

17243

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**HİPERAMONYEMİ OLUŞTURULAN
SIÇANLARDA BEYİN DOKUSUNDAKİ
AMMA AMİNOBUTİRİK ASİT (GABA) MİKTARI**

(DOKTORA TEZİ)

Giyasettin BAYDAŞ
Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi
Fizyoloji Anabilim Dalı Araştırma Görevlisi

ELAZIĞ - 1991

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
1 - GİRİŞ	1
1.1- Nörotransmitter Olarak Gamma Aminobutirik Asit ..	1
1.2- GABA'nın Epilepsi ile Olan İlişkisi	5
1.3- GABA'nın Hepatik Ensefalopatinin Patojenezindeki rolü	5
1.4- Amonyak Metabolizması	9
1.5- Amonyağın Hepatik Ensefalopati ile ilişkisi	10
1.6- GABA- NH ₃ İlişkisi.....	11
2- MATERYAL VE METOD	13
2.1- Materyal	13
2.2- GABA'nın Ekstraksiyonu	13
2.3- GABA'nın Spektrofluorometrik Ölçümü	15
2.4- Amonyak Tayini	15
3- BULGULAR	16
4- TARTIŞMA VE SONUÇ	18
5- KAYNAKLAR	26
6- ÖZET	32
7- İNGİLİZCE ÖZET	33
8- TEŞEKKÜR	34
9- ÖZ GEÇMİŞ	35

1- GİRİŞ

1.1- NÖROTRANSMİTTER OLARAK GAMMA AMİNOBUTİRİK ASİT (GABA)

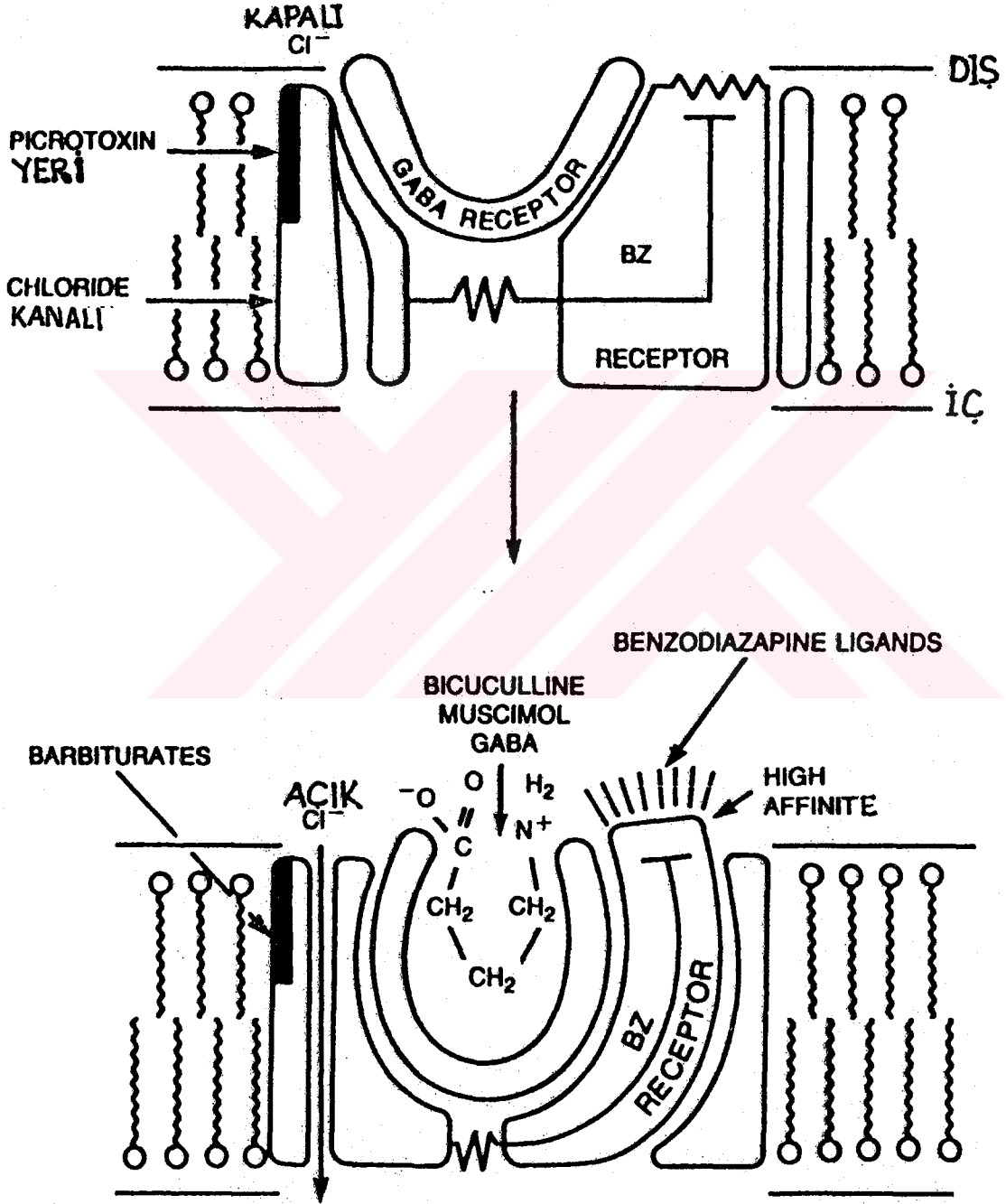
Uyarımların nörondan nörona yada nörondan kas lifine iletilmesine aracılık eden maddeler nörotransmitter veya nöromediyatörler olarak adlandırılırlar. Nörotransmitter maddeler fonksiyonel olarak iki ana başlık altında toplanırlar: İmpuls iletimini sağlayan maddelere eksitator nörotransmitterler (asetil kolin, glutamik asit v.d.) , impulsun iletimini durduran yada inhibe edenlere ise inhibitör nörotransmitterler denir. Santral sinir sisteminde (SSS) inhibitör olarak rol alan en önemli nörotransmitter maddeler GABA ve glisindir.

GABA dört karbonlu bir amino asittir. Etkisini çoğunlukla korteks serebri, bazal gangliyonlar, serabellar purkinje hücrelerinde ve talamusta gösterir. Buna karşılık glisinin etki alanı çok daha dar olmakla birlikte spinal motonöronlarda yoğunlaşmaktadır (1-3).

SSS'de yüksek konsantrasyonda bulunan GABA tüm nöronların %25-40'ında bulunur. GABA inhibitör nöronlarda sentezlenir ve akson uçlarında yoğunlaşır, impulsun nöronu uyarmasıyla da sinaptik aralığa boşalır. Sinir hücresinden salınan GABA postsinaptik membranda bulunan kendisine özgü reseptörüyle ($GABA_A$) birleşerek etkisini gösterir (1,2).

GABA'nın sinaptik olarak yerleşmiş bulunan en az iki bağlanma yeri vardır. Bunlar $GABA_A$ ve $GABA_B$ reseptörleridirler. $GABA_A$ ve $GABA_B$ reseptörleri ilaçlara karşı özellikleri, yerleştikleri yerler ve fonksiyonları bakımından farklılıklar gösterirler. $GABA_B$ reseptörü potasyum (K^+) ve kalsiyum (Ca^{++}) kanallarına etkilidir. $GABA_A$ reseptörü eslında bir reseptör komplekstir ve farmakolojik ve biyokimyasal olarak

aslında bir reseptör komplekstir ve farmakolojik ve biyokimyasal olarak üç ana bölgeden oluşmuştur: a) GABA reseptörü, b) benzodiazepin reseptörü ve c) barbiturat reseptörünü de içeren Klor (Cl^-) kanalı (ionoforu) (4).



Şekil 1: Postsinaptik nöron membranındaki GABA/benzodiazepin reseptörü/klor iyonoforu kompleksinin diğramatik görünümü (Jones'ten 6)

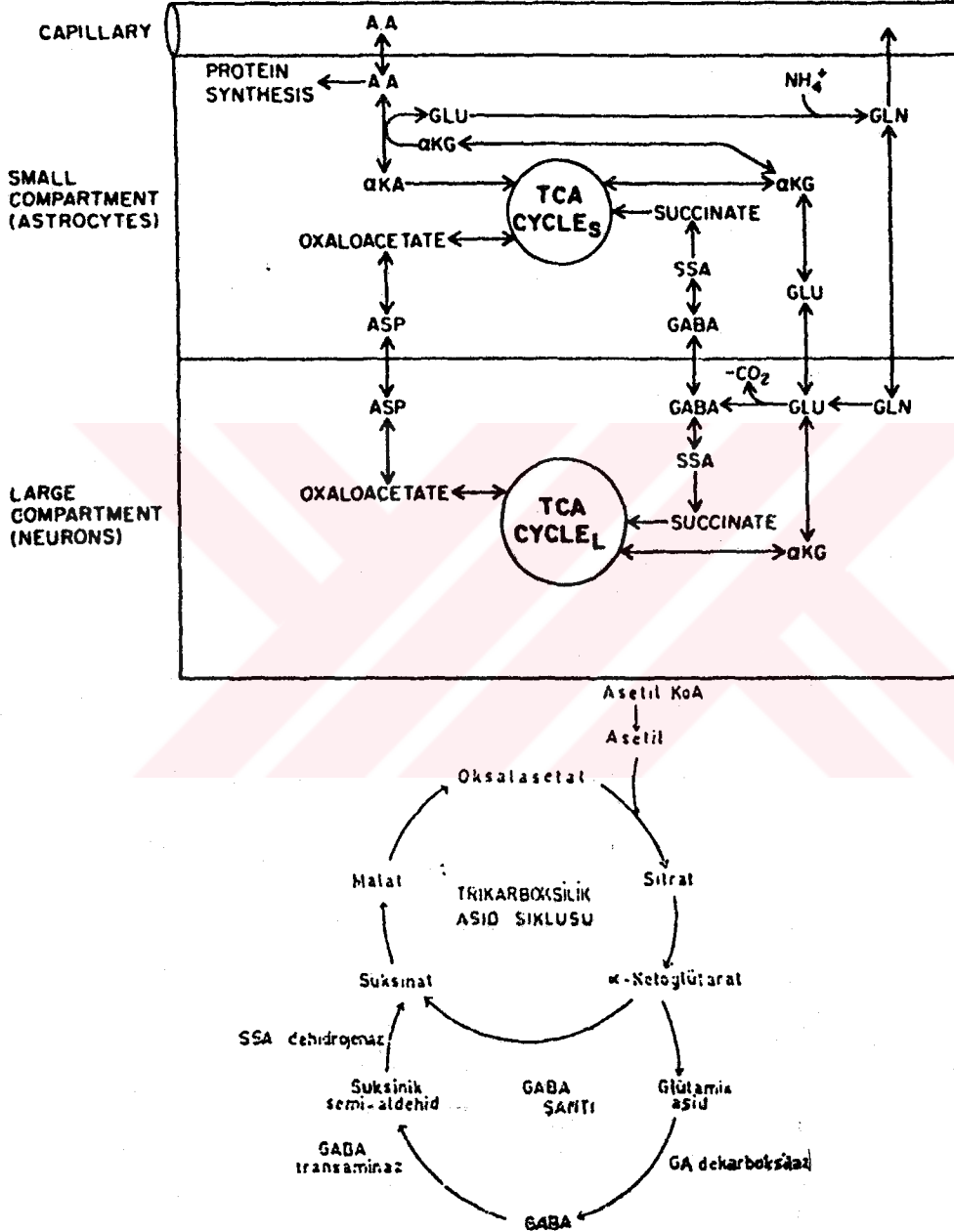
GABA_A reseptörü Cl⁻ kanallarının açılıp kapanmasını düzenler. Bu reseptörün aktivasyonu ile nöronal membranın Cl⁻ iyonlarına karşı olan permeabilitesi artar, bu artış Cl⁻ iyonoforlarının açılmasıyla olur (Şek: 1) Cl⁻ iyonlarının nörona girmesiyle membran istirahat potansiyeli daha da negatifleşir, yani hiperpolarizasyon olur. Böylece oluşan hiperpolarizasyon sınır hücrenin uyarılma eşiğini artırarak impulsun iletilmesini bloke eder, yani uyarım inhibisyona uğrar. Bu GABAergik inhibitör nörotransmisyonun esas mekanizmasıdır (5-7).

GABA_B reseptörü aracılığıyla oluşan etki, K⁺ iyonlarının hücreden çıkışının artırılması ve Ca⁺⁺ iyonlarının girişinin azaltılması şeklinde gerçekleşir (6). Bu etki muhtemelen presinaptik inhibisyon şeklinde olmaktadır. Kalsiyum iyonlarının hücre içine girememesi nörotransmitter salınımını engeller, potasyum iyonlarının hücre dışına çıkması hiperpolarizasyon yapar.

GABA SSS'nde L-glutamik asitin dekarboksilasyonu sonucu sentezlenir (1-3). Bu reaksiyonda rol alan enzim glutamik asit dekarboksilaz (GAD) dır. L-glutamik asit ise diğer bazı amino asitlerden (alfa ketoglutarik asit, glutamin ve aspartat) geriye dönüşümlü olarak meydana gelir. GABA sentezini sağlayan GAD enziminin aktivitesinde pirodoksalfosfat (B₆ vitamini) etkilidir.

Nöronal inhibisyon için sinaptik aralığa salınan GABA tekrar geri alınarak (reuptake) hücresel inaktivasyona uğrar. GABA'nın geri alımı ortamdaki sodyum (Na⁺) iyonlarına bağımlıdır (8) ve bir taşıyıcıya bağlanarak aktif bir şekilde hücre içine alınır. Böylece inhibitör olan transmitter etkisi sona erer. Hücre içine alındıktan sonra GABA transaminaz (GABA-T) etkisiyle süksinik semialdehid dönüşür. Bu oluşan madde ise süksinik semialdehid dehidrojenazla süksinata dönüşür.

Süksinat trikarboksilik asit (TCA) siklusuna girer. Bütün bu basamaklar TCA siklusunun bir yan halkesidir, buna GABA shunt'ı denir. TCA'nın ancak % 8'i bu yolu izler (Şekil: 2)



Şekil 2: Astrosit ve nöronlarda GABA metabolizmasının diagramatik olarak gösterilmesi.

1.2- GABA'nın Epilepsi ile Olan İlişkisi

Epilepside nörobiyoloji çok karmaşık olmakla birlikte beyin amino asitlerinin rölü çok önemli görülmektedir. Epileptik nöbetlerin oluşmasında glutamat ve aspartat gibi bazı amino asitlerin agonist etki göstermelerine karşı GABA antagonist bir etki gösterir (9). Çünkü GABA merkezi sinir sisteminde bilinen en güçlü inhibitör ve antikonvulsan maddedir. Beyinde substansia nigra ve pars retikülata da epilepsi nöbetlerinin ilerlemesini engelleyen başlıca inhibitör nörotransmitter GABA dır (9). Epileptik nöbetlerde kendiliğinden oluşan sinirsel deşarjlar efektör organlarda konvulsiyonlar meydana getirir. GABA inhibitör etkisi ile bu sinirsel deşarjların oluşmasını inhibe ederek konvulsiyonların meydana gelmesini engeller. Epileptik hastalarda GABA'nın hem serebrospinal sıvıda hem de beyin dokusunda azaldığı gözlenmiştir (9,10). Bazı antiepileptik ilaçlar beyin GABA miktarını artırarak antikonvulsiv etki gösterirler.

Görüldüğü gibi GABA'nın azalmasında konvulsiyonlar oluştuğu gibi ilerde bahsedileceği üzere artmasında da komaya kadar gidilebilecek ensefalopatiler meydana gelir. Bu nedenle özellikle serebral GABA metabolizmasının dengede olması son derece önemlidir.

1.3- GABA'nın Hepatik Ensefalopatinin Patojenezindeki Rolü

Hepatik ensefalopati ileri derecede karaciğer yetmezliği olan hastalarda bulunan ve anormal mental durumlarla karakterize olan klinik bir sendromdur. Bu sendromda SSS'de karakteristik fakat spesifik olmayan histolojik lezyonlar bulunur Klinik görünümler açık bir mental değişimden koma durumuna kadar değişir (6,7,12,13).

Hepatik yetmezlikte ensefalopatinin gelişmesi karaciğer tarafından metabolize edilemeyen ve ekstraselüler sıvıda biriken toksik maddelerin

etkisinden ileri gelir (6, 7, 12 , 14 , 15). Karaciğer yetmezliğinde ensefalopatinin patojenezinde rol oynayan nörotoksik maddeler çeşitli olmakla birlikte, esas etkili maddenin amonyak olduğunu bildirenlerin (12, 13, 14,16,17,18) yanında son zamanlarda dikkatleri GABA üzerinde yoğunlaştıranlar da artmıştır (6,7,15,19,20,21). Esas etken ne olursa olsun, hepatik ensefalopatide üç esas patojenetik mekanizma bildirilmiştir.(14):

- a-) Beyin enerji metabolizmasının bozulması,
- b-) Toksik maddelerin nöronal membran üzerindeki direkt etkisi ve
- c-) Nörotransmitter dengenin bozulması.

Karaciğer yetmezliğinde, serebral amino asit metabolizmasında aşırı bir değişme görülmez. Buna karşın plazma amino asit konsantrasyonunda iki nedenden dolayı farklılıklar görülür : Biri; hepatoselüler dejenerasyondan dolayı üre siklusunun bozulmasıdır, bu durumda kan amonyak konsantrasyonu artar ve glukagon salınımını uyularak glikoneojenezi hızlandırır, sonuçta plazma ve beyin amino asit miktarlarında değişmeler görülür. İkincisi ise hepatik yetmezlikte gastrointestinal sistemde bakteriler tarafından üretilen ya da besinlerle alınan bazı toksik maddelerin ve çeşitli amino asitlerin karaciğer tarafından detoksifiye edilememesidir. Bu maddeler sistemik dolaşıma ve oradan da muhtemelen beyine geçebilirler (16).

Beyin dışında GABA'nın en büyük kaynağı barsak bakterileridir . Vena porta kanındaki GABA konsantrasyonu arterlerdekinin yaklaşık iki katıdır (21). Sindirim bakterilerinin ürettiği GABA portal sistemik dolaşımla karaciğere gelir ve burada metabolize edilir. Hepatosellüler dejenerasyonda GABA karaciğer tarafından temizlenemediği için plazma GABA konsantrasyonu artar (6,7).

Normal durumlarda kan beyin baryerinin GABA'ya olan geçirgenliği minimum düzeydedir. Fakat hepatik yetmezlikte sistemik dolaşıma geçen

toksik maddeler kan beyin baryerinin permeabilitesini artırarak GABA ve diğer maddelere karşı daha geçirgen hale getirirler (12,20,22,23). Kan beyin baryerinin bu şekilde geçirgen olması muhtemelen kılcak damarları çevreleyen astrositlerin dejenerasyonundan (22) ve kılcak damar endotelyumundeki porların sayısının artmasından yada sıkı bağlantı yerlerinin bozulmasından ileri gelir (6,7). (Şekil 3)

GABA'nın hepatik ensefalopatinin patojenezinde en büyük rolü oynadığını ileri süren araştırmacılar (6,7,15,19-21) bu hipotezlerini kısaca şöyle özetlemektedirler:

1- Karaciğer yetmezliğinde barsak bakterilerinin ürettiği GABA, permeabl olmuş kan beyin bariyerini geçerek postsinaptik membranda bulunan kendi reseptörlerine bağlanır ve muhtemelen beynin GABAergik nöronal inhibisyona karşı hassasiyetini artırır.

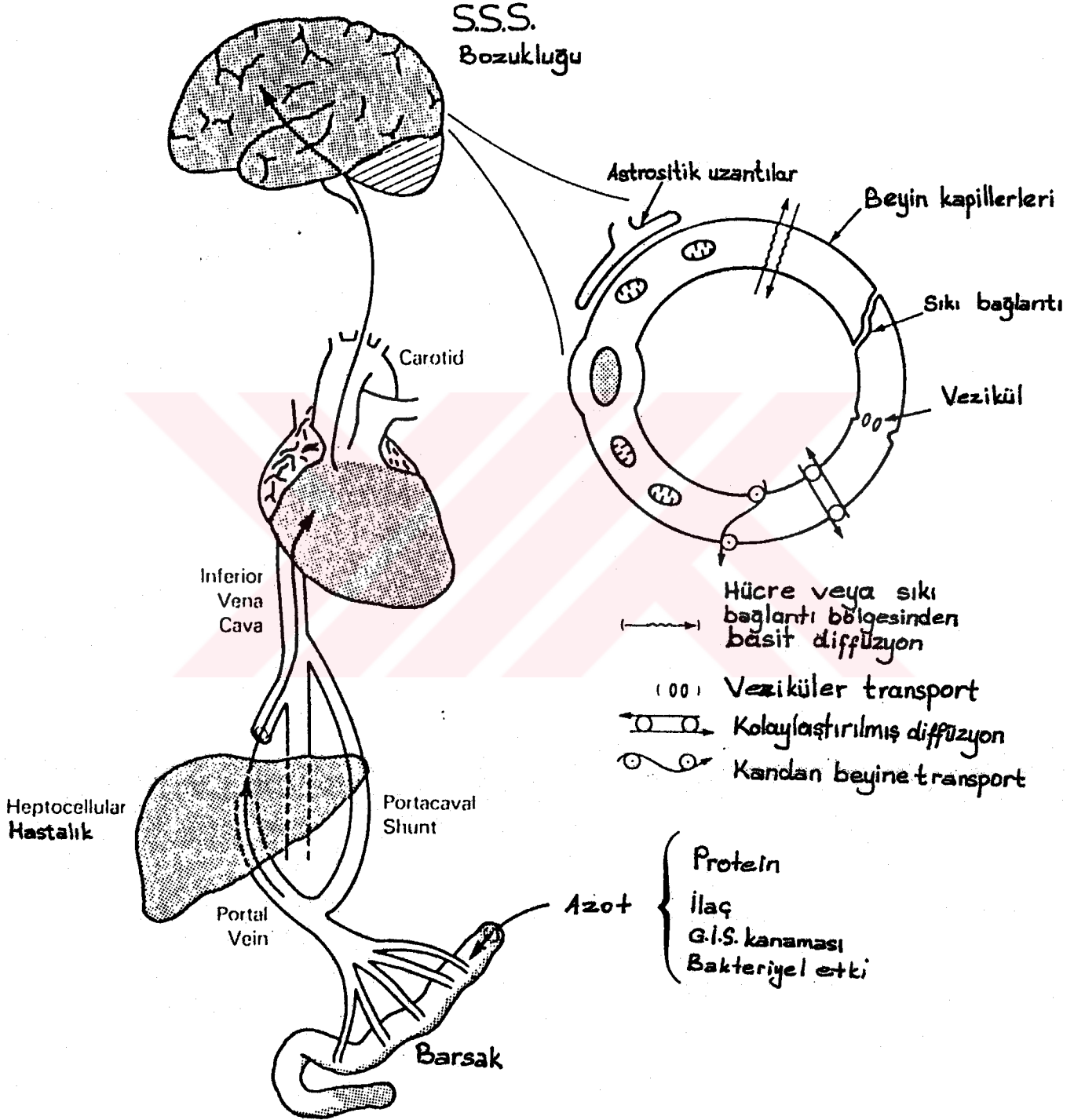
2- Barsaklarda oluşan GABA hepatik ensefalopatinin sinirsel inhibisyonunu sağlar.

3- Hepatik ensefalopatide, postsinaptik nöronal membranda GABA bağlayan yerlerin sayısında artışlar görülür.

Gerçekten deneysel olarak oluşturulan hepatik ensefalopatide veya ensefalopatiyle beraber seyreden sirozlu hastalarda plazma GABA miktarının artmış olduğu bir çok çalışmada kanıtlanmıştır (19,24-27). Ayrıca hepatik ensefalopatide beynin GABA'ya karşı affinitesi de artar (20,21).

Yapılan bir çalışmada (26) hepatik ensefalopatinin geliştiği sirozlu hastaların plazma GABA miktarı, ensefalopatik olmayanlarından çok daha yüksek bulunmuştur. Bu çalışmada elde edilen bulgularla, GABA'nın hepatik ensefalopatinin patojenezinde rol oynadığı sonucuna varılmıştır. Ayrıca GABA reseptörlerinin arttığı ve GABA'ya karşı afinitelerinin artmasıyla nöral inhibisyonu potansiyelize ettikleri de bildirilmektedir (28). Bu bilgilere göre GABA merkezi sinir sisteminin en önemli inhibitör

nörotransmitter maddesi olup, plazma yada beyinde artış göstermesi sonucu nöronal aktiviteyi kuvvetle inhibe ettiği hatta güçlü bir sedatif etki oluşturabileceği anlaşılmaktadır.

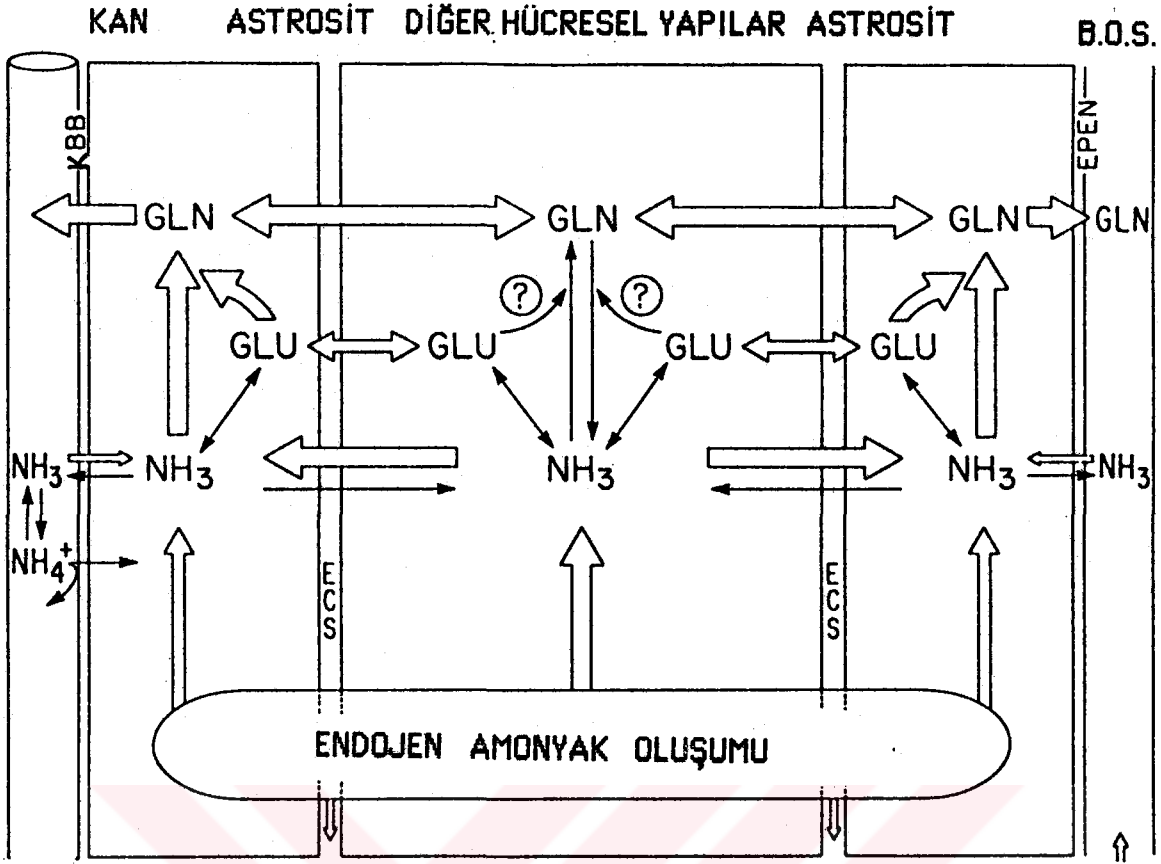


Şekil 3 : Karaciğer yetmezliğinde dolaşıma geçen toksik maddelerin K.B.B'ini ve SSS'ni bozarak hepatik ensefalopatinin gelişmesine neden olduklarının şematik görünümü. (Basile'den 7)

1.4- Amonyak Metabolizması

Gastrointestinal kanal bakterileri özellikle kolon bakterileri protein ve intestinal lümene diffüze olan üre gibi azotlu maddelerden sağlamak üzere en büyük amonyak kaynağını oluştururlar. Bununla beraber bakterilerden tamamen arındırılmış deney hayvanlarındaki çalışmalar (29,30) bakteriyel olmayan amonya k üretiminin de (intestinal lümen hücrelerindeki proteolitik enzimlerce üretilen NH_3) önemli oranda olduğunu göstermiştir. Diğer amonyak kaynakları ise sindirim kanalında proteinlerin sindirimi ve dolaşımdaki glutamindir. Ayrıca karaciğer, kas, beyin böbrekler ve eritrositler de amonyak üretim mekanizmasına sahiptirler.

Amonyak, üre ve glutamine dönüşerek detoksifiye olur. Üre oluşumu başlıca karaciğerde olur, fakat glutamin oluşumu özellikle beyin ve böbrekler başta olmak üzere bir çok organda meydana gelir. Amonyak serbestçe hücrelere girer. Arteriyel kan amonyağının % 47'si çoğunlukla diffüzyon şeklinde olmak üzere beyine geçer (31). Beyin dokusu bir çok maddelere karşı olduğu gibi amonyağın artan konsantrasyonuna karşı da oldukça duyarlıdır. Bu nedenle beyinde amonyağa karşı oluşmuş bir tampon sistemi vardır. Beyin amonyağı etkili bir şekilde astrositlerde glutamat -glutamin siklusu tarafından regüle edilir (32). Şekil 2 ' de görüldüğü gibi NH_3 glutamat ile birleşerek glutamine dönüşür. Bu reaksiyon glutamin sentetaz tarafından katalize edilir. Glutamin daha sonra kan-beyin bariyeri boyunca dışarı atılmak suretiyle beyinden temizlenebilir.



Şekil 4: Amonyakın beyindeki metabolik yolları

1.5- Amonyakın Hepatik Ensefalopati ile İlişkisi

Klasik anlamda hepatik ensefalopatinin nörotoksik maddelerin merkezi sinir sistemi üzerindeki zararlı etkilerinden ileri geldiği bilinmektedir. Ancak bugüne kadar herhangi bir toksik maddenin hepatik ensefalopatinin patojenezinde yalnız başına rol oynadığını söyleyebilmek mümkün olmamıştır. Ancak bazı araştırmacılar (12,13,14, 16-18) NH_3 'ün beyin üzerindeki toksik etkisinden dolayı ensefalopatiye neden olabileceğini ileri sürmektedirler. Karaciğer dejenerasyonunda amonyak yeterince üreye dönüştürülemediğinden, kan NH_3 konsantrasyonu artar. Amonyak kan beyin baryerini kolayca geçerek beyin NH_3 miktarını artırır. Bu astrositlerde metabolize edilerek glutamine çevrilir, ancak amonyak konsantrasyonunun aşırı yükselmesi glutamin tampon sistemini yetersiz bırakır. Hepatik ensefalopatide amonyakın metabolitleri olan ürünler koma derecesiyle orantılı bulunmuşlardır (33,34).

Beyinde, normal nöronal aktivite için gerekli olan transmembran iyon gradiyentinin sürdürülmesine yardımcı olan bol miktarda enzim sistemi vardır. Bu enzim sistemini etkileyen herhangi bir etken membran repolarizasyonunu değiştirerek kan beyin baryerinin fonksiyonel bütünlüğünü bozacağı gibi komaya da neden olur (14). Amonyakın K^+ iyonlarıyla kompetitisyona girerek nöronal Na^+ , K^+ -ATPaz aktivitesini inhibe ettiği gösterilmiştir (35). Yüksek konsantrasyondaki amonyum iyonları kısmen intrasellüler Na^+ yerine geçerek dışa doğru klor pompasını bloke eder. Halbuki bu pompa, repolarizasyon için gerekli olan transmembran klorid gradiyentinin sağlanmasında son derecede önemlidir (14).

Beyin dokusunda aşırı amonyak konsantrasyonu eksitabl membranlarda inhibitör posteksitatuar potansiyeli muhtemelen azaltarak konvulsiyonlara neden olur (17). Tavşanlarda NH_4Cl infüzyonunun yapılmasından sonra (13) akut karaciğer yetmezliğinde görülen elektrofizyolojik bozukluklar gözlenmiştir. Aynı çalışmada hepatic ensefalopatinin gelişmesinde amonyakın direkt yada indirekt nörotoksin olarak başlıca öneme sahip olduğu sonucuna varılmıştır.

1.6- GABA- NH_3 ilişkisi

Beyinde amonyak metabolizması şekil 3'te görüldüğü gibi çok karmaşıktır. Amonyak bir taraftan alfa ketoglutarik asitle birleşerek glutamat oluştururken diğer taraftan glutamatla birleşerek glutamin meydana getirir(12). Karaciğer yetmezliğinde aminoasit dengesi ile ilgili yapılan lümn çalışmalarda (12,16,36,37) glutaminin artmış olduğu gözlenmiş ve ensefalopatinin derinliği ile yakın ilişkide olduğu dikkati çekmiştir.

GABA'nın metabolizması şekil 2a ve b'de kısaca GABA shunt'ı olarak özetlenmiştir. şekilde görüldüğü gibi GABA glutamik asitin dekarboksilasyonu ile oluşmakta ve bu reaksiyonu GAD enzimi katalize etmektedir. Yani amonyak ve alfa ketoglutarik asitin birleşmesiyle oluşan glutamik asit GABA'nın başlıca kaynağıdır. Hiperamonyemide yukarıda bahsedilen kimyasal basamakların daha da hızlanması beklenir. Bu çalışmada beyin amonyak konsantrasyonunun artması sonucu önemli bir inhibitör nörotransmitter olan GABA metabolizmasının ne oranda etkilendiğini araştırdık. Ayrıca epileptik hastalarda protein diyetine önem verildiği bilinmektedir. Bu yolla amino asit ve amonyak konsantrasyonu indirekt olarak arttırılmış olur. Mekanizması kesin olarak bilinmemekle birlikte protein diyetinin epileptik hastalarda nöbetlerin oluşmasını azaltabileceği sanılmaktadır. Biz, protein yıkımı sonucu oluşan amonyakın GABA metabolizmasını hızlandırabileceğini ve bu yolla epileptik nöbetlerin seyrekleşebileceği düşüncesinden yola çıkarak deneysel olarak oluşturulan hiperamonyemide GABA miktarını belirlemeye çalıştık.

2- MATERYAL VE METOD

2.1- **Materyal** : çalışmada 10 tanesi kontrol 30 tanesi de deney hayvanı olmak üzere 40 (200-300 gr) adet sıçan kullanıldı. Kontrol grubuna izotonik sodyum klorür infüzyonu yapılırken deney grubuna ise hiperamonyemi oluşturmak için Prior and Visek (38) tarafından bildirilen yöntemine göre deri altı üreaz injeksiyonu yapıldı. Buna göre kristalin üreaz (Sigma Chemical Co.) normal serum fizyolojik içerisinde 10 mM potasyum fosfat bulunan çözeltide çözündürüldü (PH 7.4). Her hayvana öldürülmeden üç saat önce bu üreaz solusyonundan deri altı enjekte edildi. Enjeksiyon oranı her hayvana 114 I.U. üreaz/kg vücut ağırlığı olmak üzere ayarlandı.

Hayvanlar öldürülmeden 2.5 dak. önce spesifik GAD inhibitörü olan 3-mercaptopropionic asit i.p. olarak enjekte edildi (39,40). Ratler dekapitasyonla öldürüldü ve beyin dokuları çıkarılarak derin dondurucuda donduruldu (-20° C).

Deneyde kullanılan diğer malzemeler: GABA standardı, beta merkaptöetanol, ortofitalaldehit, 3-mercaptopropionic asit, Dowex 50W X-4 200-400 mesh, ninhidrin.

2.2- GABA'nın Ekstraksiyonu

Ekstraksiyon işlemi daha önce yapılan çalışmalarda bildirildiği gibi (41-43) kısaca şöyle yapıldı: Derin dondurucudan çıkarılan beyin dokuları çözündükten sonra tartılıp bir tüpe kondu. Üzerine 10 ml 0.4 N HClO₄ (buzlu), 0.1 ml % 5 lik Na₂S₂O₅ ve 0.2 ml % 10 luk Na₂-EDTA solusyonları ilave edildi. Doku Ultra-Turrax homojenizatör kullanılarak homojenize edildi. Homojenat +4° C de 10.000 g'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatantı alınıp filtre edildi.

Ion exchange cromatografı için Atack and Magnusson (41) tarafından

bildirilen sisteme göre kısaca şu işlemler yapıldı: Kolon kromatografisi için kullanılan dolgu maddesi (Dowex 50W) su, NaOH ve HCl ile 5 kez belirli sürelerle yıkandı. 100 mm uzunluğunda ve 4 mm iç çapında olan bir cam kolona yıkanmış dolgu maddesi (reçine) 76 mm olacak şekilde dolduruldu. Bu haldeki kolondan sırasıyla şu solusyonlar geçirildi:

- 1- 5 ml saf su
- 2- 20 ml 0.1 M sodyum fosfat tamponu (pH 6.5)
- 3- 5 ml saf su
- 4- 10 ml % 60 sulu metanol
- 5- 10 ml 2 N HCl
- 6- 10 ml 2.4 N etanoloik (Etanol % 60) HCl
- 7- 5 ml saf su

Bu durumda reçine 74 mm uzunluğunda olmalı. Böylece hazırlanan kolon artık rutin olarak kullanılabilir. Bundan sonra her kromatografik işlemde sadece şu solusyonlar kolondan geçirildi:

- 1- 2 N NaOH (+ % 1 EDTA)20 ml
- 2- Saf su20 ml
- 3- 2.N HCL20 ml
- 4- Saf su20 ml
- 5- 0.1 M fosfat tamponu20 ml
- 6- Saf su 5 ml
- 7- ***Ekstraksiyon kolondan geçirilir***
- 8- Saf su 10 ml
- 9- Sitrat tamponu (0.02 M, pH 4) 10 ml
- 10- Sitrat tamponu (0.05 M, pH 5.2) 1 ml
- 11- Sitrat tamponu (0.05 M, pH 5.2) 3 ml
- 12- Sitrat tamponu (0.05 M, pH 5.2) 3 ml

11. fraksiyon GABA tayini için dereceli bir tüpe alınır.

2.3- GABA'nın Spektrofluorometrik Ölçümü

GABA tayini, primer amino grubun ortoformaldehit ve beta merkaptetanolla yüksek PH 'da verdiği reaksiyonda yüksek floresan ürün oluşturmaya esasına dayanır (42-45). Bu şekilde hazırlanan örnek ve standart deneyler köre karşı spektrofluorometrede (Perkin Elmer 100) 335 nm eksitasyon ve 455 nm emisyon dalga boylarında okundu.

2.4- Amonyak Tayini

Plazma amonyak miktarı enzimatik yöntemle yapıldı. Bunun için gerekli reaktifler Sigma Chemical Co.'den KİT halinde temin edildi.

İstatistiksel analizler: Student "t" testi kullanılarak kontrol ve deneysel değerler arasındaki fark araştırıldı. Ayrıca amonyak ve GABA değerleri arasındaki korelasyon da saptandı.

3- BULGULAR

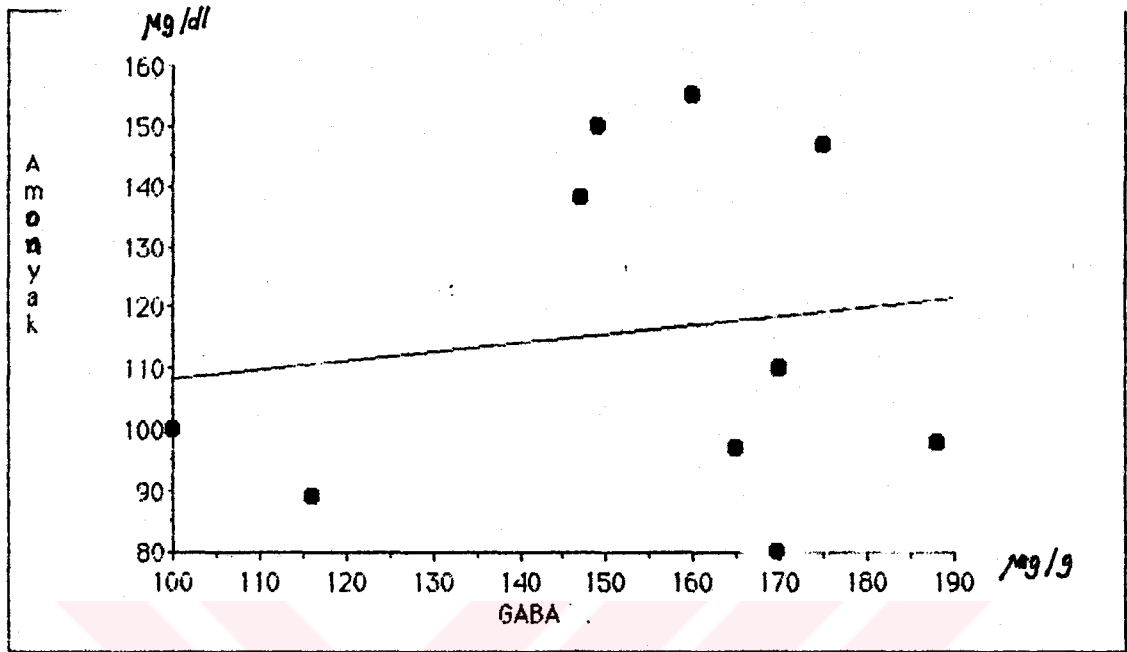
Hiperamonyemik sıçanlarda amonyanın beyin dokusundaki GABA metabolizması üzerindeki etkisinin araştırıldığı bu çalışmada, beyin dokusundaki GABA miktarları ve kan amonyak konsantrasyonları septanark aralarındaki ilişki incelendi.

Kontrol grubunda ortalama GABA miktarı 154 ± 6 $\mu\text{g/g}$ beyin dokusu olarak bulunurken, plazma amonyak konsantrasyonunun ortalama değeri 116.38 ± 9 $\mu\text{g/dl}$ idi. Bu grubun beyin GABA miktarı ile plazma amonyak konsantrasyonu arasında anlamlı bir korelasyon bulunamadı ($r= 0.192$, $P > 0.05$). (Şekil 5)

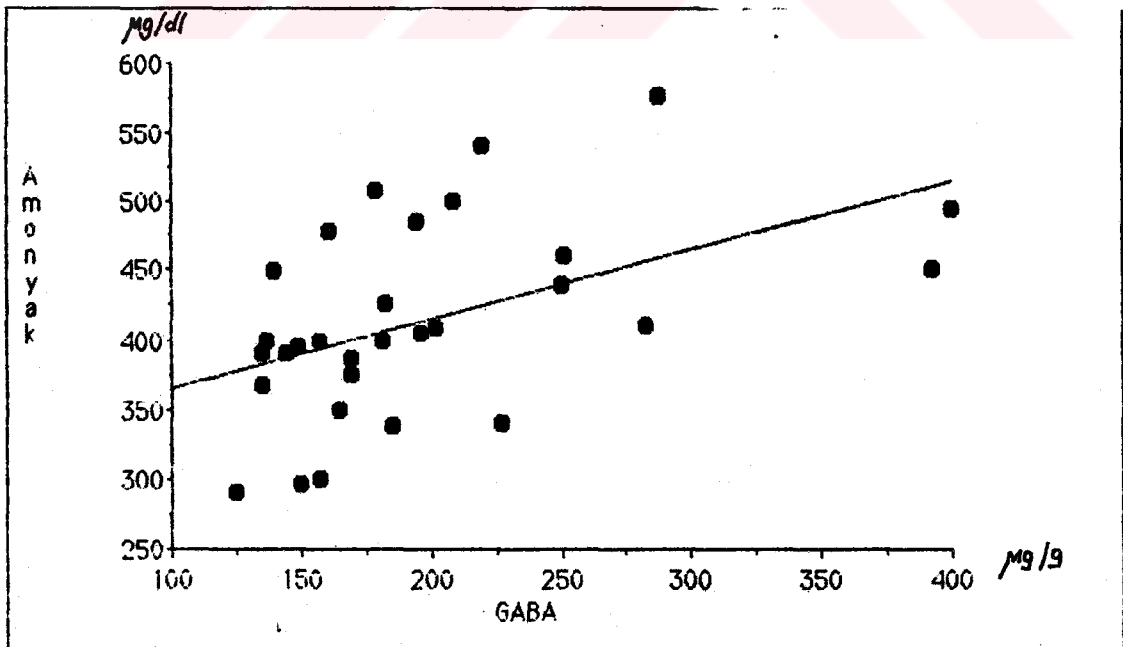
Deney grubuna üreez injeksiyonu yapılarak akut hiperamonyemi oluşturuldu. Hiperamonyemik grubun ortalama GABA miktarı 193.34 ± 11.16 $\mu\text{g/g}$ beyin dokusu, ortalama plazma amonyak miktarı 418 ± 12.4 $\mu\text{g/dl}$ düzeylerinde saptandı. Hiperamonyemik grupta beyin GABA miktarı ile plazma amonyak konsantrasyonu arasında istatistiksel anlamda olmamakla beraber zayıf bir ilişki saptandı ($r=0.455$), (Şekil 6)

Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında deney grubunda plazma amonyak konsantrasyonu önemli ölçüde yüksekti ($t=19.84$, $P < 0.001$). Aynı şekilde hiperamonyemik grubun beyin GABA miktarları kontrol grubuna göre istatistiksel anlamda olmak üzere daha yüksekti ($t= 3.02$, $P < 0.05$).

Yukardaki verilere göre (şekil 5 ve 6'da görüldüğü gibi) beyin GABA miktarı ile plazma amonyak konsantrasyonları arasında istatistiksel anlamda önemli bir ilişki bulunamamasına rağmen hiperamonyemi oluşturulduktan sonra deney grubunda GABA miktarları artmış bulunmaktadır.



A-Kontrol



B-Deney

Şekil 5.: Kan amonyaak ve beyin GABA değerleri arasındaki ilişki

4- TARTIŞMA VE SONUÇ

GABA merkezi sinir sisteminin en güçlü inhibitör nörotransmitter maddesidir. İnhibitör nöronlarda sentezlenen GABA nöronal akson uçlarında yoğunlaşmış bir şekilde bulunur. Sinir hücresinin uyarılmasıyla, GABA sinaptik aralığa boşalır ve postsinaptik membran üzerindeki GABA_A reseptörüyle birleşerek postsinaptik nöronu hiperpolarize eder. Fonksiyonu sona eren GABA aktif olarak tekrar geri emilir ve GABA transaminaz enzimi aracılığıyla parçalanarak etkisiz hale getirilir (5-7).

Nöronlardaki veziküllerde bulunanın dışında beyin omurilik sıvısı ve kanda da bir miktar GABA bulunmaktadır. Normal durumlarda kan dolaşımındaki GABA kan-beyin baryerini aşamadığı için, sentral sinir sistemindeki kendi reseptörlerini etkileyemez. Ancak BOS'taki GABA'nın postsinaptik membranda bulunan kendi reseptörünü etkileyerek hiperpolarizasyon ve dolayısıyla inhibisyon yapması olasıdır. Beyin dokusundaki GABA yoğunluğu BOS'takinden yaklaşık 10.000 kat daha fazladır (46). Sentral sinir sisteminin GABAergik aktivitesi tamamen sinaptik veziküllerde bulunan GABA ya aittir. Ancak sistemik dolaşımdaki GABA'nın herhangi bir nedenden dolayı kan beyin baryerini aşması, yada BOS'taki GABA miktarının artması GABAergik tonusta artışa neden olur. GABA'nın nöroinhibitör potansiyelinin iyontoforetik çalışmaları (47), karaciğer yetmezliğinde küçük bir miktar plazma GABA'sının postsinaptik nöral membrana geçerek nöronal inhibisyonu anlamlı bir şekilde etkilediğini göstermiştir. Hatta bu miktardaki GABA'nın beyin dokusunda tesbit edilemeyecek kadar az olduğu bildirilmiştir.

Amonyak nitrojen metabolizmasında merkezi bir öneme sahiptir. Buna karşılık yüksek amonyak dozları özellikle SSS için son derece toksiktir. Bu nedenle amonyak konsantrasyonu normal seviyede

tutulmalıdır. Glutamin beyinde, amonyak detoksifikasyonunu sağlayarak bu işlevi yerine getirmektedir.

Selektif hepatotoksin olan galaktozamin hidrokloridin i.v. injeksiyonundan sonra gelişen akut karaciğer yetmezliğinde kan beyin baryeri incelenmiş (22) ve beyin kapillerlerinin çevresini saran astrositlerin dejenere olduğu ve metabolik fonksiyonlarında yetersizlik görüldüğü anlaşılmıştır. Horowitz ve ark. (23) akut hiperamonyemide serebral endotelial hücreler arasında oluşmuş bir çok vezikül saptamış ve kapiller duvardaki hücreler arasında bulunan sıkı bağlantı bölgelerinin (tight-junction) açıldığını ileri sürmüşlerdir. Bu oluşumlar kan beyin baryerinde madde alışverişini sağlayan yerlerdir. Aynı çalışmada alfa aminoizobutirik asitin kan beyin baryerinden transferi araştırılmış ve normale göre bu transferin oldukça yüksek olduğu görülmüştür.

GABA'nın akut karaciğer yetmezliğinde beyin tarafından alımının arttığını gösteren bir çalışmada (48) yukardaki araştırmaya (23) paralellik gösteren sonuçlar bulunmuştur.

Kan beyin baryerinin GABA ve diğer bazı maddelere karşı geçirgenliği karaciğer yetmezliğinde artabileceği gibi (6, 7, 21, 22, 23, 48), sağlıklı deney hayvanlarına NH_3 infüzyonu yada inhalasyonunda da (13, 16, 17, 49) artabilmektedir. Bu sonuçlar amonyakın indirekt olarak GABAergik aktiviteye katkıda bulunabileceğini göstermektedir.

Mannien ve Savolainen (17) ratlara amonyak inhalasyonu yaptırdıktan sonra beyin dokusundaki amino asit miktarlarında önemli değişiklikler gözlemişler. Bu sonuçlara göre özellikle threonin ve glutaminin lineer bir şekilde artmasına dikkat çekmişler. Başka bir çalışmada (37) ise amonyak infüzyonunun beyin GABA konsantrasyonunu önemli oranda arttırdığı bulunmuştur. Inoue ve ark. (49) farelerde hiperamonyemi oluşturduklarında beyin nötral amino asit konsantrasyonlarında farklılıklar bulmuşlardır. Özellikle amonyak detoksifikasyonunu sağlayan glutamin ve

glutamatın arttığına dikkat çekmişlerdir.

Amonyak beyin ve BOS'taki amino asit metabolizmasını etkilediği kadar, yine nörotransmitter olan birçok monoaminin de metabolizmasını etkilemektedir. Bugge ve ark. (37) hiperamonyemide monoamin metabolizmasını incelemiş ve şu sonuçları bulmuşlar: Hiperamonyemide serotonin yapımının azaldığı, DOPA düzeyinin normal kalmasına karşılık norepinefrin miktarının azaldığı görülmüştür. Monoamin metabolizmasındaki bu azalmanın sonucunda ise deney hayvanlarının derin komaya girdiği gözlenmiştir. Bu çalışmada serebral amino asit metabolizmasının da bozulduğu ve özellikle amonyak infüzyonunun GABA miktarını artırdığı vurgulanmıştır.

Köpeklerde i.v. NH_4Cl infüzyonunun pentilentetrazole karşı epilepsi eşiği üzerindeki etkisini araştıran bir çalışmada (50), hiperamonyeminin epileptik eşiği yükselttiği ileri sürülmüştür. Burdan NH_3 'ün direkt yada indirekt olarak GABAergik tonusu artırdığı sonucuna varılmıştır.

Çalışmamızda hiperamonyemik ratların beyin GABA miktarının kontrollere oranla istatistiksel olarak ($P < 0.05$) arttığını saptadık. Beyin dokusunda NH_3 alfa ketoglutarik asitle birleşerek glutamik asit oluşturmaktadır. Glutamat GABA'nın prekürsörüdür. Amonyak miktarının beyin dokusunda artması sonucu, amonyak detoksifikasyon işlemleri hızlanır ve oluşan glutamat da yine NH_3 ile birleşerek glutamin sentezlenir. Bu reaksiyonlar geriye dönüşümlü olup denge halindedirler. Hiperamonyemide, amonyak detoksifikasyonu sonucu oluşan metabolitlerle yakın ilişkide olan GABA metabolizmasının hızlanması muhtemel olup, elde ettiğimiz bulgular da bu düşüncüyü destekler niteliktedir.

Basile ve Gammal (7) karaciğer yetmezliğinde beyin GABA konsantrasyonunun GABAergik tonus ile beraber artabileceğini fakat birçok kompensatuvar mekanizmanın bunda rol oynayabileceğini ileri

sürmektedir. Burada özellikle GABA katabolizmasının artmasından bahsedilmektedir.

Lityum verilen ratlarda GABA miktarının normalin 3 katına kadar çıktığını ve bu artışın da kısmen lityumun Na^+, K^+ -ATPaz aktivitesini inhibe ederek GABA reuptakeini bozması sonucu meydana geldiği bildirilmiştir (8). Aynı şekilde yüksek konsantrasyondaki amonyağın da Na^+, K^+ -ATPaz aktivitesini bozduğu bilinmektedir (14,35,51). Şu halde amonyağın GABA reuptakeini bozması muhtemel olup GABA konsantrasyonunu arttırması olasıdır.

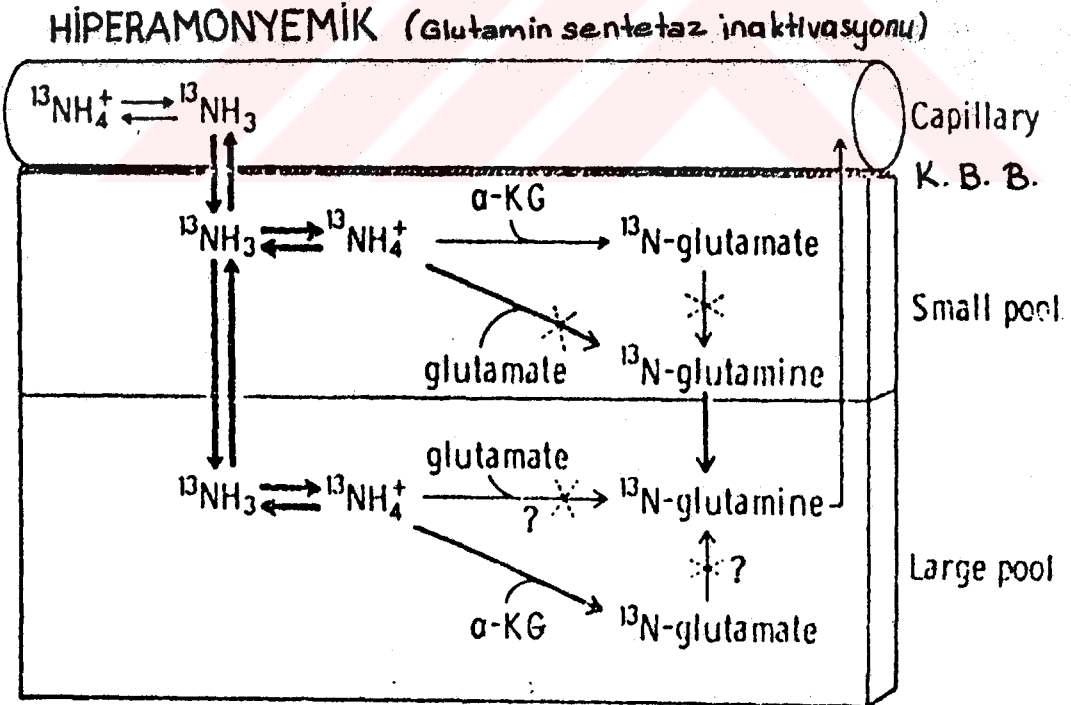
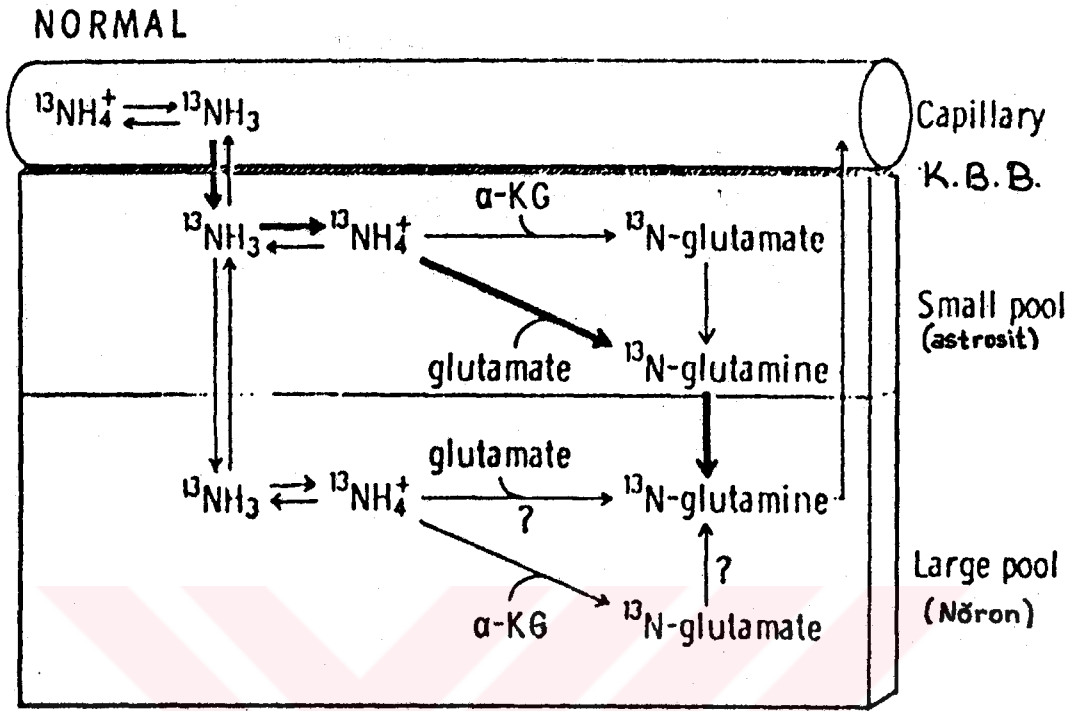
Glutamin sentetaz enzim inhibitörü olan methionin sulfoximin yada lityum verilmesinden sonra (8,52) veyahutta hiperamonyemide astrositlerde glutamine dönüşmesi gereken NH_3 'ün bir kısmı glutamin sentetazın yetersizliğinden dolayı kana geri döner, yada nöronlara geçerek glutamata dönüşür. Nöronal glutamat ise GABA sentezinde kullanılır.

Normal durumlarda glutamin sentetaz enzimi, endojen olarak oluşan amonyağın glutamine dönüşümü üzerine tam etkilidir (52). Fakat sistemik olarak amonyak konsantrasyonunun artmasında (akut yada kronik olarak) serebral glutamin sentetaz enzimi amonyak metabolizması üzerine tamamen etkili olamamakta, (53) hatta glutamin sentetaz aşırı amonyaktan dolayı inhibe olmakta ve böylece amonyak konsantrasyonu daha da artarak kısmen yukarıda bahsedilen metabolik yolu izlemektedir. Serebral amonyak metabolizmasının iki metabolik (yada anatomik) bölgede gerçekleştiği uzun zamandan beri bilinmektedir (52) Bu kompartimentalize bölgelerden biri small pool olarak nitelendirilen sinir hücresi çevresindeki astrositler ve diğer hücresel yapılarla bunların uzantılarıdır. Amonyak bu bölümlere serbest gaz halinde diffüzyonla girer. Bu kompartimentte yoğunlaşan glutamin sentetaz serebral amonyağın büyük bir kısmını burada glutamatla birleştirerek glutamine dönüştürür. Yapılan araştırmalarda (52-55) amonyağın detoksifikasyonu sırasında astrosit ve

nöronlar arasında metabolik bir baryer oluştururlar. Bu nedenle beyne geçen amonyanın büyük bir kısmı bu metabolik baryerde tuzaklanır. Çok az bir kısmı ise nöronlara geçerek glutamat-glutamin yada glutamat-GABA metabolik yolunu izler. Şekil 6'de görüldüğü gibi hiper amonyemik durumlarda smal pool'a geçen amonyanın önemli bir kısmı large pool'a geçerek buradaki metabolik yolu (glutamat-glutamin, glutamat-GABA) izler (52).

Hiperamonyemide beyin enerji dengesi bozulur ve ATP sentezi azalır (54,55,56). Aşırı amonyak yoğunluğu normal elektrofizyolojik ve nörotransmitter fonksiyonu, hücrel morfolojiyi, kan-beyin baryerinin özelliklerini, membran bütünlüğünü, osmoregülasyonu ve bir çok biyokimyasal yolu etkiler (57). Bunların tümü indirekt olarak serebral enerji metabolizmasını bozar. Glutamin sentezinin artması serebral ATP miktarını azaltır. GABA reuptakei ATP enerjisi kullanarak aktif transportla gerçekleştiğine göre, hiperamonyemide ATP'nin azalması hem glutamat ve GABA'nın reuptakeini azaltır hem de glutamin sentezinin aktivasyonunun azalmasına neden olur. Bu durum bir taraftan GABAergik inhibitör etkinin uzamasını sağlarken, öte yandan daha fazla amonyanın nöronlarda glutamat-glutamin, yada glutamat-GABA yolunu izlemesine neden olabilir.

Hepatik yetmezliğin son aşamalarında ensefalopatiye neden olan primer etkenin saptanmasına yönelik bir çok çalışmada (12,15,19,21,26,27) serum ve serebrospinal GABA miktarlarının artmış olduğu buldurulmuştur. Bu artışın nedeni çoğunlukla barsak florası tarafından sentezlenen GABA'nın dolaşım sistemine ve oradan permeabl olan kan beyin baryerini geçerek BOS'a ulaşması olarak yorumlanmıştır.



Şekil 6: Normal ve hiperamonyemik hayvanlarda beyin amonyak metabolizmasının şematik olarak karşılaştırılması.

BOS'taki GABA konsantrasyonunun artması kısmen NH_3 'ün aşırı yoğunluğuna bağlıdır. Çünkü NH_3 GABA reuptakeini hem ATP enerjisini azaltmak hemde sodyum metabolizmasını bozmak suretiyle indirekt olarak azaltabilir. Sinaptik aralıkta kalan GABA serebral dolaşıma ve BOS'a geçebilir.

Amonyanın potasyumla kompetitisyona girerek nöronal Na^+, K^+ -ATPaz aktivitesini inhibe ettiği gösterilmiştir (35). Ayrıca yüksek konsantrasyondaki amonyum iyonları kısmen intrasellüler sodyum yerine geçerek klor pompasını inhibe ederler. (14, 51). Bilindiği gibi bu pompa repolarizasyon için gerekli olan yüksek transmembran klorid gradiyentinin sağlanması için gereklidir. GABA'nın postsinaptik membrana olan etkisi klor kanallarını açarak klor iyonlarının girişini arttırmakla gerçekleşmektedir. Klor pompasının amonyum iyonları tarafından inhibe edilmesi halinde, olması gerekenden çok daha az miktardaki GABA postsinaptik membranda inhibisyonu sağlayabilir. Başka bir deyişle GABAergik inhibisyon kolaylaşır.

Fazla amonyanın GABA reuptakeini inhibe etmesinin bir nedeni de , amonyanın hem sodyum hem de potasyum iyonlarının metabolizmasını etkilemesidir (35). GABA, glutamik asit ve glisin gibi bazı nörotransmitterlerin etkisi nöronlar yada çevrelerindeki hücrelerin bu maddeleri geri almalarıyla sona ermektedir. Bu nörotransmitterlerin geri emilimi sodyuma bağlıdır (8). Amonyanın sodyum ve potasyum metabolizmasını bozduğu bilindiğine göre, fazla amonyak aynı zamanda bu yolla GABA ve glutamik asitin metabolizmasını da değiştirerek muhtemelen, hem GABA'nın nöroinhibitör tonusunu artırır hem de katabolizmasını yavaşlatır.

Karaciğer yetmezliğinde ensefalopatinin gelişmesinde bir çok

etkenin rol oynamasına karşılık majör etkenin GABA olduğunu bildiren araştırmacıların yanında amonyoğın esas toksik etken olduğu fikrini destekleyen yazarlar da mevcuttur . Karaciğer yetmezliğinde amonyak konsantrasyonunun toksik düzeyde artmasına karşılık GABA miktarı ve GABAergik aktivite de artar (6,7,14,26,37). Bu durumda ensefalopatinin gelişmesinde hem NH_3 hem de GABA'nın önemli derecede etkili oldukları açıktır. Bununla beraber amonyak hem direkt hem de indirekt olarak GABA'nın nöroinhibitör etkisini artırır.

Sonuç olarak hiperamonyemide GABA metabolizması dört değişik yoldan etkilenmektedir. Bunlar:

1- Yüksek konsantrasyondaki NH_3 glutamine dönüşerek sistemik dolaşıma geçer. Buna karşılık bazı amino asitler kan beyin baryerini geçerek (kotransport) merkezi sinir sisteminin nörotransmitter dengesini bozarlar.

2- Beyin dokusunda NH_3 miktarının aşırı artması glutamine dönüşüm kapasitesini aşacağından amonyoğın bir kısmı nöronlara geçerek glutamik asit oluşturur, bu ise GABA sentezi için temel kaynaktır.

3- Artan amonyak, beyinde iyon (Na^+ , K^+ , Cl^-) dengesini bozarak GABA reuptakeini azaltır.

4- Beyin amonyak konsantrasyonunun artması sonucu serebral enerji dengesi bozulur (58) ve GABA'nın geri alımı yavaşlar.

Yukarıda sıralanan sonuçlara göre, akut (amonyak yada üreaz injeksiyonuyla) veya kronik (portacaval anastomozis ile) olarak oluşan hiperamonyemide GABA'nın nöroinhibitör potansiyeli artmakta ve bu da ensefalopatinin muhtemelen primer etkeni olmaktadır.

5- KAYNAKLAR

1- Berne, R.M. and Levy, M.N.: Physiology, 1988, second edition, The C.V. Mosby Company, Washington.

2- Ganong, W.F.: Review of Medical Physiology, 1989, Fourth edition, Prentice-Hall International Inc. U.S.A.

3- Noyan, A.: Fizyoloji ders kitabı, beşinci baskı, 1988, 233-237

4- Skolnick, P., Paul, S.M.: Benzodiazepine receptors in the central nervous system. *Int.Rev. Neurobiol.* 23: 103-140, 1982

5- Jones, E.R., Skolnick, P., Gammal, S.H. et al.: The γ -aminobutyric acid A (GABA_A) receptors complex and hepatic encephalopathy. *Annals of Internal Medicine*, 110: 532-546, 1989

6- Jones, E.R., Gammal, S.H. and Martin, P.: Hepatic Encephalopathy New light on an old problem quarterly *J. Medicine*, 69 (259) 851-867, 1988

7- Basile, R.S., Gammal, S.H.: Evidence for the involvement of the benzodiazepine receptor complex in hepatic encephalopathy, *Clin. Neuropharmacol.* 11 (5) 401-422, 1988

8- Marcus, S.R., Nadiger, H.R., Chandrakala, M.U. et al : Acute and short-term effect of lithium on glutamate metabolism in rat brain. *Biochem. Pharmacol.* 35 (3) 365-369, 1986

9- Pitkänen, R., Matilainen, R., Halonen, T. et al: Inhibitory and excitatory amino acids in cerebrospinal fluid of chronic epileptic patients. *J. Neural Transmission*, 76: 221-230, 1989

10- Van Gelder, N.M., Sherwin, R.L. and Rasmussen, T.: Amino acid content of epileptogenic human brain: focal versus surrounding regions

Brain Res. 40: 385-393, 1972

11- Grove, J., Palfreyman, M.G., Schechter, P.J.: Cerebrospinal fluid GABA as an index of brain GABA activity, Clin Neuropharmacol. 6: 223-229, 1983

12- Fraser- C.L., Arieff, R.I.: Hepatic Encephalopathy, New England J. Med. 313- (14): 865-871, 1985

13- Fick, T.E., Schalm, S.W., Ullger, M.: Continuous intravenous ammonia infusion as a model for the study of hepatic encephalopathy in rabbits, J. Surgical Research 46: 221-225, 1989

14- Crossley, I.R., Wardle, E.N., Williams, R.: Biochemical mechanism of hepatic encephalopathy, Clin. Scien. 64: 247-252, 1983

15- Lavizzari, G.S., Steinmann, E.: Reversal of hepatic coma by benzodiazepine antagonist (Ro 15-1788) The Lancet, June 8 1324-1325, 1985

16-James, J.H., Ziparo, U., Jeppson, B. and Fischer, J.E.: Hyperammonemia, plasma amino acid imbalance, and blood-brain amino acid transport: A unified theory of portal-systemic encephalopathy, The Lancet, 2: 772-775, 1979

17- Mannien, R.T.R., Savolainen, H.: Effect of short-term ammonia inhalation on selected amino acids in rat brain, 3 (64): 244-246, 1989

18- Zieve, L., Doizaki, W.M. and Lyftogt, C.: Brain methanethiol and ammonia concentration in experimental hepatic coma induced by injections of various combinations of these substances. J. Lab. Clin. Med. 104: 655-664, 1984

19- Ferenci, P., Schafer, D.F. Kleinberger, G. et al. : Serum levels of Gamma aminobutyric acid-like activity in acute and chronic hepatocellular disease, Lancet II, 811-814, 1983

20- Bassett, M.L., Mullen, K.D., Scholz, B. et al.: Increased brain uptake of γ -aminobutyric acid in a rabbit model of hepatic

encephalopathy, *Gastroenterol.* 98: 747-757, 1990

21- Schafer, D.F., Jones E.A.: Hepatic Encephalopathy on the γ -aminobutyric acid neurotransmitter system, *Lancet* I: 18-20, 1982

22- Traber, P.G., Canto, M.D., Ganger, D.R. et al. : Electron microscopic evaluation of brain edema in rabbits with galactosemine-induced fulminant hepatic failure : Ultrastructure and integrity of blood-brain barrier. *Hepatology* 7 (6): 1272-77, 1987

23- Horowitz, M.E., Schafer, D.F., Molnar, P. et al. : Increased blood brain transfer in a rabbit model of acute liver failure, *Gastroenterol.* 84 1003- 1011, 1983

24- Schafer, D.F., Waggoner, J.G., Jones E.A.: Sera from rabbits in acute hepatic coma inhibit the binding of [3 H] γ -aminobutyric acid to neural membranes. *Gastroenterol.* 78: 1320 1980

25- Schefer, D.F., Thakur, A.K., Jones E.A.: Acute hepatic coma and inhibitory neurotransmission: Increase in γ -aminobutyric acid levels in plasma and receptors in brain. *Gastroenterol.* 79: 1223, 1980

26- Minuk, G.Y., Winder, A., Burgess, E.D.: Serum gamma aminobutyric acid (GABA) levels in patients with hepatic encephalopathy. 32: 171-174, 1985

27- Maddison, J.E., Dodd, P.R., Morrison, M. et al.: Plasma GABA, GABA-like activity and the brain GABA-benzodiazepine reseptor complex in rats with chronic hepatic encephalopathy. 7: 621-628, 1987

28- Schafer, D.F., Fowler, J.M., Munson, P.J. et al.: Gamma -aminobutyric acid and benzodiazepine receptors in an animal model of fulminant hepatic failure. *J. Lab. Clin. Med.* 102: 870-889, 1983

29- Schalm, S.W., Van Der Mey, T.: Hyperammonemic coma after hepatectomy in germ-free rats. *Gastroenterol.* 77: 231-234, 1979

30- Weber, F.L., Veach, G.L.: The importance of the small intestine in gut ammonium production in the fasting dog. *Gastroenterol.* 77:

235-240, 1979

31- Lockwood, R.H., McDonald, J.M., Reiman, R.E.: The dynamics of ammonia metabolism in man: effects of liver disease and hyperammonemia. *J. Clin. Invest.* 63: 449-460, 1979

32- Yamamoto, H., Konno, H., Yamamoto, T. et al. Glutamine synthetase of the human brain: purification and characterization. *J. Neurochem.* 49: 603-609, 1987

33- Caesar, J.: Levels of glutamine and ammonia and the PH of cerebrospinal fluid and plasma in patients with liver disease. *Clinical Science*, 22: 33-41, 1962

34- Hourani, B.T., Hamlin, E.M., Reynolds, T.B.: Cerebrospinal fluid glutamine as a measure of hepatic encephalopathy. *Archives of Internal Medicine*, 127: 1033- 1036, 1971

35- Schenker, S., McCandles, D.W., Brophy, E.: Studies on intracerebral toxicity of ammonia. *J. Clin. Invest.* 46: 838-848, 1967

36- Fischer, J.E., Yoshimura, N., Aguirre, R. et al.: Plasma amino acids in patients with hepatic encephalopathy: effects of amino acid infusion. *American J. Surgery*, 127: 40-47, 1974

37- Bugge, M., Bengtsson, F., Nobin, R. et al. : The effect of ammonia infusion on brain monoamine metabolism in portacaval-shunted rats. *189 (2):* 101-111, 1989

38- Prior, R.L. and Disek, W.J.: Effects of urea hydrolysis on tissue metabolite concentrations in rats. *Am. J. Physiol.* 223: 1143-1149, 1972

39- Van der Heyden, J.R.M., Korf, J.: Regional levels of GABA in the brain: rapid semiautomated assay and prevention of postmortem increase by 3-mercaptopropionic acid. *J. Neurochem.* 31: 197-209, 1978

40- Lamar, C.: Mercaptopropionic acid: A convulsant that inhibits glutamate decarboxylase. *J. Neurochem.* 17: 165-170, 1970

41- Rlack, C. and Magnusson, T.: A procedure for the isolation of

noradrenaline (together with adrenaline) dopamine, 5-hydroxytryptamine and histamine from the same tissue sample using a single column of strongly acidic cation exchange resin. *Acta Pharmacol. et Toxicol.* 42: 35-57, 1978

42- Lindgren, S., Anden, N.E., Grabowska-Anden, M.: A fluorimetric method for determination of GABA in tissues following cation exchange chromatography and condensation with o-phthalaldehyde. *J. Neural Transmission* 55: 243-252, 1982

43- Carmona, E., Gomes, C., Trollin, G.: Purification of GABA on small columns of dowex 50W; combination with a method for separation of biogenic amines. *Acta Pharmacol. et Toxicol.* 46: 235-240 1980

44- Roth, M.: Fluorescence reaction for amino acids. *Anal. Chem.* 43 (7): 880-882 1971

45- Benson, J.R., Hare, P.E.: o-Phthalaldehyde: fluorogenic detection of primary amines in the picomole range. Comparison with fluorescamine and ninhydrin. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 72 (2): 619-622 1975

46- Moroni, F., Riggio, O., Carla, U. et al.: Hepatic encephalopathy: Lack of changes of γ -aminobutyric acid content in plasma and cerebrospinal fluid. *Hepatology* 7 (4): 816-820, 1987

47- Krnjevic, K.: Chemical nature of synaptic transmission in vertebrates. *Physiol Rev.* 54: 418-540, 1974

48- Basset, M.L., Mullen, K.D., Scholz, B. et al.: Increased brain uptake of γ -aminobutyric acid in a rabbit model of hepatic encephalopathy. *Gastroenterol.* 98: 747-757 1990

49- Inoue, I., Gushiken, T., Kobayashi, K. et al.: Accumulation of large neutral amino acids in the brain of sparse-fur mice at hyperammonemic state. *Biochem. Med. and Metabolic Biol.* 38 (3): 378-386, 1987

50- Arıkan, M.K., Türkoğlu, A., Bulut, S., Baydaş, G., Arslan, İ.N.: Hiperamonyemi epileptik eşik ilişkisi için bir deneysel çalışma. Türkiye Klinikleri tıp Bil. Araştırma Dergisi 8(1): 47-51, 1990

51- Lux, H.D., Loracher, C. and Neher, E.: The action of ammonium of postsynaptic inhibition of cat spinal motoneurons. Exp. Brain Res. 11: 431-439, 1970

52- Cooper, R.J.L., McDonald, J.M., Gelbard, R.S. et al.: The metabolic fate of ^{13}N - labeled ammonia in rat brain. J. Biological Chem. 254 (12): 4982-4992, 1979

53- Cooper, R.J.L. and Gelbard, R.S.: Metabolism of [^{13}N]ammonia in normal and hyperammonemic rat brain. Advances in ammonia metabolism and hepatic encephalopathy. Edited by Soeters, B.P., Wilson, J.H.P. et al. 1988, Elsevier Science Publishers B.V. pp: 420-432

54-Hindfelt, B., Plum, F., Duffy, T.E.: Effect of acute ammonia intoxication on cerebral metabolism in rats with portacaval shunts. J. Clin. Invest. 59: 386-394, 1977

55- Cooper, R.J.L., Lai, J.C.K. and Gelbard R.S.: Ammonia and energy metabolism in normal and hyperammonemic rat brain. The biochemical Pathology Of Astrocytes 419-434, 1988 Alan R. Liss, Inc

56- Cooper R.J.L., Mora, S.N., Cruz, N.F. and Gelbard, R.S.: Cerebral ammonia metabolism in hyperammonemic rats. J. Neurochem. 44 (6): 1716-1723, 1985

57- Cooper, R.J.L. and Plum, F.: Biochemistry and physiology of brain ammonia. Physiol. Rev. 67: 440-529, 1987

58- Cooper. R.J.L. and Lai, J.C.K.: Cerebral ammonia metabolism in normal and hyperammonemik rats. Neurochemical Pathology, 6: 67-95, 1987

6- ÖZET

Amonyak konsantrasyonunun aşırı artmasında beyin GABA metabolizmasının nasıl etkilendiğini araştırmak için, sıçanlarda deneysel olarak hiperamonyemi oluşturularak beyin dokusundaki GABA miktarları ölçüldü. Üreaz injeksiyonuyla hiperamonyemi oluşturulan sıçanlarda, beyin GABA miktarı kontrol grubuna göre önemli oranda artmıştı ($P < 0.05$). Aynı şekilde kan amonyak konsantrasyonu da kontrollerle karşılaştırıldığında istatistiksel olarak yüksekti ($p < 0.001$).

Kan amonyak konsantrasyonu ile beyin GABA miktarları arasında, kontrol grubunda herhangi bir ilişki bulunamamasına karşın ($r = 0.192$) deney grubunda istatistiksel anlamda olmamakla beraber zayıf bir ilişki mevcuttu ($r = 0.455$). Sonuç olarak aşırı amonyak konsantrasyonunun beyin GABA miktarını artırarak nöroinhibitör potansiyeli yükselttiği kanısına varılmıştır.

7-SUMMARY

In this study, we investigated the effect of hyperammonemia on the metabolism of brain GABA. Two groups of rat were selected, one of them used as the control.

Acute hyperammonemia was induced by urease injection (i.p.). In the control group, the brain GABA levels and blood ammonia concentration were 154.11 ± 6 $\mu\text{g}/\text{gr}$ tissue and 116.53 ± 9 $\mu\text{g}/\text{dl}$ respectively.

In the hyperammonemic group brain GABA level was 193.34 ± 11 $\mu\text{g}/\text{gr}$ tissue and blood ammonia concentration was 418 ± 12.4 $\mu\text{g}/\text{dl}$.

The brain GABA levels were significantly increased after urease injection when compared to controls. In conclusion, brain GABA metabolism is affected by the elevated ammonia concentration.

B-TEŞEKKÜR

Doktora öğrenimim sırasında hiçbir fedakarlıktan kaçınmadan maddi ve manevi desteğini sağlayarak bana destek olan danışman hocam sayın Doç.Dr. Abdülbaki Türkoğlu'na teşekkür etmeyi bir borç bilirim. Laboratuvarında bana çalışma olanakları sağlayarak yardımcı olan sayın Prof.Dr. Şendoğan Gülen'e ve değerli yardımlarından dolayı sayın Doç.Dr.Haluk Keleştimur'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca tezimin her aşamasında bana yardımcı olan Fizyoloji Anabilim Dalındaki tüm personele teşekkür ederim.

9-ÖZ GEÇMİŞİM

1959 da Bingöl'de doğdum ilk öğrenimimi Karakoçan'da, orta okulu Akçadağ Öğretmen Lisesi'nde, liseyi Palu'da bitirdim. 1985 yılında Fırat Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünden mezun oldum, aynı yıl F.Ü. Tıp Fakültesi araştırma görevlisi sınavlarını kazanarak göreve başladım. 1988 de yüksek lisansımı bitirdim. Halen aynı fakültenin Fizyoloji Anabilim Dalında görev yapmaktayım.