



T.C.  
MARMARA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

# **DENEYSEL OMURİLİK YARALANMASINA BAĞLI MESANE HASARINDA ALFA LİPOİK ASİTİN ETKİLERİ**

Ecz. Arif Ekiz  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

FARMAKOLOJİ  
ANABİLİM DALI

DANIŞMAN  
Doç. Dr. Hale Zerrin Toklu

İSTANBUL – 2014



## TEZ ONAYI

Kurum : Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Programın seviyesi : Yüksek Lisans  
Anabilim Dalı : FARMAKOLOJİ  
Tez Sahibi : ARIF EKİZ  
Tez Başlığı : Deneysel Omurilik Yumurtlamasına Bağlı Mesane Hastalarında  
Alfalipikasinin Etkileri  
Sınav Yeri : Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji A.B.D.  
Sınav Tarihi : 10.03.2014.

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman (Unvan, Adı, Soyadı)

Kurumu

İmza

Sınav Jüri Üyeleri (Unvan, Adı, Soyadı)

Prof. Dr. Tijen Utkan

KOU Tıp Fak.



Prof. Dr. Göksel Şener

M.Ü. Ecz. Fak.



Prof. Dr. Feyza Arıcıoğlu

MÜ. Ecz. Fak.



Yukarıdaki jüri kararı Enstitü Yönetim Kurulu'nun ~~26/03/2014~~ <sup>28</sup>/03/2014 tarih ve ~~28~~ sayılı kararı ile onaylanmıştır.



Prof. Dr. Feyza ARICIOĞLU  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

-Sınav evrakları 3 iş günü içinde 3'er nüsha halinde Enstitüye teslim edilmelidir.  
-Bu form bilgisayar ortamında doldurulacaktır.

## **BEYAN**

Bu tez alısmasının kendi alısmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez alısmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Tarih, imza

Arif Ekiz

## TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın tüm süreçlerinde tavsiyeleri ve yönlendirmeleriyle sürekli desteğini hissettiğim, pozitif tavrı ve çözümcül yaklaşımından çok şey öğrendiğim değerli danışman hocam **Doç. Dr. Hale Zerrin Toklu'** ya,

Yüksek lisans öğrenimim boyunca kendisinden çok şey öğrendiğim, tez çalışmaları esnasında daha yakından tanıma şansı bulduğum, deneyimi ve farklı bakış açısıyla hep yanımda olan değerli hocam **Prof. Dr. Göksel Şener'** e,

Yüksek lisans öğrenimim süresince bana çok şey katan değerli hocalarım **Prof. Dr. Gül Dülger, Prof. Dr. Feyza Arıcıoğlu ve Prof. Dr. Levent Kabasakal'** a,

Tez çalışmalarında çok değerli katkıları olan **Opr. Dr. Mehmet Erşahin ve Doç. Dr. Halil Tuğtepe'** ye,

Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilimdalı öğretim üyesi **Doç. Dr. Derya Özsavcı'** ya,

Tez çalışması boyunca dostluk ve desteklerini esirgemeyen **Araş. Gör. Zarife Nigar Özdemir ve Uzm. Ecz. Zeynep Ülkü Düzgün'** e,

Bugünlere gelmemde çok büyük emeği olan ve yaşamımın her alanında desteğini hissettiğim **Ailem'** e,

**İÇTEN TEŞEKKÜRLERİMİ SUNARIM.**

## İÇİNDEKİLER

Sayfa No

Önsöz.....	iv
İçindekiler .....	v
Tablo Listesi .....	vii
Resim Listesi .....	vii
Şekil Listesi .....	vii
Kısaltmalar Dizini .....	ix
<b>1. ÖZET .....</b>	<b>1</b>
<b>2. SUMMARY .....</b>	<b>2</b>
<b>3. GİRİŞ ve AMAÇ .....</b>	<b>3</b>
<b>4. GENEL BİLGİLER .....</b>	<b>5</b>
<b>4.1. Miksiyonun Nöronal Kontrolü .....</b>	<b>6</b>
<b>4.2. Mesanenin Dolum ve Boşaltımının Düzenlenmesi .....</b>	<b>6</b>
4.2.1. Mesanenin dolumu ve sakınma refleksi .....	6
4.2.2. Mesanenin boşalması .....	7
<b>4.3. Skh Oluşum Mekanizmaları ve Epidemiyoloji .....</b>	<b>7</b>
4.3.1. Omurilik hasarında patofizyoloji .....	8
4.3.2. Omurilik hasarında ürolojik komplikasyonlar .....	9
4.3.3. Omurilik hasarı ile ilişkili nmib .....	10
<b>4.4. Alfa Lipoik Asitin Antioksidan ve Antiinflamatuvar Etkileri .....</b>	<b>11</b>
4.4.1. Nöro travma modellerinde patofizyoloji .....	13
<b>5. GEREÇ VE YÖNTEM .....</b>	<b>15</b>
<b>5.1. Deney Hayvanları .....</b>	<b>15</b>
<b>5.2. Deney Grupları .....</b>	<b>15</b>
<b>5.3. Omurilik Hasarının ( OH ) Oluşturulması .....</b>	<b>16</b>
<b>5.4. Motor işlev değerlendirmesi .....</b>	<b>19</b>
<b>5.5. İzole Organ Banyosu Deneyleri .....</b>	<b>20</b>
<b>5.5.1. İzole Organ Banyosunda Mesane</b>	
<b>Kasılma-Gevşeme Yanıtları Ölçümü .....</b>	<b>20</b>
<b>5.6. Biyokimyasal İncelemeler .....</b>	<b>21</b>
<b>5.6.1. İndirgenmiş glutatyon (GSH) .....</b>	<b>21</b>
<b>5.6.1.2. Gerekli Çözeltiler .....</b>	<b>21</b>

5.6.2. Malondealdehit (MDA) .....	23
5.6.2.1. Gerekli Çözeltiler .....	23
5.6.3. Kemilüminesans yöntemi ile radikal düzeyleri .....	24
5.6.4. Serumda nöron spesifik enolaz ( NSE ) ve soluble protein 100β ( S- 100β ) .....	25
5.6.4.1. Test prensibi .....	25
5.6.4.2. Örnek hazırlığı .....	25
5.6.4.3. Deney prosedürü .....	26
5.6.5. Nerve growth factor (NGF) tayini .....	27
5.6.5.1. NGF Sandwich ELISA Kit Yönteminin Prensibi .....	27
5.6.5.2. Reaktiflerin hazırlanması .....	27
5.6.5.3. Deneyin yapılışı .....	29
5.6.5.4. 100 µL peroksidaz konjuge donkey anti-mouse IgG doku örneklerinin hazırlanması .....	30
5.6.6. Kaspaz-3 aktivitesi tayini .....	31
5.6.6.1. Doku örneklerinin hazırlanması .....	31
5.6.6.2. Prensibi .....	31
5.6.6.3. Çözeltilerin hazırlanması .....	31
5.6.6.4. Deneyin yapılışı .....	32
5.7. Histolojik İncelemeler .....	34
5.7.1. Işık mikroskopisi .....	34
5.7.2. Taramalı elektron mikroskopisi (SEM) .....	34
5.8. İstatistiksel Değerlendirme .....	35
6. BULGULAR .....	36
6.1. Motor İşlev Skoru .....	36
6.2. Mesane İçi İdrar Hacmi .....	36
6.3. Mesane Dokusunun Karbakolle Kasılma Yanıtları .....	37
6.4. Mesane Dokusunun İsopterole Gevşeme Yanıtları .....	38
6.5. Mesane Dokusunun Papaverinle Gevşeme Yanıtları .....	39
6.6. Mesane Dokularında GSH (glutasyon) Tayini .....	39
6.7. Mesane Dokularında MDA (malondealdehit) Tayini .....	40
6.8. Mesane Dokularında Luminol Kemilüminesans Ölçümü .....	41
6.9. Mesane Dokularındaki Lusigenin Kemilüminesans Ölçümü .....	41
6.10. Mesane Dokularındaki Kaspaz 3 Aktiviteleri .....	42
6.11. Mesane Dokularındaki NGF Seviyeleri .....	43
6.12. Serum S- 100β ve NSE Seviyeleri .....	44
6.13. Mesane Dokularının Histolojik Analizi .....	46
6.14. Mesane Dokularının Yüzey Morfolojisi .....	48
7. TARTIŞMA VE SONUÇ .....	50
8. KAYNAKÇA .....	52
9. ETİKKURULONAYI .....	62
10. ÖZGEÇMİŞ .....	63

## **TABLO LİSTESİ**

**Tablo I.** NGF standartlarının seri dilüsyon oranları

**Tablo II.** Kaspaz 3 aktivitesi tayininde kullanılan materyaller

## **RESİM LİSTESİ**

**Resim I.** Sıçanda T5- 12 düzeyinin ortaya çıkarılması.

**Resim II.** 10 cm. yükseklikten 10 gr. ağırlığında paslanmaz çelik silindir düşürülmesi.

**Resim III.** Kontrol grubuna ait normal çalışan mesane.

**Resim IV.** Omurilik hasarı olan sıçanların mesanesi

**Resim V.** Omurilik hasarı olan sıçanlarda parapleji

**Resim VI.** Organ banyosu deney düzeneği

**Resim VII.** Mesane Dokularının Histolojik

**Resim VIII.** Mesane Dokularının Yüzey Morfolojisi

## **ŞEKİL LİSTESİ**

**Şekil I.** 7 günlük deney süreci

**Şekil II.** GSH tayini için kullanılan deney prosedürü

**Şekil III.** MDA tayini için kullanılan deney prosedürü

**Şekil IV.** NGF tayin grafiği

**Şekil V.** Kaspaz 3 aktivite tayin grafiği

**Şekil VI.** Gruplara ait motor işlev skorları



- Şekil VII.** Mesane içi idrar hacmi miktarları
- Şekil VIII.** Mesane dokusunun karbakolle kasılma yanıtları
- Şekil IX.** Mesane dokusunun isoproterenolle gevşeme yanıtları
- Şekil X.** Mesane dokusunun papaverinle gevşeme yanıtları
- Şekil XI.** Grupların mesane dokularında GSH (glutatyon) tayini
- Şekil XII.** Grupların mesane dokularında MDA (malondealdehit) tayini
- Şekil XIII.** Grupların mesane dokularındaki luminol kemilüminesans değerleri
- Şekil XIV.** Grupların mesane dokularındaki lusigenin kemilüminesans değerleri
- Şekil XV.** Grupların mesane dokularındaki kaspaz 3 aktiviteleri
- Şekil XVI.** Grupların mesane dokularındaki sinir büyüme faktörü (NGF) düzeyi
- Şekil XVII.** Serum nöron spesifik enolaz (NSE) VE  
Serum çözünebilir protein- 100 $\beta$  (S- 100  $\beta$ ) seviyeleri
- Şekil XVIII.** Grupların mesane dokusu kas kalınlıkları

## KISALTMALAR LİSTESİ

<b>DHLA</b>	: Dihidro lipoik asit
<b>DTNB</b>	: Ditiyo nitro benzen
<b>GSH</b>	: Glutatyon
<b>LA</b>	: Alfa lipoik asit
<b>MDA</b>	: Malondealdehit
<b>NGF</b>	: Sinir büyüme faktörü
<b>NMIB</b>	: Nörojenik mesane işlev bozukluğu
<b>NO</b>	: Nitrik oksit
<b>NSE</b>	: Nöron spesifik enolaz
<b>PAG</b>	: Periaqueductal gri madde
<b>PGN</b>	: Pregangliyonik nöronlar
<b>PMC</b>	: Pontin miksiyon merkezi
<b>OH</b>	: Omurilik hasarı
<b>TBA</b>	: Tiyo barbitürik asit
<b>TCA</b>	: Trikloro asetik asit

## 1. ÖZET

**Amaç:** Deneysel çalışmalar alfa lipoik asitin (LA) omurilik hasarına karşı nöron koruyucu etkilerini ortaya koymuştur. Klinikte omurilik yaralanması sonrasında görülen en önemli komplikasyonlardan biri mesaneye ait sorunlardır. Bu nedenle omurilikte koruyucu olan LA'nın mesanedeki biyokimyasal, histolojik ve fonksiyonel değişikliklere etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır.

**Yöntem:** Erkek Wistar albino sıçanlar (300 – 350 g); kontrol, omurilik hasarlı (OH) ve OH+ LA grubu olmak üzere 3 gruba ayrılmıştır. Travma oluşturmak için anestezi altında laminektomi yapılarak 10 g. ağırlık 10 cm yükseklikten T10 düzeyinde düşürülmüştür. Daha sonra sıçanlara LA (50 mg/kg/gün, ip) bir hafta süreyle verilmiştir. Sekizinci gün motor skorları değerlendirilerek fonksiyonel (izole organ banyosunda kasılma-gevşeme yanıtları), biyokimyasal malondialdehid (MDA), glutatyon (GSH), sinir büyüme faktörü (NGF), kaspaz- 3, luminol ve lusigenin kemiluminesansı ve histolojik incelemeler için mesane çıkarılmıştır. Ayrıca kanda nöron spesifik enolaz (NSE) ve S100 $\beta$  protein düzeyi bakılmıştır.

**Bulgular:** Mikroskopik incelemede OH' nın mesanenin detrusor kas tabakası kalınlığında anlamlı artışa ( $p>0.001$ ) neden olduğu gözlemlendi. Karbakolle kasılma ve papaverinle gevşeme yanıtlarında anlamlı artışa neden olmuştur ( $p<0.05-0.001$ ). Mesane dokusunda OH'de MDA, kaspaz-3, luminol, lusigenin kemiluminesansı yükselirken, GSH ve NGF azalmıştır ( $p<0.05$ ). LA tedavisi bu değişikliklere bir miktar etkili olmakla birlikte ( $p<0.05-0.001$ ) motor fonksiyonları düzeltmemiştir.

**Sonuç:** Elde edilen bulgular LA'nın OH sonucu bozulan mesane tonus kontrolünde ve oksidan hasarın azaltılmasında kısmen yararlı etkileri olabileceğini göstermektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Lipoik asit, omurilik yaralanması, travma, mesane, NGF.

## 2. SUMMARY

### **Effects of alpha lipoic acid on spinal cord injury induced changes in the rat urinary bladder**

**Objective:** Alpha lipoic acid (LA) was shown to exert neuroprotection in spinal cord tissue following experimental trauma. Urinary bladder complaints are frequent in patients with spinal cord injury. Thus, the protective effects of LA on biochemical and histological changes in bladder as well as functional studies were assessed.

**Methods:** Wistar albino rats were divided as control, spinal cord injury (SCI), and LA (50 mg/kg/day, ip) treated SCI groups (SCI+ LA). The standard weight-drop (100 g/cm force at T10) method was used to induce a moderately severe SCI. One week after the injury, neurological examination was performed and the rats were decapitated. Bladder samples were taken for histological examination, functional (isolated organ bath) studies and for the measurement of biochemical parameters malondialdehyde (MDA), glutathione (GSH), nerve growth factor (NGF), caspase-3, luminol and lucigenin chemiluminescences.

**Results:** SCI caused a significant ( $p < 0.001$ ) increase in the detrusor muscle thickness. It increased the contractility responses to carbachol and relaxation responses to papaverine ( $p < 0.05-0.001$ ). There were also significant alterations in MDA, caspase-3, luminol and lucigenin chemiluminescences with concomittant decreases in NGF and GSH ( $p < 0.05$ ). Although LA treatment improved biochemical, histological and functional (contractility and relaxation responses) changes ( $p < 0.05-0.001$ ), it failed to lead to a significant recovery in the neurological function.

**Conclusion:** These results may indicate that LA may have a role in regulation of the bladder tonus via its antioxidant and anti-inflammatory actions.

**Keywords:** Lipoic acid, spinal cord injury, trauma, bladder, NGF, caspase 3

### 3. GİRİŞ VE AMAÇ

Omurilik hasarının patofizyolojisi; başlangıçta oluşan birincil hasar ve onu takip eden; biyokimyasal, moleküler ve hücrel değişiklikleri de içinde barındıran ikincil hasar ile karakterizedir (10, 77). Bu ikincil olaylar; mikrovasküler iskemi, oksidatif stres, ekzitotoksisite, iyon düzensizlikleri ve inflamasyona bağlı olarak ortaya çıkar. Lipid peroksidasyonunun mikrovasküler hasarı tetiklemek suretiyle omurilik hasarından sonra dokularda ikincil bir iskemik hasara neden olduğu belirtilmektedir. Ayrıca inflamasyonun, reaktif oksijen türevlerinin aşırı üretimi ile yakından ilişkili olduğu ve çeşitli nöropatolojilerde de önemli rol oynadığı gösterilmiştir (77).

Lipoik asit (tiyotik asit; 6,8-dimerkapto oktanoik asit; LA) insanda 8 karbonlu yağ asitleri (oktanoik asit)'nden lipoil sentaz enzimiyle sentezlenen doğal bir bileşiktir (45). LA diyetle en çok sığır ve domuz etinden alınır. Diyetle alındığında barsaklardan hızla emildikten sonra, başta karaciğer olmak üzere çeşitli dokularda dihidrolipoik asit (DHHLA)'e indirgenerek metabolize olur ve idrarla atılır (21). LA kolaylıkla kan beyin bariyerini geçebilmektedir. LA ve onun vücutta indirgenmiş formu olan Dihidrolipoik Asit (DHHLA) hidrofilik ve lipofilik ortamlarda antioksidan olarak bulunabilmektedirler (92). Antioksidan etkileri in vitro ve in vivo çalışmalarda gösterilmiştir; hidroksil radikalini ve hipoklorik asidi süpürür; ancak, süperoksit ve peroksil radikale pek etkili değildir (65). DHHLA ise GSH' dan daha güçlü bir redüktandır; hipoklorik asit, peroksil ve hidroksil radikallerini süpürerek lipid peroksidasyonunu önler. Hem LA hem de DHHLA, hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ve oksijen radikale etki eder. Ayrıca metallerle şelasyon yapma yetenekleri vardır. Orta düzeyde bir antioksidan olarak kabul edilen LA ve en iyi antioksidan olarak kabul edilen DHHLA, Mn<sup>+2</sup>, Cu<sup>+2</sup>, Zn<sup>+2</sup> ve Pb<sup>+2</sup> gibi geçiş metallerle kararlı bileşikler oluşturarak biyolojik sistemlerdeki ağır metalleri de ortamdan uzaklaştırırlar (92, 73). LA' nın kendi antioksidan etkilerinin yanısıra diğer antioksidanları yenileyici ve hücreiçi düzeylerini artırıcı etkileri de vardır (20, 14).

Lipoik asitin farklı deneysel modellerde nöroprotektif etkileri gösterilmiştir (75, 1, 62, 60, 31, 35). LA son zamanlarda antioksidan ve nöroprotektif etkileriyle dikkatleri üzerine çekmektedir (72, 81).

Bu çalışmanın amacı sıçanlarda OH' na bağlı olarak gelişen ürogenital sistemdeki fonksiyon bozukluklarına karşı LA' in olası etkilerinin araştırılmasıdır.

## 4. GENEL BİLGİLER

### 4.1. Miksiyonun Nöronal Kontrolü

Vücutta idrarın depolanması ve periyodik eliminasyonu; alt üriner sistem bileşenlerinden mesane, üretra ve üretral sfinkterde yer alan çizgili ve düz kasların koordineli çalışması sonucu gerçekleşir. Bu organlar arasındaki koordinasyon, beyin ve omurilikte yer alan kompleks nöronal iletim sayesinde gerçekleşir. Miksiyon nöronal sistemin gelişmesiyle paralel olarak öğrenilen ve isteğimiz dahilinde kontrol edilebilen bir fonksiyondur. Mesanenin işlevini düzenleyen bu mekanizmanın kompleksliği, aynı zamanda çeşitli hasarlara ve hastalıklara karşı da son derece hassastır. Alt üriner sistem üzerindeki istemli kontrol, somatik ve otonomik efferent yollar ile sağlanmaktadır. Sempatik innervasyon omurilikte trakeolumbar bölgeden başlarken; parasempatik ve somatik innervasyon sakral bölgeden başlamaktadır (69, 36).

Sempatik postgangliyonik nöronlardan hipogastrik nöron tarafından salgılanan noradrenalin, detrusor kasındaki  $\beta$  adrenerjik inhibitör reseptörleri aktive ederek mesanenin gevşemesine neden olur. Parasempatik postgangliyonik nöronlar ise hem kolinerjik (Asetilkolin) hem de non adrenerjik non kolinerjik transmitterler salgırlar. Kolinerjik ileti mesanedeki temel eksitatör mekanizmadır. Bu sayede detrusor kasılması gerçekleşir (25, 6). Detrusor kasındaki P2X purinerjik reseptörler üzerindeki nonkolinerjik eksitatör ileti ATP aracılığıyla gerçekleşmektedir (19). Üretral düz kaslar üzerindeki inhibitör etki parasempatik nöronlarca salıverilen nitrik oksit (NO) aracılığıyla olmaktadır (6). Mesane doluluğu ile ilgili his, pelvik ve hipogastrik nöronlar tarafından omuriliğe iletilmektedir (69, 48).

#### **4.1.1. Miksiyonda merkezi sinir sistemi yolaklarının rolü**

Miksiyonun gerçekleşmesi için sempatik, parasempatik ve somatik sistemlerin beyin ve omurilikteki uzantıları arasında etkileşimler gerekmektedir. Parasempatik ve sempatik pregangliyonik nöronlar (PGN) sırasıyla, omuriliğin sakral ve lomber bölgelerinde bulunmaktadır (66). Omuriliğin lumbosakral kısmındaki internöronların bir kısmı beyine uzun projeksiyonlar gönderirken, diğerleri omurilikte daha bölgesel bağlantılar yapıp segmentel spinal reflekslerde görev alırlar (8).

Mesaneden çıkan afferent nöronlar omuriliğin internöron ve parasempatik PGN dendritlerinin olduğu bölgelere projeksiyon yaparlar (67, 89). Üretra ve üretral sfinkterden gelen pudental afferent yolaklar da benzer yolu izlerler (94, 27). Pontin miksiyon merkezindeki (PMC) nöronlar spesifik olarak miksiyonla ilgilidir (97, 89). Omurilikteki internöronlar beyindeki periaqueductal gri madde (PAG) ye projeksiyon yapmaktadırlar. PMC deki nöronlar PAG' den uyarı almaktadır ve aksonlarını omurilikteki parasempatik çekirdeğe geri göndermektedirler (47).

#### **4.2. Mesanenin Dolum ve Boşaltımının Düzenlenmesi**

Mesanenin dolumu ile ilgili refleksler temel olarak omurilikte düzenlenirken; boşaltımı ile ilgili refleksler beyinde organize edilmektedir (29, 30).

##### **4.2.1. Mesanenin dolumu ve sakınma refleksi**

Mesanenin dolumu esnasında istem dışı boşaltımı engellemek için; detrusorun parasempatik innervasyonu inhibe edilirken, üretral sfinkterin düz ve çizgili yapıları aktive edilmektedir. Bu işleyiş sakınma refleksi olarak adlandırılmaktadır. Mesaneden gelen afferent uyarı spinal internöronlar aracılığı ile lateral PAG' e ve buradan merkezi PAG' e gelir ve burada eksitator bir uyarı oluşturulup PMC ' a gönderilir. Bu işleyiş bize sinyal oluşumunun PAG' de gerçekleştiğini göstermektedir (47). Mesane dolumu esnasında, PMC nöronlarından



oluşan parasempatik efferent yolak engellenmektedir (26, 84). Mesanenin doluluk oranı ile ilgili bilginin kaydı ve boşaltım refleksinin düzenlenmesinde PAG kilit rol oynamaktadır. PMC' ne gelen primer uyarıyı da PAG kontrol etmektedir. Beyindeki daha üst merkezler mesanenin dolumu esnasında PMC' nin uyarılmasını engellerler; böylece boşaltımı engellemiş olurlar. Miksiyon bilinçli olarak kararlaştırıldığında, bu merkezler PMC' nin uyarılmasına izin verirler ve boşaltım gerçekleşir (51, 23). Fonksiyonel görüntüleme çalışmaları frontal lobun, miksiyonun uygunluğuna karar vermede önemli bir rol oynadığını göstermektedir. Prefrontal korteksin de miksiyonla ilgili bilinçli davranışların oluşturulmasında önemli rol oynadığı gözlenmektedir (76). Prefrontal korteksin PAG ile güçlü bağları bulunmaktadır ve sosyal olarak uygun olmadığı sürece boşaltımın baskılanmasından sorumlu olduğu düşünülmektedir.

#### **4.2.2. Mesanenin boşalması**

PMC' nden geçen spinobulbospinal yolak refleks miksiyona aracılık etmektedir (18, 28, 11). PMC' nin uyarılması üretral gevşemeye neden olan yolağın aktivasyonuna ve bir kaç saniye sonra da sakral parasempatik çıkışa neden olur. Bu durum mesanenin kasılmasına, intravezikal basınçta artışa ve sonuç olarak idrar çıkışına neden olur. NO salımını tetikleyen üretranın parasempatik yolağının aktivasyonu üretral düz kas gevşemesine aracılık etmektedir. PMC' ndeki çoğu nöron popülasyonu mesane aktivasyonu ile bağlantılı faaliyet göstermektedir (26).

#### **4.3. Omurilik Hasarı Oluşum Mekanizmaları ve Epidemiyoloji**

Omurilik hasarı, fiziksel ve duygusal travmaya sebep olan, yaşam boyu sürebilen ve uzun dönemde yaşam kalitesini ciddi düzeyde bozan, mortalite oranı yüksek önemli bir hasardır (98). Dünya genelinde 2.5 milyon kişi OH ile yaşamlarını devam ettirmekte ve bu sayıya yılda yaklaşık 130.000 yeni vaka eklenmektedir (71). Travma esnasında ya da kaza sonrası hastanede hemen gerçekleşen ölüm yüzdesi %48-79 dur. OH sonrası yine dünya genelinde yaşama insidansı milyonda 15-40 vaka olup bu rakam gelişmiş ülkelerde daha fazladır (milyonda 53,4) (85).

Travmatik omurilik hasarlarının çoğu kırık dislokasyonuna bağlı omurilik kompresyonu nedeniyle oluşur. Ayrıca akut omurilik gerilmesi, ivmelenmeyle yırtılma ve delici yaralanmalar sonucu kesilme de hasara neden olan diğer mekanizmalardır. Son klinik verilere göre OH'nda tipik travmalara ilaveten (motorlu araç kazaları, iş kazaları, şiddet, eğlence aktiviteleri, çatışmalar) travmatik olmayan hasarlar da etyopatogenik olarak dikkat çekmektedir. OH'nın %30-50 kadarı travmatik olmayan lezyonlara bağlıdır. Sıklıkla rastlanan non-travmatik OH vertebral stenoz (54%), omurilik tümörleri (%26) başta olmak üzere vasküler, inflamatuvar, dejeneratif, genetik ve metabolik hastalıklara bağlı olanlar olarak sayılabilir (64, 40).

#### **4.3.1. Omurilik hasarında patofizyoloji**

Travmatik OH endojen veya eksojen travmaların bir sonucu olabilir. Neden ne olursa olsun hasarın patolojisi primer ve sekonder hasar mekanizmaları ile açıklanmaktadır (71, 41). Primer hasar mekanik travmaya bağlıdır ve nöral dokuların fokal harabiyetini kapsar. Bu başlangıç olay daha sonra hasarı ilerleten bir dizi biyokimyasal, moleküler ve hücreyel olayları tetikler; sekonder hasarın altında yatan bu olaylar; iskemi, nörojenik şok, hemoraji, mikrosirkülatur bozukluk, vasospazm, tromboz, hücre içi sodyum ve kalsiyum artışı, ekstrasellüler potasyum artışı gibi iyon dengelerinde bozulma, serotonin ve katekolamin gibi nörotransmitterlerin birikimi, ekstrasellüler glutamat artışı, araşidonik asit salıverilmesinde artış, eikozanoid ve serbest radikal artışı, inflamasyon, lipidlerin peroksidasyonu, ATP kaybı ve apoptoz ile karakterizedir (77).

Primer hasarın sorumlusu olan mekanik etki ile arteriyoller, venüller ve kapillerlerdeki vasküler hasar omurilik dokusuna kan akımını kısıtlamaktadır (103). Bunu takiben gelişen sekonder vasospazm, tromboz, nörojenik şok ise hipotansiyon, bradikardi, periferik rezistans ve kardiyak debiyi azaltmak suretiyle doku iskemisini daha da artırır (54). İskemi nedeniyle hücreyel düzeyde oksidatif fosforilasyon ve glukoz yolağı bozulur, enerji yetersizliği, ATP depolarının boşalması ile anaerobik solunum başlar, nekrotik mekanizmalar uyarılır, membran permeabilitesi artar, lizozomal enzimlerin ve Ca-bağımlı parçalayıcı enzimlerin (proteaz, fosfolipaz,

ATPaz, endonükleaz gibi) salıverilmesi ile nükleus ve sitoskeletal yapı bozulur (93, 22). OH'nı takip eden ilk birkaç gün içinde omurilik dokusunun reperfüzyonu hasarın boyutlarını artırır. Reperfüzyon döneminde ksantin oksidazın moleküler oksijene elektron transferi ile reaktif oksijen türevleri (ROT) oluşur. Gerek reperfüzyon kaynaklı gerek nötrofil ve nekrotik hücre kaynaklı ROT hücre ölümünün en önemli nedenlerindedir (43, 80). Hücre membranları ROT' ne çok duyarlıdır ve lipid-radikal etkileşimi ile gerçekleşen lipid peroksidasyonu günümüzde membran hasarının göstergesi olarak kullanılan bir parametredir. ROT saldırısından etkilenen diğer yapı taşları da proteinler ve nükleik asitlerdir. Oksidatif hasarın göstergeleri olarak kullanılan protein karbonilasyonu ve DNA oksidasyonunun OH' nda omurilik dokusunda arttığı gösterilmiştir (104).

Apoptoz omurilik yaralanmasında sekonder hasarın önemli mediyatörlerindedir ve etkisini 2 fazda gösterir; apoptozun başlangıç fazda, çeşitli hücrelerde hem inflamasyon hem de hücre membran harabiyeti nedeniyle oluşan nekroz vardır, ancak sonraki fazda görülen hücre ölümü inflamasyondan ziyade programlanmış bir yolak içinde gerçekleşir ve esas olarak beyaz cevheri etkiler, oligodendrit ve mikroglia en çok hasar görür. Apoptozun en belirleyici moleküler göstergesi kaspaz aktivasyonudur. Hasarın başlangıcından sonra günler ya da aylar sürebilir. Apoptozise uğrayan hücre, inflamatuvar reaksiyon olmaksızın proteazlarla kendi kendini sindirip fagositozla ortadan kaldırılır (58). Özetle; apoptotik uyarı (iskemi, oksidatif etki, eksitotoksik enzimler) hücre çekirdeğinde büzülme ve küçülmeye, DNA parçalanmasına, parçaların proteazlar ve fagositler tarafından ortadan kaldırılması şeklinde gerçekleşir.

#### **4.3.2. Omurilik hasarında ürolojik komplikasyonlar**

Omurilik hasarı ürogenital sistemi de etkileyen kalıcı duyuusal ve motor kayıplara neden olur (83). Bu kayıplarda yukarıda belirtilen mekanizmalar aracılığı ile gerek nöral dokuların gerekse çeşitli organ sistemlerinde dokuların harabiyeti yanısıra ürogenital sistemde görülen patoloji, supraspinal girişlerin ve omuriliğe afferent iletilerin kesilmesi ve intraspinal şebekenin reorganizasyonuna bağlıdır.

Fonksiyonel olarak ortaya çıkan detrusor-sfinkter dissinerjisi (DSD), hiperrefleksi ve otonomik disrefleks yaşamı tehdit eden olaylardır (46).

Omurilik hasarı mesanede yapısal, fizyolojik ve moleküler değişimlere neden olur (2). Mesane duvarı üroepitel tabakası ile kaplıdır. Üroepitel doku mesane mukozasını örten çok hücreli bir tabakadır. Bu tabaka sayesinde idrar ve komponentlerinin kan akımına ve mukozaya girişı engellenir. Üroepitel içinde özelleşmiş, şemsiye şeklindeki hücreler lümeneye bakar şekilde dizilmiş olup bariyerin regulasyonunu sağlar. Bu hücreler okludin ve klaudin gibi sıkı bağlantı proteinleri aracılığıyla bir ağ yapı oluştururlar (2). Bu sıkı bağlantı proteinleri sayesinde bariyerde yüksek transepitelial rezistans ve suya, idrara ve idrardaki çözünür maddelere karşı düşük bir permeabilite vardır (17). OH' nın başlıca üriner komplikasyonu olan nörojenik mesane işlev bozukluğu (NMİB) alt üriner sistem fonksiyonlarını kontrol eden nöral yolların veya nöromüsküler kavşakların hasarına bağlıdır.

#### **4.3.3. Omurilik hasarı ile ilişkili nmib**

Omurilik hasarı mesanenin 2 önemli işlevini bozar; depolama ve boşaltım. Bilindiği gibi mesane serebral korteks, pontin ve sakral işeme merkezleri ve periferik sinir sistemi ile koordine bir şekilde çalışan kompleks bir kontrole sahiptir. OH' nda mesane ve sfinkterin motor kontrolünde olduğu gibi mesanenin dolun hissi de bozulmuştur. Omurilik lezyonunun zamanı, yeri ve yaygınlığına bağlı olarak çeşitli problemler ortaya çıkar.

NMİB, mesanenin dolun fazında artmış veya azalmış mesane hissiyatı, mesane uyumunun azalması, yüksek kapasiteli mesane, detrusor aşırı aktivitesi, üretral kapanma mekanizmalarının yetersizliği, boşaltım fazında ise akontraktıl detrusor, detrusor aktivitesinin azalması, mesane çıkım obstruksiyonu, DSD, üretral sfinkter gevşeme bozukluğuna bağlı obstruksiyon ile karakterizedir (83). NMİB' nda mesanenin afferent nöronları morfolojik ve fizyolojik bir takım değişikliğe

uğramaktadırlar. Bu nöroplastisiteye omurilikte ya da mesanede salınan NGF aracılık etmektedir. OH' ndan sonra mesanede NGF oluşumu artmaktadır. (99, 86).

#### **4.4. Alfa Lipoik Asitin Antioksidan ve Antiinflamatuvar Etkileri**

Lipoik asit (tiyotik asit; 6,8-dimerkapto oktanoik asit; LA) insanda 8 karbonlu yağ asitleri (oktanoik asit)'nden lipoil sentaz enzimiyle sentezlenen doğal bir bileşiktir. Ayrıca metiyonin ve sistein aminoasitlerinden “de novo” sentezlenebilir (45). Yapısında asimetrik karbon atomu içerdiğinden LA' in iki optik izomeri bulunur. Endojen olarak vücutta sentezlenen formu R izomeridir.

Lipoik asit (tiyotik asit; 6,8-dimerkapto oktanoik asit; LA) diyetle en çok sığır ve domuz etinden alınır. Diyetle alındığında barsaklardan hızla emildikten sonra, başta karaciğer olmak üzere çeşitli dokularda DHLA' e indirgenerek metabolize olur ve idrarla atılır (21). Mitokondride bulunan LA' in DHLA' e indirgenmesinde nikotinamid adenin dinükleotid (NADH) veya nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH)'ın yanısıra dihidrolipoil dehidrojenaz ve GSH redüktaz etkinliği de önemlidir. LA ve indirgenmiş şekli olan DHLA her molekülünde iki tiyol grubu içerir.

LA hem hidrofilik hem de lipofilik ortamda etkinlik gösterebilir (50). Antioksidan etkileri in vitro ve in vivo çalışmalarda gösterilmiştir; hidroksil radikalini ve hipoklorik asidi süpürür; ancak, süperoksit ve peroksil radikaline pek etkili değildir (65). DHLA ise GSH' dan daha güçlü bir redüktandır; hipoklorik asit, peroksil ve hidroksil radikallerini süpürerek lipid peroksidasyonunu önler. Hem LA hem de DHLA, hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ve oksijen radikaline de etki eder. Ayrıca metallere şelasyon yapma yetenekleri vardır. Orta düzeyde bir antioksidan olarak kabul edilen LA ve en iyi antioksidan olarak kabul edilen DHLA,  $Mn^{+2}$ ,  $Cu^{+2}$ ,  $Zn^{+2}$  ve  $Pb^{+2}$  gibi geçiş metallere kararlı bileşikler oluşturarak biyolojik sistemlerdeki ağır metalleri de ortamdan uzaklaştırırlar (92, 73). LA' in kendi antioksidan etkilerinin

yanısıra diğerk antioksidanları yenileyici ve hücreiçi düzeylerini artırıcı etkileri de vardır (20, 14). DHLA, C ve E vitamini, GSH ve koenzim Q10 (ubikinon) gibi iyi bilinen bazı antioksidanları, radikal veya okside formlarını indirgeyerek yenileyebilir (81). Ayrıca LA spesifik proteinlere kovalent olarak bağlanır ve kofaktör olarak görev yapar. Böylece enerji metabolizmasında asli bir rol oynar. Piruvatın asetil koenzim A (koA)' ya dönüşümünü katalize eden piruvat dehidrogenaz, süksinil koA oluşumunu katalize eden alfa-ketoglutarat dehidrogenaz ve nükleik asit sentezinde görev yapan glisin dekarboksilaz gibi enzimlerde açıl gruplarını bağlar ve onları enzim kompleksinin bir yerinden diğerk bir yerine transfer eder.

Bu etkilerinin yanı sıra LA' in sinyal transdüksiyon yollarında modülatör etkileri de vardır. Glukoz taşıyıcılarından GLUT4' ün hücre zarına translokasyonunu artırıp yağ ve kas hücrelerine glukoz girişini sağlayarak kan şekerini düşürür (15). LA' in ayrıca protein kinaz B (PKB) bağımlı sinyal yolağını aktive ederek nöronların sağkalımını artırdığı gösterilmiştir (105). Bu yolak üzerinden NO aracılı gevşeme de yapmaktadır (56). Peroksizom proliferatör aktive edici reseptör (PPAR)' lerin  $\alpha$  ve  $\gamma$  izoformlarını konsantrasyona bağımlı olarak aktive ettiği gösterilmiştir (63). Ayrıca nükleer faktör kappa B (NF-KB) gibi redoksa duyarlı transkripsiyon faktörlerini de regüle ederek inflamasyonu baskılar (74).

Lipoik asit (tiyoktik asit; 6,8-dimerkapto oktanoik asit; LA) klinikte diyabetik nöropati için endikasyon almış olmakla birlikte LA takviyesi insanlarda çeşitli hastalıklarda da denenmektedir (34, 16). Bunlar arasında diyabette kan şekerinin düşürülmesi, damar hastalıkları, metabolik sendrom, multipl skleroz, Alzheimer, demans sayılabilir (1, 78, 60, 82). Hayvan deneylerinde ise iskemi-reperfüzyon hasarı, katarakt oluşumu, nörodejenerasyon, yaşlanma, kolit, radyasyon hasarı ve çeşitli ilaç (adriamisin, siklofosfamid, siklosporin A) toksisitelerine karşı yararlı olduğu gösterilmiştir (38, 61, 62, 75, 79, 87, 5).

#### 4.4.1. Nöro travma modellerinde patofizyoloji

Sinir sisteminde nöronal hasar oluşturan deneysel travma modellerinde (travmatik beyin hasarı, TBH; OH) hasar sonucunda ortaya çıkan yaralanmaya bağlı olarak gelişen ikincil mekanizmalar da patofizyolojiye katkıda bulunur (10, 52, 101, 39). Subaraknoid kanama (SAK) modelinde ise doğrudan bir fiziksel hasar olmamakla birlikte, vazospazm ve iskemiye bağlı sekonder hasar sözkonusudur (32, 55, 9). Kafa ve omurilik travması da iskemi reperfüzyon hasarı ile benzerlikler gösteren karmaşık bir immünolojik - inflamatuvar doku yanıtına neden olur. Her üç deneysel nörotravma modelinin ortak yönü serbest radikal oluşumunun artmasına bağlı olarak oksidatif hasar oluşturmalarıdır (57, 59). Yaralanmadan sonra saatler içinde dokuda tümör nekroz faktör alfa (TNF- $\alpha$ ), interlökin (IL)-1 $\beta$  ve IL-6 gibi proinflamatuvar sitokinlerin miktarı artar. Bu sitokinlerin miktarının artmasının yanı sıra, eksitotoksititeye neden olabilen mediyatörler (özellikle glutamat) ve NO de fazla miktarlarda salıverilir (95, 70). Ekstrasellüler glutamat miktarındaki artış nöronları ve astrositleri etkileyerek, iyonotropik ve metabotropik glutamat reseptörlerinin aşırı uyarılmasına, ardından da Ca<sup>+2</sup> akımlarına neden olur (77). Erken dönemde Na<sup>+</sup> /K<sup>+</sup> - ATPaz pompası ile bu iyonik gradiyent kompanse edilmeye çalışılır; ancak daha sonra pompanın işlevi azalır. Katabolik süreçlerin tetiklenmesiyle ilişkili olarak metabolik yetersizlik de baş gösterir (91).

Aktive polimorfonükleer lökositler, adezyon moleküllerinin aracılığı ile hem hasarlı hem de sağlam endotel hücre tabakalarına yapışır. Endotel işlev bozukluğu, vazokonstriktörlerin salıverilmesi, lökosit ve trombosit adezyonu ile mikrovasküler yapının daralması, kan beyin engeli (KBE)' nin geçirgenliğindeki artış ve ödem oluşumu doku perfüzyonunu daha da bozar (37, 68). Bu süreçte açığa çıkan ROT (süperoksidler, hidrojen peroksit) ve reaktif nitrojen türevlerinin (NO ve peroksinitrit gibi) aşırı oluşumu nedeniyle endojen antioksidan enzimlerinin (süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz ve katalaz) sürdürdüğü savunma yetersiz kalır. ROT hücresel ve vasküler yapıların peroksidasyonunu, protein oksidasyonunu, DNA parçalanmasını ve mitokondriyal elektron transport zincirinin inhibisyonunu indükler

(88). Bu mekanizmalar doğrudan veya oksidatif stres ile ilişkili inflamatuvar süreçleri tetikler; apoptotik yollar etkinleşir (7).

Nörotravmalarda farmakolojik tedavi olarak antiinflamatuvarlar, glutamat antagonistleri, katyon homeostazı modölatörleri, endokanabinoidler, serbest radikal süpürücüleri, immünsupresanlar, apoptoz ve özellikle kaspaz inhibitörleri, nörotropik faktörler gibi değişik özellikteki ajanların kullanılması gündeme gelmiştir (42). LA' in farklı deneysel modellerde nöroprotektif etkileri gösterilmiştir (75, 1, 62, 60, 31, 35).



## 5. GEREÇ VE YÖNTEM

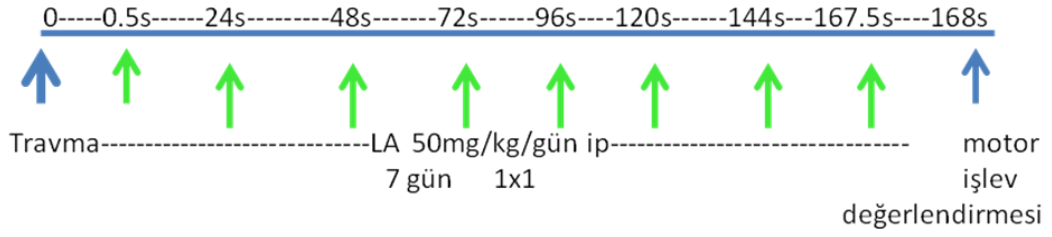
### 5.1. Deney Hayvanları

Deneyleerde 300-350g ağırlığında erkek Wistar albino sıçanlar kullanıldı. Hayvanlar 12:12 saat aydınlık/karanlık siklusuna uyularak,  $22 \pm 3$  °C sıcaklıkta ve % 65-70 nem içeren bir ortamda plastik kafeslerde barındırıldı. Standart laboratuvar yemi ile beslenmişler ve su alımları serbest bırakıldı. Hayvanlar “Laboratuvar Hayvanlarının Bakım ve Kullanım İlkeleri”ne uygun koşullarda barındırıldı ve deneyler için etik kurul izni (26.03.2010-36.2010.MAR) alındı. Çalışmalar Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalının laboratuvarlarında yapıldı.

### 5.2. Deney Grupları

Her grupta 8 sıçan olmak üzere toplam 3 deneysel grup vardır. Her deneysel gruptan 3 seri yapıldı. 1. Seride biyokimyasal analizler, 2. Seride izole organ çalışmaları, 3. Seride ise histolojik incelemeler yapıldı.

1. **Kontrol (K) grubu** : Sham operasyon yapıp kapatıldı ve LA' in taşıyıcısı olan 1 ml. salin içinde 1% alkol intraperitonel olarak uygulandı.
2. **Omurilik hasarı (OH) grubu** : Omurilik hasarı oluşturmak için operasyon geçiren ve taşıyıcı ( 1 ml. salin içinde 1% alkol ) ip. uygulanan grup.
3. **Omurilik hasarı ve Alfa Lipoik Asit (OH + LA) grubu** : Omurilik hasarı oluşturmak için operasyon geçiren ve 7 gün süreyle LA 50 mg / kg. ip. uygulanan grup.



**Şekil I.** 7 günlük deney süreci

### **5.3. Omurilik Hasarının (OH) Oluşturulması**

100 mg/kg. ip. ketamin ve 1 mg./kg. ip. klorpromazin anestezisi uygulanacak sıçanlar ısı kontrollü bir düzlem üzerine yüzü koyun yatar pozisyona getirildi. T5 ve T12 omurları arasında kesik oluşturuldu. Paravertebral kaslar ayrıştırıldı ve OH oluşturmak için ağırlık düşürme modeli uygulandı (4). Bu yöntemde 10 cm mesafeden 10 g. ağırlığında 3 mm. çapında bir paslanmaz çelik düşürülerek omurgaya kuvvet uygulandı ve kesik tekrar dikildi. OH oluşturulduktan 1 hafta sonra sıçanlardan kan alındı, dekapite edildi ve mesane dokuları çıkarıldı.



**Resim I.** Sıçanda T5- 12 düzeyinin ortaya çıkarılması.



**Resim II.** 10 cm. yükseklikten 10 gr. ağırlığında paslanmaz çelik silindir düşürülmesi.



**Resim III.** Kontrol grubuna ait normal çalışan mesane.



**Resim IV.** Omurilik hasarı olan sıçanların mesanesi



#### 5.4. Motor İşlev Değerlendirmesi

Motor işlev skoru Gale ve arkadaşlarının (1985) yöntemine göre değerlendirildi. Ölçekleme şu şekildedir. 0: Arka ayaklarda hiç hareket yok; 1: hissedilebilir hareket, 2: gözle görülür eklem hareketi; 3: hareket var ama vücudu taşıyamıyor; 4: hareket var ve vücudu taşıyabiliyor; 5: hafif aksayarak yürüyor; 6: normal yürüyor.



**Resim V.** Omurilik hasarı olan sıçanlarda parapleji

## 5.5. İzole Organ Banyosu Deneyleri

Mesaneden hazırlanan stripler 37°C'deki organ banyosunda oksijenlenmiş Krebs çözeltisi içine koyularak 1 g gerim verilerek asıldı. Daha sonra kümülatif olarak  $3 \times 10^{-8}$  -  $10^{-3}$  M-karbakol ile kasıldı. İzometrik kasılma ve gevşeme yanıtları poligrafa bağlı bir transduser aracılığıyla kaydedildi.

### 5.5.1. İzole organ banyosunda mesane kasılma-gevşeme yanıtları ölçümü

Çalışmamızda her bir Wistar albino sıçandan hazırlanan birer mesane stribi dörtkanallı 20 ml'lik izole organ banyomuzun sırasıyla 1, 2, 3 ve 4 no'lu kanallarına asıldı. 37°C'ye kadar ısıtılmış ve sürekli olarak %95 O<sub>2</sub> - %5 CO<sub>2</sub> ile gazlandırılan organ banyosunun içindeki mesane preparatlarına 500–1000 miligramlık 'lık gerilim uygulandı ve 40 dakika dinlenmeye bırakıldı. Bu süre sonunda sırasıyla mesane striplerinin bulunduğu banyolardaki KREBS çözeltisi bosaltılarak 20'er ml 124 mM'lık KCl eklendi ve maksimum kasılma trasesi gözlemlendikten sonra banyolar 3'er kez yıkandı. Bu işlem ardından 30 dakikalık dinlenime bırakılan mesane stripleri süreç sonunda maksimum doz elde edilene kadar kümülatif olarak karbakol ( $3 \times 10^{-8}$  –  $10^{-4}$ ) kasılmalarına tabi tutuldu ve maksimum düz kas kasılma cevabının elde edildiği dozun % 80 - 87' si submaksimal yanıt olarak kaydedildi. Bu seri kasılmalardan sonra karbakollü banyolar KREBS ile en az 3 defa yıkanarak stripler 30 dakika dinlenmeye bırakıldı. Ayrıca banyo içindeki krebs solüsyonu dinlenme boyunca 15 dakika arayla tazelendi. Daha sonra stripler bu önceden belirlenmiş konsantrasyonda (submaksimal elde edilen doz) tek doz submaksimal karbakol ile kasıldı. Ön kasılmayı takiben endotele bağımlı gevşeme cevaplarını oluşturmak üzere kümülatif izoproterenol ( $10^{-10}$  -  $10^{-4}$ ) uygulandı. Benzer şekilde dokuların 100 µg papaverine verdiği gevşeme yanıtları da alındı.



**Resim VI.** Organ banyosu deney düzeneği

## **5.6. Biyokimyasal İncelemeler**

### **5.6.1. İndirgenmiş glutatyon (GSH)**

Dokuda GSH tayini Ellman (1963) yöntemine göre yapıldı. GSH tayininde MDA tayini için hazırlanan % 10'luk homojenatlar kullanıldı.

#### **5.6.1.2. Gerekli Çözeltiler**

**0,3M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Disodyum hidrojen fosfat, Carlo Erba 480137)**

**10mM DTNB (Ditiyo nitro benzen, Ellman, Sigma D8130)**

39.63 mg DTNB % 1'lik sodyum sitrat ile 10 ml'ye tamamlandı.

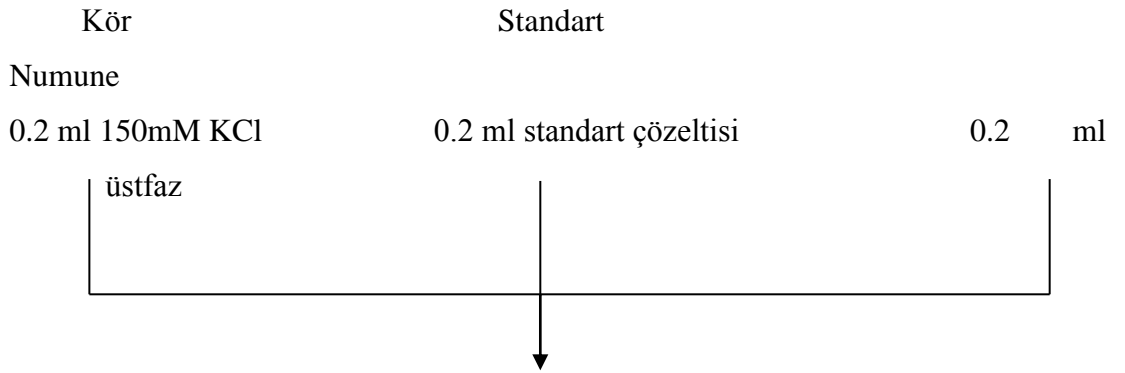
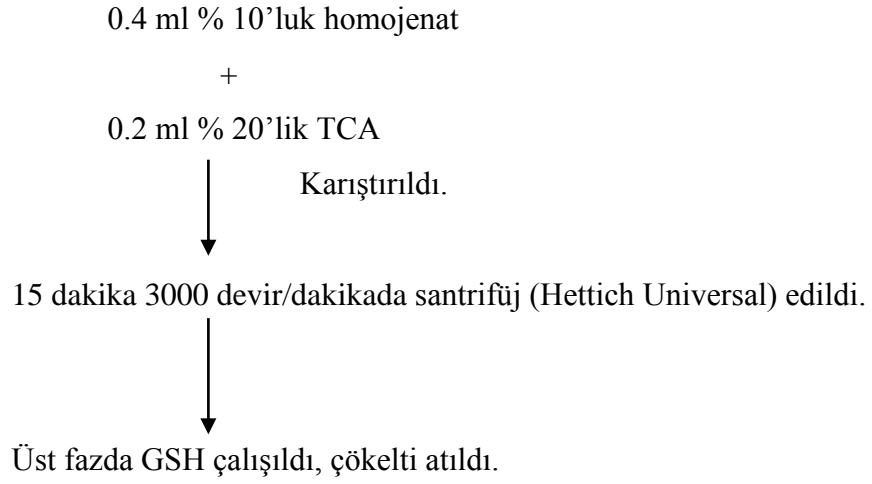
**% 20'lik TCA çözeltisi**

Trikloro asetik asit (Carlo Erba 411525)

## Standart glutasyon çözeltisi

50 mg glutasyon (Sigma G4251) distile suda çözüldü, 5 ml'ye tamamlandı. Bu stoktan farklı seyreltmeler yapılarak standart çözelti hazırlandı.

### Deneyin Yapılışı:



1 ml 0.3 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + 0.05 ml Ellman çözeltisi ilave edilerek karıştırıldı, 5 dakika bekletildi ve oluşan rengin absorbansı spektrofotometrede 412 nm.de okundu.

**Şekil II.** GSH tayini için kullanılan deney prosedürü.



## **5.6.2. Malondealdehit (MDA)**

Lipid peroksidasyonunun göstergesi olarak mesane dokularında MDA miktarı Beuge yöntemine göre tayin edilmiştir (13). Dekapitasyondan hemen sonra çıkarılan mesane dokuları serum fizyolojik ile yıkandıktan sonra filtre kağıdı ile kurutuldu, tartıldı. Ika Werk homojenizatöründe buz üstünde 150 mM KCl çözeltisiyle %10'luk homojenatı hazırlandı.

### **5.6.2.1. Gerekli çözeltiler**

#### **TBA (2-Tiyobarbitürik asit, Sigma T5500 ) çözeltisi**

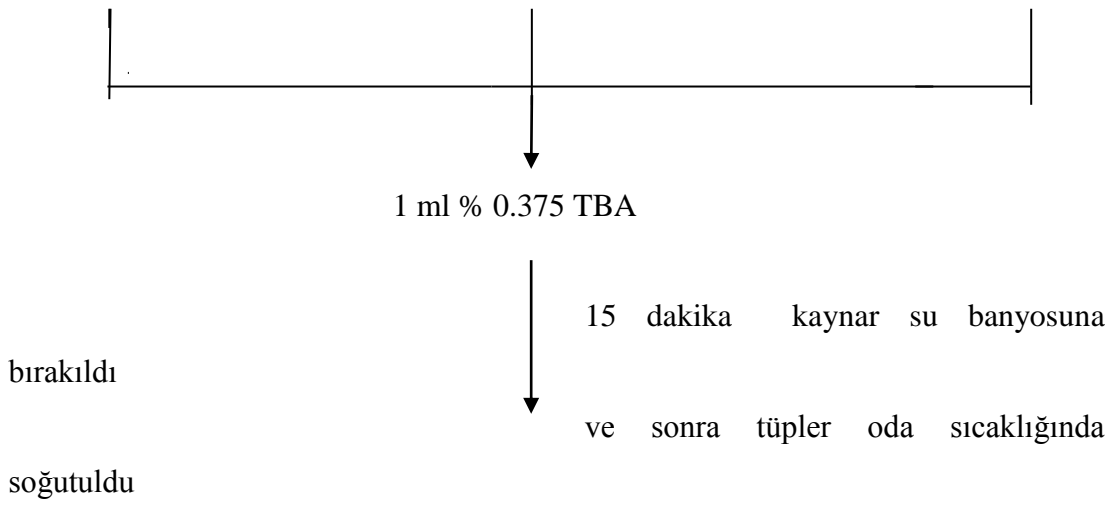
% 0.375 g TBA ve % 15'lik TCA (Trikloroasetik asit) içeren çözelti, 0.25N HCl (Hidroklorik asit) ile hazırlandı.

#### **Standart Çözeltisi**

1,1,3,3 tetraetoksipropan (malonaldehid bis [dietyl asetal], Sigma T9889)'ın 10 mM'lık stok çözeltisinden farklı seyreltmeler yapılarak standart çözelti hazırlandı.

### Deneyin Yapılışı:

Kör	Standart	Numune
0.5 ml 150 mM KCl homojenat	0.5 ml standart çözeltisi	0.5 ml böbrek



10 dakika 3000 devir/dakikada santrifüj(Hettich Universal) edildi.

Üst faz alınarak oluşan rengin absorbansı spektrofotometrede 532 nm’de okundu.

**Şekil III.** MDA tayini için kullanılan deney prosedürü.

### 5.6.3. Kemiluminesans yöntemi ile radikal düzeyleri

Reaktif oksijen metabolitlerinin (ROM) ölçümü için kullanılan yöntem ile luminol ve lusigenin kemiluminesansı ölçüldü. Alınan dokular önce 10-35 mg’lık küçük parçalara ayrılarak, 2 mL PBS (phosphate buffered saline) + HEPES (4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetanesulfonik asit) (0.5 M PBS ve 20 mM HEPES) tamponu içeren sayım tüplerine aktarıldı. Kemilüminesans ölçümleri Luminometrede (EG & G Berthold Mini Lumat LB 9506, Almanya) luminol ve lusigenin problemleri kullanılarak yapıldı. Lusigenin aracılı ölçüm ile süperoksit radikali saptanırken,

luminol aracılı ölçüm ile hidroksil, hidrojen peroksit, hipoklorit ve hidroperoksil radikalleri saptandı. Luminol (Final: 0.2 mM) ve lusigenin (Final: 0.2 mM) probu eklenen sayım tüpleri luminometrede 15 saniyelik aralıklarla 5 dakika süreyle okutulurken, kuru ağırlıkları alınmış ve sonuçlar AUC rlu/mg doku cinsinden ifade edildi (24).

#### **5.6.4. Serumda nöron spesifik enolaz ( NSE ) ve soluble protein 100β ( S- 100β )**

##### **Tayini**

USCN Life Science&Technology Company, ELISA Kit kullanılarak yapıldı.

##### **5.6.4.1. Test prensibi**

Kitte NSE'ye spesifik biotin-konjuge polyclonal antikorla önceden kaplanmış plate bulunmaktadır. Plate, örnek /standart ve Avidin konjuge Horseradish peroxidase (HRP) eklenir ve inkübe edildi. Sonra 3,3',5,5' tetrametil benzidin (TMB) substrat solüsyonu her well'e eklenir. Avidin bir renk değişimi gösterir. Enzim-substrat reaksiyonu sülfürüik asit solüsyonunun eklenmesiyle sonlandırıldı ve renk değişimi 450 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüldü. NSE'nin örneklerdeki konsantrasyonu, standart eğri grafiğinden yararlanarak Ozmotik Dansiteyle (O.D.). karşılaştırılarak hesaplandı.

**Serumun hazırlanması:** Serum yaklaşık 1000xg'de 15 dak. santrifüjlendi ve -20°C'de saklandı.

##### **5.6.4.2. Örnek hazırlığı**

Wash Buffer: 750 ml Wash Buffer hazırlamak için , 30 mL Wash Buffer 720 mL distile su ile dilue edildi.

Standart: ELISA için standart eğri konsantrasyonları, 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.312 ng/ml arası sample dilüent ile seyreltilerek hazırlandı. Taze hazırlanıp 15 dakika sonra kullanıldı.

Assay dilüent A ve B (1: 100)

**Örnek Hazırlanması:** NEURON-SPESİFİK ENOLASE'DA SERUM OLDUĞU GİBİ, SOLUBLE PROTEİN-100 B'DE İSE 20 µl SAMPLE+ 80 µl SAMPLE DİLÜENT EKLENDİ.

Deneydeki Dilüentler:

Sample dilüent (20 ml)

Assay dilüent A (10 ml)

Assay dilüent B (10 ml)

#### **5.6.4.3. Deney prosedürü**

1. Blank, standart ve örnekler 100 µl olarak her well'e eklenir. Plate'in üstü kapatılarak 2 saat 37°C'de inkübasyon yapıldı.
2. Her well'deki sıvı yıkama yapmadan uzaklaştırıldı.
3. Her well'e 100 µl detection reagent A eklenir. Plate'in üstü kapatılarak 1 saat 37°C'de inkübasyon yapıldı.
4. 350 µl Yıkama Buffer'ı (Wash Buffer) ile 3 kez yıkama yapılır. Son yıkamadan sonra plak kağıt havlu ile kurutuldu.
5. Her well'e 100 µl detection reagent B working solüsyon eklendi. Plate kapatıldı ve 1 saat 37°C'de inkübasyon yapıldı.
6. 350 µl Yıkama Buffer'ı ile 3 kez yıkama yapıldı.
7. 90 µl substrat solüsyonu eklendi. Plate'in üstünü kapatılarak karanlıkta 30 dakika 37°C'de ışıktan koruyarak inkübasyon yapıldı.
8. Üstüne 50 µl stop solüsyonu eklendi.
9. 450 nm'de okundu.

### **5.6.5. Nerve growth factor (NGF) tayini**

Doku örneklerinin hazırlanması: -70C'de saklanan doku örneklerinin ağırlıkları tartılarak belirlendi. Dokulara pH'sı 7.0 olan 100mM'lık Tris/HCl soğuk homojenizasyon tamponu (2% bovine serum albumin (BSA), 1M NaCl, 4mM EDTA.Na2, 2% Triton X-100, 0.1% sodium azide ve protez inhibitörleri (Sigma) 5 µg/mL aprotinin, 0.5 µg/mL antipain, 157 µg/mL benzamidin, 0.1 µg/mL pepstatin A and 17 µg/mL phenylmethyl-sulphonyl florid) 1/100 oranında ilave edilerek tüm dokular homojenizatörde homojenize edildi. Daha sonra homojenatlar sonikatörde sonike edilerek yüksek devirde santrüfugasyona (14,000g, 30dk) tabi tutuldu. Üst faz alınarak NGF tayini için kullanıldı.

#### **5.6.5.1. NGF sandwich elisa kit yönteminin prensibi**

NGF tayini sandviç enzim immünoassay (EIA) kit yöntemi kullanılarak yapıldı. Bu yöntemin prensibi Mouse NGF' ye karşı üretilen ve mikropate üzerine kaplanan koyun poliklonal antikorlarının örnekteki NGF ile reaksiyona girmesi ve NGF'nin antikorlarla bağlanan miktarının ölçülmesi esasına dayanır. NGF-antikor bağlanması sonucu oluşan yeşil rengin absorbansı ELISA okuyucusunda 450nm'de okunarak bulunur. NGF kit rat ve mousedan elde edilen serum , plazma doku homejenatları ve biyolojik sıvılardaki NGF' yi ölçmek için dizayn edilmiştir.

#### **5.6.5.2. Reaktiflerin hazırlanması**

1.Chemikine NGF ELISA plate (90139): 2 Sheep anti-Mouse NGF Poliklonal antikorla kaplı 96 kuyucuklu plate.

2.Yıkama Tamponu (Konsantre,60245): Kit içerisinde hazır bulunan 100ml'lik (10x) konsantre yıkama tamponu 1lt deiyonize suyla dilüe edilerek kullanıldı.

3. Dilüent (90143): 100ml'lik kullanıma hazır dilüent

4.NGF Standart (Mouse,90142): Kit içersinde hazır bulunan liyofilize standart 500µL dilüentle çözüldü ve 2-8C 'de NGF stok solüsyonu olarak saklandı.

Bu stok solüsyon daha sonra standart eğri çizimi için kullanıldı. Aşağıdaki dilüsyon miktarları kullanılarak standartlar hazırlandı.Tüpler 1-7 olarak ve 0 olarak işaretlendi. 950 µL tayin dilüenti St1 tübüne eklendi.500'er µL dilüent ise 2-7 ve 0 standart tüplerine ilave edildi. Daha sonra stok standart solüsyonundan 50 µL alınarak St1 tübüne ilave edildi. Böylece ilk standart tübünün konsantrasyonu 1,000pg/mL olarak belirlendi. St 0 tübü hariç diğer tüm standart tüpleri ise 1:2 dilüsyonla konsantrasyonları aşağıda verilen şekilde hazırlandı.

**Tablo I.** NGF standartlarının seri dilüsyon oranları

**Standardlar:**

St1	St2	St3	St4	St5	St6	St7
St0						

**Volume (µL):**

950	500	500	500	500	500	500
500						

**Konsantrasyon (pg/mL):**

1000	500	250	125	62.5	31.25	15.6
0.0						

5. Mouse Anti-Mouse NGF Monoklonal Antikor (90141): 2-8 C'de 3 ay stabil olan liyofilize Anti-NGF monoklonal antikor 1:100 oranında tayin dilüenti ile dilüe edilerek kullanıldı.

6. Donkey anti-Mouse IgG Poliklonal Antikor, HRP konjugat(90140): Liyofilize konjugat 100 µL %50 gliserolde çözüldü. Kullanımdan hemen önce 1:1,000 assay dilüent ile dilüe edildi.

7. TMB/E Solüsyon (60096): 10mL'lik 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine tamponu kullanıldı.

8. Stop Solüsyon (60260): 22mL HCL solüsyonu kullanıldı.

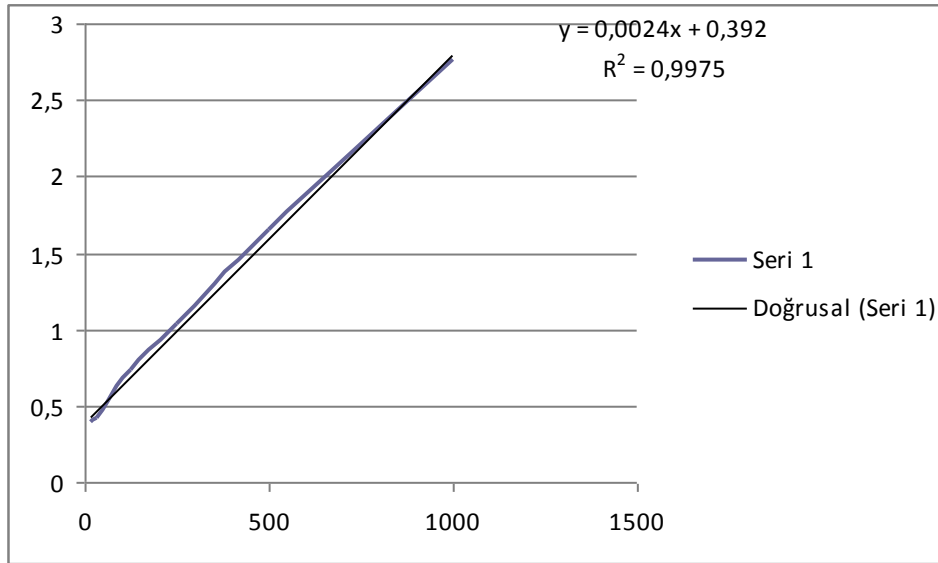
#### 5.6.5.3. Deneyin yapılışı

1. 96 Kuyucuğu olan plate hazırlanarak belirlenen düzene göre tüm standartlar (0-7 arası) ve homojenatlar 100'er µL olacak şekilde kuyucuklara pipetlendi.
2. Plate en az 3 saat boyunca oda sıcaklığında bir karıştırıcı üzerinde sabitlenerek örneklerin kaplı antikorla bağlanması için bekletildi.
3. Multi kanal pipet kullanılarak 250 µL yıkama tamponu ile 4 kez plate yıkandı.
4. 100 µL dilüe anti-mouse NGF monoklonal antikor solüsyonu tüm kuyucuklara pipetlendi ve oda sıcaklığında 2 saat boyunca karıştırıcı üzerinde bekletildi. Daha sonra yıkama tamponu ile kuyucuklar yıkandı.
5. poliklonal antikorunu tüm kuyucuklara ilave edildi. Plate oda sıcaklığında 2 saat boyunca karıştırıcı üzerinde bekletildi ve yıkama tamponu ile yıkandı.
6. 100 µL TMB/E substatından tüm kuyucuklara ilave edildi. Oda sıcaklığında örnekler 5-15 dakika bekletildi. Daha sonra stop solüsyondan her kuyucuğa ilave edildi. Mavi rengin yeşile değiştiği gözlemlendi. 450 nm'de örneklerin absorbansı ELISA okuyucusunda okundu.

#### 5.6.5.4. 100 µL peroksidaz konjuge donkey anti-mouse IgG Doku örneklerinin hazırlanması

-70C’de saklanan doku örneklerinin ağırlıkları tartılarak belirlendi. Dokulara pH’sı 7.0 olan 100mM’lık Tris/HCl soğuk homojenizasyon tamponu (2% bovine serum albumin (BSA), 1M NaCl, 4mM EDTA.Na2, 2% Triton X-100, 0.1% sodium azide ve protez inhibitörleri (Sigma) 5 µg/mL aprotinin, 0.5 µg/mL antipain, 157 µg/mL benzamidin, 0.1 µg/mL pepstatin A and 17 µg/mL phenylmethyl-sulphonyl florid) 1/100 oranında ilave edilerek tüm dokular homojenizatörde homojenize edildi. Daha sonra homojenatlar sonikatörde sonike edilerek yüksek devirde santrüfugasyona (14,000g, 30dk) tabi tutuldu. Üst faz alınarak NGF tayini için kullanıldı.

Daha önce hazırlanmış olan ve konsantrasyonu bilinen standartların absorpsanları da ELISA okuyucusunda ölçülerek standart eğrisi çizildi. Doku örneklerinden elde edilen absorpsanlar y eksenine yerleştirilerek onlara karşılık gelen değerler NGF konsantrasyonu olarak belirlendi. Sonuçlar pg/ml cinsinden hesaplandı.



Şekil IV. NGF tayin grafiği



## **5.6.6. Kaspaz-3 aktivitesi tayini**

### **5.6.6.1. Doku örneklerinin hazırlanması**

-70C'de saklanan doku örneklerinin ağırlıkları tartılarak belirlendi. Doku örnekleri üzerine 1/100 oranında KCL çözeltisi ilave edildi. Tüm dokular homojenizatörde homojenize edildi. Daha sonra homojenatlar (1 ml) üzerine 100 µl lizis tamponu eklendikten sonra sonikatörde 5 saniye aralıklarla % 75 verimle toplam 15 saniye boyunca sonike edildi. 5000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilip, üst faz alındı deney prosedürü gerçekleştirildi.

### **5.6.6.2. Prensibi**

Kaspaz-3 aktivitesi, Calbiochem kaspaz-3 kolorimetrik aktivite ölçüm kiti kullanılarak yapıldı. Memeli hücrelerinde ICE ailesi üyeleri olan proteaz/kaspazların aktivasyonu apoptozu başlatır. Bu ticari kitin ölçüm prensibi kaspaz-3 substratı olan N-Acetil- Asp-Glu-Val-Asp p-nitroanilid'den (Ac-DEVD-pNA) kromofor p-nitroanilinin (pNA) oluşmasının spektrofotometrik olarak ölçüm esasına dayanır. Serbestleşen pNA'nın absorpsiyonu ELISA okuyucusunda 405 nm' de okunarak bulundu.

### **5.6.6.3. Çözeltilerin hazırlanması**

#### **Hücre Lizis Tamponu**

Kit içerisinde hazır olarak bulunan 50 mM HEPES, 5 mM DTT, 0.1 mM EDTA, % 0.1 CHAPS içeren pH= 7.4 olan tampon çözeltisi – 70° C' de muhafaza edildi.

#### **Analiz Tamponu**

Kit içerisinde hazır olarak bulunan 100 mM NaCl, 50 mM

Hepes, 10 mM DTT, 1 mM EDTA, % 10 gliserol, % 1 CHAPS içeren pH = 7,4 olan

tampon çözeltisi – 70 ° C’ de muhafaza edildi.

**Kaspaz 3:** Kit içerisinde analiz tamponunda 300 ünite olarak bulunur.

**Kaspaz-3 kolorimetrik Substrat 1(Ac-DEVD-pNA) çözeltisi:** Kit içerisinde hazır olarak bulunan 2 mM ve 1 ml’lik çözelti. Ölçüm için analiz tamponu ile son konsantrasyon 200 µM olacak şekilde dilüe edildi.

**Kaspaz-3 inhibitör (Ac-DEVD-CHO):** Kit içerisinde hazır olarak bulunan 100µM çözelti 1: 200 oranında analiz tamponu ile dilüe edilerek ölçüm için kullanılır.

**pNA Standart:** Kit içerisinde hazır olarak bulunan analiz tamponu içinde 50µM pNA çözeltisi – 70°C’ de muhafaza edildi.

#### 5.6.6.4. Deneyin yapılışı

**Tablo II.** Kaspaz 3 aktivitesi tayininde kullanılan materyaller.

	<b>Analiz tamponu</b>	<b>Trombosit</b>	<b>Kaspaz-3</b>	<b>İnhibitör</b>	<b>Substrat</b>
<b>Kör</b>	50 µl	-	-	-	50 µl
<b>Trombosit</b>	40 µl	10 µl	-	-	50 µl
<b>İnhibitör (Ac-DEVD-CHO)</b>	20 µl	10 µl	-	20 µl	50 µl
<b>Saf Kaspaz-3</b>	35 µl	-	15 µl	-	50 µl
<b>Toplam Hacim</b>	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl

İnhibitör ilavesinden sonra örnekler 10 dakika bekletildi. En son substrat konularak 405 nm' de 0, 30, 60, 90, 120. dakikalarda ELİSA okuyucusu kullanılarak absorbanslar okundu. Her örnek için farklı zaman aralıklarında ölçülen absorbans değerleri grafiğe yerleştirilerek doğru denkleminde eğim hesaplandı ve aşağıdaki formülde yerine yerleştirilerek aktivite hesaplandı.

Trombosit kaspaz-3 aktivite düzeyleri hesaplamak için önce dönüşüm faktörü hesaplanır. Bunun için önce 50 µM' lık p-nitroanilin iki kuyucuğa ilave edilir. Bunun yanında ayrı bir kuyucuğa 100 µl analiz tamponu eklenir ve kör olarak kullanılır. p-nitroanilinden elde edilen ortalama absorbans değerleri körden çıkarılarak, dönüşüm faktörü formülde yerine yerleştirilir.

Dönüşüm faktörü( $\mu\text{M} / A_{405}$ ) = 50 µM (p-nitroanilin ) Ortalama  $A_{405}$ .

Bu formül kullanılarak kaspaz-3 aktivitesi aşağıdaki şekilde hesaplanır.

Aktivite (pmol/dak.) = eğim( $\Delta A / \text{dak.}$ ) x dönüşüm faktörü x toplam deney hacmi ( $\mu\text{l}$ ).

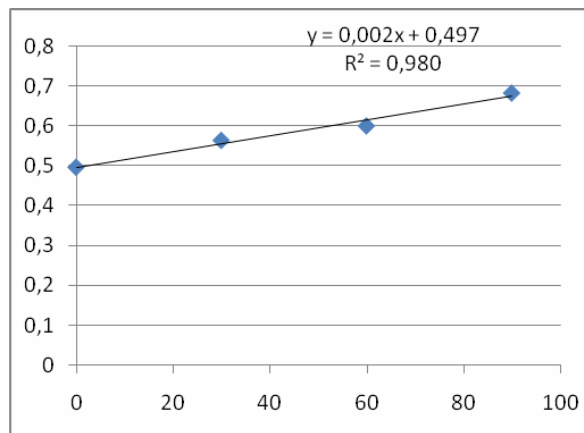
Kaspaz 3 aktivitesi ile ilgili örnek vermek istersek:

Dönüşüm faktörü = 50 µM / 0,292 = 171

30 dakikadaki absorbans = 0,564

60 dakikadaki absorbans = 0,600

90 dakikadaki absorbans = 0,682



**Şekil V.** Kaspaz 3 aktivite tayin grafiği.  $y = ax + b$  denkleminde a (eğim) hesaplanır

Aktivite = eğim.....x 171 x100 µl = ..... pmol/ dak.

## **5.7. Histolojik İncelemeler**

### **5.7.1. Işık mikroskopisi**

Perfüzyon fiksasyonu için ketamin (75 mg/kg; i.p.) ve klorpromazin (1 mg/kg; i.p.) ile anestezisi altında V kesi ile sternum kaldırılıp toraks boşluğu açıldı. Kalbin tepesinden 18 gauge kelebek iğne ile girilerek sol ventriküle dikkatli bir biçimde yerleştirildi. Daha sonra sağ atriyum kesildi ve üç yollu kanülden önce 10 dk süreyle SF verildi. Sağ atriyumdan akan sıvının berraklaştığı görüldüğünde kanülün vanası diğer girişe çevrilerek fosfat tamponu (pH 7.4) içinde %4 p-formaldehid çözeltisi 110 mm Hg basınçla 35 damla/15 sn olacak şekilde verilir 15 dakika süreyle fiksasyon perfüzyonu yapıldı. Fikse edilmiş mesane duvarından kesitler alınarak hemotoksilen eozin (HE) ile boyandı. Dokular tedavi gruplarından habersiz deneyimli histologlar tarafından ışık mikroskopunda (Olympus BX-51, Japan) incelendi. Preperatlar genel morfolojik açıdan incelendikten sonra bu preparatlarda kantitatif olarak mesane düz kas tabakası kalınlığı ölçümleri yapıldı.

### **5.7.2. Taramalı elektron mikroskopisi (SEM)**

Elde edilen mesane örnekleri %2,5'lük glutaraldehit içerisinde, 4 °C'de, 4 saat süresince tespit edildi. Fosfat tamponu (PBS, phosphate buffered saline) ile yıkanan dokulara osmiyum tetroksit ile 1 saat süreyle postfiksasyon uygulandı. PBS ile yıkanan dokular yükselen alkol serilerinden geçirilerek dehidrate edildi. Dokular 2:1 alkol:amil asetat, 1:1 alkol:amil asetat ve saf amil asetat serilerinden geçirildikten sonra BIO-RAD E3000 serisi kritik nokta kurutucusu ile kurutuldu. Kurutulan dokular prinç taşıyıcılar üzerine yapıştırılıp BIO-RAD SC502 altın kaplama cihazında kaplandı. Kaplanan dokular JEOL JSM-5200 taramalı elektron mikroskobu ile incelendi ve fotoğraflandı.

## 5.8. İstatistiksel Değerlendirme

Bu çalışmanın verileri ortalama  $\pm$  standart hata olarak verilmiştir. Tüm testlerde  $P < 0.05$  hata istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Testler bilgisayarda Graph-Pad Prism 4.0 (GraphPad Software, San Diego; CA; USA) bilgisayar istatistik programı kullanılarak yapılmıştır.

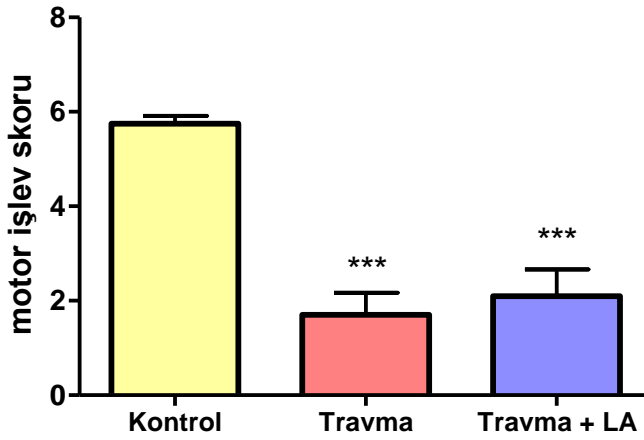
İstatistiksel değerlendirme tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve ileri analiz olarak Tukey' s testi ile yapıldı. P değerinin 0,05' ten küçük olduğu durumlar anlamlı olarak kabul edildi.

Motor işlev bozukluğunun istatistiksel değerlendirilmesinde parametrik olmayan Mann Whitney – U testi kullanılmıştır. P değerinin 0,05' ten küçük olduğu durumlar anlamlı olarak kabul edildi.

## 6. BULGULAR

### 6.1. Motor İşlev Skoru

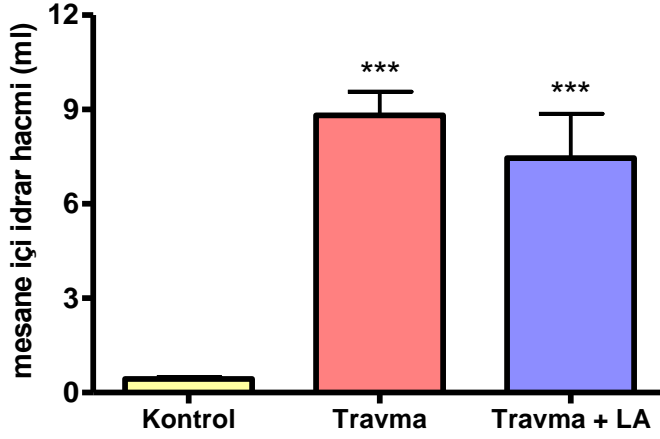
Omurilik hasarı uygulanan grupta motor işlev skoru kontrol gruba göre anlamlı olarak azalmıştır ( $p<0.001$ ). LA uygulaması skorda anlamlı bir düzeltme yapmamıştır.



Şekil VI. Gruplara ait motor işlev skorları. n=8 \*\*\*:  $p<0.001$  Kontrol grubuna göre karşılaştırma.

### 6.2. Mesane İçi İdrar Hacmi

OH uygulanan grupta mesanenin boşaltım fonksiyonu kontrol gruba göre anlamlı derecede bozulmuştur ve mesane içindeki idrar hacmi anlamlı olarak daha fazladır ( $p<0.001$ ). LA uygulaması ile idrar hacmi hafifçe daha düşük gözükmele birlikte fark anlamlı değildir.

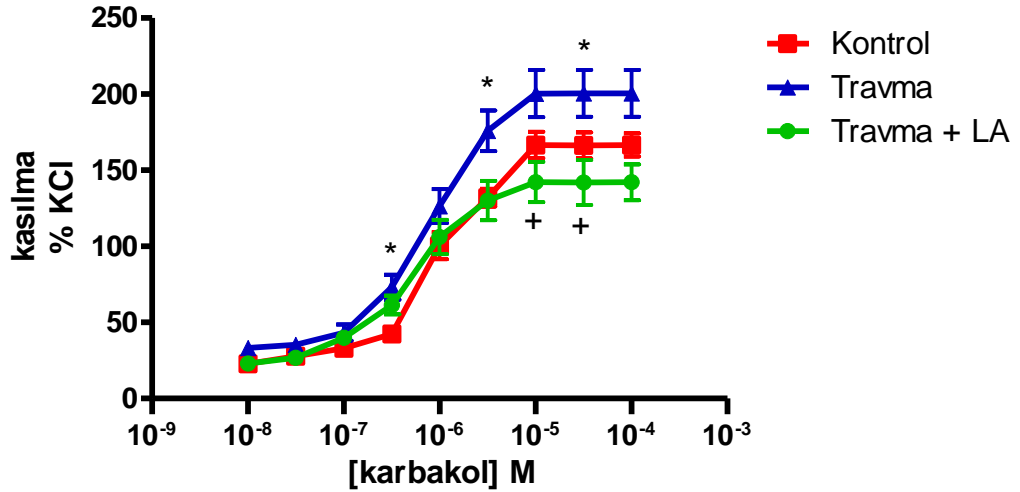


Şekil VII. Mesane içi idrar hacmi miktarları. n=8 \*\*\*: p<0.001: Kontrol grubuna göre karşılaştırma.

### 6.3. Mesane Dokusunun Karbakolle Kasılma Yanıtları

Travma grubunda karbakolle kasılma yanıtı kontrol grubuna göre anlamlı ölçüde (p<0,05) bozulmuştur . LA uygulaması travma grubuna göre kasılma yanıtını kontrol grubuna yaklaştırmıştır (p<0,05).

Kasılma- Gevşeme



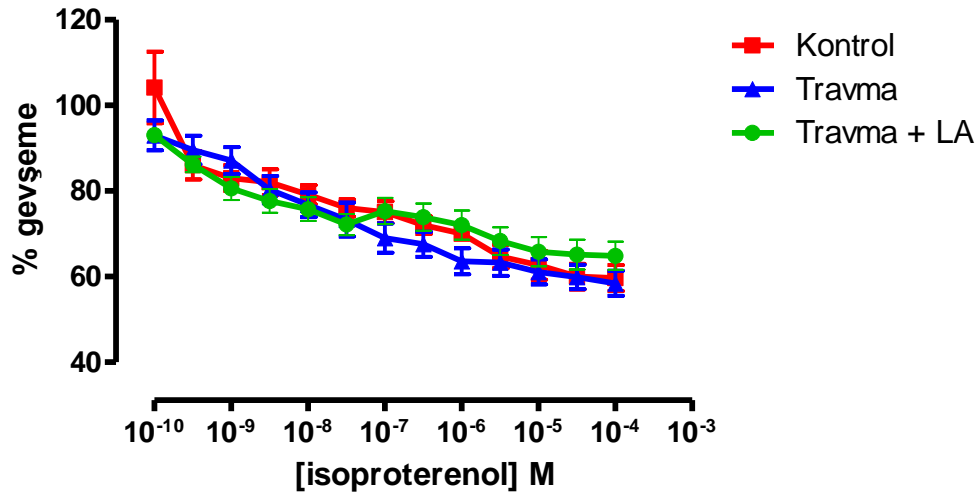
Şekil VIII. Mesane dokusunun karbakolle kasılma yanıtları. n=8 \*: p<0.05: Kontrol grubuna göre karşılaştırma. \*p<0.05 kontrole göre; +: P<0.05 Travma grubuna göre karşılaştırma.

**Karbakol ve İzoproterenol yanıt eğrilerinden elde edilen EC50 değerleri ve KCL (mg) kasılma yanıtları**

	<b>Kontrol</b>	<b>OH</b>	<b>LA</b>
<b>KCL</b>	4450,5	3914,33	5089,18
<b>Cch</b>	$1,08 \times 10^{-6}$	$8,18 \times 10^{-7}$	$5,25 \times 10^{-7}$
<b>İzoproterenol</b>	$5,20 \times 10^{-8}$	$2,35 \times 10^{-8}$	$1,16 \times 10^{-9}$

**6.4. Mesane Dokusunun İzoproterenolle Gevşeme Yanıtları**

Mesane dokusunun izoproterenolle gevşeme yanıtında her üç grupta da benzer bir cevap görülmektedir.

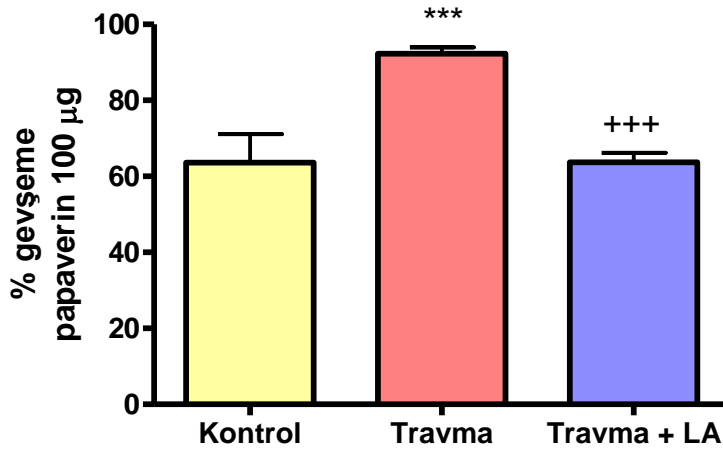


Şekil IX. Mesane dokusunun izoproterenolle gevşeme yanıtları.



### 6.5. Mesane Dokusunun Papaverinle Gevşeme Yanıtları

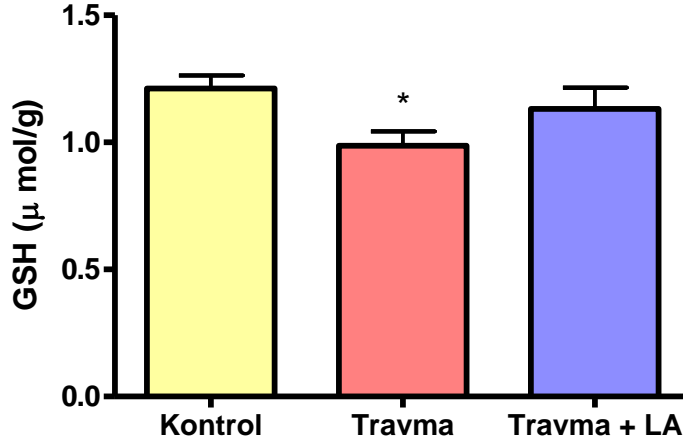
Travma grubunun papaverinle gevşeme yanıtının kontrol grubuna göre anlamlı olarak ( $p<0.001$ ) daha fazla olduğu gözlenmektedir. LA uygulaması bu bozukluğu anlamlı olarak ( $p<0,001$ ) düzeltmiştir.



**Şekil X. Mesane dokusunun papaverinle gevşeme yanıtları. n=8 \*\*\*:  $p<0,001$ : Kontrol grubuna göre karşılaştırma. +++:  $p<0,001$  travma grubuna göre karşılaştırma.**

### 6.6. Mesane Dokularında GSH (glutatyon) Tayini

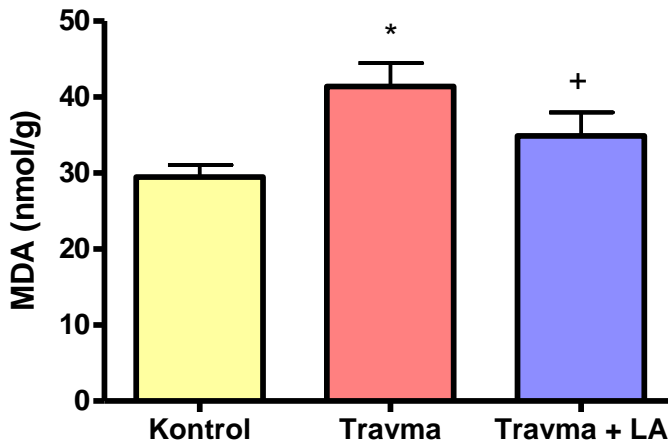
Travma grubundaki mesane dokularındaki GSH miktarı kontrol grubuna göre anlamlı ölçüde daha düşük seviyede saptanmıştır \*:  $p<0,05$ . Travma + LA grubunda bu miktar kontrol grubundakine yaklaşmıştır fakat halen daha düşük seviyededir.



Şekil XI. Grupların mesane dokularında GSH (glutatyon) tayini. n=8 \*: P<0,05: Kontrol grubuna göre karşılaştırma.

#### 6.7. Mesane Dokularında MDA (malondealdehit) Tayini

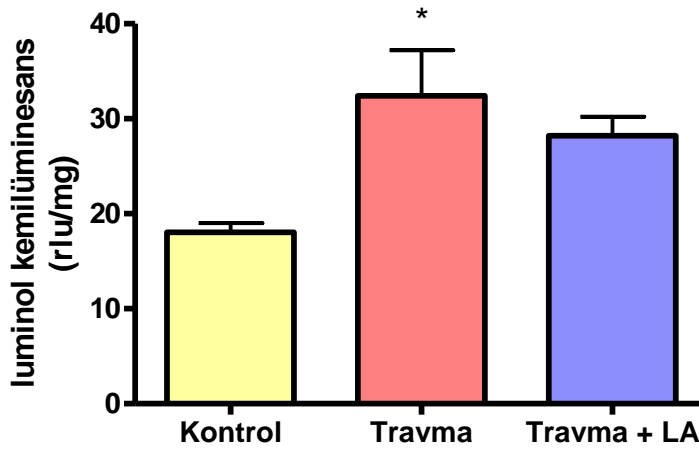
Travma grubundaki mesane dokularındaki MDA miktarı kontrol grubuna göre anlamlı ölçüde daha yüksek seviyededir \*: p<0,05. Travma + LA grubunda bu miktar kontrol grubundakine yaklaşmıştır fakat halen daha yüksek seviyededir +: p<0,05.



Şekil XII. Grupların mesane dokularında MDA (malondealdehit) tayini. n=8 \*: p<0,05 Kontrol grubuna göre. +: P<0,05 Travma grubuna göre.

## 6.8. Mesane Dokularında Luminol Kemilüminesans Ölçümü

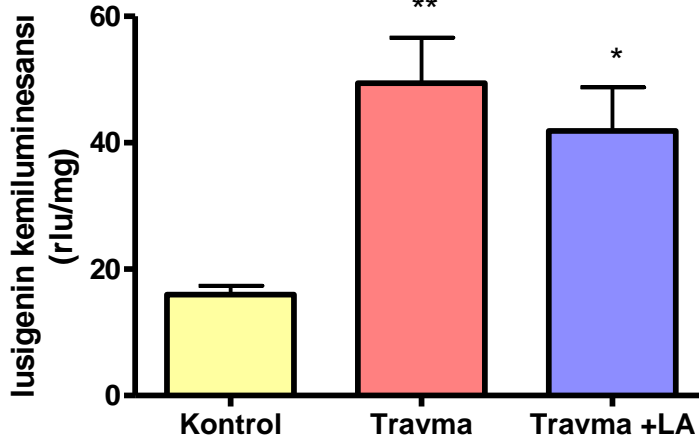
Travma grubunun mesane dokularında ölçülen luminol kemilüminesans seviyeleri, kontrol grubundakilere göre belirgin derecede yükselmiştir ( $p<0,05$ ). Travma + LA grubunda bu değer Travma grubuna göre daha düşüktür fakat, halen kontrol grubuna göre yüksek seviyededir.



Şekil XIII. Grupların mesane dokularındaki luminol kemilüminesans değerleri. n=8 \*:  $p<0,05$  Kontrol grubuna göre.

## 6.9. Mesane Dokularındaki Lusigenin Kemilüminesans Ölçümü

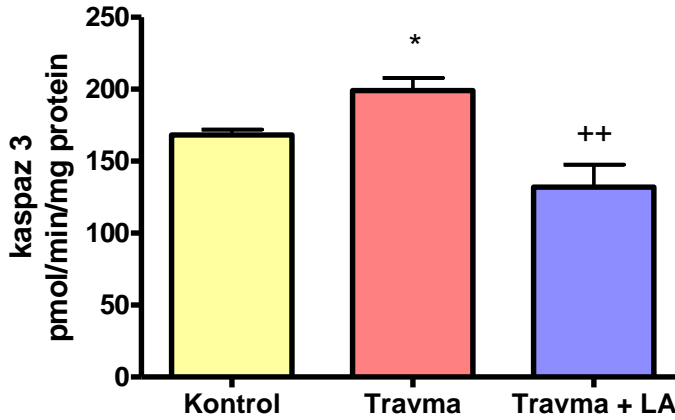
Travma grubunun mesane dokularında ölçülen lusigenin kemilüminesans seviyeleri, kontrol grubundakilere oranla belirgin düzeyde yüksektir ( $p<0,01$ ). LA uygulanan omurilik hasarlı grupta bu değer travma grubuna göre biraz daha düşük olmakla beraber kontrol grubuna göre yüksek seviyededir.



Şekil XIV. Grupların mesane dokularındaki lusigenin kemilüminesans değerleri. n=8 +: p<0,05 Travma grubuna göre. \*\*: p<0,01 Kontrol grubuna göre.

#### 6.10. Mesane Dokularındaki Kaspaz 3 Aktiviteleri

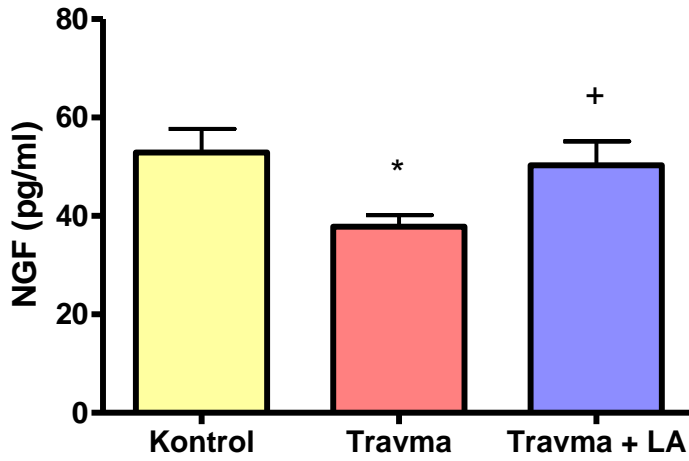
Travma grubunun mesane dokularındaki kaspaz 3 aktivitesi kontrol grubuna göre daha yüksektir (p<0,01). Bu durum travmanın, mesane dokusundaki apoptozisi indüklediğini göstermektedir. Travma + LA grubunda ise kaspaz 3 aktivitesi kontrol grubundan anlamlı olarak (p<0,01) daha düşük seviyede gözlenmiştir.



Şekil XV. Grupların mesane dokularındaki kaspaz 3 aktiviteleri. n=8 \*: p<0,05 Kontrol grubuna göre. ++: p<0,01 Travma grubuna göre.

### 6.11. Mesane Dokularındaki NGF Seviyeleri

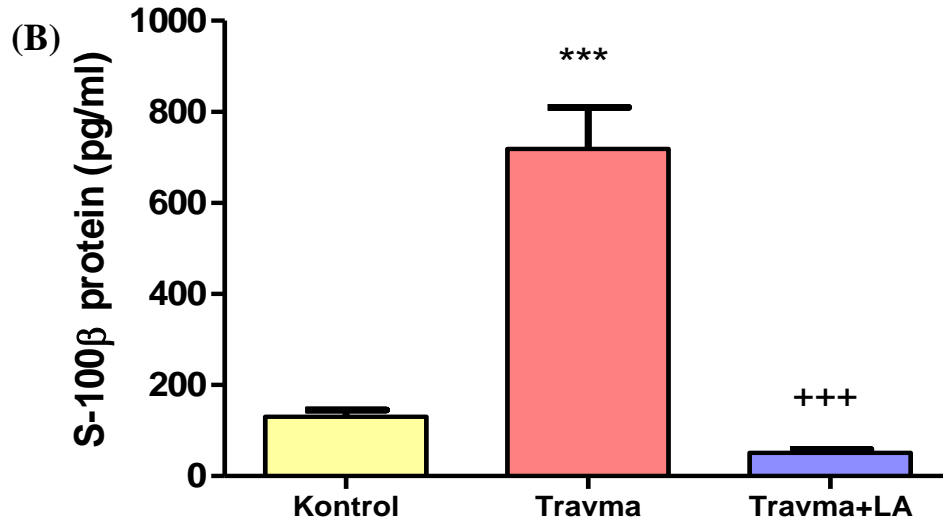
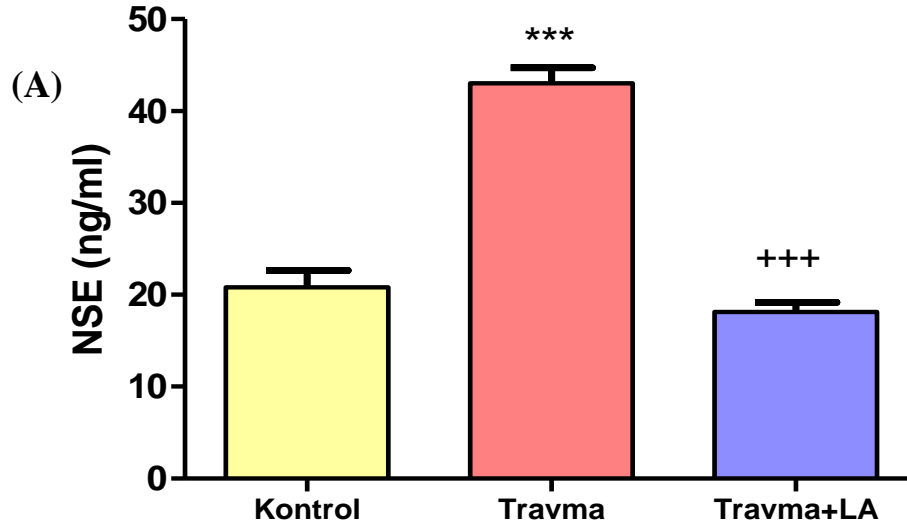
Travma grubunun mesane dokularındaki NGF seviyeleri kontrol grubuna göre daha düşüktür ( $p<0,05$ ). Travma grubuna LA uygulaması NGF düzeylerini anlamlı olarak ( $p<0,05$ ) arttırmış; kontrol grubundakilere yaklaştırmıştır.



Şekil XVI. Grupların mesane dokularındaki sinir büyüme faktörü (NGF) düzeyi. n=8 \*:  $p<0,05$  Kontrol grubuna göre. +:  $p<0,05$  Kontrol grubuna göre.

### **6.12. Serum S- 100 $\beta$ ve NSE Seviyeleri**

Travma grubunun serum S- 100 $\beta$  ve NSE seviyeleri kontrol grubuna göre belirgin düzeyde artmıştır \*\*\*: P< 0,001. Travma grubuna LA uygulaması serum S- 100 $\beta$  ve NSE seviyelerini düşürmüştür +++: p< 0,001.



Şekil XVII. (A) Serum nöron spesifik enolaz (NSE) seviyeleri.

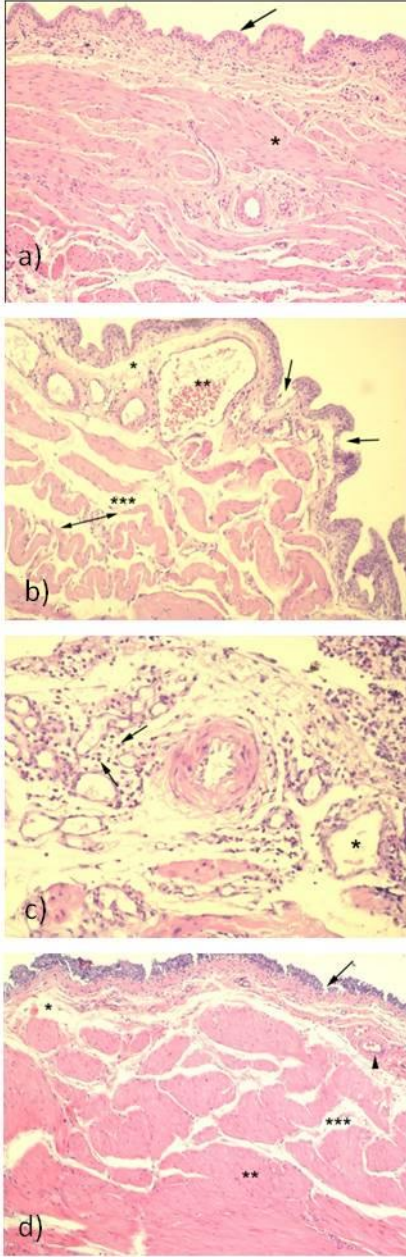
(B) Serum çözünebilir protein- 100β (S- 100 β) seviyeleri. n=8 \*\*\*: p< 0,001

Kontrol grubuna göre. +++: p< 0,001 Travma grubuna göre.

### **6.13. Mesane Dokularının Histolojik Analizi**

Kontrol grubuna ait mesane örneklerinin HE ile boyalı kesitlerinin incelemesinde tunika mukoza, tunika muskularis ve tunika adventisya tabakaları normal histolojik görünümünde izlendi. OH grubunda mesane örneklerinin ışık mikroskobu altında değerlendirilmesinde, uroepitelyal tabakada belirgin hasar izlenmezken, lamina propriada ödem, damarlanma ve vazodilatasyon artışı dikkati çekmekteydi. Düz kas tabakası lifleri oldukça düzensiz, birbirinden ayrılmış, aralarında kanama odakları ve ödem belirgindi. Serozada inflamatuvar hücre artışı izlenmekteydi. LA grubunda lamina propriada ve serozada damarlanma artışı, vazokonjesyon ve serozada inflamatuvar hücre artışı mevcuttur. Kas tabakasında lifler arasında ayrılma, ödem ve kanama azalmıştı.



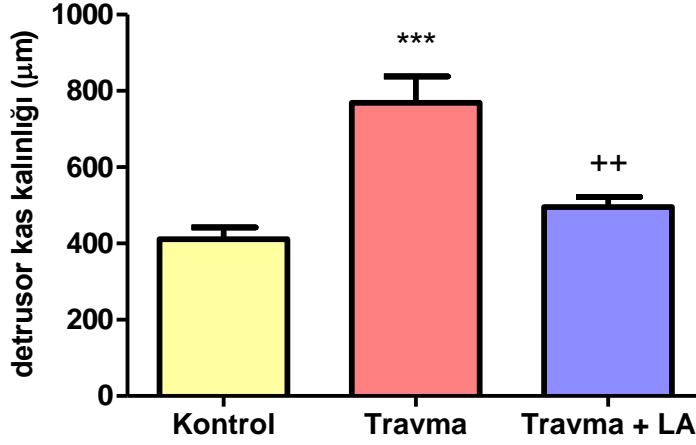


**Resim VII.** **a)** Kontrol grubunda lümeni çevreleyen hasarsız epitel tabakası (ok). Normal histolojik görünümde kas tabakası (\*) **b)** Omurilik hasarı grubunda epitel hasarı (oklar), lamina propriada ödem (\*) ve vazokonjesyon (\*\*). Tunika muskulariste düzensiz kas tabakası (iki başlı ok) ve aralarında belirgin ödem (\*\*\*) **c)** Omurilik hasarı grubunda serozada belirgin inflamatuvar hücre artışı (oklar) ve vazokonjesyon (\*). **d)** LA uygulanmış OH grubunda epitel hasarı (ok), lamina propriada azalmış ödem (\*) ve vazokonjesyon (okbaşı). Tunika muskulariste kas

liflerinin düzenli dağılımı (\*\*), aralarında azalmış ödem (\*\*\*). Hematoksilen-Eozin (HE) boyası, x100-200, orijinal büyütme.

### 6.15. Mesane Dokularının Yüzey Morfolojisi

Kantitatif mesane düz kas tabakası kalınlığı ölçümleri sonucunda kontrol grubuna kıyasla OH grubunda artmış kas kalınlığı bulundu. LA grubunda kas kalınlığı OH grubuna göre azalmış bulundu.



Şekil XVIII. Grupların mesane dokusu kas kalınlıkları. n=8 \*\*\*: p<0,001 Kontrol grubuna göre. ++: P<0,01 Travma grubuna göre.

Mesane dokusunun yüzey morfolojisini ortaya koymak amacıyla yapılan SEM incelemeleri sonucunda kontrol grubunda düzgün yüzeyli ürotelyum gözlenirken (Resim a), omurilik hasarı grubunda ürotelyumun döküldüğü ve alttaki bağ dokunun açığa çıktığı izlenmiştir (Resim b). LA uygulanmış omurilik hasarı grubunda bazı alanlarda düzgün morfolojide ürotelyum olduğu gözlenmiştir (Resim c).



**Resim VIII.** a) Kontrol grubunda düzgün yüzeyli ürotelyum görülmektedir. (Büyütme 10 µm)  
b) Omurilik hasarı grubunda ürotelyumun döküldüğü (\*) ve alttaki bağ dokunun açığa çıktığı görülmektedir. (Büyütme 50 µm)  
c) LA uygulanmış omurilik hasarı grubunda bazı alanlarda düzgün morfolojide ürotelyum görülmektedir. (Büyütme 10 µm)

## 7. TARTIŞMA VE SONUÇ

Omurilik hasarı birincil hasarı şiddetlendiren birçok zararlı patolojik mekanizmalara öncülük etmekte ve ardından ikincil hasarı tetiklemektedir, bu olaylar zinciri kalıcı hasarlarla sonuçlanmaktadır. Birçok patofizyolojik olay, iskemi, ödem iyon denge bozukluğu aracılığı ile ikincil nöronal hasara katkıda bulunmaktadır. (10, 44) Glutamat aracılı eksitotoksisite, ROT oluşumu ve lipid peroksidasyonu, merkezi sinir sistemine travmatik hasar sonucu oluşan nöronal hasara katkıda bulunan önemli faktörlerdir (10).

Omurilik dokusundaki travmaya, hücre membranlarında oksidatif yıkıma neden olan lipid peroksidasyonu eşlik etmektedir (44, 3). Hücrelerin kendi anti oksidan mekanizmalarıyla oksijen radikalinin zararlı etkilerinden korunabildikleri bilinmektedir. Oksidatif stres sonucu anti oksidan defans sistemin zayıflaması, dokuların oksidatif hasara karşı daha hassas olmalarına neden olmaktadır. GSH ve diğer antioksidanlar, serbest radikal reaksiyonlarının yayılmasını sınırlamaktadırlar; aksi halde bu durum süregelen lipid peroksidasyonuna neden olmaktadır. Artan doku GSH seviyeleri, ROM ve serbest radikal reaksiyonlarının artışına karşı koruyucu bir mekanizmadır (102).

Omurilikte meydana gelen travmatik hasar, makrofajlar gibi periferik kaynaklı inflamatuvar hücre artışı ile karakterize inflamatuvar cevabı da başlatmaktadır (39). Toklu ve arkadaşları 2010 yılında yaptıkları çalışmada omurilik hasarı sonrası, serobrospinal sıvıda önemli ölçüde myeloperoksidaz miktarında artış olduğunu göstermiştir (33- 96- 97). Bu da nötrofil infiltrasyonunun bir kanıtıdır (12). Yapılan çalışmalarda LA tedavisinin, myeloperoksidaz aktivitesini düşürdüğü gösterilmiştir (105). Diyetle alınan LA, adezyon molekülleri ve proinflamatuvar sitokin oluşumunu inhibe etmekte ve aterosklerotik lezyon oluşumunu azaltmaktadır (53).

Bizim çalışmamızda da omurilik hasarında mesane dokusunda kemiluminesans ile belirlenen serbest radikal düzeyinin arttığı, buna bağlı olarak lipid peroksidasyonunun (MDA) arttığı ve bu sürecin MPO aktivitesinde artışla karakterize olan nötrofil infiltrasyonuna yol açtığı bulunmuştur. Serbest radikaller

lipid peroksidasyonunu, protein yıkımını ve DNA hasarını tetikleyerek zamanla apoptozise kadar ilerleyen nöronal hasara neden olmaktadırlar. (62, 49) Apoptozis omurilik hasarını takiben, sürekli hücre kaybına katkıda bulunan kritik bir faktör olarak görülmektedir. (44) Bu çalışmada da LA tedavisinin kaspaz düzeyini azaltması ve sinir büyüme faktörünü artırması hasarın tamirine yönelik mekanizmaları aktive ettiğini düşündürmektedir.

Karbakol yanıtlarındaki değişim kolinerjik sistem duyarlılığının değiştiğini düşündürmektedir. Diğer taraftan mesane fonksiyonunda isoproteronol ile oluşturulan gevşeme yanıtlarında fark yokken, papaverin yanıtında anlamlı fark olması mesane düz kasında otonom sinir sistemi dışında, nonspesifik başka yollar üzerinden etkisi olduğunu düşündürmektedir. Bu durum mesane kas kalınlığındaki artışın önlenmesiyle de ilişkili olabilir.

Toklu ve arkadaşlarının 2010 yılında yaptığı çalışmada LA' in omurilik yaralanması oluşturulan sıçanlarda omurilikteki oksidan ve nöronal hasara karşı iyileştirici etkileri gösterilmişti (33- 96- 97). Bu çalışmada ise omurilik yaralanmasının sekonder bir komplikasyonu olan mesane hasarında da oksidan mekanizmaların rol oynadığı, LA'in ise mesanedeki fonksiyonel, biyokimyasal ve morfolojik bozukluğu antioksidan, antiapoptotik ve nöroprotektif etkileriyle kısmen düzelttiği gösterilmiştir.

## 8. KAYNAKÇA

1. Abdul HM, Butterfield DA. (2007) Involvement of PI3K/PKG/ERK1/2 signaling pathways in cortical neurons to trigger protection by cotreatment of acetyl-Lcarnitine and alpha-lipoic acid against HNE-mediated oxidative stress and neurotoxicity: implications for Alzheimer's disease. *Free Radic. Biol. Med.* 42: 371–384.
2. Acharya P, Beckel J, Ruiz WG, Wang E, Rojas R, Birder L, Apodaca G; Distribution of the tight junction proteins ZO-1, occludin, and claudin-4, -8, and -12 in bladder epithelium. *Am J Physiol Renal Physiol* 287(2): F305-18, 2004.
3. Adibhatla RM, Hatcher JF. Phospholipase A(2), reactive oxygen species, and lipid peroxidation in CNS pathologies. *BMB Rep.* 2008;41(8):560–567.
4. Allen AR. (1911) Surgery of experimental lesion of spinal cord equivalent to crush injury of fracture dislocation of spinal column. A preliminary report. *JAMA* 57: 878–880.
5. Amudha G, Josephine A, Varalakshmi P. (2006) Role of lipoic acid in reducing the oxidative stress induced by cyclosporine A. *Clin Chim Acta.* 372(1-2): 134-9.
6. Andersson, K. E. & Arner, A. Urinary bladder contraction and relaxation: physiology and pathophysiology. *Physiol. Rev.* 84, 935–986 (2004).
7. Ansari MA, Roberts KN, Scheff SW. (2008) Oxidative stress and modification of synaptic proteins in hippocampus after traumatic brain injury. *Free Radic. Biol. Med.* 45: 443-452.
8. Araki, I. & de Groat, W. C. Synaptic modulation associated with developmental reorganization of visceral reflex pathways. *J. Neurosci.* 17, 8402–8407 (1997).
9. Ayer RE, Zhang JH. (2008) Oxidative stress in subarachnoid haemorrhage: significance in acute brain injury and vasospasm. *Acta Neurochir. Suppl.* 104: 33-41.

10. Azbill RD, Mu X, Bruce-Keller AJ, Mattson MP, Springer JE. (1997) Impaired mitochondrial function, oxidative stress and altered antioxidant enzyme activities following traumatic spinal cord injury. *Brain Res.* 765: 283-290.
11. Barrington, F. J. The effects of lesions of the hind and midbrain on micturition in the cat. *J. Exper. Physiol.* 15, 81–102 (1925).
12. Bernardis CM, Akers T. Effect of postinjury intravenous or intrathecal methylprednisolone on spinal cord excitatory amino-acid release, nitric oxide generation, PGE2 synthesis, and myeloperoxidase content in a pig model of acute spinal cord injury. *Spinal Cord.* 2006;44(10):594–604.
13. Beuge JA, Aust SD. (1978) Microsomal lipid peroxidation. *Meth. Enzymol.* 53: 302-311
14. Bharat S, Cochran BC, Hsu M, Liu J, Ames BN, Andersen JK. (2002) Pretreatment with R-lipoic acid alleviates the effects of GSH depletion in PC12 cells: implications for Parkinson's disease therapy. *Neurotoxicology* 23: 479–486.
15. Biewenga GP, Haenen GR, Bast A. (1997b) The pharmacology of the antioxidant lipoic acid. *Gen. Pharmacol.* 29: 315-331.
16. Bilska A, Włodek L. (2005) Lipoic acid - the drug of the future? *Pharmacol. Rep.* 57: 570-577.
17. Birder LA, de Groat WC; Mechanisms of disease: involvement of the urothelium in bladder dysfunction. *Nat Clin Pract Urol* 4(1): 46-54, 2007.
18. Blok, B., Weer, H. & Holstege, G. Ultrastructural evidence for a paucity of projections from the lumbosacral cord to the pontine micturition centre or M-region in the cat: a new concept for the organization of the micturition reflex with the periaqueductal gray as central relay. *J. Comp. Neurol.* 359, 300–309 (1995).
19. Burnstock, G. in *Purinergic and Pyrimidinergic Signalling II. Cardiovascular, Respiratory, Immune, Metabolic and Gastrointestinal Tract Function (Handbook of Experimental Pharmacology)* (eds Abbracchio, M. P. & Williams, M.) 423–515 (Springer, Berlin, 2001).
20. Busse E, Zimmer G, Schopohl B, Kornhuber B. (1992) Influence of alpha-lipoic acid on intracellular glutathione in vitro and in vivo. *Arzneimittelforschung* 42: 829-831.



21. Chng HT, New LS, Neo AH, Goh CW, Browne ER, Chan EC. (2009) Distribution study of orally administered lipoic acid in rat brain tissues. *Brain Res.* 1251: 80-6.
22. Cotran RS, Kumar V, Collins T. Cellular pathology I: cell injury and cell death. In: Venkatachalam, M. (Ed.), *Robbins Pathologic Basis of Disease*, sixth ed. WB Saunders Company, Philadelphia, 1999: 5 – 18.
23. DasGupta, R., Kavia, R. B. & Fowler, C. J. Cerebral mechanisms and voiding function. *BJU Int.* 99, 731–734 (2007).
24. Davies GR, Simmonds NJ, Stevens TRJ, Grandison A, Blake DR, Rampton DS: Mucosal reactive oxygen metabolite production in duodenal ulcer disease. *Gut* 1992; 33: 1467-1472.
25. de Groat, W. C. & Booth, A. M. in *Nervous Control of the Urogenital System (Autonomic Nervous System)* Vol. 3, Ch. 9 (ed. Maggi, C. A.) 291–347 (Harwood Academic Publishers, London, 1993).
26. de Groat, W. C. et al. Developmental and injury induced plasticity in the micturition reflex pathway. *Behav. Brain Res.* 92, 127–140 (1998).
27. de Groat, W. C. et al. Neural control of the urethra. *Scand. J. Urol. Nephrol.* 35 (Suppl. 207), 35–43 (2001).
28. de Groat, W. C. et al. Organization of the sacral parasympathetic reflex pathways to the urinary bladder and large intestine. *J. Auton. Nerv. Syst.* 3, 135–160 (1981).
29. de Groat, W. C. Mechanisms underlying the recovery of lower urinary tract function following spinal cord injury. *Paraplegia* 33, 493–505 (1995).
30. de Groat, W. C., Vizzard, M. A., Araki, I. & Roppolo, J. R. Spinal interneurons and preganglionic neurons in sacral autonomic reflex pathways. *Prog. Brain Res.* 107, 97–111 (1996).
31. De Sales Santos IM, da Rocha Tomé A, Feitosa CM, de Souza GF, Feng D, de Freitas RM, Jordán J. (2009) Lipoic acid blocks seizures induced by pilocarpine via increases in delta-aminolevulinic dehydratase and Na(+), K(+)-ATPase activity in rat brain. *Pharmacol Biochem Behav.* Dec 21.



32. Del Zoppo GJ, Hallenbeck JM. (2000) Advances in the vascular pathophysiology of ischemic stroke. *Thromb. Res.* 98: 73-81.
33. Erşahin M, Toklu HZ, Cetinel S, Yüksel M, Erzik C, Berkman MZ, Yeğen BC, Sener G. Alpha Lipoic Acid Alleviates Oxidative Stress and Preserves Blood Brain Permeability in Rats with Subarachnoid Hemorrhage. *Neurochem Res.* 2010 Mar;35(3):418-28.
34. Foster TS. (2007) Efficacy and safety of alpha-lipoic acid supplementation in the treatment of symptomatic diabetic neuropathy. *Diabetes Educ.* 33: 111-117.
35. Freitas RM. (2009) The evaluation of effects of lipoic acid on the lipid peroxidation, nitrite formation and antioxidant enzymes in the hippocampus of rats after pilocarpine-induced seizures. *Neurosci Lett.* 455: 140-144.
36. Fry, C. H. et al in *Incontinence* (eds Abrams, P., Cardozo, L., Khoury, S. & Wein, A.) 313–362 (Health Publications Ltd, Jersey, 2005).
37. Germanó A, d'Avella D, Ciccirello R, Hayes RL, Tomasello F. (1992) Blood-brain barrier permeability changes after experimental subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery.* 30: 882-886
38. Glantzounis GK, Yang W, Koti RS, Mikhailidis DP, Seifalian AM, Davidson BR. (2006) The role of thiols in liver ischemia-reperfusion injury. *Curr. Pharm. Des.* 12, 2891-2901.
39. Gris D, Hamilton EF, Weaver LC. (2008) The systemic inflammatory response after spinal cord injury damages lungs and kidneys. *Exp. Neurol.* 211: 259-270
40. Gupta A, Taly AB, Srivastava A, Murali T; Non-traumatic spinal cord lesions: epidemiology, complications, neurological and functional outcome of rehabilitation. *Spinal Cord* 47(4): 307-11, 2009.
41. Hagen EM, Rekand T, Gilhus NE, Grønning M; Traumatic spinal cord injuries--incidence, mechanisms and course. *Tidsskr Nor Laegeforen* 132(7): 831-7, 2012.
42. Hall ED, Vaishnav RA, Mustafa AG. (2010) Antioxidant Therapies for Traumatic Brain Injury. *Neurotherapeutics.* 7: 51-61

43. Hall ED; Antioxidant therapies for acute spinal cord injury. *Neurotherapeutics* 8(2):152-67, 2011.
44. Hall ED, Springer JE. Neuroprotection and acute spinal cord injury: a reappraisal. *NeuroRx*. Jan 2004;1(1):80–100.
45. Han D, Handelman G, Marcocci L, Sen CK, Roy S, Kobuchi H, Tritschler HJ, Flohé L, Packer L. (1997) Lipoic acid increases de novo synthesis of cellular glutathione by improving cystine utilization. *Biofactors*. 6: 321-338.
46. Herrera JJ, Haywood-Watson RJ 2nd, Grill RJ; Acute and chronic deficits in the urinary bladder after spinal contusion injury in the adult rat. *J Neurotrauma* 27(2):423-31, 2010.
47. Holstege, G. & Mouton, L. J. Central nervous control of micturition. *Int. Rev. Neurobiol.* 56, 123–145 (2003).
48. Janig, W. & Morrison, J. F. Functional properties of spinal visceral afferents supplying abdominal and pelvic organs, with special emphasis on visceral nociception. *Prog. Brain Res.* 67, 87–114 (1986).
49. Jia Z, Zhu H, Vitto MJ, Misra BR, Li Y, Misra HP. Alpha-lipoic acid potently inhibits peroxynitrite-mediated DNA strand breakage and hydroxyl radical formation: implications for the neuroprotective effects of alpha-lipoic acid. *Mol Cell Biochem.* 2009;323(1–2):131–138.
50. Kagan VE, Shvedova A, Serbinova E, Khan S, Swanson C, Powell R, Packer L. (1992) Dihydrolipoic acid--a universal antioxidant both in the membrane and in the aqueous phase. Reduction of peroxy, ascorbyl and chromoxy radicals. *Biochem. Pharmacol.* 44: 1637-1649.
51. Kavia, R., DasGupta, R. & Fowler, C. J. Functional imaging and central control of the bladder. *J. Comp. Neurol.* 493, 27–32 (2005). This is a comprehensive review of brain-imaging studies related to the CNS control of micturition.
52. Kelley BJ, Lifshitz J, Povlishock JT. (2007) Neuroinflammatory responses after experimental diffuse traumatic brain injury. *J Neuropathol Exp Neurol* 66: 989-1001.

53. Kolgazi M, Jahovic N, Yuksel M, Ercan F, Alican I. Alpha- lipoic acid modulates gut inflammation induced by trinitrobenzene sulfonic acid in rats. *J Gastroenterol Hepatol.* 2007;22(11):1859–1865.
54. Koyanagi I, Tator CH, Lea PJ; Three-dimensional analysis of the vascular system in the rat spinal cord with scanning electron microscopy of vascular corrosion casts. Part 2: acute spinal cord injury. *Neurosurgery* 33: 285– 91, 1993.
55. Koźniewska E, Michalik R, Rafałowska J, Gadamski R, Walski M, Frontczak-Baniewicz M, Piotrowski P, Czernicki Z. (2006) Mechanisms of vascular dysfunction after subarachnoid hemorrhage. *J. Physiol. Pharmacol.* 57 Suppl 11: 145-60.
56. Lee WJ, Lee IK, Kim HS, Kim YM, Koh EH, Won JC, Han SM, Kim MS, Jo I, Oh GT, Park IS, Youn JH, Park SW, Lee KU, Park JY. (2005) Alpha-lipoic acid prevents endothelial dysfunction in obese rats via activation of AMP-activated protein kinase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 25: 2488–2494.
57. Lewen A, Matz P, Chan PH. (2000) Free radical pathways in CNS injury. *J. Neurotrauma.* 17: 871-890.
58. , Ashwell KW, Waite P; Advances in secondary spinal cord injury: role of apoptosis. *Spine* 25:1859- 66, 2000.
59. Lucas SM, Rothwell NJ, Gibson RM. (2006) The role of inflammation in CNS injury and disease. *Br J Pharmacol* 147: S232-240.
60. Maczurek A, Hager K, Kenklies M, Sharman M, Martins R, Engel J, Carlson DA, Münch G. (2008) Lipoic acid as an anti-inflammatory and neuroprotective treatment for Alzheimer's disease. *Adv Drug Deliv Rev.* 60: 1463-1470.
61. Makeeva AV, Popova TN, Matasova LV, Yama IN. (2008) Effects of lipoic acid on citrate content, aconitate hydratase activity, and oxidative status during myocardial ischaemia in rats. *Biochemistry (Mosc)* 73: 76-79
62. Manda K, Ueno M, Moritake T, Anzai K. (2007). Radiation-induced cognitive dysfunction and cerebellar oxidative stress in mice: protective effect of alpha-lipoic acid. *Behav. Brain Res.* 177: 7-14.
63. McCarty MF, Barroso-Aranda J, Contreras F. (2009) The "rejuvenatory" impact of lipoic acid on mitochondrial function in aging rats may reflect

- induction and activation of PPAR-gamma coactivator-1alpha. *Med Hypotheses*. 72(1): 29-33
64. McKinley WO, Seel RT, Hardman JT; Nontraumatic spinal cord injury: incidence, epidemiology, and functional outcome. *Arch Phys Med Rehabil* 80: 619–623,1999.
65. Moini H, Packer L, Saris NE. (2002) Antioxidant and prooxidant activities of alpha-lipoic acid and dihydrolipoic acid. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 182: 84-90.
66. Morgan, C. W., de Groat, W. C., Felkins, L. A. & Zhang, S. J. Axon collaterals indicate broad intraspinal role for sacral preganglionic neurons. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 88, 6888–6892 (1991).
67. Morgan, C., Nadelhaft, I. & de Groat, W. C. The distribution of visceral primary afferents from the pelvic nerve to Lissauer's tract and the spinal gray matter and its relationship to the sacral parasympathetic nucleus. *J. Comp. Neurol.* 201, 415–440 (1981).
68. Morganti-Kossmann MC, Satgunaseelan L, Bye N, Kossmann T. (2007) Modulation of immune response by head injury. *Injury* 38: 1392-400.
69. Morrison, J. et al in *Incontinence* (eds Abrams, P., Cardozo, L., Khoury, S. & Wein, A.) 363–422 (Health Publications Ltd, Jersey, 2005).
70. Nishizawa S, Yamamoto S, Yokoyama T, Uemura K. (1997) Dysfunction of nitric oxide induces protein kinase C activation resulting in vasospasm after subarachnoid hemorrhage. *Neurol. Res.* 19: 558–562.
71. Oyinbo CA; Secondary injury mechanisms in traumatic spinal cord injury: a nugget of this multiply cascade. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 71(2): 281-99, 2011
72. Packer L, Tritschler HJ, Wessel K. (1997) Neuroprotection by the metabolic antioxidant alpha-lipoic acid. *Free Radic. Biol. Med.* 22: 359-378.
73. Packer L, Witt EH, Tritschler HJ. (1995)  $\alpha$ -Lipoic acid as a biological antioxidant. *Free Radic. Biol. Med.* 19: 227–250.
74. Packer L. (1998) alpha-Lipoic acid: a metabolic antioxidant which regulates NF-kappa B signal transduction and protects against oxidative injury. *Drug Metab. Rev.* 30: 245-275.

75. Panigrahi M, Sadguna Y, Shivakumar BR, Kolluri SV, Roy S, Packer L, Ravindranath V. (1996) alpha-Lipoic acid protects against reperfusion injury following cerebral ischemia in rats. *Brain Res.* 717: 184-188.
76. Pardo, J. V., Fox, P. T. & Raichle, M. E. Localization of a human system for sustained attention by positron emission tomography. *Nature* 349, 61–64 (1991).
77. Park E, Velumian AA, Fehlings MG. (2004) The role of excitotoxicity in secondary mechanisms of spinal cord injury: a review with an emphasis on the implications for white matter degeneration. *J. Neurotrauma* 21: 754-774.
78. Pershadsingh HA. (2007) Alpha-lipoic acid: physiologic mechanisms and indications for the treatment of metabolic syndrome. *Expert Opin Investig Drugs.* 16(3): 291-302.
79. Prahalathan C, Selvakumar E, Varalakshmi P, Kumarasamy P, Saravanan R. (2006) Salubrious effects of lipoic acid against adriamycin-induced clastogenesis and apoptosis in Wistar rat bone marrow cells. *Toxicology* 222: 225-32.
80. Profyris C, Cheema SS, Zang D, Azari MF, Boyle K, Petratos S. Degenerative and regenerative mechanisms governing spinal cord injury. *Neurobiol Dis* 15(3):415-36, 2004.
81. Roy S, Packer L. (1998) Redox regulation of cell functions by alpha-lipoate: biochemical and molecular aspects. *Biofactors* 8: 17-21.
82. Salinthon S, Yadav V, Bourdette DN, Carr DW. (2008) Lipoic acid: a novel therapeutic approach for multiple sclerosis and other chronic inflammatory diseases of the CNS. *Endocr. Metab. Immune Disord. Drug Targets* 8: 132-142.
83. Samson G, Cardenas DD. Neurogenic bladder in spinal cord injury. *Phys Med Rehabil Clin N Am* 18(2): 255-74, 2007.
84. Sasaki, M. Feed-forward and feedback regulation of bladder contractility by Barrington's nucleus in cats. *J. Physiol.* 557, 287–305 (2004).
85. Sekhon, LH, Fehlings M G; Epidemiology, demographics, and pathophysiology of acute spinal cord injury. *Spine* 26: S2–S12, 2001.
86. Seki, S. et al. Immunoneutralization of nerve growth factor in the lumbosacral spinal cord reduces bladder hyperreflexia in spinal cord injured rats. *J. Urol.* 168, 2269–2274 (2002).

87. Selvakumar E, Prahalathan C, Sudharsan PT, Varalakshmi P. (2006) Protective of lipoic acid on cyclophosphamide-induced testicular toxicity. *Clin. Chim. Acta* 367: 114-9.
88. Slemmer JE, Shacka JJ, Sweeney MI, Weber JT. (2008) Antioxidants and free radical scavengers for the treatment of stroke, traumatic brain injury and aging. *Curr. Med. Chem.* 15: 404-414.
89. Steers, W. D., Ciambotti, J., Etzel, B., Erdman, S. & de Groat, W. C. Alterations in afferent pathways from the urinary bladder of the rat in response to partial urethral obstruction. *J. Comp. Neurol.* 310, 1–10 (1991).
90. Sugaya, K., Roppolo, J. R., Yoshimura, N., Card, J. P. & de Groat, W. C. The central neural pathways involved in micturition in the neonatal rat as revealed by the injection of pseudorabies virus into the urinary bladder. *Neurosci. Lett.* 223, 197–200 (1997).
91. Sullivan PG, Keller JN, Mattson MP, Scheff SW. (1998) Traumatic brain injury alters synaptic homeostasis: implications for impaired mitochondrial and transport function. *J. Neurotrauma* 15: 789–798.
92. Suzuki YJ, Tsuchiya M, Packer L. (1993) Antioxidant activities of dihydrolipoic acid and its structural homologues. *Free Radic. Res. Commun.* 18: 115–122.
93. Tator CH; Update on the pathophysiology and pathology of acute spinal cord injury. *Brain Pathol* 5: 407– 13, 1995
94. Thor, K. B., Morgan, C., Nadelhaft, I., Houston, M. & de Groat, W. C. Organization of afferent and efferent pathways in the pudendal nerve of the female cat. *J. Comp. Neurol.* 288, 263–279 (1989).
95. Tilleux S, Hermans E. (2007) Neuroinflammation and regulation of glial glutamate uptake in neurological disorders. *J. Neurosci. Res.* 85: 2059-2070.
96. Toklu HZ, Hakan T, Biber N, Solakoglu S, Ogunc AV, Sener G. The protective effect of alpha lipoic acid against traumatic brain injury in rats. *Free Radic Res.* 2009 May 25:1-10.
97. Toklu HZ, Hakan T, Celik H, Biber N, Erzik C, Ogunc AV, Akakin D, Cikler E, Cetinel S, Ersahin M, Sener G. Neuroprotective effects of alpha-lipoic acid in

- experimental spinal cord injury in rats. *J Spinal Cord Med.* 2010;33(4):401-9.
98. van den Berg, ME, Castellote JM, Mahillo-Fernandez, I, dePedro- Cuesta J; Incidence of spinal cord injury World wide: asystematic review. *Neuroepidemiology* 34: 184–92, 2010.
99. Vizzard, M. A. Neurochemical plasticity and the role of neurotrophic factors in bladder reflex pathways after spinal cord injury. *Prog. Brain Res.* 152, 97–116 (2006).
100. Vizzard, M. A., Erickson, V. L., Card, J. P., Roppolo, J. R. & de Groat, W. C. Transneuronal labeling of neurons in the adult rat brainstem and spinal cord after injection of pseudorabies virus into the urethra.
101. Werner C, Engelhard K. (2007) Pathophysiology of traumatic brain injury. *Br. J. Anaesth.* 99: 4-9.
102. Wu G, Fang YZ, Yang S, Lupton JR, Turner ND. Glutathione metabolism and its implications for health. *J Nutr.* 2004; 134(3):489–492.
103. Young, W., 2002. Spinal cord contusion models. *Prog. Brain Res.* 137, 231–255.
104. Yune TY, Lee JY, Cui CM, Kim HC, Oh TH; Neuroprotective effect of *Scutellaria baicalensis* on spinal cord injury in rats. *J Neurochem* 110(4): 1276-87, 2009
105. Zhang WJ, Wei H, Hagen T, Balz F. (2007) Alpha-lipoic acid attenuates LPS-induced inflammatory responses by activating the phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104: 4077-4082.

## 9. ETİK KURUL ONAYI



MARMARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ  
HAYVAN DENEYLERİ ETİK KURULU  
PROJE ONAY FORMU

**PROJENİN ADI :** Deneysel omurilik yaralanmasına bağlı mesane hasarında alfa lipoik asitin etkileri  
**PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ :** Yrd. Doç. Dr. Hale Zerrin TOKLU  
**PROJEDEKİ ARAŞTIRICILAR :** Ecz. Arif Ekiz  
**PROJENİN YÜRÜTÜLECEĞİ LABORATUVAR :** M. Ü. Eczacılık Fak. Farmakoloji Anabilim Dalı  
**ONAY TARİHİ VE ONAY SAYISI :** 26.03.2010-36.2010.mar

Sayın : Yrd. Doç. Dr. Hale Zerrin TOKLU

“Deneysel omurilik yaralanmasına bağlı mesane hasarında alfa lipoik asitin etkileri” isimli projeniz Hayvan Deneyleri Etik Kurulu tarafından incelenerek onaylanmıştır. Çalışmalarınızda başarılar dileriz.

Prof.Dr. Berrak YEĞEN  
Hayvan Deneyleri Etik Kurul  
Başkan

Prof.Dr. Zafer GÖREN

Prof.Dr. Göksele ŞENER

Prof.Dr. Aysen YARAT

Doç.Dr. Halil TUĞTEPE

Öğr. Gör. Dr. Gürkan SERT

Vet. Hek. Dilek ÖZBEYLİ

Av. Serkan DÜRAN

Av. Onur GİR

Not: Deneylerin yapılması sırasında ortaya çıkan zorluklar, deney protokolünde yapılması gereken değişiklikler, “Deney Hayvanları Araştırma Etik Kurulu’na” bildirilmelidir. Bütün yazışmalarda, proje onay tarihi ve onay sayısı belirtilmelidir. Araştırmaların proje ile yapılan bütün yayınlarında proje onay tarih ve numarası belirtmesi zorunludur.



## 10. ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

<b>Adı</b>	Arif	<b>Soyadı</b>	Ekiz
<b>Doğum Yeri</b>	Muğla	<b>Doğum Tarihi</b>	26.02.1984
<b>Uyruğu</b>	TC	<b>TC Kimlik No</b>	48937602874
<b>E-mail</b>	arifekiz@gmail.com	<b>Tel</b>	05059112270

### Eğitim Düzeyi

	<b>Mezun Olduğu Kurumun Adı</b>	<b>Mezuniyet Yılı</b>
<b>Doktora/Uzmanlık</b>		
<b>Yüksek Lisans</b>		
<b>Lisans</b>	Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi	2006
<b>Lise</b>	Muğla 75. Yıl Fen Lisesi	2002

### İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	<b>Görevi</b>	<b>Kurum</b>	<b>Süre (Yıl - Yıl)</b>
<b>1.</b>	Mesul Müdür	Arif Ekiz Eczanesi	-7
<b>2.</b>			-
<b>3.</b>			-

<b>Yabancı Dilleri</b>	<b>Okuduğunu Anlama*</b>	<b>Konuşma*</b>	<b>Yazma*</b>
İNGİLİZCE	Çok İyi	Çok İyi	Çok İyi

