe edildi. Örnekler 30 dakika daha anti-digoksinin konjugatı ile inkübe edildi ve PBS ile yıkandıktan sonra Mayer'in hematoksilini kullanıldı. Işık mikroskopuna (Olympus BX51) eklenmiş bir kamera (Olympus DP72) aracılığıyla, her bir örnekten alınan 5

mikrografta apoptotik çekirdekler sayıldı ve her hayvan için bir ortalama elde edildi.

Fekal içerikten toplam DNA izolasyonu

Dekapitasyon sonrasında steril koşullarda çekumdan feçes örnekleri alındı ve -80°C de saklandı. Bakteriye DNA izolasyonu için dışkı örnekleri (200 mg) 1 ml'lik tamponda yüksek hızlı vortekle homojenize edildi ve QIAamp DNA Feçes Mini kiti (Qiagen) kullanılarak DNA'nın izolasyonu kılavuzda verilen talimatlar doğrultusunda gerçekleştirildi. DNA konsantrasyonu 260 nm dalga boyunda spektrofotometre (Nanodrop ND-1000; Fisher Termo) ile ölçüldü ve elde edilen ekstraktlar -20° C'de saklandı.

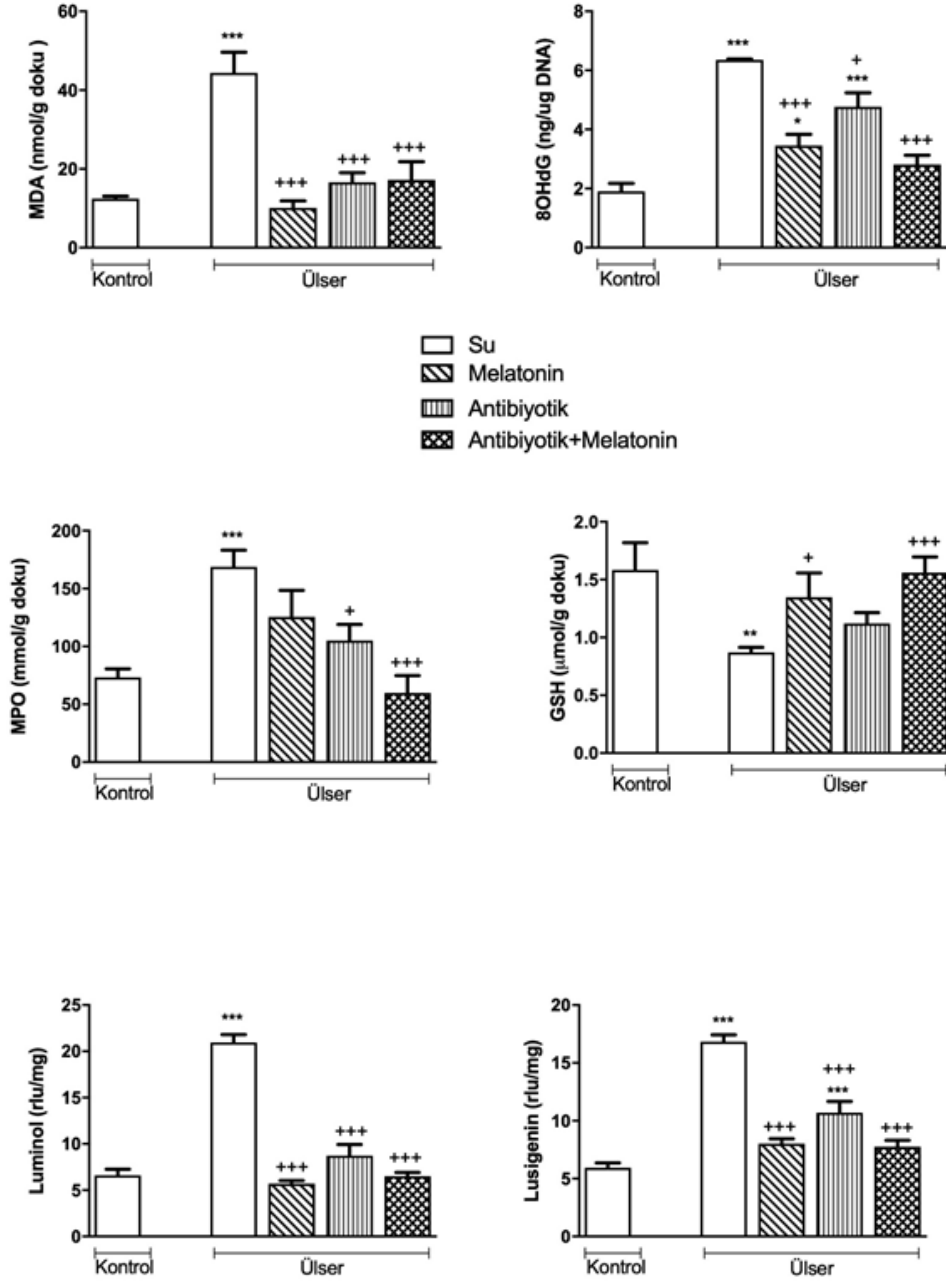
Kantitatif PCR analizi

Kantitatif *real-time* PCR (qPCR) fekal mikrobiyotadaki farklı bakteri gruplarının belirlenmesi için *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* ve *Protobacteria* için uygun primerler kullanılarak gerçekleştirildi. QPCR reaksiyonu için GM SYBR qPCR kiti (Genemark) Rotor-Gene Q termal cyclers ile kullanıldı (Qiagen). 20 µl toplam PCR karışımı hacminde, 1 µl fekal ekstrakt her primerden 200 nM ile karıştırıldı. İlk denatürasyonun 95 °C'de 10 dakika süreyle yapılmasından sonra, döngü şu koşullarda kırk beş kez tekrarlandı: 95 °C'de 10 saniye, 55 °C'de 20 sn. ve 72 °C'de 15 sn. Rotor-Gene Q yazılımı (Qiagen) qPCR ürünlerini analiz etmek için kullanıldı. Son mutlak bakteriyel filum miktarları, döngü eşik değerlerinin elde edilen standart eğrilerle ilişkilendirilmesiyle hesaplandı²⁸²⁸.

İstatistiksel analiz

Çalışmada GraphPad Prism 8.0 paket programı kullanılarak istatistiksel analizler gerçekleştirilmiştir. Verilerin normal dağılımları (Shapiro-Wilk normalite testi) kontrol edildi.

Mide dokusunda gerçekleştirilen biyokimyasal ve moleküler verilerde çoklu karşılaştırmalar için tek yönlü ANOVA testi ve ardından post-hoc Bonferroni testi yapıldı. Histopatolojik / immünohistokimyasal skorlarda parametrik olmayan Kruskal-Wallis testi kullanıldı. Değerler "ortalama ± standart hata" şeklinde ifade edildi ve p<0,05 düzeyindeki farklılıklar anlamlı kabul edildi.



Şekil 2. Tüm deney gruplarının mide dokularında malondialdehit (MDA) ve 8-hidroksi-2-deoksiguanozin (8-OHdG) seviyeleri, miyeloperoksidaz (MPO) aktivitesi, glutasyon (GSH) içeriği, luminol ve lusigenin kemilüminesans seviyeleri. Tek-yönlü ANOVA testi ile: * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001, kontrol grubuna kıyasla; + p < 0.05, +++ p < 0.001, ülser grubuna kıyasla

BULGULAR

Tedavi verilmeyip sadece içme suyu verilmiş ve ülser oluşturulmuş olan grubun mide dokusunda lipit peroksidasyonunun belirteci olan MDA, dokuda nötrofil birikimini gösteren MPO, DNA hasar belirteci 8-OHdG, ROT'ların üretimini gösteren luminol ve lusigenin kemilüminesans seviyeleri kontrol grubuna göre anlamlı derecede artarken ($p<0,001$), antioksidan GSH seviyesinin azaldığı gözlemlendi ($p<0,01$; Şekil 2). Tedavisiz ülser grubu ile kıyaslandığında, tek başına melatonin, tek başına antibiyotik veya melatonin + antibiyotik ön-tedavileri alan ülser gruplarında MDA, 8-OHdG, luminol ve lusigenin düzeylerinin anlamlı olarak düştüğü görüldü ($p<0,05-0,001$).

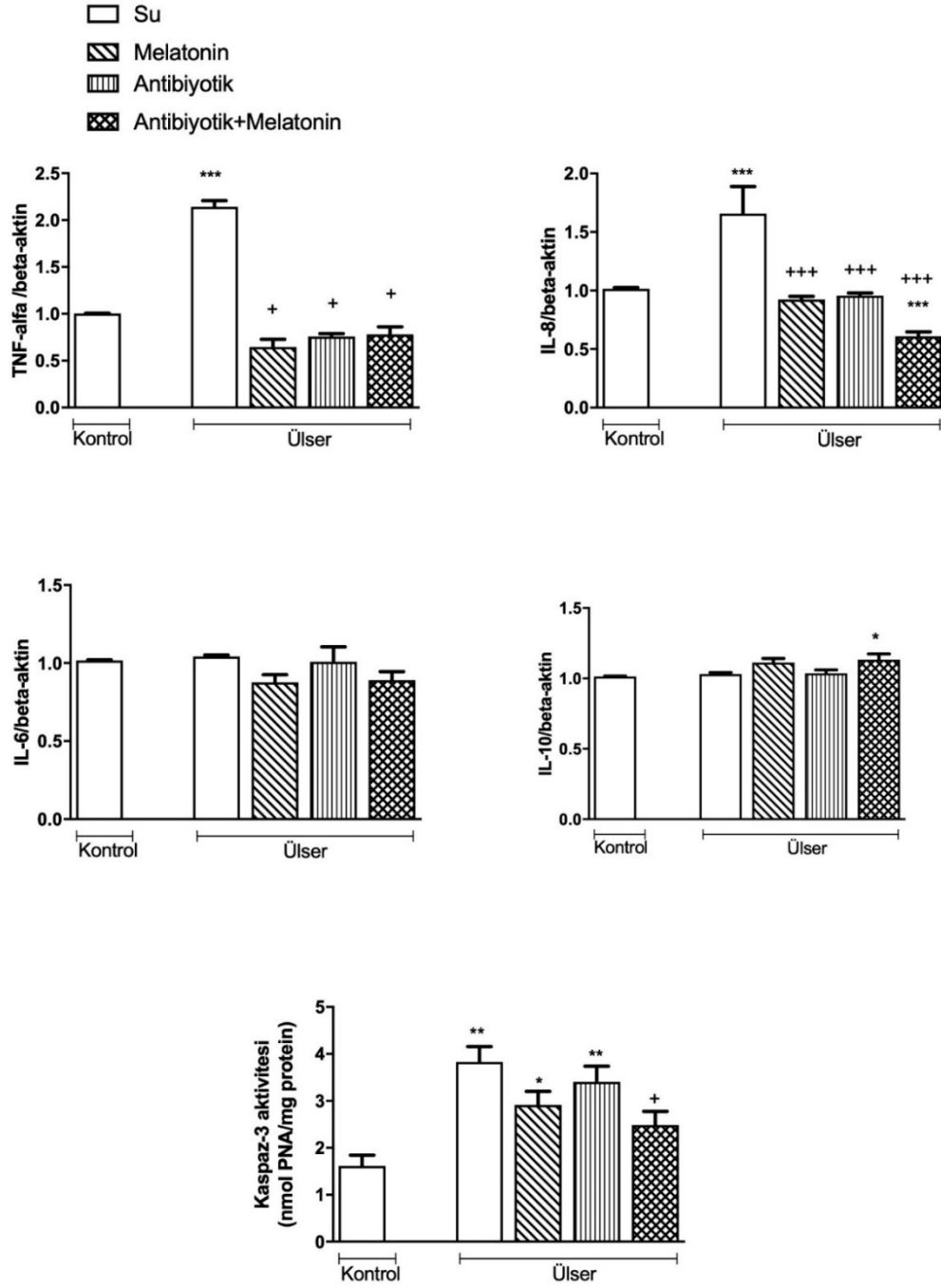
Tek başına melatonin ve antibiyotikle birlikte verilen melatonin, antioksidan GSH seviyesinde ülser grubuna göre anlamlı derecede artışa neden olurken ($p<0,05$ ve $p<0,001$), antibiyotik tek başına verildiğinde ülserle azalmış olan GSH düzeyini değiştirmede. Melatonin ön-tedavisinin ülserle bağlı artmış bulunan MPO aktivitesinde etkisi gözlenmedi; fakat tek başına antibiyotik ($p<0,05$) ve melatonin + antibiyotik ($p<0,001$) uygulanmasıyla dokudaki MPO aktivitesinin anlamlı derecede azaldığı belirlendi. Elde ettiğimiz sonuçlar antibiyotik ve melatoninin birlikte verilmesinin mide ülserinde meydana gelen oksidan hasarı daha etkin bir şekilde baskıladığını ve iyileşmesini kolaylaştırdığını göstermektedir.

Pro-inflamatuvar (TNF-alfa, IL-6, IL-8) ve anti-inflamatuvar (IL-10) sitokinlerin midedeki protein ekspresyonlarına bakıldığında, ön-tedavisiz ülser grubunda sadece TNF- α ve IL-8'in protein ekspresyonları kontrol grubuna kıyasla yüksek bulunurken ($p<0,001$), ülserin midedeki IL-6 ve IL-10 ekspresyon düzeylerini değiştirmedeği görüldü (Şekil 3). Ülser ile artmış bulunan TNF- α ve IL-8 protein ekspresyonlarının uygulanan ön-tedavilerin her biri ile anlamlı şekilde azaldığı gözlemlendi ($p<0,05-0,001$). Bununla birlikte, melatonin ve antibiyotik kombine ön-tedavisi ise IL-10 ekspresyon düzeyini kontrole kıyasla anlamlı şekilde yükseltti ($p<0,05$). Tedavisiz ülser grubu ile tek başına antibiyotik veya tek başına melatonin verilen grupların mide dokularında apoptoz belirteci olan kaspaz-3 aktivitesi kontrol grubu ile karşılaştırıldığında yüksek bulundu ($p<0,05-0,01$; Şekil 3). Tek başına melatonin veya tek başına antibiyotik tedavileri kaspaz-3 aktivitesinde tedavisiz ülser grubuna göre anlamlı değişiklik

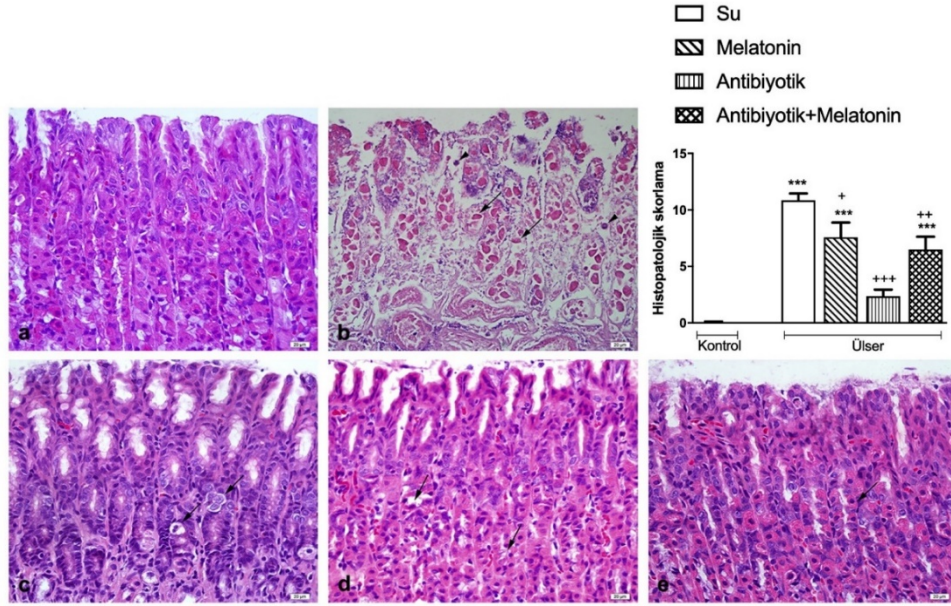
yapmazken, kombine tedavi ülserle artmış bulunan apoptozu baskıladı ($p<0,05$).

Mikroskopik değerlendirme sonucunda kontrol grubunda mide dokusunda gözlenen düzenli mukozal ve submukozaya karşın, tedavisiz ülser grubunda belirgin nekrotik lezyonlar, yoğun inflamatuvar hücre infiltrasyonu, mukozal hasar, submukozal ödem, vazokonjesyon ve kanama görüldü (Şekil 4). Melatonin veya melatonin + antibiyotik tedavileri uygulanan ülser gruplarında bu hasar göstergelerinin şiddetinin azaldığı ve nekrotik lezyonların daha az olduğu belirlendi. Hasar göstergelerinin derecelendirildiği histopatolojik skorların değerlendirilmesi ise, ülser ile artan hasar skorunun ($p<0,001$) her üç tedavi ile baskılandığını ve tek başına antibiyotik tedavisi alan ülser grubunda skorun en düşük olduğunu ortaya koydu ($p<0,05-0,001$). Diğer taraftan, tedavisiz ülser grubunda kontrol grubuna göre artmış bulunan TUNEL-pozitif apoptotik hücre sayısının ($p<0,05$) sadece antibiyotik alan ülser grubunda da benzer şekilde yüksek olduğu ($p<0,05$), ancak tek başına melatonin ya da antibiyotikle beraber melatonin alan ülser gruplarında apoptotik hücre sayısının kontrolden farklı olmadığı gözlemlendi (Şekil 5).

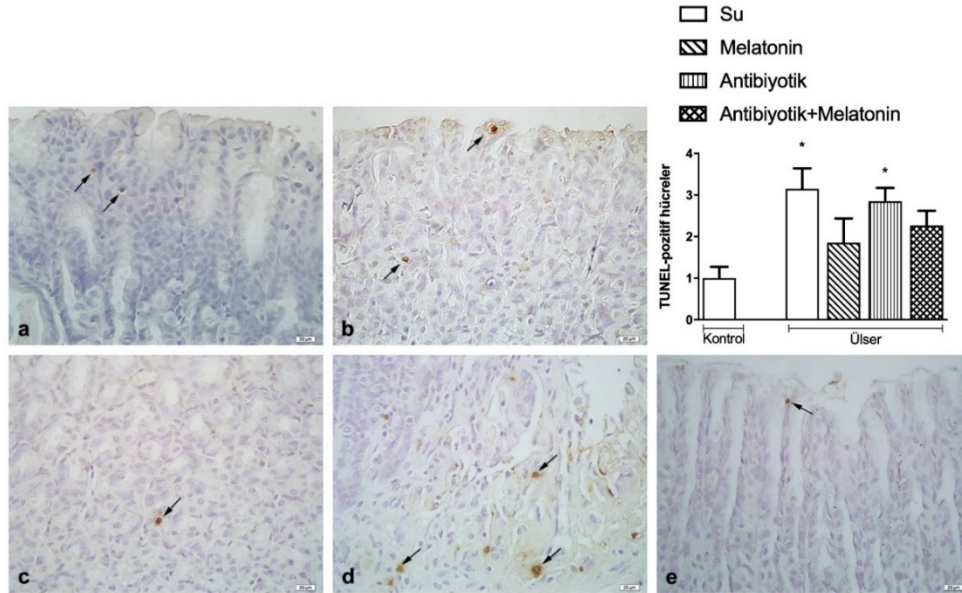
Fekal örnekler kantitatif PCR ile değerlendirildiğinde, kontrol grubunda *Bacteroidetes*'in (%93,2) baskın olduğu ve *Actinobacteria* (%6,6) ve *Protoeobacteria*'nın (%0,2) ise daha az oranlarda bulunduğu görüldü (Şekil 6A ve Şekil 6B). Tedavisiz ülser grubunda, *Bacteroidetes* filumunun yüzdesinin (%98,7) arttığı, *Actinobacteria* (%1,3) ve *Protoeobacteria* (%0,1) filumlarının oranlarının ise azaldığı görüldü; ancak bu değişiklikler istatistiksel olarak farklı bulunmadı. Tek başına melatonin tedavisi alan ülser grubunda, *Bacteroidetes* (%92,7) ve *Actinobacteria* (%7,2) miktarları ile tek başına antibiyotik tedavisi alan ülser grubunda *Bacteroidetes* (%76,9) ve *Actinobacteria* (%13,0) filumlarının miktarları kontrol grubundan istatistiksel olarak farklı değildi. Buna karşın, tek başına antibiyotik tedavisinin *Protoeobacteria* (%10,1) filumunun ekspresyonunda hem kontrol ($p<0,01$) hem de ülser grubuna göre artışa ($p<0,05$) neden olduğu gözlemlendi. Kombine tedavi alan grupta *Bacteroidetes* (%52,7) oranı azaldığı halde bu azalma anlamlı değildi. *Actinobacteria* (%42,5) ve *Protoeobacteria* (%4,8) miktarlarının kombine tedavi alan grupta kontrol grubuna göre arttığı bulundu ($p<0,05$). Ayrıca, kombine tedaviyle *Protoeobacteria* ekspresyonunun tedavisiz ülser grubunda da anlamlı olarak arttığı görüldü ($p<0,05$).



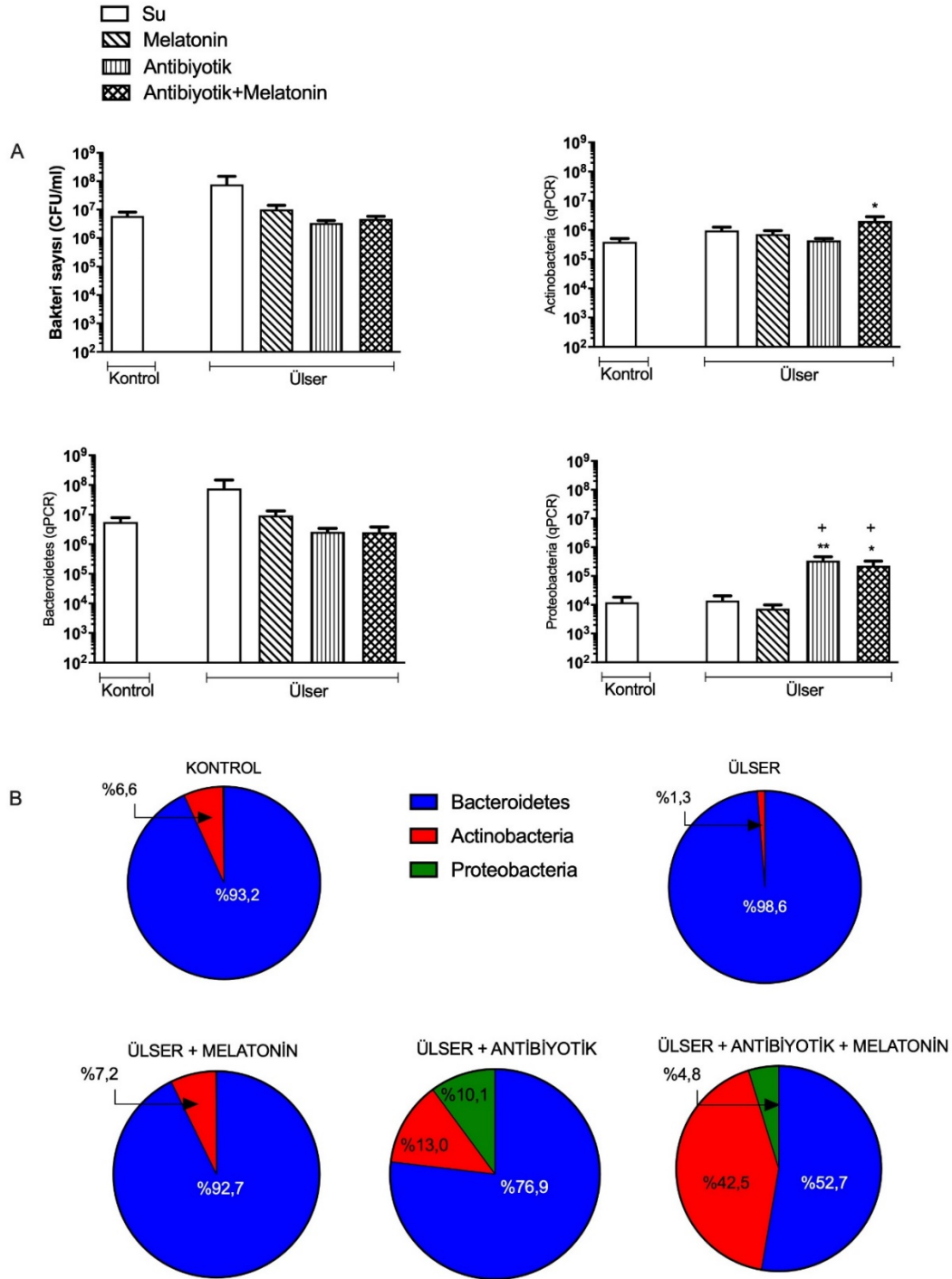
Şekil 3. Tüm deney gruplarının mide dokularında tümör nekroz faktör (TNF) - α , interlökin-8 (IL-8), IL-6, IL-10 protein ekspresyonları ve kaspaz ifadeleri. MEL: Melatonin ; AB: Antibiyotik. Tek-yönlü ANOVA testi ile: * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001, kontrol grubuna kıyasla; + p < 0.05, +++ p < 0.001, ülser grubuna kıyasla.



Şekil 4. (a) Kontrol grubunda düzgün yapıda mukoza ve mide bezleri görülmektedir. (b) Ülser grubunda ileri derecede hasarlı mukoza ve nekrotik bezler (ok) görülmektedir. Ok başı: İnflamatuvar hücre infiltrasyonu. (c) Ülser+melatonin grubunda mide mukozası genel olarak normal görünümde olup, yer yer hasarlı bez hücreleri de izlenmektedir (ok). (d) Ülser+antibiyotik grubunda mukoza ve mide bezleri genel olarak normal görünümde olup, yer yer hasarlı bez hücreleri de izlenmektedir (ok). (e) Ülser+melatonin+antibiyotik grubunda düzgün yapıda mukoza ve mide bezleri görülmektedir (ok). Hematoksilen ve eozin boyama. Orijinal büyütme: X400. Bar: 20 μ m. Kruskal-Wallis testi ile: *** p <0.001, kontrol grubuna kıyasla; + p <0.05, ++ p <0.01, +++ p <0.001, ülser grubuna kıyasla.



Şekil 5. Tüm deney gruplarının mide dokularında TUNEL boyama ve TUNEL pozitif hücre sayı grafiği. TUNEL pozitif hücre skorlamasında parametrik olmayan Kruskal-Wallis testi kullanıldı. * p <0.05, kontrol grubuna kıyasla.



Şekil 6. Tüm deney gruplarının fekal numunelerindeki Proteobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes miktarları (A) ve bu mikrobiyota türlerinin taksonomik kompozisyonundaki değişiklikler (B). CFU: koloni oluşturan birimler. Tek-yönlü ANOVA testi ile: * p < 0.05, ** p < 0.01, kontrol grubuna kıyasla; + p < 0.05, ülser grubuna kıyasla

TARTIŞMA

Çalışmanın bulguları, ülser oluşumuyla birlikte midede oksidatif stresin arttığını ortaya koyacak şekilde abartılı lipit peroksidasyonu oluştuğunu, reaktif oksijen türlerinin üretiminin yanı sıra TNF- α ve IL-8 seviyelerinin arttığını, antioksidan GSH'nın tükendiğini, apoptoz belirteci kaspaz-3 aktivitesinin ve DNA hasarının artışı ile birlikte mikroskobik olarak da hasar geliştiğini göstermiştir. Her ne kadar melatonin veya antibiyotik ön-tedavileri tek başlarına verildiklerinde oluşan oksidan hasarı ve inflamasyonu baskılamışlarsa da, kombine ön-tedavi uygulaması bunlara ek olarak antioksidan GSH seviyesini ve anti-inflamatuvar IL-10 miktarını artırmış, kaspaz-3 aktivitesini baskılamış ve dokuya nötrofil göçünü kontrol düzeyine inecek şekilde azaltmıştır. Ayrıca, melatonin-antibiyotik kombinasyonu *Actinobacteria* ve *Protoeobacteria* türlerinde artışa yol açmıştır.

Ülser tedavisinde mevcut tedavi stratejileri dahilinde yaygın olarak 'üçlü terapi' verilmekte ve proton pompa inhibitörü (PPI) ile birlikte *Helicobacter pylori*'nin ortadan kaldırılması amacıyla iki antibiyotik bu tedavide yer almaktadır³⁷. Antibiyotik tedavisi ile ülserde %80-85 oranında iyileşme sağlandığı halde, bağırsak mikrobiyotasının etkilendiği ve antibiyotiğe direnç olduğu görülmüştür^{22,38}. Bu yüzden antibiyotik rejimine pre/probiyotik eklenerek yeni tedavi önerileri ortaya atılmıştır, ancak ideal tedavi rejimi henüz tanımlanmamıştır³⁸⁻⁴⁰. Ayrıca, *H. pylori*'nin ortadan kaldırılması, kronik peptik ülserin tek tedavi aracı değildir ve enfeksiyonunun baskılanmasının yanı sıra enterik enfeksiyonlara yol açan diğer patojenlerin dağılımının değişmesi⁴¹⁻⁴³, inflamasyon, hücre proliferasyonu, re-epitelizasyon, anjiyogenez ve dokuların yeniden modellenmesi de tedavi açısından önemlidir⁴⁴. Bu nedenle, peptik ülserin tedavisinde gastroduodenal sistemdeki oksidatif stresin azaltılmasını ve gastrik mukozal bariyerin güçlendirilmesini sağlayacak ek tedavi yaklaşımlarına da gereksinim vardır. Biz de çalışmamızda, antibiyotik tedavisine disbiyozisi kısmen düzeltici etkisi gösterilmiş ve antioksidan/anti-inflamatuvar özellikleri bilinen melatonin²⁸ ekleyerek, kombine tedavinin ülser patogenezindeki etkilerini araştırdık.

Mide mukozasında hasar gelişmesinde ve hasarın alevlenmesinde, süperoksit anyonları ve hidroksil radikalleri başta olmak üzere serbest oksijen radikallerinin ve lipit peroksidasyonunun artışının

önemli rol oynadığı bilinmektedir^{45,46}. Çeşitli antioksidanların radikal süpürücü etkileri ile mide mukozasını oksidatif hasardan koruyarak veya mide ülserlerinin iyileşmesini hızlandırarak faydalı oldukları bulunmuştur⁴⁷⁻⁴⁹. Sirkadiyen ritmin düzenlenmesinde önemli rol oynayan endojen bir antioksidan olan ve serbest radikal süpürücü, sitoprotektif, anti-inflamatuvar özellikleri iyi bilinen melatonin, özofajit, gastrit, peptik ülser, pankreatit ve kolit gibi çeşitli gastrointestinal lezyonların iyileşmesini de hızlandırmaktadır⁵⁰. Melatonin tedavisinin asetik asitle indüklenen mide ülseri modelinde ülser iyileşmesini hızlandırdığı ve bu etkiye mide kan akışındaki artış, plazma gastrin düzeylerindeki artış ve lümeninde artmış nitrik oksit (NO) serbestlenmesinin eşlik ettiği gösterilmiştir¹². Benzer şekilde, NSAİİ ile indüklenen mide hasarında melatonin ön tedavisinin mide hasarını ve lipit peroksidasyonunu azalttığı, glutasyon peroksidazı artırdığı, nötrofil infiltrasyonu belirteci olan MPO aktivitesini ise etkilemediği belirlenmiştir⁵¹. Bu bulgular, oluşan mide hasarında melatoninin antioksidan ve radikal süpürücü etkinliği ile koruma sağladığını göstermektedir. Çalışmamızda da benzer şekilde melatonin ön-tedavisi mide dokusunda ülserle artmış bulunan lipit peroksidasyonunu azalttı, antioksidan GSH seviyesini arttırdı ve ROT seviyelerini baskıladı. Bulgularımız, melatonin ön-tedavisinin antioksidan kapasiteyi artırarak ve serbest radikal oluşumunda azalmaya neden olarak kronik mide hasarını hafiflettiğini göstermektedir. Ayrıca, melatoninin antibiyotik ile kombine edilmesinin GSH düzeyini daha da artırdığı ve tek başına melatonin ile sınırlanmayan nötrofil infiltrasyonunu tek başına antibiyotiğe kıyasla çok daha etkin bir şekilde baskılayarak anti-inflamatuvar etkili olduğu görülmüştür.

Mide ülseri, azalmış kan akışı, artmış nötrofil infiltrasyonu ve nekrozun yanı sıra oksidatif stres ve inflamasyon varlığı ile tanımlanan bir lezyondur⁵². 8-OHdG, nükleer veya mitokondriyal DNA'da ROT'ların neden olduğu oksidatif hasarın göstergesidir ve bu nedenle oksidatif stresin biyo-belirteci olarak kullanılır⁵³. *H. pylori* pozitif olan peptik ülser hastalarında serum 8-OHdG seviyesinin yüksek olduğu, yüksek ekspresyonunun, artmış mide inflamasyonu ile önemli derecede korelasyon gösterdiği ortaya konmuştur^{54,55}. Literatürle uyumlu olarak, çalışmamızda asetik asit ile oluşturulan ülser grubunda da 8-OHdG seviyesi yüksek bulundu ve bu artış antioksidan olan melatoninin tek başına veya

antibiyotikle birlikte verilmesi ile baskılandı. Ek olarak, ülser oluşumuyla artan pro-inflamatuvar sitokinler TNF- α ve IL-8'in seviyeleri melatonin uygulaması ile baskılandı, melatoninle beraber antibiyotik verildiğinde ise anti-inflamatuvar IL-10 seviyelerinin arttığı gözlemlendi. Benzer şekilde, asetik asit ile oluşturulmuş deneysel ülser modelinde melatonin uygulaması ülser iyileşmesini hızlandırmış, TNF- α ve IL-1 β seviyelerini baskılayarak anti-inflamatuvar etki göstermiştir⁵⁶. Bu sonuçlar, melatoninin daha önce gösterildiği gibi mide ülserinde oluşan oksidatif stresi azaltarak iyileştirici etki gösterdiğini, ancak antibiyotikle birlikte verildiğinde melatoninin anti-inflamatuvar etkisinin daha da güçlendiğini desteklemektedir. Ayrıca, melatonin veya antibiyotik tek başına verildiğinde kaspaz-3 düzeyleri yüksek kalmaya devam ettiği halde, kombine tedavinin kaspaz-3 düzeyini baskılaması bu kombinasyonla tedavinin daha başarılı olabileceğini düşündürmektedir.

İnsan çalışmaları ve deneysel ülser modellerinde mideye ait mikrobiyota ve daha çok da ülser neden olan *H. Pylori* araştırılmıştır. Kronik gastrit alevlenmesi olan hastalarda mideden alınan biyopsiler erozyonlu mide mukozasında disbiyozis geliştiğini göstermiş ve bu durumun inflamatuvar ve nekrotik süreçlerin devam etmesine yol açarak ülserin iyileşmesini engelleyebileceği öne sürülmüştür⁵⁷. Diğer taraftan, ülserli hastalarda tedavi amaçlı sıklıkla kullanılan antibiyotiklerin mide lümenindeki ekolojik ortamı ve mikrobiyotayı önemli ölçüde değiştirdiği bildirilmiştir⁵⁸.

Antibiyotik maruziyetinin sonucu olarak farelerde mide epitelinde *Lactobacilli*⁵⁹ ve *Candida albicans* popülasyonlarında aşırı artış ve gastrit geliştiği görülmüştür⁶⁰. Nispeten az sayıda bakterinin bulunduğu mide ve ince bağırsağa kıyasla en yüksek bakteri yoğunluğunun bulunduğu kolonda⁶¹ mide ülseri gelişiminin kolon bakteri popülasyonundaki etkisi pek araştırılmamıştır. Anti-*H. pylori* üçlü tedavisinin duodenum ülserli hastaların bağırsak mikrobiyotasının çeşitliliğini bozduğu ve probiyotik kullanımının mikrobiyotayı yeniden eski haline getirdiği gösterilmiştir⁶². Farelerde alkol ile indüklenen akut ülser modelinde *Proteobacteria* ve *Actinobacteria* popülasyonlarında bir artış ve *Bacteroidetes*'te azalma şeklinde disbiyozis görülmüştür⁶³. Çalışmamızda asetik asitle oluşturulup 3 günde kronikleşen ülser modelinde ise, *Actinobacteria* oranının azalmasıyla beraber *Bacteroidetes*'te bir artış eğilimi gözlemlenmiştir.

Actinobacteria filumunun gastrointestinal permeabilite, immün sistem, metabolizma ve beyin-bağırsak ekseninin düzenlenmesinde önemli rol oynadığı belirtilmektedir⁶⁴. Bu nedenle de, *Actinobacteria*'nın ve özellikle de *Bifidobacteria* ailesinin probiyotik olarak kullanımı ilgi çekmektedir. Buna karşın, çeşitli çalışmalar bağırsakta *Proteobacteria* popülasyonundaki artışın disbiyozise işaret ettiğini ve *Proteobacteria*'nın kontrolsüz bir şekilde genişlemesinin inflamasyonu ve ekzojen patojenlerin invazyonunu kolaylaştıracağını doğrulamaktadır⁶⁵. Ülser öncesinde tek başına üçlü antibiyotik verilmesiyle kolonda *Proteobacteria*'nın genişlediği, dolayısıyla disbiyozis geliştiği gözlemlenirken, antibiyotige melatonin eklenmesinin orantısız olarak *Proteobacteria*'da bir azalma ile birlikte *Actinobacteria* filumunda bir artışa yol açtığı gözlemlendi. Bu veriler, ülserde uygulanan antibiyotigin birçok inflamatuvar sürecin düzelmesini sağlarken, diğer taraftan disbiyozise yol açarak inflamasyonun uzamasını sağlayabileceğini düşündürmektedir. Nitekim, antibiyotik tedavisine karşın mide dokusunda apoptoz devam etmektedir. Ancak, antibiyotige melatonin eklendiğinde inflamasyonun daha iyi kontrol altına alınmasına ek olarak apoptoz hafifletmekte ve *Proteobacteria* oranı baskılanarak kısmen disbiyozis düzelmektedir. Bu sonucu destekleyecek şekilde, yararlı bakterilerin kombinasyonu ile oluşturulmuş bir probiyotigin huzursuz bağırsak sendromu olan hastalara verilmesinin semptomları hafiflettiği ve probiyotigin bu etkisini melatonin aracılığıyla yaptığı rapor edilmiştir⁶⁶.

Çalışmamızda antibiyotik, melatonin ve kombine tedaviler, ülser indüksiyonundan önce verilerek koruyucu etkileri araştırılmıştır. Ancak, ülser gelişimi sonrasındaki iyileştirici etkileri ve bakteri türlerindeki değişimler bu çalışmada araştırılmamıştır. Melatonin ön-tedavisinin olası koruyucu mekanizmaları arasında sayılabilecek mide kan akımı ve NO serbestlenmesi üzerine olan etkilerinin araştırılmaması da bu çalışmanın kısıtlılıkları arasında sayılabilir.

Sonuç olarak, etkin bir antioksidan ve radikal süpürücü olan ve midedeki koruyucu etkileri daha önce gösterilen melatoninin, antibiyotik ile birlikte verilmesi durumunda etkinliğinin arttığı, melatonin ve antibiyotigin tek başlarına oksidan hasarı ve inflamasyonu azaltıcı etkilerinin daha güçlü hale geldiği ve melatonin-antibiyotik kombinasyonunun kolonda ülserle ilgili olarak dağılımı bozulan bakteriyel çeşitliliği düzelttiği ortaya konmuştur. Bu çalışma ile ülser tedavisinde antibiyotikle birlikte

melatonin verilmesinin ülserle karşı daha etkin bir koruma sağlayabileceği ve ileri klinik çalışmalarla bu etkinliğin araştırılması gerektiği öngörülmektedir.

Yazar Katkıları: Çalışma konsepti/Tasarımı: SAT, AY, BÇY; Veri toplama: DK, NÖM; Veri analizi ve yorumlama: SAT, ÖÇ, BA, MY, EKD, SŞ; Yazı taslağı: SAT, AY, ÖÇ, BA, MY, EKD, SŞ, BÇY; İçerinin eleştirilme: AY, BÇY; Son onay ve sorumluluk: SAT, AY, ÖÇ, BA, MY, EKD, SŞ, BÇY; Teknik ve malzeme desteği: AY, BÇY, SAT; Süpervizyon: BÇY; Fon sağlama (mevcut ise): yok.

Etik Onay: Bu çalışma için Marmara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulundan 09.10.2017 tarih ve 67.2017.mar portokol kodu ile onay alınmıştır.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması beyan etmemişlerdir.

Finansal Destek: Yazarlar finansal destek beyan etmemişlerdir.

Author Contributions: Concept/Design : SAT, AY, BÇY; Data acquisition: DK, NÖM; Data analysis and interpretation: SAT, ÖÇ, BA, MY, EKD, SŞ; Drafting manuscript: SAT, AY, ÖÇ, BA, MY, EKD, SŞ, BÇY; Critical revision of manuscript: AY, BÇY; Final approval and accountability: SAT, AY, ÖÇ, BA, MY, EKD, SŞ, BÇY; Technical or material support: AY, BÇY, SAT; Supervision: BÇY; Securing funding (if available): n/a.

Ethical Approval: Approval was obtained for this study from Marmara University Animal Experiments Local Ethics Committee with the protocol code 67.2017.mar dated 09.10.2017.

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Conflict of Interest: Authors declared no conflict of interest.

Financial Disclosure: Authors declared no financial support

KAYNAKLAR

- Najm WI. Peptic ulcer disease. *Prim Care*. 2011;38:383-94.
- Laine L, Takeuchi K, Tarnawski A. Gastric mucosal defense and cytoprotection: bench to bedside. *Gastroenterology*. 2008;135:41-60.
- Chan FK, Leung W. Peptic-ulcer disease. *Lancet*. 2002;360:933-41.
- da Silva LM, Pezzini BC, Somensi LB, Mariano LNB, Mariott M, Boeing T et al. Hesperidin, a citrus flavanone glycoside, accelerates the gastric healing process of acetic acid-induced ulcer in rats. *Chem Biol Interact*. 2019;308:45-50.
- Chung KT, Shelat VG. Perforated peptic ulcer-an update. *World J Gastrointest Surg*. 2017;9:1.
- Chen C-Q, Fichna J, Bashashati M, Li Y-Y, Storr M. Distribution, function and physiological role of melatonin in the lower gut. *World J Gastroenterol*. 2011;17:3888.
- Reiter RJ, Maestroni GJ. Melatonin in relation to the antioxidative defense and immune systems: possible implications for cell and organ transplantation. *J Mol Med*. 1999;77:36-9.
- Rodriguez C, Mayo JC, Sainz RM, Antolín I, Herrera F, Martín V et al. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *J Pineal Res*. 2004;36:1-9.
- Tan D-X. Melatonin: a potent, endogenous hydroxyl radical scavenger. *J Endocr*. 1993;1:57-60.
- Bandyopadhyay D, Ghosh G, Bandyopadhyay A, Reiter RJ. Melatonin protects against piroxicam-induced gastric ulceration. *J Pineal Res*. 2004;36:195-203.
- Celinski K, Konturek P, Konturek S, Slomka M, Cichoż-Lach H, Brzozowski T et al. Effects of melatonin and tryptophan on healing of gastric and duodenal ulcers with *Helicobacter pylori* infection in humans. *J Physiol Pharmacol*. 2011;62:521.
- Konturek S, Konturek P, Brzozowski T. Melatonin in gastroprotection against stress-induced acute gastric lesions and in healing of chronic gastric ulcers. *J Physiol Pharmacol*. 2006;57:51.
- Mohamadın AM, Ashour OM, El-Sherbeny NA, Alahdal AM, Morsy GM, Abdel-Naim AB. Melatonin protects against hydrogen peroxide-induced gastric injury in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2009;36:367-72.
- Xu H, Wang X, Feng W, Liu Q, Zhou S, Liu Q, et al. The gut microbiota and its interactions with cardiovascular disease. *Microb Biotechnol*. 2020;13:637-56.
- Huttenhower C, Gevers D, Knight R, Abubucker S, Badger JH, Chinwalla AT et al. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*. 2012;486:207.
- Walsh J, Griffin BT, Clarke G, Hyland NP. Drug-gut microbiota interactions: implications for neuropharmacology. *Br J Pharmacol*. 2018;175:4415-29.
- Cox AJ, West NP, Cripps AW. Obesity, inflammation, and the gut microbiota. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2015;3:207-15.
- Kamada N, Seo S-U, Chen GY, Núñez G. Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease. *Nat Rev Immunol*. 2013;13:321-35.
- Nicholson JK, Holmes E, Kinross J, Burcelin R, Gibson G, Jia W et al. Host-gut microbiota metabolic interactions. *Science*. 2012;336:1262-7.
- Chan FK, To K, Wu JC, Yung M, Leung W, Kwok T et al. Eradication of *Helicobacter pylori* and risk of peptic ulcers in patients starting long-term treatment with non-steroidal anti-inflammatory drugs: a randomised trial. *Lancet*. 2002;359:9-13.
- Jia W, Li H, Zhao L, Nicholson JK. Gut microbiota: a potential new territory for drug targeting. *Nat Rev Drug Discov*. 2008;7:123-9.
- Marshall B, Warren JR. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet*. 1984;323:1311-5.
- Walsh JH, Peterson WL. The treatment of *Helicobacter pylori* infection in the management of peptic ulcer disease. *N Engl J Med*. 1995;333:984-91.
- Guevara B, Cogdill AG. *Helicobacter pylori*: a review of current diagnostic and management strategies. *Dig Dis Sci*. 2020;1-15.
- Bühling A, Radun D, Müller W, Malferteiner P. Influence of anti-*Helicobacter* triple-therapy with metronidazole, omeprazole and clarithromycin on

- intestinal microflora. *Aliment Pharmacol Ther.* 2001;15:1445-52.
26. Lou J-g, Jie C, Huang X-l, Zhao Z-y. Changes in the intestinal microflora of children with *Helicobacter pylori* infection and after *Helicobacter pylori* eradication therapy. *Chin Med J (Engl).* 2007;120:929-31.
 27. Wu L, Wang Z, Sun G, Peng L, Lu Z, Yan B, et al. Effects of anti-*H. pylori* triple therapy and a probiotic complex on intestinal microbiota in duodenal ulcer. *Sci Rep.* 2019;9:1-11.
 28. Yildirim A, Tamer SA, Sahin D, Bagriacik F, Kahraman MM, Onur ND et al. The effects of antibiotics and melatonin on hepato-intestinal inflammation and gut microbial dysbiosis induced by a short-term high-fat diet consumption in rats. *Br J Nutr.* 2019;122:841-55.
 29. Gürler EB, Çilingir-Kaya ÖT, Peker Eyüboğlu I, Ercan F, Akkiprik M, Reiter RJ et al. Melatonin supports alendronate in preserving bone matrix and prevents gastric inflammation in ovariectomized rats. *Cell Biochem Funct.* 2019;37:102-12.
 30. Carvalho B, Guadagnini D, Tsukumo D, Schenka A, Latuf-Filho P, Vassallo J et al. Modulation of gut microbiota by antibiotics improves insulin signalling in high-fat fed mice. *Diabetologia.* 2012;55:2823-34.
 31. Okabe S, JLA R, Pfeiffer CJ. A method for experimental, pen-etrating gastric and duodenal ulcer in rats. *Am J Dig Dis.* 1971;16:277-84.
 32. Casini A, Ferrali M, Pompella A, Maellaro E, Comperti M. Lipid peroxidation and cellular damage in extrahepatic tissues of bromobenzene-intoxicated mice. *Am J Pathol.* 1986;123:520.
 33. Aykaç G, Uysal M, Yalçın AS, Koçak-Toker N, Sivas A, Öz H. The effect of chronic ethanol ingestion on hepatic lipid peroxide, glutathione, glutathione peroxidase and glutathione transferase in rats. *Toxicology.* 1985;36:71-6.
 34. Bradley P, Da P. Christensen RD, Rothstein G: Measurement of cutaneous inflammation: Estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J Invest Dermatol.* 1982;78:206-9.
 35. Haklar G, Ulukaya-Durakbaş Ç, Yüksel M, Dağ T, Yalçın A. Oxygen radicals and nitric oxide in rat mesenteric ischaemia-reperfusion: Modulation by L-arginine and NG-nitro-L-arginine methyl ester. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1998;25:908-12.
 36. Arabacı Tamer S, Üçem S, Büke B, Güner M, Karaküçük AG, Yiğit N et al. Regular moderate exercise alleviates gastric oxidative damage in rats via the contribution of oxytocin receptors. *J Physiol.* 2020;598:2355-70.
 37. Matsuzaki J, Suzuki H, Nishizawa T, Hirata K, Tsugawa H, Saito Y et al. Efficacy of sitafloxacin-based rescue therapy for *Helicobacter pylori* after failures of first- and second-line therapies. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56:1643-5.
 38. Boltin D. Probiotics in *Helicobacter pylori*-induced peptic ulcer disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2016;30:99-109.
 39. Oh B, Kim BS, Kim JW, Kim JS, Koh SJ, Kim BG et al. The effect of probiotics on gut microbiota during the *Helicobacter pylori* eradication: randomized controlled trial. *Helicobacter.* 2016;21:165-74.
 40. Sartor RB. Therapeutic manipulation of the enteric microflora in inflammatory bowel diseases: antibiotics, probiotics, and prebiotics. *Gastroenterology.* 2004;126:1620-33.
 41. Makobongo MO, Einck L, Peek Jr RM, Merrell DS. In vitro characterization of the anti-bacterial activity of SQ109 against *Helicobacter pylori*. *PloS one.* 2013;8:e68917.
 42. Memariani Z, Sharifzadeh M, Bozorgi M, Hajimahmoodi M, Farzaei MH, Gholami M et al. Protective effect of essential oil of *Pistacia atlantica* Desf. on peptic ulcer: role of α -pinene. *J Tradit Chin Med.* 2017;37:57-63.
 43. Park H, Cho D, Huang E, Seo JY, Kim WG, Todorov SD et al. Amelioration of Alcohol Induced Gastric Ulcers Through the Administration of *Lactobacillus plantarum* AP Sulloc 331261 Isolated from Green Tea. *Front Microbiol.* 2020;11:420.
 44. Tarnawski AS. Cellular and molecular mechanisms of gastrointestinal ulcer healing. *Dig Dis Sci.* 2005;50:24-33.
 45. Naito Y, Yoshikawa T, Matsuyama K, Nishimura S, Yagi M, Kondo M. Effects of free radical scavengers on indomethacin-induced aggravation of gastric ulcer in rats. *Dig Dis Sci.* 1995;40:2019-21.
 46. Takeuchi K, Ueshima K, Hironaka Y, Fujioka Y, Matsumoto J, Okabe S. Oxygen free radicals and lipid peroxidation in the pathogenesis of gastric mucosal lesions induced by indomethacin in rats. *Digestion.* 1991;49:175-84.
 47. Almasaudi SB, Abbas AT, Al-Hindi RR, El-Shitany NA, Abdel-Dayem UA, Ali SS et al. Manuka honey exerts antioxidant and anti-inflammatory activities that promote healing of acetic acid-induced gastric ulcer in rats. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2017;2017:5413917.
 48. da Silva LM, Allemann A, Mendes DAG, dos Santos AC, André E, de Souza LM et al. Ethanolic extract of roots from *Arctium lappa* L. accelerates the healing of acetic acid-induced gastric ulcer in rats: Involvement of the antioxidant system. *Food Chem Toxicol.* 2013;51:179-87.
 49. Karakoyun B, Yüksel M, Ercan F, Erzik C, Yeğen BÇ. Alpha-lipoic acid improves acetic acid-induced gastric ulcer healing in rats. *Inflammation.* 2009;32:37-46.
 50. Konturek S, Konturek P, Brzozowska I, Pawlik M, Sliwowski Z, Cześnikiewicz-Guzik M et al. Localization and biological activities of melatonin. *J Physiol Pharmacol.* 2007;58:381-405.
 51. De La Lastra CA, Motllva V, Martín MJ, Nieto A, Barranco MD, Cabeza J et al. Protective effect of melatonin on indomethacin-induced gastric injury in

- rats. *J Pineal Res.* 1999;26:101-7.
52. Arunachalam K, Balogun SO, Pavan E, de Almeida GVB, de Oliveira RG, Wagner T et al. Chemical characterization, toxicology and mechanism of gastric antiulcer action of essential oil from *Gallesia integrifolia* (Spreng.) Harms in the in vitro and in vivo experimental models. *Biomed Pharmacother.* 2017;94:292-306.
 53. Hintsala HR, Haapasaari KM, Soini Y, Karihtala P. An immunohistochemical study of NFE2L2, KEAP1 and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and the EMT markers SNAI2, ZEB1 and TWIST1 in metastatic melanoma. *Histol Histopathol.* 2017;32:129-36.
 54. Khodaii Z, Ghaderian SM, Akbarzadeh Najari R, Nejati H, Tabatabaei Panah AS. cagA and vacA status and influence of *Helicobacter pylori* infection on serum oxidative DNA damage in Iranian patients with peptic ulcer disease. *Ir J Med Sci.* 2011;180:155-61.
 55. Raza Y, Khan A, Farooqui A, Mubarak M, Facista A, Akhtar SS et al. Oxidative DNA damage as a potential early biomarker of *Helicobacter pylori* associated carcinogenesis. *Pathol Oncol Res.* 2014;20:839-46.
 56. Konturek PC, Konturek SJ, Burnat G, Brzozowski T, Brzozowska I, Reiter RJ. Dynamic physiological and molecular changes in gastric ulcer healing achieved by melatonin and its precursor L-tryptophan in rats. *J Pineal Res.* 2008;45:180-90.
 57. Chervinets VM, Mironov AY, Chervinets YV, Bazlov SN. The state and role of esophagus, stomach, intestinal microbiota in patients with ulcer disease, chronic gastritis, esophagitis. *Klin Lab Diagn.* 2020;65:42-9.
 58. Espinoza JL, Matsumoto A, Tanaka H, Matsumura I. Gastric microbiota: An emerging player in *Helicobacter pylori*-induced gastric malignancies. *Cancer Lett.* 2018;414:147-52.
 59. Nardone G, Compare D. The human gastric microbiota: Is it time to rethink the pathogenesis of stomach diseases? *United European Gastroenterol J.* 2015;3:255-60.
 60. Mason KL, Erb Downward JR, Falkowski NR, Young VB, Kao JY, Huffnagle GB. Interplay between the gastric bacterial microbiota and *Candida albicans* during postantibiotic recolonization and gastritis. *Infect Immun.* 2012;80:150-8.
 61. Shapira M. Gut Microbiotas and Host Evolution: scaling up symbiosis. *Trends Ecol Evol.* 2016;31:539-49.
 62. Wu L, Wang Z, Sun G, Peng L, Lu Z, Yan B et al. Effects of anti-*H. pylori* triple therapy and a probiotic complex on intestinal microbiota in duodenal ulcer. *Sci Rep.* 2019;9:12874.
 63. Park H, Cho D, Huang E, Seo JY, Kim WG, Todorov SD et al. Amelioration of Alcohol Induced Gastric Ulcers Through the Administration of *Lactobacillus plantarum* APSulloc 331261 Isolated from Green Tea. *Front Microbiol.* 2020;11:420.
 64. Binda C, Lopetuso LR, Rizzatti G, Gibiino G, Cennamo V, Gasbarrini A. Actinobacteria: A relevant minority for the maintenance of gut homeostasis. *Dig Liver Dis.* 2018;50:421-8.
 65. Shin NR, Whon TW, Bae JW. Proteobacteria: microbial signature of dysbiosis in gut microbiota. *Trends Biotechnol.* 2015;33:496-503.
 66. Wong RK, Yang C, Song GH, Wong J, Ho KY. Melatonin regulation as a possible mechanism for probiotic (VSL#3) in irritable bowel syndrome: a randomized double-blinded placebo study. *Dig Dis Sci.* 2015;60:186-94.