



**RATLARDA DENEYSEL AKUT KARACİĞER
YETMEZLİĞİ MODELİNDE SEREBRAL
GLUTAMAT DÜZEYLERİNİN İN-VİVO
VOLTAMETRİK METOTLA İNCELENMESİ VE
MİNOSİKLİN'İN BU DÜZEYLER ÜZERİNE ETKİSİ**

Uzm. Ecz. Fatih SARUHAN

Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı

Tez Yöneticisi

Prof. Dr. Ahmet HACİMÜFTÜOĞLU

Doktora Tezi – 2016

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

**RATLARDA DENEYSEL AKUT KARACİĞER
YETMEZLİĞİ MODELİNDE SEREBRAL GLUTAMAT
DÜZEYLERİNİN İN-VIVO VOLTAMETRİK METOTLA
İNCELENMESİ VE MİNOSİKLİN'İN BU DÜZEYLER
ÜZERİNE ETKİSİ**

Uzm. Ecz. Fatih SARUHAN

**Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı
Doktora Tezi**

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Ahmet HACİMÜFTÜOĞLU**

**ERZURUM
2016**

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

RATLARDA DENEYSEL AKUT KARACİĞER YETMEZLİĞİ
MODELİNDE SEREBRAL GLUTAMAT DÜZEYLERİNİN İN-VİVO
VOLTAMETRİK METOTLA İNCELENMESİ VE MİNOSİKLİN'İN
BU DÜZEYLER ÜZERİNE ETKİSİ

Uzm. Ecz. Fatih SARUHAN

Tez Savunma Tarihi : 30.06.2016

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Ahmet HACİMÜFTÜOĞLU (Atatürk Üniversitesi)

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Zekai HALICI (Atatürk Üniversitesi)

Jüri Üyesi : Doç.Dr. Abdulmecit ALBAYRAK (Atatürk Üniversitesi)

Jüri Üyesi : Doç.Dr. Hasan TÜRKEZ (Erzurum Teknik Üniversitesi)

Jüri Üyesi : Yrd. Doç. Dr. Damla Çetin (Kafkas Üniversitesi)

Onay

Bu çalışma yukarıdaki jüri tarafından **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Yavuz Selim SAĞLAM
Enstitü Müdürü

Doktora Tezi
ERZURUM - 2016

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	VI
ÖZET	VII
ABSTRACT.....	VIII
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	X
TABLolar DİZİNİ.....	XI
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Akut Karaciğer Yetmezliği	3
2.1.1. AKY'nin Sınıflandırılması	3
2.1.2. AKY'nin Etiyolojisi	4
2.1.3. AKY'de Klinik Komplikasyonlar	4
2.2. Hepatik Ensefalopati.....	5
2.3. Hepatik Ensefalopati ve Amonyak	5
2.3.1. Akut Hiperamonyemi ve Glutamat.....	6
2.3.2. Glutamat Reseptörleri	9
2.3.2.1. NMDA Reseptörleri.....	9
2.3.2.2. AMPA Reseptörleri	13
2.3.2.3. Kainat Reseptörleri	14
2.3.2.4. Metabotropik Reseptörler (mGluR, ACPD Reseptörleri)	15
2.4. Minosiklin ve Nöroproteksiyon.....	19
3. MATERİYAL VE METOT.....	21
3.1. İn-vivo Voltametri	22
3.1.1. Mikroelektrot Hazırlama	22

3.1.1.1. Mikroelektrot Yüzeyinin Nafyon ile Kaplanması	22
3.1.1.2. Mikroelektrot Yüzeylerinin L-Glutamat Oksidaz ile Kaplanması	23
3.1.1.3. Mikroelektrot Kalibrasyonu.....	24
3.1.2. Mikropipet Hazırlama.....	25
3.1.3. Referans Elektrotun Hazırlanması	25
3.1.4. Mikroelektrotun Beyin Dokusuna İmplantasyonu.....	26
3.1.5. Elektrokimyasal Sinyal Analizi	27
3.2. Lokomotor Aktivitelerin Değerlendirilmesi	27
3.3. İstatistikî Analizler.....	27
4. BULGULAR.....	29
5. TARTIŞMA.....	34
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	43
KAYNAKLAR	44
EKLER	62
EK-1. ÖZGEÇMİŞ	62
EK-2. ETİK KURUL ONAY FORMU.....	63

TEŞEKKÜR

Tezimin yapılmasında büyük desteğinden dolayı TÜBİTAK 113S083 nolu projesine en samimi teşekkürlerimi bildiriyorum.

Tezimin tasarlanması ve yürütülmesinde desteğini bir an olsun esirgemeyen ve tecrübesiyle yol gösteren değerli hocam, Prof. Dr. Ahmet HACİMÜFTÜOĞLU'na saygı ve şükranlarımı sunarım. Tez çalışmaları süresince bilgi ve deneyimlerinden istifade ettiğim Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı öğretim üyeleri kıymetli hocalarım Prof. Dr. Zekai HALICI, Doç. Dr. Abdulmecit ALBAYRAK, Doç. Dr. Elif ÇADIRCI ve Yrd. Doç. Dr. Erol AKPINAR'a müteşekkirim.

Uzm. Ecz. Fatih SARUHAN

ÖZET

Ratlarda Deneysel Akut Karaciğer Yetmezliği Modelinde Serebral Glutamat Düzeylerinin in-vivo Voltametrik Metotla İncelenmesi ve Minosiklin'in Bu Düzeyler Üzerine Etkisi

Amaç: AKY, karaciğer hastalığı bulunmayan veya mevcut karaciğer hastalığı asemptomatik seyreden bireyde ani hepatoselüler fonksiyon bozukluğu sonucu gelişen bir sendromdur. AKY sebebiyle serebral amonyak konsantrasyonlarının kontrolsüz artışı çoğu kez ölümle sonuçlanan bir nöropsikiyatrik bozukluk olan HE'ye yol açar. Beyin dokusunda meydana gelen glutamaterjik sinyal iletim bozukluklarının bahsedilen HE'nin gelişiminde önemli rol oynadığı düşünülür. Bir tetrasiklin olan minosiklin'in glutamaterjik sinyal iletim bozukluklarıyla yakından ilişkilendirilen Huntington hastalığı, MS ve nöropatik ağrıda terapötik etkinliği gösterilmiş olmasına rağmen glutamaterjik sinyal iletimi üzerindeki muhtemel düzenleyici etkisi yeterince araştırılmamıştır. Bu tez çalışması ile minosiklin'in hiperamonyemiye bağlı olarak gelişen glutamaterjik sinyal iletimi bozuklukları üzerindeki etkisinin aydınlatılması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot: 24 adet Albino Wistar cinsi erkek sıçan i) Kontrol, ii) AKY, iii) Minosiklin ve iv) Minosiklin tedavi grubu olmak üzere dört gruba ayrılmıştır. Deneklerin lokomotor aktiviteleri serebral glutamat düzeyleri ve glutamat taşıyıcı aktiviteleri test edilmeden önce ölçülmüştür.

Bulgular: Beyin dokusundaki CA3, GP ve CPu bölgelerinde t80 sürelerinin AKY ile anlamlı ölçüde uzadığı, minosiklin ile ön tedavinin yapıldığı grupta bu sürelerin uzamadığı gözlemlenmiştir. Ayrıca AKY ile stereotipik ve ambulator hareketler için harcanan zamanların kısaldığı ve vertikal hareketler için harcanan zamanların ise değişmediği görülmüştür. Minosiklin ile öntedavi uygulanmış sıçanlarda stereotipik ve ambulator hareketler için harcanan zamanların kontrol grubu ile eşit olduğu ancak ön tedavi grubunun ambulator hareketler için harcadığı zamanın anlamlı ölçüde uzun olduğu gözlemlenmiştir. Minosiklin enjeksiyonunun hareketsiz geçen süreleri değiştirmediği de görülmüştür.

Sonuç: HE gelişen sıçanlarda glutamat taşıyıcılarının aktivitesinde ve bu sıçanların lokomotor etkinliklerinde anlamlı bir azalma gözlenmiş ve minosiklin tedavisi ile bu durumların iyileştirilebildiği tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Glutamat, hepatik ensefalopati, in-vivo voltametri, minosiklin.

ABSTRACT

In-vivo Measurement of Serebral Glutamate Levels in an Experimental Model Of Acute Liver Failure in Rats and the Effects of Minocycline on Them

Aim: ALF is a hepatocellular dysfunction syndrome results in inadequate detoxification of ammonia and elevated levels of it in brain which is associated with complications of ALF especially with HE. Elevated levels of ammonia is the main factor contributing to the glutamate signaling alterations in HE. Minocycline, a tetracycline known by its therapeutical efficacy in neurological disorders associated with glutamate hasn't been studied enough in terms of its regulatory effects on glutamatergic transmission failures. So, we aimed to determine regulatory effects of minocycline on an experimental model of HE.

Material and Method: 24 Albino Wistar rats were randomly distributed into four groups: i) The control, ii) ALF, iii) minocycline and iv) minocycline pretreatment. Locomotor activities were tested before testing basal glutamate levels and the examination of glutamate transporter activities.

Results: We observed that t80's measured in CA3, GP and CPu in group (i) rats were significantly shorter than group (ii) and were almost equal as group (iv) in same regions. Also we observed that mean times spent for stereotypic and ambulatuar movements were shorter in ALF group than the control and spent for vertical movements were the same in both. We noticed that mean times spent for stereotypic and ambulatuar movements were equal in both but measured mean times spent for ambulatuar movements were longer in minocycline group when we compere minocycline group with control. Also we observed that minocycline injection did not change the mean immobility time.

Conclusion: Cerebral glutamete transporter deficiency and locomotor hypoactivity may occur in HE induced rats and minocycline ameliorates both.

Key Words: Glutamate, hepatic encephalopathy, in-vivo voltammetry, minocycline

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AMPA	: α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropionat
AKY	: Akut karaciğer yetmezliği
DRG	: Dorsal kök gangliyonları
EAA	: Eksitator amino asitler
GLT-1	: Glutamat taşıyıcısı-1
GLAST	: Glutamat-aspartat taşıyıcısı
HE	: Hepatik ensefalopati
iGluR	: İyonotropik glutamat reseptörleri
KA	: Kainik asit
mGluR	: Metabotropik glutamat reseptörleri
MSS	: Merkezi sinir sistemi
NMDA	: N-metil-D-aspartat

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sekil No

Sayfa No

Şekil 2.1. Nöronal hasar ve/veya ölüme neden olan hücre membranı hasarı ve mitokondriyel hasar oluşum kaskadı.	8
Şekil 2.2. Hücre dışındaki glutamatın nöronlara ve astrositlere geri taşınması.	17
Şekil 5.1. İntakt gruba ait bir deneğin, 200 µM konsantrasyonundaki glutamat mikroyenjeksiyonundan sonra, serebral CP bölgesinden alınan voltametrik sonuçlara ait grafik.	31
Şekil 5.2. TAA ile HE'nin indüklendiği gruba ait bir deneğin, 200 µM konsantrasyonundaki glutamat mikroyenjeksiyonundan sonra, serebral CP bölgesinden alınan voltametrik sonuçlara ait grafik.	31
Şekil 5.3. TAA ile HE'nin indüklendiği ve minosiklin ile tedavi edilmiş gruba ait bir deneğin, 200 µM konsantrasyonundaki glutamat mikroyenjeksiyonundan sonra, serebral CP bölgesinden alınan voltametrik sonuçlara ait grafik.	32
Şekil 5.4. İntakt gruba ait bir sıçanın kaydedilmiş lokomotor aktivite sonuçları.	33
Şekil 5.5. TAA ile HE'nin indüklendiği gruba ait bir sıçanın kaydedilmiş lokomotor aktivite sonuçları.	34
Şekil 5.6. TAA ile HE'nin indüklendiği ve minosiklin ile tedavi edilmiş gruba ait bir sıçanın kaydedilmiş lokomotor aktivite sonuçları.	34

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo No

Sayfa No

Tablo 5.1. Beyin bölgelerine ait amplitud t_{80} süreleri. 29

Tablo 5.2. Deney gruplarına ait lokomotor aktivite test sonuçları 33



1. GİRİŞ

Akut karaciğer yetmezliği (AKY); bir karaciğer hastalığı bulunmayan veya mevcut karaciğer hastalığı asemptomatik seyreden bireyin hepatoselüler fonksiyonlarını kısa süre içerisinde ve büyük oranda kaybetmesine bağlı olarak gelişen, düşük iyileşme ihtimali ile birlikte hepatik ensefalopatiye (HE) ve buna bağlı olarak değişen şiddetlerde mental yetersizliklere, komaya ve nihayetinde ölüme yol açabilen bir hastalık tablosudur. Çoğu AKY vakasının ilaç zehirlenmeleri, toksinlere maruziyet, viral hepatitler ve kardiyovasküler rahatsızlıklar ve ayrıca idiyosenkratik ilaç reaksiyonları nedeniyle geliştiği bilinmektedir.

AKY'nin en önemli komplikasyonlarından olan HE, normal karaciğer fonksiyonlarına sahip bireylerde etkin bir biçimde detoksifiye edilen ancak hepatoselüler fonksiyonlarını önemli ölçüde kaybetmiş hastalarda yetersiz detoksifikasyonlarına bağlı olarak plazma düzeyleri kontrolsüz şekilde yükselen toksik maddelerin (özellikle amonyak) beyin dokusunda birikmesi ve buna bağlı olarak beyin fizyolojisinin ve anatomisinin bozulması ile ortaya çıkan ve AKY'li hastalarda hayat kalitesini düşürüp mortaliteyi artırdığı bilinen ciddi bir nöropsikiyatrik komplikasyondur. HE, hastalarda değişen derecelerde motor hareket bozukluğu, kognitif ve duygusal bozukluklar ile seyreder. Patogenezinde AKY'ye bağlı gelişen hipoglisemi, hipotansiyon, sepsis, ateş ve hipokseminin de rol aldığı bilinse de hayatını kaybeden hastaların %80'inde ve komadakilerin ise neredeyse tamamında hiperamonyemiye bağlı olarak geliştiği düşünülen ve kafa içi basınçta artışa neden olan serebral ödemin, deneysel HE modeli oluşturulmuş deney hayvanlarında ise nöronal hasarı tetikleyen ve yine hiperamonyemi zemininde geliştiği düşünülen glutamaterjik nörotransmisyon bozukluğunun tespit edilmiş olması AKY'nin patogenezini aydınlatmayı ve tedavisini amaçlayan dikkatleri

amonyak, amonyağın serebral detoksifikasyonunda rol oynayan ve ozmotik etkiye sahip glutamin ve eksitotoksiste potansiyeli yüksek glutamat üzerinde yoğunlaştırmıştır.

Merkezi Sinir Sistemi'ndeki (MSS) majör eksitatör transmitter olan, öğrenme ve hatırlama gibi normal beyin fonksiyonlarında ayrıca sinaps eliminasyonu ve indüksiyonu, hücre migrasyonu, hücre farklılaşması ve ölümü de dahil MSS'nin gelişimiyle yakından ilişkili olaylarda etkin rol aldığı bilinen glutamatın yapılan mikrodializ çalışmalar sonucunda serebral düzeylerinin deneysel HE modeli oluşturulmuş canlı deneklerde kontrolsüz şekilde yükseldiği tespit edilmiştir. Bu tespiti olanak sağlamasına rağmen serebral nörotransmitter düzeylerinin ölçümünde kullanılan mikrodializ yöntemlerinin özellikle spesifik taşıyıcıları aracılığı ile çok kısa sürelerde hücre içine aktif olarak geri taşındığı bilinen ve dolayısıyla ekstraselüler konsantrasyonları saniye bazında büyük değişiklikler gösteren nörotransmitterlerin anlık ekstraselüler konsantrasyonlarını ve ekstraselüler ortamdan hücre içine geri taşınma hızlarını yani taşıyıcı kapasitelerini ölçmekte yetersiz kalıyor olması HE-glutamat ilişkisinin tespiti için nörotransmitterlerin saniye bazında konsantrasyon tayinini yapma kabiliyetine sahip voltametrik deneylerin yapılmasını elzem kılmiştir.

Bu tez çalışması mikrodializ ve diğer yöntemlerin yüksek güvenilirlikle tespit edemediği parametrelerin (bazal glutamat konsantrasyonları, taşıyıcılarının glutamatı geri taşıma hızları ve kapasiteleri) daha yüksek duyarlılıkla ölçülmesi ve dolayısıyla HE'nin patogenezi ile serebral glutamat kinetiği arasındaki ilişkinin tayin edilmesi maksadıyla gerçekleştirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Akut Karaciğer Yetmezliği

Akut (veya fulminan) karaciğer yetmezliği (AKY); karaciğer hastalığı bulunmayan veya asemptomatik seyreden bir kişide kısa süre içerisinde hepatoselüler fonksiyonların (glikojenoliz, lipojenez, koagulasyon faktör sentezi, detoksifikasyon vb.), %80-90 oranında kaybedilmesine bağlı olarak gelişen sarılık hali, protrombin zamanında uzama, kognitif bozukluklar vb. ile seyreden, geri dönüşümlü olabilme ihtimaline rağmen koma ve nihayetinde ölümlü sonuçlanma riski yüksek bir hastalık tablosudur.^{1, 2} AKY gelişen bir hastada karaciğerin detoksifikasyon kabiliyetini aniden ve büyük ölçüde kaybetmesi ile amonyağın kan konsantrasyonunda meydana gelen kontrolsüz artışa bağlı olarak beyin dokusunda ekstraselüler düzeyleri regüle edilemeyen glutamatin bu hastalarda hayatı tehdit eden serebral ödemi ve hepatik ensefalopatiyi (HE) tetiklediği bilinmektedir.^{3, 4}

2.1.1. AKY'nin Sınıflandırılması

Karaciğer (KC) hastalıkları, sarılık vakaları üzerinden ilk defa 1946 yılında klinik seyirlerine göre Lucké ve Mallory tarafından akut ve subakut tip olmak üzere iki farklı başlık altında sınıflandırılmış ve "akut karaciğer yetmezliği" terimi ise ilk defa Trey ve Davidson isimli bilim adamlarınca, bilinen bir KC hastalığı bulunmayan kişide ağır KC hasarını işaret eden semptomların (sarılık hali, koagülopati vd.) ortaya çıkışını takip eden 8 hafta içerisinde gelişen klinik tablo için kullanılmıştır.⁵ Günümüzde hekimlerin, karaciğer yetmezliğinin (KY) prognozu hakkında daha isabetli öngöründe bulunmalarına imkan tanınması ve hastaya uygulanması gereken ideal tedaviyi belirlemelerindeki yol göstericiliği sebebiyle O'Grady ve arkadaşları tarafından KY'nin, hastada başlangıç semptomlarının ortaya çıkışından hepatik ensefalopati (HE) gelişinceye kadar geçen süreye göre i) hiperakut (7 gün), ii) akut (7-28 gün) ve iii) subakut (4-24 hafta) olmak üzere üç başlık altında incelendiği tasnif yapılanlar içinde en fazla kabul görendir.⁶

Hiperakut yetmezlik gelişmiş hastalarda çoklu organ deformasyonu ve ensefalopatinin ortaya çıkma riski geç başlangıçlı veya subakut yetmezlik gelişmiş hastalaradan yüksek olmasına rağmen bu hastaların transplantasyon yapılmaksızın iyileşme ve sağ kalım oranları da geç başlangıçlı veya subakut yetmezlik gelişmiş hastalardan daha yüksektir.^{6, 7} O'Grady ve ark.'nın yaptığı tasnif günümüzde en yaygın kabul gören olsa da hiperakut ve akut KY'de sağkalım oranlarının eşit olması, KY'yi sınıflandırırken hastada sarılık halinin ortaya çıkması ile ensefalopati gelişmesi arasında geçen sürenin yanında etiyoloji, hasta yaşı ve protrombin zamanının (PTZ) da yetmezliğin prognozu değerlendirilip tedavi şekli belirlenirken göz önünde bulundurulması gerektiğini gösterir.⁸

2.1.2. AKY'nin Etiyolojisi

AKY hastalarının %60-80'inde indükleyici sebep anamnez, serolojik ve moleküler testler ile radyolojik ve histolojik incelemeler yardımıyla tespit edilebilmekte ve bu sayede hastalığın seyri ve hastaya uygulanacak ideal tedavi hakkında klinik öngöründe bulunulabilmektedir. AKY'yi indüklediği tespit edilen sebeplerden ilaç zehirlenmeleri, toksinler, viral hepatitler ve kardiyovasküler rahatsızlıklar en çok karşılaşılan sebepler arasındadır. Bununla birlikte bu sebeplerin görülme sıklığı bölgesel farklılıklar gösterir; örneğin, Amerika Birleşik Devletleri'nde AKY vakalarının büyük kısmında indükleyici sebep asetaminofen zehirlenmesi ve idiyosenkratik ilaç reaksiyonları iken ülkemizde, Hindistan, Fransa ve Japonya'da ise Hepatit B Virüsü (HBV) enfeksiyonlarıdır.^{2, 3}

2.1.3. AKY'de Klinik Komplikasyonlar

Hepatoselüler fonksiyonların kaybedilmesine bağlı olarak gelişen protein sentezi, intermediyer metabolizma ve detoksifikasyon za'flarının tetiklediği ve bazıları homeostatik refleksler sonucu gelişen hematolojik, kardiyak, serebral ve renal patolojiler KY'nin klinik belirtilerinin ortaya çıkmasına neden olur. Pıhtılaşma faktörlerinin (faktör I, II, V, VII, IX ve X) sentezinin bozulmasına bağlı gelişen pıhtılaşma bozuklukları ve

gastrointestinal kanamalar, bilirubin klirensindeki düşme ile görülen sarılık hali, yetersiz glikojenoliz nedeniyle ortaya çıkan hipoglisemi, anaerobik glikolizdeki artışın yol açtığı metabolik asidoz sebebiyle gelişen hipotansiyon ve amonyak detoksifikasyonundaki yetersizliğe bağlı geliştiği düşünülen hepatik ensefalopati bunlara örnek verilebilir.

2.2. Hepatik Ensefalopati

HE, ağır KC hastalıklarında hepatoselüler fonksiyon yetersizliği zemininde gelişen hiperamonyemi ve bununla ilişkili serebral ödeme bağlı kafa içi basıncındaki dengelenemeyen artışın ve ekstraselüler nörotransmitter düzeylerinde meydana gelen değişikliklerin primer etkenler olarak düşünüldüğü fakat hipoglisemi, hipotansiyon, sepsis, ateş ve hipokseminin de katkıda bulunduğu, hafif dikkat eksikliğinden komaya kadar geniş spektrumda belirtilerle seyreden ve KC hastalarında hayat kalitesini düşürüp mortaliteyi artıran majör nörolojik komplikasyondur.⁹⁻¹¹ AKY dolayısıyla hayatını kaybeden hastaların %80'inde ve komadakilerin ise neredeyse tamamında kafa içi basıncında artışa neden olan serebral ödemin varlığı¹² ve deneysel HE modeli oluşturulmuş deney hayvanlarında ise nöronal hasara zemin hazırlayan glutamaterjik nörotransmisyon bozukluğu tespit edilmiştir.¹³⁻¹⁵ Hem bahsettiğimiz nöronal hasarı tetikleyen nörotransmisyon kusurlarının hem de kafa içi basıncındaki artışa neden olan serebral ödemin, primer olarak, hepatoselüler detoksifikasyondaki yetersizliğe bağlı gelişen amonyak metabolizması bozukluğunun bir sonucu olduğu düşünülmektedir.^{9, 12, 14,}

16-18

2.3. Hepatik Ensefalopati ve Amonyak

Amonyak büyük oranda proteinlerin sindirimi ile gastrointestinal lümende sentezlenen ve sistemik dolaşıma katılan bir metabolittir. Kolonda bulunan ve üreaz-

üreten bakteriler ve enterositler tarafından amonyak ve karbonata enzimatik olarak parçalanan üre sistemik amonyağın ana kaynağıdır. Glutaminaz vasıtasıyla intestinal enterositlerde glutamata deamide edilen glutamin ise sistemik dolaşıma bir molünün deamidasyonuna karşılık bir mol amonyak sağlayan ikincil kaynak olarak kabul edilir.¹⁹ İntestinal kanaldaki sentezini takiben absorbe edilip portal dolaşıma giren amonyağın büyük bir bölümü, periportal hepatositlerdeki yüksek kapasiteli fakat düşük afiniteli bir detoksifikasyon yolağına (üre siklusu, ÜS) girerek, bu düşük afiniteli yoldan kurtulan az miktardaki amonyak ise preveöz hepatositlerde glutamin sentetaz'ın aracılık ettiği enzimatik bir reaksiyon ile amonyak ve glutamatin birleştirilip glutamin'in sentezlendiğı yüksek afiniteli fakat düşük kapasiteli bir yolak ile detoksifiye edilir.²⁰ Özellikle hepatik yetmezlik durumunda glutamin sentetaz ekspresyonu upregüle olan iskelet kasları ve böbrekler de kan amonyak seviyesinin kontrolünde rol alsa da^{21,22} akut KC yetmezliğine bağı gelişen kan amonyak düzeylerindeki dramatik artışı dengelemekte tek başına bu iki mekanizma yetersiz kalır.

Kandaki amonyak düzeyinde AKY'ye bağı olarak ortaya çıkan ve sistemik regülatuar mekanizmalar ile dengelenemeyen dramatik artış beyin dokusunda da bölgesel regülatuar mekanizmalar ile dengelenemeyen amonyak düzeylerinde yükselmeye neden olur. Aşağıdaki bölümlerde MSS'deki majör eksitator transmitter olarak kabul edilen glutamat ve glutamatin toplam ve ekstraselüler düzeylerinin, spesifik reseptörlerinin ve glutamati astroglialar ve nöronlara geri taşıyan transport mekanizmalarının serebral amonyak düzeylerindeki bu artışa nasıl cevap verdiği tartışılacaktır.

2.3.1. Akut Hiperamonyemi ve Glutamat

Beyin dokusunu uyurabildiğı 20. yüzyılın ancak ikinci yarısında keşfedilebilen ve 1970'lerde bir "transmitter adayı" olarak kabul görmeye başlayan glutamatin merkezi sinir sistemindeki (MSS) majör eksitator transmitter olarak tescili 1984 yılında Fonnum isimli

araştırmacının “Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain” başlıklı makalesinin yayımlanması ile gerçekleşir. Fonnum'dan önce, 1968 yılında, Leif Hertz isimli bilim adamı o günün imkanlarıyla yaptığı çalışmada [^{14}C] ile işaretlenmiş glutamatın ekstraselüler ortamda artan K^+ konsantrasyonuna cevaben hücre dışına çıktığını tespit ettiğinde muhtemelen, glutamatın depolarizasyona bağlı saliverilmesini gözlemlediğinin farkında değilken bugün in-vivo şartlarda glutamatın bazal ekstraselüler düzeylerini, ekstraselüler ortamdan eliminasyonunu dolayısıyla sinaptik aktivitesinin sona erdirilmesini sağlayan astrositik ve nöronal geri taşıyıcı mekanizmalarının hızını ve kapasitesini saniye saniye tespit edebildiğimiz cihazların geliştirilmiş olması sayesinde glutamat ve glutamatın fizyolojik etkileri ve MSS hastalıkları ile ilişkisi hakkında oldukça geniş bilgiye sahibiz. Öyle ki glutamatın öğrenme ve hatırlama, gibi normal beyin fonksiyonlarında ayrıca sinaps eliminasyonu ve indüksiyonu, hücre migrasyonu, farklılaşması ve ölümü de dahil MSS'nin gelişimiyle yakından ilişkili olaylarda etkin rol aldığını bilmekteyiz.²³⁻²⁵

MSS, serotonin (5-HT) ve dopamin (DA) gibi önemli nörotransmitterlerin yaklaşık 1000 katı kadar glutamat ihtiva etmektedir. MSS'nin vasküler endotelinde bulunan ve sınırlı miktarda aktif transport mekanizmasına sahip, glutamat da dahil periferik dolaşımda bulunan birçok maddenin MSS'ye geçişini engelleyen kan-beyin bariyeri bize MSS'nin glutamatı sentez ve depo edebilen ayrıca hücre içi ve dışı konsantrasyonlarını kendi iç dinamikleriyle ayarlayabilen özerk bir bölge olduğunu gösterir.²⁶ Normal şartlar altında MSS'deki glutamatın büyük kısmı hücre içerisinde veziküler havuzda bulunur. Eksitator sinyal iletimine aracılık etmek üzere hücre dışına saliverilen glutamatı, oluşturduğu eksitator sinyal iletimini sonlandırmak amacıyla kimyasal yollarla etki bölgesinden uzaklaştıracak kimyasal bir mekanizma bulunmadığı ve bu nörotransmitterin ekstraselüler konsantrasyonları ile intraselüler konsantrasyonları arasındaki hassas

dengeyi enerji bağımlı geri taşıyıcı mekanizmaların koruduğu bilinmektedir. Na⁺ bağımlı ve yüksek afiniteli bu taşıyıcı mekanizmalar vasıtasıyla nöron ve astrositlerden ekstraselüler ortama sızan glutamat hızla nöron ve astrositlere geri taşınır.²⁷⁻²⁹ Glutamatın yanında diğer eksitator aminoasitleri (EAA) de ekstraselüler ortamdan uzaklaştıran bu geri taşıma mekanizmalarında gelişen nakisalar EAA'ların artan ekstraselüler konsantrasyonlarda hipereksitasyona bağlı nöronal hasara sebep olan birer eksitotoksin'e dönüşmesine yol açar.^{30, 31}

Şekil 2.1. Nöronal hasar ve/veya ölüme neden olan hücre membranı hasarı ve mitokondriyel hasar oluşum kaskadı.

ölçüde arttığını tespit etmişlerdir. Bahsedilen bu artışın sebep ve sonuçları sonraki bölümlerde tartışılacaktır.

2.3.2. Glutamat Reseptörleri

Glutamat reseptörleri (GluR), ekstraselüler ortamda bulunan glutamatın mutad konsantrasyonlarında fizyolojik etkilerine ve artan konsantrasyonlarında ise indüklediği eksitotoksisiteye aracılık eden postsinaptik membran yerleşimli reseptörleridir. Bu reseptörler genetik, elektrofizyolojik ve farmakolojik açıdan **(i)** iyonotropik reseptörler (iGluR, ligand kapılı iyon kanalları) ve **(ii)** metabotropik reseptörler (mGluR, ACPD reseptörleri, G protein kenetli) olmak üzere iki ana başlık altında incelenir.³⁸⁻⁴² İyonotropik glutamat reseptörleri birer katyon spesifik iyon kanalı olup doğal agonistlere gösterdikleri afiniteye göre; α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropiyonat (AMPA), 2-karboksi-3-karboksimetil-4-izopropenil-pirolidin (KA, kainik asit) ve N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptör kanalları olmak üzere üçe ayrılır.^{39, 40} Metabotropik glutamat reseptörleri ise hücre içi ikincil habercilerin (inositol trifosfat ve sıklık nükleotidler gibi) üretimini düzenlemek suretiyle glutamatın hücre-içi etkilerine aracılık eden ve selektif olarak $(\pm)$ -1-aminosiklopentan-*trans*-1,3-dikarboksilik asit'e (*trans*-ACPD) afinite gösteren, G proteinine kenetli, yedi transmembranal segmentli reseptörlerdir.^{38, 40-42}

2.3.2.1. NMDA Reseptörleri

Bu ligand kapılı iyon kanalları glutamatın EAA reseptörleri içerisinde en yüksek afinite gösterdiği; hipokampus, striatum, septum ve amigdalada yaygın yerleşim gösteren, post-sinaptik yerleşimli reseptörleridir. D-2-amino-5-fosfonoverat (APV), α -metil-4-karboksifenilglisin ve MK-801 tarafından selektif ve kompetitif olarak bloke edilebilen bu reseptör alt tipi, üyeleri glutamat kadar güçlü agonist etkinlik oluşturmamasına rağmen sentetik NMDA'ya gösterdikleri yüksek afinite nedeniyle onun adıyla anılır.

Her NMDA reseptörü yapısal olarak bir heterotetramerdir ve fonksiyonel bir NMDA reseptörü, glisin bağlayan iki NR1 alt birimi ile glutamat bağlayan iki NR2 (veya bir NR2 alt birimi yerine glisin bağlayan bir NR3) alt biriminin kombinasyonundan ibarettir.^{38, 40, 43} Ayrıca NMDA reseptörleri proton (H^+), poliamin (spermin, spermidin, ifenprodil), redoks ajanları, nitrik oksit (NO), Mg^{2+} ve Zn^{2+} 'nin bağlandığı allosterik modülasyon bölgeleri de ihtiva eder.⁴⁴

NMDA reseptörleri, MSS'de eksitator nörotransmisyonu AMPA reseptörlerinden farklı yollarla aracılık eder ve diğer ligand kapılı iyon kanalları ile karşılaştırıldıklarında işlevlerini yerine getirebilmek için hem membran potansiyeline hem de agonistin etki bölgesi ile etkileşmesine ihtiyaç duymaları yönüyle farklılık arz eder. Ayrıca NMDA reseptörleri aktivasyonları için iki farklı agoniste (glutamat ve glisin) ihtiyaç duymaları nedeniyle de diğer reseptörlerden ayrılır.⁴⁵ Kendine özgü glisin reseptörleri üzerinden inhibitör etkinlik gösteren glisin, NMDA reseptörlerindeki özgün bağlanma bölgeleri aracılığıyla eksitator sinyal iletiminde de rol almış olur.

Mg^{2+} için özel bir bağlanma bölgesi de bulunduran NMDA reseptörlerinin birçok alt tipi istirahat membran potansiyelinde hücre dışı Mg^{2+} tarafından fiziksel olarak bloke edilmiş halde bulunur. NMDA reseptörleri aracılığıyla tetiklenecek bir sinaptik akımı engelleyen hücre dışı Mg^{2+} 'nin bu reseptörlere bağlanarak bahsedilen fiziksel tıkaç görevini görmesi, büyük oranda voltaj ve belirli oranda da protein kinaz C (PKC) aktivasyonuna bağlıdır. Postsinaptik AMPA veya kainat reseptörlerinin aktive edilmesi ile gerçekleşen depolarizasyon sayesinde voltaj bağımlı Mg^{2+} bloku kısmen azalmakta ve azalan blokajla birlikte aktive olmuş NMDA reseptörleri hücre içine doğru gerçekleşecek Ca^{2+} akışına aracılık etmektedir.^{38, 46-48} NMDA reseptörlerinin aktivasyonu ile gerçekleşen bu akış sayesinde hücre içi konsantrasyonu artan Ca^{2+} , nöron içerisinde çeşitli fonksiyonları düzenleyen birçok kinazın, fosfatazın, endonükleazlar ve kalpain gibi

proteazların aktivasyonunu ve bu enzimlerin aktivasyonu ile ilişkili çeşitli kaskadları tetikler.^{38, 39, 49} Hücre içi Ca^{2+} miktarı optimum düzeylerin üzerine çıkarsa bu kaskadların aşırı ve sürekli tetiklenmesine bağlı olarak hücre membranı, iskeleti ve DNA'sı hasar görmeye başlar. Bu durum göz önünde bulundurulduğunda AKY'ye bağlı gelişen serebral amonyak düzeylerindeki ani artışla birlikte ekstraselüler konsantrasyonu artan glutamatın özellikle NMDA reseptörlerini aşırı ve sürekli uyarması sonucu sebep olduğu hücre içi Ca^{2+} konsantrasyonlarındaki artışın AKY ile ilişkili ensefalopatinin gelişmesine zemin hazırlayan hücre hasarını indüklediğini düşündürür.¹⁸

2000 yılında Felipo ve ark. tarafından yapılan in-vivo mikrodializ çalışmaları beyincikte NMDA reseptör aktivitesinin amonyağın kandaki artan konsantrasyonları ile orantılı olarak güçlendiğini bu reseptörlerin spesifik antagonistleri MK-801 ile önceden bloke edilmesi marifetiyle ekstraselüler siklik guanozin monofosfat (cGMP) düzeylerindeki NMDA reseptör aktivasyonuna bağlı artışın önlendiğini göstererek ispatlamıştır.⁵⁰ Çünkü NMDA reseptörlerinin uyarılması intraselüler Ca^{2+} konsantrasyonunu artırarak sırasıyla NO sentaz'ın aktivasyonu ile NO üretimini, üretilen NO ile de guanilat siklaz aktivitesini ve dolayısıyla cGMP üretimini artıran yolağı (glutamat-NO-cGMP yolağı) tetiklemektedir. Üretilikten sonra bir kısmı ekstraselüler ortama sızan cGMP'nin ekstraselüler konsantrasyonu NMDA reseptörlerinin aktivasyon derecesinin önemli bir göstergesidir.⁵¹

Daha önce de belirtildiği üzere NMDA reseptörleri agonistlerin bağlandığı alt birimler ve allosterik modülasyon bölgeleri ihtiva etmektedir. Deney hayvanlarında yüksek doz amonyağa bağlı gelişen ölümlerde NMDA reseptörlerinin ne kadar sorumlu olduğunu tespit etmek için reseptörün üç farklı alt birimine afinite gösteren farklı antagonistler (MK-801, ketamin, AP-5, etanol gibi) ile yapılan reseptör blokajının amonyak ile indüklenen ölümlerin neredeyse tamamını önlediği görülmüştür.^{50, 52} Bu

durum deney hayvanlarında amonyak ile indüklenen ölümlerde NMDA reseptörlerinin aşırı aktivasyonunun önemli bir rol oynadığını göstermektedir.

1994 yılında Kosenko ve ark.'nın ratlar üzerinde yaptıkları çalışma ile beyinde 7 mmol/kg dozda yapılan i.p. amonyum asetat enjeksiyonuna bağlı gelişen ATP depleksiyonunun MK-801 enjeksiyonu marifetiyle önlenemediği, dolayısıyla hiperamonyeminin beyinde indüklediği ATP depleksiyonuna büyük oranda NMDA reseptörlerinin aracılık ettiği gösterilmiştir.^{51, 53} Bu durum NMDA reseptörlerinin aşırı uyarılmasının ATP tüketen bazı prosesleri aşırı aktive ettiğini ve/veya ATP sentez proseslerini inhibe ettiğini gösterir. Öyle ki, NMDA reseptörlerinin aşırı uyarılması postsinaptik nöronlarda hücre içi Ca^{2+} ve Na^{+} konsantrasyonlarında artışa sebep olur. Bu durumda hücre içi Na^{+} homeostazı, ATP ile çalışan Na^{+}/K^{+} -ATPaz aracılığıyla sitoplazmik konsantrasyonu artan Na^{+} 'nın hücre dışına çıkarılmasıyla sürdürülür. Ayrıca sitoplazmik konsantrasyonu artan Ca^{2+} 'nın mitokondrielerde sekestre olup oksijenli solunumu inhibe ederek ATP depleksiyonuna neden olduğu da düşünülmektedir.⁵⁴

Yüksek dozlarda yapılan i.p. amonyak enjeksiyonuna bağlı olarak beyin dokusunda mitokondriyel süperoksit radikali üretiminin arttığı ve glutatyon peroksidaz (GPx), süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz aktivitesinin ise azaldığı bilinmektedir.^{54, 55} Akut hiperamonyeminin ratlarda sebep olduğu serebral glutatyon miktarındaki azalma ve lipid peroksidasyonundaki artış⁵⁶ da göz önünde bulundurulduğunda amonyakın beyinde oksidatif stresi indüklediği rahatça söylenebilir. Akut hiperamonyemiye bağlı artan bu oksidatif stresin MK-801 enjeksiyonu ile engellenebildiğini gösteren çalışmalar yukarıda anlatılan oksidatif olayların önemli ölçüde NMDA reseptörleri aracılığı ile gerçekleştiğinin bir göstergesidir.⁵¹

Yapılan diğer bir çalışmada nöronlarda tubulin polimerizasyonunu sağlayan ve dolayısıyla nöron iskeletini oluşturan mikrotübüler ağın stabilitesini artıran mikrotübül ile

ilişkili protein-2'yi (MAP-2) parçalayarak mikrotübüler ağ stabilitesini azaltıp hücre hasarına neden olan kalpain'in indüksiyonu yine NMDA antagonisti MK-801 ön tedavisi ile baskılanabilmektedir.^{57, 58}

MK-801 enjeksiyonu ile serebral glutamin sentetaz aktivitesinde ve glutamin konsantrasyonunda meydana gelen artış, glutamin sentetaz aktivitesinin akut amonyak toksisitesi sebebiyle NMDA reseptörlerindeki hiperaktivasyona bağlı geliştiğini göstermektedir.⁵³ Bir glutamin sentetaz inhibitörü olan metiyonin sülfoksimin (MSO) ile amonyanın birçok toksik etkisinin önlenmesi dolayısıyla HE'yi indükleyen primer sebebin beyinde artan glutamin sentezi olduğu bazı araştırmacılar tarafından düşünülse de yukarıda bahsettiğimiz çalışmalar ve MSO'nun glutamat saliverilmesi üzerinde tespit edilmiş inhibitör etkisi^{59, 60} bu hipotez ile örtüşmemektedir.

2.3.2.2. AMPA Reseptörleri

Bu reseptörler önce kiskolat reseptörleri olarak daha sonra ise metabotropik glutamat reseptörlerinin de kiskolata afinite gösterdiği ve AMPA'nın bu ligand kapılı iyon kanalları için kiskolattan daha seçici olduğunun tespiti ile AMPA reseptörleri olarak yeniden adlandırılmış,^{38, 61} GluR1, GluR2, GluR3 ve GluR4 (GluRA-D veya GLUA1-4 olarak da bilinirler) olmak üzere toplam dört adet alt birimden müteşekkil homo- veya heterotetramerlerdir. NMDA reseptörlerine nazaran glutamata daha düşük afinite gösterirler ve doğal agonistleri olan glutamata gösterdikleri afiniteleri de AMPA'dan daha düşüktür.⁶¹ AMPA reseptörleri beyin fonksiyonları için kritik öneme haiz kabul edilir; öyle ki selektif AMPA reseptör antagonistlerinin sıçan hipokampusüne infüzyonu, bu bölgedeki eksitator sinyal iletiminin neredeyse tamamen kesilmesine sebep olmuştur.⁶² Aktivasyonları hızlı gelişen (1-4 ms) ve çabuk sonlanan (2-14 ms) bir depolarizasyon oluşturan AMPA reseptörlerinin MSS'deki birçok sinapsta hızlı eksitator sinyal iletimine aracılık ettiği düşünülmektedir.⁴²

Bu iyon kanallarının büyük bir kısmı kanalın Ca^{2+} permeabilitesini belirleyen GluR2 altbirimi içerir⁴⁰ ve primer olarak Na^+ ve K^+ iyonlarına geçirgendir. Küçük elipsoidal hipokampal nöronlar, retinal bipolar hücreler ve serebral korteksin non-piramidal nöronlarındakiler hariç GluR2 altbirimi içeren AMPA reseptörleri genel olarak Ca^{2+} 'ya geçirgen değildir.^{42, 63}

Yapılan çalışmalar ile TAA ile AKY'nin indüklendiği ratlarda AMPA dansitesinin striatumda değişmediği, hipokampusda azaldığı ve serebral kortekste ise arttığı tespit edilmiştir.¹⁸

2.3.2.3. Kainat Reseptörleri

Kainik asitin güçlü eksitotoksik ve epileptojenik etkilerinden yola çıkarak 1981 yılında Watkins ve Evans adlı bilim adamları kainik asitin bu etkilerini kendisine özgü reseptörleri üzerinden oluşturduğu hipotezini öne sürmüştür. Bu hipotez daha sonra sıçan beyinde [^3H]kainata yüksek afinite gösteren bağlanma bölgelerinin izole edilmesi ve in-vitro koşullarda DRG'lerde ve C-liflerinde kainatın belirgin depolarizan ve desensitizan cevap oluşturduğunun keşfi ile desteklenmiştir.⁶¹ Ancak sonraki 20 yıl içerisinde kainat reseptörlerinin MSS'deki fonksiyonel rolleri yeteri kadar aydınlatılamamıştır. Son 10 yıl içerisinde yapılan çalışmalar, bu reseptörlerin postsinaptik bölgede mütevazî fakat uzamış depolarizasyon oluşturduğunu, eksitator ve inhibitör transmisyonunda ve nöronal eksitabilitede rol aldığını göstermiştir.^{64, 65} Birçok açıdan AMPA reseptörleri ile benzerlik gösteren bu glutamat kapılı katyon kanalları MSS'de hızlı eksitator sinaptik iletiye iştirak ederler.^{61, 66}

Kainat reseptörleri beş farklı gen aracılığıyla sentezlenen ve GluR5, GluR6, GluR7 (veya $\text{GLU}_{\text{K5-7}}$), KA1 ve KA2 (veya GLU_{K1} ve GLU_{K2}) olarak adlandırılan 5 altbirimin kombinasyonundan müteşekkil tetramerlerdir.^{38-40, 42, 61} KA1 ve KA2 altbirimleri [^3H]kainata GluR5-7'den daha yüksek afinite gösterdikleri için isimlendirilmeleri farklılık

gösterir. Teorik olarak sadece yüksek afiniteli alt birimlerin biraraya gelebileceği öngörülebilse de fonksiyonel bir kainat reseptörü için bu durum yeterli değildir.⁶⁶

TAA ile AKY'nin indüklendiği ratlarda kainat reseptör dansitesinin serebral kortekste arttığı, striatumba azaldığı ve hipokampüste ise değişmediği tespit edilmiştir.¹⁸

2.3.2.4. Metabotropik Reseptörler (mGluR, ACPD Reseptörleri)

Metabotropik glutamat reseptörleri (mGluR) 1980'lerde glutamat ve diğer EAA'ların (kiskolat ve ibotenat gibi) MSS'de farklı tip hücrelerde fosfoinozitin (PI) fosforilasyonunu stimüle edebildiklerinin ve hücre içi Ca^{2+} 'nın mobilizasyonunu sağladıklarının gösterilmesi ile keşfedilmiştir.⁶⁷ γ -aminobütirik asit_B (GABA_B) reseptörlerinin de dahil olduğu G-protein bağlı reseptörlerin (GPBR) C sınıfına dahil, doğal ligandların bağlanması için geniş amino uçlarında meydana gelmiş cep benzeri bağlanma bölgeleri ile karakterize⁶⁸ bu reseptörler yedi transmembranal segment ihtiva ederler.³⁸

Bugüne kadar sekiz farklı alt tipte (mGlu1-8) mGlu reseptörü klonlanmıştır. Bu reseptör alt tipleri aminoasit dizilişindeki benzerliklere, sinyal iletim mekanizmalarına ve farmakolojik özelliklerine göre üç gruba ayrılabilir. ^{23, 68-70} Grup I mGlu reseptörleri (mGlu1 ve mGlu5) G α q-proteini aracılığıyla fosfolipaz C (PLC) ile pozitif kenetlidir ve fosfoinozitin hidrolizini dolayısıyla intraselüler Ca^{2+} düzeyini ve araşidonik asit salgısını artırır. Grup II mGlu reseptörleri (mGlu2 ve mGlu3) G α i-proteininin aktivasyonu aracılığıyla adenilil siklaz (AC) ile negatif kenetlidir. Benzer şekilde grup III mGlu reseptörleri (mGlu4, mGlu6, mGlu7 ve mGlu8) de G α i-proteini aracılığıyla AC ile negatif kenetlidir.⁶⁸⁻⁷⁰

Hiperamonyeminin iyonotropik glutamat reseptörleri üzerindeki etkilerini (özellikle NMDA reseptörleri üzerindeki) inceleyen çok sayıda çalışma mevcutken

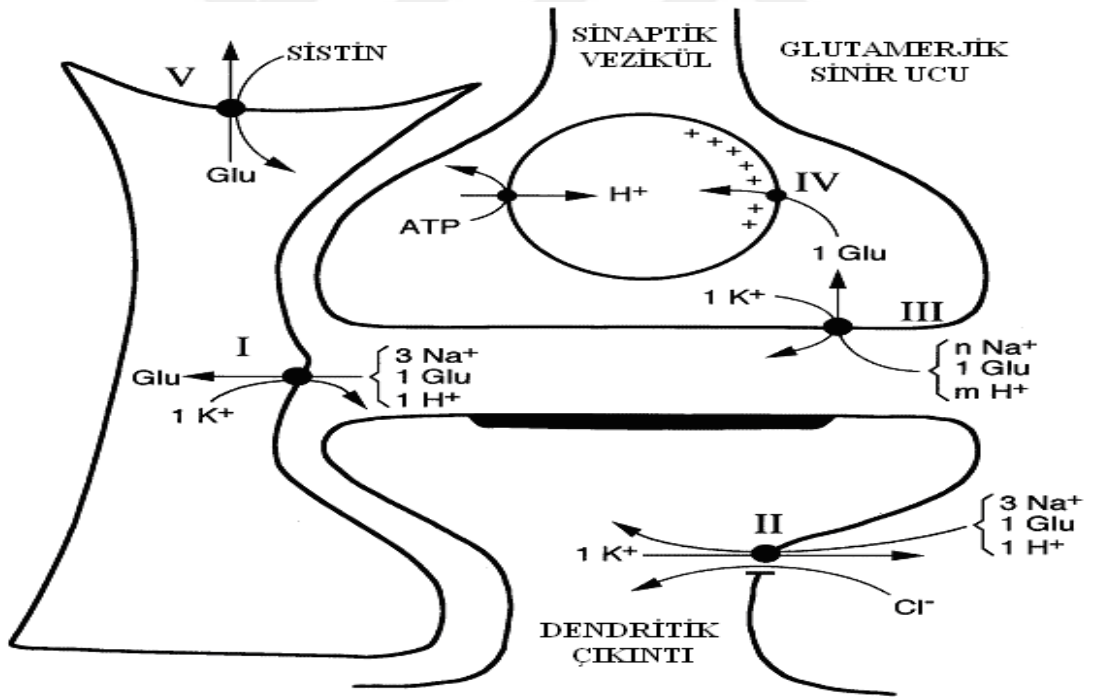
metabotropik glutamat reseptörlerinin dansitesi ve/veya afinitesi üzerinde yapılmış çok az sayıda çalışma mevcuttur.¹⁴

2.3.3. Glutamat Taşıyıcıları ve Hiperamonyemi

Ekstraselüler ortamda biriken glutamatın nörotoksik etkilerine aracılık eden reseptörlerin sadece sinapslarda değil nöron soması, dendritler ve nöron terminallerinde de bulunması glutamat eksitotoksitesini engelleyebilmek için glutamat konsantrasyonunun sadece sinaptik aralıkta değil ekstrasinaptik ortamda da kontrol altında tutulduğunu gösterir.^{27, 71-73} Daha önce de değinildiği gibi glutamatın ekstraselüler düzeylerini kimyasal yollarla regüle edebilecek bir enzim sistemi bulunmamaktadır. Bu durum ekstraselüler glutamat konsantrasyonunun regülasyonu için glutamatı ekstraselüler ortamdan salgılandığı yere geri taşıyan bir mekanizmanın elzem olduğunu gösterir. Astrositlere ve bunun yanında da nöronlara gerçekleşen bu geri taşımının %95'i Na^+ bağımlı ve yüksek afiniteli bir taşıyıcı mekanizma ve %5'i ise Na^+ bağımsız (Cl^- bağımlı glutamat/sistin taşıyıcıları) bir taşıyıcı mekanizma aracılığıyla gerçekleştirilir.^{27, 29, 74} Burada glutamatın geri taşınması sadece eksitator sinyal iletiminin sonlandırılması ve eksitotoksitenin önlenmesi açısından değil hücre içi glutamat havuzlarının tekrar doldurulması açısından da önem arz eder.

Ekstraselüler glutamatı astrositlere ve nöronlara geri taşımakla sorumlu EAAT1 (GLAST, Glutamate-Aspartate Transporter), EAAT2 (Glutamate Transporter, GLT), EAAT3 (Excitatory Amino Acid Carrier, EAAC), EAAT4 (Excitatory Amino Acid Transporter) ve EAAT5 olmak üzere beş farklı yüksek afiniteli ve Na^+ bağımlı taşıyıcının var olduğu bilinmektedir. Bu taşıyıcı proteinlerden EAAT1 ve EAAT2 MSS astrositlerinde, EAAT3 MSS nöron somaları ve dendritlerinde, EAAT4 serebellar purkinje hücrelerinde ve EAAT5 özellikle retinada yerleşim gösterir.^{27, 71, 73, 74} Bu taşıyıcılar vasıtasıyla üç adet Na^+ ve bir adet H^+ iyonu ile birlikte bir adet glutamat

anyonunu hücre içine geri taşınırken bir adet K^+ iyonu ise hücre dışına çıkarılır. Nöronlara geri taşınan glutamat sitoplazmada veziküler glutamat taşıyıcıları (VGLUT) aracılığıyla veziküller içerisine sekestre olur ve daha sonra salıverilmek üzere depo edilir.⁷⁵ Glutamatı amonyak ile amide eden reaksiyonu katalizleyen glutamin sentetaz (GS) enzimini ihtiva eden astrositlerde ise glutamat enerji gerektiren bir reaksiyonla glutamat ve GABA prekürsörü olan glutamine dönüştürülür ve sentezlenen glutamin hücre dışı ortama salıverilir. Astrositler tarafından salıverilen glutamin nöronlar tarafından hücre içine alınıp glutaminaz (GLS) enziminin katalizlediği enerji gerektirmeyen bir reaksiyonla tekrar glutamata dönüştürülür ve depo edilir. Kan-beyin bariyeri nedeniyle periferden temin edilemeyen glutamatı kendi içinde sentez ve depo etmek zorunda olan MSS'de gerçekleştirilen bu hayati döngü glutamin-glutamat döngüsü olarak adlandırılır.^{26, 75, 76}



Şekil 2.2. Hücre dışındaki glutamatın nöronlara ve astrositlere geri taşınması.

Glutamat taşıyıcıları (GT) üzerinde yapılmış ve yukarıda hayati öneme sahip olduğunu belirttiğimiz glutamat geri alımının artan amonyak konsantrasyonları ile birlikte sekteye uğradığını gösteren çok sayıda çalışma mevcuttur. Schmidt ve ark., 80 μM 'ye

kadar artan konsantrasyonlarda amonyak ile muamele ettikleri rat hipokampal doku kültürlerinde glutamatın metabolize edilemeyen analogu D-Aspartat geri alımının arttığını ancak 80 μ M üzerindeki konsantrasyonlarda (AKY hastalarında serebral amonyak konsantrasyonları 5 mM'ye kadar yükselir) D-Aspartat geri alımının doza bağımlı bir şekilde azaldığını tespit etmiştir.^{77, 78} Astrosit kültürlerinin ise 5-10 mM amonyak ile muamele edildiği in-vitro bir çalışmada glutamatın astrositlere geri taşınmasının yavaşladığı⁷⁹ ve yapılan bir başka çalışmada ise AKY'li ratların serebral kortekslerinde astrositik glutamat taşıyıcısı GLT-1 (EAAT-2) transkripsiyonun önemli derecede azaldığı gösterilmiştir.⁸⁰ Tiyoasetamid ile AKY'nin indüklendiği bir diğer çalışmada da benzer sonuçlara ulaşılmıştır.⁸¹ Ayrıca yedi gün boyunca 5 mM konsantrasyonda amonyak ile muamele edilmenin astrosit kültürlerinde GLAST (EAAT-1) ekspresyonundaki azalmaya paralel olarak glutamat geri alımını sekteye uğrattığı görülmüştür.^{82, 83}

2.4. Minosiklin ve Nöroproteksiyon

Minosiklin, birçok gram (+) ve gram (-) bakteriye ve Riketsiya, Klamidya, Plazmodyum türleri ve Mycoplasma pneumoniae'ye karşı etkinlik gösteren ikinci kuşak bir "tetrasiklin"dir. Yağda çözünürlüğü yüksek olan minosiklin molekülü bakteri membranını doğrudan veya porin kanalları sayesinde pasif difüzyonla aşarak bakteriyel ribozomların 30S alt birimine bağlanır ve tRNA'nın mRNA-ribozom kompleksi ile bir araya gelmesini engelleyip protein sentezini inhibe etmek suretiyle bakteriyostatik etkinlik gösterir. Minosiklin, oral yoldan alındığında birinci kuşak tetrasiklinlerden daha iyi bir farmakokinetik profil çizer. Öyle ki yaşlı hastalarda bile oral alımını takiben hızla ve yüksek oranda absorbe edilebilir.⁸⁴ Yağdaki yüksek çözünürlüğü sayesinde kan-beyin bariyerini aşp serebrospinal sıvıda ve MSS hücrelerinde birçok MSS hastalığında kullanımını mümkün kılacak konsantrasyonlara ulaşabilir.^{85, 86} Minosiklin kronik kullanımda da güvenilirliğini ispatlamış bir tetrasiklindir. Öyle ki FDA'nın öngördüğü

günlük maksimum dozunun (200 mg) kronik kullanımı dahi gayet iyi tolere edilebilmektedir. Minosiklinin kısa süreli tedavisi sırasında ortaya çıkan yan etkilerden en sık görülenleri tedavinin kesilmesi ile kısa sürede ortadan kalkan bulantı, vertigo ve sersemlik halidir. Ancak İngiliz Ulusal İlaç Rehberi altı aydan uzun süren minosiklin tedavilerinde her üç ayda bir hastaların hepatotoksisite, pigmentasyon ve sistemik lupus eritematozus açısından değerlendirilmesini tavsiye etmektedir. Uzun süreli kullanımına bağlı İngiliz Ulusal İlaç Rehberi'nde de öngörülen bu riskler minosiklinin enfeksiyon hastalıkları tedavisinde kullanımını belirli ölçüde sınırlandırmaktadır.⁸⁴

Minosiklinin MSS hastalıklarının tedavisinde etkili olabileceği tezi ilk defa Yrjanheikki ve ark. tarafından yaklaşık 20 yıl önce deneysel iskemi oluşturulmuş çöl fareleri üzerinde yapılan ve minosiklin tedavisi sayesinde iskemi ile indüklenen mikrogial aktivasyonun inhibe edilebildiğini gösteren bir çalışma sayesinde bilim adamlarının dikkatine sunulmuştur.⁸⁷ Daha sonra minosiklin ile yapılan ileri çalışmalar da bu tetrasiklinin birçok nörodejeneratif hastalığın tedavisinde etkin rol oynayabileceğini göstermiştir. Minosiklin ile yapılan çalışmalarda aksonal izolasyonu sağlayan oligodendrosit hasarı ve dolayısıyla aksonal nöron hasarı önemli ölçüde azaltılabilmektedir.^{88, 89} Yapılan klinik çalışmalar ile minosiklinin Huntington hastalığında^{90, 91} ve multipl sklerozda (MS)⁹² terapötik etkinliği kanıtlanmıştır.

Minosiklin'in nöroprotektif etkinliğinin araştırıldığı birçok çalışmada tetrasiklinlerin glutamat eksitotoksisitesine bağlı nöronal hasarı önleyebileceğine dair veriler elde edilmiştir.⁹³⁻¹⁰⁰ Kortikal nöron kültürlerinde yapılan in-vitro çalışmalarda kültür ortamına eklenen minosiklinin glutamatla indüklenen nörotoksisiteyi azalttığı görülmüştür.^{93, 94, 101} Ayrıca minosiklinin nörodejeneratif hastalıklarla yakından ilişkilendirilen mikrogial hiperaktiviteyi^{102, 103} inhibe ettiği de bilinmektedir.⁸⁷ 2010 yılında Nie H. ve ark. ve ayrıca 2012 yılında Amin P. ve ark.'nın yürüttüğü çalışmalar ile

minosiklinin GLT1 ekspresyonunu ve/veya aktivitesini artırmak veya korumak suretiyle ratlarda indüklenen nöropatik ağrı modelinde hipersensitiviteyi azalttığını gözlemlmeleri^{104, 105} dikkatlerin nörodejeneratif hastalıklarda minosiklin-GT etkileşmesine yoğunlaşmasını sağlamıştır.



3. MATERYAL VE METOT

Bu çalışmada, Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Araştırma ve Uygulama Merkezi'nden temin edilen ve ağırlıkları 250-300 gram arasında değişen toplam 24 adet Albino Wistar cinsi dişi rat kullanılmıştır. Deney hayvanları çalışma süresince doğal gece-gündüz döngüsünün yaşandığı bir laboratuvar ortamında, normal oda sıcaklığında (22°C), altı talaş serili plastik kafeslerde barındırıldı ve beslendi. Çalışmamızın bütün aşamalarının etik kurallara uygun olduğu “Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (AÜHADYEK)” tarafından verilen 22.05.2013 tarihli ve 42190979-01-02/2238 sayılı yazı ile onaylanmıştır.

Bahsedilen 24 adet rat lokomotor testleri yapıldıktan sonra her biri 6 denekten oluşan toplam 4 gruba ayrıldı:

1. Grup (Kontrol): AKY modelinin oluşturulmayıp ve herhangi bir tedavinin de uygulanmadığı tamamen sağlıklı ratlardan oluşan gruptur.

2. Grup (TAA): Ardışık üç gün boyunca TAA enjeksiyonu (350 mg/kg, i.p.) yapılmak suretiyle AKY'nin indüklendiği fakat herhangi bir tedavi protokolünün uygulanmadığı hastalıklı gruptur.

3. Grup (Minosiklin): AKY modelinin oluşturulmadığı ve sadece 4. grup ratlar ile eş zamanlı olarak minosiklin enjeksiyonunun (50 mg/kg, i.p.) yapıldığı sağlıklı gruptur.

4. Grup (TAA+Minosiklin): AKY modeli oluşturulmadan 10 gün önce minosiklin enjeksiyonuna (50 mg/kg, i.p.) başlanan ve ardışık üç gün boyunca yapılan TAA enjeksiyonu (400 mg/kg, i.p.) ile AKY'nin indüklendiği tedavi grubudur.

3. ve 4. gruptaki deneklere hepatik ensefalopati modeli oluşturulmadan önceki 10 gün boyunca minosiklin (50 mg/kg/gün, i.p.)¹⁰⁶ enjekte edilmiştir. Bu 10 günün sonunda 2. ve 4. gruptaki deney hayvanlarına hepatik ensefalopatiyi indüklemek maksadıyla 24 saat ara ile toplam üç doz TAA (400 mg/kg, i.p.)¹⁰⁷ enjeksiyonu yapılmıştır. 2. ve 4.

gruptaki deneklerde kilo kaybı, hipoglisemi ve böbrek yetmezliğini önlemek amacıyla 12 saat aralarla s.c. yoldan %5 dekstroz (25 mL/kg) ve potasyum (20 mEq/L) içeren % 0.9'luk NaCl solüsyonu uygulanmıştır.¹⁰⁷

3.1. İn-vivo Voltametri

İn-vivo koşullarda MSS dokularında bulunan glutamat ve diğer aminoasitlerin anlık düzeylerini tespit etmek maksadıyla kullanılan intrakraniyal mikrodializ yöntemlerinin saniyeler içerisinde ekstraselüler konsantrasyonu değişebilen glutamat gibi hızlı kinetiğe sahip transmitterlerin analizinde tartışılan güvenilirlikleri¹⁰⁸ bilim adamlarını saniye saniye ölçüm yapabilen sistemleri geliştirmeye zorlamıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda da glutamat ve diğer nörotransmitterlerin MSS'deki düzey ve kinetiklerini saniye saniye ölçebilecek mikroelettrotların kullanıldığı elektrokimyasal bir metot geliştirilmiştir: in-vivo voltametrik metot.

3.1.1. Mikroelettrot Hazırlama

Her biri üzerinde 4 adet sensör bulunduran seramik yüzeyli mikroelettrotlar glutamatı tespit etme kabiliyeti kazandırılmak üzere bir takım işlemlerden geçirilmek zorundadır. Bu bölümde seramik yüzeyli basit elektrotlara glutamat seçiciliğinin kazandırılması için yapılan işlemlerden bahsedilecektir.

3.1.1.1. Mikroelettrot Yüzeyinin Nafyon ile Kaplanması

Deney için kullanılacak olan her mikroelettrot Citrisolv temizleme solüsyonu ile 5 dakika yıkandı ve distile edilmiş deiyonize su (d-DI H₂O) ile durulandı. Bu işlemi takiben mikroelettrotlar, üzerlerindeki nemi tamamen uzaklaştırmak için 15 dakika boyunca 105–115°C sıcaklığa ayarlanmış özel fırında (Fisher Scientific) kurumaya bırakıldı. Daha sonra nafyon'un polimer matriksinde bulunan negatif yüklü substitüye sülfonik asit grupları sayesinde anyonları iterek onların platin kayıt bölgesine ulaşmasını engellemek ve serebral düzeyleri ölçülmek istenmeyen 3,4-dihidroksifenilasetik asit

(DOPAC) ve askorbik asit (AA) gibi MSS'de yüksek konsantrasyonlarda bulunan anyonların oluşturacağı kimyasal gürültüyü önlemek maksadıyla elektrot yüzeylerinin nafyon ile kaplanması işlemine geçildi. Bu amaçla anyonik bir teflon derivesi olan nafyonun %5'lik solüsyonu (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis) ile deney çalışmamızda kullanacağımız mikroelettrotların sensör yüzeyleri kaplandı.¹⁰⁹ Mikroelettrotların sensör uçlarının 300 µL'lik santrifüj tüpleri içerisindeki %5'lik nafyon solüsyonuna daldırıldıktan sonra bir dönüş bir saniye sürecek şekilde solüsyon içerisinde 5 defa döndürülüp solüsyondan çıkarıldığı ve 175°C sıcaklıktaki fırına konulup 3-4 dakika bekletildiği (daha uzun süreli kurutmalar AA ve glutamat ölçüm kabiliyetini azaltır) bu işlem optimal glutamat selektivitesini sağlamak amacıyla 5 defa tekrarlandı. Bu aşamada gereğinden kalın bir nafyon kaplamasının glutamat cevabını tamamen engelleyebileceği ve platin kayıt bölgesine AA geçişini yeterince bloke edemeyecek incelikte bir nafyon kaplamasının ise glutamat seçiciliğini azaltabileceği (arzu edilen seçicilik 100:1'dir) göz önünde bulundurulmuştur.¹¹⁰

3.1.1.2. Mikroelettrot Yüzeylerinin L-Glutamat Oksidaz ile Kaplanması

Bu işlem elektrokimyasal açıdan aktif olmayan serebral glutamattan elektrokimyasal cevap oluşturabilen bir haberci molekülün (platin elektrot yüzeyinde okside olabilen H₂O₂) meydana gelebilmesi için mikroelettrot sensör yüzeyinin L-glutamat oksidaz enzimi ile kaplanması işlemidir. Bu amaçla öncelikle stok L-glutamat oksidaz solüsyonu 50 µL didistile su ilave edilerek kullanılacak konsantrasyona seyreltili. Daha sonra kullanılacak bütün protein ve enzimler [%1 L-glutamat oksidaz (GluOx, Seikagau America), %1 sıgır serum albümini (SSA; Sigma-Aldrich) ve % 0.125 gluteraldehit (Glu; Sigma-Aldrich)] standart oda sıcaklığına getirildi. 0.1 gram SSA 1.5 mL'lik mikrosantrifüj tüpünde 985 µL'lik didistile su ile birleştirilip iyice çalkalandı. Çözülme sonrası 5 µl hacminde %25'lik gluteraldehit solüsyonu SSA karışımına ilave

edilerek iyice karıştırıldı. Daha sonra bu karışım açık sarı renk alana kadar 5 dakika süreyle oda sıcaklığında bekletildi. Hazırlanan SSA-gluteraldehit karışımından 9 µL alınıp 300 µl'lik mikrosantrifüj tüpüne aktarıldıktan sonra 1 µL hacminde L-glutamat oksidaz stok solüsyonu üzerine ilave edilerek pipetle karıştırıldı. %1 SSA, %0.125 gluteraldehit ve yaklaşık %1 L-glutamat oksidaz içeren bu 10 µL'lik son karışım mikroskop altında 25 µl'lik Hamilton mikro iğnesiyle küçük damlalar halinde mikroelettrotların üzerine damlatıldı. Bu işleme oluşan enzim tabakası mikroskop altında görülebilir hale gelene kadar birer dakika ara ile devam edildi. L-glutamat oksidaz ile muamele edilen elektrotlar oda sıcaklığında 48-72 saat süreyle bekletildikten sonra elektrotların kalibrasyon işlemine başlandı.

3.1.1.3. Mikroelettrot Kalibrasyonu

Mikroelettrot kalibrasyonu için bir beher içerisinde bulunan 37°C'de ve 40 mL hacmindeki 0.05 M'lik fosfat tampon solüsyonuna (PBS) daldırılan mikroelettrotlar yaklaşık bir saat süreyle PBS içerisinde beklemeye bırakıldı. Bir saatin sonunda Ag/AgCl referans elektrotu da tampon solüsyonuna yerleştirildikten sonra mikroelettrotlar üzerindeki 4 kayıt alma bölgesinden elde edilen elektrokimyasal verileri işleyip analit (glutamat) konsantrasyonları hakkında bilgi verebilen bilgisayarlı sensör sistemine (Fast Analytical Sensor Technology, Quanteon L.L.C, FAST-16) başlangıç bilgileri girilip mikroelettrotlara +0.7 V'lik bir gerilim uygulandı. Voltaj uygulamasını takiben akımın sabit bir taban seviyeye (baseline) ulaşması için en az 10–15 dakika beklendi. Elektriksel akımın sabit bir taban seviyeye ulaştığı analiz programının arayüzünde baseline butonu ile tespit edildi. Daha sonra 500 µL hacminde 20 mM'lik AA solüsyonu (interferent) nihai beher konsantrasyonu 250 µM olacak şekilde beher içerisine eklenip akım tekrar sabit bir taban seviyeye indiğinde bu durum da program arayüzünde bu kez interferent butonu ile tespit edildi. Bu işlemi takiben üç kere 20 mM konsantrasyonda 40 µL L-glutamat, sonuç

L-glutamat'ın beher konsantrasyonu 20, 40 ve 60 μ M olacak şekilde kalibrasyon beherine ilave edildi. Analitin deney beherine her ilavesi ve program arayüzünde kalibrasyon eğiminin görülmesi kayıt altına alındı. Analitin test ortamına üç defa daha eklenmesini takiben 2 mM konsantrasyonda ve 40 μ L hacminde dopamin (DA), test ortamına konsantrasyonu 2 μ M olacak şekilde test maddesi olarak eklendi ve bu an da program arayüzünde işaretlendi. Son olarak 8.8 mM konsantrasyonda ve 40 μ L hacminde H_2O_2 mikroelettrot duyarlılığını kesinleştirmek için kalibrasyon beherine eklendi. Kalibrasyonun bitiminde program durduruldu, veriler arayüz üzerinden kaydedildi ve mikroelettrot tampon solüsyonundan çıkarılıp muhafazaya alındı.

3.1.2. Mikropipet Hazırlama

Kalibrasyonu yapılmış her bir mikroelettrot üzerine beyin dokusuna dışarıdan glutamat enjekte edilmesine olanak sağlayacak bir cam mikropipet yerleştirildi. Bu mikropipet vertikal pipet çekici marifetiyle 1 mm dış ve 0.58 mm iç çapa sahip olacak şekilde hazırlandı. Mikroskop altında, hazırlanan bu mikropipetin uç kısmı dış çapı 12–15 μ m olacak şekilde kırılarak deney için kullanıma hazır hale getirildi. Hazır haldeki mikropipet macun ve mum kullanılarak mikroelettrotun üzerine uç kısmı elektrot üzerindeki kayıt bölgelerinin ortasına denk gelecek ve mikropipetin uç kısmı ile elektrotun platin kayıt bölgesi arasında 50–100 μ m'lik bir mesafe olacak şekilde konumlandırılıp sabitlendi. Daha sonra 200 mM konsantrasyonunda hazırlanmış L-glutamat solüsyonu 1 mL'lik tüberkülin iğnesine alındıktan sonra 0.22 μ m'lik steril filtreden geçirildi ve diğer uçtan 30 numaralı hipodermik iğneye aktarıldı. Hipodermik iğne ile içi 200 mM konsantrasyonda glutamat ile doldurulan mikropipet nihayet kullanıma hazır hale getirildi.

3.1.3. Referans Elektrotun Hazırlanması

Mikroelettrotların kalibrasyonu sırasında kullanılan cam Ag/AgCl elektrotu ratlar üzerinde yapılacak in-vivo çalışmamız için çok büyük olduğundan elektrokimyasal

metodla minyatür bir Ag/AgCl referans elektrotu hazırlandı. Bu amaçla bir ucu voltametri cihazı ile irtibatlandırılan ve diğer ucu ise NaCl ile doyurulmuş 1 M HCl çözeltisi içine yerleştirilen gümüş bir tel, platin bir kablonun zıt elektrot olarak kullanıldığı düzeneğe DC bir adaptör aracılığıyla sağlanan 9 V'lık bir potansiyel sayesinde kendisine yönlendirilen serbest Cl⁻ ile kaplandı. Elde edilen bu referans elektrot deneye kadar 3 M'lik NaCl çözeltisi içerisinde muhafaza edildi.

3.1.4. Mikroelektrotun Beyin Dokusuna İmplantasyonu

Deneyde kullanılacak sıçanlar tiyopental (25 mg/kg, i.p.) enjeksiyonu ile anestezi altına alındıktan sonra önceden hazırlamış olduğumuz mikroelektrot hedef bölgeye stereotaksi cihazı (Stoelting Co.) marifetiyle yerleştirildi. Bu işlemten önce anestezi altındaki deneklerin kafaları stereotaksi cihazına yerleştirilerek sabitlendi ve vücutları, vücut sıcaklığının 37°C'de sabit tutulabilmesi için ısıtıcı petlerle desteklendi. Kafa kılları traş edilip kafa derisi hafif bir insizyonla kesilerek sağa ve sola açılıp bregma gözle görülür hale getirildi. Bu nokta (bregma) stereotaksi cihazı için referans noktası olarak kabul edilip beyin atlasından elde edilen koordinatlar aracılığı ile mikroelektrotun yerleştirileceği noktadaki kafa kemiği, beyine zarar verilmeden elektrikli bir matkap (Foredom 1/6 HP Series SR flexible shaft power tools) yardımıyla delinerek çıkarıldı. Bir forseps yardımıyla "dura" uzaklaştırılarak beyin yüzeyine ulaşıldı. Ag/AgCl referans elektrodu beyne yerleştirilip diş sementiyle sabitlendi. Paxinos ve Watson'un stereotaksik atlasına göre elektrotun yerleştirileceği bölgenin koordinatları tespit edildi. Cam pipet içerisindeki glutamat solüsyonunu beyin dokusuna enjekte etmek için inert helyum gazını istenilen basınçta ve sürede cam pipete uygulayabilecek Pikosipritzer III cihazı mikropipete sabitlendi. Stereotaksi cihazıyla eşleştirilmiş bir mikromanipülatör yardımıyla elektrot istenilen koordinata yerleştirildi. Önceden kalibre ettiğimiz mikroelektrota ait kalibrasyon parametreleri FAST-16 kayıt sisteminden geri çağırılıp

elektrokimyasal akım sabit bir taban seviyeye ulaştığında (15-20 dk) glutamat amplitüdü, maksimuma ulaşma süresi ve glutamatın geri alım süresi ile ilgili bilgilerin tespiti işlemine başlandı.

3.1.5. Elektrokimyasal Sinyal Analizi

Beyin dokusuna basınçla enjeksiyonu sonucu ekstraselüler ortamda biriken L-glutamatın konsantrasyonu saniye saniye ölçülerek eksojen glutamatın taşıyıcıları vasıtasıyla ekstraselüler ortamdan tahliye edilmesi ile alakalı maksimum amplitüde ulaşma zamanı (yükselme zamanı, TR) ve enjekte edilen glutamatın % 80'inin taşıyıcıları vasıtasıyla ekstraselüler ortamdan uzaklaştırılma süreleri (t80) kaydedildi. İstatistikî anlam ifade edecek kadar kayıt alındıktan sonra bütün gruplar yüksek doz tiyopental sodyum (50mg/kg) ile sakrifiye edilerek deney sonlandırıldı.

3.2. Lokomotor Aktivitelerin Değerlendirilmesi

Deneklerin lokomotor aktivite testleri karanlık bir ortamda, aynı anda dört adet deneğin lokomotor aktivitesini takip edebilme kapasitesine sahip, her biri 40 cm x 40 cm x 50 cm ebadında, üstü açık ve zemini talaşsız dört adet pleksiglas lokomotor aktivite takip kafesinde her bir deneğin horizontal, ambulator ve vertikal hareketlerinin bilgisayarlı bir sistemle takip edilebildiği lokomotor aktivite test cihazında gerçekleştirildi (MAY ACT 508-Animal Locomotor Activity Meter, TR). Locomotor aktivite testi için aynı anda 1., 2., 3. ve 4. gruptan birer denek lokomotor aktivite ölçüm cihazındaki kafeslere konularak 30 dakika boyunca horizontal, vertikal ve ambulator hareketleri kayıt altına alındı.

3.3. İstatistikî Analizler

İstatistiksel analizler Statistical Packages for the Social Sciences (SPSS) yazılım programı marifetiyle yapıldı. Bütün istatistiksel farklılıklar ve önem seviyeleri "one-way

variance analyzes" (ANOVA) testi ile belirlendi. Çoklu karşılaştırmalarda Duncan ve LSD testi uygulandı ve $p<0.05$ olan sonuçlar anlamlı kabul edildi.

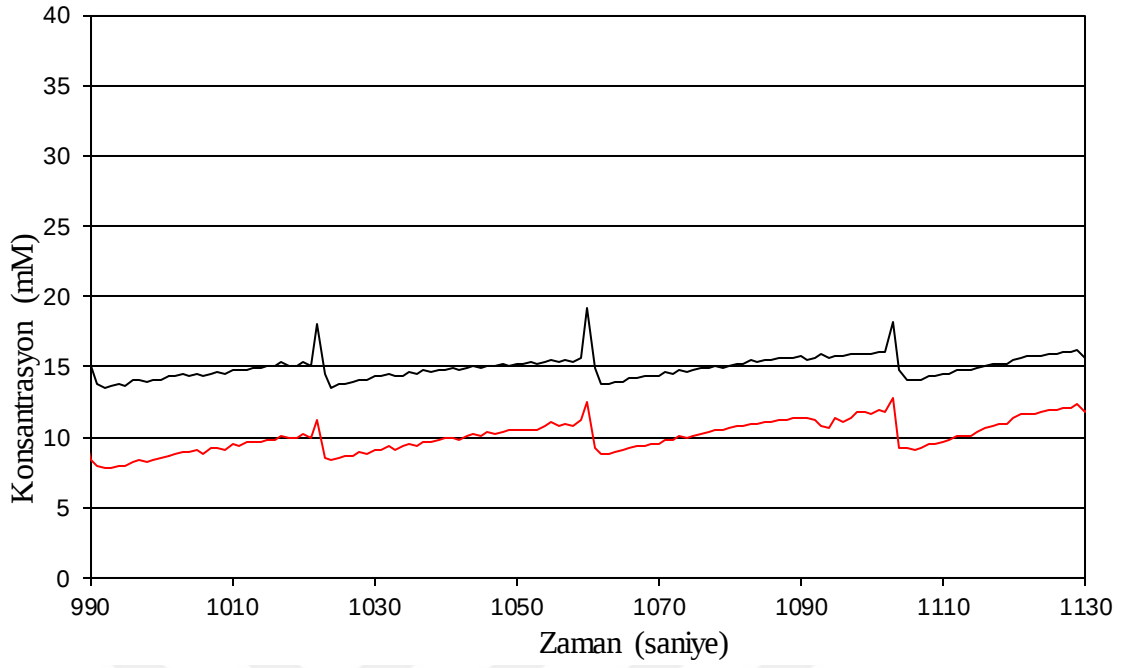


4. BULGULAR

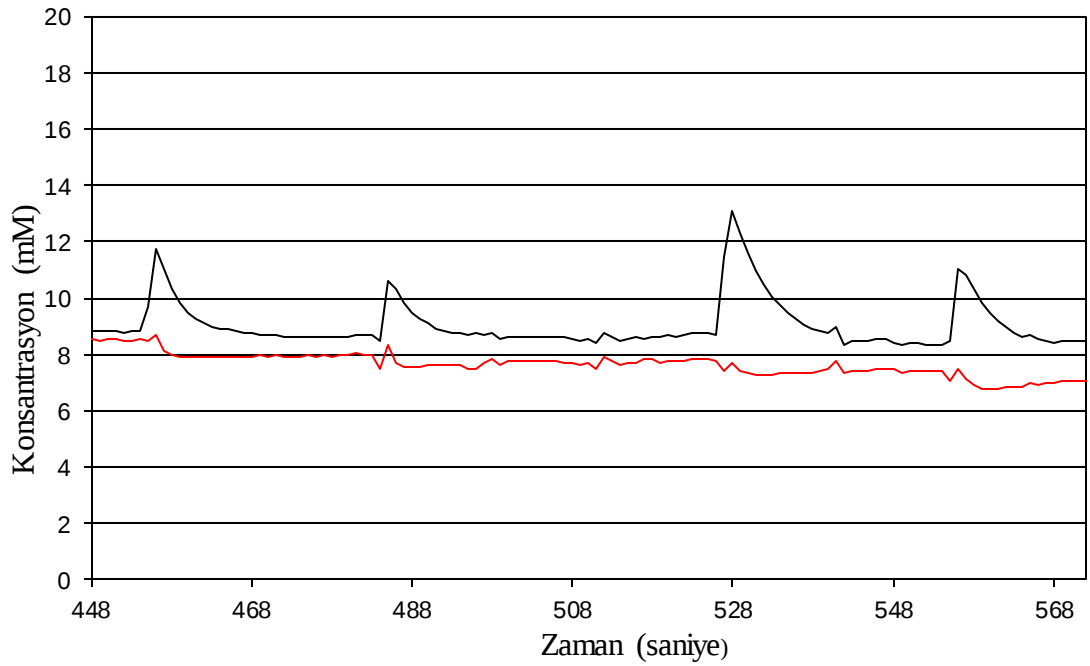
Bu deneyde, tolere edilebilir konsantrasyonların üzerinde astroglial ödeme ve eksitotoksiteye neden olduğu düşünülen glutamatın bazal seviyelerini ve spesifik geri taşıyıcılarının aktivitelerini tespit etmek üzere 4 farklı denek grubu üzerinde beynin farklı bölgelerinde (CA3, GP ve CPu) yaptığımız in-vivo voltametrik çalışmalarda bu bölgelere milimolar düzeyde zerk ettiğimiz 200 μ M glutamatın %80'inin ekstraselüler ortamdan tahliye edilme süreleri (t_{80}) araştırılmıştır. Kontrol (intakt) grubu üzerinde yapılan ölçümlerde t_{80} süreleri CA3, GP ve CPu bölgeleri için sırasıyla 4.08 ± 0.86 sn., 4.17 ± 0.7 sn. ve 3.35 ± 0.81 sn. olarak tespit edilirken bu değerlerin tiyoasetamid (TAA) ile hepatik ensefalopatinin (HE) indüklendiği grupta, dramatik şekilde, sırasıyla 54.29 ± 21.91 sn., 24.35 ± 12.30 sn. ve 48.07 ± 31.97 sn.'ye yükseldiği görülmüştür ($p < 0.05$). TAA enjeksiyonu ile HE'yi indüklediğimiz ve terapötik potansiyelini test etmek amacıyla minosiklin ile muhtemel bir tedavi uyguladığımız diğer grup sıçanlarda ise t_{80} sürelerinin 3.55 ± 0.94 sn., 4.78 ± 1.09 sn. ve 3.00 ± 0.00 sn. ile kontrol grubu değerlerine çok yaklaştığını tespit ettik ($p < 0.05$).

Tablo 5.1. Beyin bölgelerine ait t_{80} süreleri [Kontrol grubuna göre * $p < 0.001$ (n=6).]

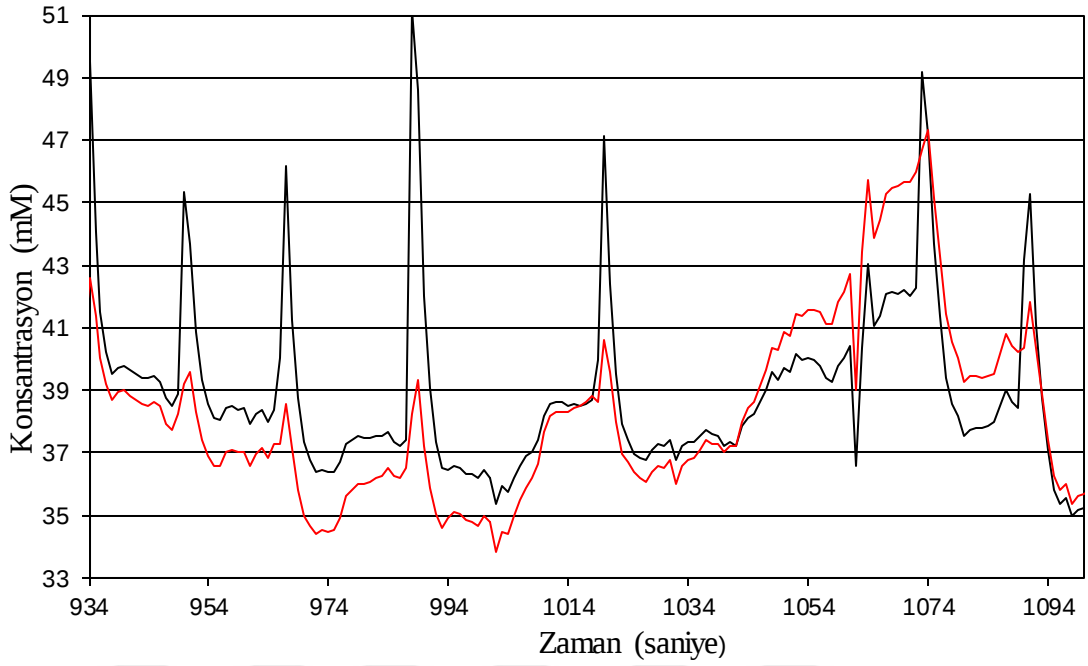
	CA3	Gp	Cpu
	Ortalama $\pm$ S. S.	Ortalama $\pm$ S. S.	Ortalama $\pm$ S. S.
Kontrol	4.08 ± 0.86 sn.	4.17 ± 0.71 sn.	3.35 ± 0.81 sn.
TAA	$54.29 \pm 21.91^*$ sn.	$24.35 \pm 12.30^*$ sn.	$48.07 \pm 31.97^*$ sn.
TAA+Minosiklin	3.55 ± 0.94 sn.	4.78 ± 1.09 sn.	3.00 ± 0.00 sn.



Şekil 5.1: İntakt gruba ait bir deneyin, 200 μ M konsantrasyonundaki glutamat mikroyenjeksiyonundan sonra, serebral CP bölgesinden alınan voltametrik sonuçlara ait grafik



Şekil 5.2: TAA ile HE'nin indüklediği gruba ait bir deneyin, 200 μ M konsantrasyonundaki glutamat mikroyenjeksiyonundan sonra, serebral CP bölgesinden alınan voltametrik sonuçlara ait grafik

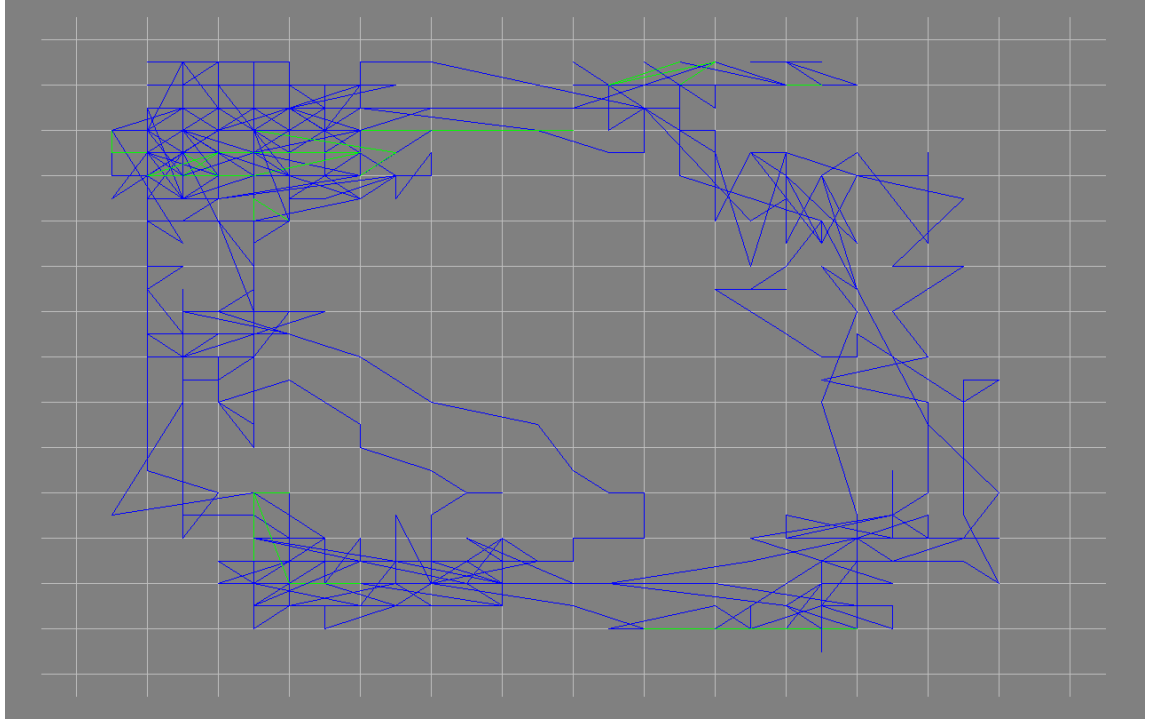


Şekil 5.3: TAA ile HE'nin indüklendiği ve minosiklin ile tedavi edilmiş gruba ait bir deneyin, 200 μ M konsantrasyonundaki glutamat mikroenjeksiyonundan sonra, serebral CP bölgesinden alınan voltametrik sonuçlara ait grafik

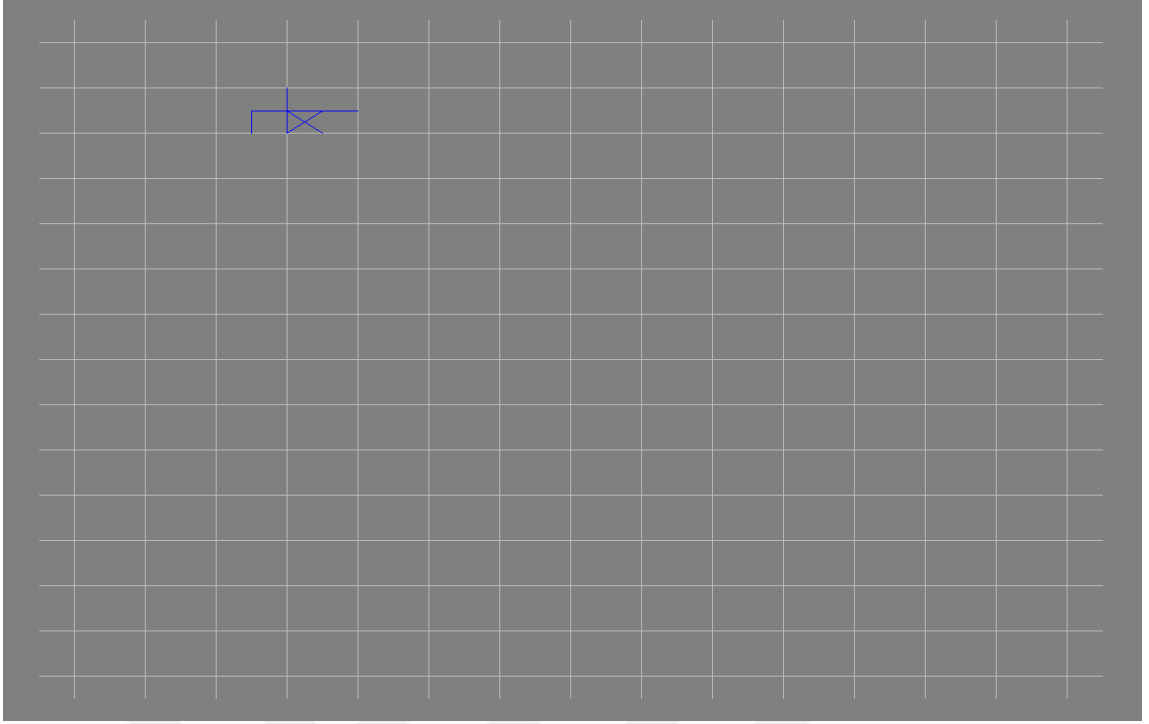
Deney gruplarının stereotipik ve ambulator hareket süreleri ile hareketsiz kaldıkları süreleri mukayese ettiğimizde TAA ile HE'nin indüklendiği sıçanların yaptıkları stereotipik ve ambulator hareketlerin toplam süreleri ile hareketsiz kaldıkları sürelerin intakt gruba göre anlamlı ölçüde kısa olduğu ($p<0.05$) fakat bu iki grup arasında vertikal hareketler için harcanan süreler açısından anlamlı bir fark bulunmadığı gözlemlendi. Minosiklin ile tedavi edilen grup ile intakt grup karşılaştırıldığında ise tedavi grubundaki deneklerin intakt gruptakilerden stereotipik ve vertikal hareketler yaparak geçirdiği süreler açısından farklılık göstermediği ancak ambulator hareketler için harcadıkları sürelerin anlamlı ölçüde uzadığı ($p<0.05$) ve hareketsiz kaldıkları sürelerin ise anlamlı ölçüde kısaldığı tespit edilmiştir ($p<0.05$).

Tablo 5.2. Deney gruplarına ait lokomotor aktivite test sonuçları [* Kontrol grubuna göre $p<0.005$ (n=6)]

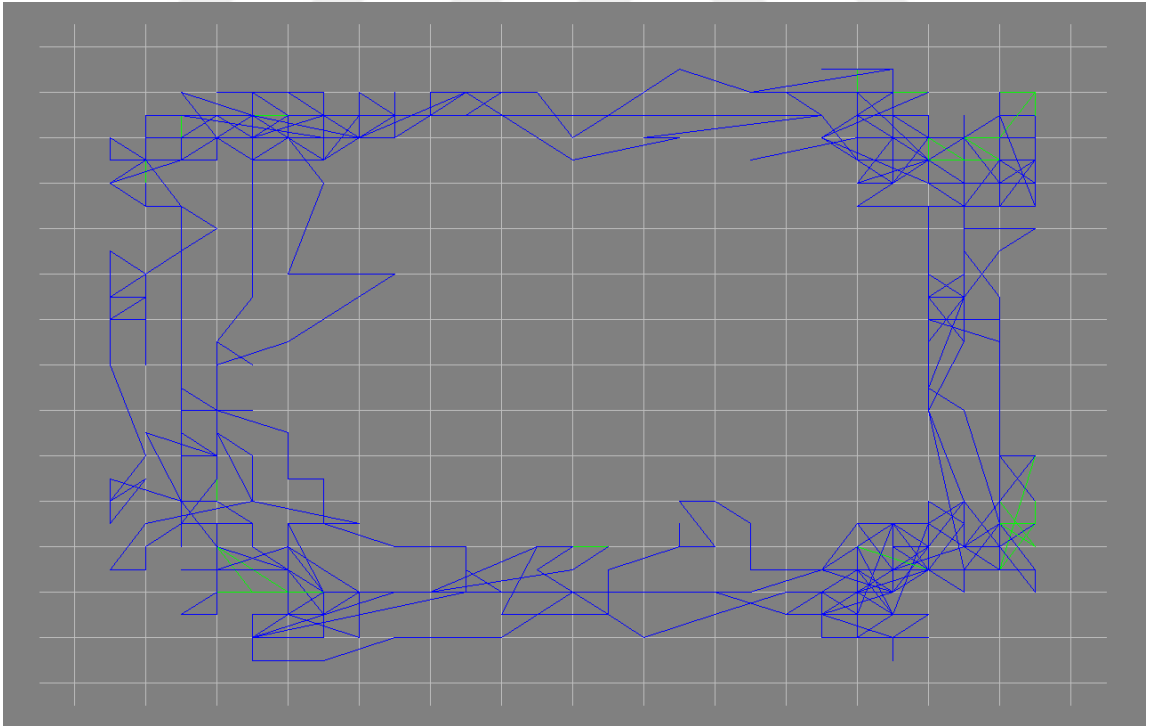
	Steriotipik (Sn)	Ambulatuvar (Sn)	Vertikal (Sn)	Dinlenme (Sn)
Kontrol	122.65±15.46	144.95±4.81	47.43±12.28	309.73±20.87
TAA	70.71±6.79*	87.64±49.74*	52.68±27.86	405.53±81.34*
TAA+Min.	112.57±39.74	144.63±27.03	51.16±14.41	313.83±61.76



Şekil 5.4: İntakt gruba ait bir sıçanın kaydedilmiş lokomotor aktivite sonuçları (Mavi çizgiler ambulatuvar ve yeşil çizgiler vertikal hareketleri temsil eder)



Şekil 5.5: TAA ile HEnin indüklendiği gruba ait bir sıçanın kaydedilmiş lokomotor aktivite sonuçları (Mavi çizgiler ambulator ve yeşil çizgiler vertikal hareketleri temsil eder)



Şekil 5.6: TAA ile HEnin indüklendiği ve minosiklin ile tedavi edilmiş gruba ait bir sıçanın kaydedilmiş lokomotor aktivite sonuçları (Mavi çizgiler ambulator ve yeşil çizgiler vertikal hareketleri temsil eder)

5. TARTIŞMA

Son yıllarda antibakteriyel etki mekanizmaları iyi bilinen bazı antibiyotiklerin nöroprotektif etkilere de sahip olabileceğini gösteren çok sayıda çalışma yapılmıştır. Özellikle, Rothstein ve arkadaşları tarafından 2005 yılında Nature isimli dergide yayınlanan ve β -laktam antibiyotiklerin (ampisilin, bakampisilin ve nafsilin gibi penisilin türevleri ve seftriakson, sefadroksil, sefalotin ve sefoperazol gibi sefalosporinlerin) glutamat taşıyıcılarının ekspresyonunu artırdıklarını ve bu suretle nöroprotektif etkinlik gösterebileceklerini tespit ettikleri çalışma¹¹¹ ve bu çalışmayı takip eden diğer destekleyici çalışmalar¹¹²⁻¹¹⁵ dikkatleri başta β -laktam antibiyotiklerin olmak üzere diğer birçok antibiyotiğin de bilinen terapötik endikasyonları yanındaki muhtemel endikasyonlarına yönlendirmiştir. Zamanla MSS'de glutamat taşıyıcısı ekspresyonunu ve dolayısıyla glutamat taşıyıcı sayısını artırma potansiyeline sahip bu ilaçların, özellikle ekstraselüler glutamat konsantrasyonlarında meydana gelen artışa bağlı olarak gelişen ve glutamatla ilişkili eksitotoksisite zemininde ilerlediği tahmin edilen MSS hasarlarının tedavisinde önemli etkilere sahip olabilecekleri kanaati oluşmuştur. Bu tezi yani ekstraselüler ortamda konsantrasyonu artan glutamatın efektif bir şekilde nöron içerisine geri alınmasını sağlayan spesifik taşıyıcıların yetersizliği ve/veya deformasyonuna bağlı olarak geliştiği düşünülen MSS hasarlarının yine bu taşıyıcıların sayısını transkripsiyon ve/veya sentez aşamasında artırarak hipereksitasyona bağlı nöronal hasarın ilerlemesinin engellenebileceği tezini desteklemek amacıyla da birçok β -laktam antibiyotik ile ileri çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmada da TAA ile indüklenen bir deneysel model kullanılarak minosiklin'in AKY'ye bağlı nöronal hasar üzerindeki muhtemel terapötik etkisi test edilmiştir. TAA ile indüklenen HE modelinin tercih edilmesi bu deneysel modelin insanlarda gelişen AKY ile hepatoselüler nekroz, köprü nekrozu ve lenfosit infiltrasyonu ile sonuçlanması yönüyle paralellik gösteriyor olmasındandır. Ayrıca bu

deneysel model kullanıldığında kan-beyin bariyerinin yapısal değişikliğe uğramaması sebebiyle astrositlerin nöromodulator fonksiyonlarında meydana gelen değişiklikler ile HE'nin progresyonu arasındaki ilişkinin tespiti mümkün olabilmektedir.¹¹¹

Tetrasiklin antibiyotiklerden yağda çözünürlüğü dolayısıyla MSS'ye geçme kabiliyeti en yüksek olan minosiklin'in aksonal izolasyonu sağlayan oligodendrosit ve dolayısıyla aksonal nöron hasarını önemli ölçüde azalttığı^{88, 89} glutamat toksisitesi ile yakından ilişkilendirilen Huntington hastalığı ve multipl skleroz'da (MS) progresyon üzerindeki pozitif etkilerinin, kortikal nöron kültürlerinde yapılan in-vitro çalışmalarda kültür ortamında glutamatla indüklenen nörotoksisiteyi baskıladığının^{93, 94, 101} ve GLT1 ekspresyonunu ve/veya aktivitesini artırmak veya korumak suretiyle ratlarda indüklenen nöropatik ağrı modellerinde hipersensitiviteyi azalttığı^{104, 105} onun nöroprotektif etki mekanizmasının β -laktam antibiyotikler ile benzerlik taşıyabileceği ihtimalini düşündürdüğü bilim insanlarını ileri çalışmalar yapmaya sevk etmiştir. Tez çalışmamız da benzer merakla bu spesifik taşıyıcıların enjekte edilen eksojen glutamati ekstraselüler ortamdan nöron ve astrositlere geri alım hızlarının ve kapasitelerinin ölçülüp değerlendirilmesi suretiyle minosiklin'in glutamat taşıyıcıları ile ilişkisini tespit etmek ve glutamatla yakından ilişkilendirilen AKY'ye bağlı gelişen HE tedavisindeki muhtemel potansiyelini test etmek maksadıyla gerçekleştirilmiştir.

L-glutamat'ın MSS'deki bozulmuş dinamikleri ile şizofreni, parkinson, inme, epilepsi gibi MSS hastalıkları arasında yakın ilişki bulunduğu uzun süreden beri bilinmektedir. Sinaptik aralığa salıverilen glutamat'ın ekstitotoksik etkilerinin oluşmasına mani olmak için glutamat, spesifik geri taşıyıcıları vasıtasıyla etki bölgesinden uzaklaştırılır. Saniyeler içerisinde gerçekleşen bu salıverilme ve geri taşınma olaylarında meydana gelen düzensizliklerin yukarıda ismi geçen hastalıklara zemin hazırladığı düşünülmektedir. Bu sebeple glutamatın (ve diğer bazı nörotransmitterlerin de) bazal

sinaptik konsantrasyonları ve nöronal uyarılma ile salıverilen kısımlarının drene edilme süreleri hep merak konusu olmuştur. Günümüze kadar bu parametrelerin tespiti için bazı yöntemler geliştirilmiş ve kullanılmıştır. Bunlar içerisinde en sık kullanılanı intrakraniyal mikrodializ yöntemlerdir. Bu yöntemlerle, beyin dokusundan alınan sıvı örnekleri modern HPLC veya spektrofotometri cihazları ile incelenmekte ve istenilen analitin alınan örnekler içerisindeki miktarları yüksek hassasiyetle ölçülebilmektedir. Ancak güncel veriler bu yöntemlerin güvenilirliklerinin tartışılmasına neden olmaktadır.¹⁰⁸ Örneğin sıçan striatumlarında yaş ile glutamat düzeyleri arasındaki ilişkiyi tespit etmek amacıyla gerçekleştirilen mikrodializ çalışmalar çelişkili sonuçlar doğurmuştur. Şöyle ki, bu yöntemi kullanan Freeman ve ark. yaşlı (24 aylık) kemirgenlerdeki bazal glutamat düzeylerinin genç (6 aylık) kemirgenlerdekine göre %94 oranında arttığını söylerken¹¹⁶ Saransaari ve ark. bu düzeylerin %60 oranında azaldığını iddia etmiştir.¹¹⁷ Yapılan diğer bazı çalışmalarla da bazal glutamat düzeylerinin yine yaşlanma ile azaldığı, arttığı ve hatta değişmediği dahi iddia edilmiştir.^{118, 119} Benzer şekilde serebral korteks ve striatuma glutamatın yaşa bağlı geri taşıma kapasitelerinin test edildiği mikrodializ çalışmalar da çelişkili sonuçlar vermiştir; çoğu deneyin sonucunda yaşlanma ile astrositlere glutamatı geri taşıyan sistemlerin yavaşladığı iddia edilse de^{117, 120-122} bu sistemlerin yaşlanmadan etkilenmediği^{123, 124} ve hatta yaşlanma ile hızlandığı kanaatini oluşturan deneyler gerçekleştirilmiştir.¹²⁵ Bütün bu sonuçlar mikrodializ yöntemlerin güvenilirlikleri ve yeterliliklerini tartışılır kılmaktadır. Bu yöntemler zamanla kapiller elektroforezin entegrasyonu ile dakika dakika ölçüm yapabilecek şekilde bir nebze olsun geliştirilmiş olsa da glutamatın hızlı kinetiklerini saniye saniye test edebilecek tutarlı bir sistemin yerini tutamamaktadır. Bu sebeplerle tez çalışmamızda yukarıda bahsettiğimiz handikaplardan arı, in-vivo voltametrik metotları kullanıldı. Glutamatın kullanılan özel mikroelettrotlar üzerinde oluşturduğu elektrokimyasal cevabı saniye saniye kaydedip

değerlendirebilen ve işlevsel bir arayüze sahip bu sistem ile güvenilir ve gelecek çalışmalar için yol gösterici sonuçlar elde edildi.

Glutamatın, kan beyin bariyerinin bu anyona geçirgen olmaması sebebiyle, MSS'de sentez ve depo edildiği bilinmektedir. Bu nörotransmitterin hassas ve kontrollü bir eksitasyon sağlayabilmesi için sentezlenen glutamatın önemli bölümü (veziküler glutamat) intraselüler ortamda muhafaza edilmekte ve ekstraselüler (nonveziküler glutamat) konsantrasyonları aktif bir geri taşıma mekanizması vasıtasıyla optimum düzeylerde kontrol altında tutulmaya çalışılmaktadır. Dolayısıyla beyin homojenatları üzerinde yapılan glutamat miktarı ölçüm çalışmaları sayesinde ancak intraselüler ortamda depo edilmekte olan toplam glutamat düzeyleri hakkında bilgiler elde edilebilmiş, ekstraselüler ortamdaki bazal konsantrasyonlar ve bazal konsantrasyonlarda meydana gelen değişiklikler değerlendirilememiştir. AKY'nin TAA ile veya hepatik devaskularizasyon ile indüklendiği ratların beyin dokuları üzerinde gerçekleştirilen çeşitli homojenat çalışmaları ile, sadece beyin dokusundaki toplam glutamat miktarının azaldığı gösterilebilmiştir.¹²⁶ Bu durum serebral konsantrasyonu artan amonyağın glutamat ile reaksiyona girip glutaminin sentezlendiği ve amonyağın detoksifiye edildiği mekanizmayla ilişkili olabilir. Ancak intraselüler (veziküler) glutamatın eksitotör sinyal iletimiyle doğrudan ilişkisinin bulunmaması bu bilgiyi eksitotoksik ensefalopati açısından kıymetsiz kılmaktadır. Bunun yanında doku kültürü sıvısından alınan in-vitro veya canlı deneklerden alınan in-vivo örneklerin yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile incelenmesi sayesinde ekstraselüler glutamat konsantrasyonları hakkında da bilgi elde edilebilmektedir. AKY ve hiperamonyemi modelleri üzerinde yapılan HPLC çalışmaları neticesinde beyindeki toplam miktarı azalan glutamatın ekstraselüler düzeylerinin bilinen optimum seviyelerin üzerine çıktığı gösterilmiştir.^{32, 126, 127} Bu durum hücre içinde oluşturduğu cevaplara membran yerleşimli reseptörlerinin aracılık ettiğini bildiğimiz

glutamatın toksik etkilerine yüksek konsantrasyonlarda bu reseptörleri aşırı uyarmasının sebep olabileceğini gösterir. Bu bilgiyi elde etmemize aracılık etmesine rağmen mikrodializ yöntemleri glutamat konsantrasyonunun ekstraselüler ortamdaki kontrolsüz artışının geri taşınma zaaflarından mı yoksa glutamatın ekstraselüler ortama aşırı salgılanmasından (veya enerji metabolizması bozukluğuna bağlı sızmasından) mı kaynaklandığı hususunda aydınlatıcı veriler üretememektedir. Yukarıda belirttiğimiz sebeple bir saniyeden daha kısa bir süre içerisinde (minimum 100 ms, mikrodializ yöntemleri için için bu süre 5-20 dakikadır) meydana gelen konsantrasyon değişikliklerini tespit edebilme kabiliyetine sahip ve mikroelettrotlar üzerine implante edilebilen mikropipetler vasıtasıyla deney bölgesine dışarıdan enjekte edilen glutamatın da dinamiklerinin ve dolayısıyla glutamat taşıyıcılarının aktiflik derecelerinin test edilebilmesine olanak tanıyan in-vivo voltametrik metot bu tez çalışmasının gerçekleştirilmesinde tercih edilmiştir. İn-vivo voltametri, 200 µm ve daha büyük çaptaki problemlerin kullanıldığı mikrodializ yöntemlerine kıyasla, 1-30 µm çapındaki problemlerle çalışmaya imkan sağladığı ve dolayısıyla daha az doku hasarına sebep olduğu için de mikrodializ yöntemlerine üstünlük arz eder.

Son yirmi beş yıl içerisinde AKY ve AKY sonucu gelişen hiperamonyemi ile glutamatın artan ekstraselüler konsantrasyonları arasındaki doğrudan ilişki kuran çok sayıda mikrodializ çalışması yapılmıştır.^{32-37, 128} Bunların arasında beyin dokusunda meydana gelen glutamatın ekstraselüler konsantrasyon artışına beyin dokusundaki yetersiz detoksifikasyon kapasitesi nedeniyle burada toksik düzeylere ulaşan amonyağın intraselüler pH'yı ve buna bağlı olarak hücre içi Ca^{2+} konsantrasyonunu artırması ile gelişen aşırı salgılanmasının neden olduğunu destekleyen çalışmalar bulunmaktadır.¹²⁹ Ancak bu çalışmalar geri taşıma sistemlerinin zaafiyete uğrayıp uğramadığı konusunda bizlere yeterince fikir vermemektedir. Bu sebeple tez çalışmamızda glutamatı astroglialara

geri taşıyan mekanizmaların AKY'ye bağlı hiperamonyemi tablosunda ne kadar efektif çalıştığı da test edilmiştir. Bunun için denek beyinlerinde bulunan ve HE ile ilişkili üç bölgeye (CA3, Gp, Cpu) mikropipet aracılığı ile enjekte ettiğimiz 200 nM konsantrasyonunda glutamatin ekstraselüler kompartmandan uzaklaştırılma süreleri gözlenmiş ve gözlem sonucunda intakt deneklerde yukarıda bahsedilen bölgelerdeki enjekte edilen eksojen glutamatin %80'inin ekstraselüler kompartmandan drene edilme süreleri (t80) sırasıyla 4.08 sn., 4.17 sn. ve 3.35 sn. olarak tespit edilmiştir. Daha önce yapılmış ve KCl ile beynin farklı bölgelerinde glutamat salgılanmasının indüklenip t80 sürelerinin test edildiği (3.5 - 9.0 sn.) in-vivo voltametrik bir çalışma ile elde ettiğimiz sonuçlar paralellik arz eder.¹³⁰ TAA ile AKY'yi indüklediğimiz ratlarda ise bu süreler aynı bölgeler (CA3, Gp, Cpu) için 54.29 sn., 24.35 sn. ve 48.07 sn. ile neredeyse on kat uzamış olarak ölçülmüştür. Bu durum hiperamonyemi ile glutamat taşıyıcısı sayılarında meydana gelen transkripsiyon^{80, 81} ve ekspresyon⁸² düzeyindeki ve glutamat taşıyıcısı aktivitelerindeki azalmayı⁷⁷⁻⁷⁹ ispat eden çalışmaları destekler. Glutamat taşıyıcılarının sayı ve aktivitelerini artırdığı bilinen^{104, 105} minosiklin ile tedavi edilmiş AKY'li deneklerde ise bu sürelerin, yine sırasıyla 3.55 sn., 4.78 sn. ve 3.00 sn. ile, intakt gruba oldukça yaklaşması taşıyıcı sayısındaki azalma ile geri taşınma yetersizliği arasındaki ilintiyi işaret etmektedir. Minosiklin'in nöropatik ratlarda bozulmuş glial glutamat geri alımını GLT-1 ekspresyonunu artırmak suretiyle düzelttiğini gösteren çalışmalar^{104, 105} minosiklin'in HE'li ratlarda meydana gelen glutamat geri alım zaafılarını yine GLT-1 ekspresyonunu ve/veya aktivitesini artırmak suretiyle düzenlediğini işaret eder. Hipoksiye maruz bırakılan yeni doğmuş ratlarda gelişen nöroinflamasyonun ve kognitif arazların EAAT2 ekspresyon düzeylerini artıran minosiklin ile düzeltilebileceğini gösteren pre-klinik çalışma da bu görüşü desteklemektedir.¹³¹ İleri aşamada yapılacak ve serebral

glutamat taşıyıcısı düzeylerinin tespit edileceği bir Western blot çalışması ile geri alımda gerçekleşen bu iyileşmenin taşıyıcı sentezindeki artışa bağlı olup olmadığı test edilebilir.

Daha önce yapılan HE çalışmalarının çoğunda duyuşsal veya motor davranış testleri hiç yapılmamış¹³²⁻¹³⁵ veya deneklerde HE'nin indüklendiğine kanaat getirilmesi için sadece onların bilinçsiz hale gelmeleri beklenmiştir.¹³⁶ Çalışmamızda modelin ne derecede oluşturulabildiğinin ve uygulanan tedavi rejiminin ne derecede etkin olduğunun tespit edilebilmesi ancak bu testlerin model oluşturulmadan önce, model oluşturulduktan sonra ve tedavi uygulandıktan sonra gerçekleştirilip elde edilen verilerin mukayesesi ile mümkün olduğundan, her ne kadar insanlar üzerinde HE'nin derecesini tespit etmek için uygulanan testler ile bire bir aynı olmasa da, denekler deney öncesinde ve tedavi sonrasında lokomotor davranış testlerine tabi tutulmuştur. HE'nin insanlarda şiddeti, önemsiz derecedeki farkındalık zaaflarından mental durumun test edilemez hale geldiği koma haline kadar geniş bir yelpazede sınıflandırılabilir. HE'nin deney hayvanlarında indüklenip indüklenmediğini ve/veya indüklenen HE'nin derinliğini tespit etmek maksadıyla şimdiye kadar birçok subjektif metod ve sınıflama yöntemi kullanılmıştır. Örneğin Michalak ve ark. yaptıkları çalışmada HE'li ratların sırtüstü yatar pozisyondan normal pozisyona geçmeyi başaramadıkları evreyi prekoma ve ratlardan ışık refleksini alamadıkları evreyi koma evresi olarak kabul etmişlerdir.³⁵ Ratlar üzerinde gerçekleştirilen bazı diğer çalışmalarda bu basit testin yanı sıra geri çekme refleksi, sesle irkilme refleksi, kafa sallama refleksi ve korneal reflekslerin değerlendirildiği bir takım davranış testleri de uygulanmış ve elde edilen veriler skorlanarak indüklenen HE; 1., 2., 3. ve 4. evre olarak sınıflandırılmıştır.¹³⁷ Bu tez çalışmasında, bahsettiğimiz subjektif testlere kıyasla daha çok sayıda veriyi elde etmek, değerlendirmek ve gözlemci hataları dolayısıyla ortaya çıkacak hatalı sonuçları bertaraf etmek maksadıyla deneklerin lokomotor aktiviteleri özel takip kafeslerinde infrared ışınlar yardımıyla, horizontal,

ambulator ve vertikal hareketler için harcadıkları zamanlar tespit edilmek suretiyle 30 dakika boyunca kayıt altına alınmıştır. Gün içerisinde deneklerin hareketliliklerindeki değişikliklerden dolayı oluşabilecek hatalı ölçümlerin önüne geçebilmek maksadıyla günün aynı saatlerinde gerçekleştirilen lokomotor aktivite testleri sonucunda HE'li deney grubunda stereotipik hareketler için harcanan sürenin ($70.71 \text{ sn.} \pm 6.79 \text{ sn.}$) intakt grupla ($122.65 \text{ sn.} \pm 15.46 \text{ sn.}$) mukayese edildiğinde yarı yarıya kısaldığı ve minosiklin tedavisi ile bu sürenin intakt grupla eşitlendiği ($112.57 \text{ sn.} \pm 39.74 \text{ sn.}$) gözlemlenmiştir. Benzer şekilde HE'li deney grubunun ambulator hareketler için harcadığı süreler ($87.64 \text{ sn.} \pm 49.74 \text{ sn.}$) intakt gruptakilere kıyasla ($144.95 \text{ sn.} \pm 4.81 \text{ sn.}$) yarı yarıya kısılırken minosiklin tedavisi ile intakt gruptakilerle ($144.63 \text{ sn.} \pm 27.03 \text{ sn.}$) eşit hale gelmiştir. Safra yolu bağlama (SYB), portokaval anastomoz (PKA) ve portokaval şant (PKŞ) ile indüklenen KC yetmezliği modelleri üzerinde yapılan diğer çalışmalarda da sham gruplarında lokomotor performansın düştüğü gözlenmiştir.¹³⁸⁻¹⁴⁰ PKŞ uygulanan KY'li ratlarla yapılan bir çalışma ile substantia nigra'da ekstraselüler GABA konsantrasyonları sabit kalırken glutamat konsantrasyonlarının arttığı ve substantia nigra'da artan glutamat konsantrasyonları ile lokomotor performans arasında negatif bir korelasyon bulunduğu da tespit edilmiştir.¹³⁹ Bu durum, KY'li ratlarda gelişen hipolokomosyon, gerçekleştirdiğimiz tez çalışmasında gözlemlediğimiz glutamat taşıyıcısı zaafı dolayısıyla glutamatın geri alımında yaşanan arazlar ile açıklanabilmektedir. Bir mGluR1 blokeri olan 7-hidroksi iminosiklopropan[b]kromen-1a-karboksilikasit etilester (CPCCOEt) ile muamele etmiş KY'li ratlarda hipolokomosyonun normalleştiğinin gösterilmesi bozulan lokomotor performansın bu reseptörlerin artan ekstraselüler glutamat konsantrasyonları sonucu gelişen aşırı aktivasyonlarına bağlı olduğunu göstermektedir. Ayrıca mGluR1 reseptörlerinin (s)-3,5-dihidroksifenilglisin (DHPG) ile aşırı aktivasyonunun hem kontrol grubunda ve hem de PKŞ grubunda lokomotor performansı düşürmesi bu hipotezi

desteklemektedir.¹³⁹ Tez çalışmamızda bozulan lokomotor aktivitenin minosiklin tedavisi sayesinde büyük ölçüde düzeltilebilmesi minosiklinin glutamat transporter zaaflarını azaltarak ve (ihtimaldir ki) mGluR1 reseptörlerini bloke ederek ve/veya mGluR1 sentezini baskılayarak etki gösterdiğine işaret eder.

Tez çalışmamızda kullanılan ve TAA ile HE'nin indüklendiği deneysel model, insanlarda gelişen AKY ile hepatoselüler nekroza, köprü nekrozuna ve lenfosit infiltrasyonuna yol açması yönüyle paralellik arz etmesi, bu modelde kan-beyin bariyerinin yapısal değişikliğe uğramaması ve bu sayede astrositlerin nöromodülatör fonksiyonlarında meydana gelen değişiklikler ile HE'nin progresyonu arasındaki ilişkinin tespitini mümkün kılması nedeniyle diğer modellere üstünlük arz eder.¹⁴¹ Bununla birlikte bu modelin AKY sonucu gelişen HE'nin davranışsal ve elektroensefalografik (EEG) değişikliklerini tam olarak taklit ediyor olması da bizi tez çalışmamızda TAA ile oluşturulan deneysel HE modelini tercih etmeye yönlendirmiştir.¹⁴² Bununla birlikte TAA'nın lokomotor aktivite ve EEG üzerindeki indirekt etkilerinin indüklediği hiperamonyemi ile yakından ilişkili olduğuna dair elimizde çok sayıda veri mevcut iken toksik metabolitleri ile indüklediği muhtemel direkt nörotoksik etkilerinin mekanizması hakkında pek az bilgiye sahibiz.¹⁴³ Dolayısıyla bu çalışmada TAA ve metabolitlerinin direkt nörotoksik etkileri göz ardı edilmiştir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Elde ettiğimiz veriler ekstraselüler ortamdan glialara gerçekleşen bozulmuş glutamat taşımını düzeltme potansiyeline sahip diğer tedavilerin de HE progresyonun yavaşlatılmasında ve HE semptomlarının iyileştirilmesinde faydalı olabileceğini göstermektedir. Bozulmuş glutamat transportu GLT-1 ekspresyonunu ve/veya GLT-1

aktivitesini artırmak suretiyle farklı ilaç veya ilaç kombinasyonları ile düzeltilebilir. Kan-beyin bariyerini aşabilme kabiliyetine sahip β -laktam antibiyotikler bu amaçla değerlendirilebilecek en önemli ilaç grubudur. Bu gruptan transkripsiyon düzeyinde GLT-1 ekspresyonunu indüklediği¹¹¹ ve buna bağlı olarak iskemik toleransı artırdığı,^{114, 144-146} eksitotoksik inflamatuvar hasarı azalttığı¹⁴⁷ ve 6-hidroksi dopaminin enjeksiyonu yapılmış ratlarda dopaminerjik nöronları ve motor aktiviteyi koruduğu bilinen¹⁴⁸ ve kan-beyin bariyerini aşabilen seftriakson HE'de terapötik etkinlik vadeden belki de en önemli ilaçtır. Bir β -laktamaz inhibitörü olan ve GLT-1 ekspresyonunu upregüle etmek suretiyle serebral iskemide piramidal nöronları koruduğu bilinen sulbaktam¹⁴⁹ da üzerinde ileri çalışmalar yapılması gereken ilaçlardandır. GLT-1 aktivitesini artırdığı bilinen ve klinik ve pre-klinik çalışmalarda nöroprotektif etkinliği gösterilmiş bir östrojen olan estradiol'ün¹⁵⁰ ve GLT-1 ekspresyonunu artırdığı gösterilmiş bir östrojen reseptör antagonisti olan tamoksifen¹⁵¹ HE tedavisinde umut vadetmektedir. Amitriptilin ise EAAT2 ekspresyonunu indüklediği ve nöropatik ağrıda mekanik allodiniyi baskılayabildiği tespit edilmiş,¹⁵² yine HE tedavisinde terapötik etkinlik gösterebilecek önemli bir trisiklik antidepressandır.

KAYNAKLAR

1. Hoofnagle JH, Carithers RL, Shapiro C, Ascher N. Fulminant Hepatic-Failure - Summary of a Workshop. *Hepatology*. 1995;21(1):240-52.
2. Fontana RJ. Acute Liver Failure. In: Feldman F, Friedman LS, Brandt LJ, editors. *Sleisenger and Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease: Pathophysiology/Diagnosis/Management*. Philadelphia: Elsevier Inc.; 2010.

3. Ostapowicz G, Lee YH. Acute hepatic failure: A Western perspective. *J Gastroen Hepatol*. 2000;15(5):480-8.
4. Blei AT, Larsen FS. Pathophysiology of cerebral edema in fulminant hepatic failure. *J Hepatol*. 1999;31(4):771-6.
5. Trey C, Davidson CS. The management of fulminant hepatic failure. *Progress in liver diseases*. 1970;3:282-98.
6. Ogrady JG, Schalm SW, Williams R. Acute Liver-Failure - Redefining the Syndromes. *Lancet*. 1993;342(8866):273-5.
7. Whitehouse T, Wendon J. Acute liver failure. *Best Pract Res Cl Ga*. 2013;27(5):757-69.
8. Bernuau J, Benhamou JP. Classifying Acute Liver-Failure. *Lancet*. 1993;342(8866):252-3.
9. Jayakumar AR, Rama Rao KV, Norenberg MD. Neuroinflammation in hepatic encephalopathy: mechanistic aspects. *Journal of clinical and experimental hepatology*. 2015;5(Suppl 1):S21-8.
10. Aggarwal S, Kramer D, Yonas H, Obrist W, Kang Y, Martin M, et al. Cerebral Hemodynamic and Metabolic Changes in Fulminant Hepatic-Failure - a Retrospective Study. *Hepatology*. 1994;19(1):80-7.
11. Cordoba J, Ventura-Cots M, Simon-Talero M, Amoros A, Pavesi M, Vilstrup H, et al. Characteristics, risk factors, and mortality of cirrhotic patients hospitalized for hepatic encephalopathy with and without acute-on-chronic liver failure (ACLF). *J Hepatol*. 2014;60(2):275-81.
12. Butterworth RF. Pathogenesis of hepatic encephalopathy and brain edema in acute liver failure. *Journal of clinical and experimental hepatology*. 2015;5(Suppl 1):S96-S103.

13. Chan H, Butterworth RF. Cell-selective effects of ammonia on glutamate transporter and receptor function in the mammalian brain. *Neurochemistry international*. 2003;43(4-5):525-32.
14. Monfort P, Munoz MD, ElAyadi A, Kosenko E, Felipe V. Effects of hyperammonemia and liver failure on glutamatergic neurotransmission. *Metabolic brain disease*. 2002;17(4):237-50.
15. Chan H, Butterworth RF. Evidence for an astrocytic glutamate transporter deficit in hepatic encephalopathy. *Neurochemical research*. 1999;24(11):1397-401.
16. Tapper EB, Jiang ZG, Patwardhan VR. Refining the Ammonia Hypothesis: A Physiology-Driven Approach to the Treatment of Hepatic Encephalopathy. *Mayo Clinic proceedings*. 2015;90(5):646-58.
17. Aldridge DR, Tranah EJ, Shawcross DL. Pathogenesis of hepatic encephalopathy: role of ammonia and systemic inflammation. *Journal of clinical and experimental hepatology*. 2015;5(Suppl 1):S7-S20.
18. Palomero-Gallagher N, Zilles K. Neurotransmitter receptor alterations in hepatic encephalopathy: a review. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2013;536(2):109-21.
19. Romero-Gomez M, Jover M, Galan JJ, Ruiz A. Gut ammonia production and its modulation. *Metabolic brain disease*. 2009;24(1):147-57.
20. Wright G, Noiret L, Olde Damink SW, Jalan R. Interorgan ammonia metabolism in liver failure: the basis of current and future therapies. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*. 2011;31(2):163-75.
21. Jalan R, Wright G, Davies NA, Hodges SJ. L-Ornithine phenylacetate (OP): a novel treatment for hyperammonemia and hepatic encephalopathy. *Medical hypotheses*. 2007;69(5):1064-9.

22. Chatauret N, Desjardins P, Zwingmann C, Rose C, Rao KVR, Butterworth RF. Direct molecular and spectroscopic evidence for increased ammonia removal capacity of skeletal muscle in acute liver failure. *J Hepatol.* 2006;44(6):1083-8.
23. Anwyl R. Metabotropic glutamate receptors: electrophysiological properties and role in plasticity. *Brain research Brain research reviews.* 1999;29(1):83-120.
24. Kullmann DM, Asztely F, Walker MC. The role of mammalian ionotropic receptors in synaptic plasticity: LTP, LTD and epilepsy. *Cell Mol Life Sci.* 2000;57(11):1551-61.
25. Malenka RC, Bear MF. LTP and LTD: An embarrassment of riches. *Neuron.* 2004;44(1):5-21.
26. Hertz L, Dringen R, Schousboe A, Robinson SR. Astrocytes: Glutamate producers for neurons. *J Neurosci Res.* 1999;57(4):417-28.
27. Danbolt NC. Glutamate uptake. *Progress in neurobiology.* 2001;65(1):1-105.
28. Sheldon AL, Robinson MB. The role of glutamate transporters in neurodegenerative diseases and potential opportunities for intervention. *Neurochemistry international.* 2007;51(6-7):333-55.
29. Kanner BI. Glutamate transporters from brain. A novel neurotransmitter transporter family. *FEBS letters.* 1993;325(1-2):95-9.
30. Khodorov B. Glutamate-induced deregulation of calcium homeostasis and mitochondrial dysfunction in mammalian central neurones. *Progress in biophysics and molecular biology.* 2004;86(2):279-351.
31. Tapia R, Medina-Ceja L, Pena F. On the relationship between extracellular glutamate, hyperexcitation and neurodegeneration, in vivo. *Neurochemistry international.* 1999;34(1):23-31.

32. McArdle P, Penning DH, Dexter F, Reynolds JD. Flumazenil does not affect the increase in rat hippocampal extracellular glutamate concentration produced during thioacetamide-induced hepatic encephalopathy. *Metabolic brain disease*. 1996;11(4):329-42.
33. Hilgier W, Zielinska M, Borkowska HD, Gadamski R, Walski M, Oja SS, et al. Changes in the extracellular profiles of neuroactive amino acids in the rat striatum at the asymptomatic stage of hepatic failure. *J Neurosci Res*. 1999;56(1):76-84.
34. Rose C, Michalak A, Pannunzio M, Chatauret N, Rambaldi A, Butterworth RF. Mild hypothermia delays the onset of coma and prevents brain edema and extracellular brain glutamate accumulation in rats with acute liver failure. *Hepatology*. 2000;31(4):872-7.
35. Michalak A, Rose C, Butterworth J, Butterworth RF. Neuroactive amino acids and glutamate (NMDA) receptors in frontal cortex of rats with experimental acute liver failure. *Hepatology*. 1996;24(4):908-13.
36. Bosman DK, Deutz NEP, Maas MAW, Vaneijk HMH, Smit JJH, Dehaan JG, et al. Amino-Acid Release from Cerebral-Cortex in Experimental Acute Liver-Failure, Studied by Invivo Cerebral-Cortex Microdialysis. *J Neurochem*. 1992;59(2):591-9.
37. Moroni F, Lombardi G, Moneti G, Cortesini C. The Release and Neosynthesis of Glutamic-Acid Are Increased in Experimental-Models of Hepatic-Encephalopathy. *J Neurochem*. 1983;40(3):850-4.
38. Ozawa S, Kamiya H, Tsuzuki K. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Progress in neurobiology*. 1998;54(5):581-618.
39. Dingledine R, Borges K, Bowie D, Traynelis SF. The glutamate receptor ion channels. *Pharmacological reviews*. 1999;51(1):7-61.

40. Kew JN, Kemp JA. Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology. *Psychopharmacology*. 2005;179(1):4-29.
41. Matthews JC, Anderson KJ. Recent advances in amino acid transporters and excitatory amino acid receptors. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*. 2002;5(1):77-84.
42. Michaelis EK. Molecular biology of glutamate receptors in the central nervous system and their role in excitotoxicity, oxidative stress and aging. *Progress in neurobiology*. 1998;54(4):369-415.
43. Yamakura T, Shimoji K. Subunit- and site-specific pharmacology of the NMDA receptor channel. *Progress in neurobiology*. 1999;59(3):279-98.
44. Ikeda K, Nagasawa M, Mori H, Araki K, Sakimura K, Watanabe M, et al. Cloning and Expression of the Epsilon-4 Subunit of the Nmda Receptor Channel. *FEBS letters*. 1992;313(1):34-8.
45. Vyklicky L, Benveniste M, Mayer ML. Modulation of N-Methyl-D-Aspartic Acid Receptor Desensitization by Glycine in Mouse Cultured Hippocampal-Neurons. *J Physiol-London*. 1990;428:313-31.
46. Ascher P, Nowak L. Early biophysics of the NMDA receptor channel. *J Physiol-London*. 2009;587(19):4563-4.
47. Chen L, Huang LYM. Protein-Kinase-C Reduces Mg²⁺ Block of Nmda-Receptor Channels as a Mechanism of Modulation. *Nature*. 1992;356(6369):521-3.
48. Paoletti P, Neyton J. NMDA receptor subunits: function and pharmacology. *Curr Opin Pharmacol*. 2007;7(1):39-47.
49. Hardingham GE. Coupling of the NMDA receptor to neuroprotective and neurodestructive events. *Biochem Soc T*. 2009;37:1147-60.

50. Felipo V, Monfort P, Fernandez-Marticorena I, Hernandez-Viadel ML, Montoliu C, Llansola M, et al. Activation of NMDA receptors in rat brain in vivo following acute ammonia intoxication. Characterization by in vivo brain microdialysis. *Eur J Neurosci*. 2000;12:40-.
51. Llansola M, Rodrigo R, Monfort P, Montoliu C, Kosenko E, Cauli O, et al. NMDA receptors in hyperammonemia and hepatic encephalopathy. *Metabolic brain disease*. 2007;22(3-4):321-35.
52. Marcaida G, Felipo V, Hermenegildo C, Minana MD, Grisolia S. Acute Ammonia Toxicity Is Mediated by the Nmda Type of Glutamate Receptors. *FEBS letters*. 1992;296(1):67-8.
53. Kosenko E, Kaminsky Y, Grau E, Minana MD, Marcaida G, Grisolia S, et al. Brain Atp Depletion Induced by Acute Ammonia Intoxication in Rats Is Mediated by Activation of the Nmda Receptor and Na⁺,K⁺-Atpase. *J Neurochem*. 1994;63(6):2172-8.
54. Kosenko E, Felipo V, Montoliu C, Grisolia S, Kaminsky Y. Effects of acute hyperammonemia in vivo on oxidative metabolism in nonsynaptic rat brain mitochondria. *Metabolic brain disease*. 1997;12(1):69-82.
55. Kosenko E, Kaminsky Y, Kaminsky A, Valencia M, Lee L, Hermenegildo C, et al. Superoxide production and antioxidant enzymes in ammonia intoxication in rats. *Free Radical Res*. 1997;27(6):637-44.
56. Kosenko E, Kaminski Y, Lopata O, Muravyov N, Felipo V. Blocking NMDA receptors prevents the oxidative stress induced by acute ammonia intoxication. *Free Radical Bio Med*. 1999;26(11-12):1369-74.
57. Minana MD, Montoliu C, Llansola M, Grisolia S, Felipo V. Nicotine prevents glutamate-induced proteolysis of the microtubule-associated protein MAP-2 and

- glutamate neurotoxicity in primary cultures of cerebellar neurons. *Neuropharmacology*. 1998;37(7):847-57.
58. Blomgren K, Mcrae A, Bona E, Saido TC, Karlsson JO, Hagberg H. Degradation of Fodrin and Map-2 after Neonatal Cerebral Hypoxic-Ischemia. *Brain Res*. 1995;684(2):136-42.
59. Paulsen RE, Fonnum F. Role of glial cells for the basal and Ca²⁺-dependent K⁺-evoked release of transmitter amino acids investigated by microdialysis. *J Neurochem*. 1989;52(6):1823-9.
60. Exposito I, Sanz B, Porras A, Mora F. Effects of Apomorphine and L-Methionine Sulfoximine on the Release of Excitatory Amino-Acid Neurotransmitters and Glutamine in the Striatum of the Conscious Rat. *Eur J Neurosci*. 1994;6(2):287-91.
61. Bleakman D, Lodge D. Neuropharmacology of AMPA and kainate receptors. *Neuropharmacology*. 1998;37(10-11):1187-204.
62. Riedel G, Micheau J, Lam AGM, Roloff EV, Martin SJ, Bridge H, et al. Reversible neural inactivation reveals hippocampal participation in several memory processes. *Nat Neurosci*. 1999;2(10):898-905.
63. BG K. Basic and Clinical Pharmacology. New York: *Lange Medical Books*; 2007.
64. Huettnner JE. Kainate receptors and synaptic transmission. *Progress in neurobiology*. 2003;70(5):387-407.
65. Crowder TL, Ariwodola OJ, Weiner JL. Kainate receptor activation potentiates GABAergic synaptic transmission in the nucleus accumbens core. *Brain Res*. 2006;1088:73-82.
66. Bleakman D, Alt A, Nisenbaum ES. Glutamate receptors and pain. *Semin Cell Dev Biol*. 2006;17(5):592-604.

67. Bordi F, Ugolini A. Group I metabotropic glutamate receptors: Implications for brain diseases. *Progress in neurobiology*. 1999;59(1):55-79.
68. Schkeryantz JM, Kingston AE, Johnson MP. Prospects for metabotropic glutamate 1 receptor antagonists in the treatment of neuropathic pain. *J Med Chem*. 2007;50(11):2563-8.
69. Albasanz JL, Ros M, Martin M. Characterization of metabotropic glutamate receptors in rat C6 glioma cells. *Eur J Pharmacol*. 1997;326(1):85-91.
70. Byrnes KR, Loane DJ, Faden AI. Metabotropic Glutamate Receptors as Targets for Multipotential Treatment of Neurological Disorders. *Neurotherapeutics*. 2009;6(1):94-107.
71. Balcar VJ. Molecular pharmacology of the Na⁺-dependent transport of acidic amino acids in the mammalian central nervous system. *Biol Pharm Bull*. 2002;25(3):291-301.
72. Benarroch EE. Neuron-astrocyte interactions: Partnership for normal function and disease in the central nervous system. *Mayo Clinic proceedings*. 2005;80(10):1326-38.
73. Tanaka K. Functions of glutamate transporters in the brain. *Neurosci Res*. 2000;37(1):15-9.
74. Anderson CM, Swanson RA. Astrocyte glutamate transport: Review of properties, regulation, and physiological functions. *Glia*. 2000;32(1):1-14.
75. Shigeri Y, Seal RP, Shimamoto K. Molecular pharmacology of glutamate transporters, EAATs and VGLUTs. *Brain Res Rev*. 2004;45(3):250-65.
76. Hertz L. *Glutamate, a neurotransmitter - And so much more - A synopsis of Wierzba III*. *Neurochemistry international*. 2006;48(6-7):416-25.

77. Schmidt W, Wolf G, Grungreiff K, Meier M, Reum T. Hepatic-Encephalopathy Influences High-Affinity Uptake of Transmitter Glutamate and Aspartate into the Hippocampal-Formation. *Metabolic brain disease*. 1990;5(1):19-31.
78. Butterworth RF. Glutamate transporters in hyperammonemia. *Neurochemistry international*. 2002;41(2-3):81-5.
79. Bender AS, Norenberg MD. Effects of ammonia on L-glutamate uptake in cultured astrocytes. *Neurochemical research*. 1996;21(5):567-73.
80. Knecht K, Michalak A, Rose C, Rothstein JD, Butterworth RF. Decreased glutamate transporter (GLT-1) expression in frontal cortex of rats with acute liver failure. *Neurosci Lett*. 1997;229(3):201-3.
81. Norenberg MD, Huo ZF, Neary JT, RoigCantesano A. The glial glutamate transporter in hyperammonemia and hepatic encephalopathy: Relation to energy metabolism and glutamatergic neurotransmission. *Glia*. 1997;21(1):124-33.
82. Chan H, Hazell AS, Desjardins P, Butterworth RF. Effects of ammonia on glutamate transporter (GLAST) protein and mRNA in cultured rat cortical astrocytes. *Neurochemistry international*. 2000;37(2-3):243-8.
83. Rose C. Effect of ammonia on astrocytic glutamate uptake/release mechanisms. *J Neurochem*. 2006;97:11-5.
84. Garrido-Mesa N, Zarzuelo A, Galvez J. Minocycline: far beyond an antibiotic. *Brit J Pharmacol*. 2013;169(2):337-52.
85. Wang X, Zhu S, Drozda M, Zhang W, Stavrovskaya IG, Cattaneo E, et al. Minocycline inhibits caspase-independent and -dependent mitochondrial cell death pathways in models of Huntington's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(18):10483-7.

86. Yong VW, Wells J, Giuliani F, Casha S, Power C, Metz LM. The promise of minocycline in neurology. *Lancet Neurol.* 2004;3(12):744-51.
87. Yrjanheikki J, Keinanen R, Pellikka M, Hokfelt T, Koistinaho J. Tetracyclines inhibit microglial activation and are neuroprotective in global brain ischemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1998;95(26):15769-74.
88. Stirling DP, Khodarahmi K, Liu J, McPhail LT, McBride CB, Steeves JD, et al. Minocycline treatment reduces delayed oligodendrocyte death, attenuates axonal dieback, and improves functional outcome after spinal cord injury. *J Neurosci.* 2004;24(9):2182-90.
89. Lee SM, Yune TY, Kim SJ, Park DW, Lee YK, Kim YC, et al. Minocycline reduces cell death and improves functional recovery after traumatic spinal cord injury in the rat. *J Neurotraum.* 2003;20(10):1017-27.
90. Thomas M, Ashizawa T, Jankovic J. Minocycline in Huntington's disease: A pilot study. *Movement Disord.* 2004;19(6):692-5.
91. Cha JH, Cudkowicz ME, Gevorkian S, Young A, de Bleeck EA, Kieburz K, et al. Minocycline safety and tolerability in Huntington disease. *Neurology.* 2004;63(3):547-9.
92. Metz LM, Zhang YY, Yeung M, Party DG, Bell RB, Stoian CA, et al. Minocycline reduces gadolinium-enhancing magnetic resonance imaging lesions in multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 2004;55(5):756-.
93. Morimoto N, Shimazawa M, Yamashima T, Nagai H, Hara H. Minocycline inhibits oxidative stress and decreases in vitro and in vivo ischemic neuronal damage. *Brain Res.* 2005;1044(1):8-15.

94. Kraus RL, Pasieczny R, Lariosa-Willingham K, Turner MS, Jiang A, Trauger JW. Antioxidant properties of minocycline: neuroprotection in an oxidative stress assay and direct radical-scavenging activity. *J Neurochem*. 2005;94(3):819-27.
95. Wiedholz LM, Owens WA, Horton RE, Feyder M, Karlsson RM, Hefner K, et al. Mice lacking the AMPA GluR1 receptor exhibit striatal hyperdopaminergia and 'schizophrenia-related' behaviors. *Mol Psychiatry*. 2008;13(6):631-40.
96. Woolley ML, Waters KA, Gartlon JE, Lacroix LP, Jennings C, Shaughnessy F, et al. Evaluation of the pro-cognitive effects of the AMPA receptor positive modulator, 5-(1-piperidinylcarbonyl)-2,1,3-benzoxadiazole (CX691), in the rat. *Psychopharmacology*. 2009;202(1-3):343-54.
97. Wang JQ, Arora A, Yang L, Parelkar NK, Zhang GC, Liu XY, et al. Phosphorylation of AMPA receptors. *Mol Neurobiol*. 2005;32(3):237-49.
98. Du YS, Ma ZZ, Lin SZ, Dodel RC, Gao F, Bales KR, et al. Minocycline prevents nigrostriatal dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;98(25):14669-74.
99. Wasserman JK, Schlichter LC. Neuron death and inflammation in a rat model of intracerebral hemorrhage: Effects of delayed minocycline treatment. *Brain Res*. 2007;1136(1):208-18.
100. Zhang L, Kitaichi K, Fujimoto Y, Nakayama H, Shimizu E, Iyo M, et al. Protective effects of minocycline on behavioral changes and neurotoxicity in mice after administration of methamphetamine. *Prog Neuro-Psychoph*. 2006;30(8):1381-93.
101. Zhang LL, Zhao JP. Profile of minocycline and its potential in the treatment of schizophrenia. *Neuropsych Dis Treat*. 2014;10:1103-11.

102. Piani D, Frei K, Do KQ, Cuenod M, Fontana A. Murine Brain Macrophages Induce Nmda Receptor Mediated Neurotoxicity Invitro by Secreting Glutamate. *Neurosci Lett*. 1991;133(2):159-62.
103. Noda M, Nakanishi H, Akaike N. Glutamate release from microglia via glutamate transporter is enhanced by amyloid-beta peptide. *Neuroscience*. 1999;92(4):1465-74.
104. Amin B, Hajhashemi V, Hosseinzadeh H, Abnous K. Antinociceptive Evaluation of Ceftriaxone and Minocycline Alone and in Combination in a Neuropathic Pain Model in Rat. *Neuroscience*. 2012;224:15-25.
105. Nie H, Zhang H, Weng HR. Minocycline Prevents Impaired Glial Glutamate Uptake in the Spinal Sensory Synapses of Neuropathic Rats. *Neuroscience*. 2010;170(3):901-12.
106. Maier K, Merkler D, Gerber J, Taheri N, Kuhnert AV, Williams SK, et al. Multiple neuroprotective mechanisms of minocycline in autoimmune CNS inflammation. *Neurobiol Dis*. 2007;25(3):514-25.
107. Bruck R, Oren R, Shirin H, Aeed H, Papa M, Matas Z, et al. Hypothyroidism minimizes liver damage and improves survival in rats with thioacetamide induced fulminant hepatic failure. *Hepatology*. 1998;27(4):1013-20.
108. Timmerman W, Westerink BH. Brain microdialysis of GABA and glutamate: what does it signify? *Synapse*. 1997;27(3):242-61.
109. Burmeister JJ, Gerhardt GA. Self referencing ceramic based multisite microelectrodes for the detection and elimination of interferences from the measurement of L-glutamate and other analytes. *Anal Chem*. 2001;73(5):1037-42.

110. Burmeister JJ, Pomerleau F, Palmer M, Day BK, Huettl P, Gerhardt GA. Improved ceramic-based multisite microelectrode for rapid measurements of L-glutamate in the CNS. *J Neurosci Meth.* 2002;119(2):163-71.
111. Rothstein JD, Patel S, Regan MR, Haenggeli C, Huang YH, Bergles DE, et al. beta-Lactam antibiotics offer neuroprotection by increasing glutamate transporter expression. *Nature.* 2005;433(7021):73-7.
112. Hu YY, Li WB, Lu LL, Cai JS, Xian XH, Zhang M, et al. An anti-nociceptive role for ceftriaxone in chronic neuropathic pain in rats. *Pain.* 2010;148(2):284-301.
113. Lee SG, Su ZZ, Emdad L, Gupta P, Sarkar D, Borjabad A, et al. Mechanism of ceftriaxone induction of excitatory amino acid transporter-2 expression and glutamate uptake in primary human astrocytes. *J Biol Chem.* 2008;283(19):13116-23.
114. Lipski J, Wan CK, Bai JZ, Pi R, Li D, Donnelly D. Neuroprotective potential of ceftriaxone in in vitro models of stroke. *Neuroscience.* 2007;146(2):617-29.
115. Rawls SM, Zielinski M, Patel H, Sacavage S, Baron DA, Patel D. Beta-lactam antibiotic reduces morphine analgesic tolerance in rats through GLT-1 transporter activation. *Drug Alcohol Depen.* 2010;107(2-3):261-3.
116. Freeman GB, Gibson GE. Selective Alteration of Mouse-Brain Neurotransmitter Release with Age. *Neurobiol Aging.* 1987;8(2):147-52.
117. Saransaari P, Oja SS. Age-related changes in the uptake and release of glutamate and aspartate in the mouse brain. *Mechanisms of ageing and development.* 1995;81(2-3):61-71.
118. Massieu L, Tapia R. Glutamate uptake impairment and neuronal damage in young and aged rats in vivo. *J Neurochem.* 1997;69(3):1151-60.

119. Corsi C, Pazzagli M, Bianchi L, Della Corte L, Pepeu G, Pedata F. In vivo amino acid release from the striatum of aging rats: adenosine modulation. *Neurobiol Aging*. 1997;18(2):243-50.
120. Wheeler DD, Ondo JG. Time course of the aging of the high affinity L-glutamate transporter in rat cortical synaptosomes. *Experimental gerontology*. 1986;21(3):159-68.
121. Najlerahim A, Francis PT, Bowen DM. Age-Related Alteration in Excitatory Amino-Acid Neurotransmission in Rat-Brain. *Neurobiol Aging*. 1990;11(2):155-8.
122. Vatassery GT, Lai JCK, Smith WE, Quach HT. Aging is associated with a decrease in synaptosomal glutamate uptake and an increase in the susceptibility of synaptosomal vitamin E to oxidative stress. *Neurochemical research*. 1998;23(2):121-5.
123. Dawson R, Wallace DR, Meldrum MJ. Endogenous Glutamate Release from Frontal-Cortex of Adult and Aged Rats. *Neurobiol Aging*. 1989;10(6):665-8.
124. Palmer AM, Robichaud PJ, Reiter CT. The release and uptake of excitatory amino acids in rat brain: effect of aging and oxidative stress. *Neurobiol Aging*. 1994;15(1):103-11.
125. Strong R, Samorajski T, Gottesfeld Z. High-affinity uptake of neurotransmitters in rat neostriatum: effects of aging. *J Neurochem*. 1984;43(6):1766-8.
126. Vaquero J, Butterworth RF. The brain glutamate system in liver failure. *J Neurochem*. 2006;98(3):661-9.
127. Suzuki K, Matsuo N, Moriguchi T, Takeyama N, Kitazawa Y, Tanaka T. Changes in Brain Ecf Amino-Acids in Rats with Experimentally Induced Hyperammonemia. *Metabolic brain disease*. 1992;7(2):63-75.
128. Deknegt RJ, Schalm SW, Vanderrijt CCD, Fekkes D, Dalm E, Hekkingweyma I. Extracellular Brain Glutamate during Acute Liver-Failure and during Acute

- Hyperammonemia Simulating Acute Liver-Failure - an Experimental-Study Based on in-Vivo Brain Dialysis. *J Hepatol.* 1994;20(1):19-26.
129. 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(22):20937-44.
130. Stan TL, Alvarsson A, Branzell N, Sousa VC, Svenningsson P. NMDA receptor antagonists ketamine and Ro25-6981 inhibit evoked release of glutamate in vivo in the subiculum. *Transl Psychiat.* 2014;4.
131. Li HC XJ, Huang YL, Li LJ, Jiang H, Huang LX, Yang T, Yang L, Li F. Reduction in hypoxia-derived neuroinflammation and dysfunctional glutamate transporters by minocycline may restore hypoxia-injured cognition of neonatal rat. *Sheng Li Xue Bao.* 2016;25(68(2)):148-56.
132. Geller D, Gammal SH, Mullen KD, Jones EA. An Improved Rat Model of Hepatic-Encephalopathy (He) Due to Fulminant Hepatic-Failure (Fhf) - the Importance of Supportive Therapy. *Gastroenterology.* 1987;92(5):1734-.
133. Snodgrass PJ. Urea Cycle Enzyme-Activities Are Normal and Inducible by a High-Protein Diet in Ccl4 Cirrhosis of Rats. *Hepatology.* 1989;9(3):373-9.
134. Osada J, Aylagas H, Miroobradors MJ, Arce C, Palaciosalaiz E, Cascales M. Effect of Acute Thioacetamide Administration on Rat-Brain Phospholipid-Metabolism. *Neurochemical research.* 1990;15(9):927-31.
135. Yamamoto HA, Sugihara N. Blood Ammonia Levels and Hepatic-Encephalopathy Induced by Ccl4 in Rats. *Toxicol Appl Pharm.* 1987;91(3):461-8.
136. Yamamoto HA. Brain Phenylalanine and Tyrosine Levels and Hepatic-Encephalopathy Induced by Ccl4 in Rats. *Toxicology.* 1990;61(3):241-7.

137. Norton NS, McConnell JR, RodriguezSierra JF. Behavioral and physiological sex differences observed in an animal model of fulminant hepatic encephalopathy in the rat. *Physiol Behav.* 1997;62(5):1113-24.
138. Ahboucha S, Jiang W, Chatauret N, Mamer O, Baker GB, Butterworth RF. Indomethacin improves locomotor deficit and reduces brain concentrations of neuroinhibitory steroids in rats following portacaval anastomosis. *Neurogastroent Motil.* 2008;20(8):949-57.
139. Cauli O, Llansola M, Erceg S, Felipe V. Hypolocomotion in rats with chronic liver failure is due to increased glutamate and activation of metabotropic glutamate receptors in substantia nigra. *J Hepatol.* 2006;45(5):654-61.
140. Jover R, Rodrigo R, Felipe V, Insausti R, Saez-Valero J, Garcia-Ayllon MS, et al. Brain edema and inflammatory activation in bile duct ligated rats with diet-induced hyperammonemia: A model of hepatic encephalopathy in cirrhosis. *Hepatology.* 2006;43(6):1257-66.
141. Butterworth RF, Norenberg MD, Felipe V, Ferenci P, Albrecht J, Blei AT, et al. Experimental models of hepatic encephalopathy: ISHEN guidelines. *Liver International.* 2009;29(6):783-8.
142. Mladenovic D, Hrcic D, Rasic-Markovic A, Stanojlovic O. Behavioral and Electroencephalographic Manifestations of Thioacetamide-Induced Encephalopathy: Possible Mechanisms of Neurotoxic Effects. *Arch Biol Sci.* 2012;64(3):829-41.
143. Wang T, Shankar K, Bucci TJ, Warbritton A, Mehendale HM. Diallyl sulfide inhibition of CYP2E1 does not rescue diabetic rats from thioacetamide-induced mortality. *Toxicol Appl Pharm.* 2001;173(1):27-37.

144. Chu K, Lee ST, Sinn DI, Ko SY, Kim EH, Kim JM, et al. Pharmacological induction of ischemic tolerance by glutamate transporter-1 (EAAT2) upregulation. *Stroke*. 2007;38(1):177-82.
145. Hota SK, Barhwal K, Ray K, Singh SB, Eavazhagan G. Ceftriaxone rescues hippocampal neurons from excitotoxicity and enhances memory retrieval in chronic hypobaric hypoxia. *Neurobiol Learn Mem*. 2008;89(4):522-32.
146. Verma R, Mishra V, Sasmal D, Raghubir R. Pharmacological evaluation of glutamate transporter 1 (GLT-1) mediated neuroprotection following cerebral ischemia/reperfusion injury. *Eur J Pharmacol*. 2010;638(1-3):65-71.
147. Melzer N, Meuth SG, Torres-Salazar D, Bittner S, Zozulya AL, Weidenfeller C, et al. A beta-Lactam Antibiotic Dampens Excitotoxic Inflammatory CNS Damage in a Mouse Model of Multiple Sclerosis. *Plos One*. 2008;3(9).
148. Leung TCH, Lui CNP, Chen LW, Yung WH, Chan YS, Yung KKL. Ceftriaxone Ameliorates Motor Deficits and Protects Dopaminergic Neurons in 6-Hydroxydopamine-Lesioned Rats. *Acs Chem Neurosci*. 2012;3(1):22-30.
149. Cui X, Li L, Hu YY, Ren S, Zhang M, Li WB. Sulbactam Plays Neuronal Protective Effect Against Brain Ischemia via Upregulating GLT1 in Rats. *Mol Neurobiol*. 2015;51(3):1322-33.
150. Karki P, Smith K, Johnson J, Lee E. Astrocyte-derived growth factors and estrogen neuroprotection: Role of transforming growth factor-alpha in estrogen-induced upregulation of glutamate transporters in astrocytes. *Mol Cell Endocrinol*. 2014;389(1-2):58-64.
151. Lee E, Sidoryk-Wegrzynowicz M, Farina M, Rocha JBT, Aschner M. Estrogen Attenuates Manganese-Induced Glutamate Transporter Impairment in Rat Primary Astrocytes. *Neurotox Res*. 2013;23(2):124-30.

152. Mao QX, Yang TD. Amitriptyline upregulates EAAT1 and EAAT2 in neuropathic pain rats. *Brain Res Bull.* 2010;81(4-5):424-7.



EKLER

EK-1. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler
Adı Soyadı: Fatih Saruhan Doğum tarihi: 23.05.1984 Doğum Yeri: Erzurum Medeni Hali: Bekar Uyruğu: T.C Adres: Bilali Habeş Mah. İ. Yusuf Alptekin Cad. No:14 Aziziye/ERZURUM Tel: +90 536 220 64 39 Faks: - E-mail: fsaruhan@atauni.edu.tr
Eğitim
Lise: Erzurum Anadolu Lisesi (2002) Lisans: Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi (2002-2006) Yüksek Lisans: Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü (2008-2010) Doktora: -
Yabancı Dil Bilgisi
İngilizce: 87.500 (ÜDS) Almanca: - Rusça: -
Üye Olunan Mesleki Kuruluşlar
Türk Farmakoloji Derneği, 2010 - ... Türk Eczacıları Birliği, 2011 - ...
İlgi Alanları ve Hobiler
Nörofarmakoloji, İn-vivo voltametri, Psikofarmakoloji

EK-2. ETİK KURUL ONAY FORMU



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı

Sayı : 36643897-35

Konu : Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Kararı.

04.06.2013
ERZURUM

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA

25240 – Kampus / ERZURUM

İlgi : 22.05.2013 tarih ve 42190979-01-02/2238 sayılı yazı.

İlgide kayıtlı yazıda belirtildiği üzere, Fakülteniz Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof.Dr.Ahmet HACİMÜFTÜOĞLU'nun yürütücülüğünde, Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi ile Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığının Farmakoloji Anabilim Dalı Voltametri Laboratuvarında yürütülecek olan "Ratlarda Deneysel Akut Karaciğer Yetersizliği Modelinde Serebral Glutamat Düzeylerinin İn-Vivo Voltametrik Metotla İncelenmesi ve Minosiklin'in Bu Düzeyler Üzerine Etkisi" başlıklı araştırma çalışması, Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulumuzun 31.05.2013 tarih ve 1 sayılı Oturumunda Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başvuru Formu ve ekli belgeleri, gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemler dikkate alınarak incelenmiş ve aşağıya çıkarılan 20 no'lu kararı ile sözkonusu araştırma çalışmasının yürütülmesinin etik kurallarına uygun olduğuna mevcudun oy birliğiyle karar verilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini arz ederim.

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ DEKANLIĞI
T.C. No : 19755
05.06.2013

Prof. Dr. Derviş ÖZDEMİR
Başkan Vekili
Dahil Tıp Fakültesi
Bölüm Başkanı

Prof. Dr. Özkan POLAT
Dekan

Toplantı Tarihi : 31.05.2013

Toplantı Sayısı : 1

KARAR NO : 20- Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof.Dr.Ahmet HACİMÜFTÜOĞLU'nun yürütücülüğünde, Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi ile Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığının Farmakoloji Anabilim Dalı Voltametri Laboratuvarında yürütülecek olan "Ratlarda Deneysel Akut Karaciğer Yetersizliği Modelinde Serebral Glutamat Düzeylerinin İn-Vivo Voltametrik Metotla İncelenmesi ve Minosiklin'in Bu Düzeyler Üzerine Etkisi" başlıklı araştırma çalışması ile ilgili Tıp Fakültesi Dekanlığının 22.05.2013 tarih ve 42190979-01-02/2238 sayılı yazısı ile ekleri görüşüldü.

Yapılan görüşmelerden sonra; adı geçen araştırma çalışmasının yürütülmesinin, etik kurallarına uygun olduğunun, mevcut oy birliği ile kabulüne; (Yönergenin 5/f maddesi gereğince, Prof.Dr. Ahmet HACİMÜFTÜOĞLU oylamaya katılmadı). karar verildi.

Adres : Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dekanlığı. 25240 – Yakutiye / ERZURUM
Telefon : 0-442-236 08 80 Fax : 0-442-236 08 81 e-mail: hadyek@atauni.edu.tr