

**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KAFEİK ASİT FENETİL ESTERİN SIÇANLARDA HEPATİK
ENSEFALOPATİDE NÖROPROTEKTİF ETKİNLİĞİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Cebrail GÜRSUL
FİZYOLOJİ ANABİLİMDALI**

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Ersin FADİLLİOĞLU**

MALATYA-2006

**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KAFEİK ASİT FENETİL ESTERİN SIÇANLARDA
HEPATİK ENSEFALOPATİDE NÖROPROTEKTİF
ETKİNLİĞİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**CebraİL GÜRSUL
FİZYOLOJİ ANABİLİMDALI**

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Ersin FADİLLİOĞLU**

**Bu tez, İnönü Üniversitesi bilimsel araştırma proje birimi (BAP) tarafından
2005/75 proje numarası ile desteklenmiştir.**

MALATYA – 2006

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince bana her türlü olanağı sağlayan ve tüm birikimlerini bana yansıtan danışman hocam Doç. Dr. Ersin FADILLIOĞLU'na, değerli yardımlarından dolayı anabilimdalı başkanımız Prof. Dr. M. Hanifi EMRE'ye, anabilimdalımız öğretim üyeleri Doç. Dr. Yunus KARAKOÇ'a ve Yrd. Doç. Dr. Halil DÜZOVA'ya, yüksek lisans öğrencileri Zümrüt YILMAZ'a ve Evren KILINÇ'a, cerrahi işlemlerdeki yardımlarından dolayı Farmakoloji Anabilimdalından Uzm. Dr. Mustafa IRAZ'a, bana her zaman destek olan Cemal YERLİ'ye ve Eczacılık Fakültesinden Mehmet LEVENT'e, farmakoloji bilgileriyle beni aydınlatan ve yazım aşamasında büyük yardımları olan Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilimdalından Arş. Gör. Özgür GÖKTAŞ'a sonsuz teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	I
İÇİNDEKİLER	II
ŞEKİLLER DİZİNİ	IV
GRAFİKLER DİZİNİ	V
TABLolar DİZİNİ	VI
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	VII
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. HEPATİK ENSEFALOPATİ	3
2.2. HEPATİK ENSEFALOPATİNİN PATOGENEZİ	7
2.2.1. Hiperamonyemi	8
2.2.2. Karaciğer ve beyin arasındaki ilişki	9
2.2.3. Akut (fulminant) karaciğer yetmezliği	10
2.2.4. Akut karaciğer yetmezliğinin nedenleri	10
2.2.5. Beyinde amonyak ve glutamat etkileşimi	10
2.2.6. Amoyağın beyin glutamat sistemiyle etkileşimi	11
2.2.7. NMDA reseptörlerinin aktivasyonu	12
2.2.8. Amonyanın genler üzerindeki etkileri	14
2.2.9. Tioasetamid ve hepatik ensefalopati modeli	16
2.2.10. Benzodiazepin reseptörleri ve hepatik ensefalopati oluşumundaki rolleri	16
2.2.11. Glutamat transporterleri	17
2.2.12. Glutamat reseptörleri ve hepatik ensefalopatinin oluşumundaki rolleri	19
2.2.13. Glutamin sentezi ve astrositlerde şişme	19
2.2.14. Amonyanın beyin fonksiyonları üzerindeki etkileri	21
2.2.15. Amonyanın katabolizması	22
2.2.16. Nitrik oksit (NO) hepatik ensefalopatideki rolü	24
2.2.17. Akut amonyak toksisitesi ile beyinde oluşan reaktif oksijen türleri	24
2.3. KAFEİK ASİT FENETİL ESTER	26
3. MATERYAL METOD	27
3.1. DENEY GRUPLARI	27
3.2. DAVRANIŞ TESTLERİ	28
3.2.1. Geri çekilme refleksi	28
3.2.2. İşitsel ürkütme refleksi	28
3.2.3. Baş sallama refleksi	28
3.2.4. Korneal refleksi	28
3.2.5. Doğrulma refleksi	28
3.2.6. Denge testi	29
3.2.7. Yakalama refleksi	29
3.2.8. Yerleştirme refleksi	29

3.3. BİYOKİMYASAL PROSEDÜR	29
3.3.1. Dokuların hazırlanması	30
3.3.2. Katalaz (KAT) Enzim Aktivitesi	30
3.3.3. Süperoksit Dismutaz (SOD) Enzim Aktivitesi	30
3.3.4. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) Enziminin Aktivitesi	30
3.3.5. Tiyoarbitürik Asit Reaktif Maddeleri (TBARS) Miktarının Tayini	31
3.3.6. Protein Tayini	31
3.3.7. Kanda Amonyak Tayini	31
3.3.8. ALT ve AST enzim aktiviteleri tayini	31
3.3.9. İstatistiksel analiz	31
4. BULGULAR	32
5. TARTIŞMA	45
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	50
7. ÖZET	51
8. SUMMARY	52
9. KAYNAKÇA	53
10. ÖZGEÇMİŞ	58

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1. Normal bir insanda ve karaciğer yetmezliği durumunda vücuttaki amonyak metabolizması.....	5
Şekil 2. Hepatik ensefalopatinin patogeneziyle ilgili faktörlerin şematik gösterimi.....	8
Şekil 3. Glutamaterjik sinapsın basitleştirilmiş gösterimi.....	11
Şekil 4. Amonyak tarafından NMDA reseptörlerinin aktivasyonu.....	12
Şekil 5. NMDA reseptörü tarafından mediate edilen nitrik oksit (NO)-cGMP sinyal iletim yolağı.....	14
Şekil 6. Alzheimer tip II astrositleri.....	15
Şekil 7. GABA _A reseptör kompleksi ve onun modulatör bölgeleri.....	17
Şekil 8. Glutamaterjik sinaps ve astrositik glutamat transporterleri.....	18
Şekil 9. Üre döğüsü.....	23
Şekil 10. Glutamin sentezi.....	23
Şekil 11. Amonyak toksisitesi sonucu meydana gelen serbest radikal üretim mekanizmaları.....	25
Şekil 12. CAPE'nin kimyasal yapısı.....	26

GRAFİKLER DİZİNİ

	Sayfa No
Grafik 1: Kan amonyak düzeyleri.....	32
Grafik 2: Plazma ALT düzeyleri.....	34
Grafik 3: Plazma AST düzeyleri.....	34
Grafik 4: Korteks dokusu katalaz aktiviteleri.....	36
Grafik 5: Korteks dokusu SOD aktiviteleri.....	36
Grafik 6: Korteks dokusu GSH-Px aktiviteleri.....	37
Grafik 7: Korteks dokusu MDA düzeyleri.....	37
Grafik 8: Beyin sapı dokusu CAT aktiviteleri.....	38
Grafik 9: Beyin sapı dokusu SOD aktiviteleri.....	39
Grafik 10: Beyin sapı dokusu GSH-Px aktiviteleri.....	39
Grafik 11: Beyin sapı dokusu MDA düzeyleri.....	40
Grafik 12: Serebellum dokusu CAT aktiviteleri.....	40
Grafik 13: Serebellum dokusu SOD aktiviteleri.....	41
Grafik 14: Serebellum dokusu GSH-Px aktiviteleri.....	42
Grafik 15: Serebellum dokusu MDA düzeyleri.....	42

TABLÖLAR DİZİNİ

	Sayfa No
Tablo 1. Kan amonyak, plazma AST ve ALT düzeyleri.....	33
Tablo 2. Korteks dokusu antioksidan enzim ve MDA düzeyleri.....	35
Tablo 3. Beyin sapı dokusu antioksidan enzim ve MDA düzeyleri.....	38
Tablo 4. Serebellum dokusu antioksidan enzim ve MDA düzeyleri.....	41
Tablo 5. Yaşan durumu.....	43
Tablo 6. Refleks durumları.....	44

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ALT	: Alanin aminotransferaz
AST	: Aspartat aminotransferaz
CAPE	: Kafeik asit fenetil ester
CAT	: Katalaz
FHE	: Fulminant hepatik ensefalopati
GABA	: Gama amino bütirik asit
GSH-Px	: Glutasyon peroksidaz
LAC	: Laktuloz
HE	: Hepatik ensefalopati
MDA	: Malondialdehit
NMDA	: N-metil D-aspartat
NO	: Nitrik oksit
NOS	: Nitrik oksit sentetaz
SOD	: Süperoksit dismutaz
O₂⁻	: Süperoksit radikali
XO	: Ksantin oksidaz
H₂O₂	: Hidrojen peroksit

1. GİRİŞ

Merkezi sinir sistemi üzerindeki metabolik kaynaklı hasarlar nörolojik hastalıkların geniş bir bölümünden sorumludur. Bunların arasında hepatik ensefalopati; ciddi bir klinik sendromdur. Karaciğer hasarı sonucu artan amonyak düzeyi nörolojik fonksiyonları zayıflatarak koma ve ölüme neden olabilir (1). Beyinde amonyak konsantrasyonunun artması hem beyin metabolizmasında hem de nörotransmisyonunda değişiklikler meydana getirir (2).

Vücutta amonyak birikmesi sonucu oluşan hiperamonyum durumunun neden olduğu serebral hasarla ilgili moleküler mekanizmalar tam olarak anlaşılammıştır. Ancak, glutamat reseptörlerinin NMDA alt tipinin aşırı aktivasyonu ile meydana gelen oksidatif stresin, hiperamonyemik nörotoksiteden sorumlu mekanizmada önemli bir rol oynayabileceği rapor edilmiştir (3). Hiperamonyemik koşullarda artan NMDA reseptör aktivitesinin nöronal ölümün bir nedeni olduğu ileri sürülmüştür. NMDA reseptör aktivitesinin artması, hücre içine kalsiyum girişinin artmasıyla sonuçlanır. Hücre içi konsantrasyonu artan kalsiyum, ATP sentezinin ve dolayısıyla mitokondri membran potansiyelinin bozulmasına yol açar. Bu durum, serbest radikal üretiminin artmasına yol açan mitokondriyal elektron transport zincir değişimleriyle sonuçlanır (4).

Tioasetamid (TAA), seçici bir hepatotoksindir. Uygulandıktan sonra kısa bir zaman periyodu içerisinde karaciğer yetmezliği meydana getirdiği bilinmektedir. Tioasetamid karaciğerdeki karışık fonksiyonlu oksidaz sistem tarafından asetamid ve tioasetamid-S-oksit'e metabolize olur. Asetamid karaciğerde nekroz oluşturma özelliğine sahip değilken tioasetamid-S-oksit sitokrom P-450 monooksijenaz tarafından kısmen de olsa sülfen'e ve tioasetamid-S-dioksit'e metabolize edilir. Tioasetamid-S-dioksit son derece reaktif bir moleküldür. Onun karaciğerde doku makromoleküllerine bağlanması hepatik nekroza, hiperamonyemiye ve oksidatif strese neden olur (23).

Kafeik asit fenetilester (CAPE) propolis kaynaklı bir moleküldür. CAPE'nin bir çok doku üzerine olan oksidan hasarı önleyici etkisi gösterilmiştir.

Ayrıca, CAPE nöronal dokularda meydana gelen hasarlarda da başarılı etkiler göstermiştir. Pentilenetetrazol ile indüklenen epilepsi modelinde nöronal oksidan hasarı CAPE tedavisinin engellediği bildirilmiştir (5). Fadillioglu ve ark. doksorubisin ile indüklenen beyin hasarında CAPE'nin koruyucu etkisinin olduğunu tespit etmişlerdir (6).

Bizde çalışmamızda deneysel oluşturulan hepatik ensefalopati hayvan modelinde ortaya çıkan nöronal oksidan hasarın CAPE ile önlenip önlenemeyeceğini araştırdık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. HEPATİK ENSEFALOPATİ

Hepatik ensefalopati; siroz, viral hepatit, ilaç toksisitesi, hepatotoksinlere maruz kalma ve porto-sistemik şant oluşumu gibi nedenlerden kaynaklanan nöropsikiyatrik bir sendromdur. Üre döngüsü bozuklukları, reye sendromu, valproate toksisitesi ve idiyopatik hiperamonyemi gibi çeşitli hiperamonyemik koşullar kadar amonyak da hepatik ensefalopatide yaygın bir etiyolojik faktördür (7). Hepatik ensefalopati, sirkadiyan ritim değişikliklerinden entelektüel fonksiyon, bilinç ve nöromüsküler koordinasyondaki değişikliklere kadar olan nöropsikiyatrik bozuklukların geniş bir bölümüyle ilgilidir (31). Moleküler düzeyde hepatik ensefalopati; glutamaterjik fonksiyon kayıpları, hücrel kalsiyum homeostasisinin bozulması ve serbest radikallerin (özellikle süper oksit radikalının) oluşumuyla ilişkilidir (46). Amonyak toksisitesinin mekanizması tam olarak anlaşılammakla birlikte olası toksik etkilerinin şunlar olabileceği düşünülmektedir;

- 1-) Biyoenerjetiklerde değişiklikler
- 2-) Elektrofizyolojik etkiler
- 3-) Nörotransmitter fonksiyonlarında bozuklukluklar
- 4-) Enerji metabolizmasında görev yapan enzimlerin aktiviterinde değişiklikler
- 5-) Oksidatif stres (7)

Yüksek konsantrasyonlarda amonyak beyin kan akımının ve glukoz metabolizmasının bozulmasına yol açar. Yüklü partikül olan NH_4^+ (amonyum iyonu) kan beyin bariyerini geçemezken NH_3 kan beyin bariyerini geçebilir (43). Hiperamonyemi durumunda oluşan serbest radikal üretiminin mekanizması tam olarak anlaşılammıştır. Serbest radikal üretiminin NMDA reseptörlerinin aktivasyonu ile gerçekleştiği düşünülmektedir. Amonyanın neden olduğu mitokondriyal fonksiyon bozukluklarının reaktif oksijen türlerinin kaynağı olabileceğini gösteren kanıtlar vardır (8). Oksidatif stres, hepatik ensefalopatide ve

amonyak nörotoksitesinde öne çıkan bir kavramdır. Amonyanın merkezi sinir sistemi üzerindeki tahrip edici etkisinde nitrosative stres kadar oksidatif stresin de potansiyel katkısının olduğu son zamanlarda ileri sürülmektedir. Amonyanın patofizyolojik konsantrasyonlarına maruz kalan kültüre alınmış astrositlerde yapılan son çalışmalar serbest radikal oluşumunun arttığını göstermektedir ve akut amonyak toksisiteli hayvan modellerinde süper oksit üretiminin arttığı, çeşitli antioksidan enzimlerin aktivitelerinin azaldığı gösterilmiştir (9). Oksidatif stresin bir sonucu, mitokondri iç membranında kalsiyuma bağımlı bir işlemle gerçekleşen ve geçirgenliği değişmiş porların açılmasıyla karakterize olan mitokondrial permeabilite değişiklikleridir. Bu olay, mitokondri iç membranının 1500 daltondan küçük olan metabolitlere olan geçirgenliğinin artması ve mitokondri iç membran potansiyelinin bozulmasıyla sonuçlanır. Mitokondriyal iç membran potansiyelinin bozulması aşağıdaki durumların oluşmasına yol açar;

- 1-) Mitokondriyal kolloid matrikste osmotik şişme
- 2-) Metabolitlerin iç membran boyunca hareketi
- 3-) Oksidatif fosforilasyonun bozulması
- 4-) ATP sentezinin durması
- 5-) Reaktif oksijen türlerinin oluşması (9)

Amonyak, protein ve nitrojen bileşiklerinin katabolik bir ürünüdür ve memeliler ve insanlarda oluşturulur. Yüksek konsantrasyonlarda amonyak nörotoksiktir. Merkezi sinir sisteminin fonksiyonlarını etkileyerek koma ve ölüme yol açar. Amonyanın karaciğer tarafından yetersiz uzaklaştırılması ve portakaval şant'tan kaynaklanan hiperamonyemi, beyinde amonyak düzeyinin artmasına yol açar ve hepatic ensefalopatinin oluşmasından sorumludur. Amonyak toksisitesi mitokondriyal fonksiyonu zayıflatarak ATP sentezinin azalmasına ve aynı zamanda serbest radikal oluşumunun artmasına yol açar. Amonyanın ana toksik etkileri hücrel pH'yı değiştirmesi ve özellikle α -ketoglutarat gibi sitrik asit döngüsünün bazı ara ürünlerini tüketmesidir. Farelerde uzun süre devam eden hiperamonyeminin karaciğer ve beyinde, oksidatif stres durumunu yansıtan lipid peroksidasyonunu arttırdığı rapor edilmiştir (10). Artmış kan ve beyin amonyak

düzeyleyinin cerebral fonksiyonlardaki zayıflamayla ilişkili olduğu bilinmektedir. Amonyak toksisitesinin, konjenital üre döngüsü bozuklukları, reye sendromu, siroz ve fulminant hepatik yetmezlik gibi karaciğer rahatsızlıklarında serebral fonksiyon bozukluklarına yol açan başlıca faktör olduğuna inanılmaktadır. Astrositler tarafından glutamat alımı, klor transporteri, Na-K-ATPaz ve cerebral kolinesteraz gibi beyinde membranlarla ilişkili bazı fonksiyonların hiperamonyemik durum boyunca değiştii rapor edilmiştir (11). Hepatik ensefalopatininin oluşumundan sorumlu olduğu düşünölen toksinler şunlardır:

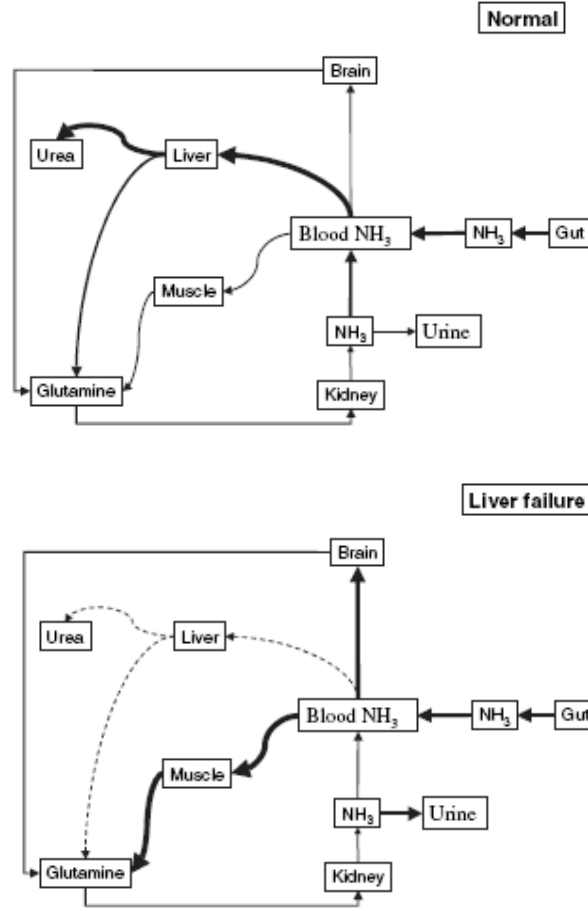
1-) Amonyak

2-) Sinerjistik toksinler: Merkaptanlar, fenoller, kısa zincirli yağ asitleri

3-) Nörotransmitterler: Aromatik amino asitlerin artışı ve dallanmış zincirli amino asitlerin azalışı arasındaki dengesizlik

4-) GABA/endojen benzodiazepinler

5-) Sitokinler: TNF- α , interlökin-1 β , interlökin-6 (12)



Şekil 1. Normal bir insanda ve karaciğer yetmezliği durumunda vücuttaki amonyak metabolizması (13) (Liver failure; karaciğer yetmezliği, Gut; Bağırsak, Blood; Kan, Brain; Beyin, Liver; Karaciğer, Muscle; Kas, Kidney; Böbrek, Urea; Üre, Urine; İdrar)

Sirozlu hastalarda, dallanmış zincirli amino asitler (valin, lösin, izolösin) kanda azalırken aromatik aminoasitler (fenilalanin, tirozin) artar. Dallanmış zincirli aminoasitlerdeki azalış onların kas dokusunda amonyağın uzaklaştırılması için kullanılmalarıyla açıklanabilir. Aromatik aminoasitlerdeki artış, karaciğerin onları yetersiz uzaklaştırması nedeniyle olabilir (43).

Hepatik ensefalopatinin nedenleri; amonyağı da içeren bağırsak kökenli toksinlerin porto-sistemik şant oluşumu ya da karaciğer fonksiyonunun zayıflaması nedeniyle dolaşımda artışı ve kandaki aminoasit dengesizliğidir. Bu toksinlerin beyin hücrelerine direk olarak zarar verdiği, nörotransmitterleri ve bu nörotransmitterlerin beyindeki reseptörlerini değiştirerek bilgi düzeyini bozduğu

rapor edilmiştir. Hepatik ensefalopati ile ilgili faktörler temel olarak bağırsaklarda oluşmaktadır ve büyük klinik öneme sahiptir. Proteinli besinler ve gastrointestinal kanamadan kaynaklanan nitrojenli bileşikler bu toksinlerden çoğunun öncüsüdür. Amonyak gibi toksik maddelerin uzun süreli birikimi onlara olan duyarlılığı artırır ve sirozda olduğu gibi kolaylıkla ensefalopatiye neden olur (43).

Hiperamonyum dışında bazı nörotransmitter sistemlerinin de hepatic ensefalopatinin gelişimiyle ilgili olduğu bulunmuştur. Bu nörotransmitter sistemleri arasında GABA-erjik, opioid ve serotonerjik sistemler bulunmaktadır. Hiperamonyumun GABA-erjik nörotransmisyonu etkilediği bulunmuştur. Akut karaciğer yetmezliği olan hayvanların beyinlerinde opioid peptidlerin düzeyinin arttığı bulunmuştur. Hepatik ensefalopati hayvanlara, benzodiazepin reseptör antagonisti olan flumazenilin uygulanması nörolojik fonksiyonlarda iyileşme ile sonuçlanmıştır. (33). Deney hayvanlarıyla yapılan çalışmalar, portacaval anastomosisli ratlarda dopaminerjik, serotonerjik ve histaminerjik sistemlerde önemli değişimler olduğunu ortaya çıkarmıştır. Özellikle de beyin biyojenik amin nörotransmitter sistemlerinde seçici değişimlerin hepatic ensefalopatinin patogenezinde önemli olduğu vurgulanmıştır. Hepatik ensefalopati hastalarda görülen uyku ve sirkadiyen ritim bozuklukları serotonerjik ve histaminerjik nörotransmisyonundaki bozukluklardan kaynaklanırken motor fonksiyonlardaki bozuklukların dopaminerjik sistemdeki kayıplardan kaynaklandığı ifade edilmektedir (45). Hepatik ensefalopatide, serebrospinal sıvıdaki yağ asidi kompozisyonundaki değişimlerle birlikte, serebral korteksten alınan beyin homojenatlarında lipid kompozisyonunun değiştiği ortaya çıkarılmıştır (34).

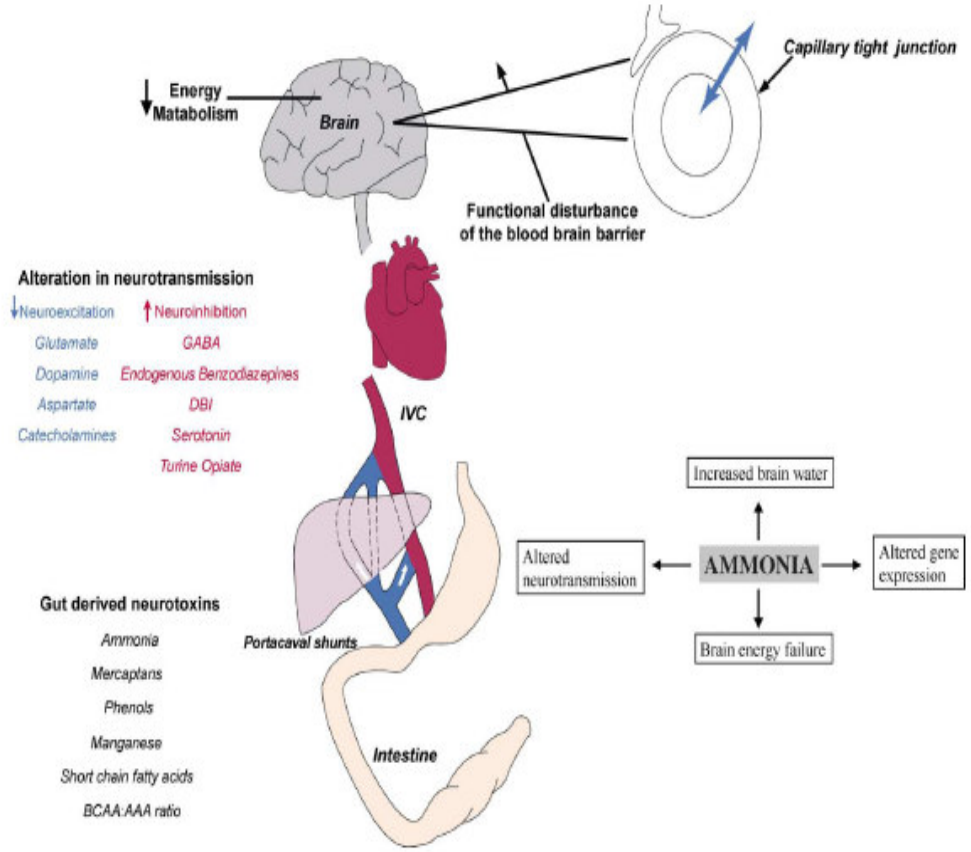
2.2. HEPATİK ENSEFALOPATİNİN PATOGENEZİ

Hepatic ensefalopatinin patogenezinin açıklanmaya yönelik çeşitli teoriler değişik zamanlarda kabul görmüşse de halen patogenezin açıklanmasında tatmin

edici bir noktaya ulaşılamamıştır. Günümüzde patogeneizde rolü olduğu düşünülen faktörler 4 ana grupta toplanabilir:

1. **Kan-Beyin bariyerindeki değişiklikler:** Hepatik ensefalopatili hastalarda kan beyin bariyerinde nötral aminoasitlerin artmış, bazik aminoasitlerin azalmış transportuna yol açan fonksiyonel bir yetersizlik vardır.
2. **Enerji metabolizmasındaki değişiklikler:** Hepatik ensefalopatili hastalarda beyin kan akımı azalmış, glukoz ve oksijen tüketimi düşmüştür. Pozitron emisyon tomografisinde beyin kan akımındaki değişiklikler ile nöropsikolojik fonksiyon bozukluğunun şiddeti arasında ilişki bulunduğu saptanmıştır. Ancak bu değişiklikler muhtemelen hepatic ensefalopatinin sebebi olmaktan çok genel merkezi sinir sistemi depresyonunun bir sonucudur.
3. **Barsak kaynaklı faktörler:** Tarih boyunca hepatic ensefalopati ile ilgili olarak üzerinde en çok durulmuş olan faktör amonyaktır. Plazma amonyak düzeyindeki akut artışın etkileri hem klinik olarak hem de deneysel olarak kronik artışın etkilerinden ayırte diledilir. Amonyagin şu şekilde etki ettiği düşünölmektedir:
 - Amonyak MSS depresyonu yapan klor kanallarını inhibe etmektedir.
 - Amonyak alfa-ketoglutarat ile birleşerek, beyinde sitrik asit döngüsünün substratlarını azaltarak enerji eldesini bozmaktadır.
 - Amonyak, glutamatla birleşerek glutamini meydana getirmekte ve malat-aspartat mekiğini bozup enerji metabolizmasını etkilediği gibi beyinde eksitatuvar nörotransmitter olarak görev yapan glutamatında azalmasına yol açmaktadır.
 - Beyinde, serotonin dahil pek çok nöroaktif mediatörün yapımında substrat olan triptofanın beyne geğişi amonyak tarafından kolaylaştırılmaktadır. Serotonin prokürsörü olan triptofanın kandan beyine transportu hiperamonyumlu beyinde artar.

4. **Beyindeki nörotransmisyonunda değişiklikler:** Beynin optimum çalışması ancak eksitator ve inhibitör nörotransmisyon arasında bir denge bulunduğunda mümkün olur (14).



Şekil 2. Hepatik ensefalopatinin patogeneziyle ilgili faktörlerin şematik gösterimi (48) (Alteration in neurotransmission; Nörotransmisyonundaki değişiklikler, GABA; Gama amino bütirik asit, Gut derived neurotoxins; Bağırsak kaynaklı nörotoksinler, BCAA; Dallonmuş zincirli amino asitler, AAA; Aromatik amino asitler, Intestine; Bağırsak, Ammonia; Amonyak, Altered neurotransmission; Nörotransmisyonunda değişme, Increased brain water; Beyin suyunun artması, Altered gene expression; Gen expresyonunun değişmesi, Brain energy failure; Beyin enerji yetmezliği, Functional disturbance of the blood brain barrier; Kan beyin bariyerinin fonksiyonel bozukluğu)

2.2.1. Hiperamonyemi

Hepatik ensefalopatide meydana gelen nörolojik değişimlere katkıda bulunan ana faktörlerden birinin hiperamonyemi olduğunu gösteren bir dizi kanıt vardır. Hiperamonyemi nörotransmisyonla ilgili anahtar proteinlerin fosforilasyonu üzerinde çeşitli etkilere sahiptir. Bu proteinler; mikrotübülle ilişkili protein (MAP-2), Na⁺/K⁺-ATPaz ve NMDA reseptörleridir. Bu proteinlerin fizyolojik fonksiyonları fosforilasyonla düzenlenir ve hiperamonyemide onların fosforilasyonunun değişmesi nörotransmisyon bozukluklarına katkıda bulunabilir (51).

Amonyak, proteinlerin ve diğer bileşiklerin normal yıkım ürünüdür fakat amonyak yüksek konsantrasyonlarda toksiktir ve merkezi sinir sisteminde fonksiyonel bozukluklara yol açar. Amonyanın toksik etkilerinden sakınmak için karaciğerde üreye dönüştürülerek detoksifiye edilir. Ancak karaciğer yetmezliğinde amonyak detoksifikasyonu muhtemelen gerçekleşmez. Kanda ve dokularda amonyak düzeyi artarak hiperamonyemiye yol açar. Hiperamonyeminin iki ana tipi vardır:

1. **Kronik hiperamonyemi:** Serebral fonksiyonlarda değişmelere yol açan karaciğer sirozunda ortaya çıkar. Farklı hiperamonyemik durumlardaki nörolojik değişimlerle, karaciğer hastalıkları ve hepatik ensefalopatideki nörolojik değişimlerin bazılarında sorumludur.
2. **Akut hiperamonyemi:** Hayvanların ve insanlarda hızlı ölüme yol açabilen yüksek konsantrasyondaki amonyak zehirlenmesi sonucu ortaya çıkar. Bu durum akut karaciğer yetmezliğinde görülür (47).

2.2.2. Karaciğer ve beyin arasındaki ilişki

Beynin normal olarak fonksiyon görmesi normal karaciğer fonksiyonunun bazı bölümlerine bağlıdır. Örneğin karaciğer, beynin kendi kendine üretemediği bazı besinleri sağlar. Karaciğer aynı zamanda beyin hücrelerine zarar veren nörotoksinleri kandan temizler. Beyin kan damarlarının bir özelliği, çoğu maddenin kandan beyin dokusuna geçişini önlemektir. Her ne kadar beyin çoğu nörotoksik maddeden kan-beyin bariyeri sayesinde korunsa da bazı nörotoksinler bu bariyeri geçebilirler. Bu maddeler (amonyak, manganez ve diğer kimyasallar), karaciğer tarafından kandan etkili bir biçimde uzaklaştırılmadıkları sürece beyne girebilirler (15).

2.2.3. Akut (fulminant) karaciğer yetmezliği

Karaciğer yetmezliği esnasında büyük miktarda amonyak sistemik dolaşıma girer ve sistemik dolaşımdaki amonyak merkezi sinir sistemine geçebilir. Merkezi sinir sistemi de aynı zamanda amonyak oluşturabilir. Lokal olarak oluşturulan bu amonyak eğer metabolize edilmezse ya da serebrospinal sıvıya verilmezse nöronal fonksiyonları zayıflatabilir. Merkezi sinir sistemi karbamoil-fosfat sentaz ve ornitin transkarbamilaz enzimlerinden yoksun olduğu için amonyağı üreye dönüştüremez. Merkezi sinir sisteminde amonyak, glutamin sentetaz enzimi vasıtasıyla glutamine metabolize edilir (32).

2.2.4. Akut karaciğer yetmezliğinin nedenleri

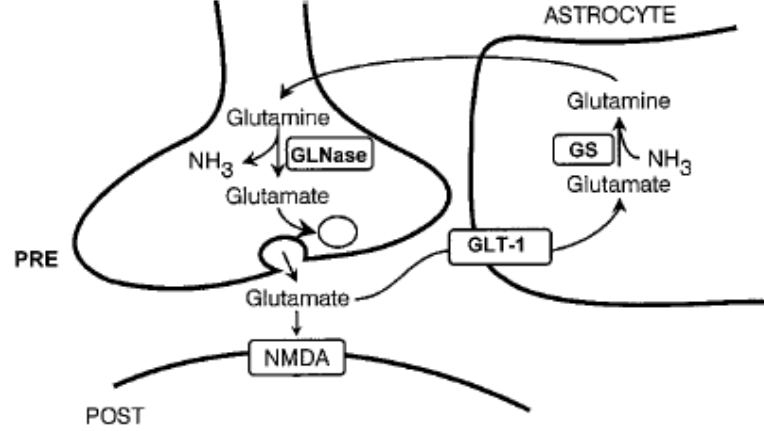
1. **İnfeksiyonlar:** Hepatit A,B,C,E, sitomegalovirüs, herpes simpleks virüsü, Epstein-Barr virüsü, varisella
2. **İlaçlar:** Parasetamol (asetoaminofen), isoniazid, monoamino oksidaz inhibitörleri (MAOIs), non-steroidal anti-inflamatuvar ilaçlar (NSAIDs), halothan, ecstasy, gold, fentoin)
3. **Metabolik:** Wilson hastalığı, Reye sendromu
4. **Kardiovasküler:** Budd-Chiari sendromu, iskemik hepatit

5. Miscellaneous: Hamileliğin akut yağlı karaciğeri, lenfoma, *Amanita phalloides*, tıbbi bitkiler (16)

2.2.5. Beyinde amonyak ve glutamat etkileşimi

Amonyak kan-beyin bariyerini NH_3 olarak difüzyonla geçer. Beyinde amonyak glutamin sentetaz enziminin katalizörlüğünde glutamine dönüştürülür. Bu enzim astrositlerde lokalize olmuştur. Diğer taraftan, glutaminin deaminasyonundan ve glutamat nörotransmitter havuzunun yenilenmesinden sorumlu enzim olan glutaminaz ise sinir terminalinde lokalize olmuştur. Presinaptik sinir terminalinden salınan glutamat perinöronal astrositler tarafından alınır ve buradaki glutamin sentetaz ile glutamine dönüştürülerek inaktif edilir. Oluşan glutaminin bir kısmı glutamat transmitterinin öncülü olarak sinir terminaline verilir. Glutamat-glutamin döngüsünün bir turu bir molekül NH_3 'ün astrositten nörona hareketi ile sonuçlanır (17).

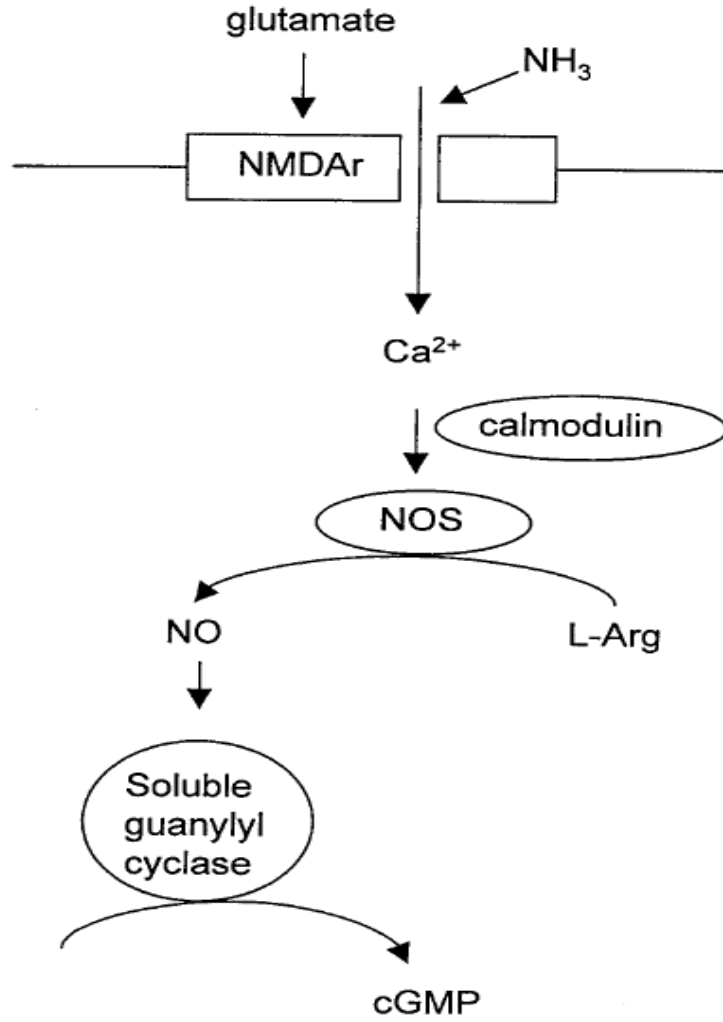
Amonyak glutamaterjik transmisyonu baskılayarak, glutamat salınımını ve alınımını inhibe ederek ve beyin enerji metabolizmasını değiştirmek suretiyle beyin fonksiyonları üzerinde komplek etkiler oluşturur. Glutamat alınımının inhibisyonunun glutamat transporterlerinin ekspresyonunun azalmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Amonyak aynı zamanda NMDA reseptörleri tarafından mediate edilen cevapları kolaylaştırmaktadır (32).



Şekil 3. Glutamaterjik sinapsın basitleştirilmiş gösterimi (17) (Astrocyte; Astrosit, PRE; Presinaptik nöron, POST; Postsinaptik nöron, GS; Glutamin sentataz, GLNase; Glutaminaz, NMDA; N-metil D- aspartat reseptörü, GLT-1; Glutamat transporteri-1)

2.2.6. Amonyak beyin glutamat sistemiyle etkileşimi

1. Amonyak glutamatla mediate edilen eksitatör nörotransmisyon üzerinde direk bir inhibitör postsinaptik etkiye sahiptir.
2. Amonyak yüksek affiniteli glutamat transporterlerini idrek bir etkiyle inhibe eder.
3. Amonyak NMDA reseptörlerinin aşırı biçimde aktive olmasına neden olur.
4. Akut hiperamonyemi, NMDA reseptörünün mediate ettiği nitrik oksit-cGMP sinyal iletim yolağını aktive eder.
5. Akut hiperamonyemi, NMDA reseptörleri tarafından mediate edilen bir etki ile serebral enerji metabolizmasını zayıfladır.
6. Akut hiperamonyemi, NMDA reseptörleri tarafından mediate edilen eksitotoksik nöronal hücre ölümüne neden olur (17).

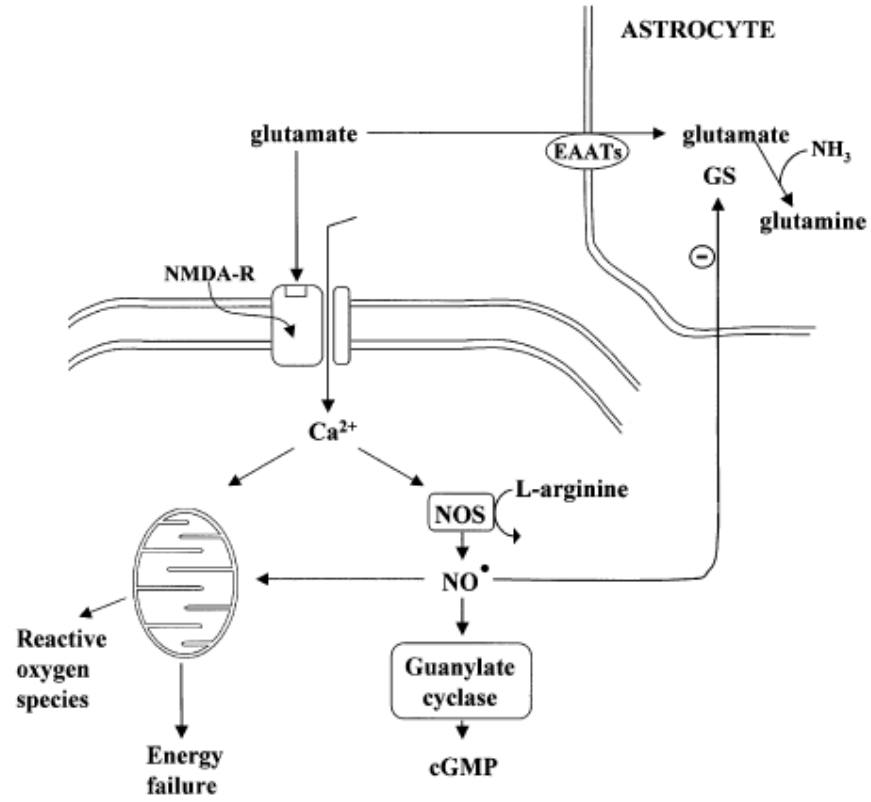


Şekil 4. Amonyak tarafından NMDA reseptörlerinin aktivasyonu (17) (NMDAr; N-metil D-aspartat reseptörü, NOS; Nitrik oksit sentetaz, L-Arg; L-Arjinin, NO; Nitrik oksit, Soluble guanylyl cyclase; Çözünür guanil siklaz, cGMP; Siklik guanozin mono fosfat)

2.2.7. NMDA reseptörlerinin aktivasyonu

NMDA reseptörlerinin amonyak tarafından aktivasyonu, bu reseptörlerdeki magnezyum blokajının uzaklaştırılması ve hücre içine kalsiyum girişi şeklinde gerçekleştirilir. NMDA reseptörlerinin aktivasyonu, nitrik oksit sentazın indüklenmesi ve nitrik oksit üretiminin artmasına yol açar. Artan kalsiyum ve nitrik oksit mitokondriyal fonksiyonun zayıflamasına yol açar. Bu da reaktif oksijen türlerinin artmasına ve enerji yetmezliğinin ortaya çıkmasına neden olur. Nitrik oksit sentazın indüksiyonu ile oluşan nitrik oksit guanil siklaz üzerinden cGMP'nin sentezini sitümüle eder. Nörolojik rahatsızlıkların

şiddetiyle oluşan cGMP miktarı arasında bir korelasyon olduğu araştırmacılar tarafından öne sürülmüştür. NO ayrıca, nörondan astrosite geçerek burada amonyağı uzaklaştırmaktan sorumlu olan glutamin sentetaz enzimini inhibe eder (18). Hiperamonyum durumunda bu reseptörlerin aktivasyonu, reaktif oksijen ve nitrojen türlerinin aşırı üretimine ve sonuç olarak oksidatif strese neden olur. Mitokondriler, kalsiyum bağımlı sinaptik plastisitede önemli bir rol oynar. Kalsiyum homeostasisinin bozulmasıyla ilişkili olan mitokondrial fonksiyon kayıpları, eksitotoksitenin ve nörodejenerasyonun başlıca nedenlerinden biri olarak kabul edilmektedir (25). Hiperamonyemi, protein kinaz-C (PKC) için substrat olan bazı nöronal proteinlerin fosforilasyonunu değiştirir. Bu proteinler arasında mikrotübüllerle ilişkili protein (MAP-2), Na-K-ATPaz ve nörofilament-M (NF-M) bulunmaktadır. PKC tarafından NMDA reseptörlerinin fosforilasyonunun 1 mM amonyağa maruz kalan nöronlarda değişebildiği gösterilmiştir. NMDA reseptör antagonisti olan MK801'in NMDA reseptörlerine bağlanması kronik hiperamonyemili sıçanların hipokampal sinaptik membranlarında ve 1 mM amonyağa maruz bırakılan kültürdeki serebellar nöronlarda azalmıştır. Bunun nedeni NMDA reseptörlerinin yüzeyel ekspresyonlarının azalması ve reseptörlerin fonksiyonlarının zayıflamasıdır. Bu çalışmalar göstermiştir ki hiperamonyemi NMDA reseptörlerinin yüzey ekspresyonunu ve fosforilasyonunu etkileyerek bu reseptörlerin fonksiyonlarını değiştirebilirler (29). NMDA reseptörleri bir kanal ve agonist ya da modülatörlerinin bağlanabileceği birkaç bölge bulunduran kompleks bir moleküldür. Reseptörün farklı bölgelerine etki eden farklı bileşiklerin koruyucu rolleri test edilmiştir. Amonyakla indüklenen hayvan ölümleri, kanal blokerleri olarak etki eden NMDA reseptör antagonistleri (MK-801, ketamin, PCB), reseptörün yarışmacı antagonistleri (AP-5, CPP, CGP 40116, CGS 19755) ve glisin bağlanma bölgesine etki ederek reseptör fonksiyonunu inhibe eden bileşiklerle (etanol, metanol, bütanol) neredeyse tamamen ortadan kaldırılmıştır. Reseptörün üç farklı bölgesine etki eden 10 farklı reseptör antagonisti amonyakla indüklenen hayvan ölümlerini ortadan kaldırmıştır. Bu bulgular amonyakla indüklenen hayvan ölümlerinin NMDA reseptörlerinin aşırı aktivasyonu ile gerçekleştiğini doğrulamaktadır (50).



Şekil 5. NMDA reseptörü tarafından mediate edilen nitrik oksit (NO)-cGMP sinyal iletim yolağı (18) (GS; Glutamin sentetaz, EAATs; Eksitator amino asit transporteri, NMDA-R; N-metil D-aspartat reseptörü, NOS; Nitrik oksit sentetaz, NO; Nitrik oksit, cGMP; Siklik guanil mono fosfat, Reactive oxygen species; Reaktif oksijen türleri, Energy failure; Enerji yetmezliği)

2.2.8. Amonyagın genler üzerindeki etkileri

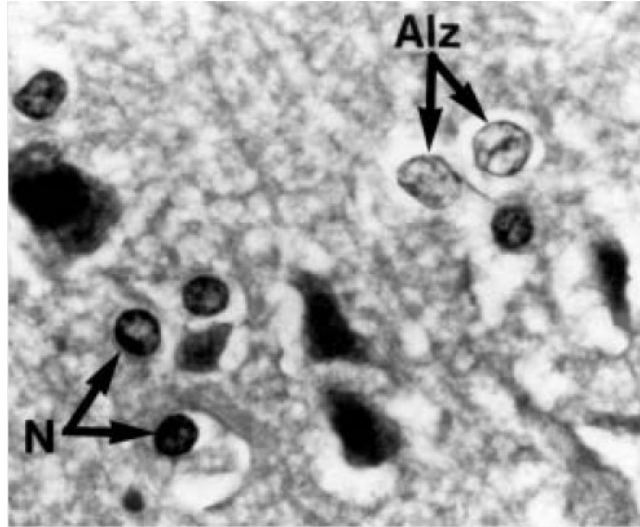
Moleküler biyolojideki araştırma teknikleri araştırmacılara, hepatic ensefalopatinin gelişiminde amonyağın spesifik etkilerine yeni bakış açıları getirmelerine izin vermiştir. Bu analizlerle amonyağın bazı genlerin ekspresyonunu değiştirdiği bulunmuştur. Moleküler yaklaşımlar araştırmacılara, hepatic ensefalopatide etkilenen genlerden bazılarını tespit etme olanağını kazandırmıştır. Bu genler hücrelerin enerji üretimi, yapısı ve diğer hücrelerle olan etkileşimleri için gerekli olan anahtar beyin proteinlerini kodlar. Bu proteinler şunlardır:

1-) **Monoamino oksidaz (MAO-A):** Monoaminler olarak adlandırılan nörotransmitterlerin metabolizmasından sorumlu bir enzimdir.

2-) **Mitokondrial (periferal tip) benzodiazepin reseptörü (PBR):** Hücrelerin enerji birimleri olarak hizmet gören mitokondrileri çevreleyen membranlarda lokalize olmuş bir reseptör proteindir. Bu reseptörler, mitokondrilerin kolesterolü kolay bir biçimde almalarına yardım eder. Kolesterol daha sonra nörosteroidlere dönüştürülür.

3-) **Nöronal nitrik oksit sentaz (nNOS):** Son derece reaktif bir molekül olan nitrik oksitin (NO) oluşumunu sağlayan nitrik oksit sentaz enziminin nöronlara özgü olan formudur.

4-) **Glial fibriller asidik protein (GFAP):** Astrositlerin yapısını sürdürebilmeleri için gerekli olan bir proteindir. Kronik karaciğer yetmezliği ya da amonyak maruziyeti GFAP'nin azalmasına yol açar, bu da hepatik ensefalopati için karakteristik olan Alzheimer tip II astrositlerin varlığıyla ilişkilidir (19).



Şekil 6. Alzheimer tip II astrositleri (N: Koyu çekirdekli normal astrositler, Alz: Açık ve genişlemiş nükleuslu Alzheimer tip II astrositleri (19))

Karaciğer tahribatıyla indüklenen akut karaciğer yetmezli olan ratlarda, santral sinir sisteminin bazı genlerinin ekspresyonunda değişimler olduğu farklı görüntüleme tekniklerinin kullanılmasıyla ortaya çıkarılmıştır. Yapılan çalışmalar ekspresyonu değişen genlerin santral sinir sisteminin normal fonksiyonu için primer önemi olan proteinlerle ilgili olduğunu göstermiştir. Bu proteinler;

glutamat transporteri EAAT-2, glisin transporteri GLYT-1, periferik tip benzodiazepin reseptörü (PTBR), su kanalı proteini Aquaporin IV ve glial fibriler asidik proteindir (GFAP). Şaşırtıcı olan, akut karaciğer yetmezliğinin bir sonucu olarak düzeylerinde değişme gözlenen proteinlerin çoğunun astrositlerde lokalize olmasıdır (30).

2.2.9. Tioasetamid ve hepatik ensefalopati modeli

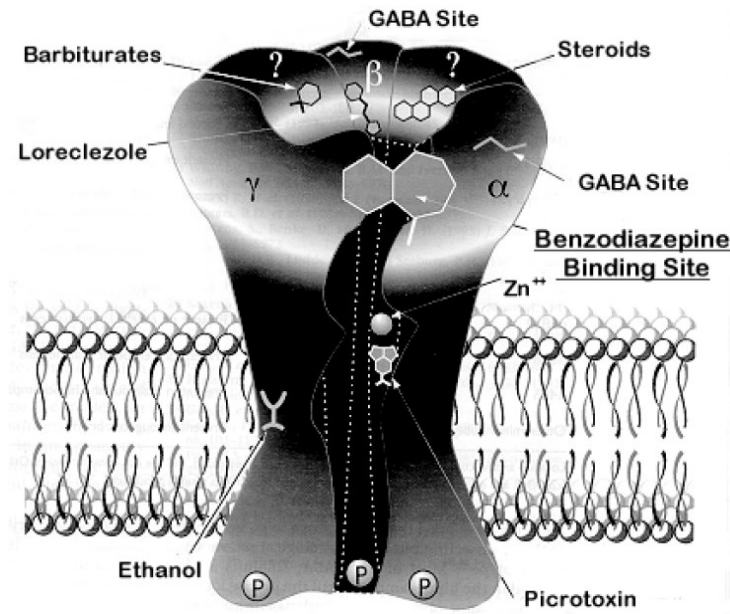
Tioasetamid (TAA) seçici bir hepatotoksindir ve karaciğer yetmezliğine neden olduğu bilinmektedir (23). Tioasetamid, karaciğer hasarı ve karsinogenik aktivitelere sahip olan ve thio-sülfür içeren bir bileşiktir. Uygulandıktan kısa süre sonra karaciğerdeki karmaşık fonksiyonlu oksidaz sistem tarafından asetamid ve tioasetamid-S-oksit'e metabolize olur. Asetamid karaciğerde nekroz oluşturmazken tioasetamid-S-oksit sitokrom P-450 monooksijenaz tarafından polar bir bileşik olan olan sülfen'e ve çok reaktif olan tioasetamid-S-dioksit'e metabolize edilir. Bu metabolitin doku makromoleküllerine bağlanması hepatik nekroz oluşumundan sorumludur (20). Bu reaktif metabolitin doku makromoleküllerine bağlanması ayrıca hiperamonyuma ve oksidatif strese neden olur(23).

2.2.10. Benzodiazepin reseptörleri ve hepatik ensefalopati oluşumundaki rolleri

Hepatik ensefalopatide GABA_Aerjik nörotransmisyonun artmasındaki diğer bir olası mekanizma benzodiazepin reseptörü (BZR) ve ligandlarındaki değişikliklerle ilgilidir.

Benzodiazepin reseptörü GABA_A reseptör kompleksinin bir bölümüdür ve aktive olduğunda GABA_Aerjik nörotransmisyonu artırır. Hepatik ensefalopatili hastalarda ve hayvan modellerinde benzodiazepin reseptörlerinin yoğunluğunun arttığı ve aynı zamanda bu reseptörlerin ligand düzeylerinde de değişiklikler

olduğu rapor edilmiştir. Bu bulgular, hepatic ensefalopatide GABA_Aerjik tonusun artmasının nedeninin benzodiazepin benzeri ligandlardaki artış olabileceği fikrini desteklemektedir (21). Bazı reseptörlerin ve iyon kanallarının modulatörleri olan nörosteroidler, hepatic ensefalopati gibi bazı nöropsikiyatrik hastalıkların patofizyolojisinde işe karışırlar. Bir nörosteroid olan allopregnananolone, GABA_A reseptörlerinin pozitif bir alosterik modulatördür ve GABA_A reseptör mediateli cevabın şiddetlenebildiği hepatic ensefalopatili hastaların beylerinde birikebilir (26).

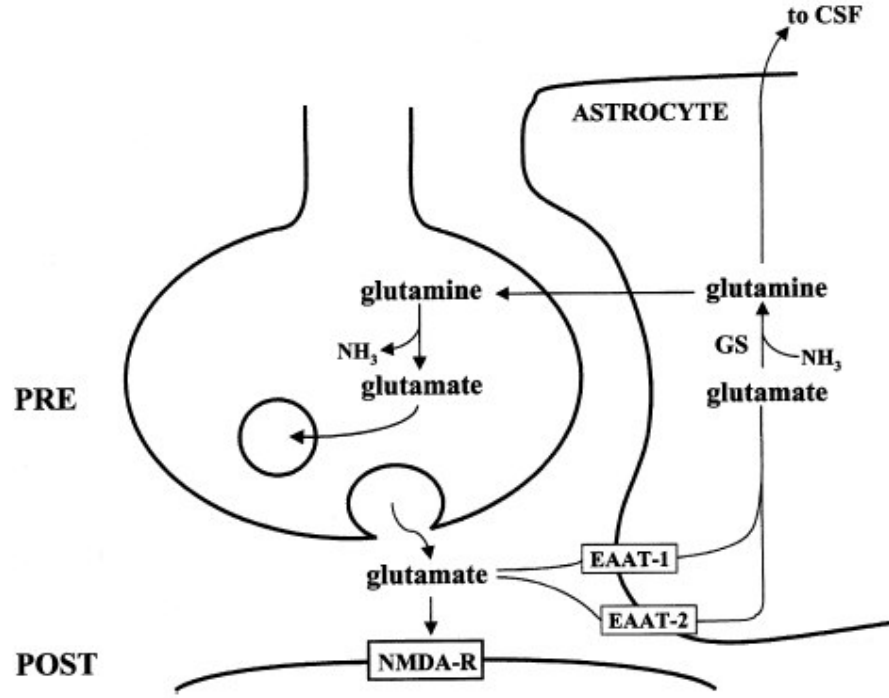


Şekil 7. GABA_A reseptör kompleksi ve onun modulatör bölgeleri (benzodiazepinler, etanol, barbituatlar ve diğer maddeler). Benzodiazepin reseptör kompleksi γ ve α alt ünitelerin birleşme bölgesindedir (21).

2.2.11. Glutamat transporterleri

Beyindeki ekstrasellüler glutamat düzeyinin artması karaciğer yetmezliği ile ilişkili hiperamonyemide gözlenmektedir. Karaciğer yetmezliğinde ve diğer hiperamonyemik patolojilerde meydana gelen amonyağın patofizyolojik birikimi, glutamaterjik sistemdeki fonksiyonel bozukluklarla ilişkilidir. Örneğin portakaval şant'lı ratların beyinlerindeki NMDA reseptör bölgelerinde bir azalma olduğu tespit edilmiştir. İskemik karaciğer yetmezliği oluşturulan ratlardaki hiperamonyum derecesi ve nörolojik bozuklukların derecesiyle ekstrasellüler

glutamat düzeyinin artışı arasında bir korelasyon olduğunu gösteren kanıtlar bulunmaktadır. Böyle bir artışın, nöronal hücreler tarafından glutamat salınımının artması ve nöronal hücreler tarafından glutamat alınımının yetersiz olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir (49). Nöronlar tarafından salınan glutamatın sinaptik aralıktan uzaklaştırılması yüksek affiniteli ve enerji bağımlı olan glutamat taşıyıcıları tarafından yürütülür. İn vitro ve in vivo çalışmalar, amonyak maruziyetinde bu reseptörlerin aktivitesinde ve ekspresyonunda değişmelerle sonuçlandığını göstermiştir. Astrositler nöronlardan salınan glutamatın sinapslardan uzaklaştırılmasında anahtar bir rol oynar ve bu hücreler ön beyinde yüksek affiniteli glutamat taşıyıcılarından EAAT-1 ve EAAT-2'yi bulundururlar. Nöronal olarak lokalize olan glutamat reseptörü EAAT-3, sinir terminallerinde lokalizasyon göstermez. Bu nedenle bu reseptörün sinaptik aralığa salınan glutamatın uzaklaştırılmasında büyük bir rol oynamadığı düşünülmektedir. EAAT-4 serebellar purkinje hücrelerinde bulunan bir nöronal taşıyıcıdır. EAAT-5 ise retinada bulunmaktadır. Serebral korteks, hipokampus ve orta beyin gibi beyin dokularının glutamatın sinapslardan etkili bir biçimde uzaklaştırmak işini genel olarak astrositik taşıyıcılar ile yaptıkları görülmektedir (18). Plazmada normal olarak en fazla bulunan amino asit olan glutamin bazı önemli metabolik rolere sahiptir. Bunlardan bazıları; intestinal, endotelial ve lenfosit hücreleri için bir enerji kaynağı olması, endotelial hücrelerdeki nitrik oksit sentazın bir regülatörü olması ve amonyağı periferel dokulardan üreye metabolize olacağı yer olan karaciğere taşıyan non-toksik bir taşıyıcı olmasıdır (22). Amonyaga maruz bırakılan kültüre alınmış astrositlerde glutamat alım kapasitesinin azaldığı, akut karaciğer yetmezliği olan ratların beyinlerinden izole edilen astrositlerde glutamat alınımının azaldığı ve tioasetamidle indüklenen karaciğer yetmezliği olan ratlardan alınan sinaptozomlarda glutamat taşıyıcısının azaldığı gösterilmiştir (49).



Şekil 8. Glutamaterjik sinaps ve astrositik glutamat transporterleri (18) (PRE; Presinaptik nöron, POST; Post sinaptik nöron, CSF; Ekstrasellüler sıvı, GS; Glutamin sentetaz, EAAT-1, EAAT-2; Eksitator amino asit transporterleri 1-2, NMDA-R; N-metil D-aspartat reseptörü)

Akut amonyak maruziyeti astrositlerin yapısında ve spesifik proteinlerinde değişmelere yol açar. Bu değişiklikler; glial fibriler asidik protein, eksitator amino asit transporteri (EAAT-2), periferal tip benzodiazepin reseptörü ve glutamin sentetaz enziminde görülür (24). Hiperamonyum altındaki astrositlerin hücre iskeletlerinde, morfolojilerinde, kalsiyum homeostasisinde, elektriksel özelliklerinde, serbest radikal detoksifikasyon sistemlerinde, protein tirozin nitrasyonunda ve mitokondrial permeabilitede değişiklikler meydana gelir (27). Protein tirozin nitrasyonu hepatik ensefalopatinin patogeneziyle ilgili olabilir. Kültüre alınmış astrositlerde amonyak, hipoosmotik şişme ya da benzodiazepinlerin oksidatif strese ve protein tirozin nitrasyonuna neden oldukları gözlenmiştir. Tirozinle nitratlanmış proteinler arasında glutamin sentetaz, periferal tip benzodiazepin reseptörü ve gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz tespit edilmiştir ve bu proteinler hepatik ensefalopatinin patogeneziyle ilgilidir. En önemlisi de astroglial protein tirozin nitrasyonudur ve akut amonyak ya da benzodiazepin toksisitesine maruz kalan ratların beyinlerinde gözlenmiştir (28).

2.2.12. Glutamat reseptörleri ve hepatic ensefalopatinin oluşumundaki rolleri

Glutamat, presinaptik terminallerden Ca-bağımlı bir mekanizma ile sinaptik veziküllerden salınır. Salınım için gerekli olan kalsiyum voltaj kapılı kalsiyum kanalları tarafından sağlanır. Vezikül içindeki glutamat konsantrasyonunun yaklaşık olarak 10 mmol/L olduğu düşünülmektedir. Tek bir veziküldeki glutamatın salınımı bile eksitator postsinaptik potansiyel oluşturabilir. Glutamat aynı zamanda glutamat transporterlerinin ters yönlü çalışması ile de salınabilir. Bu olay serebral iskemi esnasında membran boyunca Na⁺ ve K⁺ gradienti azaldığı zaman gerçekleşmektedir. Glutamatın sinaptik salınımı presinaptik reseptörlerin geniş bir sınıfı tarafından kontrol edilir. Bunlar; iyonotropik glutamat reseptörleri, AMPA reseptörleri, kainat reseptörleri, NMDA reseptörleri ve metabotropik glutamat reseptörleridir (35).

2.2.13. Glutamin sentezi ve astrositlerde şişme

Astrositler, merkezi sinir sisteminin ekstrasellüler kısmındaki su volümünün ve elektrolit konsantrasyonunun düzenlenmesinden sorumludur. Glutamin osmotik olarak aktif bir moleküldür ve amonyak detoksifikasyonu nedeniyle glutaminin astrositlerde birikmesi astrositlerin intrasellüler osmolaritesini artırır. Osmolariteyi dengelemek için ekstrasellüler alandan alınan su, astrositlerin şişmesine neden olur ve daha sonra sitotoksik beyin ödeminde yol açar. Hiperamonyum ve hepatic ensefalopatide oluşan beyin ödeminin nedeninin astrositlerdeki şişme olduğunu gösteren kanıtlar vardır. Glutamin birikimi beyin enerji metabolizmasını da etkileyebilir (36). Amonyagin serebral detoksifikasyonu, beyinde glutamin sentetaz enziminin bulunduğuş başlıca hücresel kısım olan astrositler tarafından gerçekleştirilir. Hiperamonyum durumu, hücre içi glutamin birikimiyle birlikte hücreye su girişine neden olduğu için astrositlerde şişmeye yol açar. Fulminant karaciğer yetmezliğinde meydana gelen astrosit şişmesi beyin ödeminin oluşumuna katkıda bulunur. Amonyagin neden olduğu beyin su miktarındaki artış, intrakraniyal basıncın ve serebral kan akışının

artmasına yol açar. Beyindeki su miktarının artışıyla serebral kan akışındaki artış arasında önemli bir korelasyon bulunmuştur. Kültüre alınmış astrositlerdeki osmotik şişme ani bir oksidatif stres cevabı ve farklı proteinlerin tirozin nitrasyonunun artmasıyla sonuçlandı (38). Hiperamonyumun neden olduğu astrositlerde glutamin birikimi osmotik strese ve astrositlerde şişmeye yol açar. Hepatik ensefalopatili hastalarda yapılan gözlemler, fosfoinositidlerin senteziyle ilişkili bir şeker olan miyo-inositolün, glutamin konsantrasyonundaki artışa karşılık azalma gösterdiğini ortaya çıkarmıştır. Bu da miyo-inositolün, astrositler içerisinde önemli bir osmotik düzenleyeci olabileceğini göstermektedir (41). Ratlarda karaciğer hasarı sonrası beyin amino asit içeriğinin belirlenmesiyle glutamin miktarının beş-altı kat arttığı ortaya çıkarılmıştır. Bu artış beyin dokusu içerisinde meydana gelir ve artışın nedeni plazmadan beyine geçişteki artış değildir. Beyin ödemi gelişimini etkileyebilen hücrel metabolizma bozuklukları şunlardır:

1. Astrositlerde oksidatif / nitrosatif stresin oluşması
2. Astrositler tarafından alınımının azalması nedeniyle glutamatin ekstrasellüler konsantrasyonundaki artış
3. Anerobik glikolizin bir sonucu olarak astrositlerdeki laktat düzeyinin artması (41).

Akut amonyak toksisitesinin moleküler mekanizmaları üzerinde yapılan çalışmalar, beyindeki glutamin sentaz aktivitesinin ve glutamin içeriğinin NMDA reseptörleri ve NO tarafından düzenlendiğini göstermiştir. Kosenko ve ark. yaptıkları çalışmada aşağıdaki bulguları elde etmişlerdir:

1. NMDA reseptörlerinin bloklanması amonyakla indüklenen beyin ATP tüketimini ve ratların ölümünü önler fakat beyin glutamin düzeyinde artış meydana gelmedi. Bu da amonyak toksisitesinin glutamin sentaz aktivitesindeki artış ya da glutamin oluşumuyla değil NMDA reseptörlerinin aşırı aktivasyonu ile gerçekleştiğini gösterir.

2. NMDA reseptörlerinin in-vivo olarak bloklanması beyindeki glutamin sentaz aktivitesini ve glutamin içeriğini arttırır. Bu da NMDA reseptörlerinin tonik aktivasyonunun glutamin sentazın tonik inhibisyonunu sağladığını gösterir.
3. NMDA reseptörlerinin in-vivo olarak bloklanması glutamin sentaz enziminin in-vitro ortamda çalışılan aktivitesini arttırır. Bu da, aktivite artışının enzimin kovalent modifikasyonu nedeniyle olduğunu gösterir. Nitrik oksit glutamin sentazı inhibe eder. Bu olay, glutamin sentazı inhibe eden kovalent modifikasyonun nitrosilasyonla ya da nitrasyonla gerçekleştiğini gösterir.
4. Nitrik oksit sentazın inhibe edilmesi glutamin sentaz aktivitesini arttırır. Bu da kovalent modifikasyonun geri dönüşlü olduğunu ve glutamin sentaz enziminin nitrosilasyonu ve nitrasyonu geriye döndürdüğünü gösterir.
5. NMDA tarafından gerçekleştirilen nitrik oksit sentazın aktivasyonu glutamin sentazın tonik inhibisyonunun yalnızca bir bölümünden sorumludur. Nitrik oksitin diğer kaynakları da aynı zamanda bu tonik inhibisyona katkıda bulunur.
6. Glutamin sentaz beyinde maksimum hızda çalışmaz. Bu enzimin aktivitesi NMDA reseptörlerinin ve NO miktarının değişmesiyle farmakolojik olarak arttırılabilir. Örneğin bu olay hiperamonyemik durumlarda beyindeki amonyak detoksifikasyonunu arttırmak için yararlı olabilir (47).

2.2.14. Amonyanın beyin fonksiyonları üzerindeki etkileri

1. **Elektrofizyolojik etkileri:** İnhibitör postsinaptik potansiyeli ve postsinaptik glutamerjik nörotransmisyonu etkiler.
2. **Beyin enerjisi metabolizması üzerindeki etkileri:** α -ketoglutarat dehidrogenaz enzimini inhibe eder.

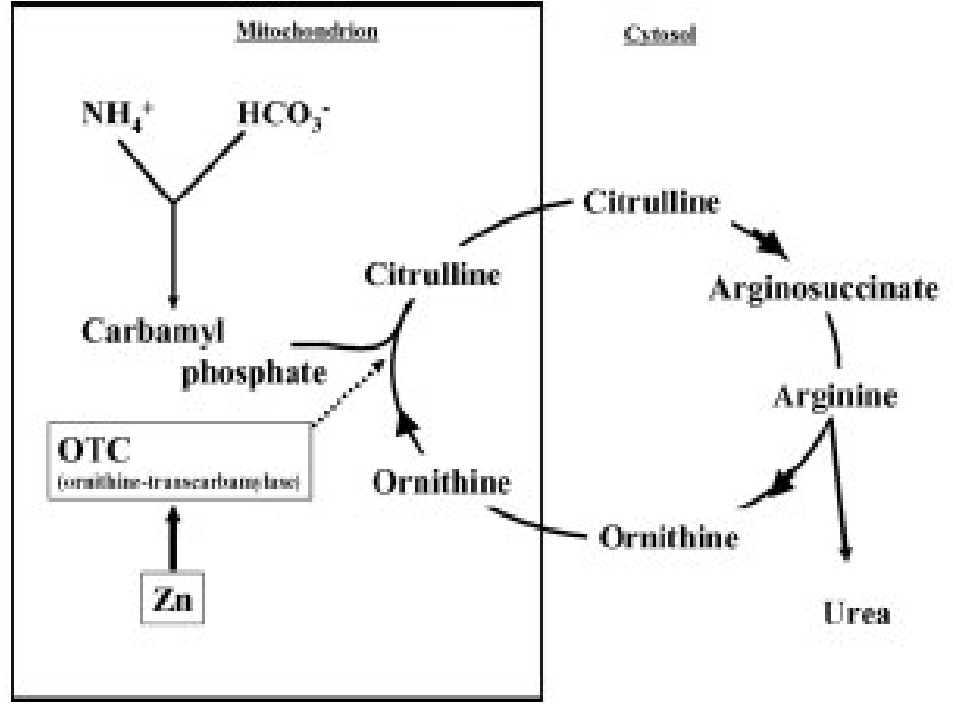
3. **Astrositik fonksiyon üzerindeki etkileri:** Glutamat transporterleri GLT-1'in ekspresyonunu azaltır. Periferal tip benzodiazepin reseptörlerinin ekspresyonunu artırır. Alzheimer Tip II astrositlerinin oluşumuna neden olur.
4. **Glutamat nörotransmitter sistemi üzerindeki etkileri:** Direk postsinaptik etkilere sahiptir. Glutamatın nöronlarla astrositler arasındaki hareketini zayıflatır. Glutamat alınımını inhibe eder. Glutamat reseptörlerinde değişikliklere neden olur.
5. **Glutamin oluşumu üzerindeki etkileri:** Sitotoksik beyin ödemeine neden olur. Aromatik amino asitlerin alınımını artırır.
6. **Diğer etkileri:** L-arjinin alınımını uyararak nöronal nitrik oksit sentetaz enziminin (nNOS) ekspresyonunu artırır (37).

2.2.15. Amonyakın katabolizması

Portal sistemde amonyak potansiyel olarak iki kaynak tarafından üretilir. Bunlar; nitrojenli bileşiklerin bağırsak kanalında bakteriler tarafından yıkılması ve enerji kaynağı olarak glutamini kullanan intestinal hücrelerdir (44).

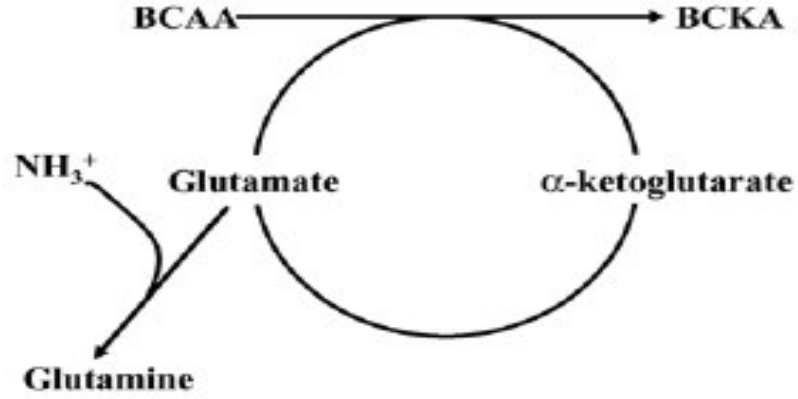
Karaciğerdeki üre döngüsü ve glutamin sentezi amonyağın kandan uzaklaştırılmasında önemli rol oynar.

1. Üre döngüsü: Üre döngüsünün ilk basamağı mitokondride gerçekleşir. Karbamil fosfat sentaz, ATP bağımlı bir işlemle amonyak ve HCO_3^- 'den karbamil fosfatı oluşturur. Karbamil fosfat daha sonra sitrullini oluşturmak için ornitin transkarbamilaz ile katalizlenen bir reaksiyonla ornitinle reaksiyona girer. Sitrullin mitokondriden sitozole geçer ve arjinosüksinatı oluşturmak için arjinosüksinat sentazın katalizörlüğünde aspartik asitle reaksiyona girer. Arjinosüksinat, arjinosüksinat liyaz tarafından arjinine ve fumarik asite yıkılır. Arjinin, arjinaz tarafından üre ve ornitine yıkılır. Ornitin daha sonra mitokondriye taşınır (43).



Şekil 9. Üre döğüsü (43) (Mitochondrion; Mitokondri, Cytosol; Sitozol, OTC; Ornitin-transkarbamilaz, Zn; Çinko, Urea; Üre)

2. Glutamin sentezi: Amonyacı detoksifiye edici mekanizmalarda kas dokusu önemli bir rol oynar. Kas dokusunda, dallanmış zincirli amino asitlerin (BCAA) deaminasyon işlemi α -ketoglutarik asitten glutamatın oluşması işlemiyle bağlantılıdır ve glutamatın glutamine dönüşümünde amonyak tüketilir. Bu yüzden amonyak dallanmış zincirli amino asitlerin varlığında detoksifiye edilir. Sağlıklı insanlarda arteriyel amonyağın yaklaşık %50'si iskelet kasları tarafından detoksifiye edilir (43).



Şekil 10. Glutamin sentezi (43) (BCAA; Dalların zincirli amino asitler, BCKA; Dalların zincirli keto asitler)

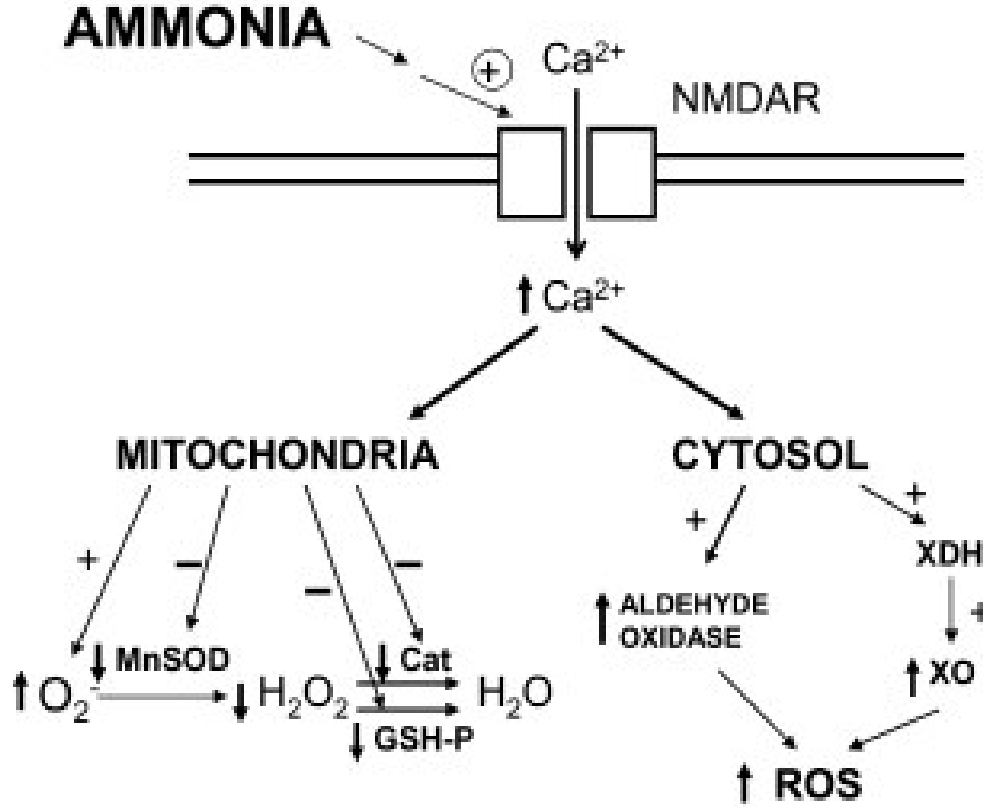
2.2.16. Nitrik oksit (NO) hepatik ensefalopatideki rolü

Nitrik oksit sentaz enziminin bloke edilmesi, amonyağın beyindeki antioksidan enzimler ve süper oksit oluşumu üzerindeki etkilerini önledi. Bu da, akut amonyak toksisitesinde NMDA reseptör aktivasyonunun ve NO üretiminin merkezi rolünü desteklemektedir (38). Merkezi sinir sisteminde NO'nin hepatik ensefalopatinin oluşumundaki fizyolojik ve patolojik süreçlerin bir bölümüyle ilgili olduğu bilinmektedir. Çoğu araştırmacı, amonyak ve glutamat konsantrasyonlarındaki artış gibi hepatik ensefalopatini oluşumundan sorumlu ana faktörlerle NO arasındaki ilişkiyi belirlemek için uğraşmaktadırlar. Ratlarda amonyak infüzyonunun serebral NO düzeyindeki artışla ilişkili olduğu ve nöronal nitrik oksit sentetaz (nNOS) inhibitörlerinin hayvanları amonyak toksisitesinden koruduğu bildirilmiştir. NMDA reseptörlerinin aktivasyonu ile nNOS'u aktive ettiği ve bunun da NO üretimini artırarak nöronal hücre ölümüne neden olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (39). NMDA reseptörlerinin aktivasyonu hücre içi serbest kalsiyumun artışına yol açar. Daha sonra kalsiyum kalmoduline bağlanarak nöronal nitrik oksit sentazi aktifleştirir ve NO üretiminin artmasına yol açar. Oluşan NO daha sonra, guanil siklazı aktifleştirerek cGMP oluşumunun artmasına yol açar. Bu yolağın, hepatik ensefalopatide meydana gelen nörolojik değişimlerin bazılarında sorumlu olabileceği düşünülmektedir (40). Bu yolla oluşan NO katalaz ve glutatyon peroksidaz enzim aktivitelerini direk olarak inhibe

etmektedir. NO aynı zamanda astrositlerdeki mitokondriyal solunum zincirini inhibe ederek serbest radikallerin artışına katkıda bulunur. NO ayrıca glutatyonun oksidasyonuna yol açarak glutatyonun tükenmesine yol açar. Beyinde amonyakla indüklenen oksidatif stresin, NMDA reseptörlerinin aşırı aktivasyonunun bir sonucu olarak nitrik oksit üretiminin artışıyla gerçekleştiğine inanılmaktadır. Kosenko ve ark. yaptıkları çalışmada, nitrik oksit sentazın bir inhibitörü olan nitroarjinin'in amonyağın neden olduğu süperoksit radikali ve antioksidan enzimlerdeki değişimleri engelleğini tespit etmişlerdir (52).

2.2.17. Akut amonyak toksisitesi ile beyinde oluşan reaktif oksijen türleri

Akut amonyak toksisitesi sonucu beyinde oksijen radikalleri farklı kaynaklar tarafından üretilmektedir. Akut amonyak toksisitesi, beyinde süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz enzim aktivitelerinin azalmasına ve süperoksit radikalının ($O_2^{\cdot-}$) artmasına yol açar. Akut amonyak toksisitesi aynı zamanda ksantin oksidaz enzim aktivitesinin artmasına, ksantin dehidrogenaz enzim aktivitesinin azalmasına ve monoamino oksidaz A (MAO-A) enzim aktivitesinin artmasına yol açar. Amonyak toksisitesi süper oksit radikalının ($O_2^{\cdot-}$) üretimini arttırmasına rağmen hidrojen peroksit (H_2O_2) oluşumunu arttırmadı. Mitokondriyal matriksteki H_2O_2 'nin ana kaynağı Mn-SOD'dur. Amonyak toksisitesinin süperoksit radikalının artmasına ve H_2O_2 'nin azalmasına yol açtığı görüldü. Süper oksit radikalının artması; solunum zincirindeki üretiminin artması, ksantin ve aldehit oksidazlar tarafından üretilmesi ve antioksidan enzimler tarafından süpürümünün azalması nedeniyledir. Bir NMDA reseptör antagonisti olan MK-801'in amonyağın neden olduğu serbest radikal üretimini önlemesi serbest radikal üretiminin NMDA reseptörlerinin aşırı aktivasyonu ile gerçekleştiği fikrini desteklemektedir (53).

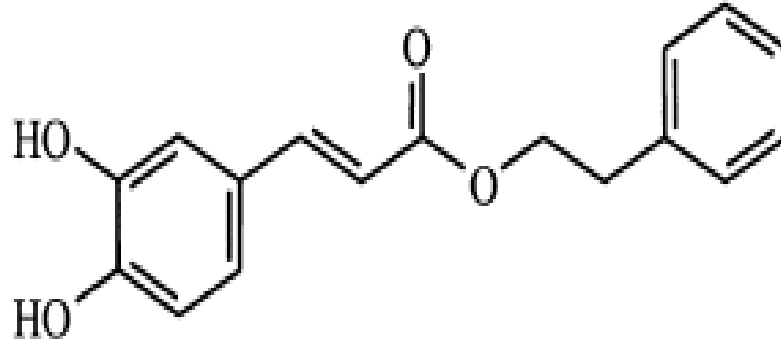


Şekil 11. Amonyak toksisitesi sonucu meydana gelen serbest radikal üretim mekanizmaları (53) (NMDAR; N-metil D-aspartat reseptörü, O_2^- ; Süperoksit radikali, H_2O_2 ; Hidrojen peroksit, CAT; Katalaz, GSH-P; Glutatyon peroksidaz, XHD; Ksantin dehidrogenaz, XO; Ksantin oksidaz, ROS; Reaktif oksijen türleri)

2.3. KAFEİK ASİT FENETİL ESTER

Kafeik asit fenetil ester, balarıları tarafından sentezlenen propolisin aktif bileşeni olup; antimikrobiyal, antienflamatuar ve antikanser özellikler göstermektedir. Önceden yapılan çalışmalar CAPE'nin antioksidan özelliklerin de olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte CAPE'nin bir oksijen radikal süpürücüsü olduğu rapor edilmiştir (54). CAPE, 10 μM 'lık bir konsantrasyonda insan nötrofillerinde ve ksantin / ksantin oksidaz sistemindeki ROS üretimini tamamen bloke etmiştir (55). CAPE, antiviral ve immünomodülatör özelliklere de sahiptir. CAPE; NF-kB aktivasyonu, lipid peroksidasyonu, lipioksijenaz aktivitesi, protein tirozin kinaz ve ornitin dekarboksilaz üzerinde inhibitör özelliklere sahiptir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar bu bileşiğin iskemiyle oluşturulan

nöronal hasara karşı nöroprotektif özellikler gösterdiğini göstermiştir (56). CAPE; böbrek, testis, bağırsak ve medulla sipinalis gibi organlarda iskemi / reperfüzyon hasarından dokuları korumuştur. Son yapılan çalışmalar CAPE'nin ratlarda iskemi / reperfüzyon hasarına karşı kalbi koruduğunu göstermiştir. İskemi / reperfüzyon hasarı oluşturulan grupla karşılaştırıldığında CAPE'nin; apoptosisi azalttığı, nitrik oksit (NO) üretimini arttırdığı, miyokardiyal süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesini arttırdığı, serum kreatin kinaz ve aspartat transaminaz aktivitesini azalttığı tespit edilmiştir (57). CAPE, küçük ve yağda çözünür bir bileşiktir. Süperoksit (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve diğer radikalleri süpürmesinin yanında protein kinaz-C (PKC) aktivasyonunu ve NO inaktivasyonunu önlemiştir (58). CAPE, farmakojik olarak güvenilir bir moleküldür. Lipid peroksidasyonunu baskılayarak antioksidan enzimlerin aktivitesini arttırmaktadır (59).



Şekil 12. CAPE'nin kimyasal yapısı

3. MATERYAL METOD

3.1. DENEY GRUPLARI

Deneyde Wistar-Albino (195 ± 15 g) erkek sıçanlardan 56 adet kullanıldı. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırma Laboratuvarından temin edilen sıçanlar standart 12 saat karanlık 12 saat aydınlık, havalandırılmalı, sabit ısıda ve her kafese dörderli gruplar halinde yerleştirildi ve randomize olarak her

grup için seçildi. Sıçanlar standart pellet yemi ve musluk suyu kullanılarak beslendi. Deneye başlanmadan önce İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurulu'ndan 2005/26 protokol numarasıyla izin alındı. Hayvanlar altı gruba ayrıldı ve Norton ve ark.(60) hepatik ensefalopati modeli örnek alınarak deney düzeneği hazırlandı:

1. grup: Kontrol

2. grup: CAPE (10 µmol/kg/gün, i.p.)

3. grup: HE (hepatik-ensefalopati) grubu (tioasetamid 0. ve 24. saatte 600 mg/kg i.p.).

4. grup: HE + laktuloz grubu (tioasetamid + laktuloz 3 gr/kg/gün 12 saatte bir)

5. grup: HE + CAPE grubu (tioasetamid + CAPE bir gün önce başlanmak üzere günde 10 µmol/kg/gün i.p.)

6. grup: HE + laktuloz + CAPE grubu (tioasetamid+ laktuloz + CAPE)

Her gruba destek tedavisi:

I. destek tedavisi: 25 ml/kg i.p., %5 dekstroz + %0.45 NaCl + 20 mEq/L KCl. Tioasetamidin ilk enjeksiyonundan sonra 12 saatte bir.

II. destek tedavisi: 25 ml/kg i.p., %0.9 NaCl. Tioasetamidin ikinci uygulanmasından sonra her 4 saatte bir enjeksiyonundan sonra 12 saatte bir.

CAPE %10'luk etil alkol içerisinde çözüldü ve tioasetamid uygulanmasından 24 saat önce verilmeye başlandı. Tioasetamid %0.9 NaCl solüsyonu içerisinde çözümlenerek hazırlandı ve HE oluşturulacak gruplara i.p. olarak iki gün 600 mg/kg dozunda verildi.. Lactuloz uygulanan gruplara 3 gr/kg/gün olacak şekilde 12 saatte oral olarak verildi. Yukarıda belirtilen destek tedavileri HE oluşturulan gruplara uygulandığı gibi kontrol ve CAPE gruplarına da benzer hacimde %0.9 NaCl ve %5 dekstroz enjeksiyonu deney sonlandırılana kadar yapıldı.

Deney her grup için tioasetamid uygulanmasından bir gün önce başlamış (tioasetamid uygulanmayan kontrol ve CAPE grupları da benzer şekilde olmak üzere) ve ilk tioasetamid enjeksiyonundan 60 saat sonra deney ketamin/ksilazin (75/10 mg/kg, i.p.) anestezisi ile dokuları ve kan örneklerini almak üzere sonlandırılmıştır.

Deney sonunda sağ kalan ve ölen sıçanlar her grup için belirlendi ve istatistiksel analiz için tablo haline getirildi.

3.2. DAVRANIŞ TESTLERİ

Nörolojik hasarın izlenmesi için bir dizi davranış testi ilk tioasetamid dozuna göre 54. saatte tüm gruplardaki sıçanlara uygulandı. Testlerden her bir sıçanın aldığı skor kayıt edildi. Uygulanan refleks testleri şunlardır:

3.2.1. Geri çekilme refleksi:

Sabit haldeki sıçanın kuyruğu kısırlır ve kuyruğunu çekmesi izlenir.

3.2.2. İşitsel ürkütme refleksi:

Sıçan sabit iken eller çırılarak yüksek ses çıkarılır. Hayvanın süratle titreyip geriye doğru kaçması beklenir.

3.2.3. Baş sallama refleksi:

Sıçanın gözlerine ışık ile uyarı verilir ve normalde uyarı boyunca başını sallamasını ve geri çekmesi beklenir.

3.2.4. Korneal refleks:

Korneasına hafifçe dokunulduğunda sıçan gözlerini kapar.

3.2.5. Doğrulma refleksi:

Sırt üstü masaya yerleştirilen sıçanın doğrulması ve normal pozisyonunu alması beklenir.

3.2.6. Denge testi:

Sıçan 90 cm yükseklikte bir yüzeye yerleştirilir ve 30° açı olacak şekilde eğim verilir. Normal cevapta sıçanın yüzünü yukarı yöne çevirmesi beklenir. Ancak tekraralarda bu cevap kaybolur.

3.2.7. Yakalama refleksi:

Sıçanın kafes telini yakalaması test edilir.

3.2.8. Yerleştirme refleksi:

Sıçan yaklaşık 30° lik açıyla tutularak masa yüzeyine doğru hareket ettirilir ve masa kenarında arka ayaklarına dokunulduğunda hemen ön ayaklarını masaya yerleştirir.

Fulminant hepatik ensefalopati (FHE) sınıflamasına göre yukarıdaki davranış testleri 4 üzerinden puanlandırıldı (60):

Kontrol grubuyla aynı performans: 4 puan

Kontrol grubunun %75-50 si kadar performans: 3 puan

Kontrol grubunun %50-25 i kadar performans: 2 puan

Kontrol grubunun %25-1 i kadar performans: 1 puan

Cevap alınmazsa: 0 puan

3.3. BİYOKİMYASAL PROSEDÜR

Deney sonunda ölen sıçanların deney dışında bırakılmasından sonra kalan sıçanların (Tablo 8.) anestezi altında (ketamin/ksilazin, 75/10 mg/kg, i.p.) heparinize venöz kanları alınarak beyin bölümleri atlas yardımıyla çıkarılarak -80°C de saklandı. Kanları iki kısma ayrıldı. Biri amonyak ölçümü için diğeri de santrifüj edilerek ALT ve AST ölçümü için saklandı. Dokular sıçan beyin atlasına göre korteks, beyin sapı ve serebellum kısımları ayrılarak saklandı.

3.3.1. Dokuların hazırlanması

Deney günü tartılan dokular 0.2 mM pH: 7.4 Tris-HCl tamponuyla homojenize edildi (IKA Ultra-Turrax T25 basic homogenizer, Germany). Doku MDA ölçümleri bu örneklerden yapıldı. Homojenat daha sonra 4000 rpm de 55 dakika santrifüj edildikten sonra üst kısımda yer alan temiz süpernatant kısım SOD, CAT ve GSH-Px ölçümleri için ayrıldı. SOD ölçümü için süpernatantlar eşit hacim etanol kloroform (5/3, v/v) karışımıyla ekstrakte edildi. Spektrofotometrik ölçümlerde uv-Shimadzu 1600 kullanıldı.

3.3.2. Katalaz (KAT) Enzim Aktivitesi

Katalaz (KAT, EC 1.11.1.6) enzim aktivitesi Aebi'nin metoduna göre (61) H₂O₂ nin ortamındaki katalaz tarafından tüketilmesi prensibine göre spektrofotometrik olarak 240 nm'de ölçüldü. 50 mM fosfat tamponuna hidrojen peroksit eklenerek 0.500 OD ye tampon ayarlandı. Numune eklenmesiyle birlikte düşüş her 15 sn de bir kayıt edildi. 1 dak. tüketilen H₂O₂ hızı olarak k/g protein olarak ifade edildi ($k = [2.3 \times \log (OD_1 / OD_2)] / 30$ (sn)).

3.3.3. Süperoksit Dismutaz (SOD) Enzim Aktivitesi

Süperoksit dismutaz (SOD, EC 1.15.1.1) enzim aktivitesi ölçümü nitroblue tetrazolium (NBT) ile ortaya çıkan O₂^{•-}'nin indirgenmesi esasına dayanılarak spektrofotometrede 560 nm de ölçülerek değerlendirildi (62). Ortamda SOD enzimi bulunduğunda enzim miktarına bağlı olarak açık bir renk değişikliği meydana gelirken olmaması durumunda daha koyu renk vermektedir. Enziminin aktivitesini % 50 oranında NBT redüksiyonunu inhibe eden enzim aktivitesi olarak alındı ve U/mg protein olarak ifade edildi (Enzimin % inhibisyonu = $(Abs_{k\ddot{o}r} - Abs_{num}) / Abs_{k\ddot{o}r} \times 100$).

3.3.4. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) Enziminin Aktivitesi

Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px, EC 1.11.1.9) enzim aktivitesi Paglia ve arkadaşlarının metodu uygulanarak H₂O₂ varlığında redükte glutasyonun (GSH)

okside glutatyona (GSSG) yükseltgenmesini katalizlemesi prensibine göre ölçüldü (63). NADPH'ın NADP⁺'ya yükseltgenmesi sırasındaki absorbans azalmasının 340 nm'de spektrofotometrik olarak okunmasıyla enzim aktivitesi hesaplandı ve birim zamanda okside olan NADPH'ın mikromol miktarı U/mg protein olarak ifade edildi.

3.3.5. Tiyobarbitürik Asit Reaktif Maddeleri (TBARS) Miktarının Tayini

Esterbauer ve Cheeseman'nin metoduna göre asidik ortamdaki tiyobarbitürik asit ile 90-95°C'de reaksiyona girmesi prensibine göre spektrofotometrik olarak çalışıldı (64). 532 nm'de spektrofotometrik olarak okunan sonuçlar standart grafik sonuçlarına göre hesaplanarak nmol/g yaş doku olarak ifade edildi.

3.3.6. Protein Tayini

Supernatan ve ekstrakte edilen örneklerde protein analizleri Lowry metoduna göre çalışıldı (65).

3.3.7. Kanda Amonyak Tayini

Kanda amonyak tayini indolfenol reaksiyonuna göre yapıldı (66). %10 luk trikloroasetik asit (TCA) eklenen kan örnekleri buz içerisinde laboratuvar ortamına alınarak -80°C derin dondurucuda analiz gününe kadar saklandı. Fenol ve sodyumnitrozoprusiyat ile hazırlanan fenol çözeltisi ve daha sonra hipoklorit çözeltisi eklenerek 37°C de 30 dak. su banyosunda inkübe edilen örnekler 624 nm de okundu. (NH₄)SO₄ ile hazırlanan standart çözeltisine de aynı işlemler yapıldı. Elde edilen standart formülüne göre hesaplandı ve sonuçlar µgr/dL olacak şekilde verilir.

3.3.8. ALT ve AST enzim aktiviteleri tayini

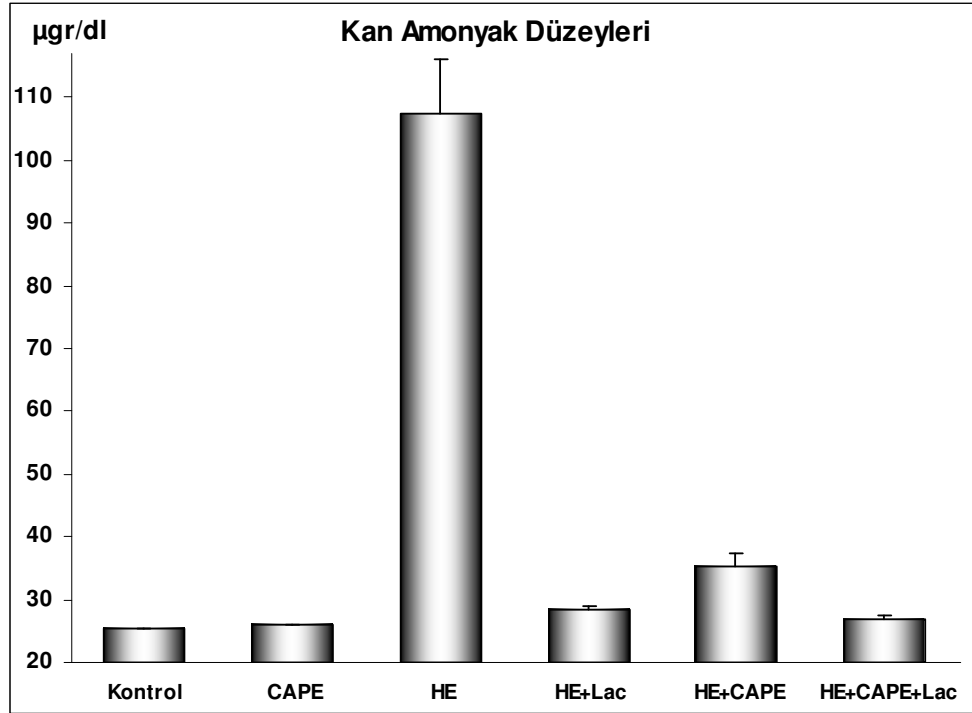
ALT için Olympus'un OSR6107 kiti ve AST Olympus'un OSR6209 kiti aktivitelerin ölçümü için kullanılarak bir otoanalizator ile (Olympus AU2700) ölçüldü.

3.3.9. İstatistiksel analiz

İstatistiksel analizler Windows uyumlu SPSS programı ile yapıldı. Sonuçların gruplara göre dağılımı non-parametrik testlerden Kolmogorov-Smirnov Testi ile değerlendirildi. Grupların normal dağılım göstermesinde dolayı parametrik testlerden “one-way Anova Testi” ve “Post Hoc” testlerden “LSD” kullanıldı. Yüzdelerin karşılaştırılması için *ki-kare* testi kullanıldı. Değerler ortalama \pm standart hata olarak verildi ve $p < 0.05$ olan karşılaştırmalar istatistiksel olarak anlamlı olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

Deney sonunda elde ettiğimiz sonuçlar tablolar ve grafikler halinde aşağıda verilmiştir. Tüm gruplara ait serum amonyak, AST, ALT düzeyleri aynı tabloda gösterilmiştir. Her beyin dokusu için (korteks, beyin sapı, serebellum) antioksidan enzim aktiviteleri ve MDA düzeyleri ayrı ayrı tablolar halinde verilmiştir. Serum amonyak, AST, ALT düzeyleri ve beyin dokularındaki antioksidan enzim aktiviteleri ve MDA düzeyleri ayrı ayrı grafikler şeklinde gösterilmiştir. Yine refleks skorları da ayrı bir tablo halinde sunulmuş ve toplam skor bir grafik ile gösterilmiştir.



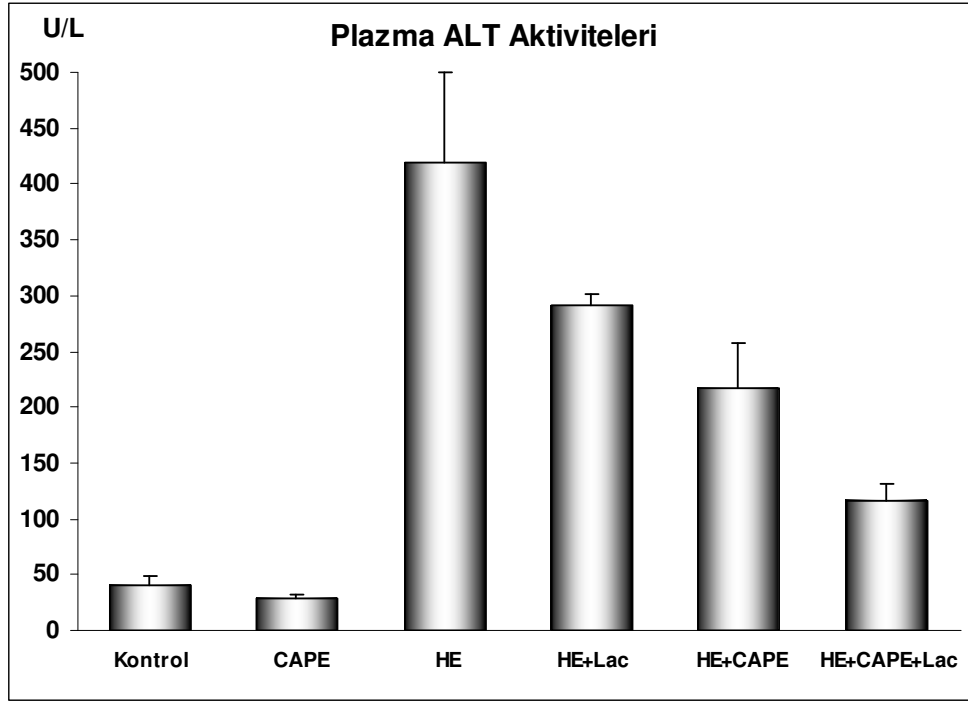
Grafik 1: Kan amonyak düzeyleri (CAPE; Kafeik asit fenetil ester, HE; hepatik ensefalopati, Lac; laktuloz).

HE grubunda serum amonyak, AST ve ALT enzim düzeylerinin diğer gruplardan çok daha yüksek olduğu görülmüştür (Tablo 3, Grafik1,2,3). HE grubu amonyak düzeyi kontrol, CAPE, HE+Lac, HE+CAPE ve HE+CAPE+Lac gruplarından anlamlı olarak yüksekti ($p<0.05$). Ayrıca HE+CAPE grubu kontrol ve CAPE gruplarından daha yüksek kan amonyak düzeyine sahipti ($p<0.05$). Diğer gruplar

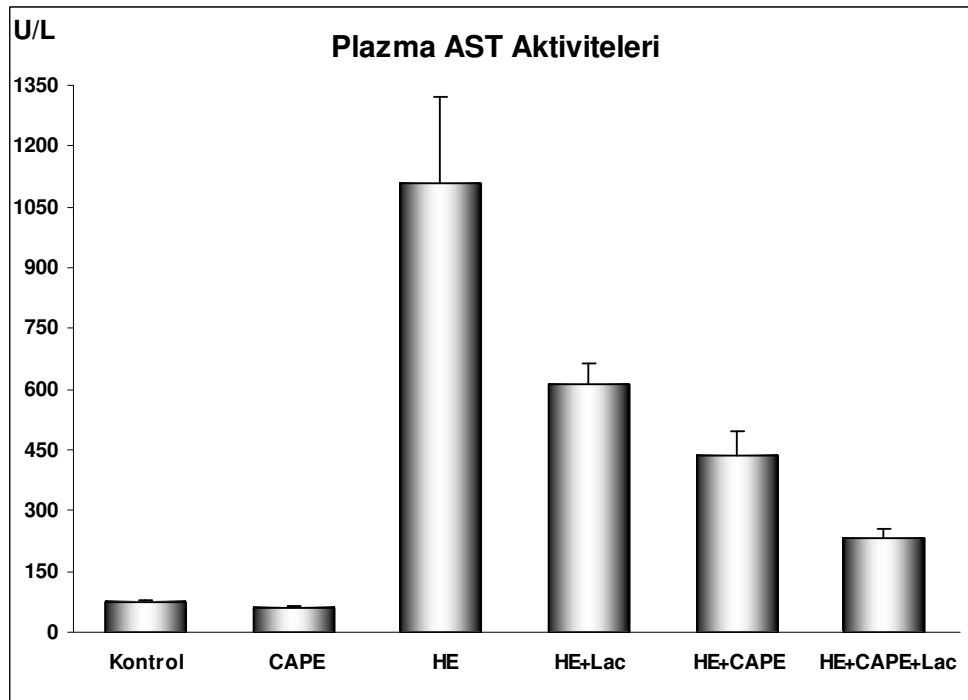
arasında amonyak düzeyi açısından anlamlı bir fark yoktu. HE+CAPE+Lac grubu hariç tüm diğer HE oluşturulan gruplarda plazma ALT ve AST aktiviteleri kontrol ve CAPE gruplarına göre anlamlı olarak yüksekti ($p<0.05$). HE+CAPE+Lac grubu ile hem kontrol hem de CAPE grupları birbirleri ile karşılaştırıldığında plazma ALT ve AST aktiviteleri açısından anlamlı bir fark yoktu. Plazma ALT ve AST aktiviteleri HE+CAPE+Lac grubundan HE+Lac grubuna göre anlamlı olarak azaldığı tespit edildi ($p<0.05$). Plazma ALT aktivitesi HE+CAPE+Lac grubunda HE+CAPE grubuna göre anlamlı olarak azalırken ($p<0.05$), AST düzeyinde ki azalma istatistiksel olarak anlamlı değildi.

Tablo 1. Kan amonyak, plazma AST ve ALT düzeyleri

		<i>Amonyak ($\mu\text{gr/dL}$)</i>	<i>ALT (U/L)</i>	<i>AST (U/L)</i>
1	Kontrol	25,246 \pm 0,259	40,167 \pm 8,372	72,333 \pm 5,414
2	CAPE	25,896 \pm 0,142	28,167 \pm 4,400	61,167 \pm 2,522
3	HE	107,318 \pm 8,720	419,333 \pm 81,067	1109,833 \pm 214,392
4	HE+Lac	28,488 \pm 0,560	290,857 \pm 9,733	613,143 \pm 52,188
5	HE+CAPE	35,261 \pm 1,959	217,714 \pm 39,982	436,286 \pm 59,205
6	HE+CAPE+Lac	26,797 \pm 0,572	116,714 \pm 14,615	232,571 \pm 24,444
	<i>P</i>			
	1-2	AD	AD	AD
	1-3	0,000	0,000	0,000
	1-4	AD	0,000	0,000
	1-5	0,036	0,001	0,006
	1-6	AD	AD	AD
	2-3	0,000	0,000	0,000
	2-4	AD	0,000	0,000
	2-5	0,049	0,001	0,005
	2-6	AD	AD	AD
	3-4	0,000	0,017	0,000
	3-5	0,000	0,000	0,000
	3-6	0,000	0,000	0,000
	4-5	AD	AD	AD
	4-6	AD	0,001	0,003
	5-6	AD	0,048	AD
	AD, anlamlı değil			



Grafik 2: Plazma ALT aktivitelemi (CAPE; Kafeik asit fenetil ester, HE; hepatic ensefalopati, Lac; laktuloz).



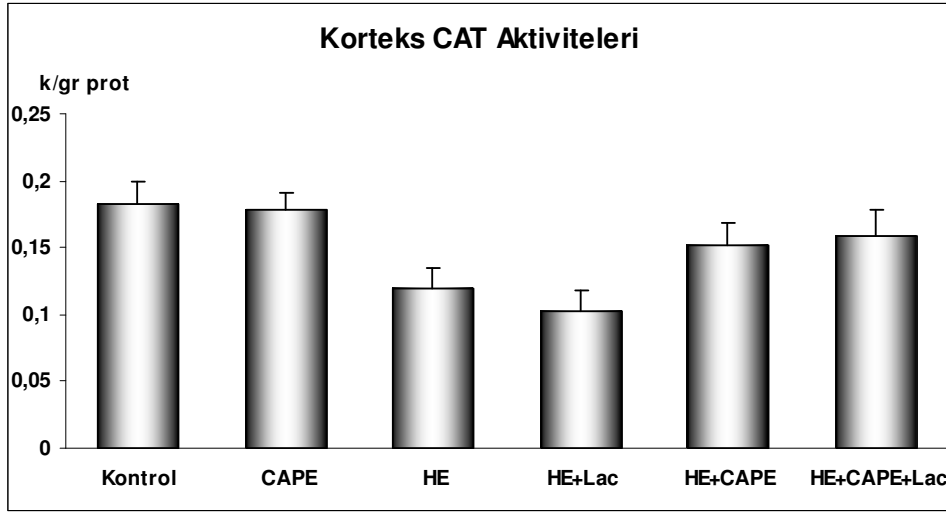
Grafik 3: Plazma AST aktivitelemi (CAPE; Kafeik asit fenetil ester, HE; hepatic ensefalopati, Lac; laktuloz).

Korteks dokusu CAT aktiviteleri açısından HE ve HE+Lac grupları kontrol ve CAPE gruplarına göre anlamlı olarak yüksek iken, HE+Lac grubu CAT aktivitesi ayrıca hem HE+CAPE hem de HE+CAPE+Lac grubuna göre anlamlı olarak düşük olduğu tespit edildi ($p<0.05$) (Tablo 4, Grafik 4). Diğer gruplar arasında korteks dokusu CAT aktivitesi açısından anlamlı farklılık yoktu.

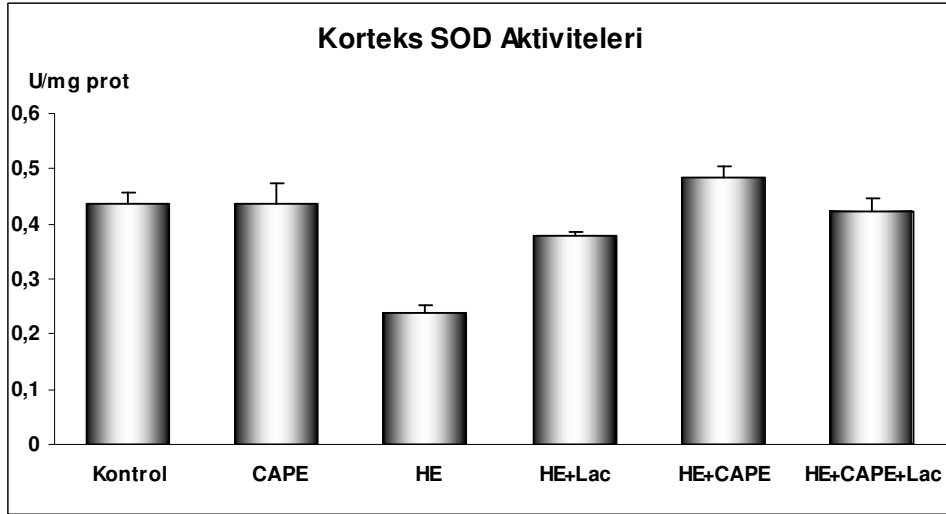
Tablo 2. Korteks dokusu antioksidan enzim ve MDA düzeyleri

		<i>CAT</i> (<i>k/g prot</i>)	<i>SOD</i> (<i>U/mg prot</i>)	<i>GSH-Px</i> (<i>U/g prot</i>)	<i>MDA</i> (<i>nmol/g yaş doku</i>)
1	Kontrol	0,182 ± 0,017	0,435 ± 0,021	1,344 ± 0,094	43,53 ± 3,27
2	CAPE	0,179 ± 0,012	0,438 ± 0,036	1,434 ± 0,118	46,22 ± 2,05
3	HE	0,119 ± 0,016	0,238 ± 0,013	0,768 ± 0,056	71,13 ± 4,52
4	HE+Lac	0,102 ± 0,016	0,378 ± 0,007	0,672 ± 0,081	61,67 ± 2,93
5	HE+CAPE	0,152 ± 0,017	0,484 ± 0,022	1,425 ± 0,093	43,08 ± 4,50
6	HE+CAPE+Lac	0,159 ± 0,020	0,423 ± 0,022	1,280 ± 0,116	47,59 ± 4,20
	p				
	1-2	AD	AD	AD	AD
	1-3	0,021	0,000	0,000	0,000
	1-4	0,003	AD	0,000	0,003
	1-5	AD	AD	AD	AD
	1-6	AD	AD	AD	AD
	2-3	0,026	0,000	0,000	0,000
	2-4	0,004	AD	0,000	0,009
	2-5	AD	AD	AD	AD
	2-6	AD	AD	AD	AD
	3-4	AD	0,000	AD	AD
	3-5	AD	0,000	0,000	0,000
	3-6	AD	0,000	0,001	0,000
	4-5	0,038	0,001	0,000	0,001
	4-6	0,019	AD	0,000	0,011
	5-6	AD	0,042	AD	AD
	AD, anlamlı değil				

HE grubu korteks dokusu SOD enzim aktivitesi tüm diğer gruplara göre anlamlı olarak azalmış olarak tespit edildi ($p<0.05$) (Tablo 4, Grafik 5). Ayrıca HE+Lac ile HE+CAPE+Lac gruplarında korteks dokusu SOD enzim aktiviteleri HE+CAPE grubuna göre de anlamlı olarak düşük bulundu ($p<0.05$). Diğer gruplar arasında ise korteks dokusu SOD aktiviteleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu.



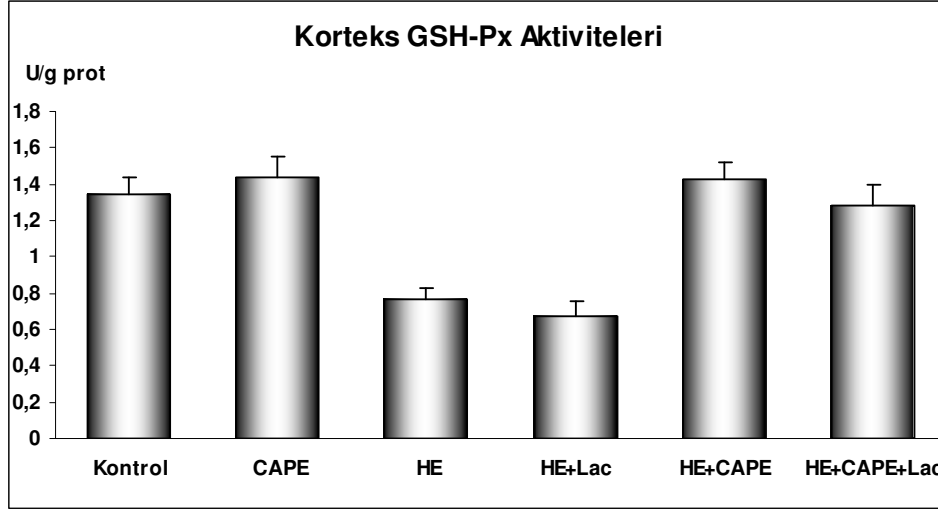
Grafik 4: Korteks dokusu katalaz (CAT) aktiviteleri (CAPE; Kafeik asit fenetil ester, HE; hepatik ensefalopati, Lac; laktuloz).



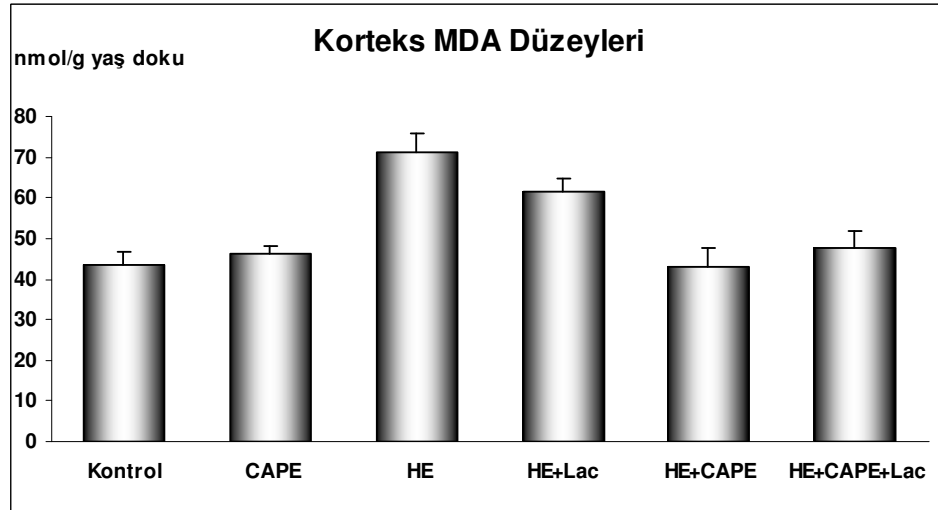
Grafik 5: Korteks dokusu superoksit dismutaz (SOD) aktiviteleri (CAPE; Kafeik asit fenetil ester, HE; hepatik ensefalopati, Lac; laktuloz).

Korteks GSH-Px aktivitesi HE ve HE+Lac gruplarında diğler gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı azalma mevcuttu ($p < 0,05$) (Tablo 4, Grafik 6). Diğler gruplar arasında korteks dokusu GSH-Px enzim aktiviteleri farklılık göstermedi.

Korteks dokusu MDA düzeyleri bakımından HE ve HE+Lac gruplarında diğer gruplara göre yüksek olduğu tespit edildi ($p<0.05$) (Tablo 4, Grafik 7). Diğer gruplar arasında kortek dokusu MDA düzeyleri arasında farklılık gözlemlenmedi.



Grafik 6: Korteks dokusu glutatyon peroksidaz (GSH-Px) aktiviteleri (CAPE; Kafeik asit fenetil ester, HE; hepatik ensefalopati, Lac; laktuloz).



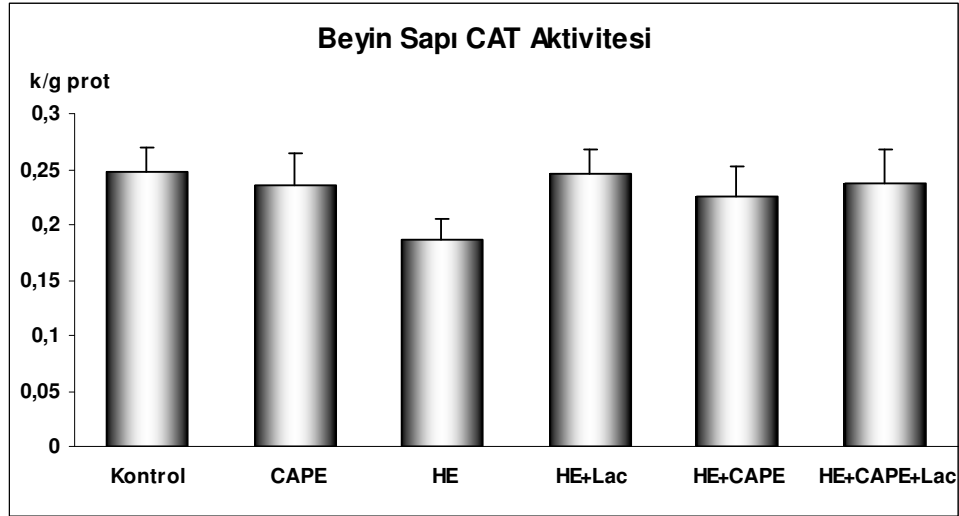
Grafik 7: Korteks dokusu malondialdehit (MDA) düzeyleri (CAPE; Kafeik asit fenetil ester, HE; hepatik ensefalopati, Lac; laktuloz).

Beyin sapı dokusu CAT aktivitesi açısından gruplara arasında anlamlı fark yoktu (Tablo 5, Grafik 8). Ancak anlamlı olmamakla beraber HE grubunda CAT aktivitesi diğer gruplara göre daha düşük olduğu görüldü ($p>0.05$). Beyin sapı SOD aktivitesi ise HE grubunda diğer gruplara göre anlamlı olarak azaldığı tespit edildi

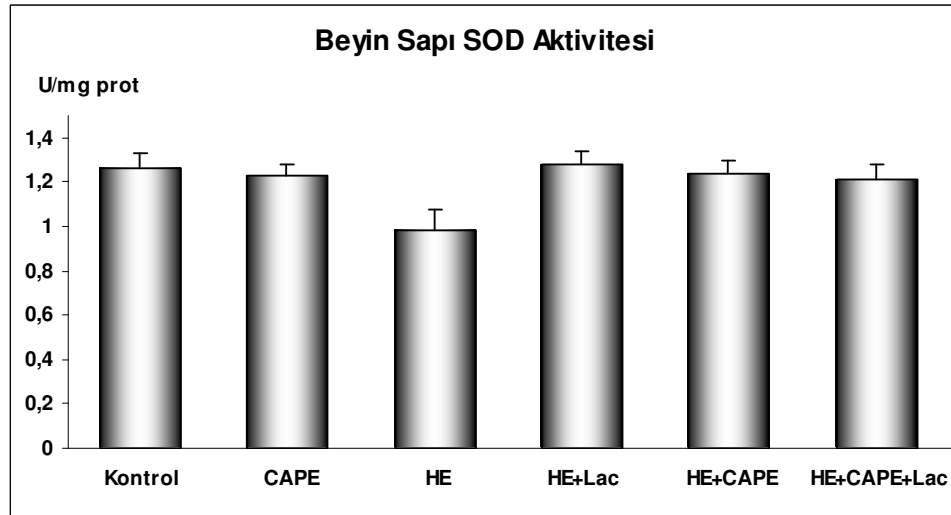
($p < 0.05$) (Tablo 5, Grafik 9). Diğer gruplar arasında beyin sapı SOD aktiviteleri anlamlı bir farklılık göstermedi.

Tablo 3. Beyin sapı dokusu antioksidan enzim ve MDA düzeyleri

		<i>CAT</i> (<i>k/g protein</i>)	<i>SOD</i> (<i>U/mg protein</i>)	<i>GSH-Px</i> (<i>U/g protein</i>)	<i>MDA</i> (<i>nmol/g yaş doku</i>)
1	Kontrol	0,248 ± 0,021	1,26 ± 0,07	1,687 ± 0,078	136,5 ± 4,6
2	CAPE	0,236 ± 0,029	1,23 ± 0,05	1,673 ± 0,110	141,3 ± 6,6
3	HE	0,186 ± 0,019	0,99 ± 0,09	1,326 ± 0,133	212,6 ± 16,2
4	HE+Lac	0,245 ± 0,022	1,28 ± 0,06	1,307 ± 0,129	141,7 ± 5,0
5	HE+CAPE	0,225 ± 0,027	1,24 ± 0,06	1,738 ± 0,089	148,9 ± 12,5
6	HE+CAPE+Lac	0,237 ± 0,031	1,21 ± 0,07	1,626 ± 0,084	123,8 ± 6,4
	<i>p</i>				
	1-2	AD	AD	AD	AD
	1-3	AD	0,008	0,029	0,000
	1-4	AD	AD	0,017	AD
	1-5	AD	AD	AD	AD
	1-6	AD	AD	AD	AD
	2-3	AD	0,019	0,035	0,000
	2-4	AD	AD	0,021	AD
	2-5	AD	AD	AD	AD
	2-6	AD	AD	AD	AD
	3-4	AD	0,004	AD	0,000
	3-5	AD	0,010	0,008	0,000
	3-6	AD	0,021	AD	0,000
	4-5	AD	AD	0,004	AD
	4-6	AD	AD	0,030	AD
	5-6	AD	AD	AD	AD
	AD, anlamlı değil				

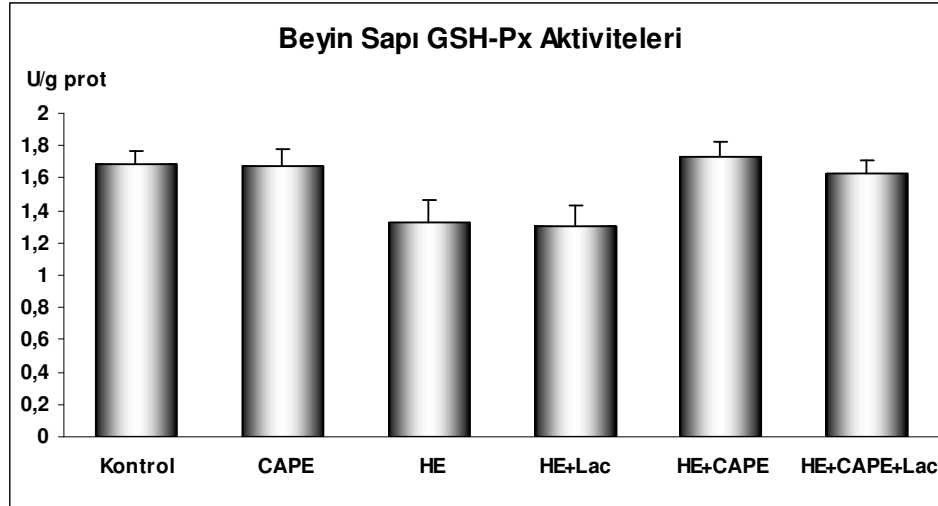


Grafik 8: Beyin sapı dokusu katalaz (CAT) aktiviteleri (CAPE; Kafeik asit fenetil ester, HE; hepatik ensefalopati, Lac; laktuloz).



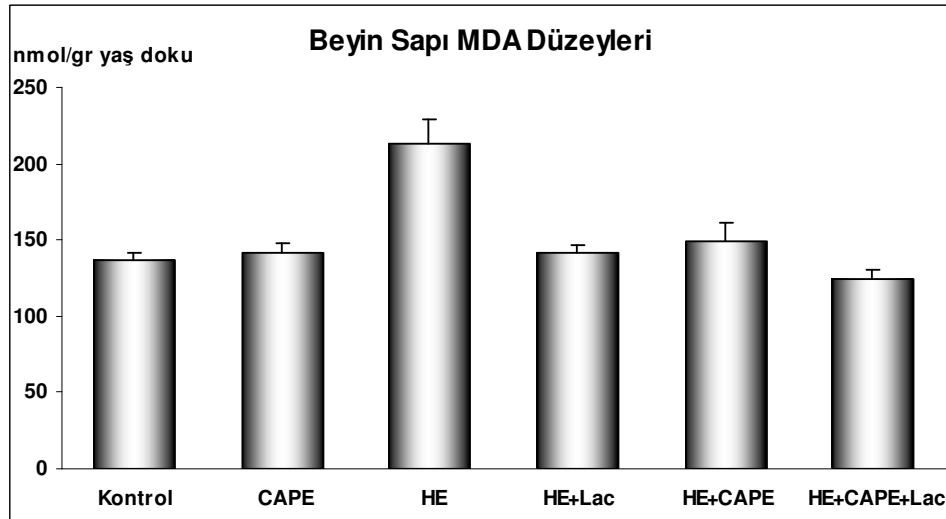
Grafik 9: Beyin sapı dokusu superoksit dismutaz (SOD) aktiviteleri (CAPE; Kafeik asit fenetil ester, HE; hepatik ensefalopati, Lac; laktuloz).

HE+Lac grubu beyin sapı GSH-Px aktivitesi HE grubu hariç diğer gruplara göre düşük iken, HE grubu beyin sapı GSH-Px aktivitesi kontrol, CAPE ve HE+CAPE gruplarına göre anlamlı olarak düşük olduğu tespit edildi ($p < 0.05$) (Tablo 5, Grafik 10). Diğer gruplar arasında ise beyin sapı GSH-Px aktiviteleri açısından anlamlı bir fark bulunamadı.



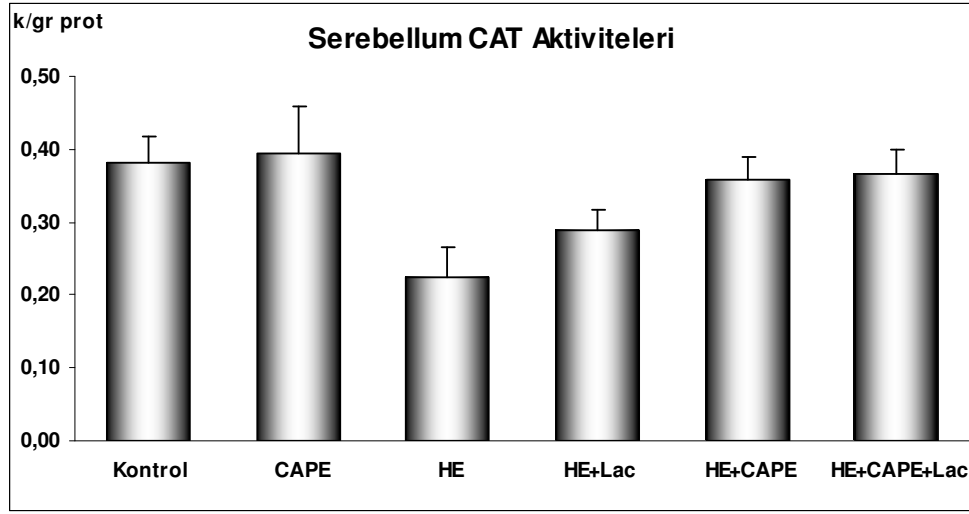
Grafik 10: Beyin sapı dokusu glutatyon peroksidaz (GSH-Px) aktiviteleri (CAPE; Kafeik asit fenetil ester, HE; hepatik ensefalopati, Lac; laktuloz).

Beyin sapı MDA düzeyi HE grubunda diğer gruplara göre anlamlı olarak arttığı görüldü ($p < 0.05$) (Tablo 5, Grafik 11). Diğer gruplar arasında beyin sapı MDA seviyeleri farklılık göstermedi.



Grafik 11: Beyin sapı dokusu malondialdehit (MDA) düzeyleri (CAPE; Kafeik asit fenetil ester, HE; hepatik ensefalopati, Lac; laktuloz).

Serebellum dokusu CAT enzim aktivitesinin HE grubunda HE+Lac grubu hariç diğer gruplara göre anlamlı olarak azaldığı tespit edildi ($p < 0.05$) (Tablo 6, Grafik 12). Diğer gruplar arasında serebellum CAT aktiviteleri farklılık göstermedi.

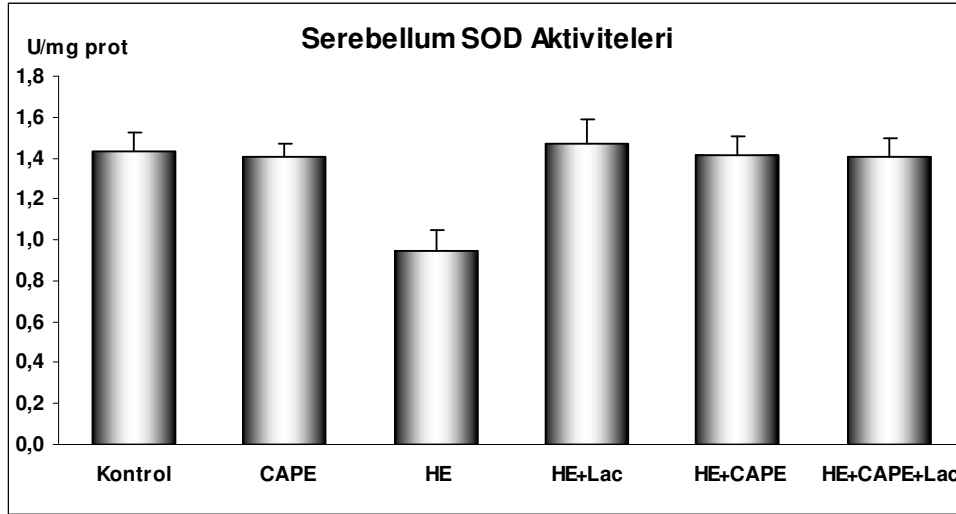


Grafik 12: Serebellum dokusu katalaz (CAT) aktiviteleri (CAPE; Kafeik asit fenetil ester, HE; hepatik ensefalopati, Lac; laktuloz).

Tablo 4. Serebellum dokusu antioksidan enzim ve MDA düzeyleri

	<i>CAT</i> (k/g prot)	<i>SOD</i> (U/mg prot)	<i>GSH-Px</i> (U/g prot)	<i>MDA</i> (nmol/g yaş doku)
1 Kontrol	0,381 ± 0,036	1,436 ± 0,084	1,315 ± 0,031	111,5 ± 4,7
2 CAPE	0,395 ± 0,064	1,401 ± 0,068	1,371 ± 0,162	114,2 ± 4,7
3 HE	0,225 ± 0,041	0,945 ± 0,099	0,989 ± 0,055	205,5 ± 14,3
4 HE+Lac	0,289 ± 0,027	1,469 ± 0,116	0,997 ± 0,083	126,9 ± 6,5
5 HE+CAPE	0,359 ± 0,031	1,415 ± 0,092	1,456 ± 0,110	115,6 ± 9,0
6 HE+CAPE+Lac	0,365 ± 0,035	1,406 ± 0,091	1,395 ± 0,102	103,5 ± 15,6
<i>p</i>				
1-2	AD	AD	AD	AD
1-3	0,012	0,002	0,040	0,000
1-4	AD	AD	0,038	AD
1-5	AD	AD	AD	AD
1-6	AD	AD	AD	AD
2-3	0,007	0,003	0,017	0,000
2-4	AD	AD	0,016	AD
2-5	AD	AD	AD	AD
2-6	AD	AD	AD	AD
3-4	AD	0,001	AD	0,000
3-5	0,021	0,001	0,002	0,000
3-6	0,016	0,001	0,008	0,000
4-5	AD	AD	0,002	AD
4-6	AD	AD	0,006	AD
5-6	AD	AD	AD	AD

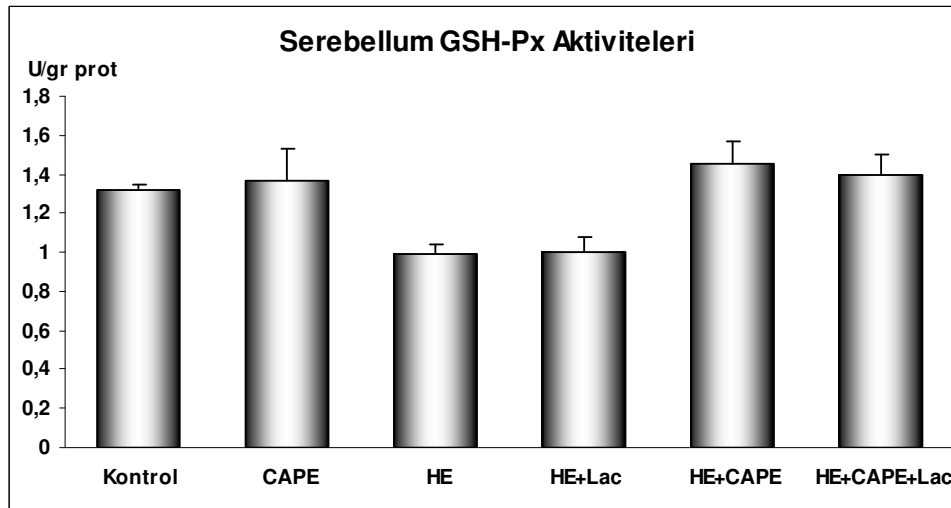
AD, anlamlı değil



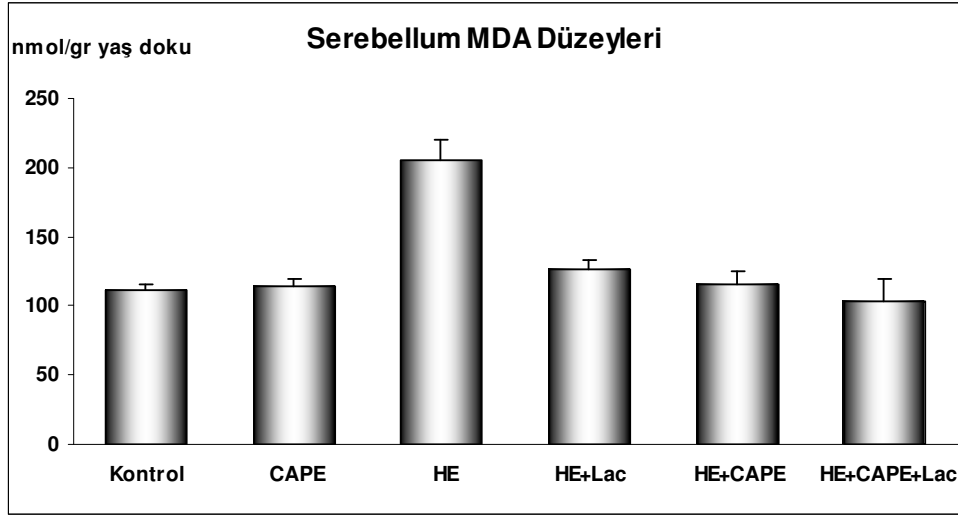
Grafik 13: Serebellum dokusu superoksit dismutaz (SOD) aktiviteleri (CAPE; Kafeik asit fenetil ester, HE; hepatik ensefalopati, Lac; laktuloz).

HE ve HE+Lac gruplarındaki serebellum dokusu GSH-Px enzim aktivitesinin diğer gruplara göre istatistiksel olarak azalmış olduğu tespit edildi ($p < 0,05$) (Tablo 6, Grafik 14). Diğer grupların GSH-Px aktiviteleri serebellum dokusunda farklılık göstermedi.

HE grubunda lipit peroksidasyon indeksi olan MDA düzeyinin diğer gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı görüldü ($p < 0,05$) (Tablo 6, Grafik 15). Laktuloz, CAPE ya da her ikisinin birlikte kullanılmasının tioasetamit ile artan lipit peroksidasyonunu engellediği tespit edildi ($p < 0,05$).



Grafik 14: Serebellum dokusu glutatyon peroksidaz (GSH-Px) aktiviteleri (CAPE; Kafeik asit fenetil ester, HE; hepatik ensefalopati, Lac; laktuloz).



Grafik 15: Serebellum dokusu malondialdehit (MDA) düzeyleri (CAPE; Kafeik asit fenetil ester, HE; hepatik ensefalopati, Lac; laktuloz).

HE ile geri çekme, işitsel ürkütme baş sallama, korneal, doğrulma, yakalama ve yerleştirme refleksleri ile denge testine göre skorların ortalaması sifıra yaklaştı. Laktuloz tedavisi ile bu skorlar kısmen düzeldi ve CAPE laktuloza göre kontrol skorlarına daha yaklaştırdı ve hem CAPE hem de laktuloz uygulanan grupta ise kontrole yakın skorlar elde edildi ($p < 0.05$) (Tablo 7).

Tablo 5. Deney sonunda gruplarda sağ kalan sıçan sayıları ve yüzdeleri

Gruplar	Deney sonunda yaşam durumu n(%)		Toplam
	Sağ	Ölü	
Kontrol	6 (% 100,0)	0 (% 0,0)	6 (% 100,0)
CAPE	6 (% 100,0)	0 (% 0,0)	6 (% 100,0)
HE	6 (% 37,5)	10 (% 62,5)	16 (% 100,0)
HE+Lac	7 (% 70,0)	3 (% 30,0)	10 (% 100,0)
HE+CAPE	8 (% 80,0)	2 (% 20,0)	10 (% 100,0)
HE+CAPE+Lac	8 (% 100,0)	0 (% 0,0)	8 (% 100,0)
Toplam	41 (% 73,2)	15 (% 26,8)	56 (% 100,0)

Deney sonunda sağ kalan sıçanlar açısından incelendiğinde HE grubu en fazla sıçanın öldüğü grup oldu (%62.5). Ki-kare testine göre HE grubunda ölümler diğer gruplara göre anlamlı olarak farklı idi ($p<0.05$). Bu yüksek ölüm oranı CAPE uygulaması ile belirgin bir biçimde azaldı. CAPE ve laktulozun birlikte uygulandığı grupta ölüm olayı görülmedi (%0).

Tablo 6. Gruplara göre motor aktivitenin değerlendirildiği refleks testlerine verilen cevaba göre skorlar.

	<i>Geriçekte reflesi</i>	<i>İşitsel ürkütme reflesi</i>	<i>Baş sallama reflesi</i>	<i>Korneal refleks</i>	<i>Doğrulma reflesi</i>	<i>Denge testi</i>	<i>Yakalama</i>	<i>Yerleştirme</i>
1 Kontrol	4,0 ± 0,0	4,0 ± 0,0	4,0 ± 0,0	4,0 ± 0,0	4,0 ± 0,0	4,0 ± 0,0	4,0 ± 0,0	4,0 ± 0,0
2 CAPE	4,0 ± 0,0	4,0 ± 0,0	4,0 ± 0,0	4,0 ± 0,0	4,0 ± 0,0	4,0 ± 0,0	4,0 ± 0,0	4,0 ± 0,0
3 HE	0,3 ± 0,2	0,2 ± 0,2	0,2 ± 0,2	0,3 ± 0,2	0,2 ± 0,2	0,3 ± 0,2	0,2 ± 0,2	0,2 ± 0,2
4 HE+Lac	3,0 ± 0,2	2,7 ± 0,2	2,9 ± 0,3	2,7 ± 0,2	2,7 ± 0,2	2,6 ± 0,2	2,7 ± 0,2	2,6 ± 0,2
5 HE+CAPE	3,4 ± 0,2	3,5 ± 0,2	3,5 ± 0,2	3,3 ± 0,2	3,3 ± 0,3	3,3 ± 0,2	3,3 ± 0,2	3,3 ± 0,2
6 HE+CAPE+ Lac	3,8 ± 0,2	3,8 ± 0,2	3,6 ± 0,2	3,6 ± 0,2	4,0 ± 0,0	3,8 ± 0,2	3,9 ± 0,1	3,8 ± 0,2
<i>P</i>								
1-2	AD	AD	AD	AD	AD	AD	AD	AD
1-3	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
1-4	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
1-5	0,012	0,029	AD	0,002	0,002	0,002	0,001	0,001
1-6	AD	AD	AD	AD	AD	AD	AD	AD
2-3	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
2-4	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
2-5	0,012	0,029	AD	0,002	0,002	0,002	0,001	0,001
2-6	AD	AD	AD	AD	AD	AD	AD	AD
3-4	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
3-5	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
3-6	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
4-5	AD	0,001	0,011	0,018	0,015	0,003	0,007	0,002
4-6	0,002	0,000	0,003	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
5-6	AD	AD	AD	AD	0,001	0,022	0,002	0,017
AD, anlamlı değil								

5. TARTIŞMA

Fulminant ya da akut hepatik yetmezlik ani olarak hepatositlerin nekrozu ve karaciğer dokusunun dejenerasyonu ile kendini gösteren bir klinik durumdur. Bu hastalarda nörolojik ve nöropsikiyatrik bir dizi bozukluklar görülmektedir. Sonuçta hastaların büyük çoğunluğu beyin ödeminden dolayı ölmektedir. Viral enfeksiyonlar, parasetamol, halotan, tetrasiklin, valproik asit, anti-tüberküloz ilaçları, sulfonamidler, diüretikler gibi hepatotoksik ilaçların aşırı dozları karaciğer yetmezliğinin en önemli ana nedenleri arasında yer almaktadır. Hepatik yetmezlik sonucu oluşan nörolojik bozuklukların patofizyolojik mekanizmaları tam olarak aydınlatılmamış olmamakla beraber en önemli suçlanan neden yükselen kan amonyak seviyesidir (4). Hepatik yetmezlik sırasında portal dolaşım ile karaciğere detoksifikasyon için gelen büyük miktarda amonyak detoksifikasyon işlemine uğrayamadığından sistemik dolaşıma girmektedir. Bunun sonucunda fulminant karaciğer yetmezliği olan hastalarda hem kan hem de doku ve özellikle beyin dokusu amonyak düzeyleri hızla yükselmektedir. Yüksek amonyak seviyesi ile glutamata ait NMDA reseptör aktivitesinde artış olmaktadır (67,68). Hücre içi Ca^{+2} miktarının artışı işte bu NMDA reseptör aktivasyonu ile olmaktadır. Hücre içi Ca^{+2} artması ile hücre ATP üretimi bozulmakta ve mitokondri fonksiyonları etkilenmektedir (4,10). Mitokondri oksidatif fosforilasyon için görev yapan bir organeldir. Oksidatif fosforilasyon için hücre O_2 kullanmaktadır. Ancak mitokondrinin hasara uğraması ve buradaki ATP üretiminin bozulması bir başka hasar mekanizmasını devreye sokar. Oksijen radikallerinin üretilme yerlerinden biri de hücrede mitokondridir. Hepatik ensefalopati ile nöronlarda meydana gelen hasar sonrası artan Ca^{+2} miktarı mitokondrial fonksiyonları bozmanın yanında birde yeni radikal oluşumuna da yol açmaktadır.

Serbest oksijen radikalleri (SOR) normal koşullar altında da vücutta üretilmektedirler. Superoksit anyonu (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali ($\cdot OH$) gibi radikaller hücrede sitoplazmada, mitokondride ya da endoplazmik retikulumda üretilebilir. Ancak bu üretilen radikaller sonunda detoksifiye edilen mekanizmalarla ortamdaki süpürülür. Bu mekanizmaların

başında endojen antioksidanlar gelmektedir. Endojen antioksidan mekanizmalardan superoksit dizmutaz (SOD) enzimi açığa çıkmış olan O_2^- ni ortamdan uzaklaştırmak amacıyla H_2O_2 e dönüştürmektedir. H_2O_2 in ortamdan uzaklaştırılma işini iki antioksidan enzim katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) üstlenmiştir. Katalaz enzimi H_2O_2 in suya detoksifikasyonunu sağlarken, GSH-Px de benzer şekilde glutatyon indirgenmesi ile bu işi yapar. Anlaşılacağı üzere üretilen SOR ürünlerine karşı hücre tarafından endojen antioksidanlar ile bir denge sağlanmaya çalışılmaktadır (5,6). Hepatik yetmezlik ile artan amonyak düzeyi ve sonucunda artan hücre içi Ca^{+2} un yol açtığı mitokondrial hasar üretilen SOR miktarını artırmaktadır. Böylece oksijen radikalleri ile antioksidanlar arasında yer alan denge bozulmakta ve hücre de SOR miktarı artmaktadır. Artan radikal üretiminin bir sonucu olarak antioksidan enzim aktivitesinde azalma ve sonuçta daha da toksik bir radikal olan $^{\bullet}OH$ radikalinde bir artış meydana gelmektedir. Oksijen radikalleri hücrede artıkları zaman hücre membranında ve iç organellerde lipid peroksidasyonuna yol açmaktadır.

Sonuçlarımıza göre hepatik ensefalopati grubunda artan amonyak düzeyi ve bununla beraber ALT ve AST seviyeleri literatür ile uygunluk göstermektedir. Reddy ve ark. (4) benzer şekilde 300 mg/kg tioasetamidi iki gün peş peşe uygulamış ve sonuçta kan amonyak düzeyleri 12. saatten itibaren anlamlı olarak artmıştır. Bizim çalışmamızda 72. saatte amonyak değerlerinin kontrol değerinin neredeyse dört katına çıktığını gördük. Reddy ve ark ayrıca hem karaciğer hem de beyin dokusu amonyak düzeylerini incelemiş ve tioasetamidin bu dokularda anlamlı amonyak artışına yol açtığını göstermişlerdir. Yaptıkları çalışmada artan amonyak düzeyinin karaciğer hasarına bağlı olduğu artan ALT ve AST düzeyleriyle de desteklenmiştir (4). Sonuçlarımıza göre ALT ve AST enzim düzeylerinde, HE grubunda nerdeyse 10 kata kadar artış olduğunu gözlemledik. Avni ve ark. (69) tioacetamid ile indukledikleri hepatik ensefalopatide, ALT ve AST değerlerinin bizim sonuçlarımız gibi çok yüksek artışlar gösterdiğini tespit etmişlerdir. Karaciğerde hasar göstergesi açısından yeterli bulgular olan ALT, AST ve dolaylı olarak kan amonyak düzeylerinin tez çalışmamız sonrası HE

grubunda artmış olması, tioasetamidin HE'yi başarıyla indüklediğini göstermektedir.

Hepatik ensefalopatinin en önemli göstergelerinden birisi de nöronal hasarın gösterilmesidir. Biz çalışmamızda bunu değerlendirmek için iki yol izledik. Birincisi sıçanların FHE değerlendirme kriterlerine göre (60) sıçanların davranışlarının izlenmesi ve puanlanması, ikinci olarak da değişik beyin bölgelerinin oksidan ve antioksidan parametreler açısından incelenmesidir. FHE puanlamalarına göre HE grubunda sıçanların düşük puanları ile nöronal hasara ait bulgular tespit ettik. Norton ve ark. (60) hem dişi hem erkek sıçanlarda ayrı ayrı deneyleri yapmış sonuç olarak ikinci günden itibaren motor aktivite ve reflekslerde 0 puan alacak derecede azalma olduğunu göstermişlerdir. Bizim çalışmamızda da benzer şekilde refleksler ve motor aktiviteler 0 ile 1 arasında puan aldılar (Tablo 7).

Hepatik ensefalopati modellerinde gözlemlenen en önemli bulgulardan biri yaşam durumudur. Bizim çalışmamız sonrası HE grubunda %37,5 gibi bir oran ile karşılaştık. Bu oranı, Norton ve ark. 60. saatte erkek sıçanlarda %20 lerin biraz üzerinde bulmuşlardır (60). Bruck ve ark. ise hayatta kalma oranını 52 saat sonra %30 olarak tespit etmişler (70).

Beyin bölgelerinden korteks, beyin sapı ve serebellum kısımları doku MDA seviyesi ile endojen antioksidanlar CAT, SOD ve GSH-Px analizleri ile değerlendirildi. Tioasetamid sonrası HE indüklenen grupta MDA artışı ve antioksidan enzim aktivitelerindeki azalma fulminant hepatik ensefalopatinin patofizyolojik mekanizmaları arasında önemli bir yere sahiptir ve yüksek amonyak düzeyinin oksidatif hasarı arttırdığı fikrini desteklemektedir. Hareket için sağlam olması gereken bu beyin bölgelerinin aynı zamanda hareketin dengeli yapılması içinde sağlam olması gerekmektedir. Deneylerimizde motor fonksiyonları kontrol eden testlerde HE grubunda görülen düşük puanlar ile korteks, beyin sapı ve serebellum dokularında artmış lipit peroksidasyonu bize

HE'nin patogenezinde yüksek amonyak düzeyinin nöronlarda oksidan hasara yol açarak nöronal hasara yol açtığı fikrini verdi.

Deneylerimizde HE tedavisi amacıyla iki grup tedavi seçeneğimiz vardı. Birincisi barsaklardan amonyak üretimini azaltarak ortaya çıkan amonyağın azaltılması ile nöronal hasarı önlemek ve hayatta kalma oranını artırmak, diğeri ise antioksidan CAPE ile tedavi ederek hem karaciğerde hemde nöronlarda tioasetamide bağlı hasarı engellemektir. Daha önce yapılan çalışmalar CAPE nin karaciğer hasarına karşı koruyucu olduğu gösterilmiştir. Ateş ve ark. soğuk stresi oluşturdukları karaciğer hasarına karşı CAPE yi kullanmış ve karaciğer hasarını azalttığını göstermişlerdir (59). Benzer şekilde CCl₄ ile indüklenen karaciğer hasarının CAPE ile engellenebildiği gösterilmiştir (71). Ayrıca CAPE nöronal hasarlara karşıda başarıyla deneysel olarak kullanılmıştır. 6-Hidroksidopamin ile indüklenen Parkinson hastalığına karşı CAPE Noelker ve ark. tarafından kullanılmış, etkinliği gösterilmiş ve nöroprotektif bir ajan olarak tarif edilmiştir (72).

Laktuloz tedavisinin kan amonyak düzeyini düşürdüğünü ve hayatta kalma oranını da artırdığını gözlemledik. Sadece CAPE tedavisinin karaciğer ALT ve AST enzim düzeylerinde azalmaya yol açtığını, amonyak düzeyini kısmen de olsa kontrole yakınlaştırdığını, ayrıca refleks ve motor hareketlerde kontrole yakın bulgular sağladığını gördük. Buna karşılık sadece laktuloz tedavisinde hayatta kalma oranı %70 iken sadece CAPE tedavisi uygulanan HE' li sıçanlarda bu oran %80 oldu. Görüldüğü gibi sadece amonyak düzeyine yönelik bir tedavi (laktuloz tedavisi) ya da sadece karaciğer ve nöronal oksidanlara karşı yapılan tedavi (CAPE) tedavisi tam olarak %100 yaşam oranı sağlamadılar. Ancak hem laktuloz hem de CAPE uygulanan grupta ölüm olmadı ve sıçanlar kontrole yakın nörolojik puanlama aldılar. Oksidan-antioksidan parametrelerde de kontrole yakın bir düzelme olduğu gözlemlendi.

Pek çok hastalığın patogenezinde serbest radikallerin neden olduğu oksidatif hasarın önemli bir rol oynadığı son yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Parkinson, alzheimer, ateroskleroz gibi hastalıklar buna örnek olarak verilebilir.

Bizim yaptığımız çalışmadan elde ettiğimiz sonuçlar, hepatik yetmezlik sonucu beyin dokusunda lipit peroksidasyonunun arttığını ve antioksidan savunma sisteminin zayıfladığını göstermektedir. Bu da bize beyin dokusunda bir oksidatif stres tablosunun oluştuğunu gösterir. Hepatik yetmezlik sonucu ortaya çıkan hiperamonyum durumunun oksidatif stresin oluşumunda temel neden olduğu düşünülmektedir. Hiperamonyumun, nöronal NMDA reseptörlerinin aşırı biçimde aktive olmasına neden olduğu, bunun da hücre içi kalsiyum düzeyini arttırdığı düşünülmektedir. Artan kalsiyum, mitokondri membran potansiyelinin ve permeabilitesinin değişmesine neden olmaktadır. Sonuç olarak mitokondriyal kaynaklı serbest radikal üretimi artmaktadır. Serbest radikallerin hücrelerde oluşturduğu ilk zararlı etki lipit peroksidasyonudur. Yaptığımız çalışmada, beyin dokusunda, lipit peroksidasyon indeksi olan malondialdehit düzeyinin belirgin bir biçimde arttığı görülmüştür. Propolisin aktif maddesi olan CAPE güçlü antioksidan özelliği sayesinde lipit peroksidasyonunu düşürmüş ve antioksidan savunmayı güçlendirmiştir. CAPE, güçlü bir serbest radikal süpürücüsü olmasının yanında antioksidan enzimleri de etkinleştirerek oksidatif stres tablosunun ortadan kalkmasını sağlamıştır. CAPE kullanılmasıyla hepatik yetmezlik sonucu ortaya çıkan nörolojik değişimlerin önlendiği gözlenmiştir. Hepatik yetmezlik sonucu ortaya çıkan refleks kayıpları CAPE tedavisiyle tekrar normale dönmüştür. Karaciğer fonksiyon enzimleri olan AST ve ALT'nin serumdaki düzeylerinin artması karaciğerde bir hasar meydana geldiğini göstermektedir. CAPE, hepatoprotektif özelliği sayesinde serum AST ve ALT düzeylerini düşürmüş bu da bize tioasetamid ile oluşturulan hepatik hasarın CAPE tedavisi ile azaltılabileceği fikrini vermektedir. CAPE tedavisi uygulanan sıçanlarda serum amonyak düzeyinin belirgin bir biçimde düşmesi bu fikri desteklemektedir. Laktuloz sindirilemeyen bir disakkarittir. İnce bağırsakta pH'yı düşürerek bağırsağın asidifikasyonuna ve böylece bağırsak kapillerlerindeki amonyağın bağırsağa geçerek feçesle vücuttan uzaklaştırılmasını sağlamaktadır. Laktuloz tedavisi uygulanan sıçanların serum amonyak düzeylerinin kontrol grubuna yakın olması laktulozun bu özelliğini doğrulamaktadır. Laktuloz verilen sıçanlarda amonyak toksisitesinin önüne geçilmiştir. Bu sıçanlar kontrol grubuna çok yakın özellikler göstermişlerdir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. CAPE, hepatik ensefalopati sonrası ortaya çıkan nöronal oksidan hasarı önlemiştir. CAPE, serbest radikal süpürücü özelliği sayesinde lipid peroksidasyonunu düşürmüş ve antioksidan enzimlerin aktivitesini arttırmıştır.

2. CAPE, hepatik ensefalopati sonrası refleks kayıpları oluşmasını engellemiştir.

3. CAPE, hepatoprotektif özelliği sayesinde karaciğer hücrelerini nekroza karşı korumuştur.

4. Laktuloz, serum amonyak düzeyini belirgin bir şekilde düşürmüştür.

Karaciğer vücut için hayati önem taşıyan bir organdır. Karaciğerde meydana gelen herhangi bir hasar sonucu oluşan fonksiyon kayıpları çeşitli nörolojik bozuklukları ortaya çıkarmakta ve bu da toplumun büyük bir bölümünü etkilemektedir. Nörolojik bozuklukların ortaya çıkmasından sorumlu olduğu düşünülen amonyak laktuloz kullanılarak vücuttan uzaklaştırılabilir. Karaciğer problemi olan insanlar propolis tüketmek yoluyla nörolojik bozuklukların ortaya çıkmasını engelleyebilirler. Bunu doğrulamak için daha ileri hayvan deneylerine ihtiyaç duyulmaktadır. Yaptığımız çalışmanın ileri hayvan deneylerine ışık tutacağı ve insan sağlığı açısından fayda sağlayacağı kanaatindeyiz.

7. ÖZET

Fulminant hepatik yetmezlik, herhangi bir karaciğer hastalığı olmaksızın hepatositlerde ani bir nekrozun başlaması ve karaciğer dokusunun dejenere olması durumudur. Fulminant hepatik yetmezlik, nörotoksik olduğu düşünülen ve sonunda nöronal ölüme yol açabilen amonyağın kan ve beyinde artışıyla ilişkilidir. Şimdiki çalışmada, tioasetamidle indüklenen fulminant hepatik yetmezlikli sıçan modelinde çalışmalar beyin dokusundaki oksidatif stres üzerinden yürütüldü. Bu çalışmada amacımız tioasetamid ile indüklenen hepatik ensefalopatide (HE), CAPE'nin kan amonyak düzeyi üzerine, davranış testlerine ve beynin korteks, beyin sapı ve serebellum kısımlarından alınan dokulardaki oksidan/antioksidan parametrelere etkisinin incelenmesi amaçlandı. Sıçanlar 6 gruba ayrıldı: kontrol, CAPE, HE, HE+laktuloz, HE+CAPE ve HE+CAPE+laktuloz. Deney ilk tioasetamid uygulanmasının 60. saatinde sonlandırıldı. Çalışmadan elde edilen sonuçlar, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında deneysel hayvanların beyin dokularında lipid peroksidasyonunun arttığını göstermektedir. Üstelik lipid peroksidasyonundaki artış antioksidan savunmanın zayıflaması ile birlikte gerçekleşti. Bunun yanında kan amonyak düzeyi ve plazma AST, ALT enzim düzeyleri arttı. Refleksler zayıfladı. Fakat laktuloz ve CAPE uygulaması bu değişiklikleri önledi.

Anahtar kelimeler: Fulminant karaciğer yetmezliği; hiperamonyum; tioasetamid; oksidatif stres

8. SUMMARY

Fulminant hepatic failure (FHF) is a condition with sudden onset of necrosis of hepatocytes and degeneration of liver tissue without any established liver disease. FHF is associated with increased ammonia levels in blood and brain, which is supposed to be neurotoxic, ultimately leading to neuronal death. In the present investigation, on thioacetamide-induced FHF rat models, studies were undertaken on brain tissues oxidative stress. The aim of the present study was to investigate the effects of CAPE on thioacetamide induced hepatic encephalopathy (HE) via blood ammonia level, behavioral test, and oxidant/antioxidant parameters of different brain regions, cortex, brainstem and cerebellum. The rats were divided into 6 groups: control, CAPE, HE, HE+lactulose, HE+CAPE and HE+CAPE+lactulose. The study was ended at the 60 hour of first thioacetamide injection.

The results of the present study reveal elevated lipid peroxidation in the brain tissues of experimental animals compared to saline treated control rats. Overall, thioacetamide-induced FHF in rats enhanced the levels of lipid peroxidation coupled with impaired antioxidant defenses in the cerebral tissues. Furthermore, blood ammonia level and plasma AST, ALT enzyme levels increased. Reflexes were declined. But administration of lactulose and CAPE prevented these changes.

Keywords: Fulminant hepatic failure; Hyperammonemia; Thioacetamide; Oxidative stress

9. KAYNAKÇA

1. Insausti, A.M., Gaztelu, J.M., Gonzalo, L.M., Vives, M., Barrenechea, C., Felipo, V., Insausti, R.: Diet induced hyperammonemia decreases neuronal nuclear size in rat entorhinal cortex. *Neuroscience Letters* 231, 179-181, 1997.
2. Vogels, B.A.P.M., Steynen, B., Maas, M.A.W., Jörning, G.G.A., Chamuleau, A.F.M.: The effects of ammonia and portal-systemic shunting on brain metabolism, neurotransmission and intracranial hypertension in hyperammonemia-induced encephalopathy. *Journal of Hepatology* 26, 387-395, 1997.
3. Garcia, M.V., Mediavilla, C.L., Juanes, M.C., Medina, J.M.: Antioxidant defence of the neonatal rat brain against acute hyperammonemia. *Brain Research* 1001, 159-163, 2004.
4. Reddy, P.V.B., Murthy, C.R.K., Reddanna, P.: Fulminant hepatic failure induced oxidative stress in nonsynaptic mitochondria of cerebral cortex in rats. *Neuroscience Letters* 368, 15-20, 2004.
5. Ilhan, A., Iraz, M., Gurel, A., Armutcu, F., Akyol, Ö.: Caffeic acid phenethyl ester exerts a neuroprotective effect on CNS against pentylentetrazol-induced seizures in mice. *Neurochemical Research* 29, (12), 2287-2292, 2004.
6. Fadilloğlu, E., Erdogan, H., Iraz, M., Yagmurca, M.: Effects of caffeic acid phenethyl ester against doxorubicin-induced neuronal oxidant injury. *Neuroscience Research Communications* 33, (2), 132-138, 2003.
7. Rama, R.K.V., Norenberg, M.D.: Cerebral Energy Metabolism in Hepatic Encephalopathy and Hyperammonemia. *Metabolic Brain Disease* 16, (1/2), 2001.
8. Norenberg, M.D., Jayakumar, A.R., Rama, R.K.V.: Oxidative Stress in the Pathogenesis of Hepatic Encephalopathy. *Metabolic Brain Disease* 19, (3/4), 2004.
9. Rama, R.K.V., Jayakumar, A.R., Norenberg, M.D.: Role of oxidative stress in the ammonia-induced mitochondrial permeability transition in cultured astrocytes. *Neurochemistry International* 47, 31-38, 2005.
10. Lena, P.J., Subramanian, P.: Evaluation of the antiperoxidative effects of melatonin in ammonium acetate-treated wistar rats. *Polish Journal of Pharmacology* 55, 1031-1036, 2003.
11. Swapna, I., Kumar, S.S., Murthy, C.R.K., Senthilkumaran, B.: Membrane alterations and fluidity changes in cerebral cortex during acute ammonia intoxication. *NeuroToxicology*, 2006.
12. Blei, A.T.: Diagnosis and treatment of hepatic encephalopathy. *Bailliere's Clinical Gastroenterology* 14, (6), 959-974, 2000.
13. Chatauret, N., Butterworth, R.F.: Effect of liver failure on inter-organ trafficking of ammonia: implications for the treatment of hepatic encephalopathy. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 19, 219-223, 2004.
14. Akın, P., Erden, B.: Hepatik Ensefalopati. İ.Ü. *Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri: Hepato-Biliyer Sistem ve Pankreas Hastalıkları Sempozyum Dizisi* 28, 111-120, 2002.
15. Butterworth, R.F.: Hepatic Encephalopathy-A Serious Complication of Alcoholic Liver Disease. *Alcohol Research & Health* 27, (2), 143-145, 2003.
16. Gunning, K.E.J.: Acute Liver Failure. *The Medicine Publishing Company Ltd*, 112-113, 2003.

17. Butterworth, R.F.: Glutamate transporter and receptor function in disorders of ammonia metabolism. *Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Reviews* 7, 276-279, 2001.
18. Felipo, V., Butterworth, R.F.: Neurobiology of ammonia. *Progress in Neurobiology* 67, 259-279, 2002.
19. Butterworth, R.F.: Hepatic Encephalopathy. *Alcohol Research & Health* 27, (3), 240-246, 2003.
20. Bruck, R., Aeed, H., Shirin, H., Matas, Z., Zaidel, L., Avni, Y., Halpern, Z.: The hydroxyl radical scavengers dimethylsulfoxide and dimethylthiourea protect rats against thioacetamide-induced fulminant hepatic failure. *Journal of Hepatology* 31, 27-38, 1999.
21. Quevedo, J., Amaral O.B., Walz, R., Kapczinski, F.: Pathogenesis of hepatic encephalopathy-A role for the benzodiazepine receptor?. *Medicina, Riberiario Preto* 32, 82-86, 1999.
22. Lee, W.J., Hawkins, R.A., Vina, J.R., Peterson, D.R.: Glutamine transport by the blood-brain barrier: a possible mechanism for nitrogen removal. *The American Physiological Society* 98, 1101-1107, 1998.
23. Tunez, I., Munoz, M.C., Villavicencio, M.A., Medina, F.J., Prado, E.P., Espejo, I., Barcos, Montserrat., Salcedo, M., Feijoo, M., Montilla, P.: Hepato and neurotoxicity induced by thioacetamide: Protective effects of melatonin and dimethylsulfoxide. *Pharmacological Research* 52, 223-228, 2005.
24. Leite, M.C., Brolese, G., Almeida, L.M.V., Pinero, C.C., Gottfried, C., Gonçalves C.A.: Ammonia-induced alteration in S100B secretion in astrocytes is not reverted by creatine addition. *Brain Research Bulletin* 70, 179-185, 2006.
25. Chepkova, A.N., Sergeeva, O.A., Haas, H.L.: Taurine rescues hippocampal long-term potentiation from ammonia-induced impairment. *Neurobiology of Disease*, 2006.
26. Ahboucha, S., Coyne, L., Hirakawa, R., Butterworth, R.F., Halliwell, R.F.: An interaction between benzodiazepines and neuroactive steroids at GABA_A receptors in cultured hippocampal neurons. *Neurochemistry International* 48, 703-707, 2006.
27. Bodega, G., Suarez, I., Fernandez, L.A.L., Almonacid, L., Zaballos, A., Fernandez, B.: Possible implication of ciliary neurotrophic factor (CNTF) and β -synuclein in the ammonia effect on cultured rat astroglial cells: A study using DNA and protein microarrays. *Neurochemistry International* 48, 729-738, 2006.
28. Görg, B., Bidmon, H.J., Keitel, V., Foster, N., Goerlich, R., Schliess, F., Haussinger, D.: Inflammatory cytokines induce protein tyrosine nitration in rat astrocytes. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 449, 104-114, 2006.
29. Sanchez, A.M., Felipo, V.: Chronic exposure to ammonia alters basal and NMDA-induced phosphorylation of NMDA receptor-subunit NR1. *Neuroscience*, 2006.
30. Belanger, M., Cote, J., Butterworth, R.F.: Neurobiological characterization of an azoxymethane mouse model of acute liver failure. *Neurochemistry International* 48, 434-440, 2006.
31. Erceg, S., Monfort, P., Cauli, O., Montoliu, C., Llansola, M., Piedrafita, B., Felipo, V.: Role of extracellular cGMP and of hyperammonemia in the impairment of learning in rats with chronic hepatic failure: Therapeutic implications. *Neurochemistry International* 48, 441-446, 2006.
32. Izumi, Y., Izumi, M., Matsukawa, M., Funatsu, M., Zorumski, C.H.: Ammonia-mediated LTP inhibition: Effect of NMDA receptor antagonists and L-carnitine. *Neurobiology of Disease* 20, 615-624, 2005.

33. Avraham, Y., Israeli, E., Gabbay, E., Okun, A., Zolotarev, O., Silberman, I., Ganzburg, V., Dagon, Y., Magen, I., Vorobia, L., Pappo, O., Mechoulam, R., Ilan, Y., Berry, E.M.: Endocannabinoids affect neurological and cognitive function in thioacetamide-induced hepatic encephalopathy in mice. *Neurobiology of Disease* 21, 237-245, 2006.
34. Swapna, I., Kumar, K.V.S.S., Reddy, P.V.B., Murthy, C.R.K., Reddanna, P., Senthilkumaran, B.: Phospholipid and cholesterol alterations accompany structural disarray in myelin membrane of rats with hepatic encephalopathy induced by thioacetamide. *Neurochemistry International*, 2006.
35. Platt, S.R.: The role of glutamate in central nervous system health and disease - A review. *The Veterinary Journal*, 2005.
36. Zwingmann, C., Butterworth, R.: An update on the role of brain glutamine synthesis and its relation to cell-specific energy metabolism in the hyperammonemic brain: Further studies using NMR spectroscopy. *Neurochemistry International* 47, 19-30, 2005.
37. Hazell, A.S., Butterworth, R.F.: Hepatic encephalopathy: An update of pathophysiologic mechanism. *P.S.E.B.M.* 222, 1999.
38. Haussinger, D., Schliess, F.: Astrocyte swelling and protein tyrosine nitration in hepatic encephalopathy. *Neurochemistry International* 47, 64-70, 2005.
39. Suarez, I., Bodega, G., Rubio, M., Felipo, V., Fernandez, B.: Neuronal and inducible nitric oxide synthase expression in the rat cerebellum following portacaval anastomosis. *Brain Research* 1047, 205-213, 2005.
40. Rodrigo, R., Erceg, S., Felipo, V.: Neurons exposed to ammonia reproduce the differential alteration in nitric oxide modulation of guanylate cyclase in the cerebellum and cortex of patients with liver cirrhosis. *Neurobiology of Disease* 19, 150-161, 2005.
41. Shawcross, D.L., Balata, S., Damink, S.W.M.O., Hayes, P.C., Wardlaw, J., Marshall, I., Deutz, N.E.P., Williams, R., Jalan, R.: Low myo-inositol and high glutamine levels in brain are associated with neuropsychological deterioration after induced hyperammonemia. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 287, 503-509, 2004.
42. Blei, A.T.: The pathophysiology of brain edema in acute liver failure. *Neurochemistry International* 47, 71-77, 2005.
43. Katayama, K.: Ammonia metabolism and hepatic encephalopathy. *Hepatology Research* 30, 71-78, 2004.
44. Gomez, M., Guerrero, R., Grande, L., Teran, L.C., Corpas, R., Camacho, I., Bautista J.D.: Intestinal glutaminase activity is increased in liver cirrhosis and correlates with minimal hepatic encephalopathy. *Journal of Hepatology* 41, 49-54, 2004.
45. Lozeva, V., Montgomery, J.A., Tuomisto, L., Rocheleau, B., Pannunzio, M., Huet, P., Butterworth, R.F.: Increased brain serotonin turnover correlates with the degree of shunting and hyperammonemia in rats following variable portal vein stenosis. *Journal of Hepatology* 40, 742-748, 2004.
46. Hernandez, R., Lara, E., Moral, M.L.D., Blanco, S., Canuelo, A., Siles, E., Esteban, F.J., Pedrosa, J.A., Peinado, M.A.: Upregulation of endothelial nitric oxide synthase maintains nitric oxide production in the cerebellum of thioacetamide cirrhotic rats. *Neuroscience* 126, 879-887, 2004.
47. Kosenko, E., Llansola, M., Montoliu, C., Monfort, P., Rodrigo, R., Viadel, M., Erceg, S., Perez, A.M., Felipo, V.: Glutamine synthetase activity and glutamine content

in brain: modulation by NMDA receptors and nitric oxide. *Neurochemistry International* 43, 493-499, 2003.

48. Jalan, R., Shawcross, D., Davies, N.: The molecular pathogenesis of hepatic encephalopathy. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 35, 1175-1181, 2003.

49. Chan, H., Zwingmann, C., Pannunzio, M., Butterworth, R.F.: Effect of ammonia on high affinity glutamate uptake and glutamate transporter EAAT3 expression in cultured rat cerebellar granule cells. *Neurochemistry International* 43, 137-146, 2003.

50. Monfort, P., Kosenko, E., Erceg, S., Canales, J., Felipo, V.: Molecular mechanism of acute ammonia toxicity: role of NMDA receptors. *Neurochemistry International* 41, 95-102, 2002.

51. Corbalan, R., Viadel, M.H., Llansola, M., Montoliu, C., Felipo, V.: Chronic hyperammonemia alters protein phosphorylation and glutamate receptor-associated signal transduction in brain. *Neurochemistry International* 41, 103-108, 2002.

52. Kosenko, E., Kaminski, Y., Lopata, O., Muravyov, N., Felipo, V.: Blocking NMDA receptors prevents the oxidative stress induced by acute ammonia intoxication. *Free Radical Biology & Medicine* 26, (11/12), 1369-1374, 1999.

53. Kosenko, E., Venediktova, N., Kaminsky, Y., Montoliu, C., Felipo, V.: Sources of oxygen radicals in brain in acute ammonia intoxication in vivo. *Brain Research* 981, 193-200, 2003.

54. Pekmez, H., Kus, I., Colakoglu, N., Ogeturk, M., Ozyurt, H., Turkoglu, A.O., Sarsilmaz, M.: The protective effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) against liver damage induced by cigarette smoke inhalation in rats. *Cell Biochemistry and Function* (in pres).

55. Iraz, M., Ozerol, E., Gulec, M., Tasdemir, S., Idiz, N., Fadilloglu, E., Naziroglu, M., Akyol, O.: Protective effect of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) administration on cisplatin-induced oxidative damage to liver in rat. *Cell Biochemistry and Function* 24, 357-361, 2006.

56. Ma, Z., Wei, X., Fortanilla, C., Noelker, C., Dodel, R., Hampel, H., Du, Y.: Caffeic acid phenethyl ester blocks free radical generation and 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity. *Life Sciences*, 2006.

57. Ince, H., Kandemir, E., Bagci, C., Gulec, M., Akyol, O.: The effect of caffeic acid phenethyl ester on short-term acute myocardial ischemia. *Med Sci Monit* 12, (5), 187-193, 2006.

58. Aladag, M.A., Turkoz, Y., Ozcan, C., Sahna, E., Parlakpınar, H., Akpolat, N., Cigremis, Y.: Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) attenuates cerebral vasospasm after experimental subarachnoidal haemorrhage by increasing brain nitric oxide levels. *Int. J. Devl. Neuroscience* 24, 9-14, 2006.

59. Ates, B., Dogru, M.I., Gul, M., Erdogan, A., Dogru, A.K., Yilmaz, I., Yurekli, M., Esrefoglu, M.: Protective role of caffeic acid phenethyl ester in the liver of rats exposed to cold stress. *Fundamental & Clinical Pharmacology* 20, 283-289, 2006.

60. Norton, N.S., McConnell, J.R., Rodriguez-Sierra, J.F.: Behavioral and physiological sex differences observed in an animal model of fulminant hepatic encephalopathy in the rat. *Physiol Behav.* 62, (5), 1113-1124, 1997.

61. Aebi, H.: Catalase. In: Bergmeyer HU, editor. *Methods of Enzymatic Analysis*. New York and London: Academic Press. 673-677, 1974.

62. Sun, Y., Oberley, L.W., Ying, L.A.: Simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem* 34, 497-500, 1988.

- 63.** Paglia, D.E., Valentine, W.N.: Studies on the quantitative and qualitative characterisation of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 70, 158-169, 1967.
- 64.** Esterbauer, H., Cheeseman, K.H.: Determination of aldehydic lipid peroxidation products: Malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. In: Packer, L., Glazer, A.N., editors. *Methods in Enzymology, Oxygen radicals in biological systems* 186. California: Academic Press, 407-421, 1990.
- 65.** Lowry, O., Rosenbraugh, N., Farr, L., Rondall, R.: Protein measurement with the folin-phenol reagent. *J Biol Chem* 183, 265-275, 1951.
- 66.** Searle, P.L.: The Berthelot or indophenol reaction and its use in the analytical chemistry of nitrogen-a review. *Analyst* 109, 549-568, 1984.
- 67.** Marcaida, G., Felipo, V., Hermenegildo, C., Minana, M.D., Grisolia, S.: Acute ammonia toxicity is mediated by the NMDA type of glutamate receptors, *FEBS Lett.* 296, 67-68, 1992.
- 68.** Hermenegildo, C., Marcaida, G., Montoliu, C., Grisolia, S., Minana, M.D., Felipo, V.: NMDA receptor antagonists prevent acute ammonia toxicity in mice, *Neurochem. Res.* 21, 1237-1244, 1996.
- 69.** Avni, Y., Shirin, H., Aeed, H., Shahmurov, M., Birkenfeld, S., Bruck, R.: Thioacetamide-induced hepatic damage in a rat nutritional model of steatohepatitis. *Hepatol Res.* 30, (3), 141-147, 2004.
- 70.** Bruck, R., Aeed, H., Shirin, H., Matas, Z., Zaidel, L., Avni, Y., Halpern, Z.: The hydroxyl radical scavengers dimethylsulfoxide and dimethylthiourea protect rats against thioacetamide-induced fulminant hepatic failure. *J Hepatol.* 31, (1), 27-38, 1999.
- 71.** Kus, I., Colakoglu, N., Pekmez, H., Seckin, D., Ogeturk, M., Sarsilmaz, M.: Protective effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats. *Acta Histochem.* 106, (4), 289-297, 2004.
- 72.** Noelker, C., Bacher, M., Gocke, P., Wei, X., Klockgether, T., Du, Y., Dodel, R.: The flavanoid caffeic acid phenethyl ester blocks 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity. *Neurosci Lett.* 383, (1-2), 22-29, 39-43, 2005.

10. ÖZGEÇMİŞ

1979 yılında Malatya’da doğdum. İlk ve orta öğrenimimi Malatya’da tamamladım. 2002 yılında İnönü Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünden mezun oldum. 2003 yılı bahar döneminde aynı Üniversitenin Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji Anabilimdalında yüksek lisans öğrenimine başladım. Halen aynı enstitüde yüksek lisans öğrenimime devam etmekteyim. Bekarım.