T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
GASTROENTEROLOJİ BİLİM DALI

DENEYSEL AKUT KARACİĞER YETERSİZLİĞİNDE BEYİN GLUTAMAT DÜZEYLERİ VE L-ORNİTİN L-ASPARTAT TEDAVİSİNİN ETKİNLİĞİNİN İN VİVO VOLTAMETRİ YÖNTEMİ İLE ARAŞTIRILMASI

Uzm.Dr.Fatih Albayrak

Tez Yöneticisi
Prof.Dr.Nihat OKÇU

Yan Dal Uzmanlık Tezi
ERZURUM 2011

İÇİNDEKİLER

İçindekiler iii

Onay v

Özet vi

Summary viii

1. Giriş ve amaç 1

2. Genel bilgiler 3

2. 1. Akut karaciğer yetmezliği 3

2. 1. 1. Tanım-Sınıflandırma 3

2. 1. 2. Etiyoloji 4

2. 2. Akut hepatik ensefalopati 4

2. 2. 1. Nöropatoloji 6

2. 2. 2. Patofizyoloji 7

2. 2. 3. Amonyak 7

2. 3. Serebral ödem ve ilişkili durumlar 12

2. 3. 1. Serebral ödem 12

2. 3. 2. Vazojenik ve sitotoksik mekanizmalar 13

2. 3. 3. Sitokinler ve inflamatuar faktörler 13

2. 3. 4. Serebral kan akışı 14

2. 3. 5. Glutamin 14

2. 3. 6. Glutamat 14

2. 3. 7. Nitrik oksit 17

2. 3. 8. Diğer mekanizmalar: Na^+/K^+ pompası, Benzodiazepinler, GABA ve Nörosteroidler 17

2. 4. Laboratuar 18

2. 5. Akut karaciğer yetmezliğinde spesifik tedaviler 18

2. 5. 1. N-Asetil sistein (NAS) 18

2. 5. 2. Penisilin ve Silibinin 19

2. 5. 3. Nükleozid analogları ve asiklovir 19

2. 5. 4. Plazmaferez ve D-penisilamin 19

2. 5. 5. Nörotransmitterler 19

2. 5. 6. L-ornithine–L-aspartate (LOLA) 19

2. 5. 7. Suni Karaciğer Desteği 20

2. 5. 8. Karaciğer Transplantasyonu 21

2. 6. Deney hayvanlarında akut karaciğer yetersizliği modelleri 21

2. 6. 1. Tiyoasetamid (TAA) 21

İÇİNDEKİLER

2. 7. Lokomotor aktivite değerlendirilmesi 21
2. 8. Voltametri 22
2. 9. Primer antioksidanlar (enzimler) 25
2. 9. 1. Süperoksit dismutaz (SOD) 25
2. 9. 2. Glutatyon peroksidaz (GPx) 25
2. 9. 3. Glutatyon s-transferaz (GST) 25
2. 9. 4. Glutatyon redüktaz (GR) 25
2. 9. 5. Miyeloperoksidaz (MPO) 25
2. 9. 6. Glutatyon (GSH) 26
3. Gereç ve yöntem 27
3. 1. Lokomotor aktivite değerlendirilmesi 27
3. 2. Mikroelektrot hazırlama 28
3. 2. 1. Mikroelektrotların temizlenmesi 28
3. 2. 2. Nafion kaplama 28
3. 2. 3. L-Glutamat oksidaz kaplama 28
3. 2. 4. Kalibrasyon 28
3. 2. 5. Lokal ilaç vermek için cam mikropipetler 29
3. 2. 6. Ag/AgCl Referans elektrodu 29
3. 2. 7. Voltametri mikroelektrodunun yerleştirilmesi 30
3. 2. 8. Sinyal analizi 30
3. 3. Kan AST, ALT, Amonyak, T.Bil. INR seviyelerinin ölçülmesi 31
3. 4. Karaciğer ve Beyin Dokusunun Biyokimyasal İncelenmesi 31
3. 4. 1. Doku Homojenatlarının Hazırlanması 32
3. 4. 2. Süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesinin ölçümü 32
3. 4. 3. Glutatyon *s*-transferaz (GST) aktivitesinin ölçümü 32
3. 4. 4. Miyeloperoksidaz (MPO) aktivitesinin ölçümü 32
3. 4. 5. Lipid peroksidasyon (LPO) miktarı ölçümü 33
3. 5. Histopatoloji 33
3. 6. İstatistiksel Analizler 33
4. Bulgular 34
5. Tartışma 43
6. Sonuç ve öneriler 54
7. Kaynaklar 57

ONAY

" Deneysel akut karaciğer yetersizliğinde beyin glutamat düzeyleri ve l-ornitin l-aspartat tedavisinin etkinliğinin in vivo voltametri yöntemi ile araştırılması" adlı çalışma İç Hastalıkları Anabilim Dalı'nın 13.01.2009 tarih, 01 nolu oturumun, 03 nolu kararı, Dahili Tıp Bilimleri Bölüm Başkanlığı'nın 21.06.2010 tarih, 3 sayılı oturumu ve 13 nolu kararı sonrası Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunun 27.08.2010 tarih, 08 sayılı sayılı etik kurul oturumunda değerlendirilmiş olup, kurulun 29 no.lu kararı ile Etik Kurallara uygun olduğu onaylanmış ve tez çalışması olarak kabul edilmiştir.

ÖZET

DENEYSEL AKUT KARACİĞER YETERSİZLİĞİNDE BEYİN GLUTAMAT DÜZEYLERİ VE L-ORNİTİN L-ASPARTAT TEDAVİSİNİN ETKİNLİĞİNİN İN VİVO VOLTAMETRİ YÖNTEMİ İLE ARAŞTIRILMASI

Akut karaciğer yetmezliği (AKY), daha önceden kronik karaciğer hastalığı olmayan bir kişide, karaciğer fonksiyonlarının ani bozulması, olup buna bağlı olarak nöropsikiyatrik bir sendrom olan hepatik ensefalopatinin (HE) gelişmesidir. AKY'nde HE patogenezinde glutamatın rolü tam olarak bilinmemektedir. L-ornitin L-aspartat (LOLA)'ın kan amonyak düzeyini azalttığı bilinmekle birlikte, LOLA tedavisinin beyin glutamat kinetiğine etkisi bilinmemektedir. Bu çalışmada sıçan beyninde in vivo glutamat düzeyleri ve LOLA tedavisinin beyin glutamat kinetiğine etkisi araştırıldı.

Çalışmamız; kontrol grubu, LOLA verilen grup, tiyoasetamid (TAA) verilerek AKY gelişen grup ve TAA+LOLA verilen tedavi gruplarındaki toplam 16 sıçan ile gerçekleştirildi. Çalışma sonunda lokomotor aktiviteleri ölçüldükten sonra sıçan beyinlerine mikroelektrod yerleştirilerek glutamat konsantrasyonu ve kinetiği ölçüldü. Daha sonra biyokimyasal ve histopatolojik inceleme için kan ve dokular alınarak sakrifiye edildi.

Kontrol grubunun stereotipik hareket sayısı ve vertikal hareket sayısı TAA ve TAA+LOLA grubundan fazla idi ($p<0.05$). Kontrol grubunun gittiği (yürüdüğü) mesafe TAA grubundan belirgin olarak fazla bulundu($p=0.001$). Ayrıca TAA+LOLA grubundan da daha fazla mesafe aldıkları gözlendi ($p<0.05$). Kontrol grubunun deney sırasında hareket etmeksizin geçirdiği süre, TAA grubundan belirgin derecede az olarak gözlendi ($p<0.001$). Kontrol grubunun glutamatın % 80'ini geri alma süresi, TAA grubundan belirgin olarak daha kısa bulundu ($p<0.001$). LOLA+ TAA grubunun da glutamatın % 80'ini geri alma süresi TAA grubundan belirgin olarak daha kısa idi ($p<0.001$). Kontrol grubunda glutamatın maksimum amplituda geliş süresi, TAA grubundan belirgin olarak daha kısa gözlendi ($p<0.001$). LOLA+ TAA grubunda da glutamatın maksimum amplituda geliş süresi, TAA grubundan belirgin olarak daha kısa idi ($p<0.001$). Beyin dokusundaki glutamatın amplitudunda, TAA grubu ile hem kontrol grubu hem de TAA+LOLA grubu arasında belirgin farklılık mevcuttu ($p<0.001$).

Bu çalışma sonucunda, TAA grubundaki sıçanların beyin glutamat konsantrasyonları, maksimum amplituda çıkış süreleri ve geri alım süreleri TAA+LOLA ve kontrol grubundan daha yüksek olarak bulundu. TAA+LOLA grubunun, beyin ve karaciğer dokularının TAA grubuna göre daha iyi korunduğu ve antioksidan düzeylerinin kontrol grubuna yakın olduğu gözlendi. Bu bulgulardan hareketle, LOLA'ın AKY'nde kısa dönem

için, beyin dokusunu koruyabileceği ve bu nedenle karaciğer transplantasyonu yapılana kadar veya AKY'ne sebep olan nedenin ortadan kaldırılana kadar diğer tedavilere yardımcı olarak zaman kazandırabilecek köprü tedavisi şeklinde kullanılabileceğini düşünülebilir.

Anahtar kelimeler: Akut karaciğer yetmezliği; hepatik ensefalopati; L-ornitin L-aspartat; glutamat; lokomotor aktivite; voltametri

SUMMARY

GLUTAMATE LEVELS OF BRAIN AND TREATMENT EFFICIENCY OF L-ORNITHINE L-ASPARTATE BY IN VIVO VOLTAMETRIC MEASURES ON EXPERIMENTAL ACUTE LIVER FAILURE

Acute Liver Failure (ALF) is the sudden deterioration of liver functions in a person with no prior history of chronic liver disease. It may lead to hepatic encephalophathy (HE), which is a neuropsychiatric disorder. A role for glutamate in the pathogenesis of HE in ALF is suspected. Although L-ornithine L-aspartate (LOLA) is known to lower blood ammonia levels, the effects of LOLA treatment on the brain glutamate kinetics have not yet been established. In this study, we aimed to investigate in vivo glutamate levels in rat brains and to determine the effects of LOLA treatment on brain glutamate kinetics.

A total of 16 rats comprised a control group, the group receiving LOLA, the group given thioacetamide (TAA) and subsequently developing ALF, and the cure group receiving TAA + LOLA. At the conclusion of the study, after measuring locomotor activities, microelectrodes were placed in the rat brains to measure glutamate concentrations and kinetics. The rats were subsequently sacrificed and blood and tissue samples were taken for biochemical and histopathological examination.

A higher number of stereotypical and vertical movements were observed in the control group than in the TAA and TAA+LOLA groups ($p<0.05$). The distance covered (walked) was significantly greater in the control group than in the TAA group ($p=0.001$). The control animals also covered a greater distance than the TAA+LOLA group ($p<0.05$). The time spent motionless during the experiment was significantly less in the control group than in the TAA group ($p<0.001$). The time taken to regain 80% of the glutamate was considerably shorter in the control group than in the TAA group ($p<0.001$). The time taken by the LOLA+ TAA group to regain 80% of the glutamate was also significantly shorter than that taken by the TAA group ($p<0.001$). Glutamate reached a maximum amplitude in a shorter time for the control group than for the TAA group ($p<0.001$). The maximum amplitude was also reached in a shorter time for the LOLA+TAA group compared to the TAA group ($p<0.001$). The glutamate amplitude in brain tissue was significantly different between the TAA group and both the control and TAA+LOLA groups ($p<0.001$).

In summary, the brain glutamate concentrations, the time taken to reach maximum amplitude, and the time required to regain glutamate levels were all higher in TAA-treated rats than in the TAA+LOLA or the control groups. The brain and liver tissues were better preserved in the TAA+LOLA group than in the TAA group, and the antioxidant levels of the TAA+LOLA group were close to those of the control group. We are of the opinion that LOLA can protect brain tissue in the short term during ALF, and could therefore be used as a

bridging treatment. Its use would provide additional time, thereby assisting other treatments until a liver transplant is carried out or until the reason for the ALF is eliminated.

Key words: Acute Liver Failure; hepatic encephalophathy; L-ornithine L-aspartate; glutamate; locomotor activity; voltametry

1.GİRİŞ VE AMAÇ:

Akut karaciğer yetmezliği (AKY), daha önceden kronik karaciğer hastalığı olmayan bir kişide, karaciğer fonksiyonlarının ani bozulması olarak tanımlanır. AKY, klinik olarak koagulasyon bozuklukları ile ortaya çıkan ve çeşitli derecelerde mental değişikliklere yol açan hepatik ensefalopatiyle seyreden ciddi karaciğer yetersizliği ile karakterizedir (1). AKY ilaçlar, toksinler, viral hepatitler, kardiyovasküler nedenler, metabolik ve infiltratif nedenler ile muhtelif nedenler sonucunda ortaya çıkar (2).

Hepatik ensefalopati (HE), psikomotor, entellektüel, kognitiv, emosyonel/affektiv, davranışsal ve ince motor hareketlerde değişik derecelerde bozuklukların olduğu kronik ve akut karaciğer hastalıklarının sık izlenen bir nöropsikiyatrik görüntüsüdür (3,4). AKY'nde serebral ödeme bağlı olarak nörolojik değişikler hızlı gelişir (2). AKY olan hastalardaki bazı ölümlerin, arteriyel amonyak konsantrasyonunda artış ile ilişkili beyin ödemi, intrakraniyal basınç artışı ve beyin sapı herniasyonu gibi nörolojik komplikasyonlar sonucu meydana geldiği klinik ve deneysel çalışmalarda gösterilmiştir (5-12). HE'nin patogenezi ile ilgili birçok hipotez ileri sürülmüş olmasına rağmen hala tam olarak açıklanamamıştır. Hepato-serebral disfonksiyonun genellikle normalde bulunması gereken veya koruyucu özelliği olan maddelerin eksikliğinden değil, anormal veya toksik maddelerin organizmada birikmesi ile meydana geldiğine inanılır (2). Bu konuda en fazla suçlanan madde amonyakdır (2,13). Endojen benzodiazepinlerin, g-amino butirik asit (GABA)-erjik nörotransmisyonla etkileşimi de etiyolojide düşünülen nedenlerdendir. Ayrıca AKY'nde GABA, glutamat ve nitrik oksit gibi birçok nörotransmitter ve nöromodülatörlerde de değişiklikler vardır (2,13).

Serebral ödem ve intrakraniyal hipertansiyon AKY'li hastaların % 80'inden fazlasında gözükür (2,14). Nekrotik karaciğer hücrelerinden açığa çıkan toksik maddelerin ödem oluşumunda rol oynadığı konusunda kuvvetli şüpheler mevcuttur. Glutamin serebral ödemin gelişmesinde önemli rolü olan organik ozmolitlerdendir (2).

L-Glutamat amino asiti santral sinir sisteminde önemli bir eksitatör nörotransmitterdir (15,16). Glutamatın santral sinir sisteminin gelişmesi, sinapsların tetiklenmesi ve eliminasyonu, hücre göçü, diferansiasyonu ile ölümü üzerine önemli rolü vardır (15). Nöron hücre korpusu, dendritler, sinir uçları ve glial hücrelerin plazma membranlarında glutamat reseptörleri vardır (15,17-19). Deneysel birçok farklı AKY modelinde ekstraselüler beyin glutamat konsantrasyonunun arttığı gösterilmiştir (20-24). Ancak bu çalışmalarda yapılan ölçümlerin birçok eksik yönü bulunmaktadır. Çalışmamızda beyin glutamat düzeyi ve kinetik fizyolojisinin araştırarak, HE patogenezinin daha iyi anlaşılmasını amaçladık.

Amonyak metabolizmasındaki organlar arası değişiklikler HE'de önemli rol oynar Amonyak, barsaklardan alınan glutaminin, glutaminaz ile glutamat ve amonyağa çevrilmesiyle yapılır (25,26). Amonyak normal karaciğerin periportal hepatositlerinde üreye, perivenöz hepatositlerde glutamine dönüştürülür. Ancak karaciğer hastalığı veya porto-

sistemik şant olduğunda amonyak toksik seviyeler ulaşır. Normal bireylerde, amonyağın % 50'si iskelet kaslarında metabolize edilir (25). L-Ornitin, L-Aspartat (LOLA), vücudun fazla amonyağı yok etmek için kullandığı iki önemli sistem olan üregenesis ve glutamin sentezi için kritik öneme sahip substratlardır. L-ornitin karaciğerde üre siklusu ile amonyaktan üre yapımı için gerekli olan temel amino asittir (27). LOLA, kronik karaciğer yetmezliğine bağlı HE tedavisinde uzun yıllardır kullanılan bir amino asit olmasına rağmen, AKY'ne bağlı HE'deki etkinliği ve beyin glutamat düzeyine etkisi yeterince bilinmemektedir.

Bu çalışmadaki amaçlarımız: AKY patogenezinin daha iyi anlaşılmasıve deneysel AKY'nde LOLA tedavisinin etkisini ortaya koymaktır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1.Akut karaciğer yetmezliği:

2.1.1.Tanım-Sınıflandırma:

Akut karaciğer yetmezliği (AKY), daha önceden kronik karaciğer hastalığı olmayan bir kişide, karaciğer fonksiyonlarının ani bozulması olarak tanımlanır. AKY, klinik olarak koagulasyon bozuklukları ile ortaya çıkan (International Normalisation Ratio (INR) ≥ 1.5) ve çeşitli derecelerde mental değişikliklere yol açan hepatik ensefalopatiyle seyreden ciddi karaciğer yetersizliği ile karakterizedir (1).

Trey ve Davidson'un 1970 de Fulminant karaciğer yetersizliğini (FKY) ilk kez sınıflandırmalarının ardından, AKY veya FKY'nin tanımı ve sınıflandırılması ile ilgili değişik tanımlamalar yapıldı (28). Bernuau ve ark. 1986 yılında FKY'ni, sarılık ortaya çıktıktan sonra 2 hafta içinde ensefalopati gelişen AKY olarak tanımladılar (29). 2-12 hafta içinde sarılık çıkan grup ise subfulminant karaciğer yetersizliği olarak sınıflandırıldı (29). Daha sonra O'Grady ve ark. yeni bir terminoloji önerdiler (30,31). O'Grady ve ark.'na göre AKY'nde başlangıç semptomlarından, ensefalopati gelişmesine kadar geçen süreye bağlı olarak serebral ödem gelişme oranları ve karaciğer transplantasyonu yapılmaksızın survey oranları değişmekte olduğu için, bu sürelere göre AKY, hiperakut, akut ve subakut olarak kategorize edilmektedir (30,31). Sarılık ortaya çıktıktan sonraki 7 gün içinde ensefalopati meydana gelirse "hiperakut karaciğer yetersizliği", 7 ila 28 gün arasında çıkarsa "akut karaciğer yetersizliği", 5 ila 12 hafta arasında ortaya çıkarsa "subakut karaciğer yetersizliği"nden bahsedilir (30,31). Hiperakut karaciğer yetersizliği, yüksek oranda kalp ve böbrek yetmezliği, ileri evre ensefalopati ve ileri beyin ödemi gibi komplikasyonların en fazla olduğu durumdur (32). Ancak karaciğer transplantasyonu yapılmadan, en fazla spontan yaşama şansı olan karaciğer yetersizliği grubudur. Hastaların % 69'unda serebral ödem gelişmekte ve hastaların % 36'sı transplantasyonsuz yaşayabilmektedirler. Parasetamol intoksikasyonlarının tamamı ile Hepatit A ve B vakalarının bir kısmı bu tür karaciğer yetersizliğine sebep olmaktadır (31). Akut karaciğer yetersizliği tablosunda da serebral ödem oranı hiperakuta yakın oranda olmasına rağmen (% 56), karaciğer transplantasyonu yapılmaksızın spontan yaşam şansları azdır (% 7). Vakaların yaklaşık yarısında etiyoloji bilinememektedir. Subakut karaciğer yetersizliğinde, serebral ödem hastaların yalnızca % 14'ünde görülürken, yaşam şansları azdır (%14) (31). Bu gruptaki hastaların çoğunda (% 86) etiyoloji anlaşılamamıştır (31). Daha önceden asemptomatik kronik karaciğer hastalığı olan kişiler de bu yeni sınıflamaya dahil edilmiştir (31). Bernuau ve Benhamou, O'Grady ve ark. önerdiği sınıflamanın kendi serilerine uymadığını, hiperakut ve akut karaciğer yetersizliğinin mortalite oranlarının eşit olduğunu bildirmişlerdir. Bu durumun, etiyolojik nedenler arasındaki farklılığa bağlı olabileceğini bildirmişler ve hastanın prognozunu belirlemede sarılığın ortaya çıkmasından sonra ensefalopatinin meydana gelişi arasındaki sürenin değil, hastanın yaşının,

etiyolojik nedenin, protrombin zamanındaki uzamanın veya faktör V düzeyinin etkili olabileceğini bildirmişlerdir (33).

2.1.2.Etiyoloji:

İlaçlar, toksinler, viral hepatitler, kardiyovasküler nedenler, metabolik ve infiltratif nedenler ile muhtelif nedenlerden oluşan gruplar AKY'nin asıl ana sebepleridir (2). Amerika Birleşik Devletlerinde 1998-2001 yılları arasında AKY'nin % 39'una asetaminofen toksikasyonunun, % 17'sine belirlenemeyen sebeplerin, % 13'üne idiyosenkrazik olayların ve % 12'sine ise hepatit B ve C'nin sebep olduğu bildirilmiştir (34). AKY'li hastaların % 60-80'inde etiyolojik neden tespit edilebilmektedir. Alta yatan nedenin tespiti, tedavi şeklini ve prognozu direkt etkilemektedir (35).

2.2.Akut hepatik ensefalopati:

Hepatik ensefalopati (HE) ilk olarak 1890'larda Nencki, Pavlov ve Zaleski tarafından porto-kaval şant (Eck fistülü) yapılmış köpeklerde tanımlanmış ve ortaya çıkan bu serebral hastalığın amonyağın karaciğerde üreye çevrilememesine bağlı olabileceği ifade edilmiştir (36). HE hakkındaki bu ilk çalışmalardan yaklaşık 60 yıl sonra, Gabuzda ve ark. sirozlu hastalara katyon değiştirici reçine verilmesi sonucu, sodyumun absorbe edilmesine karşın amonyak açığa çıkmasına bağlı olarak epizodik HE geliştiğini rapor etmişlerdir (36).

HE, psikomotor, entellektüel, kognitiv, emosyonel/affektiv, davranışsal ve ince motor hareketlerde değişik derecelerde bozuklukların olduğu kronik ve akut karaciğer hastalıklarının sık izlenen bir nöropsikiyatrik tablodur (3). HE'lerin değişik karaciğer hastalıklarında, değişik seyir ve özelliklerle ortaya çıkmasından dolayı, 1998'de Viyana'da toplanan 11. Dünya Gastroenteroloji Kongresi'nde konuyla ilgili bir çalışma grubu (Working Party of the 11th World Congress of Gastroenterology (WCOG)) tarafından bu amaçla bir sınıflama yapılmıştır (Tablo 1) (37). Buna göre HE tip A, B ve C olmak üzere üç alt gruba ayrılır. HE, klinik bulgu, semptom ve bunların ciddiyeti göz önüne alınarak West Haven kriterlerine göre I ila IV arasında derecelendirilmektedir (Tablo 2) (37).

Kronik HE daha sık görülmesine rağmen, AKY'deki nörolojik değişikler daha dramatik ve daha hızlı gelişir (2). Klinik olarak bu iki durumun yönetimi farklılık göstermektedir. FKY'de serebral ödemin klinik olarak açığa çıkması bilinen bir komplikasyon olmakla birlikte, sirozlu hastalardaki HE'de genellikle serebral ödem ve intrakraniyal basınç artışı bulgularının olmadığı bildirilmekteydi (38). Ancak 1994 yılında Haussinger ve ark.'nın in vivo proton manyetik rezonans spektroskopi (^{1}H-MRS) yöntemi ile yaptıkları çalışmada, sirozlu hastalarda düşük derecede serebral ödem olduğu gösterilmiştir (39).

Tablo 1. Hepatik Ensefalopatinin sınıflandırılması

HE Tipi	Adlandırma	Alt kategori	Alt bölüm
A	Akut Karaciğer Yetmezliğinin indüklediği HE		
B	Hepatosellüler yetmezlik olmaksızın Porto-sistemik bypass'ın indüklediği HE		
C	Portal hipertansiyon veya porto-sistemik şantın birlikte olduğu sirozun indüklediği HE	Epizodik hepatik ensefalopati	Presipite, spontan veya rekürren
		Persistan hepatik ensefalopati	Hafif, orta veya tedavi bağımlı
		Minimal hepatik ensefalopati	

Tablo 2. Hepatik ensefalopatinin klinik evrelemesi

Evre	Şuur düzeyi	Kişilik ve entelektüel fonksiyonlar	Nörolojik belirtiler	EEG anomalileri
0	Normal	Normal	Yok	Yok
Sub klinik	Normal	Normal	Psikometrik testlerle saptanabilen anormallikler	Yok
1	Uykuya eğilim	Unutkanlık, hafif konfüzyon, ajitasyon ve irritabilite	Tremor, apraksi, inkoordinasyon, el yazısında bozulma	Trifazik dalgalar
2	Letarjik, reaksiyonlar yavaşlamış	Dezoryantasyon, amnezi, inhibisyonun azalması ve uygunsuz davranışlar	Asteriksiz, dizartri, ataksi ve hipoaktif refleksler	Trifazik dalgalar
3	Somnolans mevcut, ancak uyandırılabilir.	Dezoryantasyon ve agresif davranışlar.	Asteriksiz, hiperaktif refleksler, babinski varlığı ve rijidite	Trifazik dalgalar
4	Koma	Koma	Deserebrasyon	Delta aktivitesi

2.2.1.Nöropatoloji:

Beyin, nöronal ve non-nöronal hücrelerden oluşan heterojen bir yapıdır. Beyin parankimi astrosit, oligodentrosit ve mikrogliya adı verilen üç tip non-nöronal (glial) hücreden oluşur (40). Beyinde amonyak detoksifikasyonunda astrositler görev alırken, nöronlarda glutamini glutamata çevirecek enzim bulunmamaktadır (40). Astrositler kortikal hacmin yaklaşık 1/3'ünü kapsar ve nöronları dış çevreden ayıran bir bariyer oluşturur (41). Astrositler nöronları çevreleyip, fonksiyonlarını desteklerler ve böylece patolojik değişikliklerde primer hücresel hedef olurlar (2). Astrositlerin vasküler yapılar, nöronlar ve diğer astrositlerle etkileşerek beyin kan akımını ayarlamak, uyarı iletiminin modülasyonunu sağlamak, serebral sirkülasyona giren ilaçlar, hormonlar ve amonyak gibi maddeleri detoksifiye etmek, glutamat ve GABA gibi glukoz kaynaklı nörotransmitterlerin sentez ve degradasyonunu sağlamak gibi fonksiyonları vardır (2, 40,42).

Astrositler, özel bir stimulusun olmadığı istirahat durumlarında beyindeki oksidatif metabolizmanın % 30'unu, glikolizisin % 50'sini gerçekleştirirken, oldukça az glikojenoliz yaparlar (8). Astrositler glutamin sentetaz enzimi yardımıyla glutamatı amonyak ile birleştirip glutamin sentez ederek amonyağın detoksifiye edildiği bölgelerdir (43,44). Siroz ve AKY'de nöronlar ve kan-beyin bariyeri normaldir. AKY'de astrositlerin şişmesi ile hastalarda sitotoksik beyin ödemi gelişir. Bu gözlemler kültüre edilmiş astrositlerde de doğrulanmıştır (36). Kronik karaciğer hastalığında astrositler karakteristik olarak "Alzheimer tip II astrosit" morfolojisi gösterirler. Alzheimer tip II astrosit morfolojisi, astrosit nükleusunda büyüme, çekirdekçikte belirginleşme, kromatin yapının marjinasyonu ve sitoplazmik organellerin izole proliferasyonuyla beraber belirgin sitoplazmik büyümenin izlendiği hücre morfolojisidir (36). Bu görünümler kronik olarak amonyağa maruz bırakılan astrosit kültürlerinde, hiperamonyemi ile sonuçlanan konjenital üre siklus enzim defektli hastaların beyinlerinde ve deneysel hayvan modellerinde de gösterilmiştir (36,45-47). Kronik karaciğer hastalığında astrositlerden hücre hacminin regülasyonunda önemli görevi olan glial fibriler asidik protein (GFAP)'in ekspresyonunda azalma gözlenir (48,49). Kronik karaciğer hastalarında ayrıca periferal tip benzodiazepin reseptörleri ve glutamat taşıyıcıları gibi temel astrositik proteinlerin ekspresyonunda da değişiklikler vardır (36,45,46,50).

Santral sinir sisteminin nörovasküler kısmı, vasküler endotelyal hücreler, perisitler ve sıkıca bitiştirilmiş astrosit ve nöronlardan oluşan dinamik bir yapıdır. Bu hücrelerin birbiri ile teması ve iletişimi serebral kan akımını ayarlar ve kan-beyin bariyerinin geçirgenliğini etkiler (36,47). HE'de kan-beyin bariyeri intakt olmasına rağmen, pozitron emisyon tomografisi (PET) ile yapılan bir çalışmada karaciğer hastalığının şiddetinin artması ile amonyağa geçirgen alanın arttığı gösterilmiştir (2,36,51,52).

2.2.2.Patofizyoloji:

Karaciğer disfonksiyonundaki kantitatif ve kalitatif farklılıklar, HE'nin derecesi ile ilişkilidir. Akut karaciğer hasarı olan hastaların % 30'u intrakraniyal hipertansiyon ve beyin ödeminden dolayı beyin herniasyonuna bağlı olarak ölmektedir (37). Buna karşılık sirozlu hastalarda (kronik karaciğer hastaları) psikomotor disfonksiyon, bozulmuş hafıza, reaksiyon zamanında uzama, duyu anormallikleri ve konsantrasyonda zayıflama gibi sinsi nöropsikiyatrik bozukluklar görülebilir (37). Bunların ciddi formlarında veya dekompanse durumlarda ise, hastalarda konfüzyon, stupor, koma ve ölüm gözlenebilir (37). Kompanse kronik karaciğer yetersizliği olan hastada kliniğin ağırlaşıp, dekompanse hale dönmesi iki şekilde olabilir. Birincisi, kronik karaciğer yetersizliğine neden olan hastalığın progresyonu sonucu, kompanse haldeki sirozun son dönem siroza ilerlemesi şeklinde olabilir. İkincisi ise, kompanse kronik karaciğer hastalığı olan bir hastaya sepsis, üst gastrointestinal sistem kanaması, iskemi, karaciğer hasarı yapan alkol, hepatotoksik ilaç veya hepatit virüs enfeksiyonu gibi presipite edici durumların eklenmesi halinde "Akut-on-kronik (kronik karaciğer hastalığında gelişen akut karaciğer yetmezliği) karaciğer yetmezliği" (AKKY) diye adlandırılan ve presipite edici nedenin ortadan kaldırılması ile geri dönüşümlü olabilen bir durumdur (53). AKKY'deki HE patofizyolojisi AKY ile benzerdir (53).

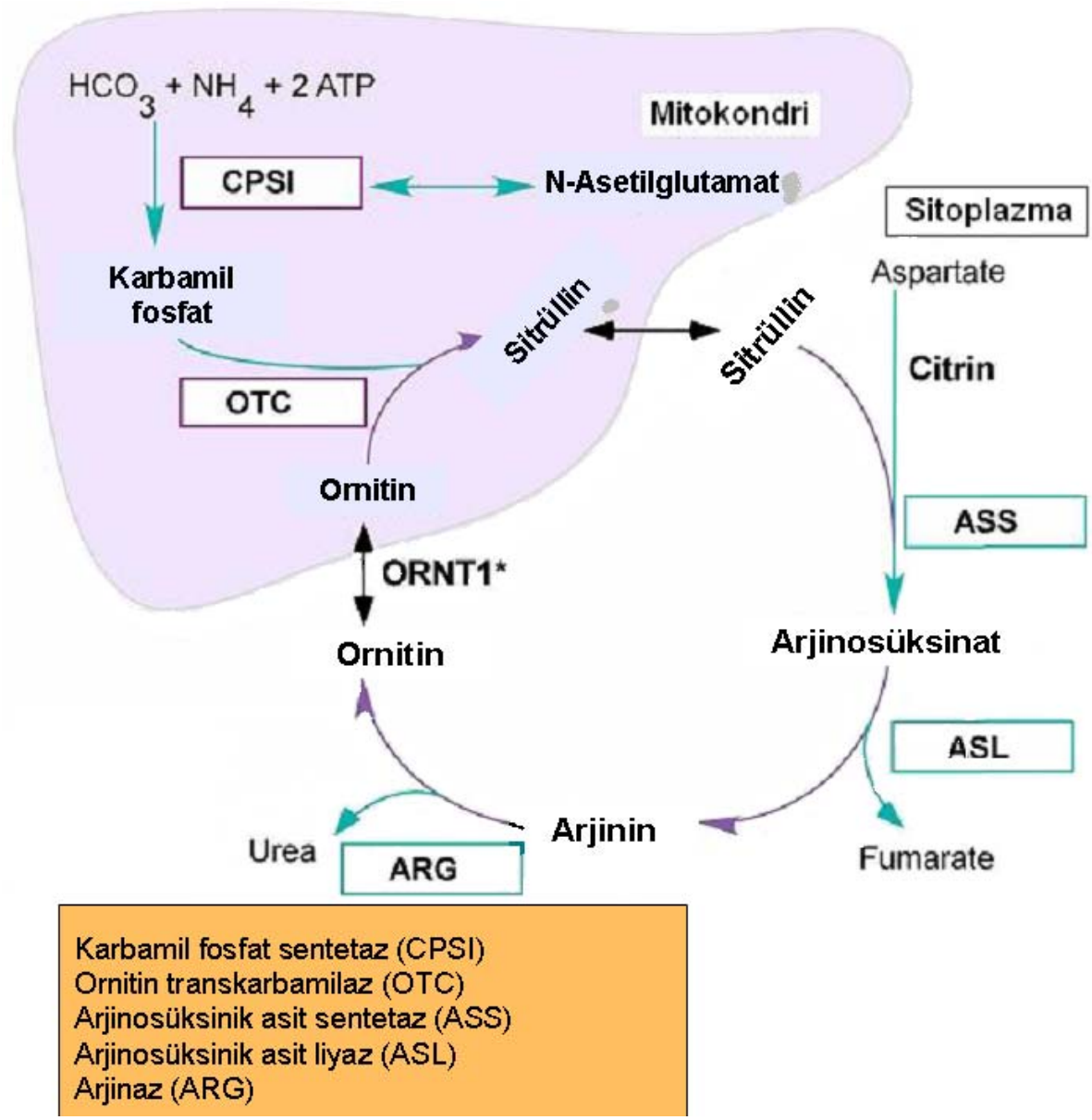
HE'nin patogenezi ile ilgili birçok hipotez ileri sürülmüş olmasına rağmen hala tam olarak açıklanamamıştır. Hepato-serebral disfonksiyonun genellikle normalde bulunması gereken veya koruyucu özelliği olan maddelerin eksikliğinden değil, anormal veya toksik maddelerin organizmada birikmesi ile meydana geldiğine inanılır. Bu durum karaciğer klirensindeki yetersizliğin serebral toksinlerin birikmesi ile oluştuğunu düşündürür (2). Bu konuda en fazla öne sürülen maddeler amonyakdır (2,13). Endojen benzodiazepinlerin, g-amino butirik asit (GABA)-erjik nörotransmisyonla etkileşimi de etiyolojide düşünülen nedenlerdendir. Ayrıca AKY'de GABA, glutamat ve nitrik oksit gibi birçok nörotransmitter ve nöromodülatörlerde de değişiklikler vardır (2,13).

2.2.2.1.Amonyak:

Amonyak barsaklardan protein sindirimi ve deaminasyon sonucu ortaya çıkan bir metabolittir. Dolaşımdaki amonyak böbreklerden itrah edilir, iskelet kaslarında glutamin sentezinde kullanılır ve önemli bir kısmı karaciğerde üre sentezi için kullanılır (54). Amonyak karaciğerde asıl olarak periportal hepatositlerde üre siklusu (ornitin siklusu) ile detoksifiye edilir. Daha sonra hepatik venlere salınarak, idrarla itrah edilir (55). Yalnızca karaciğerde yapılabilen üre siklusu ile kan amonyak seviyesi 50–100 μM aralığında dengelenir (5). Hepatik üre sentezi, düşük afiniteli, yüksek detoksifikasyon kapasitesine sahip bir sistem olup normal durumlarda çok az miktarda amonyum bu işlemden kaçabilir (55,56).

Periportal hepatositlerdeki detoksifikasyondan kaçan amonyak, perivenöz hepatositlerce yakalanıp glutamin sentetazla glutamin sentezine sokulur. Bu işlem, üre

siklusunun aksine yüksek afiniteli ancak düşük detoksifikasyon kapasitesine sahiptir (55,56). Karaciğer yetmezlikli hastalarda üre sentezi ve glutamin sentez kapasitesinin azalması nedeniyle amonyak detoksifikasyon kapasitesi azalır. Bu hastalarda glutaminaza doğru akış 4-6 kat artar (55). Üre döngüsü beş basamaktan oluşur, iki basamak mitokondride, geriye kalan üç basamak ise sitoplazmada oluşur. I. basamakta reaksiyonu karbamoil fosfat sentaz I katalizler. Enzim aktivitesi için N- asetil glutamata ihtiyaç vardır. Aynı zamanda arginin tarafından sentezi artırılır. Karbamoil fosfat sentetaz I, üre döngüsünün hız kısıtlayıcı enzimidir. Üre siklusu Şekil 1'de şematik olarak özetlenmiştir (56).



Şekil 1. Üre siklusunun mitokondri ile stoplazmada meydana gelen reaksiyonları

Amonyak zayıf baz (NH_3) veya zayıf asit (NH_4^+) olarak görev yapabilen, elektrolit iletkenlik ve bir çok biyokimyasal reaksiyonda rol alan yegane moleküldür (5). Amonyak gaz (NH_3) ve iyonik (NH_4^+) komponentlerden oluşmakta olup, her iki form da hücre membranlarından geçebilme özelliğine sahiptir. Bu iki form sıvı solüsyonlar içinde intraselüler veya ektraselüler ortamın pH durumuna göre birbirlerine dönüşebilirler (5). Amonyağın 37^0 C'da pKa'sı 9.15 olduğundan, normal fizyolojik durumlarda (pH=7.4) amonyağın % 98'i NH_4^+ formunda bulunur (5). NH_4^+ iyonu K^+ iyonu ile iyonik özellikler ve diffüzyon sabiti bakımından

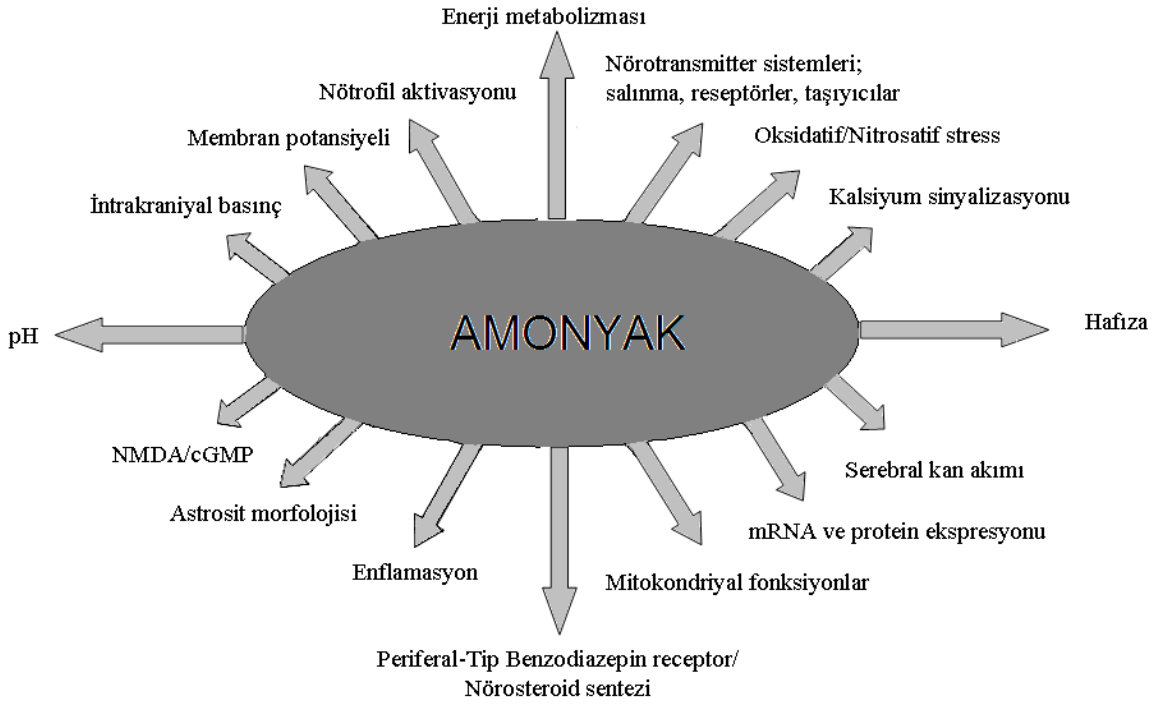
oldukça benzerdir. Bu benzer özellikler NH_4^+ 'un iç bölge düzeltici ve voltaj bağımlı K kanalları gibi membran iyon kanallarında K^+ ile yarışmasına imkan tanır (5). Astrosit hücre membranı amonyum iyonlarına yüksek geçirgenlik gösterir. Amonyum iyonları, astrositler içinde K^+ iyonlarının düşük konsantrasyonlarda olduğu bölgelerde yoğunlaşır. Bu yüzden, K^+ iyon konsantrasyonundaki azalma, astrosit membran permeabilitesi arttıracağından, intraselüler amonyak seviyesinde artışa neden olur (57). Ayrıca NH_4^+, Na^+/K^+ ve H^+/K^+ ATPase (Adenozin trifosfat) taşıyıcılarında K^+ ile yer değiştirerek, $NH4^+/Cl^-$ ve $Na^+/K^+/Cl^-$ ortak taşıyıcılarıyla da hücre membranından geçiş yapabilir (5). Saparov ve ark. ise amonyağın aquaporin kanallarınca (özellikle aquaporin-8) taşındığını göstermişlerdir (58).

Karaciğer yetersizliği olan hastalardaki bazı ölümlerin, arteriyel amonyak konsantrasyonunda artış ile ilişkili beyin ödemi, intrakraniyal basınç artışı ve beyin sapı herniasyonu gibi nörolojik komplikasyonlar sonucu meydana geldiği klinik ve deneysel çalışmalarda gösterilmiştir (5-12). Hiperamonyemi ve hepatik ensefalopati gelişen karaciğer yetmezliği hayvan modellerinde, çok sayıda biyokimyasal, fizyolojik ve moleküler değişikler izlenmiştir. Bu değişiklikler (Şekil 2)'de gösterilmiştir (5). Hayvan modellerinde izlenen etkilerin benzerleri, patofizyolojik konsantrasyonlarda amonyak uygulanmış nöron veya glia hücre kültürlerinde de gözlemlenmiştir (5,59,60).

Amonyağın inhibitör ve eksitatör nörotransmisyonda direkt ve indirekt etkisi vardır (5,61). Nörosteroidlerin, eksitatör glutaminerjik N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptörlerinin aktivasyonu ve GABA-reseptörlerinin modülasyonunun yanısıra seratonerjik ve dopaminerjik iletimi de değiştirdiği bilinmektedir (54,62).

Deneysel karaciğer yetersizliklerinde amonyak konsantrasyonlarının, postsinaptik nöronlarda klorid bloke etmesi ile serebral korteks, beyin sapı ve medulla spinaliste postsinaptik inhibisyon bozulur. Benzer amonyak konsantrasyonları direkt postsinaptik etkiyle eksitatör nörotransmisyonu inhibe eder (46).

Amonyak artışı, enzimatik reaksiyonları inhibe ederek intraselüler metabolizmanın bozulmasına neden olabilir (63). Ayrıca, saniyeler içeresindeki amonyak konsantrasyonundaki hızlı değişiklikler sitozolik pH'da değişikliklere yol açar (20,64,65). HE'nin kan amonyak seviyesi ile korele olmamasına rağmen, parsiyel amonyak basıncı (pNH_3) ile daha iyi korele olduğu bildirilmiştir (66).



Şekil 2. Hiperamonyeminin yapmış olduğu biyokimyasal, fizyolojik ve moleküler değişikler (NMDA: N-metil-D-aspartat reseptörleri)

Amonyak detoksifikasyonu için beyinde üre siklusunun enzimatik çarkı olmadığından, aminoasit sentezinde (özellikle glutamin sentezi) kullanılarak metabolize edilmektedir (54,67).Bu durum direkt nörotoksik etkiyi güçlendirir, ancak kimyasal reaksiyonlardaki substrat azalması ve biyokimyasal yollardaki dengesizlik ile metabolik dengesizlikler ortaya çıkar (54,68).

Plazma amonyak konsantrasyonu arttığında meydana gelen ilk olay astrosit şişmesidir. Yüksek amonyum klorite maruz bırakılan astrosit veya glial Müller hücre kültürlerinde hipertrofi gözlenmektedir (54). Akut hiperamonyemi sırasındaki astrosit sitoplazması su ile şişer, astrosit çekirdek hacminin artması sonucu beyin ödematöz olur (54,,69-71). Uzun zamandır astrosit şişmesininin nedeninin, hücre içerisinde biriken glutaminin ozmotik etkisiyle olduğu düşünülmekteydi (54,72,73). Ancak daha sonra öne sürülen “Truva atı” hipotezine göre, hücre içindeki glutaminin mitokondriye girerek fosfat ile aktifleşen glutaminaz (FAG) ile amonyağa ayrıştırılması neticesinde hücre şişmesine neden olduğu öne sürülmüştür. FAG çoğunlukla nöronlarda bulunmasına rağmen, astrosit kültürlerinde “Truva atı” hipotezi belirgin olarak gösterilmiştir (74). Mitokondri içindeki amonyak oksidatif ve nitrozatif stresi indükliyerek serbest radikallerin ortaya çıkmasını sağlar. Bu da mitokondriyal permeabilite transizyonu (MPT) denilen apopitozise yol açar (54,75). MPT iç membran potansiyelinin ani olarak kaybı ile karakterize olup, MPT sonucunda, mitokondriyal ATP sentezi durur, astrositler şişer, aquaporin 4 artar (upregülasyon), reaktif

nitrojen ve oksijen türleri (RNOT) oluşur, mitojen ile aktive edilen protein kinaz fosforilasyonu (MAPK) ve apopitozis meydana gelir (54).

Hiperamonyemi, süperoksid (O_2^-), nitrik oksid (NO) ve bunların reaksiyon ürünü peroksinitrit ($ONOO^-$) gibi RNOT denilen serbest radikal oluşumuna neden olur (54,76,77). Bu serbest radikallerin mitokondriyal elektron transport zincirini inhibe ettiği gösterilmiştir (78). Amonyağın milimolar konsantrasyonları, trikarboksilik asit siklusunun hız kısıtlayıcı enzimlerinden biri olan α-ketoglutarat dehidrogenazı inhibe ederek serebral enerji yetersizliğine yol açma potansiyeline sahiptir (41,78,79).

MAPK'ın fosforilasyonu, hücre siklus kontrolü, hücre farklılaşması, tümor süpresyonu ve apopitozis gibi çeşitli intraselüler regulatuar mekanizmaların aktivasyonunu tetikleyerek, amonyak toksisitesinde temel rol oynar (54).

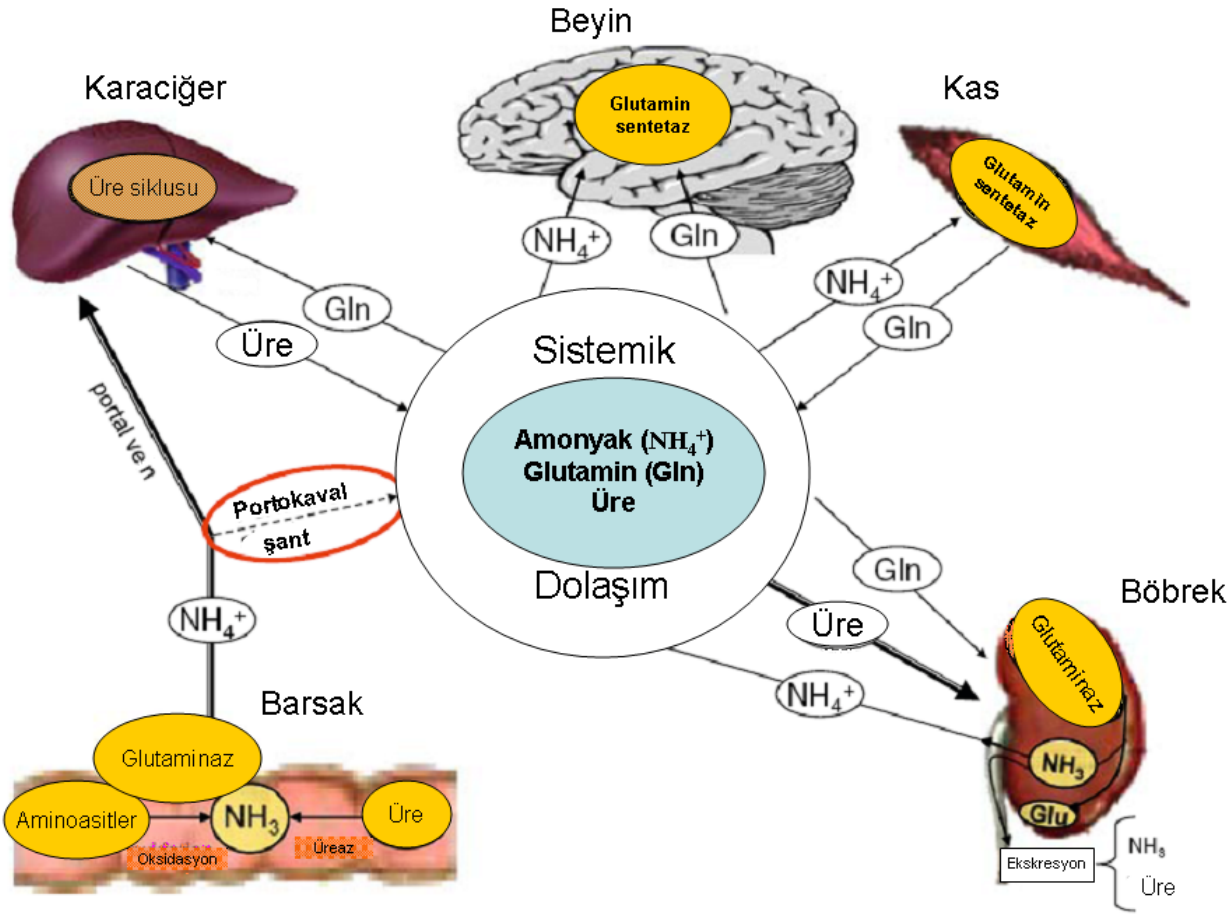
Amonyak toksisitesi olan beyinde belirgin astrosit şişmesi olduğunda, hücre hacminin dengelenmesi için karşı mekanizmalar devreye girebilir. Hücre membranlarından iyon ve osmolit transportundaki birçok proses hücre hacim regülasyonunda rol alır. Artmış hücre içi su, non-spesifik katyon kanallarınının aktive olması sonucu, Ca^{+2}, K^+ ve Cl^- kanallarından net iyon akışı olur (54,80). Hücre hacim regulasyonunda iyonların sınırlı kapasitesi olduğundan, myoinositol, sorbitol, betain, taurin ve diğer aminoasitlerin organik ozmolitler olarak önemli rolleri vardır (54,80). Hücre hacminin regülasyonu için hücre membranlarından su akışında rol alan bir başka mekanizma aquaporinlerdir (80,81). Aquaporin 4, astrositlerde en fazla bulunan aquaporindir (54).

Astrosit şişmesi hızlı olduğu zaman, ektraselüler aralığın hacmi azalır ve interselüler aralığın geometrisi değişir (82,83). Şişmeden dolayı meydana gelen değişikler ile glutamat salınımında artış izlenir. Bu yüzden, hiperamonyemide astrositlerdeki amonyak konsantrasyonundaki artış, fazla miktardaki amonyak ve glutamatı metabolize etmek için glutamin sentetaz aktivitesini stimüle edebilir (57).

Amonyak metabolizmasındaki organlar arası değişiklikler HE'de önemli rol oynar (Şekil 3). Amonyak, barsaklardan alınan glutaminin, glutaminaz ile glutamat ve amonyağa çevrilmesiyle yapılır (25, 26). Amonyak normal karaciğerin periportal hepatositlerinde üreye, perivenöz hepatositlerde glutamine dönüştürülür. Ancak karaciğer hastalığı veya porto-sistemik şant olduğunda amonyak toksik seviyeler ulaşır. Normal bireylerde, amonyağın % 50'si iskelet kaslarında metabolize edilir (25).

Amonyak üretiminin en fazla olduğu yer portal sisteme drene olan organlardır. Glutaminin, glutamat, enerji üretimi, nükleotid sentezi ve amonyağa dönüşünü katalizleyen enzim FAG'dır. Böbrek tipi (B-FAG) ve karaciğer tipi (K-FAG) olmak üzere FAG'ın iki asıl izoformu tanımlanmıştır (84).B-FAG böbrek, beyin ve villus enterositlerinde bulunurken, K-FAG yalnızca karaciğerde bulunur. Sağlıklı insanların gastrointestinal traktüsünün en fazla FAG aktivitesi olan bölümü ince barsaklardır (84). Sirozlu hastalardaki amonyak üretiminin

asıl kaynağı, portal sisteme drene olan organlardaki glutaminin deaminasyonu olduğundan, sirozlu hastalardaki sistemik hiperamonyemi yapımının sebebi FAG aktivitesi olarak gözükmektedir (84).



Şekil 3: Amonyağın, organlar arasında üre ve glutamin şeklindeki metabolizması (Gln: glutamin; Glu: glutamat; NH_3- NH_4^+: amonyak)

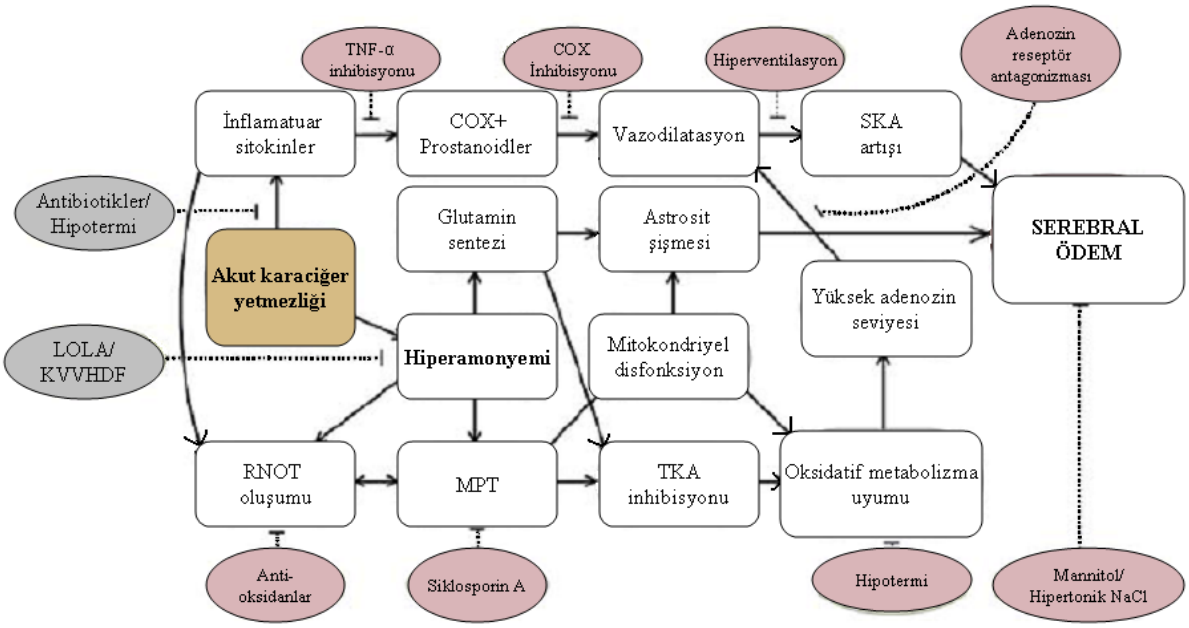
Karaciğer yetersizliğinde kas glutamin sentetaz aktivitesi artar (25). Metiyonin sülfoksimin ile glutatyon sentetazın inhibisyonunun, ölüm, bayılma, serebral enerji metabolizmasındaki bozukluklar, beyin ödemi, astrosit şişmesi, beyin kan akımında artış, serbest radikal üretimi, mitkondriayal permeabilite geçişi gibi amonyağın bazı toksik etkilerini önlediği veya geri çevirebildiği bildirilmiştir (74,78).

2.3.Serebral ödem ve ilişkili durumlar:

2.3.1.Serebral ödem:

Akut ve kronik ensefalopati arasındaki farklılıklara bakılmaksızın, hepatik ensefalopatinin akut durumunda, beyin kan akımında değişiklikler ve beyin ödemi, patogenezdeki asıl durumlardır. Akut karaciğer yetersizliğinde serebral ödem oluşumu ve tedavide kullanılan yöntemlerin patogenezin hangi basamağına etki ettiği Şekil 4.de

gösterilmiştir (2).Serebral ödem ve intrakraniyal hipertansiyon AKY'li hastaların % 80'inden fazlasında gözükür (14).



Şekil 4. Akut karaciğer yetersizliğinde serebral ödem oluşumu ve tedavide kullanılan yöntemlerin etkisini gösterdiği bölgeler (LOLA: L-ornitin L-aspartat; KVVHDF: Sürekli venö-venöz hemodiafiltrasyon; RNOT: reaktif nitrojen ve oksijen türleri; TNF-α: tümor nekrozis faktör-alfa; COX: siklooksijenaz; MPT: mitokondriyal permeabilite transizyonu; TKA: trikarboksilik asit; SKA: serebral kan akışı)

2.3.2.Vazojenik ve sitotoksik mekanizmalar:

Serebral ödem oluşumunda son ortak yol olarak iki temel teori bulunmaktadır (2). "Vazojenik teori" de serebral ödem nedeninin, kan beyin bariyerinin bozulması sonucu ektraselüler aralıkta plazma göllenmesi olduğu öne sürülmektedir. "Sitotoksik teori" de ise primer olarak hücresel ozmoregülasyon değişikliğinin direkt olarak intraselüler ödeme neden olduğu öne sürülmektedir (85). Akut hepatik ensefalopatide, ödem oluşumunun farklı fazlarında her iki mekanizma da rol alıyor olsa da, sitotoksik mekanizmaların daha ön planda olduğu düşünülmektedir (2,13,52).

2.3.3.Sitokinler ve inflamatuar faktörler:

Nekrotik karaciğer hücrelerinden açığa çıkan toksik maddelerin ödem oluşumunda rol oynadığı konusunda kuvvetli şüpheler mevcuttur. Bu durumu gösteren ciddi klinik gözlemler mevcuttur. Şöyle ki, AKY olan bir hastanın total hepatektomi sonrası, hemodinamisinin düzelmesinin yanısıra intrakraniyal basınçta belirgin azalma izlenmiştir (86). Ancak, deneysel anhepatik modellerde, hayvanlarda serebral ödemin varlığı, ödem gelişiminde çok daha kompleks etiyolojinin varlığını desteklemektedir (2). İnterlökin (IL)- 1, IL-6 veya tümor nekrozis faktör-alfa (TNF-α) bu olaylardan sorumlu olabilecek inflamatuar sitokinlerdir (87). Ayrıca araşidonik asit kaskatının değişik elemanlarının da önemli rolü vardır (2).

2.3.4.Serebral kan akışı:

AKY'de serebral kan akımı çok değişkendir (32). Serebral kan akımındaki primer değişiklerin, serebral ödem meydana gelmesi ve intrakraniyal basınç artışında önemli rol oynadığı düşünülmektedir. Kraniyum hacmi sabit olduğundan, beyin hacmi, serebrospinal sıvı veya kan akımındaki artış intrakraniyal basıncı arttırır (2). Normal koşullar altında, serebral kan akımı, ortalama arteriyel kan basıncı geniş bir aralıkta relatif olarak sabit olacak şekilde otoregulatuar kontrol altındadır. Serebral kan akışındaki değişikliklerin serebral ödeme primer veya sekonder olup olmadığı bilinmemektedir (88). AKY'de oto-regülasyonun primer kaybı ile serebral metabolik ihtiyaçlara kıyasla beyine olan kan akışında artış olabileceği iddia edilmiştir (89). Alternatif bir şekilde de, oto-regülasyonun kaybı neticesinde serebral hipoperfüzyon meydana gelmesi sonrası ortaya çıkan hipokseminin ödeme katkıda bulunabileceği de düşünülebilir (90).

2.3.5.Glutamin:

Glutamin serebral ödemin gelişmesinde önemli rolü olan organik ozmolitlerdendir. Glutamin beyinde nörogliyal hücrelerde, glutamin sentetazın katalizlediği reaksiyon sonucu amonyak ile glutamatın birleşmesi ile oluşur (2). Glutamin ektraselüler sıvıda normalde 200-500 μM civarında bulunur ve toksik özellik göstermediğinden hem amonyağın, hem de glutamatın ortamdan uzaklaştırılması esnasında yapımı artar (15). AKY'de aşırı miktardaki amonyak da glutaminin birikmesi yönünde çalışır (52). Kompansatuar değişikliklerin yokluğunda, sıvı glial hücrelerin içine girer ve doku ödemi meydana gelir. Bu teori karşısında yapılmış olan bir çalışmada, glutaminin mitokondriyal metabolizmasının engellenmesi ile astrositik hücrelerde şişme olmadığı ve pik glutamin konsantrasyonunun pik hücre şişmesine neden olmadığı gösterilmiştir (91). Bu ve benzeri bulgular astrosit şişmesinde yalnız ozmotik etkinin değil, diğer mekanizmaların da rol aldığını göstermiştir. Bu nedenle astrositik glutaminin mitokondriye geçerek orada amonyak ve glutamata metabolize olması sonucu ortaya çıkan fazla miktardaki amonyağın, reaktif oksijen metabolit yapımını arttırdığı, mitokondriyal geçirgenlik porlarının ve kinazların aktivasyonu ile astrositik hücre şişmesinin oluştuğunu savunan "Truva atı" hipotezi öne sürülmüştür (92,93).

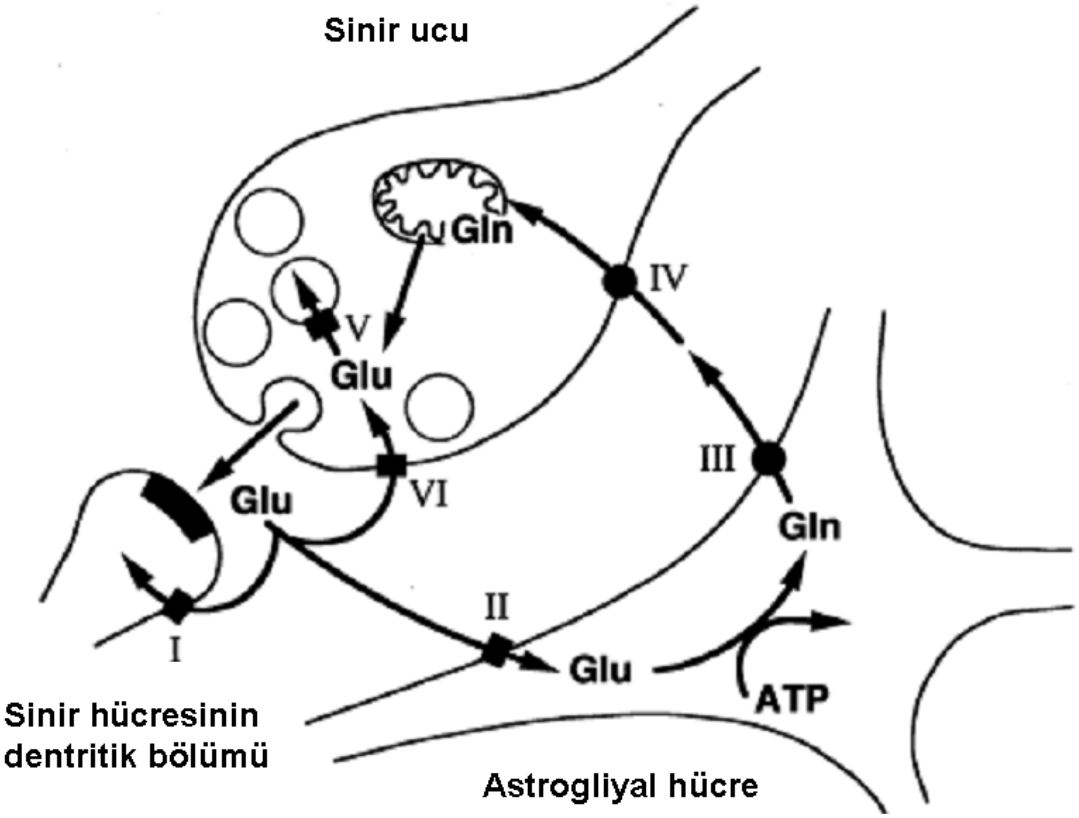
2.3.6.Glutamat:

L-Glutamat amino asiti santral sinir sisteminde önemli bir eksitatör nörotransmitterdir (16). Glutamatın santral sinir sisteminin gelişmesi, sinapsların tetiklenmesi ve eliminasyonu, hücre göçü, diferansiasyonu ile ölümü üzerine önemli rolü vardır (15). Nöron hücre korpusu, dendritler, sinir uçları ve glial hücrelerin plazma membranlarında glutamat reseptörleri vardır (15,17-19). Beyin çok büyük miktarda glutamat içerir (yaklaşık her ıslak kg başına 5–15 mmol), ancak bu miktarın çok az bir kısmı ektraselüler ortamda bulunur (15). Ektraselüler sıvı ve serebrospinal sıvıdaki konsantrasyonu sırasıyla 3-4 μM ve 10 μM dür (15). Glutamatın plazma membranı arasındaki konsantrasyon gradiyenti binlerce kattır. Glutamatın en yüksek

konsantrasyonda olduğu yer sinir uçlarıdır (15,94). Glutamatın enerji durumunun değişimine göre dinamik bir dağılım özelliği vardır. Hücrede enerji azaldığında glutamat hücreye sızar. Glutamat sürekli olarak hücreden salınır ve ektraselüler sıvıdan devamlı olarak uzaklaştırılması gerekir (15). Glutamatın uzun süreli olarak düşük ekstraselüler konsantrasyonlarında tutulabilmesinden sorumlu mekanizma glutamat uptakedir. Glutamat uptake, plazma membranlarından taşıyıcı güç olarak elektrokimyasal gradyenti kullanan ve hem nöronlarda hem de glial hücrelerde bulunan glutamat taşıyıcı proteinlerle başarılır (15). Glutamatın salınması çok hızlı olduğundan, glutamat uptakenin inhibisyonu sonucu saniyeler içinde ektraselüler ortamda glutamat seviyesi çok artar (15).

Saflaştırılmış sinaptik veziküllerdeki glutamat konsantrasyonu 60-210 mM olabileceği gösterilmiştir (95,96). Ancak her ne kadar sinaptik veziküllerdeki glutamat konsantrasyonları bilinse de, vezikül boyutlarında ki farklılıklar ve ekzostoz yapabilecek vezikül sayısı tam olarak bilinemediğinden, glutamaterjik sinir uçlarından ne kadar glutamatın ekzositozla salınabileceği tam olarak bilinememektedir (15). Bununla birlikte, glutamatın ekstraselüler dönüşümü olmadığından, beyin dokusunun kendisini glutamat toksisitesinden koruyabilmesi için çok yüksek bir glutamat up-take aktivitesine ihtiyaç gösterir. Zaten gerçekte de sağlam beyin dokusunun glutamat up-take'i oldukça fazla olup, glutamat toksisitesine karşı dirençlidir (15). Buna karşın, kültürde ki korunmasız nöronlar ortamda birkaç mikromolar glutamat varlığında dahi ölebilirler (15,97).

Hücreler tarafından geri alınan (up-take) glutamat ya protein sentezi, enerji metabizması, amonyak metabolizması gibi metabolik amaç için ya da yeniden transmitter olarak kullanılabilir (15). Glutamatın sinir uçlarında veziküler glutamat transporterlarla sinaptik veziküllere taşınır ve daha sonra ekzositozla salınarak yeniden nörotransmitter olarak kullanılır (15,98). Astrositlerde ektraselüler sıvıdan glutamatın alımı sonrası glutamine dönüştürülerek ektraselüler sıvıya salınır. Ektraselüler ortamda bulunan glutamin nöronlarca alınarak, burada yeniden glutamata çevrilir. Astrositler ve nöronlar arasındaki glutamat ile glutamin arasındaki bu trafik, transmitter olarak kullanılan glutamat için ana yoldur ve "Glutamat-Glutamin siklusu" olarak isimlendirilir. Bu siklusta, ATP ve Ca^{+2}'a bağımlı olarak sinir ucundan salınan glutamat, presinaptik, postsinaptik ve ekstrasinaptik olarak astroglial hücreler de bulunan glutamat transporterları tarafından alınır. Astroglialar ATP'ye ihtiyaç duyan bir prosesle glutamatı glutamine çevirerek detoksifiye ederler. Daha sonra glutamin, glutamin transporterları aracılığı ile glial hücrelerden salınıp, başka glutamin transporterları ile nöronlara alınır. Nöronlarda glutamin yeniden glutamata çevrilir. Sinaptik veziküller, veziküler glutamat transporterları ile sitozoldeki glutamatla doldurulur (Şekil 5) (99). Glutamin, glutamatın aksine toksik olmadığından ve glutamat reseptörlerini aktive etmediğinden nörotransmisyonu olumsuz etkilemez (15).



Şekil 5. Glutamat–glutamin siklusu (I: postsinaptik II: ekstrasinaptik glutamat transporterları; III ve IV: glutamin transporterları; V: veziküler glutamat transporterları; VI:Presinaptik glutamat transporterları; ATP: Adenozin trifosfat; Gln: glutamin; Glu: glutamat)

Glutamatın astrosite geri alımı sonrası iki farklı yolla metabolize edilebilir. Birinci yolda, glutamat ATP-bağımlı glia-spesifik enzim olan glutamin sentetaz ile amidasyona uğrayarak glutamine dönüşür (94). İkinci olarak ta, glutamat dehidrogenaz ile deaminasyon veya transaminazlarla transaminasyonla α-ketoglutarata çevrilebilir. Alfa-ketoglutarat trikarboksilik asit siklusu ile suksinat, fumarat veya malata metabolize edilebilir. Malat trikarboksilik asit siklusu ile daha ileri metabolize edilebilir veya piruvata dekarboksile edilir ve laktata indirgenir. Oluşan glutamin ve laktat astrositten ektraselüler sıvıya çıkar ve nöronlara girer (15).

Deneysel birçok farklı AKY modelinde ekstraselüler beyin glutamat konsantrasyonunun arttığı gösterilmiştir (20-24). Astrosit kültürlerinde amonyağa akut olarak maruz kalınması durumunda sitozolün alkali olması neticesinde kalsiyum bağımlı glutamat salınır (20). Ektraselüler aralıkta glutamatın artışı kan amonyak konsantrasyonu ile korele olup, glutamatın ektraselüler aralıktan intraselüler aralığa transportundaki bozulma sonucunda meydana gelir (2,100). Glutamatın hücre membranlarından sorumlu proteinler olan GLAST ve GLT-1'in AKY'de koma halindeki sıçanlarda azalmaktadır (101). Beyindeki amonyağın yükselmesi (1-3 mM) bu glutamat transporter proteinlerinin down-regülasyonu için sinyalin açığa çıkmasına neden olur. Glutamat reseptörleri, metabotropik ve iyonotropik

reseptörler olmak üzere temel iki gruba ayrılır. Metabotropik glutamat reseptörleri, glutamaterjik ve bazı GABA erjik sinir uçlarında presinaptik olarak yerleşmiş olup transmitterlerin salınımını modüle ederler (15). İyonotropik reseptörlerin alt grupları N-metil-D-aspartat (NMDA) ve non-NMDA beyinde nöronlar arasında eksitatör sinyallerin iletiminde işlev görürler. Non-NMDA reseptörler kainate ve AMPA alt gruplarına ayrılırlar (2). Glutamat reseptörlerinin aşırı aktivasyonu zararlıdır ve bu nedenle yüksek konsantrasyonlarda glutamat toksiktir (15). Sinaptik aralıkta glutamat fazlalığı, AMPA reseptörlerinin azalmış bağlama kapasitesi nedeniyle desensitizasyonu sonucu nörotransmisyon bozulabilir (23,102). Ancak NMDA bağlanma bölgeleri değişmez (22,61,100,102). Ektraselüler glutamatın fazla olması nedeniyle NMDA'ın aşırı uyarılması nöronlara, toksik düzeyde kalsiyum iyon girişine yol açabilir (85). Bu kalsiyum girişi de kan-beyin bariyerinden permeabilite artışına neden olabilecek nitrik oksit yapımını tetikleyebilir (61). Buna karşılık genel olarak intraselüler glutamatın non-toksik olduğu düşünülür. Ancak intraselüler glutamat ta tam olarak inert davranmaz, hücre yüzeyindeki glutamat transporterlarının regülasyonunda rol aldığı düşünülmektedir (15).

2.3.7.Nitrik oksit:

Nitrik oksit (NO) ve peroksinitrit gibi NO'dan derive olan oksidan maddelerdeki aşırı üretim hepatik ensefalopati patogenezinde rol aldığı düşünülmektedir. AKY'i olan hastaların plazmalarında NO'nun metabolik ürünleri yüksek seviyelerde bulunmuştur (103). NO hücrelerde depolanamayan ve hücre membranlarından geçebilen bir madde olduğundan nörondan nörona difüzyonla geçerek intraselüler komponentlere direkt etki etmesi ile büyük alanlara etki eder (2).

2.3.8.Diğer mekanizmalar: Na^+/K^+ pompası, Benzodiazepinler, GABA ve Nörosteroidler

AKY'de sodyum ve potasyumun nöronal aktif transportunda değişiklik olduğu bildirilmektedir. İskemi durumu veya dolaşan toksinler Na^+K^+ ATPaz'ı inhibe edebilir. Sodyumun intraselüler birikimi ödem oluşumuna neden olur bunun sonucunda iskemi siklusunda artış ve patolojik durumu hızlandırabilir (104).

GABA beyindeki en önemli inhibitör nörotransmitterdir. Genellikle presinaptik sinirlerde Glutamat'tan glutamat dehidrogenaz ile sentezlenir ve veziküllerde depolanır. Postsinaptik membranda spesifik bir GABA reseptörüne bağlanır. Bu reseptör daha büyük bir reseptör kompleksinin parçasıdır ve bu reseptör kompleksinde benzodiazepinlerin bağlanma yerleri vardır. Bu ligantlardan herhangi birinin bağlanmasıyla bir klor kanalı açılır ve klorun içeriye girişinden sonra postsinaptik membran hiperpolarizasyonu ve nöroinhibisyon gerçekleşir. İntestinal sistemdeki bakteriler tarafından sentezlenen GABA portal vene girdikten sonra karaciğer tarafından metabolize edilir (105). FKY'i olan hastalarda, ensefalopatinin tüm evrelerinde artmış GABA-erjik tonusla birlikte benzodiazepin reseptör

bağlarında artma olduğu gösterilmiştir (103,106). Ayrıca AKY'li hayvan çalışmalarında beyindeki periferal tip benzodiazepin reseptörlerinin yoğunluğunda ve nörosteroidlerin seviyesinde yükselme rapor edilmiştir (107). Amonyağın astrositlerdeki periferal tip benzodiazepin reseptörlerini aktive ettiği bununda GABA-erjik nörotransmisyonu güçlendiren nörosteroidlerin açığa çıkmasına sebep olduğu düşünülmektedir (2). Amonyak ayrıca GABA'nın GABA-A reseptörlerine olan affinitesini arttırarak GABA-erjik tonusu direkt olarak ta güçlendirir (108). Tüm bu bulgulara rağmen, benzodiazepin ligandları veya reseptörleri ile akut ensefalopati arasında direkt klinik ilişki bulunamamıştır (2). Ayrıca ligandlarla ensefalopatinin evresi arasında korelasyon olmadığı gibi ligandlarda artma tüm hastalarda izlenen bir durum değildir (106). Bunlara ilaveten, yapılan klinik ve hayvan deneyi çalışmalarında benzodiazepin reseptör antagonisti verilmesinin belirgin etkileri gösterilememiştir (109,110). İstisnai bir durum olarak benzodizepin antagonistik etkisinin yanısıta GABA antagonisti etkisi de bulunan flumazenil ile kısmi etki izlenebilmiştir (111).

2.4.Laboratuar:

Hepatik ensefalopatide biyokimyasal testlerde görülen anormallikler tipik olarak karaciğer hastalığının biyokimyasal bulgularını kapsar. Transaminazlarda aşırı yükselme, protrombin zamanında uzama, faktör V seviyesinde azalma, INR de artma ve etiyolojik faktöre spesifik testlerde (viral etkenler, metabolik nedenler vs) pozitiflik tespit edilir. Arteryel kan gazı, serum glukozu ve elektrolit seviyelerinde değişiklikler olabileceğinden takip edilmelidir (2,112). AKY'de arteryel amonyak konsantrasyonunun belirlenmesi bazı durumlarda faydalıdır. Fakat hepatik ensefalopati tanısı koymak için gerekli değildir. Amonyak tayininin doğruluğu birçok faktör tarafından (elin yumruk yapılması, turnike kullanımı vs.) etkilenir. Venöz kandan elde edilen amonyak değerleri, klinikle uyumsuz olarak yüksek bulunacağından hepatik ensefalopati için bir tarama testi olarak kullanılması uygun değildir. Arteryel amonyak ölçümü, amonyak seviyesinin tayininde daha doğru bir sonuç verir. AKY'de arteryel amonyak düzeyi beyin ödemi ile ilişkili olmasına rağmen, kronik karaciğer yetmezliğine bağlı hepatik ensefalopatili hastalarda ensefalopatinin derecesi ile korelasyon göstermez (7,9,113). Prognoz ve seyrin tayininde de bir değeri yoktur.

2.5.Akut karaciğer yetmezliğinde spesifik tedaviler:

2.5.1.N-Asetil sistein (NAS):

NAS bir glutatyon prekürsörüdür, glutatyon depolarını ve sülfat konjugasyonunu arttırır ve glutatyon gibi etki edererek asetaminofenin toksik metabolitine bağlanır. Asetaminofen toksisitesinde erken dönemde antidot olarak NAS kullanılır ise, efektif bir şekilde azalmış olan gulutatyon depolarını doldurarak asetaminofenin toksik metabolitinin hepatotoksik etkisini önleyebilir (114). NAS hastalarda oksijen kullanımını düzeltir ve organ yetersizliklerinin gelişmesini önleyici rol oynar. NAS'ın AKY olan hastalarda etyoloji ne olursa

olsun kalp debisini, dokulara oksijen sunumunu ve oksijen ekstraksiyon oranını olumlu yönde etkilediği belirtilmiştir (112).

2.5.2.Penisilin ve Silibinin:

Mantar zehirlenmesi medikal acil bir durumdur ve günümüzde randomize kontrollü çalışmalar mevcut değildir. Hastalık sırasında erken dönemde penisilin G 250 mg/kg/gün ve silibinin 20–50 mg / kg / gün kullanılmasının etkin olduğu görülmektedir (112).

2.5.3.Nükleozid analogları ve asiklovir:

AKY etiyolojisinde hepatit B virüsü olan hastalarda bu virüse yönelik spesifik tedaviler uygulanabilir. Hepatit B virüs enfeksiyonuna bağlı gelişen AKY'de antiviral ilaçların faydası henüz kesinleşmemiştir ancak, randomize kontrollü bir çalışmada, lamivudin kullanan, 3'ü HE'li olmak üzere 71 akut HBV'li hastada yararlı etkiler bildirilmiştir (115). Daha sonra geliştirilen bir nükleozid analoğu olan Entekavir ile yapılan bir çalışmada, HBV ilişkili AKY gelişen 6 hastada ilacın iyi tolere edildiği ve hastalık seyrini olumlu etkilediği bildirilmiştir (116). Herpes simplex virüsü (HSV)'nün indüklediği AKY'den şüpheleniliyorsa i.v. asiklovir hem iyi tolere edilebilir hem de faydalı bir tedavi yöntemidir (112).

2.5.4.Plazmaferez ve D-penisilamin:

İlerlemiş Wilson hastalığında AKY'ne D-penisilamin, trientin ve çinko kullanımının çok fazla bir yararı yoktur. Hastalar OKT yapılacak süreye kadar plazmaferezden fayda görebilirler (117).

2.5.5.Nörotransmitterler:

Kompetitif GABA-benzodiazepin reseptör antagonisti flumazenil, GABA-erjik nörotransmisyonu inhibe edici etkisi nedeniyle hepatik ensefalopatide kullanılabilir (111).

2.5.6.L-ornithine–L-aspartate (LOLA):

Ornitin ve aspartat vücutta çok sayıda metabolik proses için gerekli olan endojenik amino asitlerdir. Karbohidrat, lipid ve amino asit metabolizmasında bilinen çok sayıda etkiye sahiplerdir (27). L-Ornitin, L-Aspartat (LOLA), ornitin ve aspartik asit doğal amino asitlerinin stabl tuz formudur. LOLA vücudun fazla amonyağı yok etmek için kullandığı iki önemli sistem olan üregenesis ve glutamin sentezi için kritik öneme sahip substratlardır. L-ornitin karaciğerde üre siklusu ile amonyaktan üre yapımı için gerekli olan temel amino asittir (Şekil 1). Ornitin, ornitin karbamil transferaz ve karbamilfosfat sentetaz enzimlerinin spesifik aktivatörüdür. Periportal hepatositlerde karbamil fosfat transferaz enziminin uyarılması ile sistem akışını hızlandırır (27). Bu sayede amonyağın eliminasyonu hızlanır ve toksik amonyak düzeyi azalır. İlave olarak üregenezde de önemli bir substrattır (55,118). L-ornitin seviyesinin artması karaciğer ve beyinde detoksifikasyon proseslerini hızlandırır (27). Bu reaksiyonlar yoğun olarak hepatik lobüllerin periportal kısımlarında gerçekleşmektedir. Aspartat ve ornitin, ketoglutarata değiştikten sonra glutamin sentezi için substrat olarak kullanılır. Bu reaksiyon ise, perivenöz hepatositlerde gerçekleşir (55,118). Amonyak

düşürücü etki bahsedilen bu iki amonyum detoksifikasyon mekanizmanın stimülasyonu ile gerçekleşmektedir. LOLA hepatik devaskülarize sıçanlarda çoğunlukla iskelet kaslarında olmakla birlikte periferik glutamin sentezini stimüle eder (119). LOLA'nın karaciğerin yapısı (arkitekstür) ve hepatosit membranı üzerine koruyucu etkilerinin olduğu bildirilmektedir (120,121).

LOLA, hepatik ensafalopatiye neden olan ana faktörleri (amonyakemi veya mevcut aminoasit imbalansının düzeltilmesi ile metiyonin, tirozin, glisin, treonin ve fenilalanin gibi aromatik aminoasitlerin doza bağlı olarak azaltılması ve alanin, arginin, glutamik asit, ornitin ve aspartik asitin plazma konsantrasyonlarının artırılması yolu ile) dengeleyerek veya normalleştirerek hepatik ensefalopati tedavisinde önemli bir seçenek oluşturur (121).

Antioksidan etki sayesinde karaciğer hücrelerin peroksidan/antioksidan dengesinin stabilizasyonu sağlar (121).

2.5.7.Suni Karaciğer Desteği:

Karaciğer destek sistemleri karaciğer fonksiyonları düzelene kadar ya da karaciğer trasplantasyonu yapılacak süreye kadar destek amacıyla kullanılan sistemlerdir. Karaciğer destek sistemleri non-biyolojik, biyolojik ve biyo-artifisiyel (hibrid) yöntemler olarak 3 gruba ayrılmaktadır (122). Non-biyolojik destek sistemleri toksinleri hemodiyaliz aracılığıyla filtre etme temeline dayanmaktadır. Ancak, bu yöntemin AKY'de sürvey üzerine olumlu etkileri gösterilememiştir (122). Biyolojik destek sistemlerinde ise çeşitli hücre (hepatosit) kültürlerinden faydalanılarak doğal karaciğer dokusuna yakın bir detoksifikasyon ortamı oluşturulmaya çalışılmaktadır. Bu nedenle hepatositlerin sentez fonksiyonlarından yararlanmayı da hedefleyerek "extracorporeal liver assist device (ELAD)" ya da "bioartificial liver (BAL)" olarak adlandırılan cihazlardan yararlanma yoluna gidilmiştir. Bu sistemlerde kullanılacak hepatositlerin en ideali insan hepatositleridir. Ayrıca bu amaca yönelik olarak her an laboratuar ortamlarında hepatosit bulundurulmalıdır. Bu konudaki en büyük sorun hem sentez görevini yerine getirecek hem de detoksifikasyon yapabilecek hepatositlerin sağlanamamış olmasıdır. Şu andaki olanaklarla hücre kültürlerinde hepatosit büyümesi yavaştır, hepatositlerin yaşam süreleri kısadır ve diferansiye durumlarını çabuk kaybetmektedirler. Bu nedenle non-biyolojik karaciğer destek sistemleri daha çok kullanılmaktadır. Bu destek sistemleri başlıca 4 ana gruba ayrılmaktadır; sürekli renal replasman tedavileri (sürekli veno-venöz hemodiyaliz, sürekli veno-venöz hemofiltrasyon, sürekli veno-venöz hemodiafiltrasyon, sürekli yavaş ultrafiltrasyon, sürekli yüksek değişimli diyaliz, sürekli plazmafiltrasyon adsorbsiyon), plazmaferez ve plazma değişimleri, hemoperfüzyon ve karaciğer replasman tedavisi (Molecular Absorbent and Recirculating System (MARS), PROMETHEUS ve Single-pass albumin dialysis (SPAD)) dir (111,122).

2.5.8.Karaciğer Transplantasyonu:

Akut karaciğer yetmezliğinde destekleyici tedavilerde ilerlemeye karşın prognozu hala kötü olan olgularda OKT yaşam şansı tanımaktadır. Karaciğer transplantasyonu artık AKY de standart bir tedavi yöntemi olarak kabul edilmektedir. Yoğun bakım koşullarının ve karaciğer destek sistemlerinin gelişmesi ile birlikte AKY'deki spontan sürvey %15'lerden %40'lara ulaşmıştır. Bu ilerlemeler sonucunda OKT yapılan hastalarda sürvey oldukça iyileşmiş ve %60'lara çıkmıştır. ABD'de AKY transplantasyon nedenlerinin %5-6'sını oluşturur (123).

İyileşerek kendi karaciğerinin normal fonksiyon ve morfolojisine kavuşma potansiyeli olan hastalarda "auxiliary" karaciğer transplantasyonu uygulaması da yapılabilmektedir (112).

2.6.Deney hayvanlarında akut karaciğer yetersizliği modelleri:

Deney hayvanlarında akut karaciğer yetersizliği cerrahi veya toksin verilmesi ile oluşturulur. Deney hayvanlarında akut karaciğer yetersizliği oluşturulması için çok sayıda cerrahi teknik mevcuttur. Bu yöntemler porto-kaval anastomoz ve hepatik arter ligasyonu ile hepatik devaskülarizasyon veya total hepatetektomidir. Ayrıca hayvanlara toksin verilerek de (Tiyoasetamid (TAA), karbon tetraklorür, galaktozamin, asetaminofen, fosfor ve nitrozamin) akut karaciğer yetersizliği meydana getirilebilir (124).

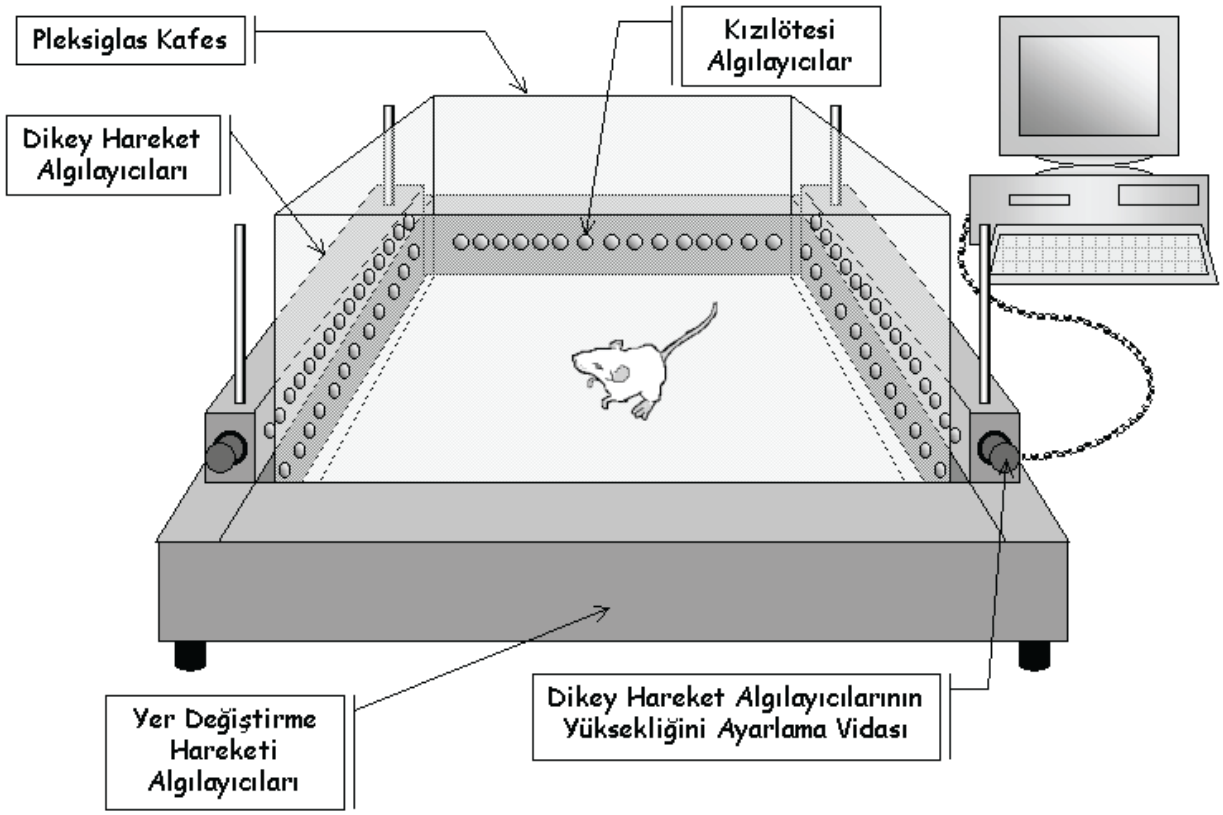
2.6.1.Tiyoasetamid (TAA):

TAA, portakalların bozulmasının engellemesinde fungisid amaçla kullanılan bir maddedir. Dikkatsiz kullanılması sonrası yan etki olarak sıçanlarda potansiyel olarak hepatotoksik ve karsinojen olduğu anlaşılmıştır (125). TAA sıçan karaciğerinde sitokrom-P450 ile asetamid ve tiyoasetamid-S-oksit'e metabolize edilir. Tiyoasetamid-S-oksit daha ileri metabolize olarak tiyoasetamid-S-dioksit meydana gelir (126). Bu tiyoasetamid-S-dioksit ileri derecede reaktif bir bileşik olup dokulardaki makromoleküllere bağlanarak hepatik nekrozu indükler (127,128). TAA'in tiyoasetamid-S-dioksit oluşumu sonrası, hücre permeabilitesini değişmesi, intraselüler Ca^{++} konsantrasyonu artması, çekirdek hacminde artış, çekirdekçikte genişleme ve mitokondri aktivitesinin inhibisyonu sonucu hücre ölümüne yol açarak toksik etki gösterdiği düşünülmektedir (124). TAA verilmesi, kolestaz izlenmeksizin hepatoselüler nekroz, köprüleşme nekrozu ve lenfosit infiltrasyonuna neden olur (129).TAA uygulanan sıçanlarda böbrek yetmezliği, hipoglisemi, hipotansiyon gelişebilir (124). TAA uygulaması kan beyin bariyerini etkilemez. TAA ile karaciğer yetersizliği yapılan hayvan modelleri, HE oluşan hayvanlardaki astrositlerin nöromodulatör fonksiyonlarındaki değişikliklerin araştırılmasında kullanılmaktadır (124).

2.7.Lokomotor aktivite değerlendirilmesi

Lokomotor aktivite ölçümü için kullanılan sisteminin esası her bir kenarı üzerinde kızılötesi (IR) ışık kaynakları içeren kare şeklinde bir dörtgendir. Bu dörtgenin içine kare şeklinde pleksiglas bir kafes yerleştirilir. Bu kafesin boyutları çeşitli ölçülerde olabilir. Deney hayvanı kafes içinde bir hareket yaptığında karşılıklı IR sensörler arasındaki iletişimi keser ve

bu deneğin yaptığı hareketin şekline göre cihaza bağlı bir kaydedici tarafından kaydedilir (Şekil 6). Bu sistem yardımı ile sıçanların horizontal, vertikal ve ambulatuvar aktiviteleri kaydedilir. Horizontal hareket, deneğin yer değiştirme ve dikilme hareketleri yapmaksızın olduğu yerde yaptığı hareketlerdir. Vertikal hareket, dikilme hareketidir ve bantlar üzerindeki vertikal sensörler yardımı ile algılanır. Ambulatuvar hareket ise deneğin kafes içinde dikilme haricinde yaptığı her türlü yer değiştirme (gezinme) hareketidir. Horizontal ve vertikal aktiviteler deney hayvanının stereotipik hareketleri ve agresivitesi hakkında fikir verici özelliktedir. Her üç aktivite ayrı ayrı değerlendirilebileceği gibi üçünün toplamı total lokomotor aktivite olarak da ifade edilebilir (130).



Şekil 6. Lokomotor aktivite ölçümünün yapıldığı sistemin şematik görünümü

2.8.Voltametri:

Optik metotlar, patch klemp, mikrodializ ve elektrokimyasal teknikler (voltametri ve spektrofotometri) gibi yöntemler beyin glutamat konsantrasyonunun ölçülmesinde kullanılabilir (131,132). Literatürde HE ile ilgili çalışmalarda beyin glutamat konsantrasyonu genellikle mikrodializ yöntemi ile ölçülmüştür. Ancak mikrodializ yöntemi, probunun büyük olması (voltametri probuna göre en az 10 kat büyük), anlık analiz yapılamaması (1-20 dakika aralıklarla ölçüm mümkün), alınan örnek miktarının az olmasından dolayı hassas ölçüm yapılmasında zorluk (pikomolar düzeyde ölçüm yapılabilmesi) ve probun beyine yerleştirildiği bölgede dokuda hasar oluşturabilmesi nedeniyle uygun bir teknik olarak gözükmemektedir (131,132). Bu nedenle anlık ve hassas ölçümler verebilen, uygulanan bölgeye zarar

vermeyen elektrokimyasal mikroelektrotlar (voltametri) uygulanım alanına girmiştir. Elektrokimyasal mikroelektrotlar ile hücre kültürleri, hippokampus kesiti ve in vivo sıçan beyin ölçümleri yapılmıştır (131,133,134). Mikroelektrotların kayıt bölgesi, çevresindeki küçük bir dokuda analiz yapabilir. Bu durum küçük ve katmanlı yapıların analizinde (sıçan ile farenin beyin ve omuriliği gibi) avantaj sağlar. Mikroelektrotların çoklu kayıt yüzeyi 2 veya daha fazla beyin bölgesinden analit (tayini istenen madde) ölçüm imkanı sağlar. Ayrıca mikroelektrotlar, amperometrik tekniklerle birleştirilince, ilgilenilen maddenin ölçümünü hızlı zaman dilimlerinde (1–1000 ms) yapabilir. Bu durumda nörotransmitter alımının/gerialımının veya salınımının kinetikleri ölçülebilir (131,135,136).

Amperometrik transdüksiyon teknikleri (voltametrik teknik) genellikle nörotransmitterlerin (glutamat, seratonin ve nitrik oksit gibi) elektrokimyasal ölçümünde kullanılır (135,136). Voltametrik teknik prensibi, kimyasalların oksidasyonu sonucunda elektronların açığa çıkarak, akım oluşturması esasına dayanır (132). Mikroelektrotlar, Platin (Pt) ve karbon (C) gibi elementler kullanılarak imal edilir. Oksijenin hidroksil gruba transferi ile elektronlar açığa çıkar. Bu elektronlar akım oluşturlar ve çok sayıdaki molekül okside olur. Maddelerin oksidasyon potansiyeli değişken olmakla birlikte, dopamin ve askorbik asit gibi bazı bileşikler benzer yapıda olduklarından, benzer oksidizasyon potansiyeline sahiptirler. Fakat, ektraselüler aralıkta az miktardaki bileşik okside edilebilir özelliktedir ve in vivo elektrotlara uygulanabilen potansiyeller –0.2 ile +0.7 Volt ile sınırlıdır. Ag/AgCl referans elektroda karşı uygulanan 0.7 V potansiyel, Pt kayıt yüzeyine uygulanır, elektronların transferiyle akımda değişim olur. Oksidasyon enzimleri için O_2 kofaktördür. Haberci molekül hidrojen peroksit (H_2O_2)'in oksidasyonu, devam eden reaksiyonlarda O_2 oluşturur. Okside olarak tespit edilebilen bileşikler katekolaminler, dopamin, 5-hidroksitriptamin (5-HT), askorbik asit, ürik asit, triptofan, tiramin, homovanilik asit, dihidroksifenil asetik asit, 5-hidroksiindol asetik asit, glukoz ve glutamattır (135,136). Mikroelektrot yüzeyindeki potansiyel eğer yeterliyse, çalışma elektrodu, kayıt bölgesi üzerindeki molekülleri direkt olarak okside veya redükte edebilir (kendi iç elektrokimyasal özelliklerine göre). Okside moleküller, kayıt bölgesine bir veya daha çok okside molekül verirken, redükte moleküller kayıt bölgesinden elektron alırlar. Bu Faradaik reaksiyonlardan oluşan akımlar, mikroelektrot çevresindeki dokulardaki elektroaktif moleküllerin yoğunluklarıyla birebir orantılıdır. Bu temel prensip, in vitro kalibrasyon (ölçümleme) metodlarının in vivo çalışmalar için kullanılmasına imkan verir (131,132,137). Elektrokimyasal kayıt metodları: Amperometrik (DC-Devamlı potansiyel), Siklik voltametri (CV-üçgen dalgalar), Kronoamperometri (kare dalgalar) ve Farklı puls voltametrisi (DPV, Kare dalgalar + üçgen dalgalar) şeklinde yapılabilir. En basit elektrokimyasal tekniklerden biri, devamlı sabit bir potansiyelde ölçüm yapılabilen amperometridir. Akım devamlı olarak monitörize edilebilir. Olaylar ≤1 milisaniyede ölçümlenebilir. Çalışma elektroduna devamlı voltaj uygulanmasından itibaren, mikroelektrot

tarafından kaydedilen diğer non-Faradaik akımlar azdır. Bu teknik elektrokimyasal olarak aktif moleküllerin duyarlı ölçümlerine imkan sağlar.

Glutamat amperometrik biosensörleri (mikroelektrot) genellikle L-glutamat dehidrojenaz ve L-glutamat oksidaz enzimlerine dayalı olarak üretilir (137). L-glutamat oksidaz enzimine dayalı biosensörler, oksidasyon ile elektrokimyasal olarak kolayca tespit edilebilen hidrojen peroksit (H_2O_2) yapımı için kullanılırlar (137). Teorik olarak, H_2O_2 yapım hızı glutamat konsantrasyonu ile direkt olarak ilişkilidir (135-137). L-glutamat oksidaz enzimine dayalı biosensörler ile H_2O_2 tespiti yüksek selektivite ile yapılır ancak tespit için 20-50 sn gibi bir süre gerekir (137). Bu da glutamat salınımının in vivo ve in vitro real-time monitörizasyonunu zorlaştırmaktadır. Bu nedenle amperometrik biosensörlerin spesifik selektivitesini arttırmak için "permselektif polimer modifiye elektrot" lar kullanılır. Nafion, fenilen diamin, aşırı okside olmuş polipirol gibi permselektif polimerler H_2O_2'in elektrot yüzeyini geçip, başka bileşiklerle ilişkide bulunmadan direkt olarak elektrot yüzeyinin okside olmasını sağlar (137). Bu tabaka, biosensörlerin fizyolojik monitörizasyon yapabilmesine izin verecek kadar hızlı (yaklaşık 1-2 sn) çalışmasını sağlar (137).

Amperometrik biosensörlerin performansı, elektrot yüzeyindeki enzimin etkili şekilde immobilizasyonunun sağlanması ile biosensörün sensitivite ve stabilitesinin korunmasına bağlıdır. Bunun sağlanabilmesi için L-glutamat oksidaz, polimer ile kovalen olarak bağlanır (137). Ancak bu yöntem düzgün olarak yapılamazsa, biosensörün sensitivitesinin ve kullanım süresinin azalmasına neden olabilir (137).

Bilgisayar yazılımı (software), kontrol kutusu ve bir A/D (Analogdan Dijitale Dönüştürücü) bilgisayar kartı yardımıyla, mikroelektrotlarda oksidasyon veya indirgenme reaksiyonlarının ürettiği elektrik akımını yükseltir ve bu akımı sayısallaştırır. Kullanılan bilgisayar yazılımı, saniyede 1 kayıt veya daha hızlı şekilde veri dosyalarını kaydedebilir. Bilgisayar yazılım göstergeleri, akım ve renk akım kayıtları, 40 Hz'e kadar olan kayıtları gösterebilir. Kaydedilen dosyalar diğer yazılımlarla (Excel gibi) veri işlemeye imkan sağlar veya doğrudan veri işleme analiz programına aktarılır.

Pikospritzer III, FAST 16 kayıt sistemine bağlanır ve solüsyonlar cam mikropipetten basınçla injekte edildiğinde yazılım olayları kaydeder. FAST 16 kayıt sistemi, her 4 kanalda otomatik olarak amperometrik veya kronoamperometrik bilgileri, zamanı ve basınç injeksiyon uygulamalarını kaydeder. KCl veya glutamatın basınçla injeksiyonu, depolarizasyona yol açar ve L-glutamatın hücre dışı boşluğa salınımına ve baseline ile karşılaştırılınca L-glutamatta yükselmeye yol açar. Konsantrasyondaki maksimum değişiklik, L-glutamat sinyalinin maksimum amplitüdü olarak düşünülür. Bu değer mikromolar olarak kaydedilir. Sonra sinyalin maksimum amplitüdü stimulus yapan miktara bölünür. Sonuçta sinyalin baseline'dan maksimum amplitüde ulaşma zamanı (yükselme zamanı, TR) tespit edilir. Maksimum amplitüdden sonra baseline'a doğru sinyal azalması tespit edilir. L-glutamat

sinyalinin azalması verinin doğal logaritmik transformasyonunun çizgisel azalmasının eğimidir. Bu da k-1 adını alır. k-1 sinyalin maksimum amplitüdüyle çarpıldığında alım-gerialım oranı veya saniyede ekstraselüler boşluktan uzaklaştırılan L-glutamatın mikromoları elde edilir. Bu sırada glutamatın amplitudu, maksimum amplituda ulaşma zamanı ve geri-alım süresi ile ilgili bilgiler kaydedilir.

2.9.Primer antioksidanlar (enzimler):

2.9.1.Süperoksit dismutaz (SOD):

Süperoksit dismutaz enzimi süperoksitin, hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizleyen enzimdir. SOD enziminin aktivitesi yaş artışıyla beraber artar. SOD yaklaşık olarak bütün canlılarda bulunmaktadır. Memelilerde üç tipi vardır. Bunlar sitozolde bulunan dimerik Cu ve Zn ihtiva eden Cu-ZnSOD, extraselular etki gösteren ECSOD ve mitokondri de bulunan tetramerik Mn ihtiva eden Mn-SOD izomerlerdir. SOD'nin Fe ihtiva eden izomeri Fe-SOD ise sadece mikroorganizmalarda ve bazı bitkilerde bulunmaktadır. SOD'nin tüm çeşitleri süperoksitin dismutasyon reaksiyonunu katalizleyebilirler (138).

2.9.2.Glutatyon peroksidaz (GPx):

Hücrelerde oluşan hidroperoksitlerin uzaklaştırılmasından sorumlu olan bir enzimdir. Birbirinin aynı dört subünitten oluşan tetramerik bir enzimdir. Her subünit bir selenyum atomu içerir. Bu nedenle hücreleri çeşitli hasarlara karşı koruyan bir selenoenzim olduğu düşünülmektedir (139). GPx, intrasellüler mesafede lipidleri peroksidasyondan koruyan en önemli enzimdir. Bu nedenle hücrenin yapısını ve fonksiyonunu korur (140).

2.9.3.Glutatyon s-transferaz (GST):

Hem detoksifikasyon yaparlar, hem de hücre içi bağlayıcı ve taşıyıcı rolleri vardır. Katalitik olarak, yabancı maddeleri glutatyondaki sisteine ait -SH grubu ile bağlayarak onların elektrofilik bölgelerini nötralize eder ve ürünün daha fazla suda çözünür hale gelmesini sağlarlar. Oluşan bu GSH konjugatları böylece organizmadan atılabilir ve daha ileri bir ürüne metabolize olabilirler (141).

2.9.4.Glutatyon redüktaz (GR):

Glutatyon redüktaz, yükseltgenmiş glutatyonu (GSSG) indirgenmiş (GSH) hale çevirir. Sıklıkla önce NADPH'dan sıkıca bağlı bulunan Fenil adenin difosfat (FAD)'a transfer edilirler. Daha sonraki alt birimlerdeki 2 sistein arasında bulunan disülfid köprüsüne transfer edilmek suretiyle okside glutatyona aktarılmış olurlar (142).

2.9.5.Miyeloperoksidaz (MPO):

Nötrofil granüllerde bol miktarda bulunan MPO enzimi H_2O_2'den hipoklorik asit (HOCl) oluşturmak üzere etki eder. Asidik pH oluşumuna bağlı olarak MPO aktivitesi artmakta ve membranı kolayca geçen H_2O_2 bakteriye toksik etki yapmakta ya da hidroksil ($OH^{\cdot}$) radikaline dönüşmektedir. Bu tepkimede HOCl yer almaktadır. H_2O_2 ile MPO, Cl^- iyonlarını HOCl'ye dönüştürmektedir. Çok reaktif olan HOCl birçok biyolojik molekülü oksitlemektedir (143,144).

2.9.6.Glutatyon (GSH):

GSH, bir sekonder antioksidan olup birçok hücrede bulunur (143,144). GSH, hemoglobin ve diğer eritrosit proteinlerinde bulunan sistein rezidülerini indirgenmiş halde tutarak sülfhidril tamponu görevini görür. Eritrosit hücrelerinde GSH/GSSG oranı yaklaşık 500'dür. İndirgenmiş glutatyon yani GSH, aktif bölgesinde selenyum iz elementini içeren bir enzim olan GPx enzimi katalizörlüğünde H_2O_2 ve organik peroksitlerle reaksiyona girerek antioksidant etki sergiler ve H_2O_2'yi alyuvarlardan uzaklaştırır (143,144).

GSH, hidrojen peroksidi veya organik oksitleri kimyasal olarak detoksifiye edebilir. GSH, hücre proteinlerini indirgemiş şekilde tutan disülfit-sülfidril değişimi tepkimelerinde etki gösterir. Belirli oksidaz tepkimeleriyle oluşan hidrojen peroksidi uzaklaştıran enzim GPx'e substratlık yaparak proteinlerin sülfidril gruplarını da korur. GSH yokluğunda hidrojen peroksit birikir. GSSG, GR tarafından sürekli GSH'ye indirgenerek GSH miktarı düzenlenir (143,144).

Moleküler oksijenden türeyen oksidatif radikaller iki mekanizmayla uzaklaştırılır. Birincisi, toksik radikallerin enzimatik inaktivasyonudur. İkinci mekanizma ise oksijen radikallerini kimyasal olarak inaktive eden askorbik asit, α-tokoferol ve B-karoten gibi diyetle alınan antioksidantlarla ilgilidir (145).

3.GEREÇ VE YÖNTEM:

Bu çalışmada, Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Araştırma ve Uygulama Merkezi'nden temin edilen ve ağırlıkları 270–310 gram arasında değişen toplam 12 adet Albino Wistar cinsi erkek sıçan kullanıldı. Deney hayvanları laboratuvarda normal oda sıcaklığında (22°C), doğal gece-gündüzün yaşandığı bir ortamda, altı talaş serili plastik kafeslerde barındırıldı ve standart rat yemi ile günlük olarak beslendi. Bahsedilen deney hayvanları, her biri 3 hayvandan oluşan 4 gruba ayrıldı.

1. Grup (Kontrol grubu): İntakt (sağlam) kontrol grubu sıçanlara (n=3), deney süresince diğer gruplarla eşzamanlı olarak 2 saatte bir intraperitoneal serum fizyolojik enjeksiyonu uygulandı.

2. Grup (TAA grubu): Hastalıklı grup olarak değerlendirildi (n=3). Deney başladıktan sonra iki gün süresince 2 saatte bir intraperitoneal serum fizyolojik enjeksiyonu uygulandı. Üçüncü günden itibaren 3 gün süreyle 350 mg/kg/gün intraperitoneal TAA enjekte edildi.

3. Grup (LOLA grubu): LOLA verilen grup olarak planlandı (n=3). Bu gruba deney süresince 2 saatte bir 0.6 gr/hayvan/saat intraperitoneal LOLA enjekte edildi.

4. Grup (TAA +LOLA grubu): TAA verilen gruba LOLA'ın etkisinin araştırılması için planlanan grup (n=3). Deney süresince 2 saatte bir 0.6 gr/hayvan/saat intraperitoneal LOLA enjekte edildi. Deneyin 3. gününden itibaren 3 gün süreyle 350 mg/kg/gün intraperitoneal TAA enjeksiyonu yapıldı.

TAA uygulanan gruplara (Grup 2 ve 4'e) deney süresince 25 mL/kg, %10 glukoz içeren laktatlı ringer sabah ve akşam olmak üzere günde iki kez intraperitoneal yoldan verildi. İntakt grubu sıçanlara (Grup 1 ve 3'e) ise deney süresince diğer iki grupla eşzamanlı intraperitoneal serum fizyolojik enjekte edildi.

Deneyin 5. gününde sıçanların (Grup 3'teki sıçanlar lokomotor ve elektrokimyasal glutamat ölçüm çalışmalarına alınmadı) lokomotor aktiviteleri değerlendirildi.

3.1.Lokomotor aktivite değerlendirilmesi:

Lokomotor aktivite ölçümleri aynı anda 4 deneğin lokomotor aktivitesini ölçme kapasitesine sahip, deneklerin barındıkları kafeslerden farklı, her biri 40 x 40 x 50 cm ebadında, üstü açık ve zemini talaşsız, pleksiglas lokomotor ölçüm alanlarında deneklerin horizontal, ambulatuar ve vertikal aktivitelerinin bilgisayarlı bir sistemle değerlendirilebildiği lokomotor aktivite test cihazında gerçekleştirilmiştir (MAY ACT 508-Animal Lokomotor Activity Meter, TR). Lokomotor aktivite ölçümleri için aynı anda kontrol grubundan, TAA grubundan ve TAA+LOLA grubundan birer sıçan lokomotor aktivite ölçüm cihazındaki kafeslere konuldu ve 30 dakika boyunca horizontal, vertikal ve ambulatuar aktiviteleri ölçüldü. Horizontal, vertikal ve ambulatuar aktivitelerin toplamı total aktivite olarak kaydedildi.

3.2.Mikroelektrot hazırlama:

3.2.1.Mikroelektrotların temizlenmesi:

Yeni elektrotların uçları, citrisolv solüsyonunda 5 dk. bırakıldı. Sonra 5 dk. didistile H_2O (ddH_20) ile hafifçe yıkandı. Bu yıkama sonrası, platin kayıt bölgesinde oluşan film tabaka kâğıt peçete ile kaldırıldı. Sonra 15 dk. 105–115ºC'de fırında kurutuldu.

3.2.2.Nafion kaplama:

Her bir mikroelektrot nafion solusyonuna (%5, Sigma-Aldrich Co, St.Louis) batırıldı, 5 kez döndürülüp ve çıkarıldı. Sonra nafionla kaplanmış elektrot fırına (Fisher scientific) konuldu. Beyinde voltametrik kayıtların seçiciliğini artırmak için anyonik teflon derivesi olan nafion kullanıldı. Negatif yüklü sülfonik asit grupları, polimer matriks ile yer değiştirip, platin kayıt bölgelerindeki anyonları geri itmesi ve dopamin, norepinefrin, 5-hidroksi triptofan gibi türleri yoğunlaştırması için nafion ile kaplandı. Bunun için %5'lik nafion (Sigma-Aldrich Co, St.Louis), 300 mikrolitrelik santrifüj tüplerine kondu. Mikroelektrodun ucu nafionun içine daldırılarak ve bir dönüş 1 s. sürecek şekilde sıvının içinde 5 kez döndürülüp çıkarıldı. Mikroelektrot nafion solüsyonundan çıkarıldıktan sonra, 165–175ºC'de 4 dak. fırına (Fisher scientific) konuldu. Tekrar nafiona batırılıp, çıkarıldı, 175 derecedeki fırına konuldu ve bu işlemler 5 kez tekrarlandı. Bu işlem optimal glutamat özgünlüğünü sağlamaktadır.

3.2.3.L-Glutamat oksidaz kaplama:

Mikroelektrotlar iyice temizlendikten sonra L-glutamat oksidaz enzim uygulaması yapıldı. L-glutamat oksidazın stok solüsyonu, 50 mikrolitre ddH2O ilave edilerek final konsantrasyon hazırlandı. Tüm protein ve enzimler (%1 glutamat oksidaz (Seikagau America, İnc), %1 Sığır Serum Albümin (SSA; Sigma-Aldrich) ve % 0.125 gluteraldehit (Sigma-Aldrich)) oda sıcaklığına getirildi. SSA) 0.1 gramı 1,5 mililitrelik mikrosantrifüj tüpünde 985 µl lik ddH_2O ile birleştirilerek çalkalandı. Çözülme sonrası 5 µl %25'lik gluteraldehit solüsyonu, SSA karışımına ilave edilerek karıştırıldı. Sonra karışım açık sarıya dönene kadar 5 dk. Dışarıda bekletildi. SSA- Gluteraldehit karışımından 9 mikrolitre alınarak 300 µl mikrosantrifüj tüpüne konulduktan sonra 1 mikrolitre L-glutamat oksidaz stok solüsyonu ilave edilerek pipetle karıştırıldı. Bu 10 mikrolitrelik solüsyonun son konsantrasyonları %1 SSA, %0.125 gluteraldehid ve yaklaşık %1 L-glutamat oksidaz içerir. Solüsyonlar mikroskop altında 25 µl Hamilton mikro iğnesiyle ucunda küçük damlalar oluşturacak şekilde elektrodun üzerine damlatıldı. Kuruyan solüsyon, ince, ışık geçirebilen ve mikroskop altında görülebilen bir katman oluşturur. Aynı yolla kaplamalara birer dakika arayla görülebilir bir film oluşana kadar devam edildi. Mikroelektrotlar kaplamadan sonraki üç hafta içerisinde kullanıldı.

3.2.4.Kalibrasyon:

Enzim uygulandıktan sonra mikroelektrotlar oda sıcaklığında 48–72 saat bekletildi ve kalibrasyonları yapıldı. Yoğunluğu bilinen analit (glutamik asit), 37º'de 40 mililitrelik 0.05 M PBS solüsyonuna eklenip en az bir saat bekletildikten sonra küçük karıştırıcı ile yavaşça

karıştırıldı. Ag/AgCl referans elektrodu solüsyona konuldu. Mikroelektrodun yarısı solüsyona indirildi. Bilgisayarlı sensor teknoloji (Fast Analitical Sensor Technology, Quanteon L.L.C, FAST-16) sistemine başlangıç bilgileri girildikten sonra, mikroelektrot kayıt bölgesine +0.7 V voltaj uygulandı. FAST-16 software elektrokimyasal dataları, dijital olayları ve 4 kanaldaki glutamat aktivitesi hakkında bilgi verir. Kalibrasyona başladıktan sonra akımın sabit bir baseline (taban seviye) 'a ulaşması beklendi. (10–15 dakika ya da daha uzun). Sabit baseline oluştuktan sonra bilgisayarda baseline tuşuna basıldı. Sonra 500 µl, 20 mM AA (interferent), sonuç beher konsantrasyonu 250 µM olacak şekilde eklendi. Yeni bir sabit taban seviyeye ulaşıldığında interferent tuşuna basıldı. Sonra üç kere 40 mikrolitre, 20 mM L-glutamat, sonuç beher konsantrasyonu 20, 40 ve 60 mikromolar L-glutamat olacak şekilde ilave edildi. Analit her bir ilaveden ve kalibrasyon eğimi oluşumundan sonra kaydedildi. Analitin üç defa daha ilavesinden sonra 40 mikrolitre, 2 mM DA (2 mikromolar son beher konsantrasyonu) test maddesi olarak solüsyona eklendi ve işaretlendi. En son 40 mikrolitre, 8.8 mM hidrojen peroksit mikroelektrot duyarlığını kesinleştirmek için eklendi. Kalibrasyonun bitiminde program durduruldu. Data kaydedildi. Mikroelektrot solüsyondan çıkarılıp depo edildi

3.2.5.Lokal ilaç vermek için cam mikropipetler:

Kalibrasyonlar tamamlandıktan sonra cam bir mikropipet elektrota eklendi. Bu cam mikropipet sayesinde merkezi sinir sisteminin lokal farmakolojik uygulamaları için ilaç solüsyonları basınçla injekte edilir. Vertikal pipet çekici, cam pipet hazırlamada kullanılarak 1 mm dış çap, 0.58 mm iç çapa sahip mikropipet hazırlandı. Mikroskop yardımıyla mikropipetin ucu kırılarak, tepesi 12–15 mikromilimetre olacak şekilde hazırlandı. Cam mikropipet macun ve mumla birlikte kayıt bölgelerinin ortasına gelecek şekilde pozisyonlandırıldı. Sonra mumla sabitleştirildi. Camın ucu seramik yüzeye dokundurulmadan platin kayıt bölgesine 50–100 mikron mesafede bırakıldı. Önce ilaç solüsyonu 1 ml lik tüberkülin iğnesine çekildi. Sonra 0.22 mikromilimetrelik steril filtreden geçirildi. Diğer uçtan 30-nolu hipodermik iğneye aktarıldı. İğne cam mikropipetin içine sokuldu. Cam pipet doldurularak mikroelektrot beyine implante edilmeden basınç injeksiyonu test edildi.

3.2.6.Ag/AgCl Referans elektrodu:

Minyatür Ag/AgCl referans elektrodu, gümüş telden teflon kaplamayla hazırlandı. Ucu FAST–16 ile ilişkilendirildi. Diğer ucu NaCl ile doyurulmuş 1 M HCl içine yerleştirildi. Bir platin kablo zıt elektrot olarak solüsyona sokuldu. 9 volt DC adaptör kullanıldı. Uygulanan potansiyel, kloru kabloya hareketlendirdi ve AgCl oluştu. Elektrik potansiyeli yaklaşık 10–15 dakika uygulandı. Platin zıt elektrodu çevresinde kabarcıklar oluştuğunda tam iletim sağlandığı anlaşıldı. Bu minyatür Ag/AgCl referans elektrotları in vivo kullanım öncesi 3 M NaCl içine sokuldu.

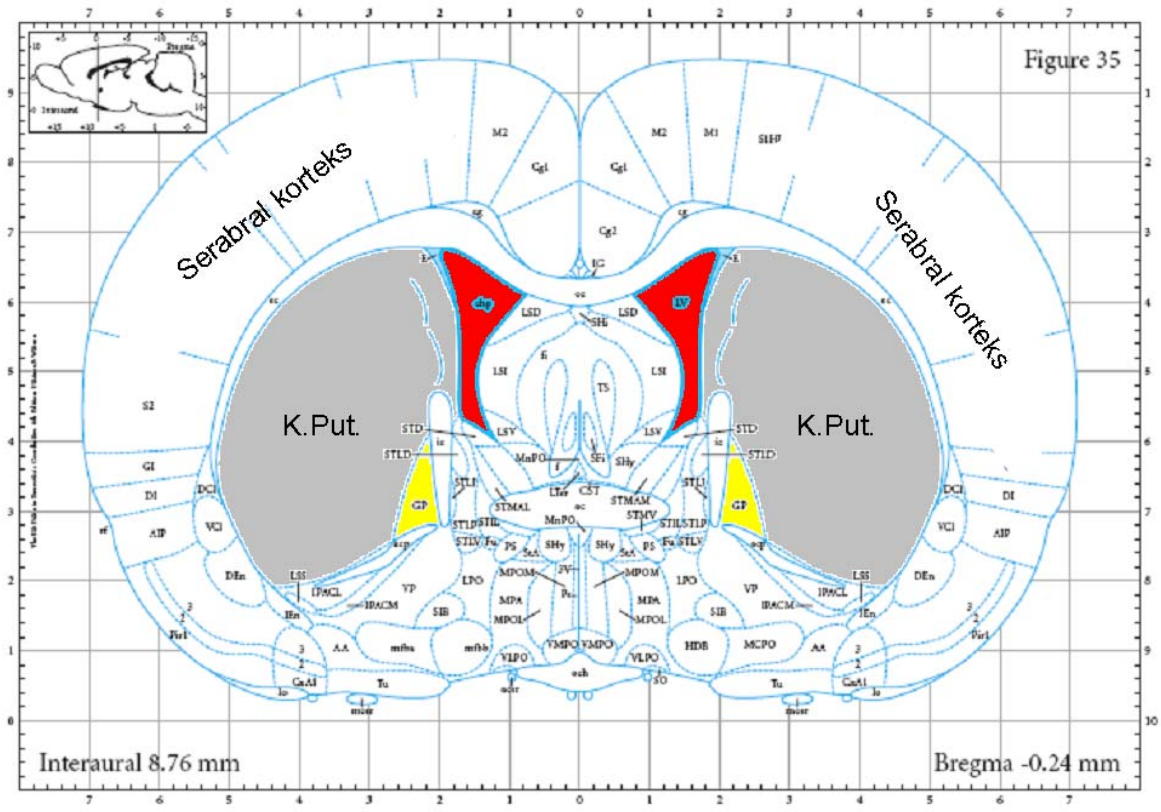
3.2.7.Voltametri mikroelektrodunun yerleştirilmesi:

Sıçanlara tiyopental 25 mg/kg intraperitoneal uygulanarak anestezi yapıldıktan sonra, voltametri elektrotları stereotaksik frame (Stoelting Co.) kullanılarak yerleştirildi. Anestezi altındaki sıçanların kafaları frame yerleştirilerek sabitlendi. Hayvanın vücut ısısının 37^0C derecede tutulabilmesi için sıçanlar hayvan ısıtıcı petlerle yanlardan desteklendi. Kafa tüyleri traş edildikten sonra kafa derisi hafif bir insizyonla kesilip sağa ve sola açılarak bregma ortaya çıkarıldı. Bu nokta referans noktası olarak alındı. Beyin atlasından elde edilen koordinatlar aracılığı ile mikroelektrotun yerleştirileceği noktadaki kafa kemiği, beyine zarar verilmeden elektrikli matkapla (Foredom 1/6 HP Series SR flexible shaft power tools) 107 nolu delici ile delinerek, kafatasının bir kısmı çıkarıldı. Forsepsle dura yana alınarak beyin yüzeyine ulaşıldı. Ag/AgCl referans elektrodu için küçük bir çukur açıldı. Kaplanmış Ag/AgCl referans elektrodu beyne sokuldu ve diş sementiyle sabitleştirildi. Paxinos ve Watson'un stereotaksik sıçan beyin atlasına göre elektrodun konulması gereken bölge tespit edildi (146). Cam mikropipet, mikroelektroda birleştirildi ve solüsyonla dolduruldu. Pikosipritzer III, cam mikropipete iliştirildi. Basınçlı injeksiyonla implantasyon öncesi kontrol yapıldı. Kontrol sonrası mikroelektrotu istenen beyin bölgesine indirmek için stereotaksik cihaza birleştirilmiş mikromanipülatör kullanıldı ve uygun koordinata elektrot yerleştirildi. Hipokampus için koordinat olarak (2,5/2,5-4/2,2-3,8), serebral korteks için (2,5/-1,9/0,6-6,9), globus pallidus için (3,2/-1/5,5-7,5) ve kaudat putamen için (3,5/0/-5,5) kullanıldı (199). Ölçüm yapılan bölgelerin şematik görünümleri Şekil 7'de verilmiştir. Kalibrasyon parametreleri FAST–16 kayıt sisteminden geri çağrılıp, mikroelektrot sabit bir baseline'e ulaştığında (15-20 dk) glutamat amplitudu, maksimuma ulaşma süresi ve geri alım süresi ile ilgili bilgilerin tespit işlemi başlatıldı.

3.2.8.Sinyal analizi:

Pikosipritzer III, FAST 16 kayıt sistemine bağlandı ve cam mikropipetten solüsyonlar basınçla injekte edildiğinde yazılım olayları kaydedildi. Glutamatın µmol basınçla injeksiyonu, depolarizasyona yol açarak L-glutamatın hücre dışı boşluğa salınımına ve baseline ile karşılaştırılınca L-glutamatta yükselmeye yol açtı. Konsantrasyondaki maksimum değişiklik, L-glutamat sinyalinin maksimum amplitüdü olarak ölçüldü. Bu değer mikromolar olarak kaydedildi. Sonra sinyalin maksimum amplitüdü stimulus yapan miktara bölündü (cam mikropipetten injekte edilen hacim). Sonuçta sinyalin baseline'dan maksimum amplitüde ulaşma zamanı (yükselme zamanı, TR) tespit edildi. Maksimum amplitüdden sonra baseline'a doğru sinyal azalması tespit edildi. Glutamatın maksimum amplitudu ve % 80'inin geri alınma süresi (T80) kaydedildi.

Voltametri ile glutamat ölçümleri yapıldıktan ve tüm kayıtlar alındıktan sonra bütün gruplar yüksek doz tiyopental sodyum ile (50mg/kg) sakrifiye edilmiş ve kan, beyin ve karaciğer çıkarılarak ilgili laboratuarlara gönderilmiştir.



Şekil 7: Kaudat putamen (CPu) gri renk ile boyanmış olarak, globus pallidus sarı renk ile boyanmış, hipokampus kırmızı renkile boyanmış alanlar ve serebral korteks S1HL,S1FL,S1DZ,S1ULp)'in Paxinos ve Watson'ın (146) stereotaksik sıçan beyin atlasındaki şematik görünümleri.

3.3.Kan AST, ALT, Amonyak, T.Bil. INR seviyelerinin ölçülmesi:

Sakrifiye edilen sıçan kanları analiz için uygun tüplere alınarak kan AST, ALT, amonyak ve T.Bil. seviyeleri ölçüldü. AST, ALT ve bilurubin düzeyleri Cobas 8000 (Tokyo, Japan) cihazı ile spektrofotometrik yöntemle çalışıldı. Kan amonyak düzeyi reflektofotometrik yöntemle (PocketChem BA PA-4130, Kyoto, Japan) ölçüldü. Protrombin zamanı tam otomatik mutiparameterik koagulasyon ölçüm cihazı ACL TOP (Instrumentation Laboratory, Paris, France) seviyeleri laser okuma yöntemiyle (Foto-optik teknoloji) ölçüldü. INR ölçümü ACL TOP cihazı için spesifik internasyonal sensitivite indeksi olan 1.85 kullanılarak hesaplandı.

3.4.Karaciğer ve Beyin Dokusunun Biyokimyasal İncelenmesi:

Sakrifiye edilen sıçanların biyokimyasal incelemeler için -20^{o}C de saklanan karaciğer ve beyin dokularındaki enzim aktivitelerini ölçmek üzere karaciğer ve beyin dokularından homojenatlar hazırlandı. Karaciğer ve beyin dokusu homojenatlarından elde edilen süpernatantlarda SOD, CAT, GST ve MPO enzim aktiviteleri ile LPO miktarları literatürlere dayalı, uygun metotlar kullanılmak suretiyle tespit edildi. Tüm ölçümler oda sıcaklığında, üç paralel tekrar olarak gerçekleştirildi.

3.4.1. Doku Homojenatlarının Hazırlanması:

Karaciğer ve beyin dokuları bir havan içinde sıvı azot ile öğütülerek toz haline getirildi. Her bir sıçan grubu dokularından 0,5 g tartıldı, üzerlerine 4,5 ml tampon çözeltilerden (her parametre için farklı bir tampon sistemi kullanılarak) ilave edilerek 1/10 oranında seyreltildi. Bu homojenatlar sonra homojenizatörde 10 dakika süreyle buz üzerinde homojenize edildi. Homojenatlar bir süzgeç kağıdından süzüldükten sonra soğutmalı santrifüj kullanılarak her enzim için literatürlerde belirtilen hızlarda 4^{o}C'de santrifüj edildi ve hazırlanan bu süpernatantlarda biyokimyasal araştırmalar yapıldı (147).

3.4.2.Süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesinin ölçümü:

SOD aktivitesi Sun ve arkadaşları tarafından tarif edilen yönteme göre ölçüldü (148). Karaciğer ve beyin dokuları homojenize edildikten sonra 18.000 g'de 1 saat santrifüj edildi. Cam bir spektrofotometre küvetine 2450 µl ölçüm karışımı (0,3 mM ksantin, 0,6 mM EDTA, 150 µM NBT, 0,4 M Na_2CO_3, 1,2 g/L BSA), 500 µl supernatant, 50 µl ksantin oksidaz eklendikten sonra karıştırılarak yaklaşık 20 dakika inkubasyona bırakıldı ve 100 µl 0,8 mM $CuCl_2$ ilave edilerek reaksiyon sonlandırıldı. Oluşan formazon miktarları 560 nm'de 3 ml'lik kuvartz küvetler kullanılarak okundu ve seyreltme katsayıları dikkate alınarak aşağıdaki geliştirilen formülden aktivite değerleri (EU) elde edildi ve SOD aktivitesi *mmol/dakika/mg doku* olarak tarif edildi.

3.4.3.Glutatyon *s*-transferaz (GST) aktivitesinin ölçümü:

Sıçan karaciğer ve beyin dokusundan elde edilen homojenatların GST aktiviteleri Habig ve Jakoby tarafından belirtilen prosedür doğrultusunda belirlendi (149). Son konsantrasyonları: 0,1 M KH_2PO_4 tamponu (pH 6,5), 1 mM CDNB ve 1 mM glutatyon olacak şekilde reaktifler 3 ml'lik kuvartz küvete pipetlendi. GSH katılır katılmaz küvet altüst edilerek absorbanslar 3 dakika boyunca ve 15 saniyede bir kaydedildi. 3 dakikalık zaman aralığındaki absorbans değişiminin lineer olduğu kısımdan dakika başına absorbans değişimi tesbit edildi. Ölçümlerde lineer olarak absorbans artışı olan aralıktan dakika başına absorbans azalması hesaplandı. GST aktivitesi, seyrelme faktörleri dikkate alınarak *nmol/dakika/mg doku* olarak tarif edildi.

3.4.4.Miyeloperoksidaz (MPO) aktivitesinin ölçümü:

MPO aktivitesi ölçümü için, 0,1 g doku alınarak üzerine 10 ml 50 mM fosfat tamponu (pH 6.0) ilave edilerek homojenize edildi. Oluşan homojenat 3500 g 4^{o}C'de 30 dakika santrifüj edilerek süpernatantlar MPO aktivitesi ölçümünde enzim kaynağı olarak kullanıldı. Kuvartz spektrofotometre küveti içerisine 2,8 ml ölçüm tamponu, 0,12 ml homojenat tamponu ve 0,12 ml numune çözeltisinden ilave edildiği anda kronometre çalıştırıldı. Kuvartz küvet spektrofotometrede 460 nm dalga boyunda 30 saniye aralıklarla ve 5 dakika süreyle ölçülerek absorbans azalması köre karşı kaydedildi (150). Ölçümlerde lineer olarak

absorbans azalması olan aralıktan dakika başına absorbans azalması hesaplandı. MPO aktivitesi, seyrelme faktörleri dikkate alınarak *µmol/dakika/mg doku* olarak tarif edildi.

3.4.5.Lipid peroksidasyon (LPO) miktarı ölçümü:

0,5 g doku üzerine 4,5 ml %10 KCl ilave edilerek homojenize edildi. Homojenatlar, 5000 g 4^{o}C'de 20 dakika santrifüj edildi ve bu süpernatantlar, LPO miktarının belirlenmesinde kullanıldı. Kapaklı deney tüpleri içerisine 250 µl homojenat, 100 µl %8 sodium lauril sulfat (SLS), 750 µl %20 asetik asit, 750 µl %0,08 TBA ve 150 µl distile su pipetlenerek vortekslendi. Karışım 100^{o}C'ta 60 dakika inkubasyona bırakıldıktan sonra üzerine 2,5 ml *n*-bütanol ilave edildi ve ölçüm alındı (150). Oluşan kırmızı renk miktarları 532 nm'de 3 ml'lik cam küvetler kullanılarak okundu ve seyreltme katsayıları dikkate alınarak önceden hazırlanan MDA stok çözeltisi kullanılarak oluşturulan standart grafikten yararlanarak ölçümler yapıldı. Numunelerin LPO miktarları, *nmol MDA/g doku* olarak tarif edildi. Tüm antioksidantların ölçümü 3 tekrar yapılarak belirlendi.

3.5.Histopatoloji:

Sakrifiye edilmiş, sıçanların karaciğer ve beyin dokuları, Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Ana Bilim Dalı Laboratuaralarında 24 saat süreyle %10' luk formaldehit solusyonunda tespit edildi. Tespit edilen örnekler daha sonra rutin histolojik doku takibinden (yükselen alkol serileri, ksiloller, parafin) geçirildi ve parafinde bloklandı. Hasarı tespit etmek amacıyla parafin bloklardan 5µm kalınlıgında alınan kesitlere Hematoksilen-Eozin boyama yöntemi uygulandı. Beyin dokuları ayrıca immunohistokimyasal boyama için glial fibriller asidik protein (GFAP) boyası uygulandı. Hazırlanan preparatlar Olympus BX51 tipi ışık mikroskobunda incelenerek, ilgili kısımlardan fotograf çekimi yapıldı.

3.6.İstatistiksel Analizler:

İstatistiksel analizler Statistical Packages for the Social Sciences (SPSS) 13.0 yazılım programı kullanılarak yapıldı. Bütün istatistiksel farklılıklar ve önem seviyeleri one-way variance analyzes (ANOVA) testi ile belirlendi. Çoklu karşılaştırmalarda Duncan ve LSD testi uygulandı ve $p<0.05$ seviyesindeki sonuçlar önemli kabul edildi.

4. BULGULAR:

Çalışmadaki grupların plazma alanin transaminaz (ALT), aspartat transaminaz (AST), total bilürübin (T.Bil), amonyak, kreatinin ve INR (International Normalization Ratio) sonuçları Tablo 3'te verilmiştir. ALT ve AST değerleri tiyoasetamid (TAA) grubu (grup 3) ve tiyoasetamid + L-ornitin L-aspartat (TAA+LOLA) grubunda (grup 4), kontrol grubundan (grup 1) belirgin olarak yüksekti ($p<0.001$). Grup 1'in ALT seviyesi LOLA grubun (grup 2)'dan daha düşük ($p<0.05$) olmasına rağmen her iki grubun AST seviyeleri benzerdi ($p>0.05$). Grup 3'ün ALT ve AST değerleri grup 4'den belirgin olarak daha yüksek olarak tespit edildi ($p<0.001$). Plazma T.Bil. seviyesi Grup 1'de, diğer gruplardan daha düşük idi ($p<0.05$). Grup 3'ün T.Bil. seviyesi grup 4'den daha yüksek olarak bulundu ($p<0.05$). Kan amonyak konsantrasyonu grup 1 ile grup 2 ve 4 benzerdi ($p>0.05$). Grup 3 kan amonyak konsantrasyonu, grup 1 ve 4'den belirgin olarak yüksek bulundu ($p<0.001$).

Tablo 3: Grupların ALT, AST, T.Bil., amonyak, kreatinin ve INR ortalama değerleri.

Grup	ALT (IU/ml)	AST (IU/ml)	T.Bil (mg/dl)	Amonyak (µg/dl)	Kreatinin (mg/dl)	INR
Kontrol	56.3±3.2	124.3±13.5	0.06±0.006	39.7±4.2	0.31±0.05	1.06±0.03
LOLA	54.7±9.1	118.3±8.6	0.08±0.02	35.2±4.2	0.32±0.02	1.07±0.02
TAA	155.7±9.9	278.4±10.0	0.13±0.012	307.0±48.7	0.35±0.03	1.40±0.05
TAA+LOLA	87.0±6.0	167.0±11.1	0.10±0.006	69.3±4.7	0.35±0.03	1.13±0.04

LOLA: L-ornitin L-aspartat verilen grup; TAA: Tiyoasetamid verilen grup; TAA+LOLA: L-ornitin L-aspartat ve Tiyoasetamid verilen grup; ALT: Alanin transaminaz; AST: Aspartat transaminaz; T.Bil: Total bilurubin; INR: International Normalization Ratio.

Çalışmadaki tüm grupların karaciğer dokusunda belirlenen GST, SOD, MPx aktivitelerini ve LPO miktarını gösteren sonuçlar Tablo 4'de gösterilmiştir GST, SOD, MPx aktiviteleri, seyrelme faktörleri dikkate alınarak *mmol/dakika /mg doku* olarak tarif edilmiştir. Numunelerin LPO miktarları, *nmo/ g doku* olarak tarif edilmiştir. Tablo ve şekillerde ortalamalar istatistik sonucuna göre harflendirildi. İstatistiki olarak birbirine benzer olanlar aynı harflerle gösterildi. Birbirleri ile aralarında istatistiki farklılık bulunanlar farklı harflerle gösterildi. Benzer şekilde tüm grupların beyin dokusunda belirlenen GST, SOD, MPx aktivitelerini ve LPO miktarını gösteren sonuçlar Tablo 5'de gösterilmiştir GST, SOD, MPx aktiviteleri, seyrelme faktörleri dikkate alınarak *mmol/dakika /mg doku* olarak tarif edilmiştir. Numunelerin LPO miktarları, *nmo/g doku* olarak tarif edilmiştir. Tablo ve şekillerde ortalamalar istatistik sonucuna göre harflendirildi. İstatistiki olarak birbirine benzer olanlar aynı harflerle gösterildi. Birbirleri ile aralarında istatistiki farklılık bulunanlar farklı harflerle gösterildi.

Tablo 4: Karaciğer dokusunda antioksidan düzeyleri.

Grup	GST aktivitesi (µmol/dak/ mg doku)	SOD aktivitesi (mmol/dak/mg doku)	MPx aktivitesi (µmol/dak/mg doku)	LPO miktarı (nmol/g doku)
Kontrol	344.27±1.9a	90.37±0.3a	34.19±0.7b	19.82±0.2d
LOLA	359.55±3.5b	126.0±0.5d	16.04±0.3a	14.91±4.9b
TAA	367.36±2.6c	110.53±0.3b	35.26±0.7b	16.41±0.1c
TAA+LOLA	338.89±2.3a	113.92±9.3c	14.52±0.4a	12.82±0.6a

LOLA: L-ornitin L-aspartat verilen grup; TAA: Tiyoasetamid verilen grup; TAA+LOLA: L-ornitin L-aspartat ve Tiyoasetamid verilen grup GST: Glutatyon s-transferaz; SOD: Süperoksit dismutaz; MPx: Myeloperoksidaz; LPO: Lipid peroksidasyon. Aynı harfli değerler Duncan testine göre istatistiksel olarak farklı olmadığını göstermektedir ($p>0.05$). Farklı harfler birbiri ile istatistiki olarak anlamlılığı yansıtmaktadır ($p<0.05$).

Tablo 5: Beyin dokusunda antioksidant düzeyleri.

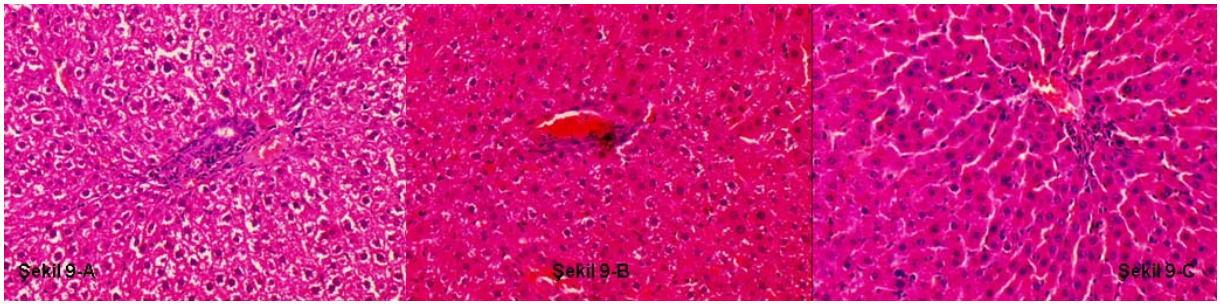
Grup	GST aktivitesi (µmol/dak/ mg doku)	SOD aktivitesi (mmol/dak/mg doku)	MPx aktivitesi (µmol/dak/mg doku)	LPO miktarı (nmol/g doku)
Kontrol	45.31±0.8b	121.07±0.2a	9.15±2.0d	17.3±4.9d
LOLA	47.05±1.0b	174.24±0.3d	3.55±5.7a	13.5±4.2a
TAA	52.95±1.0c	142.15±0.4b	7.69±0.2c	15.7±6.5c
TAA+LOLA	37.85±1.4a	160.45±0.4c	5.20±5.4b	14.4±4.2b

LOLA: L-ornitin L-aspartat verilen grup; TAA: Tiyoasetamid verilen grup; TAA+LOLA: L-ornitin L-aspartat ve Tiyoasetamid verilen grup GST: Glutatyon s-transferaz; SOD: Süperoksit dismutaz; MPx: Myeloperoksidaz; LPO: Lipid peroksidasyon. Aynı harfli değerler Duncan testine göre istatistiksel olarak farklı olmadığını göstermektedir ($p>0.05$). Farklı harfler birbiri ile istatistiki olarak anlamlılığı yansıtmaktadır ($p<0.05$).

Kontrol grubundaki sıçanların karaciğer kesitlerinde normal hepatik mimari ve normal lobüler yapı bozulmamıştı. Kontrol grubundaki sıçanların hepatositlerinde yaygın balonlaşma dejenerasyonu izlendi (Şekil 8-A).

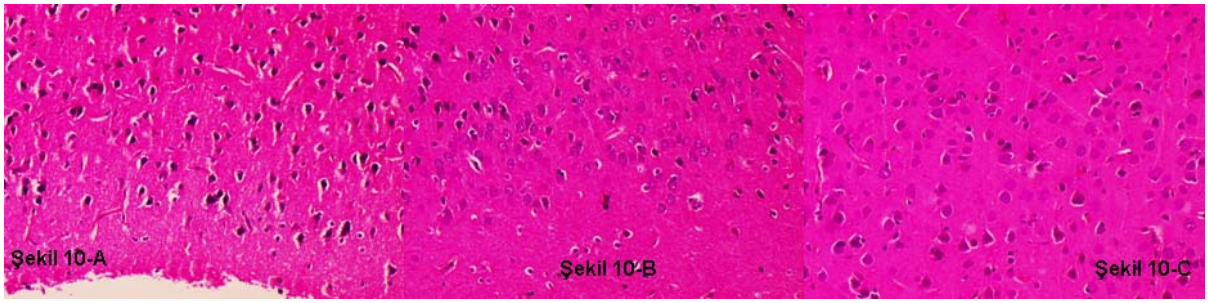
TAA verilen sıçanlarda sentrilobüler nekroz, periportal hepatositik vakuolizasyon ve yer yer enflamasyon gözlendi. Hepatositlerde kısmi balonlaşma dejenerasyonunun yanısıra histopatolojik olarak, çok çekirdekli hücrelerin sayıca artması ve hepatosit kordonlarının kalınlaşması şeklinde izlenen rejenerasyon bulguları vardı (Şekil 8-B).

TAA+LOLA verilen gruptaki sıçanların karaciğerinde, TAA grubuna göre daha az enflamasyon ve nekroz izlendi. Hepatositlerde ise belirgin rejenerasyon vardı (Şekil 8-C).



Şekil 8: A- Kontrol grubundaki bir sıçanın hepatositlerindeki yaygın balonlaşma dejenerasyonu. B- TAA verilen gruptaki sıçanlardan birisinde hepatositlerdeki kısmi balonlaşma dejenerasyonu ile rejenerasyon bulguları. C- TAA+LOLA verilen sıçanların birinin karaciğerindeki hepatosit rejenerasyonları.

Kontrol grubundaki sıçan beyinlerinde asidofilik nöronal sitoplazma ve karyoreksi ile ("kırmızı nöron") yaygın serebral Akut nöron ölümü izlendi (Şekil 9-A). TAA verilen sıçanlarda orta derecede Akut nöron ölümü izlenirken (Şekil 9-B), LOLA grubunda ise az sayıda serebral Akut nöron ölümü gözlendi (Şekil 9-C). TAA grubunda kontrol gubuna göre immunohistokimyasal olarak GFAP ile daha az boyandı.



Şekil 10- A- Yaygın serebral Akut nöron ölümü. B- Orta derecede Akut nöron ölümü. C- Az sayıda Akut nöron ölümü.

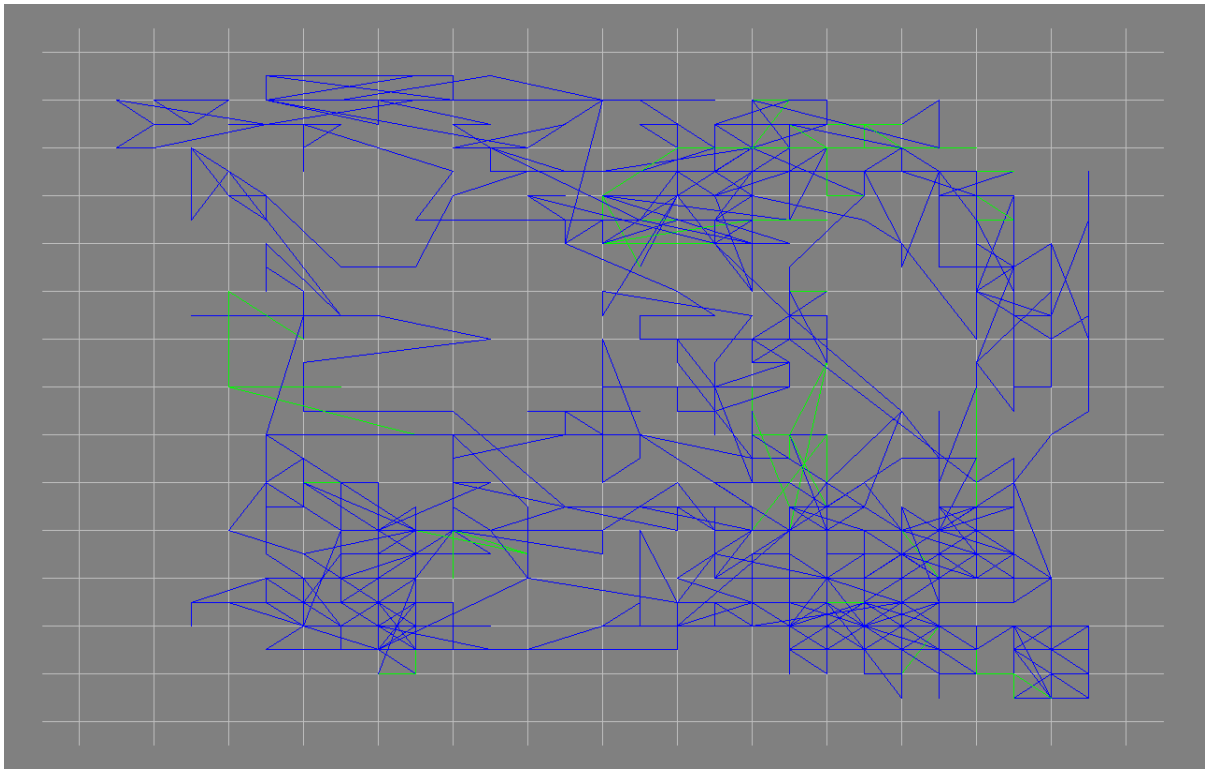
Lokomotor aktivite ölçüm sonuçları Tablo 6'da verilmiştir. Kontrol, TAA ve TAA+LOLA gruplarındaki birer deneğin lokometrik aktivite ölçüm cihazı ile 30 dakikalık ölçüm süresince yaptığı ambulatuar ve vertikal hareketlerin diyagramları Şekil 10, 11, 12'de verilmiştir. Kontrol grubunun stereotipik hareket sayısı ve vertikal hareket sayısı TAA grubundan belirgin olarak fazla idi ($p=0.001$). Kontrol grubunun stereotipik hareket sayısı ve vertikal hareket sayısı TAA+LOLA grubundan fazla idi ($p<0.05$). Ancak ambulatuar hareket sayısı kontrol grubunda TAA grubuna göre fazla iken ($p<0.05$), TAA+LOLA grubuyla fark tespit edilmedi ($p>0.05$). Stereotipik hareket yapılan toplam zaman ve vertikal hareket yapılan toplam zaman benzer şekilde kontrol grubunda, TAA grubuna göre belirgin olarak fazla idi ($p<0.001$). Kontrol grubundaki ambulatuar hareket yapılan toplam süre TAA grubuna göre daha fazla bulundu ($p<0.05$). Stereotipik hareket yapılan toplam zaman kontrol grubunda, TAA+LOLA grubuna göre daha uzun idi ($p<0.05$). Ayrıca kontrol grubunun vertikal hareket yapılan toplam süresi TAA+LOLA grubuna göre belirgin olarak uzun tespit edildi ($p<0.001$). Ancak kontrol grubunun ambulatuar hareket yapılan toplam süresi ile TAA+LOLA grubunun süreleri arasında fark yoktu ($p>0.05$). Kontrol grubunun gittiği (yürüdüğü) mesafe TAA grubundan belirgin olarak fazla bulundu ($p=0.001$). Ayrıca TAA+LOLA grubundan da daha fazla mesafe aldıkları gözlendi ($p<0.05$). Kontrol grubunun deney sırasında hareket etmeksizin geçirdiği süre, TAA grubundan belirgin derecede az olarak gözlendi ($p<0.001$). Ayrıca TAA+LOLA grubundan da daha az hareket etmeden (dinlenerek) zaman geçirdiği tespit edildi ($p<0.05$).

Tablo 6:Grupların lokomotor aktivite ölçüm değerleri.

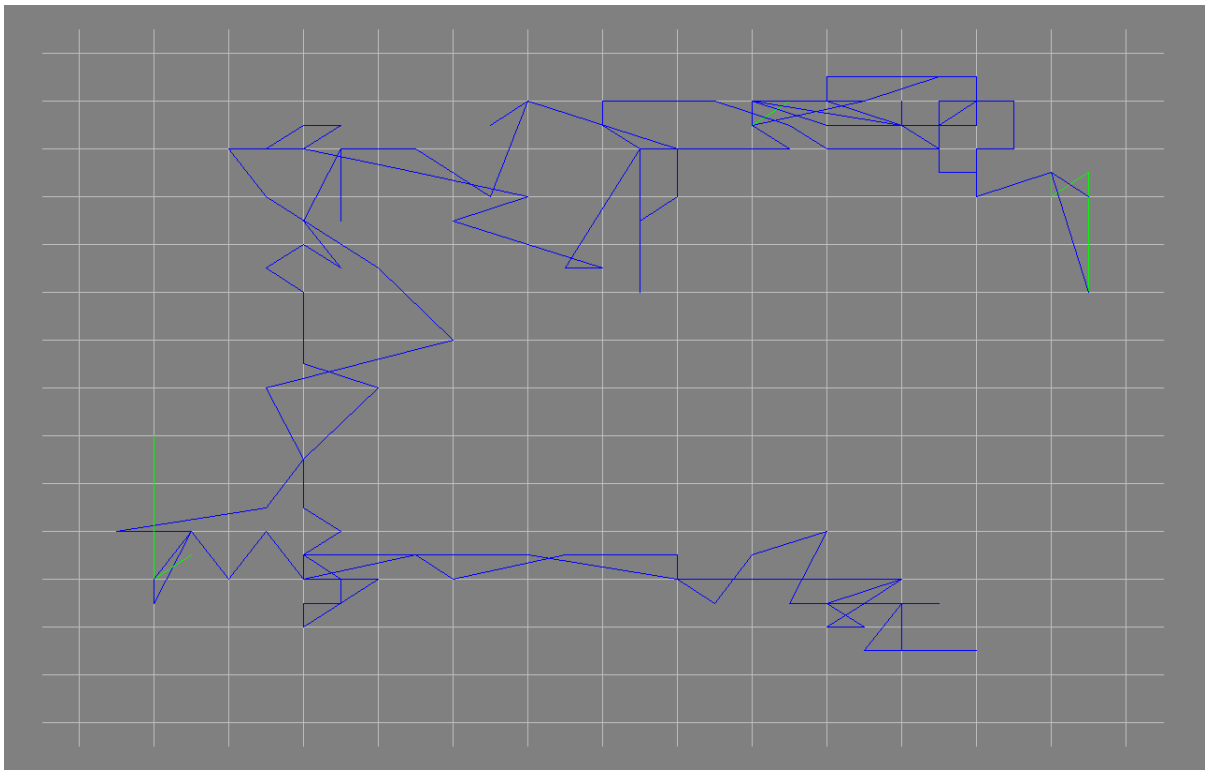
	Kontrol	TAA	TAA+LOLA
SHS	902,8± 168,6	140,0± 63,1	489,7± 326,2
AHS	603,0± 145,1	112,8± 66,8	381,3± 306,1
VHS	22,8± 8,0	2,3± 2,2	5,7± 5,5
SHSÜ (sn)	235,1±44.0	36,4±16,4	127,3±84,9
AHSÜ (sn)	156,7±37.4	29,5±17,2	99,1±79,5
VHSÜ (sn)	32,0±5.6	2,6±2,3	3,2±0,4
DS (sn)	1377,0± 70,0	1733,7± 25,9	1573,1± 123,5
HM (cm)	1112,6±228,8	201,0±103,3	605,8±350,3

TAA: Tiyoasetamid verilen grup; TAA+LOLA: L-ornitin L-aspartat ve Tiyoasetamid verilen grup; SHS: Stereotipik hareket sayısı; AHS: ambulatuar hareket sayısı; VHS: hareket sayısı; SHSÜ: Stereotipik hareket yapılan toplam zaman; AHSÜ: ambulatuar hareket yapılan toplam zaman; VHSÜ: hareket sayısı yapılan toplam zaman; DS: Dinlenme ile geçirilen süre; HM: Hareket edilen toplam mesafe

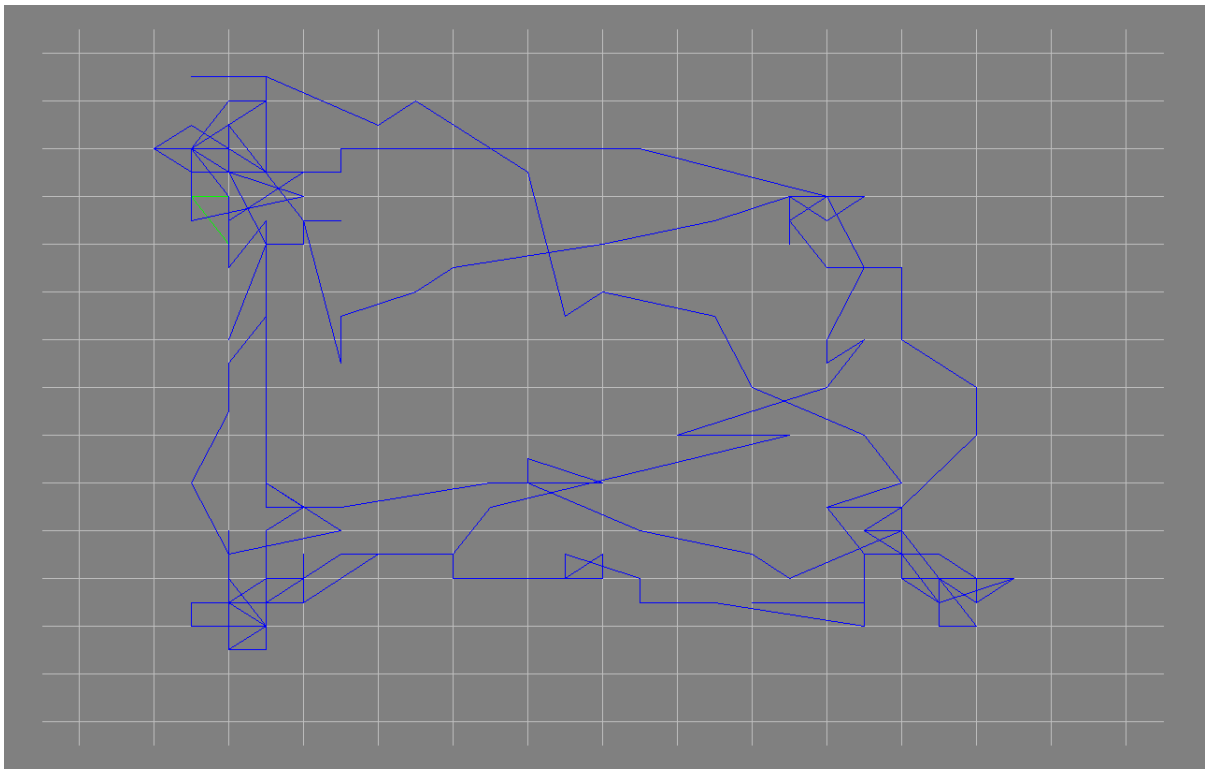
TAA grubu ile TAA+LOLA grupları arasında sıçanların yaptığı ambulatuar hareketlerin sayısı ve süresi ile vertikal hareket sayı ve süreleri arasında fark yoktu ($p>0.05$). Sıçanların yaptığı stereotipik hareketlerin sayı ve süreleri arasında ise sınırda farklılık izlendi (sırasıyla $p=0.048$ ve $p=0.049$). TAA grubundaki sıçanların yürüdüğü mesafe ile TAA+LOLA grubundaki sıçanların mesafesi arasında fark yoktu ($p>0.05$).



Şekil 10: Kontrol grubundaki bir sıçanın yaptığı hareketler. Mavi çizgiler ambulatuar hareketleri, yeşil çizgiler vertikal hareketleri göstermektedir.



Şekil 11: TAA grubundaki bir sıçanın yaptığı hareketler. Mavi çizgiler ambulatuar hareketleri, yeşil çizgiler vertikal hareketleri göstermektedir.



Şekil 12: TAA+LOLA grubundaki bir sıçanın yaptığı hareketler. Mavi çizgiler ambulatuar hareketleri, yeşil çizgiler vertikal hareketleri göstermektedir.

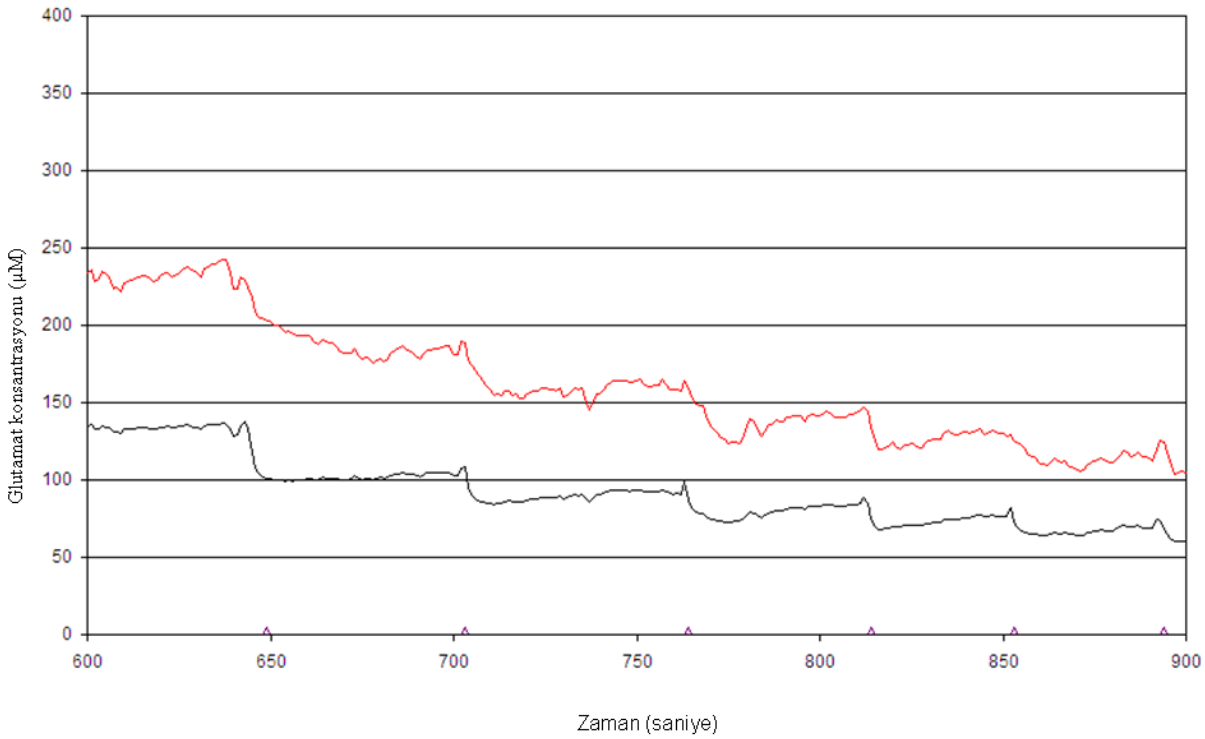
Glutamatın voltametrik elektrokimyasal ölçümlerinde 3 ayrı parametre değerlendirildi. Beyindeki anatomik bölgelere göre kontrol, TAA ve TAA+LOLA gruplarındaki sıçanların dışarıdan verilen ve ortamdaki glutamatın % 80'inin geri alım süreleri, glutamatın maksimum amplituda geliş süresi ve glutamat amplitudu ölçüm değerleri tablo 7'de gösterilmiştir. Kontrol, TAA ve TAA+LOLA gruplarına ait sıçan beyinlerinden yapılan in vivo glutamat konsantrasyonu, maksimum akplituda yükselme süresi ve glutamatın geri alımının grafikleri şekil 13,14 ve 15'de verilmiştir.

Kontrol grubunun glutamatın % 80'ini geri alma süresi 7.1 ± 9.7 sn, TAA grubunun 99.4± 46.7 sn ve TAA+LOLA grubunun ise 25.8 ± 18.7 sn idi. Kontrol grubunun glutamatın % 80'ini geri alma süresi TAA grubundan belirgin olarak daha kısa bulundu ($p<0.001$). Ayrıca kontrol grubunun glutamatın % 80'ini geri alma süresi TAA+LOLA grubundan da kısa idi ($p<0.05$). LOLA+ TAA grubunun da glutamatın % 80'ini geri alma süresi TAA grubundan belirgin olarak daha kısa idi ($p<0.001$).

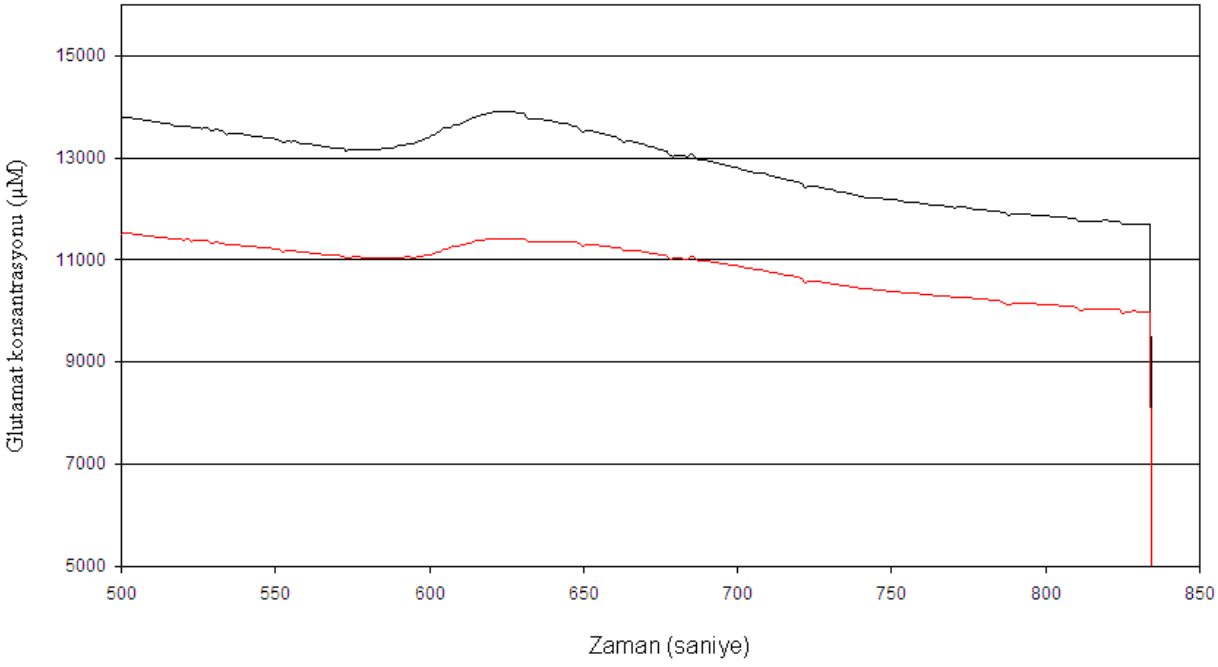
Tablo 7: Grupların glutamat konsantrasyonları ve kinetik değerleri

	Geri alım T%80 (sn)	**Glutamat Amplitudu**	**MGAS (sn)**
SK-KONTROL	4,8± 1,5 (n=18)	74,3± 80,0 (n=23)	9,1± 11,1 (n=23)
GP-KONTROL	7,1± 6.0 (n=13)	63,2± 63,2 (n=24)	4,8± 6,1 (n=30)
KP-KONTROL	5,1± 2.1 (n=14)	25,6± 15,1 (n=24)	9,8± 11,0 (n=17)
HK-KONTROL	15,6±22.8 (n=8)	9,3±12,5 (n=13)	26,3±1,0 (n=16)
SK-TAA	92,7± 3,1 (n=3)	308,5± 48,8 (n=2)	119,1± 67,3 (n=3)
GP- TAA	120,2± 64.9 (n=5)	64,1± 44,3 (n=10)	112,4± 67,3 (n=5)
KP- TAA	92,4± 54,6 (n=5)	46,4± 27,1 (n=5)	41,7± 8,0 (n=7)
HK- TAA	96,6±44,6 (n=17)	405,7± 492,5 (n=29)	67,4± 48,5 (n=16)
SK- TAA+LOLA	38,8± 16,0 (n=8)	27,9± 40,9 (n=15)	20,9± 19,0 (n=13)
GP- TAA+LOLA	14,3± 2,1 (n=3)	2,8± 0,8 (n=5)	1,0± 0,1 (n=3)
KP- TAA+LOLA	10,0± 2,0 (n=3)	6,4± 4,0 (n=3)	27,5± 16,3 (n=2)
HK- TAA+LOLA	22,2± 21,5 (n=6)	30,0± 44,5 (n=10)	56,6± 41,5 (n=8)

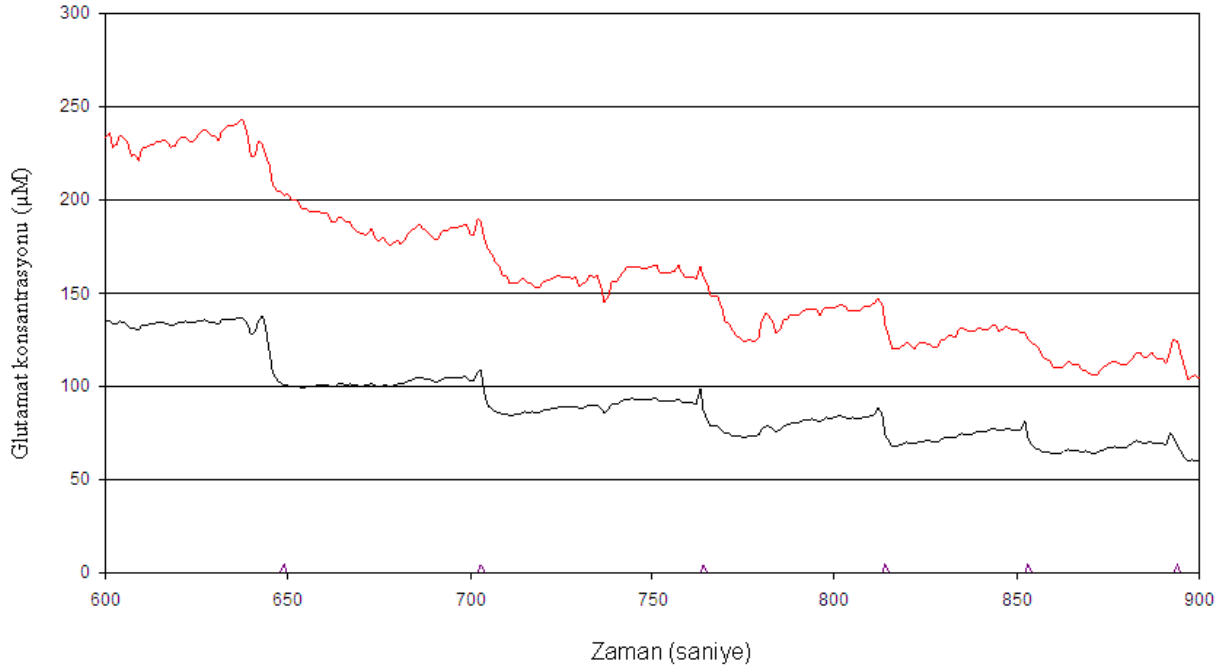
TAA: Tiyoasetamid verilen grup; TAA+LOLA: L-ornitin L-aspartat ve Tiyoasetamid verilen grup; SK: Serebral korteks; GP: globus pallidus; KP: kaudat putamen; HK: hipokampus; n: alınan toplam ölçüm sayısı; Geri alım T%80: glutamatın % 80'inin geri alınma süresi; MGAS: Maksimum glutamat amplituduna ulaşma süresi.



Şekil 13: Kontrol grubundaki bir sıçanın beynine verilen glutamatın bazal amplitudu, maksimum amplituda yükselişi ve geri alımının grafik olarak görünümü.



Şekil 14: TAA grubundaki bir sıçanın beynine verilen glutamatın bazal amplitudu, maksimum amplituda yükselişi ve geri alımının grafik olarak görünümü.



Şekil 15: TAA+LOLA grubundaki bir sıçanın beynine verilen glutamatın bazal amplitudu, maksimum amplituda yükselişi ve geri alımının grafik olarak görünümü.

Kontrol grubunun glutamatın maksimum amplituda geliş süresi 10.9± 13.3 sn, TAA grubunun 73.8± 50.1 sn ve TAA+LOLA grubunun 30.1± 32.2 sn idi. Kontrol grubunun glutamatın maksimum amplituda geliş süresi TAA grubundan belirgin olarak daha kısa gözlendi ($p<0.001$). Kontrol grubunun glutamatın maksimum amplituda geliş süresi TAA+LOLA grubundan da kısa idi ($p<0.05$). LOLA+ TAA grubunun glutamatın maksimum amplituda geliş süresi de TAA grubundan belirgin olarak daha kısa idi ($p<0.001$).

Kontrol grubunda çevre dokudaki glutamatın amplitudu 47.2± 59.4 µM, TAA grubunda 288.2± 421.9 µM ve TAA+LOLA grubunda 22.7± 37.5 µM olarak tespit edildi. Kontrol grubu ile TAA+LOLA grubu arasında fark bulunmadı ($p>0.05$). Ancak TAA grubu ile hem kontrol grubu hemde TAA+LOLA grubu arasında belirgin farklılık mevcuttu ($p<0.001$).

5. TARTIŞMA:

Hepatik ensefalopati (HE), karaciğer hastalığı ile ilişkili olarak psikomotor, entellektüel, bilişsel ve emosyonel durumlarda reverzibl olarak bozulmayı ifade eden nöropsikiyatrik bir sendromdur (2,13). GABA'te artma (artmış nöroinhibisyon), glutamat değişiklikleri, artmış endojen benzodiazepinler, nörosteroidlerin nörotransmisyonunda bozukluklar ve amonyak birikiminin HE patogenezinde önemli olduğu bildirilmektedir (23,36,151,152). KC sirozundaki HE'de izlenen değişik semptomlar ve bunların reverzibilitesi, HE patogenezinde önerilmiş çok sayıda değişik modelle açıklanmaya çalışılmıştır (2).

AKY'de arteriyel amonyak seviyesinin serebral ödemi gösterebileceği düşünülmüştür. Bu konuda Clemmesen ve ark. arteriyel amonyak seviyesinde cut off değeri olarak 150 mmol/l'yi belirlemişler ve bu değerin bulunmasının serebral ödemi gösterebileceğini bildirmişlerdir (9,32). Bhatia ve ark. da benzer bulgular bildirmişken, Bernal ve ark., arteriyel amonyak seviyesinin 200 mmol/l üzerinde olmasının komplikasyonların prediktörü olabileceğini ifade etmişlerdir (7,32,113). Bernal ve ark.'nın erken renal replasman tedavisine başlamış olmaları, diğer çalışmalar ile aralarındaki farklılığın sebebi olabilir. AKY, kronik karaciğer hastalığında gelişen akut karaciğer yetmezliği (akut-on-kronik) ve kronik karaciğer yetersizliğinde klinik bulgu, semptomların gelişme süresi ve prognoz farklıdır. Bunun sebebi de muhtemelen kan amonyak seviyeleridir. Kronik karaciğer hastalarının hepatik venöz amonyak konsantrasyonu 40– 60 μM, kronik karaciğer hastalığında gelişen akut karaciğer yetmezliğinde 70–90 μM ve AKY'de ise 200– 240 μM olarak tespit edilmiştir (9,55,153). AKY modelli çalışmalarda Bemeur ve ark.'ı sıçan kan amonyak düzeyini 503±69 μM, Jiang ve ark. ise 728.7±32.0 μM olarak bulmuşlardır (154,155). Çalışmalar arasındaki farklılığın sebebi olarak AKY oluşturma yöntemleri ve amonyak ölçüm zamanında standardizasyon olmaması gözükmektedir. Çalışmamızda kontrol grubundaki sıçanların amonyak seviyesini tiyoasetamid (TAA) grubundan belirgin yüksek bulduk (sırasıyla 39.7±4.2 μg/dl, 307.0±48.7 μg/dl).

Hiperamonyeminin deney hayvanları ve astrosit kültürlerinde protein fosforilasyonunu bozduğu ve stoplazma proteini olan glial fibriller asidik protein (GFAP)'inin ekspresyonunu azalttığı gösterilmiştir (57,156-159). Groeneweg ve ark. amonyak infüzyonu yaparak AKY oluşturdukları tavşanlarda, glial hücre GFAP'lerinde azalma izlemediklerini rapor etmişlerdir (160). Çalışmamızda AKY oluşturulmuş sıçan beyinlerinde, kontrol grubundaki sıçan beyinlerine göre GFAP'de azalma olduğunu tespit ettik. Norenberg ve ark. da bizim gibi GFAP da azalma tespit etmişlerdir. Bu farklılığın nedeni, biz çalışmamızda TAA infüzyonu ile akut karaciğer hasarı yaparak AKY oluşturmuşken, Groeneweg ve ark. AKY oluşturmak için amonyak infüzyonu yapmışlar ve AKY'deki amonyak konsantrasyonuna ulaşmışlardır. Ancak AKY'deki HE patogenezinde yalnızca hiperamonyemi olmayıp, ayrıca karaciğer yetersizliğine

bağlı olarak meydana gelen oksidatif stresteki artış, enflamatuar sitokinler ve GABA gibi çok sayıda başka nedenlerin de rolü olabilir. Bu çalışma ancak hiperamonyeminin beyine etkilerini gösteren bir çalışma olarak sunulabilir. Dolayısıyla çalışmamız ve diğer benzer AKY yapılan çalışmalarda GFAP'in düşük bulunması, GFAP mRNA'nın amonyağa dayanıksız olduğunu göstermektedir Ancak AKY'nin tedavi sonrası tamamıyla düzeliyor olması, bu durumun da reversbl olduğunu da düşündürür (46,57,157-159,161).

AKY'deki asıl patolojik bulgu değişik nedenler sonucunda astrosit şişmesi ve buna bağlı beyin ödemi ile herniasyondur. AKY'de hücre kaybı nadiren izlenir (63,65). HE'de primer gliopatiye bağlı sekonder nöronal fonksiyon değişikliği olduğuna dair önemli deliller bildirilmiştir (162). FKY'nde klinik olarak ortaya çıkan serebral ödem bilinen bir komplikasyon olmasına rağmen, karaciğer sirozuna bağlı meydana gelen HE'de intrakraniyal basınçta artma veya belirgin serebral ödem bulguları olmadığı bildirilmekteydi. Ancak beynin in vivo proton magnetik rezonans spektroskopi (H^1-MRS) incelenmesi ile sirozlu hastalarda da düşük derecede serebral ödem varlığı gösterilmiştir (39). Yalnızca sirozlu HE'li hastalarda değil, ayrıca minimal HE'si olan non-sirotik portal ven trombozu olan hastalarda da MR görüntüleme ile beyindeki su miktarında artış tespit edilmiştir (163). HE'li siroz hayvan modelinde de hafif derecede beyin ödeminin geliştiği izlenmiştir (11). Böylece serebral ödemin yalnızca akut karaciğer yetersizliği sonucunda meydana gelen HE'de değil, ayrıca siroz esnasında veya sirozlu hastada presipite edici neden sonrası alevlenmeye (akut-on-kronik) bağlı HE'de de meydana geldiği anlaşılmıştır (4). Çalışmamız her ne kadar akut karaciğer yetmezlikli sıçanlardaki HE patogenezi ile ilişkili olsa da, sirozda da serebral ödem gelişmesi nedeniyle elde edilen sonuçlar her iki HE patogenezini ve tedavisini ilgilendirmektedir.

AKY'de astrosit şişmesine bağlı beyin ödemi durumunda, astrositlerin şişmesine bağımlı mekanizmalarla glutamat salınmaktadır (65). TAA grubundaki sıçanların glutamat amplitudunu, kontrol grubundakilerden belirgin derecede yüksek bulduk. Bu bulgu astrosit hücrelerindeki şişmenin, glutamat salınımına neden olabileceğini ve yüksek glutamat seviyesinin nedenlerinden birisinin bu olabileceğini düşündürmektedir.

Yapılan çalışmalarda beyine submilimolar derecelerde glutamat enjeksiyonunun astrosit şişmesi yaptığı gösterilmiştir (164,165). Bu hücre şişmeleri öncelikle astroglial hücrelerde olmaktadır (166). Bender ve ark.'nın astrosit kültürü ile yaptıkları çalışmada ekzojen verilen glutamat konsantrasyonu ile hücre şişmesi arasında pozitif ilişki olduğunu gösterilmiştir. Ancak glutamat seviyesindeki yüksekliğin belli konsantrasyonundan sonra, glutamat konsantrasyonunun yükseltilmeye devam edilmesine rağmen hücre hacmi artmamış, aksine bir miktar azalma olduğunu gözlemlemiştir (166). Biz çalışmamızda TAA verilen AKY oluşmuş sıçan beyinlerinde, kontrol grubuna göre glutamat amplitudunun arttığını bulduk. Bu artış astrosit şişmesine ve HE'ye neden olmuştur. Çalışmamızda TAA

grubunun glutamatın % 80'ninin geri alma süresini kontrol grubuna göre belirgin olarak daha uzun bulduk. Bu bulgu da yüksek konsantrasyondaki glutamatın, glutamat transporterlarınca hücre içine alınamadığı ve belli bir doygunluktan sonra glutamatın geçişinin azaldığı veya durduğunu düşündürmektedir. Ayrıca AKY'de astrosit şişmesine bağlı beyin ödemi durumunda, astrosit şişmesine bağlı olarak glutamat salınımı olduğu da bilinmektedir (65). Ancak yüksek glutamat konsantrasyonu da astrosit şişmesi yaptığından, hem astrosit şişmesi glutamat salınımına yol açmakta, hem de yüksek glutamat konsantrasyonlarının astrosit hücrelerinin şişmesine neden olması, glutamat konsantrasyonu ile astrosit hücrelerinin şişmesi arasında bir kısır döngü oluşturmaktadır. Bu nedenle AKY'de yeni tedavi hedeflerinin glutamat salınımını azaltıcı ve glutamat metabolizmasını hızlandırıcı alternatif tedavi stratejileri geliştirilmesine yönelik olması gerektiğini düşünmekteyiz.

Uzun zamandır astrosit şişmesininin nedeninin, hücre içerisinde biriken glutaminin ozmotik etkisi olduğu düşünülmekteydi (72,73) Ancak daha sonra öne sürülen "Truva atı" hipotezine göre, hücre içindeki glutaminin mitokondriye girerek fosfat ile aktifleşen glutaminaz (FAG) ile amonyağa ayrıştırıldığı ve mitokondriyal amonyak seviyesinin yükselmesi ile toksisitesinin astrosit şişmesine neden olduğu öne sürülmüştür (74). Diğer taraftan sıçanlarda yapılan çalışmalarda ROT/RNOT yapımı ve beyin ödemi ciddi şekilde glutamin yapımına bağlıdır. Ancak amonyak non-sinaptik beyin mitokondrisinde MPT'u indüklemez (4,70,76). Bu da in vivo astrosit şişmesinin glutamin bağımlı MPT uyarısı olmaktan çok, beyindeki ROT/RNOT yapımı ve amonyak toksisitesi ile ilişkili olduğunu destekler (4). Oksidatif stresin, astrositlerin glutamat uptakenin inhibisyonunda belirgin rol oynadığı bilinmektedir (78,167). Çalışmamızda TAA grubundaki sıçanlarda, anti-oksidan enzimlerdeki değişimlerin (Glutatyon s-transferaz (GST), Süperoksit dismutaz (SOD), Myeloperoksidaz (MPx) aktivitelerinde artış ve Lipid peroksidasyon (LPO) da azalma) glutamat seviyesindeki değişikliklerin sebeplerinden olabilir.

Astrosit kültürlerinin amonyağa maruz bırakılması ile MAPK'ların aktive olduğu ve bu aktivasyonun antioksidantlarla bloke edildiği gösterilmiştir (168,169). Ayrıca hiperamonyemik ortamdaki astrositlerin MAPK'ların bloke edilmesi ile hücre şişmesinin azaldığı ve glutamat uptake defisitinde de düzelme olduğu bildirilmiştir (169). Çalışmamızda kontrol grubunun glutamat amplitudunu TAA grubundan belirgin olarak daha düşük tespit ettik. Ancak TAA+LOLA grubunda glutamat amplitudu kontrol grubu ile farksızdı. LOLA verilmesinin, periferde amonyak düzeyini azaltması dışında beyinde glutamat düzeyini de belirgin şekilde azalttığını tespit ettik.

Organizmalar ROS'ların toksisitesine karşı hem enzimatik hem de enzimatik olmayan savunma mekanizmalarına sahiptirler (170). Amonyak enjekte edilen sıçanların beyin ve karaciğerlerinde GST, SOD ve katalaz aktivitelerinde azalma olduğu gösterilmiştir (78,171). Çalışmamızda, Reddy ve ark.'ı gibi TAA verilen gruptaki sıçanların beyin dokusundaki SOD

aktivitesini kontrol grubuna göre artmış olarak tespit ettik. (126). Kosenko ve ark. nın aksine çalışmamızda ayrıca, TAA verilen gruptaki sıçanların karaciğerdeki SOD aktivitesini kontrol grubundakilerden de yüksek olarak bulduk. SOD aktivitesini düşük tespit etmemizin nedeni, hem bizim hem de Reddy ve ark.'nın sıçanlara TAA vererek AKY oluşturmuş olmamıza karşın, Kosenko ve ark.'nın amonyak infüzyonu yaparak AKY modeli oluşturmalarıdır. Dolayısıyla biz karaciğer nekrozuna sekonder AKY oluşturmuşken, Kosenko ve ark. sağlam karaciğerli sıçanların kan amonyak konsantrasyonunu yükseltmişlerdir. Dolayısıyla karaciğer hasarına bağlı oluşacak oksidatif bileşikler ve sitokinler Kosenko ve ark.'nın çalışmasında ortaya çıkmamıştır. Najmi ve ark.'nın yaptıkları çalışmada LOLA'ın karaciğer hepatositlerini oksidatif stresten koruduğunu göstermişlerdir (121). Çalışmamızda TAA verilerek AKY oluşturulan sıçanlara LOLA verilmesi durumunda beyin ve karaciğerdeki SOD aktivitesi, TAA verilen gruptan daha fazla artmış olarak tespit ettik. AKY'de lipit peroksidasyonunun göstergesi olan malonilaldehid (MDA) veya LPO düzeyleri konusunda da değişik sonuçlar bildirilmiştir. Çalışmamızda TAA verilen sıçan beyin ve karaciğerinde LPO miktarlarını kontrol grubuna göre azalmış olarak tespit ettik. Ayrıca TAA+LOLA verilen sıçanlarda da LPO miktarını azalmış olarak bulduk. Ancak TAA+LOLA verilen gruptaki LPO miktarı TAA grubundan daha düşük bulundu. Reddy ve ark. ise MPO miktarını ölçmüşler ve AKY'de artmış olduğunu bildirmişlerdir (126). Çalışmamızda kontrol grubundaki sıçanların karaciğer ve beyin dokusunda ki glutatyon s-transferaz (GST) aktivitesi TAA verilen gruptan daha düşüktü. Ancak LOLA tedavisi verilen AKY'ndeki sıçanların GST aktivitesi kontrol grubundaki sıçanların düzeyinde idi ve TAA verilen sıçanlardan daha düşük olarak tespit edildi. Karaciğer dokusundaki MPx aktivitesi TAA grubu ile kontrol grubunda farksız iken, LOLA tedavisi yapılmış AKY'deki sıçanlarda düşük olarak tespit edildi. Beyin dokusunda ise LOLA tedavisi sonrası MPx aktivitesi, hem kontrol grubu hemde TAA grubundakilerden daha düşük idi. Sıçanlarda TAA ya bağlı oluşan AKY'nde LOLA'ın karaciğer ve beyin dokusunda antioksidan özellik göstermesi serum amonyak düzeyini düşürmesiyle ilgili olabilir. LOLA'ın antioksidan etkisinin amonyağın kas dokusunda glutamine dönüşünü hızlandırması ile kan amonyak düzeyinin azalması, dolayısı ile amonyağın toksik etkilerinin azalmasına bağlı olduğu düşünülmektedir. Ayrıca LOLA'ın direkt sitoprotektif etkisinin olabileceği de düşünülebilir.

Beyinde in vivo olarak orta derecedeki astrosit şişmesi, kafatasında esneklik olmamasından dolayı beyindeki ektraselüler sıvı hacmini azaltabilir. Ektraselüler alandaki bu daralmadan dolayı, moleküllerin difüzyonu azalır ve hücrelerde iyonlar, eksitotoksik transmitterler ve nörotoksik metabolitlerin birikmesi neticesinde nöronal hasarlar meydana gelebilir (172,173). Çalışmamızda ekzojen glutamatın % 80'ninin geri alınma süresi TAA grubunda kontrol grubuna göre belirgin olarak uzun bulduk. Bu durumun nedenlerinden bir

tanesi de ektraselüler hacmin azalmasına bağlı olarak glutamatın difüzyonundaki azalma olabilir.

HE'li hastalarda nörofizyolojik seviyelerde değişik motor bozukluklar (osilator kortikokortikal ve kortikomüsküler coupling) izlenir (4,174,175). İlginç bir şekilde, kortikal motor hareketlerin HE'nin şiddetinin yavaşlaması ve osillatör görme stimulus azalması paralel gitmektedir (176). Dolayısıyla, HE'de hareketlerdeki azalma, beynin diğer fonksiyonlarını da (görme, bilişsel vs) yansıtabilir. Çalışmamızda sıçan hareketleri sayılarak, kantitatif değerlerle HE evrelemesi yapılmasındaki temel nokta buradan kaynaklanmaktadır. Sirozlu hasta beyinlerindeki kortiko-spinal traktüs, santral motor iletim zamanında ve kortikal motor eşiğinde artma ile uyarılmış motor potansiyel amplitüdünde azalma izlenir (177,178). Çalışmamızda TAA ve LOLA+TAA gruplarının lokomotor aktivite ölçümleri arasında istatistiki fark bulunmaması, her iki grupta da HE geliştiğini ve beyinden yapılacak glutamat ölçümlerinin, her iki grupta da HE döneminde olduğunun göstergesidir. Ancak bu iki grup arasındaki farklılığın belirgin şekilde değil de, sınırda olması ve hatta stereotipik hareketlerde farkın olması LOLA'ın HE gidişi geciktirdiğini göstermektedir.

HE çalışmalarının değerlendirilmesinde, hayvan hareketlerindeki azalmanın kantitatif olarak ölçülmesi, elde edilen bulguların değerlendirilmesi ve diğer çalışmaların sonuçları ile kıyas yapılabilmesi için çok önemlidir (179). Çünkü yapılan hayvan deneylerinde, karaciğer yetersizliği oluşturmak için çok sayıda yöntem kullanılmaktadır. Ayrıca HE'deki sonuçların karşılaştırıldığı dönemlerin ne olduğu ve ne zaman elde edildiği kesin olarak bilinememektedir. Dolayısıyla bu çalışmalardan çıkan sonuçların birbiri ile karşılaştırılması uygun olmamaktadır. Bu nedenle HE çalışmalarında hayvan evrelemelerinin mutlaka lokomotor aktivite sayımı gibi objektif, tekrarlanabilir, kontrol edilebilir, kişisel gözlem ve yorumlardan bağımsız tekniklerle değerlendirilmesinin, bilimsel sonuçların karşılaştırılabilirliğini ve çıkan sonuçların doğru yorumlanmasını sağlayacağını düşünmekteyiz.

Hayvanlarda HE evresinin değerlendirilmesinde kullanılabilen "Lokomotor aktivite ölçümü" işlemi dikkatli bir şekilde yapılmalıdır. Sıçanların lokomotor aktiviteleri gün içinde farklılık gösterebilmektedir (130). Ardışık lokomotor aktivite ölçümleri esnasında da deneklerin spontan lokomotor aktivitelerinde giderek bir azalma gözlenir ve bu azalma örneğin, her iki saatte bir 6 saat boyunca ölçülen aktivitede, 6. saatte, ilk ölçüme göre oldukça anlamlı seviyelere ulaşabilir (130). Bu nedenle birden fazla grupla yapılan çalışmalarda aktivite ölçümlerinin günün hep aynı saatlerinde yapılması ve paralel kontrol grubunun bulunması oldukça önemlidir. Biz de çalışmamızda aynı anda 4 hayvanın lokomotor aktivitesini ölçebilecek, 4 kafesli sistem kullandığımızdan aynı anda 3 gruptan (kontrol, TAA ve TAA+LOLA) birer sıçanın ölçümünü, günün hep aynı saatinde gerçekleştirdik.

Glutamat beyindeki majör eksitatör nörotransmitterdir. Kan beyin bariyeri glutamata geçirgen değildir. Beyindeki glutamatın tamamı glukoz, glutamin veya proteinlerin parçalanması sonucunda beyinde sentezlenir (180). TAA verilmiş veya hepatik devaskülarize sıçanlardaki AKY'de, beyindeki toplam glutamatın azaldığı gösterilmiştir (180,181). Beyin homojenatlarındaki glutamat konsantrasyonu intraselüler glutamatı yansıtır. Ekstraselüler glutamat seviyesi, yüksek hassasiyette nörotransmisyon sağlanabilmesi için çok düşük konsantrasyonlarda tutulur (180). Beyin homojenatlarında glutamat miktarındaki azalmanın aksine, değişik AKY modelleriyle yapılan çalışmalarda ekstraselüler glutamat seviyesinin arttığı bildirilmiştir (180,182,183). Sağlam beynin glutamat uptake kapasitesi daha iyi olduğundan glutamat toksisitesine çok daha dirençli olduğu bildirilmiştir (15). Biz de çalışmamızda sağlam sıçanlara verilen ekzojen glutamatın çok daha kısa sürede geri alındığını tespit ettik. Ektraselüler glutamat konsantrasyonu arttığında astrosit ve nöronlardaki glutamat reseptörleri aşırı uyarılabilir hale gelirler (57,73). Astrosit kültürlerinin akut olarak amonyağa maruz bırakılmasının glutamat salınımına neden olduğu gösterilmiştir. Amonyak nedeniyle astrositlerden glutamat salınımındaki regülasyon bozukluğunun glutamat disfonksiyonu ile bağlantılı olduğu akut HE'li hayvan modelli çalışmalarla gösterilmiştir (20,36). Bu konuda yapılan ilk çalışmalarda Swain ve ark. beyin ve serebrospinal sıvıda glutamatın azaldığı bildirilmiştir (73,181). Ancak Swain ve ark. nın bu çalışmalarındaki sonuçları bizim sonuçlarımızla ve daha sonra yapılan çok sayıdaki çalışma ile uyumlu değildir. De Knegt ve ark. tavşanlarda, Bosman ve ark, Hilgier ve ark. ile Michalak ve ark. sıçanlarda in vivo olarak mikrodializ yöntemiyle beyin glutamat düzeyini ölçmüşlerdir (20-24). Michalak ve ark.'nın çalışmasında ektraselüler glutamat konsantrasyonunun ciddi HE bulguları oluşmadan 3 saat önce belirgin olarak yükseldiğini ve nörolojik fonksiyonların kaybına kadar yükselmeye devam ettiğini ifade etmişlerdir. Biz de çalışmamızda TAA verilen sıçanlarda, kontrollerine göre daha yavaş olmakla birlikte glutamatın geri alınmasının devam ettiğini ve ayrıca TAA grubunda ekzojen verilen glutamatın maksimum amplituda ulaşma süresinin belirgin olarak arttığını izledik. Bu durum, AKY'de astrositlerdeki glutamat transporterlarındaki defekt nedeniyle glutamat reuptakenin bozulmasından kaynaklanabileceğini düşündürmektedir. Michalak ve ark. yaptıkları çalışmada portokaval anastomoz yapılan sıçanlarda AKY oluşturduktan sonra, sıçanları 30 dakikada bir sırtüstü çevirerek normal pozisyona geçemedikleri (doğrultma refleksi) zamanı HE'nin "prekoma evresi", kornea refleksinin olmamasını ise "koma evresi" olarak kabul etmişlerdir. Bu şekilde bir sıçanın HE olup olmadığının anlaşılması tekniği subjektif bir yöntem olup standardizasyonu da mümkün değildir. Bu nedenle biz çalışmamızda HE tanısını, sıçanların hareketlerini infrared ışıklar aracılığıyla sayma ve hareketlerini kaydetma esasına dayanan lokomotor aktivite ölçümü esasına göre koyduk. Ayrıca De Knegt, Bosman, Hilgier ile Michalak ve ark.'nın çalışmaları in vivo yapılmasına rağmen gerçek zamanlı (real-time) ve

glutamatın kinetiğini gösteren çalışmalar değildir (21-24). Nörotransmisyon milisaniyeler içinde gerçekleştiğinden, gerçek zamanlı olmayan bu ölçümler glutamatın ekstraselüler ölçümünü tam olarak yansıtmayabilir (184). Bizim çalışmamız, ekstraselüler beyin glutamat konsantrasyonunun arttığı gösteren diğer çalışmalardan farklı olarak, in vivo voltametrik ölçümlerle glutamat düzeyi ve kinetiği ile ilgili sonuçların real-time elde edildiği ilk çalışmadır.

Akut hiperamonyemi oluşturan hayvan modellerinde, NMDA reseptörlerinin aktivasyonunda belirgin artış olduğu bildirilmiştir (168,185-187). Aynı zamanda otopsi yapılmış beyinlerde bu reseptörlerin yoğunluğunda belirgin artma olduğu gösterilmiştir (186). NMDA reseptörlerinin aşırı aktivasyonu amonyağın indüklediği hücre ölümünden sorumlu olduğu bildirilmiştir (57,188,189). Çalışmamızda gerçek zamanlı ve in vivo olarak biz de ektraselüler glutamatı artmış olarak tespit ettik. Buna karşılık AKY'ndeki sıçanların HE'de olmalarından dolayı lokomotor aktivitelerini kontrol grubuna göre beklendiği gibi belirgin olarak azalmış olarak tespit ettik. Yani sıçanların beyinlerindeki majör eksitatör nörotransmitter olan glutamatın amplitüdü artmış olmasına rağmen, nörönlarda eksitatör değil, inhibitör uyarının hakim olduğunu gördük. Bu durumun daha önceki değişik çalışmalarda gösterildiği veya iddia edildiği gibi yüksek amonyak seviyelerine bağlı olarak, glutamatın reseptör duyarlılığındaki azalmaya yani reseptör desensitizasyonuna bağlı olabileceğini düşünmekteyiz (20,23,101,185-187,189). Vogels ve ark. da ektraselüler glutamat düzeyindeki artışın NMDA reseptör duyarlılığındaki artışa bağlı olabileceğini söylemişlerdir (190).

Beynin değişik anatomik bölgelerindeki astrosit hacimleri, sinaps aralığının genişliği, hücrelerdeki reseptör sayıları ile vezikül sayı ve kapasitesi farklılıklar göstermektedir. Bu da her bölgedeki astrositlerin glutamat uptake ve salınım kapasitesini farklı kılmaktadır (15,191). Ancak biz çalışmamızda serebral korteks, kaudat putamen, globus pallidus ve hipokampustan yaptığımız ölçümlerde glutamat amplitudu ve geri alımında fark bulmadık. Bu bulgu yalnızca kontrol grubu sıçanlarında değil, TAA grubu ve TAA+LOLA grubunda da izlendi. Biz sinaptik aralıktaki veya hücre içindeki glutamat düzeyini ölçmeyip, mikroelektrotun yerleştirildiği bölgenin çevresindeki glutamatı ölçmekteyiz. Yani AKY'de sinaptik aralıklar ve hücreler arasında glutamat seviyelerinde farklılıklar olsa da, çalışmamız sonucunda anatomik bölgeler arasında glutamat miktarında farklılık olmadığı söylenebilir.

Glutamatın sinaptik aralıktan uzaklaştırılması glutamat reseptör ailesince yapılır (15). Glutamat reseptörlerinin fonksiyonlarında değişiklikler glutamat uptake'inde azalmaya neden olur (180). Cauli ve ark.'nın yaptıkları çalışmada kronik hiperamonyemili sıçan beyinlerine DHPG enjeksiyonu sonrası ektraselüler glutamat düzeyinin belirgin şekilde (% 514-654 kadar artış) arttığını gösterilmiştir. Bu çalışmanın sonucunda, kronik hiperamonyeminin nükleus akumbenste metabotropik glutamat reseptörler aracılığıyla ektraselüler glutamat düzeyini değiştirdiğini bildirmişlerdir (178). Biz de çalışmamızda akut hiperamonyemi yapılan sıçan

beyinlerinde glutamat amplitüdlerini yüksek olarak tespit ettik Bu yüksekliğin nedenlerinden birisinin Cauli ve ark. nın kronik hiperamonyemik sıçanlarda bildirdikleri glutamat reseptörleri ile benzer şekilde olabileceğini düşünmekteyiz.

Ornithin ve aspartat, amonyağın karaciğer ve kaslarda üre siklusu ve glutamin sentezinde kullanılan önemli substratlardır (192,193). L-ornitin seviyesindeki artış karaciğerde amonyak yapımı, beyin ve iskelet kasında glutamin sentezi gibi detoksifikasyon proseslerini hızlandırır (27). LOLA'ın deneysel ve insanlarda yapılan çalışmalarda kandaki amonyak konsantrasyonunu efektif şekilde düşürdüğü kanıtlanmıştır (12,120,194-196).

LOLA'ın serum amonyak konsantrasyonunu düşürme etkisi iki şekilde olmaktadır. Diyetle alınan bazı aminoasitlerin (alanin, glisin, metiyonin, sistein) hepatositlerde üre siklusunda yer alan beş enzimin aktivitesini kuvvetlendirdiği bildirilmiştir (197). Bu etkilerin endokrin olaylarla olduğuna inanılmaktadır (198,199). LOLA'ın dolaylı yararlarından birisi de karaciğerde üre siklusunun aktivitesini arttırarak, amonyak konsantrasyonunu düşürmesi ile glutamin sentetazın aktivitesini arttırmak ve böylece beyin ile iskelet kasında glutamin sentetaz vasıtasıyla amonyak detoksifikasyonu arttırılabilmektir. Gebhard ve ark. LOLA'nın üre siklusuna substrat girişinin artması ile amonyak detoksifikasyon kapasitesini arttırdığını ve nitrojen dengesinde olumlu etkisinin olduğunu ifade etmişlerdir (120).

Rose ve ark.'nın sıçanlara portokaval anastomoz uygulayarak AKY oluşturdukları çalışmada, Gebhard ve ark. nın kronik karaciğer yetersizliğinde elde ettikleri sonuçlara benzer sonuçlar bildirmişlerdir (12,120). Rose ve ark. LOLA verilen AKY'deki sıçanların plazma amonyak seviyesinin normal sınırlara kadar indiğini ve beyin ödeminin LOLA verilmeyen gruptan belirgin derecede az olduğunu göstermişlerdir (12). Vogels ve ark. Rose ve ark. gibi portokaval anastomoz uygulanmış sıçanları, üç gruba ayırmışlar, birinci gruba plasebo, ikinci gruba ornitin ve üçüncü gruba ise LOLA vermişlerdir. Ornitin verilen sıçanlardaki plazma amonyak seviyesindeki düşüş LOLA grubundan daha önce olmuş, ancak daha sonra LOLA grubunun amonyak seviyesi daha aşağı inmiştir (190). Biz de çalışmamızda, söz konusu iki çalışmaya (Rose ve ark. ve Vogels ve ark.) benzer şekilde LOLA verilen grubun plazma amonyak seviyesini TAA+LOLA verilen gruptan belirgin derecede farklı olduğunu tespit ettik (12,190). Ancak Rose ve ark.'nın çalışmasında farklı olarak LOLA grubundaki sıçanların plazma amonyak seviyesi kontrol grubuna benzer değildi. Kontrol grubu ile LOLA verilen gruplar arasındaki farklılık, gerek bizim gerekse de çalışmamız ile Rose ve ark.'nın çalışmasında HE tanısı koymadaki yöntem farklılığından kaynaklanmaktadır. Çalışmamızda HE tanısı sıçanların lokomotor aktivitelerindeki azalmanın değerlendirilmesi ile konulurken, Rose ve ark. prekoma ve koma diye evrelendirerek bu tanıyı koymuşlar. Bu nedenle Rose ve ark. sıçanlarda HE'nin daha geç dönemlerindeki amonyak seviyelerinin normal sınırlarda olduğunu bildirmelerine rağmen prekoma döneminde ise daha yüksek olduğunu göstermişlerdir. Rose ve ark.'nın plazma amonyak

seviyesindeki düşüşle birlikte, serebrospinal sıvıda düşük glutamat konsantrasyonunun eşlik ettiğini bildirmeleri ve LOLA verilen sıçanlarda, LOLA verilmeyenlere göre daha az beyin ödeminin geliştiğini göstermeleri ile çalışmamızdaki bazı bulgular örtüşmektedir (12). Şöyle ki; daha öncedende anlatıldığı gibi AKY'de astrosit şişmesine bağlı beyin ödemi durumunda, astrosit şişmesine bağlı olarak glutamat salınımı olduğu bilinmektedir (65). Çalışmamızda TAA+LOLA verilen grupla, TAA verilen gruplar arasında glutamat amplitudu, glutamatın % 80'inin geri alınma süresi ile pik değere ulaşma sürelerinin tamamında TAA grubunun daha fazla olarak tespit ettik. Bu sonuç, TAA+LOLA verilen grupta daha az astrosit şişmesi ve buna bağlı olarak da daha az glutamat salınımı olduğunu desteklemektedir. Vogels ve ark. ornitin verilen grup ile LOLA verilen gruptaki üre yapımının kontrol grubuna (portokaval şant yapılmış, ancak tedavide plasebo verilen sıçanlar) göre belirgin derecede arttığını tespit etmişlerdir. Ayrıca çalışmanın sonunda in vitro olarak beyinden yapılan ölçümlerde de beyin dokusundaki amonyağın her iki grupta, kontrol grubuna göre daha düşük olduğunu bildirmişlerdir (190). Vogel ve ark. plazma glutamat konsantrasyonunu LOLA grubunda daha yüksek ancak ornitin grubunda kontrol grubuna yakın olarak tespit etmişlerdir. Bu da AKY'de amonyağın detoksifikasyonunda önemli bir yeri olan iskelet kasında glutamin sentezinin substratı olan glutamat sentezi için LOLA verilmesinin, yalnız başına ornitin verilmesinden daha iyi olacağını düşündürmekle birlikte Vogels ve ark.'nın çalışmasında ornitin verilen sıçanlarla LOLA verilenler arasında plazma glutamin seviyeleri benzer olarak bildirilmektedir (190). Rose ve ark. LOLA verilen sıçanların serebrospinal sıvılarındaki glutamat konsantrasyonunun LOLA verilmeyen gruba göre daha düşük olarak tespit etmişlerdir (12). Rose ve ark.'nın 1998 yılında yaptıkları çalışmada da daha sonraki çalışmalarına benzer şekilde plazma amonyak ve üre sonuçları ile serebrospinal glutamat konsantrasyon sonuçları bildirilmiştir (196).Biz de beyin dokusunda glutamatı daha düşük olarak bulduk. Kan beyin bariyeri glutamata geçirgen değildir. Dolayısıyla, beyindeki glutamatın tamamı glukoz, glutamin veya proteinlerin parçalanması sonucunda beyinde sentezlenir (180,200). Bu nedenle, LOLA'ın beyinde toksik olan glutamatın sentezini azalttığı ve bu etkisiyle de direkt olarak beyin dokusunda koruyucu etki gösterdiğini düşünülebilir. Vogel ve ark. çalışmalarında H^1-MRS ile sıçan beyin incelemesinde, LOLA verilen grup ile kontrol grubunda beyinde glutamat miktarını azalmış bulmuşken, yalnızca ornitin verilen gruptaki glutamat konsantrasyonunu sabit olarak tespit etmişler. Aynı çalışmada H^1-MRS ile LOLA ve ornitin ile tedavi edilen gruplarda serebral korteksteki glutamin konsantrasyonlarının belirgin derecede azaldığını bildirmişlerdir (190).

Vogel ve ark. portokaval anastomoz ile AKY gelişen sıçanların HE düzeylerini EEG ile evrelendirerek değerlendirmişlerdir. Çalışmalarında gerek ornitin gerekse de LOLA verilenlerin ensefalopati derecelerinin klinik olarak düzeldiğini tespit etmişlerdir. Ancak EEG de kontrol grubuna göre düzelmenin yalnızca ornitin verilen grupta olduğunu bildirmişlerdir

(190). Çalışmamızda HE derecesini lokomotor aktivite sayacı ile değerlendirdiğimizden, Vogel ve ark.'nın çalışmalarından daha objektif ve kesin sonuçlar tespit ettiğimizi düşünmekteyiz. Zaten Vogel ve ark. da çalışmalarında ornitin verilen grupla, LOLA verilen gruplar arasındaki ensefalopatinin düzelmesi açısından EEG bulguları ve klinik evre değerlendirmesi arasında ortaya çıkan bu farklı durumun; EEG spektral analizin serebral korteksin elektro-aktivitesini yansıttığını, klinik değerlendirmenin ise sıçanın komple davranışlarını yansıttığını söylemişlerdir (190). Biz de bu değerlendirmeyi sayısal değerler şeklinde kantitatif olarak ölçerek sıçan davranışlarını değerlendirmiş olduk. Çalışmamızdaki sıçanlardan LOLA verilenler TAA+LOLA verilenlere göre belirgin olarak daha fazla süre ve mesafe hareket etmişlerdir. Beklendiği gibi kontrol grubundan daha az hareket ettiklerini tespit ettik. Ancak çalışmamızda yalnızca ornitin verilen grup olmadığı için bu grubun hareket cevabını değerlendiremedik. Yapılan deneysel bir AKY çalışmasında, LOLA verilen sıçanlar ortalama 915.7 dakikada komaya girerken, serum fizyolojik verilen gruptaki sıçanlarda 694.8 dakikada koma gelişmiştir (12). Çalışmamızda TAA+LOLA verilen grupla, TAA verilen gruplar arasında ambulatuar ve vertikal hareketlerde azalmalar arasında istatistiki fark olmasa da, TAA+LOLA grubunun hareket sayı ve süresi TAA grubundan daha fazla olarak tespit edildi.

LOLA öncelikle sirozlu hastalarda kullanılmış, daha sonra da gerek deneysel çalışmalar gerekse de insanlarla yapılan klinik çalışmalarla AKY'deki etkisi araştırılmıştır. Schmid ve ark.'nın yakın zamanlarda sirozlu 40 hasta ile yaptıkları çalışmada, LOLA verilen grubun posturografisi ve psikometrik testleri plasebo grubuna göre farklı tespit edilmemiştir. Ancak kan amonyak seviyesi ve parsiyel amonyak basıncı LOLA grubunda plasebo grubuna göre daha düşük seviyelerde bulunmuştur (201). Toplam 217 sirozlu hastanın değerlendirildiği, randomize, plasebo kontrollü, prospektif, çift kör olarak yapılmış 1993-2000 yılları arasındaki 4 klinik çalışmanın metaanalizinde; LOLA'ın plazma amonyak seviyelerini belirgin olarak düşürdüğü ve psikometrik testlerde de düzelmeler yaptığı ifade edilmiştir (202). LOLA'ın sirozlu HE'deki etkinliği hakkında çok sayıda çalışma yapılmış ve genellikle faydalı olabileceği ifade edilmiştir. Ancak bu çalışmaların dizaynları, sonlanım noktaları, tedavi şemaları ve hasta profilleri standardize olmadığından sonuçlar tartışılmaya açıktır (195,203-209). Üretici kurum tarafından HE tedavisinde standart olduğu bildirilmesine rağmen, Avrupa Birliği ve Amerika Birleşik Devletlerince tescil edilmemiştir (210,211). LOLA ile insanlarda yapılan HE çalışmalarının neredeyse tamamı sirozlu hastalarda yapılmıştır. Ancak daha öncede ifade ettiğimiz üzere hem sirozdaki HE'de hem de AKY'de ortaya çıkan HE'de patogenezde beyin ödemi bulunmaktadır. Dolayısıyla tedavi seçenekleri ve yöntemleri de beyin ödemi ve nedenlerini içerecek şekilde olmalıdır. LOLA'ın AKY'deki etkinliği ile ilgili prospektif bir klinik çalışma yakın zamanda yayınlandı (212). Bu çalışma yaklaşık 3 yıl içinde değişik AKY nedeniyle takip edilen 201 hastanın sonuçlarını bildirmektedir. Bu çalışmada 3 gün süreyle hastalara 30 gr/gün LOLA verilmiş ve bazal-6. günde arteryel amonyak seviyeleri

ölçülmüştür. Çalışmanın primer sonlanım noktası ölüm olarak belirlenmiştir. Çalışmada bazal amonyak seviyesi ile 6. gündeki seviye arasında belirgin fark tespit edilmiş olmasına rağmen, ensefalopati düzelmesi, şuurun düzelmesi, yaşam süreleri, böbrek yetmezliği ve ölüm açısından fark tespit edilmemiştir. Bu sonuç, AKY'de LOLA kullanımı açısından hayal kırıklığı doğurmuş olsa da aslında beklenen ve LOLA tedavisine devam edilmesi için kabul edilebilir bir sonuçtur. Çünkü LOLA'ın temel etkisi karaciğer fonksiyonlarında kalıcı bir düzelme ve hücre rejenerasyonu değildir. Beyin ödemini önleme veya yavaşlatmak amacıyla kullanılabilir. Bu nedenle LOLA sadece tedavi edilebilir veya geri döndürülebilir AKY nedenlerinde beyin ödemine gidişi yavaşlatmak için veya OKT yapılması düşünülen hastalarda basamak tedavisi olarak düşünülebilir. Bu iki durum dışında kullanımı, AKY'nde mortaliteyi engellemeyecektir. Biz de çalışmamızda LOLA verilen sıçanlarda LOLA verilmeyenlere göre, kan amonyak konsantrasyonlarını, beyin ve karaciğer dokusundaki antioksidan enzim aktivitelerini, karaciğer ve beyin histolojisini, beyin glutamatının % 80'ninin geri alım süresini, glutamatın maksimum amplituda çıkma süresini ve glutamat amplitudunu normal sıçanlara daha yakın ve benzer olarak tespit ettik.

Sonuç olarak LOLA tedavisi, AKY'ne bağlı HE tedavisinde kısa süreli olarak kullanıldığında, yararlı etkilerinden dolayı asıl tedavi için zaman kazandırabilecek, yan etkisi oldukça az olan, etkin ve uygulanabilir bir tedavi seçeneği olabileceğini düşünmekteyiz.

6.SONUÇ VE ÖNERİLER:

Çalışmamız sonucunda;

1. Çalışmamızda, ALT ve AST düzeyleri tiyoasetamid (TAA) grubu (grup 3) ve tiyoasetamid + L-ornitin L-aspartat (TAA+LOLA) grubunda (grup 4), kontrol grubu (grup 1)'ndan belirgin olarak yüksek bulundu ($p<0.001$). Plazma T.Bil. seviyesi Grup 1'de, diğer gruplardan daha düşük idi ($p<0.05$).
2. Kan amonyak konsantrasyonu grup 1 ile grup 2 ve 4 benzerdi ($p>0.05$). Grup 3 kan amonyak konsantrasyonu, grup 1 ve 4'den belirgin olarak yüksek olarak bulundu ($p<0.001$).
3. TAA verilen gruptaki sıçanların beyin dokusundaki SOD aktivitesini kontrol grubuna göre artmış olarak bulundu ($p<0.05$). Biz çalışmamızda ayrıca TAA verilen gruptaki sıçanların karaciğerdeki SOD aktivitesini kontrol grubundakilerden de daha yüksekti ($p<0.05$). TAA+LOLA verilen gruptaki sıçanların beyin ve karaciğer SOD aktivitelerinin, TAA verilen gruptan daha fazla arttığı izlendi ($p<0.05$). TAA verilen sıçan beyin ve karaciğerinde LPO miktarları kontrol grubuna göre daha azdı ($p<0.05$). Kontrol grubundaki sıçanların karaciğer ve beyin dokusundaki glutatyon s-transferaz (GST) aktivitesi TAA verilen gruptan daha düşüktü ($p<0.05$). LOLA tedavisi verilen AKY'ndeki sıçanların GST aktivitesi, kontrol grubundaki sıçanların GST aktivitesinden farklı değildi ($p>0.05$). Ancak TAA verilen sıçanlardan daha düşüktü ($p<0.05$). Karaciğer dokusundaki myeloperoksidaz (MPx) aktivitesi TAA grubu ile kontrol grubunda farksız iken ($p>0.05$)., LOLA tedavisi yapılmış AKY'deki sıçanlarda düşük olarak tespit edildi ($p<0.05$).
4. TAA verilen sıçanlarda sentrilobüler nekroz, periportal hepatositik vakuolizasyon ve yer yer enflamasyon gözlendi. Hepatositlerde kısmi balonlaşma dejenerasyonunun yanısıra histopatolojik olarak, çok çekirdekli hücrelerin sayıca artması ve hepatosit kordonlarının kalınlaşması şeklinde izlenen rejenerasyon bulguları izlendi. LOLA verilen gruptaki sıçanların karaciğerinde, TAA grubuna göre daha az enflamasyon ve nekroz izlendi. Hepatositlerde ise belirgin rejenerasyon vardı.
5. Kontrol grubundaki sıçan beyinlerinde yaygın serebral Akut nöron ölümü izlendi. TAA verilen sıçanlarda orta derecede Akut nöron ölümü izlenirken, LOLA grubunda ise az sayıda serebral Akut nöron ölümü gözlendi. TAA grubunda kontrol gubuna göre immunohistokimyasal olarak GFAP ile daha az boyandı.
6. Kontrol grubunun stereotipik hareket sayısı ve vertikal hareket sayısı TAA grubundan belirgin olarak fazla idi ($p=0.001$). Kontrol grubunun stereotipik

hareket sayısı ve vertikal hareket sayısı TAA+LOLA grubundan fazla idi ($p<0.05$). Ancak ambulatuar hareket sayısı kontrol grubunda TAA grubuna göre fazla bulundu ($p<0.05$). Stereotipik hareket yapılan toplam zaman ve vertikal hareket yapılan toplam zaman kontrol grubunda, TAA grubuna göre belirgin olarak fazla idi ($p<0.001$). Kontrol grubundaki ambulatuar hareket yapılan toplam süre TAA grubuna göre daha fazla bulundu ($p<0.05$). Stereotipik hareket yapılan toplam zaman kontrol grubunda, TAA+LOLA grubuna göre daha uzun idi ($p<0.05$). Ayrıca kontrol grubunun vertikal hareket yapılan toplam süresi TAA+LOLA grubuna göre belirgin olarak uzun tespit edildi ($p<0.001$). Kontrol grubunun gittiği (yürüdüğü) mesafe TAA grubundan belirgin olarak fazla bulundu($p=0.001$). Ayrıca TAA+LOLA grubundan da daha fazla mesafe aldıkları gözlendi ($p<0.05$). Kontrol grubunun deney sırasında hareket etmeksizin geçirdiği süre, TAA grubundan belirgin derecede az olarak gözlendi ($p<0.001$).

7. TAA grubu ile TAA+LOLA grupları arasında sıçanların yaptığı ambulatuar hareketlerin sayısı ve süresi ile vertikal hareket sayı ve süreleri arasında fark yoktu ($p>0.05$). Sıçanların yaptığı stereotipik hareketlerin sayı ve süreleri arasında ise sınırda farklılık izlendi (sırasıyla $p=0.048$ ve $p=0.049$). TAA grubundaki sıçanların yürüdüğü mesafe ile TAA+LOLA grubundaki sıçanların mesafesi arasında fark yoktu ($p>0.05$).
8. Kontrol grubunun glutamatın % 80'ini geri alma süresi TAA grubundan belirgin olarak daha kısa bulundu ($p<0.001$). Ayrıca kontrol grubunun glutamatın % 80'ini geri alma süresi TAA+LOLA grubundan da kısa idi ($p<0.05$). LOLA+ TAA grubunun da glutamatın % 80'ini geri alma süresi TAA grubundan belirgin olarak daha kısa idi ($p<0.001$).
9. Kontrol grubunun glutamatın maksimum amplituda geliş süresi TAA grubundan belirgin olarak daha kısa gözlendi ($p<0.001$). Kontrol grubunun glutamatın maksimum amplituda geliş süresi TAA+LOLA grubundan da kısa idi ($p<0.05$). LOLA+ TAA grubunun glutamatın maksimum amplituda geliş süresi de TAA grubundan belirgin olarak daha kısa idi ($p<0.001$).
10. Kontrol grubu ile TAA+LOLA grubu arasında fark bulunmadı ($p>0.05$). Ancak TAA grubu ile hem kontrol grubu hemde TAA+LOLA grubu arasında belirgin farklılık mevcuttu ($p<0.001$).

Çalışmamız sonucunda AKY'nde LOLA tedavisinin kan amonyak düzeyini belirgin olarak düşürdüğü, kısa sürelee içinde olsa karaciğer ve beyin dokusunu oksidatif strese karşı koruyabileceği, hepatik ensefalopatiye gidişi yavaşlattığı ve beynin glutamatı geri alım kapasitesini koruyarak, glutamat düzeyini düşürüp beyni glutamat toksisitesinden koruduğu

gözlemlenmiştir. Çalışmamız hayvan deneyi olduğundan, insanlardaki sonuçları aynı olmayabilir. Ancak mevcut bulgular ışığında, LOLA'ın sadece tedavi edilebilir veya geri döndürülebilir AKY nedenlerinde mevcut yararlı etkileri nedeniyle HE ve beyin ödemine gidişi yavaşlatmak için veya OKT yapılması düşünülen hastalarda basamak tedavisi olarak kullanılmasının uygun olacağını düşünmekteyiz.

7. KAYNAKLAR:

1. Koch A, Trautwein C. Acute Liver Failure. In: Dancygier H. Clinical Hepatology, Principles and Practice of Hepatobiliary Diseases. Berlin, Germany: Springer-Verlag, 2010: 931-946.

2. Goldman DE, Woolf GM. Acute Liver Failure: Definitions and Etiology. In: Demetriou AA, Watanabe FD. Support of the Acutely Failing Liver. Texas, U.S.A.; Landes Bioscience, 2000: 5-20.

3. Haussinger D, Blei AT. Hepatic encephalopathy. In: Rodes J, et al, eds. The Oxford textbook of hepatology. Oxford: Blackwell, 2007:728–760.

4. Haussinger D, Schliess F. Pathogenetic mechanisms of hepatic encephalopathy. Gut 2008;57:1156–1165.

5. Bosoi CR, Rose CF. Identifying the direct effects of ammonia on the brain. Metab Brain Dis 2009;24:95–102

6. Bernal W, Hall C, Karvellas CJ, Auzinger G, Sizer E, Wendon J. Arterial ammonia and clinical risk factors for encephalopathy and intracranial hypertension in acute liver failure. Hepatology 2007;46:1844–1852

7. Bhatia V, Singh R, Acharya SK.Predictive value of arterial ammonia for complications and outcome in acute liver failure. Gut 2006;55:98–104

8. Jalan R, Olde Damink SW, Hayes PC, Deutz NE, Lee A. Pathogenesis of intracranial hypertension in acute liver failure: inflammation, ammonia and cerebral blood flow. J Hepatol 2004;41:613–620

9. Clemmesen JO, Larsen FS, Kondrup J, Hansen BA, Ott P. Cerebral herniation in patients with acute liver failure is correlated with arterial ammonia concentration. Hepatology 1999;29:648–653

10. Sen S, Rose C, Ytrebø LM, Davies NA, Nedredal GI, Drevland SS, Kjønnø M, Prinzen FW, Hodges SJ, Deutz NE, Williams R, Butterworth RF, Revhaug A, Jalan R. Effect of albumin dialysis on intracranial pressure increase in pigs with acute liver failure: a randomized study. Crit Care Med 2006;34:158–164

11. Jover R, Rodrigo R, Felipo V, Insausti R, Sáez-Valero J, García-Ayllón MS, Suárez I, Candela A, Compañ A, Esteban A, Cauli O, Ausó E, Rodríguez E, Gutiérrez A, Girona E, Erceg S, Berbel P, Pérez-Mateo M. Brain edema and inflammatory activation in bile duct ligated rats with diet-induced hyperammonemia: a model of hepatic encephalopathy in cirrhosis. Hepatology 2006;43:1257–1266
12. Rose C, Michalak A, Rao KV, Quack G, Kircheis G, Butterworth RF. L-ornithine-L-aspartate lowers plasma and cerebrospinal fluid ammonia and prevents brain edema in rats with acute liver failure. Hepatology 1999;30:636–640
13. Butterworth RF. The neurobiology of hepatic encephalopathy. Semin Liver Dis 1996; 16:235-244.
14. Ede RJ, Gimson AE, Bihari D et al. Controlled hyperventilation in the prevention of cerebral edema in FHF. J Hepatol 1986; 2:43-51.
15. Danbolt NC. Glutamate uptake. Prog Neurobiol. 2001;65:1-105.
16. Headley, P.M., Grillner, S. Excitatory amino acids and synaptic transmission: the evidence for a physiological function. Trends Pharmacol. Sci. 1990;11:205–211.
17. Conti, F., Barbaresi, P., Melone, M., Ducati, A. Neuronal and glial localization of NR1 and NR2a/b subunits of the NMDA receptor in the human cerebral cortex. Cereb. Cortex 1999;9:110–120.
18. Shelton, M.K.,McCarthy, K.D. Mature hippocampal astrocytes exhibit functional metabotropic and ionotropic glutamate receptors in situ. Glia 1999;26:1–11.
19. Bergles, D.E., Roberts, J.D., Somogyi, P., Jahr, C.E. Glutamatergic synapses on oligodendrocyte precursor cells in the hippocampus. Nature 2000;405:187–191.
20. Rose C, Kresse W, Kettenmann H. Acute insult of ammonia leads to calcium-dependent glutamate release from cultured astrocytes, an effect of pH. J Biol Chem. 2005 ;280:20937-20944.
21. Bosman D.K, Deutz N.E.P, Maas M.A.W, van Eijk H.M.H, Smit J.J.H, de Hann J.G, Chamuleau R.A.F.M. J. Neurochem. 1992;59: 591–599

22. de Knegt R J, Schalm SW, van der Rijt CCD, Fekkes D, Dalm E, Hekking-Weyma IJ. Hepatol. 1994;20:19–26
23. Michalak A, Rose C., Butterworth J, Butterworth R. F. Neuroactive amino acids and glutamate (NMDA) receptors in frontal cortex of rats with experimental acute liver failure. Hepatology 1996;24:908–914
24. Hilgier W., Zielinska M., Borkowska H. D., Gadamski R., Walski M., Oja S. S., Saransaari P,Albrecht J. J. Neurosci. Res. ;1999;56:76–84
25. Desjardins P et al. Effect of portacaval anastomosis on glutamine synthetase protein and gene expression in brain, liver and skeletal muscle. Metab Brain Dis 1999;14:273–280
26. Olde Damink SW et al. The kidney plays a major role in the hyperammonemia seen after simulated or actual GI bleeding in patients with cirrhosis. Hepatology 2003;37:1277–1285
27. Kowalski P, Bieniecki M. Pharmacokinetics and bioavailability study of L-ornithine-L-aspartate in healthy volunteers--a comparative study of two oral formulations. J Pharm Biomed Anal. 2006;41:1061-1064.
28. Trey C, Davidson CS. The management of fulminant hepatic failure. Prog Liver Dis 1970;3: 282–298
29. Bernuau J, Rueff B, Benhamou J-P. Fulminant and subfulminant liver failure: Definitions and causes. Sem Liver Dis 1986; 6:97-106.
30. O'Grady JG, Williams R. Classification of acute liver failure. Lancet. 1993;342:743.
31. O'Grady JG, Schalm SW, Williams R. Acute liver failure: redefining the syndromes. Lancet. 1993;342:273–5.
32. Wendon J, Lee W. Encephalopathy and Cerebral Edema in the Setting of Acute Liver Failure: Pathogenesis and Management. Neurocrit Care 2008:9:97–102.
33. Bernuau J, Benhamou J-P. Classifying acute liver failure. Lancet 1993; 342:252.

34. Ostapowicz G, Fontana RJ, Schiodt FV, et al Results of a prospective study of acute liver failure at 17 tertiary care centers in the United States. Ann Intern Med 2002:137: 947–954
35. Lidofsky SD. Liver transplantation for fulminant hepatic failure. Gastroenterol Clin North Am 1993;22:257–69
36. Shawcross D, Jalan R. The pathophysiologic basis of hepatic encephalopathy: central role for ammonia and inflammation. Cell. Mol. Life Sci. 2005;62:2295–2304
37. Ferenci P, Lockwood A, Mullen K, et al. Hepatic encephalopathy–definition, nomenclature, diagnosis, and quantification: final report of the working party at the 11th World Congresses of Gastroenterology, Vienna, 1998. Hepatology 2002;35:716–721.
38. Vaquero J, Chung C, Cahill ME, et al. Pathogenesis of hepatic encephalopathy in acute liver failure. Semin Liver Dis 2003;23:259–269.
39. Haussinger D, Laubenberger J, vom Dahl S, et al. Proton magnetic resonance spectroscopy studies on human brain myoinositol in hypo-osmolarity and hepatic encephalopathy. Gastroenterology 1994;107:1475–1480.
40. Hertz L, Kala G. Energy metabolism in brain cells: effects of elevated ammonia concentrations. Metab Brain Dis 2007;22:199–218
41. Jalan R, Shawcross D, Davies N. The molecular pathogenesis of hepatic encephalopathy. Int J Biochem Cell Biol. 2003;35:1175-1181.
42. Hertz L, Zielke HR. Astrocytic control of glutamatergic activity: astrocytes as the stars of the show. Trends Neurosci 2004;27:735–743
43. Stewart CA, Cerhan J. Hepatic encephalopathy: a dynamic or static condition. Metab Brain Dis. 2005;20:193-204
44. Hertz, L., Yu, A.C., Kala, G., Schousboe, A. Neuronal-astrocytic and cytosolic-mitochondrial metabolite trafficking during brain activation, hyperammonemia and energy deprivation. Neurochem. Int. 2000;37:83–102.

45. Chan H, Butterworth RF. Evidence for an astrocytic glutamate transporter deficit in hepatic encephalopathy. Neurochem. Res. 1999;24: 1397–1401
46. Belanger M., Desjardins P., Chatauret N., Butterworth R. F. Loss of expression of glial fibrillary acidic protein in acute hyperammonemia. Neurochem. Int. 2002;41: 155–160
47. McCarty J. H. Cell biology of the neurovascular unit: implications for drug delivery across the blood-brain barrier. Assay Drug Dev. Technol. 2005;3:89–95
48. Butterworth, R.F., Images of the brain in chronic liver failure. J. Hepatol. 2001;35: 661–662.
49. Sobel, R.A., DeArmond, S.J., Forno, L.S., Eng, L.F. Glial fibrillary acidic protein in hepatic encephalopathy. An immunohistochemical study. J. Neuropathol. Exp. Neurol. 1981;40:625–632.
50. Desjardins P., Bandeira P., Rao V.L., Butterworth R.F. Portacaval anastomosis causes selective alterations of peripheral-type benzodiazepine receptor expression in rat brain and peripheral tissues. Neurochem. Int.1999:35:293–299
51. Lockwood A, Yap E, Wong W. Cerebral ammonia metabolism in patients with severe liver disease and minimal hepatic encephalopathy. J. Cereb. Blood Flow Metab. 1991;11:337–341
52. Mousseau DD, Butterworth RF. Current theories on the pathogenesis of hepatic encephalopathy. Proc Soc Exper Biol and Med 1994;206:329-344.
53. Sen S, Williams R, Jalan R The pathophysiological basis of acute-on-chronic liver failure. Liver. 2002;22 Suppl 2:5-13.
54. Bjerring PN, Eefsen M, Hansen BA, Larsen FS. The brain in acute liver failure. A tortuous path from hyperammonemia to cerebral edema. Metab Brain Dis. 2009 ;24:5-14.
55. Olde Damink SW, Jalan R, Dejong CH. Interorgan ammonia trafficking in liver disease. Metab Brain Dis. 2009;24:169-81.

56. Meijer AJ, Lamers WH, Chamuleau RAFM Nitrogen metabolism and ornithine cycle function. Physiol Rev 1990;70:701–748
57. Suárez I, Bodega G, Fernández B.Glutamine synthetase in brain: effect of ammonia. Neurochem Int. 2002;41:123-142.
58. Saparov SM, Liu K, Agre P, Pohl P. Fast and selective ammonia transport by aquaporin-8. J Biol Chem 2007;282:5296–301
59. Rama Rao KV, Jayakumar AR, Norenberg DM. Ammonia neurotoxicity: role of the mitochondrial permeability transition. Metab Brain Dis 2003;18:113–127
60. Chan H, Zwingmann C, Pannunzio M, Butterworth RF. Effects of ammonia on high affinity glutamate uptake and glutamate transporter EAAT3 expression in cultured rat cerebellar granule cells. Neurochem Int 2003;43:137–146
61. Michalak A, Knecht K, Butterworth RF. Hepatic encephalopathy in acute liver failure: Role of the glutamate system. Adv Exper Med Biol 1997; 420:35-43.
62. Albrecht J, Bender AS, Norenberg MD. Potassium-stimulated GABA release is a chloride dependent but sodium- and calcium-independent process in cultured astrocytes. Acta Neurobiol Exp (Wars) 1998;58:169–175
63. Felipo V, Butterworth RF. Neurobiology of ammonia. Prog. In Neurobiol. 2002;67:259–279.
64. Marcaggi P, Coles JA. Ammonium in nervous tissue: transport across cell membranes, fluxes from neurons to glial cells, and role in signaling. Prog. In Neurobiol. 2001;64:157–183.
65. Rose C. Effect of ammonia on astrocytic glutamate uptake/release mechanisms. J Neurochem. 2006;97 Suppl 1:11-15.
66. Kramer L, Tribl B, Gendo A, Zauner C, Schneider B, Ferenci P et al: Partial pressure of ammonia versus ammonia in hepatic encephalopathy. Hepatology 2000; 31: 30–34.
67. Cooper AJ, Lai JC. Cerebral ammonia metabolism in normal and hyperammonemic rats. Neurochem Pathol 1987;6:67–95

68. Zwingmann C. The anaplerotic flux and ammonia detoxification in hepatic encephalopathy. Metab Brain Dis 2007:22:235–249
69. Blei AT, Olafsson S, Therrien G, Butterworth RF. Ammonia-induced brain edema and intracranial hypertension in rats after portacaval anastomosis. Hepatology 1994;19:1437–1444.
70. Willard-Mack CL, Koehler RC, Hirata T, Cork LC, Takahashi H, Traysman RJ, Brusilow SW. Inhibition of glutamine synthetase reduces ammonia-induced astrocyte swelling in rat. Neuroscience 1996;71:589–599.
71. Takahashi H, Koehler RC, Brusilow SW, Traysman RJ. Inhibition of brain glutamine accumulation prevents cerebral edema in hyperammonemic rats. Am. J. Physiol. 1991;261:825–829.
72. Brusilow SW, Traystman R. Hepatic encephalopathy. N Engl J Med 1986;314:786–787
73. Swain M, Butterworth RF, Blei AT. Ammonia and related amino acids in the pathogenesis of brain edema in acute ischemic liver failure in rats. Hepatology 1992;15:449–453
74. Albrecht J, Norenberg MD. Glutamine: a Trojan horse in ammonia neurotoxicity. Hepatology 2006;44:788–794
75. Rama Rao KV, Jayakumar AR, Norenberg MD Role of oxidative stress in the ammonia-induced mitochondrial permeability transition in cultured astrocytes. Neurochem Int 2005;47:31–38
76. Master S, Gottstein J, Blei AT. Cerebral blood flow and the development of ammonia-induced brain edema in rats after portacaval anastomosis. Hepatology 1999;30:876–880
77. Kosenko E, Venediktova N, Kaminsky Y, Montoliu C, Felipo V. Sources of oxygen radicals in brain in acute ammonia intoxication in vivo. Brain Res 2003;981:193–200

78. Sheline CT, Wei L Free radical-mediated neurotoxicity may be caused by inhibition of mitochondrial dehydrogenases in vitro and in vivo. Neuroscience 2006;140:235–246

79. Norenberg MD, Rama Rao KV, Jayakumar AR. Signaling factors in the mechanism of ammonia neurotoxicity. Metab Brain Dis. 2009;24:103-17.

80. Lang F. Mechanisms and significance of cell volume regulation. J Am Coll Nutr 2007;26:613–623

81. Tait MJ, Saadoun S, Bell BA, Papadopoulos MC. Water movements in the brain: role of aquaporins. Trends Neurosci 2008;31:37–43

82. Syková, E. The extracellular space in the CNS: Its regulation, volume and geometry in normal ans pathological neuronal function. Neuroscientist 1997;3:28–41.

83. Nicholson C, Syková E. Extracellular space structure revealed by diffusion analysis. Trends Neurosci. 1998;21:207–215.

84. Romero-Gómez M, Jover M, Galán JJ, Ruiz A. Gut ammonia production and its modulation. Metab Brain Dis 2009;24:147–157

85. Blei AT. Pathogenesis of brain edema in fulminant hepatic failure. In: Progress in Liver Diseases, Boyer JL, Ockner RK, eds. Philadelphia, W.B. Saunders, 1995;311-330.

86. Ejlersen E, Larsen FS, Pott F et al. Hepatectomy corrects cerebral hyperperfusion in FHF. Transpl Proc 1994; 26:1794-1795.

87. Williams R. Classification, etiology and considerations of outcome in acute liver failure. Semin Liver Dis 1996; 16:343-345.

88. Wendon JA, Harrison PM, Keays R et al. Cerebral blood flow and metabolism in fulminant liver failure. Hepatology 1994;19:1407-1413.

89. Larsen FS, Knudsen GM, Paulson OB et al. Cerebral blood flow autoregulation is absent in rats with thioacetamde-induced hepatic failure. J Hepatol 1994; 21:491-495.

90. Larsen FS, Ejlersen E, Hansen BA et al. Functional loss of cerebral blood flow autoregulation in patients with fulminant hepatic failure. J Hepatol 1995; 23:212-217.

91. Jayakumar AR, Rao KV, Murthy ChR, Norenberg MD. Glutamine in the mechanism of ammonia-induced astrocyte swelling. Neurochem Int. 2006;48:623–628.

92. Norenberg MD, Rao KV, Jayakumar AR. Mechanisms of ammonia-induced astrocyte swelling. Metab Brain Dis. 2005;20:303–318.

93. Norenberg MD, Jayakumar AR, Rama Rao KV, Panickar KS. New concepts in the mechanism of ammonia-induced astrocyte swelling. Metab Brain Dis. 2007;22:219–234.

94. Ottersen OP, Zhang N, Walberg F. Metabolic compartmentation of glutamate and glutamine: morphological evidence obtained by quantitative immunocytochemistry in rat cerebellum. Neuroscience 1992;46:519–534.

95. Shupliakov O, Brodin L, Cullheim S, Ottersen OP, Storm-Mathisen J. Immunogold quantification of glutamate in two types of excitatory synapse with different firing patterns. J. Neurosci. 1992;12:3789–3803.

96. Burger PM, Mehl E, Cameron PL, Maycox PR, Baumert M, Lottspeich F, De Camilli P, Jahn R. Synaptic vesicles immunoisolated from rat cerebral cortex contain high levels of glutamate. Neuron 1989;3:715–720.

97. Rosenberg PA, Amin S, Leitner M. Glutamate uptake disguises neurotoxic potency of glutamate agonists in cerebral cortex in dissociated cell culture. J. Neurosci. 1992;12:56–61.

98. Cousin MA, Robinson PJ. Mechanisms of synaptic vesicle recycling illuminated by fluorescent dyes. J. Neurochem. 1999;73:2227–2239.

99. Westergaard N, Sonnewald U, Schousboe A. Metabolic trafficking between neurons and astrocytes: the glutamate glutamine cycle revisited. Dev. Neurosci. 1995;17:203–211.

100. Butterworth RF. Neuroactive amino acids in hepatic encephalopathy. Metabol Brain Dis 1996; 11:165-173.

101. Knecht K, Michalak A, Rose C et al. Decreased glutamate transporter (GLT-1) expression in frontal cortex of rats with acute liver failure. Neuroscience Letters 1997; 229:201-203.

102. Ferenci P. Brain dysfunction in FHF. J Hepatol 1994; 21:487-490.

103. Ellis A, Wendon J. Circulatory, respiratory, cerebral, and renal derangements in acute liver failure: Pathophysiology and management. Semin Liver Dis 1997;16:379-388.

104. Cordoba J, Blei AT. Brain edema and hepatic encephalopathy. Semin Liver Dis 1996;16:271-280.

105. Jones EA. Ammonia, the GABA neurotransmitter system, and hepatic encephalopathy. Metab Brain Dis. 2002;17:275-81.

106. Basile AS, Harrison PM, Hughes RD et al. Relationship between plasma benzodiazepine receptor ligand concentrations and severity of hepatic encephalopathy. Hepatology 1994;19:112-121.

107. Itzhak Y, Roig-Cantisano A, Dombro RS et al. Acute liver failure and hyperammonemia increase peripheral-type benzodiazepine receptor binding and pregnenolone synthesis in mouse brain. Brain Res 1995; 705:345-348.

108. Takahashi K, Kameda H, Kataoka M et al. Ammonia potentiates GABA-A response in dissociated rat cortical neurons. Neuroscience Letters 1993; 151:51-54.

109. Steindl P, Puspok A, Druml W et al. Beneficial effect of pharmacological modulation of the GABA-A-benzodiazepine receptor on hepatic encephalopathy in the rat: Comparison with uremic encephalopathy. Hepatology 1991;14:963-968.

110. Widler P, Fisch HU, Schoch P et al. Increased benzodiazepine-like activity is neither necessary nor sufficient to explain acute hepatic encephalopathy in the thioacetamide-treated rat. Hepatology 1993; 18:1459-1464.

111. Wright G, Jalan R. Management of hepatic encephalopathy in patients with cirrhosis. Best Pract Res Clin Gastroenterol. 2007;21:95-110.

112. Turkay C, Bayram Y. Akut Karaciğer Yetmezliği. Güncel Gastroenteroloji 2010;14:138-144

113. Bernal W, Hall C, Karvellas CJ, Auzinger G, Sizer E, Wendon J. Arterial ammonia and clinical risk factors for encephalopathy and intracranial hypertension in acute liver failure. Hepatology. 2007;46:1844–1852.

114. Heard KJ. Acetylcysteine for acetaminophen poisoning. N Engl J Med 2008;359: 285-292.

115. Kumar M, Satapathy S, Monga R, et al. A randomized controlled trial of lamivudine to treat acute hepatitis B. Hepatology 2007;45:97-101.

116. Jochum C, Gieseler RK, Gawlista I, et al. Hepatitis B-associated acute liver failure: immediate treatment with entecavir inhibits hepatitis B virus replication and potentially its sequelae. Digestion 2009;80:235-240.

117. Clemmesen JO, Kondrup J, Nielsen LB, et al. Effects of high-volume plasmapheresis on ammonia, urea, and amino acids in patients with acute liver failure. Am J Gastroenterol 2001;96:1217-23.

118. Brusilow SW, Koehler RC, Traystman RJ, Cooper AJ. Astrocyte glutamine synthetase: importance in hyperammonemic syndromes and potential target for therapy. Neurotherapeutics. 2010;7:452-70.

119. Lockwood AH, McDonald JM, Reinman RE, Gelbard AS, Laughlin JS, Duffy TE. et al. The dynamics of ammonia metabolism in man. J Clin Invest 1979;63:449-460.

120. Gebhardt R, Beckers G, Gaunitz F, Haupt W, Jonitza D, Klein S, Scheja L. Treatment of cirrhotic rats with L-ornithine-L-aspartate enhances urea synthesis and lowers serum ammonia levels. J Pharmacol Exp Ther. 1997;283:1-6.

121. Najmi AK, Pillai KK, Pal SN, Akhtar M, Aqil M, Sharma M. Effect of L-ornithine L-aspartate against thioacetamide-induced hepatic damage in rats. Indian J Pharmacol 2010;42:384-387

122. Topaloğlu S, Yankol Y, Küçükkartallar T, et al. Karaciğer yetmezliği tedavisinde non-biyolojik destek sistemlerinin yeri. Yoğun Bakım Derg 2010; 1: 14-20.

123. Simpson KJ, Bates CM, Henderson NC, et al. The utilization of liver transplantation in the management of acute liver failure: comparison between acetaminophen and non-acetaminophen etiologies. Liver Transpl 2009;15:600-609.

124. Butterworth RF, Norenberg MD, Felipo V, Ferenci P, Albrecht J, Blei AT. Experimental models of hepatic encephalopathy: ISHEN guidelines. Liver Int. 2009;29:783-788.

125. Fitzhugh OG, Nelson AA. Liver tumours in rats fed thiourea or thioacetamide. Science 1948;108:626-628.

126. Reddy PV, Murthy ChR, Reddanna P. Fulminant hepatic failure induced oxidative stress in nonsynaptic mitochondria of cerebral cortex in rats. Neurosci Lett. 2004 16;368:15-20.

127. Hunter AL, Holscher MA, Neal RA. Thioacetamide induced hepatic necrosis. Involvement of the mixed function oxidase enzyme system, J. Pharmacol. Exp. Ther. 1977;200:439–448.

128. Porter WR, Neal RA, Metabolism of thioacetamide and thioacetamide *S*-oxide by rat liver microsomes, Drug Metab. Dispos. 1978;6:379–388.

129. Zimmerman C, Ferenci P, Pifl C, et al. Hepatic encephalopathy in thioacetamide-induced acute liver failure in rats: characterization of an improved model and study of amino acid-ergic neurotransmission. Hepatology 1989;9:594–601.

130. Uzbay IT, Erden BF, Tapanyiğit EE, Kayaalp SO. Nitric oxide synthase inhibition attenuates signs of ethanol withdrawal in rats. Life Sci 1997;61:2197-2209.

131. McLamore ES, Mohanty S, Shi J, Claussen J, Jedlicka SS, Rickus JL, Porterfield DM. A self-referencing glutamate biosensor for measuring real time neuronal glutamate flux. J Neurosci Methods. 2010;189:14-22.

132. Hutchinson PJ, O'Connell MT, Kirkpatrick PJ, Pickard JD. How can we measure substrate, metabolite and neurotransmitter concentrations in the human brain? Physiol Meas. 2002;23:75-109.

133. Niwa O, Horiuchi T, Torimitsu K. Continuous monitoring of l-glutamate released from cultured nerve cells by an online sensor coupled with microcapillary sampling. Biosens Bioelectron 1997;12:311–319.

134. Oldenziel WH, van der Zeyden M, Dijkstra G, Ghijsen WEJM, Karst H, Cremers TIHF, et al. Monitoring extracellular glutamate in hippocampal slices with a microsensor. J Neurosci Methods 2007;160:37–44.

135. Dale N, Hatz S, Tian F, Llaudet E. Listening to the brain: microelectrode biosensors for neurochemicals. Trends Biotechnol 2005;23:420–428.

136. Wilson GS, Gifford R. Biosensors for real time in vivo measurements. Biosens Bioelectron 2005;20:2388–2403.

137. Tian F, Gourine AV, Huckstepp RT, Dale N. A microelectrode biosensor for real time monitoring of L-glutamate release. Anal Chim Acta. 2009;645:86-91.

138. Freeman BA, Crapo JD. Biology of disease: Free radicals and tissue injury. Lab Invest 1982; 47: 412-426.

139. Hung-Hai K, Brunk UT, Sohala RS. Relationship between mitochondrial superoxide and hydrogen peroxide production and longevity of mammalian species. Free Rad Biol Med 1993; 15: 621-627.

140. Jana AK, Agarwal S, Chatterjee SN. Membrane lipid peroxidation by ultrasound: Mechanism and implications. J Biosci 1990; 15: 211–215.

141. Thomas CE, Aust SD. Free radicals and environmental toxins. Ann Emerge Med 1986;15:1075-1083.

142. Marnett LJ. Lipid peroxidation—DNA damage by malondialdehyde. Mutat Res 1999; 424: 83–95.

143. Goulart M, Batore´u MC, Rodriguez AS, Laires A, Rueff J. Lipoperoxidation products and thiol antioxidants in chromium exposed workers. Mutagen 2005;20:311–315.

144. Halliwell B, Chirico S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. Am J Clin Nutr 1993; 57: 715-725.

145. Dalle-Donne İ, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. Clin Chem Acta 2003; 329: 23–38.

146. Paxinos G, Watson N. The Rat Brain In Stereotaxic Coordinates. 6th Edn. 30 Corporate Drive, Suite 400, Burlington, MA 01803, USA, 2007:16-182.

147. Bilici M, Ozturk C, Dursun H, Albayrak F, Saglam MB, Uyanik A, Gulaboglu M and Tekin SB. Protective Effect of Mirtazapine on Indomethacin-Induced Ulcer in Rats and Its Relationship with Oxidant and Antioxidant Parameters. Dig Dis Sci 2009; 54:1868–1875.

148. Sun Y, Larry WO, Ying LA. simple method for clinical assay of superoxide dismutase. Clin Chem 1988; 34:497–500.

149. Habig WH, Jakoby WB. Assays for differentiation of glutathione-S-transferase. Methods Enzymol1981; 77: 398–405.

150. Albayrak A, Uyanik MH, Odabasoglu F, Halici Z, Uyanik A, Bayir Y, Albayrak F, Albayrak Y, Polat B, Suleyman H. The Effects of Diabetes and/or Polymicrobial Sepsis on the Status of Antioxidant Enzymes and Pro-Inflammatory Cytokines on Heart, Liver, and Lung of Ovariectomized Rats. J Surg Res. doi:10.1016/j.jss.2009.09.055

151. Ahboucha S, Butterworth RF. Pathophysiology of hepatic encephalopathy: a new look at GABA from the molecular standpoint. Metab. Brain Dis. 2004;19:331–343

152. Butterworth RF. Pathophysiology of hepatic encephalopathy: a new look at ammonia. Metab. Brain Dis. 2002;17:221–227

153. Clemmesen JO, Kondrup J, Ott P. Splanchnic and leg exchange of amino acids and ammonia in acute liver failure. Gastroenterology 2000;118:1131–1139

154. Bémeur C, Desjardins P, Butterworth RF.Antioxidant and anti-inflammatory effects of mild hypothermia in the attenuation of liver injury due to azoxymethane toxicity in the mouse. Metab Brain Dis. 2010;25:23-29.

155. Jiang W, Desjardins P, Butterworth RF.Minocycline attenuates oxidative/nitrosative stress and cerebral complications of acute liver failure in rats. Neurochem Int. 2009;55:601-605.

156. Tofteng F, Hauerberg J, Hansen BA, Pedersen CB, Jorgensen L, Larsen FS. Persistent arterial hyperammonemia increases the concentration of glutamine and alanine in the brain and correlates with intracranial pressure in patients with fulminant hepatic failure. J Cereb Blood Flow Metab. 2006;26:21–27.

157. Neary JT, Norenberg LOB, Gutierrez MP, Norenberg MD. Hyperammonemia causes altered protein phosphorylation in astrocytes. Brain Res. 1987;437:161–164.

158. Norenberg M.D. A light and electron microscopic study of experimental portal-systemic (ammonia) encephalopathy. Progression and reversal of the disorder. Lab. Invest. 1977;36:618–627.

159. Norenberg MD, Neary JT, Norenberg LOB, McCarthy M. Ammonia induced decrease in glial fibrillary acidic protein in cultured astrocytes. J. Neuropathol. Exp. Neurol. 1990;49:399–405.

160. Groeneweg M, de Knegt RJ, Hamberger A, Ding M, Wang S, Schalm SW, Haglid KG. Neuronal and glial marker proteins in encephalopathy associated with acute liver failure and acute hyperammonemia in the rabbit. Metab. Brain Dis. 1993;8:95–106.

161. Chastre A, Jiang W, Desjardins P, Butterworth RF.Ammonia and proinflammatory cytokines modify expression of genes coding for astrocytic proteins implicated in brain edema in acute liver failure. Metab Brain Dis. 2010;25:17-21.

162. Norenberg MD, Neary JT, Bender AS, et al. Hepatic encephalopathy: a disorder in glial–neuronal communication. Prog Brain Res 1992;94:261–269.

163. Minguez B, Garcia-Pagan JC, Bosch J, et al. Noncirrhotic portal vein thrombosis exhibits neuropsychological and MR changes consistent with minimal hepatic encephalopathy. Hepatology 2006;43:707–714.

164. Kimelberg HK, Pang S, Treble DH. Excitatory amino-acid stimulated up-take of Na in primary astrocyte cultures. J Neurosci 1989;9:1141-1149.

165. Moroni F, Riggio O, Carla V, Capocaccia L. Hepatic encephalopathy: lack of changes of gamma aminobutyric acid content in plasma and cerebrospinal fluid. Hepatology 1987;7:816-820.

166. Bender AS, Schousboe A, Reichelt W, Norenberg MD. Ionic mechanisms in glutamate-induced astrocyte swelling: role of K+ influx. J Neurosci Res. 1998;52:307-321.

167. Volterra A, Trotti D, Tromba C, Floridi S, Racagni G. Glutamate uptake inhibition by oxygen free radicals in rat cortical astrocytes. J Neurosci 1994;14:2924–2932

168. Schliess F, Görg B, Fischer R, Desjardins P, Bidmon HJ, Herrmann A, Butterworth RF, Zilles K, Häussinger D. Ammonia induces MK-801-sensitive nitration and phosphorylation of protein tyrosine residues in rat astrocytes. FASEB J 2002;16:739–741

169. Jayakumar AR, Panickar KS, Murthy ChRK, Norenberg MD. Oxidative stress and MAPK phosphorylation mediate ammonia-induced cell swelling and glutamate uptake inhibition in cultured astrocytes. J Neurosci 2006;26:4774–4784

170. Verspaget HW, Mulder TPJ, van der Sluys Veer A, Pena AS, Lamers CBHW. Reactive oxygen metabolites and colitis; a disturbed balance between damage end protection. Scand J Gastroenterol 1991; 26: 44–51.

171. Kosenko E, Kaminsky Y, Kaminsky A, Valencia M, Lee L, Hermenegildo C, Felipo V Superoxide production and antioxidant enzymes in ammonia intoxication in rats. Free Rad Res 1997;27:637–644

172. Sykova E. Glia and volume transmission during physiological and pathological states. J Neural Transm 2005;112:137–147.

173. Simard M, Nedergaard M. The neurobiology of glia in the context of water and ion homeostasis. Neuroscience 2004;129:877–896.

174. Schliess F, Görg B, Haussinger D. Pathogenetic interplay between osmotic and oxidative stress: the hepatic encephalopathy paradigm. Biol. Chem. 2006;387:1363–1370

175. Timmermann L, Gross J, Butz M, Kircheis G, Haussinger D, Schnitzler A. Mini-asterixis in hepatic encephalopathy induced by pathologic thalamo-motor-cortical coupling. Neurology 2003;61:689–692.

176. Timmermann L, Butz M, Gross J, Ploner M, Südmeyer M, Kircheis G, Häussinger D, Schnitzler A. Impaired cerebral oscillatory processing in hepatic encephalopathy. Clin Neurophysiol. 2008;119:265-272.

177. Cordoba J, Raguer N, Flavia M, Vargas V, Jacas C, Alonso J, Rovira A. T2 hyperintensity along the cortico-spinal tract in cirrhosis relates to functional abnormalities. Hepatology 2003;38:1026–1033.

178. Cauli O, Llansola M, Rodrigo R, El Mlili N, Errami M, Felipo V.Altered modulation of motor activity by group I metabotropic glutamate receptors in the nucleus accumbens in hyperammonemic rats. Metab Brain Dis. 2005;20:347-358.

179. Hsu CY, Lee FY, Huo TI, Chan CY, Huang HC, Lin HC, Chang CC, Teng TH, Wang SS, Lee SD. Lack of therapeutic effects of gabexate mesilate on the hepatic encephalopathy in rats with acute and chronic hepatic failure. J Gastroenterol Hepatol. 2010;25:1321-1328.

180. Vaquero J, Butterworth RF. The brain glutamate system in liver failure. J Neurochem. 2006;98:661-669.

181. Swain MS, Bergeron M, Audet R, Blei AT, Butterworth RF. Monitoring of neurotransmitter amino acids by means of an indwelling cisterna magna catheter: a comparison of two rodent models of fulminant liver failure. Hepatology 1992;16:1028–1035.

182. McArdle P, Penning DH, Dexter F, Reynolds JD. Flumazenil does not affect the increase in rat hippocampal extracellular glutamate concentration produced during thioacetamideinduced hepatic encephalopathy. Metab Brain Dis 1996;11:329–342.

183. Suzuki K, Matsuo N, Moriguchi T, Takeyama N, Kitazawa Y, Tanaka T. Changes in brain ECF amino acids in rats with experimentally induced hyperammonemia. Metab Brain Dis 1992;7:63–75.

184. Perea G, Navarrete M, Araque A. Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. Trends Neurosci. 2009;32:421-31.

185. Vogels BAP, Maas MAW, daalhuisen J, Quack G, Chamuleau RAFM: Memantine, a non-competitive NMDA-receptor antagonist improves hyperamonemiainduced encephalopathy and acute hepatic encephalopathy in rats. Hepatology 1997;25:820-827.

186. Palomero-Gallagher N, Bidmon HJ, Cremer M, Schleicher A, Kircheis G, Reifenberger G, Kostopoulos G, Häussinger D, Zilles K. Neurotransmitter receptor imbalances in motor cortex and basal ganglia in hepatic encephalopathy. Cell Physiol Biochem. 2009;24:291-306.

187. Hermenegildo C, Monfort P, Felipo V. Activation of *N*-methyl-D-aspartate receptors in rat brain in vivo following acute ammonia intoxication: characterization by in vivo brain microdialysis. Hepatology 2000;31:709-715.

188. Marcaida G, Miñana MD, Burgal M, Grisolıa S, Felipo V. Ammonia prevents activation of NMDA receptors by glutamate in rat cerebellar neuronal cultures. Eur. J. Neurosci. 1995;7:2389–2396.

189. Monfort P, Montoliu C, Hermenegildo C, Muñoz MD, Felipo V. Differential effects od acute and chronic hyperammonemia on signal transduction pathways associated to NMDA receptors. Neurochem. Int. 2000;37:249–253.

190. Vogels BA, Karlsen OT, Mass MA, Boveé WM, Chamuleau RA. L-ornithine vs. L-ornithine-L-aspartate as a treatment for hyperammonemia-induced encephalopathy in rats. J Hepatol. 1997;26:174-182.

191. Klintsova A, Levy WB, Desmond NL. Astrocytic volume fluctuates in the hippocampal CA1 region across the estrous cycle. Brain Res. 1995;690:269–274.

192. Jiang Q, Jiang XH, Zheng MH, Chen YP. L-Ornithine-l-aspartate in the management of hepatic encephalopathy: a meta-analysis. J Gastroenterol Hepatol. 2009;24:9-14.

193. Al Sibae MR, McGuire BM. Current trends in the treatment of hepatic encephalopathy. Ther Clin Risk Manag. 2009;5:617-626.

194. Staedt U, Leweling H, Gladisch R, Kortsik C, Hagmuller E, Holm E. Effects of ornithine aspartate on plasma ammonia and plasma aminoacids in patients with cirrhosis. A double-blind, randomized study using a four-fold crossover design. J Hepatol 1993;19:424-430.

195. Kircheis G, Nilius R, Held C, Berndt H, Buchner M, Gortelmeyer R, et al. Therapeutic efficacy of L-ornithine-L-aspartate infusions in patients with cirrhosis and hepatic encephalopathy: results of a placebo-controlled, double-blind study. Hepatology 1997;25:1351-1360.

196. Rose C, Michalak A, Pannunzio P, Therrien G, Quack G, Kircheis G, Butterworth RF. L-Ornithine-aspartate in experimental portal-systemic encephalopathy: therapeutic efficacy and mechanism of action. Metab Brain Dis 1998;12:24-32.

197. Snodgrass PJ, Lin RC. Induction of urea cycle enzymes of rat liver by amino acids. J. Nutr. 1981;111**:** 586–601.

198. Gebhard R, Mecke D. Permissive effect of dexamethasone on glucagon induction of urea-cycle enzymes in perifused primary monolayer cultures of rat hepatocytes. Eur. J. Biochem. 1979;97: 29–35.

199. Morris SM. Regulation of enzymes of the urea and arginine synthesis. Ann. Rev. Nutr. 1992;12: 81–101.

200. Gruetter R, Novotny EJ, Boulware SD, Mason GF, Rothman DL, Shulman GI, Prichard JW, Shulman RG. Localized 13C NMR spectroscopy in the human brain of amino acid labeling from D-[1-13C]glucose. J. Neurochem. 1994;63:1377–1385.

201. Schmid M, Peck-Radosavljevic M, König F, Mittermaier C, Gangl A, Ferenci P. A double-blind, randomized, placebo-controlled trial of intravenous L-ornithine-L-aspartate on postural control in patients with cirrhosis. Liver Int. 2010 ;30:574-582.

202. Soárez PC, Oliveira AC, Padovan J, Parise ER, Ferraz MB. A critical analysis of studies assessing L-ornithine-L-aspartate (LOLA) in hepatic encephalopathy treatment. Arq Gastroenterol. 2009 ;46:241-247.

203. Poo JL, Góngora J, Sánchez-Ávila F *et al.* Efficacy of oral L-ornithine-L-aspartate in cirrhotic patients with hyperammonemic hepatic encephalopathy. Results of a randomized, lactulosecontrolled study. Ann. Hepatol. 2006; 5: 281–288.

204. Sabine S, Kircheis G, Adler G *et al.* Oral L-ornithine-L-aspartate therapy of chronic hepatic encephalopathy: results of a placebo-controlled double-blind study. J. Hepatol. 1998; 28: 856–864.

205. Abid S, Mumtaz K, Abbas Z *et al.* Efficacy of infusion of L-ornithine L-aspartate in cirrhotic patients with portosystemic encephalopathy: a placebo controlled study. *J. Hepatol. 2005; 42* (Suppl. 2): 84.

206. Li H. Effects of aspartate and ornithine on treatment of hepatic encephalopathy. J. Med. Forum 2006; 27: 44–45.

207. Ai J, Li XP, Song BB et al. L-ornithine-L-aspartate in the treatment of cirrhosis patients with hepatic encephalopathy. J. Mudanjiang Med. Coll. 2007; 28: 36–37.

208. Jia KL, Ma YJ, Feng SP, Fang LF, Guo YX. Controlled study of L-ornithine-L-aspartate in the treatment of cirrhosis patients with hepatic encephalopathy. Central Plains Med. J. 2006; 33: 32–33.

209. Rees CJ, Oppong K, Al Mardini H, Hudson M, Record CO. Effect of L-ornithine-L-aspartate on patients with and without TIPS undergoing glutamine challenge: a double blind, placebo controlled trial. Gut. 2000 ;47:571-574.

210. Merz Pharmaceuticals. Merz image brochure. "We care: Researching for the future." (Accessed August 25, 2004 at http://download.merz.de/merzde/ files/imagebroschuere_englisch.pdf).

211. Nielsen BA. Treatment of hepatic encephalopathy–systematic Cochrane reviews of randomised clinical trials. Doktora Tezi.Faculty of Health Sciences University of Copenhagen,2005

212. Acharya SK, Bhatia V, Sreenivas V, Khanal S, Panda SK. Efficacy of L-ornithine L-aspartate in acute liver failure: a double-blind, randomized, placebo-controlled study. Gastroenterology. 2009;136:2159-2168.