



T.C
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
NÖROŞİRÜRJİ ANABİLİM DALI

PERİFERİK SİNİR KESİSİNDE FARKLI DOZLARDA SİSTEMİK
UYGULANAN CDP-KOLİN'İN AKSONAL REJENERASYON VE
EPİNÖRAL SKAR DOKUSU ÜZERİNE ETKİLERİNİN ERKEN PRİMER
SÜTÜR MODELİNDE ARAŞTIRILMASI

Dr. Tolga KAPLAN

UZMANLIK TEZİ

BURSA - 2012



T.C
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
NÖROŞİRÜRJİ ANABİLİM DALI

PERİFERİK SİNİR KESİSİNDE FARKLI DOZLARDA SİSTEMİK
UYGULANAN CDP-KOLİN'İN AKSONAL REJENERASYON VE
EPİNÖRAL SKAR DOKUSU ÜZERİNE ETKİLERİNİN ERKEN PRİMER
SÜTÜR MODELİNDE ARAŞTIRILMASI

Dr. Tolga KAPLAN

UZMANLIK TEZİ

Danışman: Prof. Dr. Ahmet BEKAR

BURSA - 2012

İÇİNDEKİLER

Türkçe Özet.....	ii
İngilizce Özet.....	iv
Giriş.....	1
Gereç ve Yöntem.....	3
Değerlendirme.....	5
Makroskopik Değerlendirme.....	5
Histomorfolojik Değerlendirme.....	6
Fonksiyonel Değerlendirme.....	7
Elektrofizyolojik Değerlendirme.....	8
İstatistiksel Analiz.....	9
Bulgular.....	10
Cerrahi Girişim Sonuçları.....	10
Makroskopik Değerlendirme Sonuçları.....	11
Fonksiyonel Değerlendirme Sonuçları.....	14
Elektrofizyolojik Değerlendirme Sonuçları.....	15
Histomorfolojik Değerlendirme Sonuçları.....	17
Tartışma ve Sonuç.....	22
Kaynaklar.....	29
Teşekkür	35
Özgeçmiş.....	36

ÖZET

Periferik sinir kesisi sonrası iyileşmede fonksiyonel geri kazanım nadiren tam olarak görülmektedir. Daha önce kliniğimizde yapılan çalışmalarda periferik sinir hasarında CDP-kolin'in perinöral skar dokusu, aksonal rejenerasyon ve fonksiyonel geri kazanım üzerine etkinliğini kanıtlanmıştı. Bu çalışmamızda ise sitikolin'in periferik sinir hasarındaki etkinliğinin dozla ilişkisini inceledik.

Çalışmada ağırlıkları 200-270 (± 23) gr arasında değişen 60 adet Wistar Albino tipi dişi yetişkin sıçan kullanıldı. Tüm sıçanlarda sağ siyatik sinire mikromakas ile kesi yapılarak 8/0 prolen ile hemen primer anastomoz yapıldı. Takiben sıçanlar 4 tedavi grubuna ayrıldı: kontrol (K; n=15) grubuna intraperitoneal yolla 2 cc serum fizyolojik (SF) enjekte edilirken, C-300 (n=15), C-600 (n=15) ve C-900 (n=15) gruplarındaki sıçanlara 2 cc SF içinde sulandırılmış sırasıyla 300 $\mu\text{mol/kg}$, 600 $\mu\text{mol/kg}$ ve 900 $\mu\text{mol/kg}$ CDP-kolin uygulandı.

12.haftada tüm sıçanlar yüksek doz Tiopental sodyum uygulamasıyla sakrifiye edildi. Sıçanlar sakrifiye edilmeden önce 4, 8, 12 haftada siyatik fonksiyon indeksi (SFİ) çalışmaları ve 12. haftada elektromiyografik (EMG) kayıtları alındı. Takiben sıçanlar sakrifiye edilerek, sinir yapışıklığı, SFİ, EMG sonuçları ve histomorfolojik inceleme yapıldı. Sinir yapışıklığı, SFİ ve EMG inceleme değerlendirmelerinde K ve C-300 grubuna göre C-600 ve C-900 grubunda aksonal rejenerasyon ve skarsız iyileşmenin istatistiksel olarak anlamlı derecede daha iyi olduğu gözlemlendi ($p < 0.05$).

Yapılan histomorfolojik değerlendirmede gruplar arasındaki akson sayıları ve aksonal dansite bakıldığında C-900 grubunda istatistiksel olarak anlamlı derecede artma olmasa da ($p > 0.05$); fonksiyonel olarak myelinli akson sayılarının arttığı ve morfolojilerinin daha düzgün olduğu gözlemlendi.

Bu çalışma periferik sinir kesisi ve primer anastomoz modelinde CDP-kolin'in aksonal rejenerasyon ve skarsız iyileşme üzerine etkinliğinin doza bağımlı olabileceğini göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Periferik sinir, sitikolin, rejenerasyon

SUMMARY

Investigation of the Effects of CDP-choline Administered Systemically at Various Doses on Axonal Regeneration and Epineural Scar Tissue in a Rat Model of Early Primary Suture

A full functional recovery is rarely seen after peripheral nerve injuries. We have previously reported effects of citicoline on perineural scar tissue, axonal regeneration and functional recovery after peripheral nerve injury. In this study, we investigated the relation of citicoline dose on its effectiveness in peripheral nerve injury.

Sixty adult female Wistar Albino rats weighing 200 to 270 (± 23) g were used in the study. Right sciatic nerves of all rats were incised using micro-scissors and primary anastomosis was performed immediately with 8/0 prolene. Rats were then divided into four groups: control (K) (n=15) group received 2 cc saline (SF) intraperitoneally, while rats in C-300 (n=15), C-600 (n=15) and C-900 (n=15) groups received 300 $\mu\text{mol/kg}$, 600 $\mu\text{mol/kg}$ and 900 $\mu\text{mol/kg}$ CDP-choline diluted in 2 cc saline, respectively.

At the 12th week, all the rats were sacrificed by administration of high dose Thiopental sodium. Before rats were sacrificed, the sciatic functional index (SFI) at the 4th, 8th and 12th weeks and electrophysiological recordings at the 12th week were recorded. Then, rats were sacrificed and nerve adhesions, SFI, electrophysiological results and histomorphological examinations were performed. According to neural adhesion, SFI and electrophysiological evaluations, it was observed that the results of C-600 and C-900 groups were significantly better than the results of K and C-300 groups ($p < 0.05$).

It was determined that the number of functionally myelinated axons were increased and they were more uniform in morphology in C-900 group,

even though there was no statistically significant increase in number observed when the number of axons and axonal density between the groups were examined by histomorphological evaluation.

We conclude that there is a dose dependent promoting effect of CDP-choline on axonal regeneration, recovery and scar formation in the model of peripheral nerve incision and primary anastomosis.

Keywords: Peripheral nerve, citicoline, regeneration

GİRİŞ

CDP-kolin (sitikolin) vücudumuzda endojen olarak oluşan doğal bir bileşiktir. Yapısal olarak bir nükleotiddir. Molekül ağırlığı 488,33 g olan polarize bir moleküldür. Monosodyum tuzu suda çözünebilen ancak alkolde hemen hemen hiç çözünmeyen beyaz, kristal görünümlü, süngerimsi ve oldukça higroskopik bir toz halindedir (1). Hücre membran fosfolipidlerinden fosfatidilkolin sentezi sırasında hız kısıtlayıcı basamakta ortaya çıkar.

Travmatik hasarlanma veya iskemik serebral patolojilerde ve serebral ödemin patofizyolojisinde hücre membranı ve bunun en önemli yapıtaşı olan fosfolipidlerin önemi bilinmektedir (2).

CDP-kolin'in nöroprotektif etkileri, yapılan bazı çalışmalarda değerlendirilmiş (3-7) ve etkisini; fosfatidilkolin sentezini attırarak veya kısmen fosfatidilkolini restore edip sfingomyelin ve kardiolipini tamamen koruyarak (2,4,8), glutasyon sentezini ve glutasyon reduktaz aktivitesini artırarak (7,9), Na⁺-K⁺-ATPaz'ı restore ederek (10), glutamat salınımını azaltarak (11,12), fosfolipaz A2 inhibisyonu veya aktivasyonun önlenmesi ile (13), ve anti-apoptik (12,14) etkileriyle gerçekleştirdiği savunulmuştur. Genel kanı nöronal hasarda iyileşme için gerekli olduğudur (3-6, 9, 12, 15-17).

Literatüre bakıldığı zaman sitikolinle ilgili çıkmış çalışmalarda; tıkaçıcı-beyin damar hastalığında kullanımında doz arttıkça (min 500 mg-mak 6000mg) etki artarken maksimum doza ulaştığında etkide belirgin bir duraklama saptanmıştır (18).

Sitikolinle yapılan çalışmalarda; maksimum lethal dozu 4600mg/kg olarak bulunmuş, oral dozda verildiğinde lethal doza ulaşamamıştır (19). Yüksek doz verilen (2000mg/kg) hayvan çalışmalarında sitikolinin akut intoksitesisi görülmezken, 90 günlük çalışmada renal tübüler fosfor ve kalsiyum alımında artışla beraber kan-üre azotu düzeylerinde hafif bir yükselme saptanmıştır (20).

İnsan tıkaçıcı beyin damar hastalığı çalışmalarında görülen en sık yan etki mide ağrısı ve diyare olarak bildirilmiştir (19). Yan etkilerine bakıldığında sitikolinin güvenilir bir ilaç olduğundan söz etmek mümkündür.

Değişik çalışmalarda, sitikolin ve metabolitlerinin iskemik ve ya travmatik sinir sistemi hasarlarında olumlu etkileri bildirilmiş olmasına rağmen periferik sinir hasarındaki etkilerinin araştırıldığı çalışma azdır. Daha önce kliniğimizde bu konuda Özyay ve ark. (4) tarafından yapılan çalışmada periferik sinir hasarı sonrası primer onarım yapılan sıçanlarda topikal uygulanan sitikolinin perinöral skar dokusunu azalttığı, aksonal rejenerasyonu ve aynı zamanda fonksiyonel geri kazanımı arttırdığı gösterilmiştir. Aslan ve ark. (21), siyatik sinirde kesi ve primer anastomoz sonrası topikal CDP-kolin, sitidin, kolin, sitidin+kolinin topikal etkilerini primer anastomoz modelinde incelemiş ve sitidin+kolin ve CDP-kolin uygulamasının skar dokusu oluşumunun engellenmesinde etkili olduğu, sitidin ve kolin birlikte verildiğinde aksonal rejenerasyonu potansiyelize ederek fonksiyonel geri kazanımı arttırdığını saptamıştır. Caner ve ark. (22) ise siyatik sinirde kesiden sonra primer anastomoz uygulayarak, sistemik CDP-kolin (sitikolin), sitidin, kolin ve sitidin+kolin uygulanmasının perinöral skar dokusu, aksonal rejenerasyon ve fonksiyonel geri kazanım üzerine etkilerini değerlendirmiş ve CDP-kolin'in sistemik olarak uygulanması hem skar dokusu oluşumunu engelleyerek hem fonksiyonel geri kazanımı arttırarak hem de rejenerasyonu güçlendirerek periferik sinir kesisini takiben primer onarımda pozitif etki gösterdiğini gözlemlemiştir.

Çalışmamızda kliniğimizde daha önceki yapılan bu çalışmalardan yola çıkarak primer anastomoz modelinde sistemik olarak uygulanan CDP-kolin'in farklı dozlarda uygulanmasının sinir iyileşmesi üzerine etkileri araştırıldı.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Yetiştirme ve Araştırma Merkezi'nde Ocak 2011-Ağustos 2011 tarihleri arasında gerçekleştirildi.

UÜTF Deney Hayvanları Bakım ve Kullanım Komitesi'nin onayını takiben (2010-01/06) sıçanlar UÜTF Deney Hayvanları Yetiştirme ve Araştırma Merkezi'nden temin edildi.

Çalışmamızda ağırlıkları 200-270 gram arasında değişen 60 adet erişkin Wistar Albino cinsi dişi sıçan kullanıldı. Tarafsız bir görevli tarafından rastgele seçilen sıçanlardan 4 grup oluşturuldu. Tüm sıçanlara sol gluteal bölgeden intramuskuler olarak uygulanan Ksilazin 10 mg/kg (Rompun, Bayer, Türkiye) ve 70 mg/kg Ketamin (Ketalar, Eczacıbaşı, Türkiye) ile anestezi sağlandı. Sıçanlar prone pozisyona getirilerek tüm ekstremiteleri operasyon masasına tespit edildi. Sağ uyluk ve inguinal bölge altına yerleştirilmiş 1 cm kalınlığında rulo gazlı bez ile operasyon sahasına yükseklik kazandırıldı.

Operasyon sahası povidone İodine (Glividon ®, Bikar İlaç San, İstanbul) solüsyonu ile temizlendikten sonra girişim yapılacak saha açık kalacak şekilde deneklerin üzeri steril olarak örtüldü. Cerrahi girişim mikroskop (Zeiss Opmi 6) altında mikrocerrahi yöntemler kullanılarak yapıldı.

Tüm gruplarda sağ gluteal bölgeden uyluk posterioruna uzanan 3 cm uzunluğunda posterior longitudinal cilt insizyonu yapıldı. M. gluteus superficialis ve m biceps femoris kaslarının bileşke hattı ve üzerini çevreleyen fasya künt disseksiyon ile açılarak siyatik sinir ortaya kondu. Siyatik sinir siyatik foramenden tibial ve peroneal dalların ayrıldığı noktaya kadar olan ünifasiküler olduğu bölümde üzerindeki membranöz yapılar disseke edilerek çevre dokulardan izole edildi. Siyatik sinir siyatik foramenden 10 mm uzaklıkta root hooku ile hafifçe kaldırılarak mikro makas ile düzgün tam kat sinir kesisi oluşturuldu. Epinöral sinir tekniği kullanılarak proksimal ve distal sinir güdüklüğü

8-0 polypropylene sütür ile (Prolene, Ethicon ® Ltd, Somerville NJ, USA) ile aralarında 180° bulunan iki ayrı noktadan sütüre edildi ve primer anastomoz sağlandı. Anastomoz işlemleri esnasında gerginlik oluşturulmamasına dikkat edildi. İşlemler esnasında meydana gelen küçük kanamalar kompresyon ile durduruldu. Künt disseksiyon ile ayrıştırılan fasya ve kas dokusuna uygulanan traksiyon serbestleştirildiğinde spontan olarak siyatik sinirin üzerini yeniden kapattığı için sütüre edilmedi. Cilt 4-0 polypropylene (Prolene, Ethicon ® Ltd, Somerville NJ, USA) sütür ile sütüre edildi.

1. Kontrol (K) Grubu (n:15): Oluşturulan sinir hasarını ve tamirini takiben hemen tüm sıçanlara intraperitoneal (ip) 2 cc SF enjekte edildi.
2. C-300 Grubu (n:15): Oluşturulan sinir hasarını ve tamirini takiben hemen tüm sıçanlara 2 cc SF içinde sulandırılmış 300 umol/kg ip CDP-kolin enjekte edildi.
3. C-600 Grubu (n:15): Oluşturulan sinir hasarını ve tamirini takiben hemen tüm sıçanlara 2 cc SF içinde sulandırılmış 600 umol/kg ip CDP-kolin enjekte edildi.
4. C-900 Grubu: (n:15): Oluşturulan sinir hasarını ve tamirini takiben hemen tüm sıçanlara 2 cc SF içinde sulandırılmış 900 umol/kg ip CDP-kolin enjekte edildi.

Tüm denekler deney sonunda spontan olarak uyandırıldı ve serbest hareket edebilmeleri için kafeslerine bırakıldı. Sıçanlar cerrahi girişim öncesi ve sonrasında her bir kafese 4 adet sıçan düşecek şekilde kafeslerde barındırıldı. Her kafes numaralandırıldı ve sıçanlar kulaklarına konulmuş işaretler ile birbirinden ayrılarak numaralandırıldı. Cerrahi işlem sonrasında tüm sıçanlar standart sıçan yemi ve su ile beslendi, mobilize olmalarına izin verildi.

Değerlendirme:

Makroskopik değerlendirme :

Bütün sıçanlar kesi ile oluşturulan periferik sinir hasarı ve yapılan cerrahi işlem sonrasında kendilerine yönelik zarar verici davranışları açısından takip edildi. Sağ ayak parmaklarında oluşan hiperemi, ödem ve ülser şeklinde gözlenen bulgular kaydedildi. Postoperatif 12. hafta sonunda incelemeye alınan ve yaşayan deneklerin tamamı uygulanan yüksek doz Tiopental verilerek sakrifiye edildi. Eski cilt insizyonu açılarak siyatik sinirin çevre dokuya olan yapışıklığı ve bu dokulardan ayrılabilirliği değerlendirildi. Değerlendirmede cilt ve adele fasyasının kapanmasını, sinirin çevre kas kütesine yapışıklığını ve bu yapılardan ayrılabilirliğini belirleyen kriterler Petersen ve ark. (23) tarafından tarif edilen numerik gradeleme şeması kullanılarak kantitatif skorlara dönüştürüldü (Tablo-1). Siyatik sinirler başlangıcı çevreleyen dokusu ve tamir edilen segmentini içerecek şekilde enblok olarak çıkarıldı ve histopatolojik inceleme için %4 Gluteraldehid içine konuldu.

Tablo-1: Petersen ve ark. (23) tarafından tanımlanan Makroskopik Değerlendirme İçin Sayısal Değerlendirme şeması :

Doku	Grade	Tanımlama
Cilt ve adele fasyası	1	Tamamen kapanmış
	2	Kısmen açık
	3	Tamamen açık
Sinir yapışıklığı ve ayrılabilirliği	1	Disseksiyon yok veya hafif künt disseksiyon
	2	Biraz kuvvetli künt disseksiyon
	3	Keskin disseksiyon

Histomorfolojik Değerlendirme:

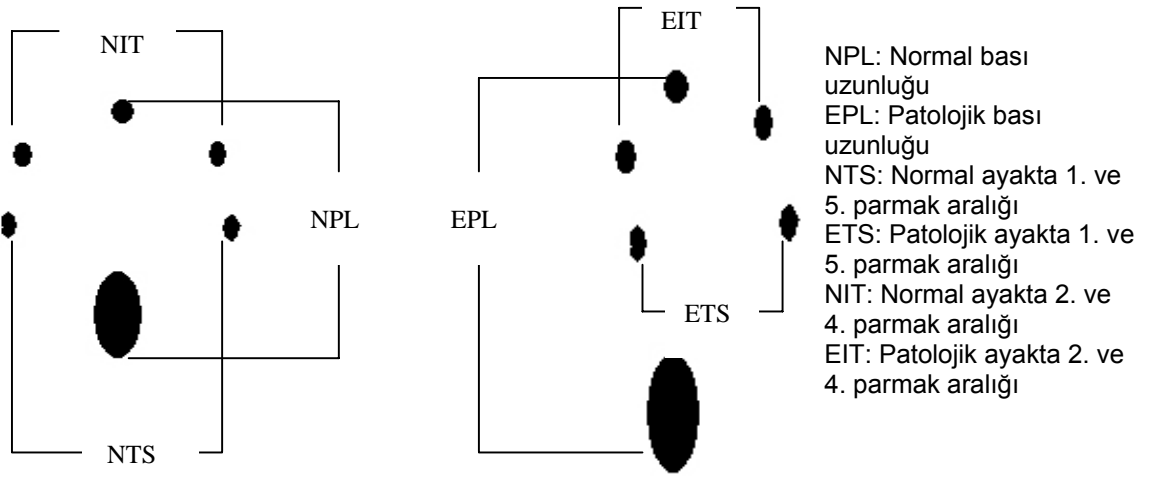
Histomorfolojik değerlendirme Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Anatomi laboratuvarında gerçekleştirildi. Anastomoz alanını içeren yaklaşık 0.5 cm uzunluğundaki dokular 0.1 mol/L fosfat tamponu içerisindeki %4 gluteraldehit (pH 7.4) içerisinde bir gece süresince tespit edildi. Ertesi gün 2 saat süre ile 0.1 mol/L fosfat tamponu içerisindeki %1 Osmium tetroksit (OsO_4) ile postfikse edilecek olan doku örnekleri, artan yüzdelerdeki alkol serileri içerisinde dehidrate edilerek, propilen oksit ile muamele edildi ve Spur's resin(Agar Scientific, Stansted, UK) içerisine gömülerek 70 C° de bir gece süresince polimerize edildi.

Elde edilen resin bloklardan sinir dokusunun uzun eksenine dik olacak şekilde 0.5 µm kalınlığında yarı ince kesitler alındı ve lam üzerine çıkarılan kesitler %1 toludin mavisi - %1 boraks karışımı ile boyandı.

Akson sayımları sinir dokusunun hangi gruba ait olduğunu bilmeyen tek bir araştırmacı tarafından gerçekleştirildi. Görüntülerin yakalanması ve analizi, "Nikon 4S-2 Alphaphot" ışık mikroskobuna bağlı "Sony Cybershot DSC-F717" sayısal kamera ve "Scion-Image" yazılımı işleten bir PC kullanılarak gerçekleştirildi. Tüm ölçüm ve sayımlar öncesinde, görüntü analiz sistemi, bir "tabla mikrometresi" aracılığıyla kalibre edildi. Siyatik sinir kesit yüzeyi toplam alanı 4x büyütmede yakalanan görüntüler üzerinde hesaplandıktan sonra, her bir sinir örneği için 10 adet mikroskop alanı 40x objektif ile yakalandı, yakalanan görüntüler üzerine bir "sayım çerçevesi" süperimpoze edilerek sayım alanı içerisinde bulunan myelinli aksonlar non-biased sayım kuralları dahilinde sayılarak milimetre karedeki akson sayıları (aksonal dansite) belirlendi. Daha sonra siyatik sinir yüzey alanı kullanılarak toplam myelinli akson sayıları hesaplandı. Aksonal dansite ve toplam akson sayıları Kruskal-Wallis testi kullanılarak kontrol grubundan elde edilen sayılarla karşılaştırıldı.

Fonksiyonel Değerlendirme:

Tüm sıçanlar her iki arka ayakları mürekkebe batırıldıktan sonra 144x10x10 cm boyutlarında oluşturulmuş bir yürüme koridorunda yürütüldü. Yürüme işlemi en iyi bası uzunluğu ve parmak arası mesafeler görülene dek bir kaç defa tekrarlandı. Cerrahi işlemi takiben 4. - 8. - 12. haftalarda yürüme yolu analizleri tekrar edildi. Tüm sıçanlarda fonksiyonel değerlendirme tanımlanan siyatik fonksiyon indeksi (SFİ) formülü kullanılarak kaydedildi (24, 25), (Şekil-1).



$$SFİ = - 38,3 \times \left[\frac{EPL - NPL}{NPL} \right] + 109,5 \times \left[\frac{ETS - NTS}{NTS} \right] + 13,3 \times \left[\frac{EIT - NIT}{NIT} \right] - 8,8$$

Şekil-1: SFİ hesaplanması :

Elektrofizyolojik Değerlendirme:

Tüm EMG kayıtları Uludağ Üniversitesi Tıp Fakóltesi Nörofizyoloji laboratuvarında Dantec Keypoint 4 (Medtronik) marka cihazda geręekleřtirildi. Tüm sıçanlarda anastomozdan 3 ay sonra, sakrifiye edilmeden önce sol gluteal bölgeden intramuskuler olarak uygulanan Ksilazin 10 mg/kg (Rompun, Bayer, Türkiye) ve 70 mg/kg Ketamin (Ketalar, Eczacıbaşı, Türkiye) ile anestezi sağlandı. Sıçanlar prone pozisyona getirildi ve tüm ekstremiteler flaster yardımıyla EMG uygulanacak masaya fikse edildi. Kayıtlar m. gastroknemiustan yapıldı. Aktif kayıtlayıcı elektrod olarak kullanılan cup elektrod m. gastroknemius karıncığının üzerine referans cup elektrod ise ayak sırtına yerleştirildi. Toprak elektrod olarak kullanılan cup elektrod karına yerleştirildi. Uyarıcı katod elektrod olarak monopolar ięne, anod olarak ise yine cup elektrod kullanıldı. Katod ile anod uçlar arası mesafenin 2 cm olmasına dikkat edildi. Gluteal bölgede cilt üzerinde Ophtalmic Knife (MANI) ile oluşturulmuş yaklaşık 1-2 mm'lik bir delikten monopolar ięne elektrodu ile girildi. İğne elektrodu siyatik sinire en yakın noktada konumlandırıldı. Uyarılar 0.04 msn'lik sürelerle giderek artan şiddette verildi. Klinik olarak en iyi plantar fleksiyonun gözleendiği konumda EMG'de en iyi cevap kaydedildi. Cevabın izoelektrik hattan elektronegatif olarak başlamasına ve artefaktın az olmasına dikkat edildi. Oluşan bileşik kas aksiyon potansiyelinin amplitude süresi, alanı ve latansı kaydedildi (şekil-2).



Şekil-2: Örnek EMG kaydı

İstatistiksel Analiz

Çalışmanın analizleri SPSS 13.0 (Chicago, IL.) programında yapılmıştır. CDP-kolin'in farklı doz grupları ve kontrol gruplarından elde edilen makroskopik, epinöral skar dokusu, fonksiyonel, elektrofizyolojik değerlendirme skorları, aksonal dansite ve akson sayısı ölçümleri; Kruskal-Wallis testiyle değerlendirilerek anlamlı olan gruplar Mann-Whitney-U testi ile analiz edildi. Kantitatif sonuçların tümü aritmetik ortalama olarak ifade edildi ve istatistiksel analizde $p < 0,05$ sonucu anlamlı olarak kabul edildi.

BULGULAR

Cerrahi Girişim Sonuçları:

İşlem sonrası K grubunda 4 hayvan, C-300 grubunda 1 hayvan, C-600 grubunda 2 hayvan, C-900 grubunda 1 hayvan anestezi sırasında kaybedildi (Tablo-2).

Tablo-2: Gruplardaki işlem sonrası kalan hayvan sayısı :

Grup	sayı	oran
K	11	21,2
C-300	14	26,9
C-600	13	25,0
C-900	14	26,9
Toplam	52	100,0

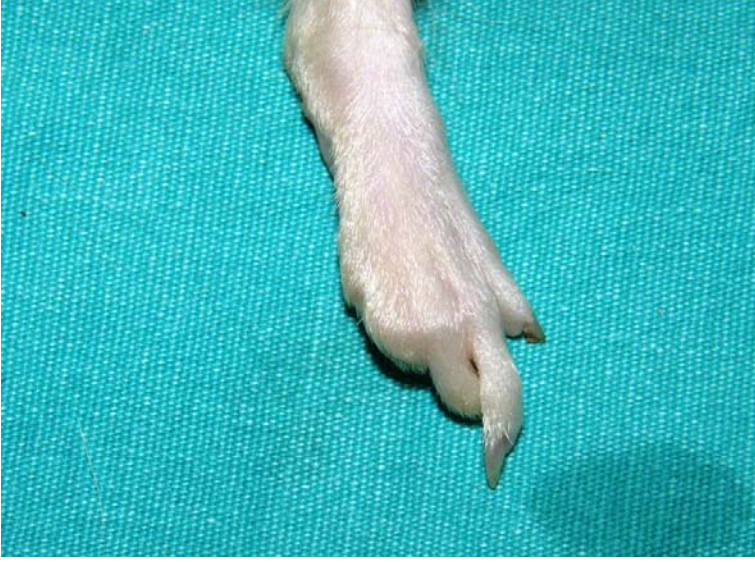
K:Kontrol grubu

C-300: 300 umol/kg uygulanan grup

C-600: 600 umol/kg uygulanan grup

C-900: 900 umol/kg uygulanan grup

İlk 4 haftalık süreçte tüm hayvanlar içinde toplam 14 tanesinde sağ ayak 3-4 ve 5. parmaklarda nöropatik ağrıya bağlı ülsere yaralar ve amputasyon görüldü. Bu parmak kayıplarının yürüme yolu analizlerini etkileyeceği düşünülerek bu hayvanlar yürüme yolu testine tabi tutulmadı (Şekil-3).



Şekil-3: Self mutilasyona bağlı 3.,4.,5. parmakta amputasyon

Makroskopik Değerlendirme Sonuçları:

Tüm sıçanlarda 12. hafta sonunda yapılan değerlendirmede cilt ve adele fasyasının tamamen kapandığı, insizyon hattında enfeksiyon ve ya enflamatuar bulgu olmadığı görüldü. 12. hafta sonunda kontrol grubundan 11 hayvan, C-300 ve C-900 grubundan 14 ve diğer C-600 grubundan 13 hayvanın tamamen kapanmış olan insizyon hattı yeniden açılarak makroskopik değerlendirmeye tabi tutuldu (Tablo-3). Değerlendirme Petersen ve ark. (22, 23) tarafından tanımlanan numerik değerlendirme skalasına göre yapıldı (Tablo-1).

12. hafta sonunda cilt ve adele kapanması açısından 4 grup arasında Kruskal Wallis testi ile yapılan analiz ile gruplar arasında anlamlı farklılık saptandı ($p < 0.02$). Alt grup analizleri Mann - Whitney U testi ile yapılarak değerlendirildi. K grubuna göre C-300, C-600 ve C-900 grubunda düzelme istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0.05$). C-300, C-600 ve C-900 grubu arasında anlamlı fark saptanmadı ($p > 0.05$), (Tablo-4).

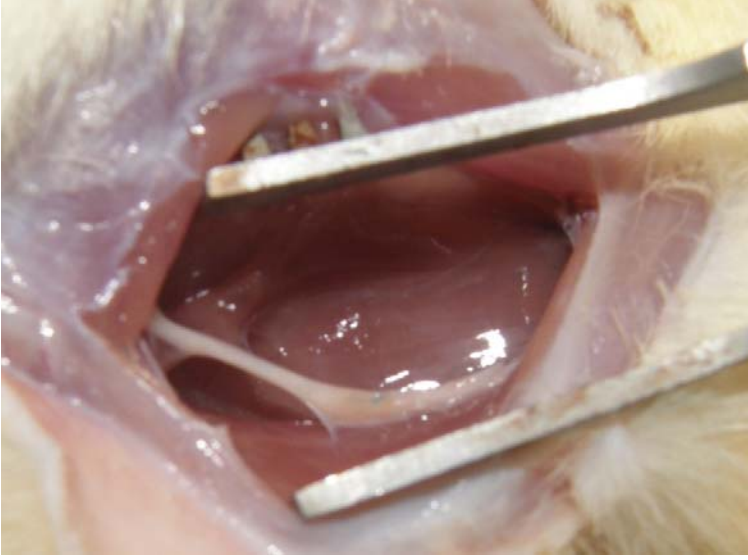
Tablo-3: Makroskopik değerlendirme için kullanılan sayısal değerlendirme skalasının ortalama, minimum ve maksimum değerleri:

Grup	Sayı
K Grubu n Med Min Max	11 3 2 3
C-300 Grubu n Med Min Max	14 2 1 3
C-600 Grubu n Med Min Max	13 2 1 3
C-900 Grubu n Med Min Max	14 1 1 3
Toplam n Med Min Max	52 2 1 3

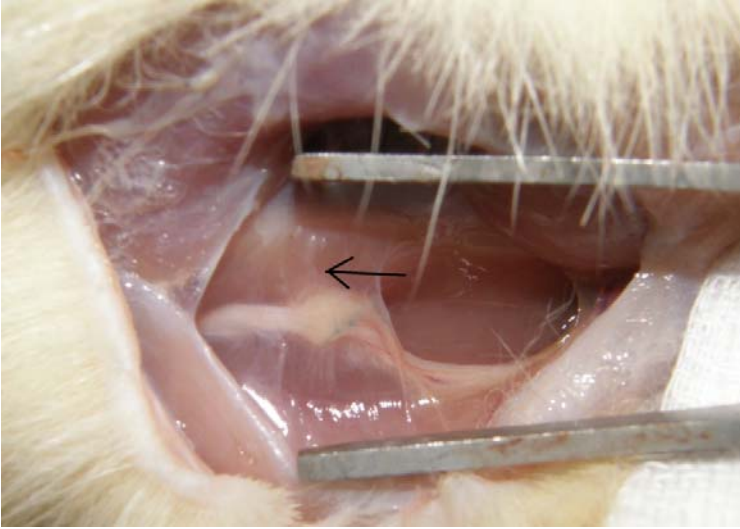
Tablo-4: Cilt ve adale kapanmasında gruplar arasındaki karşılaştırmanın istatistiki verileri :

Grup	P değerleri
K / C-300 grubu	0.015
K / C-600 grubu	0.013
K / C-900 grubu	0.001
C-300 / C-600 grubu	0.756
C-300 / C-900 grubu	0.104
C-600 / C-900 grubu	0.220

Kırmızı punto ile yazılanlar istatistiksel olarak anlamlıdır.



Şekil-4: Cerrahi sahada gelişen ince membranöz doku x4



Şekil-5: Cerrahi sahada gelişen siyah ok ile gösterilen kalın konnektif doku x4

Fonksiyonel Değerlendirme Sonuçları:

4, 8, 12. haftalarda yapılan yürüme yolu analizi sonucunda hesaplanan siyatik fonksiyon indeksi sonuçlarının ortalama değerleri Tablo- 5' de verilmiştir. Tüm gruplara kendi ilerinde 4. 8. ve 12. haftalar arasında Kruskal wallis testi ile analiz yapıldığında 12. haftaya doğru siyatik fonksiyon indeksinde (SFİ) anlamlı olarak düşme gözlendi ($p<0,01$) (Tablo-5).

Tablo-5: 4 - 8 - 12. haftalardaki siyatik fonksiyon indeksi ortalama, minimum ve maksimum değerleri:

grup	4.hafta SFİ	8.hafta SFİ	12.hafta SFİ
K Grubu n Med Min Max	11 -93.795 -127.019 -61.068	11 -90.445 -125.736 -66.765	11 -90.0 -101.702 -71.831
C-300 Grubu n Med Min Max	9 -99.074 -115.638 -72.564	9 -89.074 -105.044 -66.771	9 -85.552 -105.998 -62.043
C-600 Grubu n Med Min Max	8 -102.608 -113.021 -68.778	8 -72.286 -101.007 -54.830	8 -70.048 -98.847 -52.075
C-900 Grubu n Med Min Max	10 -113.841 -132.682 -81.446	10 -86.706 -104.025 -72.153	10 -81.449 -92.817 -64.303
Toplam n Med Min Max	38 -99.422 -132.682 -61.068	38 -85.596 -125.736 -54.830	38 -81.449 -105.998 -52.075

Gruplar birbiri ile karşılaştırıldığında ise K ve C-300 grubuna göre; C-900 grubunda düzelmenin istatistiksel olarak anlamlı olduğu ($p<0.05$), K grubuna göre C-600 grubunda da istatistiksel olarak anlamlı düzelme olduğu görüldü. C-600 ve C-900 gruplarının ise kendi aralarında değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görüldü ($p>0.05$), (Tablo-6).

Tablo-6: 4-8-12. hafta siyatik fonksiyon indeksi sonuçlarının gruplara göre istatistiksel olarak karşılaştırılması:

Grup	P değerleri
K / C-300 grubu	0.370
K / C-600 grubu	0.009
K / C-900 grubu	0.008
C-300 / C-600 grubu	0.167
C-300 / C-900 grubu	0.043
C-600 / C-900 grubu	0.633

İstatistiksel olarak anlamlı olanlar kırmızı punto ile yazılmıştır.

Elektrofizyolojik Değerlendirme Sonuçları:

Elde edilen elektrofizyolojik kayıtlamalardan sinir aksiyon potansiyel amplitüd değerleri istatistiksel olarak analiz edildi. 12. hafta sonunda 4 grup arasında Kruskal wallis testi ile yapılan analiz ile gruplar arasında anlamlı farklılık saptandı ($p<0.03$). Mann whitney U testi ile yapılan analizlerde K grubuna göre C-600 ve C-900 gruplarının istatistiksel olarak anlamlı derecede EMG kayıtlarının iyi olduğu görüldü. C-300, C-600 ve C-900 grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı görüldü ($p>0.05$), (Tablo- 7, 8).

Tablo-7: Latans değerlerinin gruplara göre ortalama, minimum ve maksimum değerleri:

Grup	Sayı
K Grubu n Med Min Max	10 2.55 1.4 5.1
C-300 Grubu n Med Min Max	14 1.95 1.4 3.2
C-600 Grubu n Med Min Max	13 1.8 1.4 3.4
C-900 Grubu n Med Min Max	14 1.65 1.4 2.5
Toplam n Med Min Max	51 1.8 1.4 5.1

Tablo-8: Gastroknemius kasından elde edilen EMG değerlerinin latansının gruplara göre p değerleri:

Grup	P değerleri
K / C-300 grubu	0.192
K / C-600 grubu	0.042
K / C-900 grubu	0.011
C-300 / C-600 grubu	0.350
C-300 / C-900 grubu	0.062
C-600 / C-900 grubu	0.402

İstatistiksel olarak anlamlı olanlar kırmızı punto ile yazılmıştır.

Histomorfolojik Değerlendirme Sonuçları:

Toplam akson sayıları değerlendirildiğinde K, C-300, C-600 grubuna göre C-900 grubunda daha fazla myelinli akson sayıldı (Tablo-9, 10). Aksonal dansite diğer gruplara göre daha yüksek olarak görüldü. C-900 grubundaki iyileşme istatistiksel olarak diğer gruplara göre anlamlı olmasa da hem akson sayısındaki artış hemde diğer gruplara bakıldığında morfolojik olarak myelinli aksonlarının daha büyük olarak görülmesi, fibröz dokunun daha az görülmesi, rejenerasyonun C-900 grubunda diğer gruplardan daha iyi olduğunu düşündürmüştür (Şekil-6, 10).

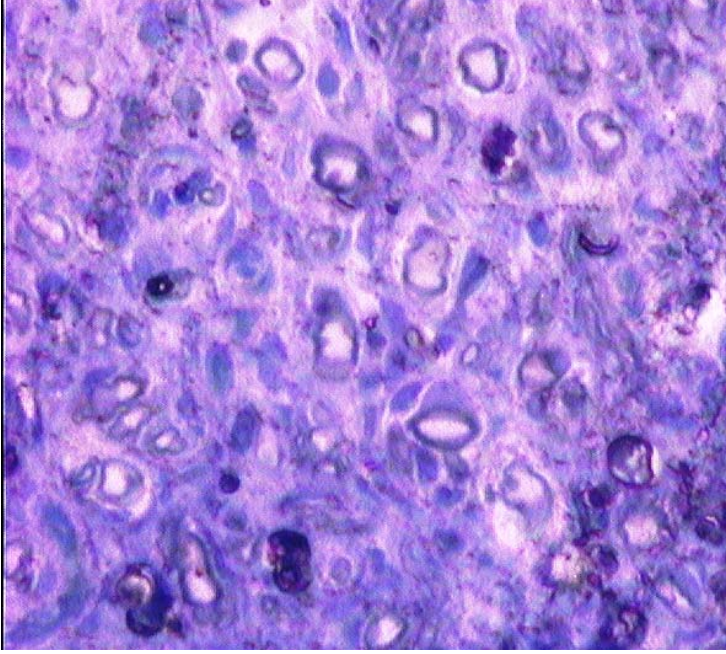
Tablo-9: Toplam akson sayısı ve aksonal dansitenin gruplara göre ortalama, minimum ve maksimum değerleri:

Grup	Total akson sayısı	Aksonal dansite
K Grubun	6	6
Med	6503.629	20761,72
Min	4950.820	14687.50
Max	7502.380	24765.63
C-300 Grubun	6	6
Med	5851.171	15957.030
Min	4461.680	13398.440
Max	9615.430	25390.630
C-600 Grubun	6	6
Med	6371.871	19941.410
Min	4928.480	17539.060
Max	7920.440	27578.130
C-900 Grubun	6	6
Med	6941.566	24375.000
Min	4360.820	20273.440
Max	11051.870	42070.310
Toplam n	24	24
Med	6409.203	20996.095
Min	4360.820	13398.440
Max	11051.870	42070.310

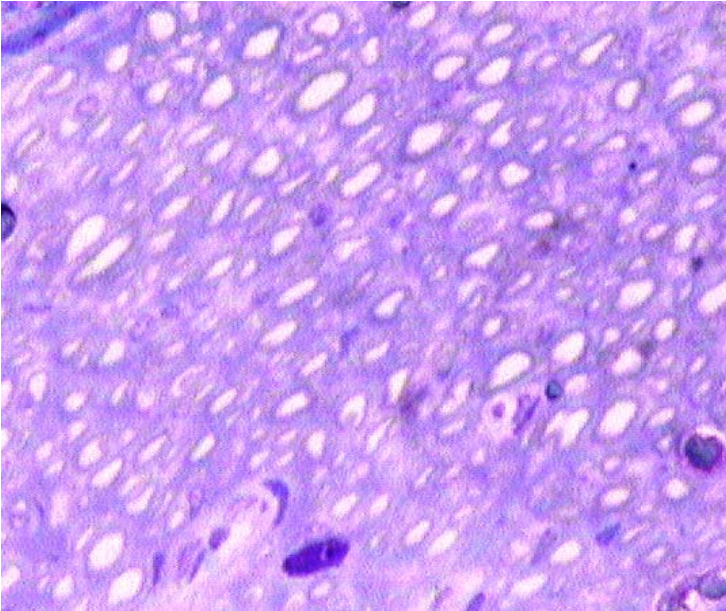
Toplam akson sayısı ve aksonal dansite için her gruptan 6 sıçanın siyatik sinir örnekleme yapılmıştır.

Tablo-10: Toplam akson sayısı ve aksonal dansite için p değerleri:

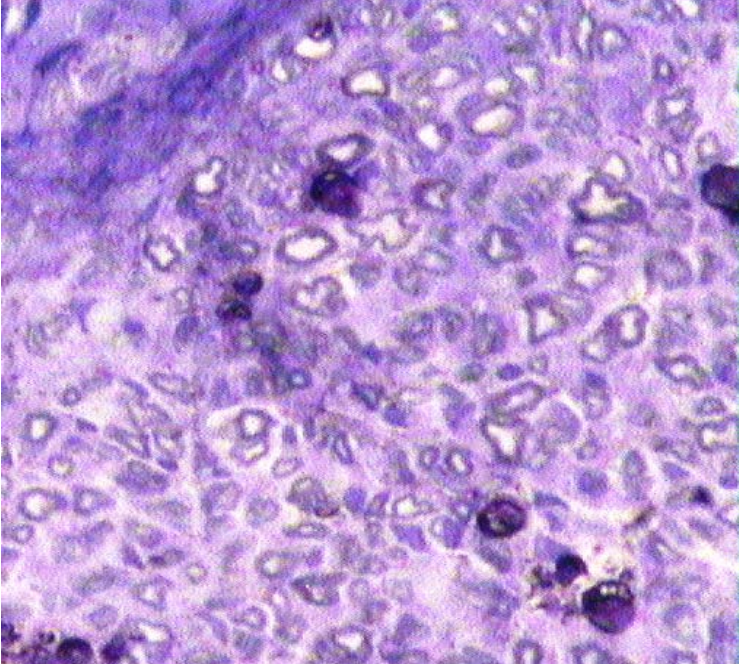
Grup	Total akson sayısı p değeri	Aksonal dansite p değeri
K, C-300, C-600, C-900 grupları	0.646	0.082



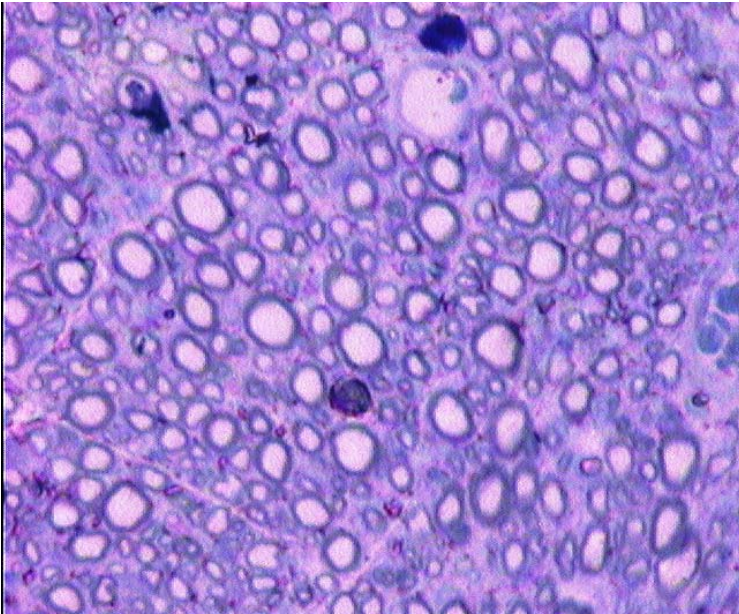
Şekil-6: Kontrol grubuna ait sinir kesiti, Toluidine blue, X40.



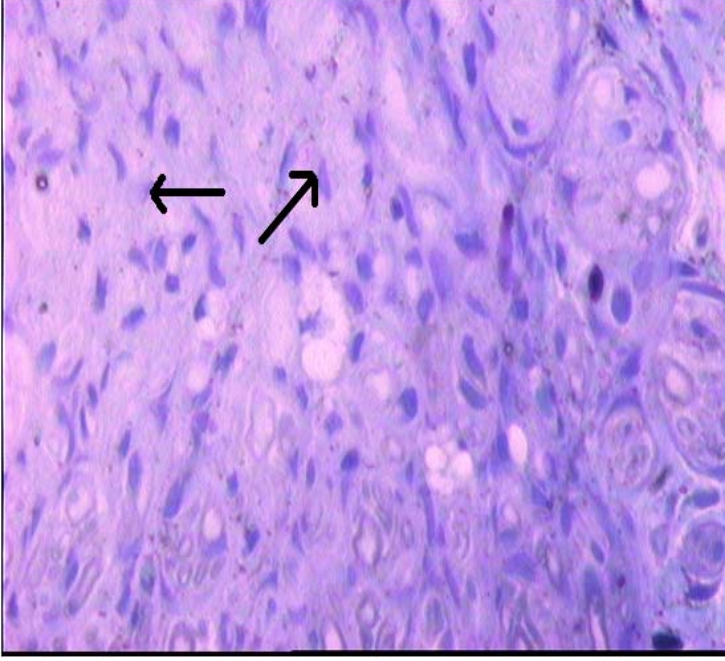
Şekil -7: C-300 grubuna ait sinir kesiti, Toluidine blue, X40.



Şekil-8: C-600 grubuna ait sinir kesiti, Toluidine blue, X40.



Şekil-9: C-900 grubuna ait sinir kesiti, Toluidine blue, X40.



Şekil-10:Bazı örneklerde görülen siyak ok ile gösterilmiş fibröz doku bantları.

TARTIŞMA VE SONUÇ

İdeal sinir onarımında etkili olabilecek bir çok faktör vardır. Sinir yaralanması sonrası canlı kalan nöron sayısı, aksonal büyümenin özelliği, rejenerere olan aksonun durumu, hedef dokunun durumu gibi faktörler bu süreçte rol almaktadır (5, 16). Aksonun yaralanması sonrası tamir tüm nöronu kapsayan bir süreçtir. Aksonal filizlenme, büyüme ve reinnervasyon ile sonuçlanan aksonal rejenerasyon ise bu sürecin en önemli bölümünü üstlenmektedir (16, 26). Uygun bir rejenerasyon için; büyüme faktörlerinin ekspresyonu, sitokinler, nöropeptidler, transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu, enflamatuvar yanıt gibi mekanizmalar sorumlu tutulmaktadır (26, 27). Oluşmuş olan sinir yaralanması sonrası, mikroşirürjikal teknikle primer sütür ile anatomik olarak akson aksona tekrar birleştirme günümüzde hala altın standart yöntem olarak kabul edilmektedir (16, 26).

Yaralanma sonrası fonksiyonel geri kazanımı etkileyen pek çok faktör ortaya atılmıştır. Nörinom gelişimi, travma ve onarım yerinde enfeksiyon, uygulanan sütür teknikleri, skar dokusu gelişimi, sinirde meydana gelen traksiyonun etkileri gibi bir çok faktör sinir iyileşmesinde rol oynamaktadır (16, 26). Sinir ucunda nörinom gelişimi aksonal rejenerasyon dolayısıyla fonksiyonel geri kazanımı etkileyen en önemli faktörlerden biridir. Nörinom gelişimini engellemek için otolog bypass teknikleri (28,29), Schwann hücreleri içeren sinir greftleri (30, 31), çeşitli endojen ve eksojen büyüme faktörleri (9, 11-17, 32-40), sinir boşluğuna çeşitli maddeler içeren tübüler sistemlerin yerleştirilmesi (41-45), fibrin glue kullanımı (46) tekniklerle yapılan çalışmalarda olumlu sonuçlar elde edilmiştir. Günümüze gelindiğinde bu deneysel çalışmaların çok azı klinik kullanıma girerek başarılı olabilmektedir.

Epinöral skar dokusu gelişiminin de fonksiyonel kayıp gelişmesinde önemli faktörlerden birisi olduğu gösterilmiş ve iyileşmenin skar formasyonu ile Schwann hücrelerindeki rejenerasyona bağlı olduğu düşünülmüştür (47).

Sunderland ve ark. (48), kesi sonrası distal sinir segmentinde başlayan kollajen artışı ve endonöral tüplerin büzülmesi gibi yapısal değişikliklerin denervasyon sürecinde de devam ederek fiberlerin çapında % 80-90 azalmaya yol açtığını göstermiştir. Literatürde bildirilen bir çok çalışmada topikal uygulanan aprotinin, mitomycin C, insan amniyon mayi, hyalüronik asit, Adcon T, doku plasminojen aktivatörü (TPA) gibi çeşitli maddeler ile skar formasyonunun engellenebildiği gösterilmiştir (23, 49-53). Aynı şekilde sistemik uygulanan metilprednizolon ve cishidroksiprolinin antienflamatuar etkileriyle skar dokusu oluşumunu azalttığı gösterilmiştir (48). Yapılan klinik çalışmalarda sistemik kullanımıyla yan etki oluşturmayan ve nöronal hasarda iyileşme için gerekli olduğu düşünülen sitikolinin daha önce kliniğimizde Özay ve ark. (4), yaptığı bir çalışmada periferik sinir kesisini takiben primer sütürasyon sonrası topikal uygulamasının skar dokusunu önleyerek kontrol grubuna göre aksonal rejenerasyonu anlamlı ölçüde arttırdığı gösterilmiştir. Bu etkinin detay incelemesi için yapılan çalışmada Aslan ve ark. (21); siyatik sinirde kesi ve primer anastomoz sonrası topikal CDP-kolin, sitidin, kolin, sitidin+kolinin topikal etkilerini primer anastomoz modelinde incelemiş ve sitidin+kolin ve CDP-kolin uygulamasının skar dokusu oluşumunda etkili olduğu, aksiyonel rejenerasyonu potansiyelize ederek fonksiyonel geri kazanımı arttırdığı ve bu etki için sitidin ve kolinin ortamda birlikte bulunmaları gerektiğini saptamıştır.

Daha önce kliniğimizde Caner ve ark. (22) ise yaptığı çalışmada sistemik kullanımında bu maddelerin aynı etkilerin elde edilip edilemeyeceği araştırıldı. 12. hafta sonunda yapılan değerlendirmede kontrol grubuna göre sitidin, sitidin+kolin ve sadece kolin uygulanan gruplarda skar formasyonu açısından farklılık saptanmazken sistemik uygulanan CDP-kolin grubunda kontrol grubu ve diğer gruplara göre belirgin olarak daha az skar formasyonu geliştiği gözlenmiştir.

Bizim çalışmamızda ise sistemik yolla uygulanan CDP-kolin'in hangi dozda en iyi etkiyi sağladığı gösterilmeye çalışıldı. Yapılan fonksiyonel değerlendirme ve elektrofizyolojik çalışmalarda K ve C-300 grubuna göre , C-

600 ve C-900 grubunda sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı olarak bulunmuştur. Histomorfolojik değerlendirmede ise klinik olarak C-900 grubunda en iyi iyileşme sağlanmışken istatistiksel olarak fark saptanmamıştır. Bunun da incelenen olgu sayısının azlığı ile açıklanabileceği düşünülmüştür.

Fuminori ve ark. (5), tarafından bildirildiğine göre, sinir ileti hızı en hızlı ileten lifleri ölçer ve bu ölçümün; akson çapı internodal aralık ve myelinizasyon ile alakalı olduğu düşünülmüştür. Sinir aksiyon potansiyelinin amplitüd değeri myelinize aksonların oluşturduğu toplam elektrik akımına bağlıdır. Kim ve ark. (43), tavşan posterior tibial sinir üzerinde yaptıkları bir çalışmada sinir aksiyon potansiyeli amplitüd değerinin fonksiyonel geri kazanımın değerlendirilmesinde kullanılabileceğini göstermişlerdir. Wolthers ve ark. (54), yaptıkları çalışmada , fonksiyonel, elektrofizyolojik ve histopatolojik incelemelerde, sinir hasarındaki iyileşmenin bu üç parametreyle gösterilebileceğinden bahsetmişlerdir. Bizim çalışmamızda m.gastroknemiustan yapılan kayıtlamalarda oluşan aksiyon potansiyelinin amplitüdü, alanı ve latansı kaydedilmiştir. Fonksiyonel geri kazanımın değerlendirilmesinde aksiyon potansiyelinin latansı kullanılmıştır. 12. hafta sonunda yapılan değerlendirmede C-600 ve C-900 gruplarında diğer gruplara göre belirgin olarak anlamlı olacak şekilde iyi değerler saptandı. C-600 ve C-900 grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı. Elde edilen elektrofizyolojik bulgular diğer bulgularla korelasyon göstermektedir. Bu nedenle elektrofizyolojik kayıtlamaların periferik sinir hasarında fonksiyonel geri kazanımın değerlendirilmesinde kullanılabileceği ve özellikle doza bağlı olarak değerlendirildiğinde 600 ug/kg ve sonrasında elektrofizyolojik olarak anlamlı derecede düzelme elde edildiği görülmüştür.

Sitikolinin metabolize olması sonucu ortaya çıkan kolin; S-adenosyl-L-methionine ve sonra da glutatyona dönüşebilen bir maddedir. Glutasyon antioksidan özelliği nedeniyle nöroprotektif bir ajandır (7, 55, 56). Santral sinir sisteminde özellikle iskemi ve nörodejeneratif hastalıklarda sitikolinin etkisi kanıtlanmış fakat etki mekanizması tam olarak açıklanamamıştır. Ratlarda yapılan çalışmalarda yüksek doz kullanılan sitikolinin ,serebral iskemi

azalttığına dair bulgular elde edilmiştir (19, 57, 58). Sitikolinin yüksek dozlarda, demansta hipokampus çevresindeki nöronal hücre ölümünü azalttığı gösterilmiştir (56). Bir başka çalışmada ise kafa travmalı olgularda kullanılan sitikolinin genel son durum skorunu arttırarak fonksiyonel iyileşmeye katkıda bulunduğu gösterilmiştir (59). İskemi modelinde yapılan bir diğer çalışmada sistemik olarak uygulanan sitikolinin doza bağımlı olarak apoptozisi engellediği ve nöron koruyucu etki gösterdiği saptanmıştır (60). Bağdaş ve ark. (61), yaptığı çalışmada sitikolinin neuropatik ve inflamatuvar ağrı modelinde etkili olduğunu belirtmişlerdir. Başka bir çalışmada ise invitro lokal uygulanmasıyla retinal ganglion hücrelerinde nöron koruyucu potansiyelinin olduğu, hasar görmüş hücrelerde antiapoptotik etkisinin mitokondri hücre bağımlı ölüm mekanizmasını önleyerek gerçekleştirildiği düşünülmüştür (62). Aksotomize nöronların apoptozis ile öldükleri ve karakteristik morfolojik değişiklikleri ile DNA fragmentasyonun gerçekleştiği bilgisinden yola çıkarak (63) sitikolinin hem topikal hem de sistemik uygulamasının aksonetmezisin neden olduğu apoptozis ile gerçekleşen nöronal ölümü engellediği ve aksonal rejenerasyonu potansiyelize ettiği düşünülebilir. Bizim çalışmamızda K, C-300 ve C-600 grubuna göre yüksek dozda uygulanan C-900 grubunda, sitikolinin akson rejenerasyonunu daha fazla potansiyelize ederek akson sayısında artma ve myelinli akson sayısının morfolojisinde değişme olduğu gösterilmiştir.

Sitikolinin bir diğer koruyucu etki mekanizmalarından biri ise Fosfolipaz A2 (PLA₂) aktivasyonunu önlemesidir (64, 65). De ve ark. (66), sıçan siyatik sinirinde sağlam sinirde PLA₂ görülmezken periferik sinir hasarı sonucu Schwann hücrelerinde ilk 5 saat önemli ölçüde PLA₂'nin ortaya çıktığı ve sonra hasar bölgesine makrofajların ilerlediğini göstermişlerdir. Travma sonrasında 10 gün boyunca distal segmentte Schwann hücrelerinde ve immün hücrelerde PLA₂'nin artan oranda ortaya çıktığını göstermişlerdir. Bu süreç aynı zamanda myelin yıkımı ve fagositozun maksimal düzeyde olduğu dönemdir. PLA₂ fosfotidilkolini hidrolize ederek lipofosfotidilkolin ve araşidonik asit ortaya çıkarmaktadır ve myelin yıkımını indüklemektedir. PLA₂'nin periferik sinir

kesisinde bloke edilmesi myelin ve akson yıkımı ile fagositozu distal segmentte azaltmaktadır. Serebral iskemi modellerinde PLA₂'nin membran fosfolipidlerinin yıkımıyla araşidonik asit salınımını arttırdığı ve bunun da nöronal hücre ölümünü teşvik ettiği düşünülmektedir (64, 65). Buradan yola çıkarak sitikolinin periferik sinir hasarında Wallerian dejenerasyonun tetikleyicisi olan PLA₂'nin aktivasyonunu dolayısıyla akson ve myelin yıkımını önleyip, fosfolipid seviyesini artırarak (67) enflamatuvar yanıtı ve skar dokusu oluşumunu engelleyerek aksonal iyileşmeyi arttırdığı düşünülebilir. Çalışmamızda çevre dokuda oluşan skar dokusu değerlendirildiğinde, K grubuna göre C-300, C-600 ve C-900 gruplarında daha anlamlı sonuçlar elde edilmiştir.

Davalos ve ark. (68), 2002 yılında yaptıkları çalışmada stroke sonrası oral yolla farklı dozlarda verilen sitikolin tedavisinde doz arttıkça kontrol grubuna göre fonksiyonel iyileşmenin arttığı gösterilmiştir. Parisi ve ark. (69), yaptığı çalışmada, optik nöritli hastalarda kullanılan sitikolinin belirgin olarak görme alanı defektlerinde iyileşme sağladığını göstermişlerdir. Yücel ve ark. (70), spinal kord hasarı sonrası sitikolin uygulanan hayvanlarda neuroprotektif etkinin ve nöroanatomik bütünlüğün korunmasının kontrol grubuna göre daha anlamlı olduğunu göstermişlerdir. Hurdato ve ark. (71), yaptığı çalışmada uzun süreli CDP-kolin kullanıldığında neuronal plastisitenin arttığını ve fonksiyonel geri kazanımın arttığını göstermişlerdir. Çalışmamızda farklı dozlarda uygulanan sitikolinin fonksiyonel ve histopatolojik olarak doz bağımlı olarak özellikle yüksek dozda iyileşmeyi 12. haftada arttırdığı görülmüştür.

Fosfotidilkolin biyosentezinde önemli olan kolin kinaz, kolinofotransferaz ve fosfokolin sitidiltransferaz enzimleri nöronların aksonlarında bulunur. Araki ve ark.'nın (72), sıçan siyatik sinirinde yaptıkları çalışmada PC12 hücrelerinde nörit oluşumunun filizlendiği dönemde fosfotidilkolin sentezinin arttığını ve bu artışın da primer olarak kolinofotransferazdaki aktiviteyle ve onun diaçilgliserolle doymasıyla kontrol edildiğini düşünmüşler ve fosfotidilkolin sentezinin sinir büyüme faktörünün (NGF) açığa çıkmasıyla indüklenen nörit gelişimini arttırdığını bildirmişlerdir.

Sinir aksonunda büyüme ve rejenerasyon için gerekli olan protein lipid gibi maddelerin hücre gövdelerinde barındıkları ve anterograd olarak aksonlara taşındıkları bildirilmiştir (73). Fakat Vance ve ark.'nın (74) bildirdiklerine göre aksonların da fosfotidilkolin, sfingomyelin, fosfotidiletanolamin, fosfotidilserin, fosfotidilinositol ve serbest yağ asitlerini sentezleme yetenekleri vardır. Bu sebeple aksonal filizlenme için aksonlarda biyosentetik yolla fosfotidilkolin sentezinde sitikolinin enzimatik reaksiyonları gerekmektedir (74-76). Yapılan çalışmalarda ortak görüş sitikolinin fosfotidilkolin sentezini artırarak nöroprotektif etkisini gösterdiği (7, 8, 60, 77). Sitidin ve kolinin aynı anda verilmesi ile yapılan deneysel çalışmalarda serbest yağ asitlerinin fosfolipidlerle birleşmesini artırarak (78) ve amiloid prekürsör proteininin (APP) salınımını ve ekspresyonunu stimüle ederek (79) membran fosfolipidlerinin sentezini arttırdıkları gösterilmiştir. Daha önce kliniğimizde yapılan çalışmalarda; CDP-kolin verilen sıçanlar da aksonal dansite artışı ve fosfotidilkolin sentezini artırması yoluyla aksonal filizlenmede etki ettiği gösterilmiştir (4, 21, 22).

Çalışmamızda sitikolinin doz bağımlı etkinliğini kontrol grubu ve üç adet kademeli olarak yükselen dozlar kullanarak bulmaya hedefledik. SFİ, elektrofizyolojik çalışma, akson dansitesi ve sayısı gibi parametreler kullanarak en uygun dozu araştırdık. Bu parametreler değerlendirildiğinde; kontrol grubuna göre CDP-kolin'in etkin olduğu ve kademeli olarak C-300 grubuna göre C-600 ve C-900 grubunda sinir iyileşmesinin daha iyi olduğunu gözlemledik. C-600 ve C-900 grubu arasında anlamlı bir fark saptamadık. Histomorfolojik incelemede ise C-900 grubunda sayıları artan ve morfolojileri değişen myelinli akson akson sayılarına rağmen istatistiksel olarak fark saptanmamıştır. Literatürde sinir hasarının rejenerasyonunda kullanılan yöntemler kıyaslandığında; elektrofizyolojik çalışmalar, SFİ çalışmaları ve histomorfolojik çalışmalar arasında korelasyon her zaman olmasada , sinir rejenerasyonunu incelemede günümüzde en etkin yöntemler olarak gösterilmektedir (54, 80).

Sonuç olarak çalışmamızda sistemik olarak 600 ve 900 umol/kg dozlarında uygulanan CDP-kolin'in kontrol grubuna göre hem skar formasyonu

oluşumunu engelleyerek hem de aksonal rejenerasyonu potansiyelize ederek fonksiyonel düzelmeyi sağladığı SFİ ve elektrofizyolojik çalışmalarda saptanmıştır. Daha düşük doz olan 300 umol/kg dozunda ise kontrol tedavisine göre anlamlı fark saptanmamıştır. CDP-kolin tedavisi sonrası total akson sayısı ve aksonal dansite anlamlı olarak değişmemiş olsada, özellikle C-900 grubunda artan myelinli akson sayısı ve normale dönme eğilimi gösteren akson morfolojilerinin fonksiyonel iyileşmeye katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Çalışmamızda elde edilen verilerle periferik sinir kesisi ve primer anastomoz modelinde CDP-kolin'in aksonal rejenerasyon ve skarsız iyileşme üzerine doz bağımlı olarak etkinliğinin olduğu söylenebilir. İlerki çalışmalarda CDP-kolin'in periferik sinir hasarındaki yararlı etkilerinin mekanizmaları aydınlatılmalıdır.

KAYNAKLAR

- 1) Weiss GB. Metabolism and actions of CDP-choline as an endogenous compound and administered exogenously as citicoline. *Life Sci.* 1995; 56: 637-60.
- 2) Tayebati S.K, Tomassoni D, Stefano A.D, et al. Effect of choline-containing phospholipids on brain cholinergic transports in the rat. *J Neurol Sci.* 2011; 302: 49–57.
- 3) Yang Y, Liu Z, Cermak JM, et al. Protective effects of prenatal choline supplementation on seizure-induced memory impairment. *J Neurosci.* 2000; 20: 1-6.
- 4) Ozay R, Bekar A, Kocaeli H, et al. Citicoline improves functional recovery, promotes nerve regeneration, and reduces postoperative scarring after peripheral nerve surgery in rats. *Surg. Neurol.* 2007; 68: 615-22.
- 5) Fuminori K, John CF, Warren CB. Sciatic function index, nerve conduction tests, muscle contraction, and axon morphometry as indicators of regeneration. *Plast. Reconstr. Surg.* 1996; 98: 1264-71.
- 6) Lago N, Navarro X. Correlation between target reinnervation and distribution of motor axons in the injured rat sciatic nerve. *J Neurotrauma.* 2006; 23: 227-40.
- 7) Hurdato O, Moro MA, Cardenas A, et al. Neuroprotection offered by prior citicoline administration in experimental brain ischemia: effects on glutamate transport. *Neurobiol Dis.* 2005; 18: 336-45.
- 8) Fernandez-Murray JP, McMaster CR. Glycerophosphocholine catabolism as a new route for choline formation for phosphatidylcholine synthesis by the Kennedy pathway. *J Biol Chem.* 2005; 280: 38290-6.
- 9) Mohiuddin L, Delcroix D, Fernyhough P, Tomlinson R. Focally administered nerve growth factor suppresses molecular regenerative responses of axotomized peripheral afferent in rats. *Neuroscience* 1999; 91: 265-71.
- 10) Savcı V, Wurtman RJ. Effect of cytidine on membrane phospholipid synthesis in rat striatal slices. *J Neurochem.* 1995; 64: 378-84 .
- 11) Chai H, Wu W, So KF, Pevette DM, Oppenheim RW. Long term effects of a single dose of brain-derived neurotrophic factor on motoneuron survival following spinal root avulsion in the adult rat. *Neurosci Lett.* 1999; 274: 147-50.
- 12) Takasaki K, Uchida K, Fujikawa R, et al. Neuroprotective effects of citidine-5-diphosphocholine on impaired spatial memory in a rat model of cerebrovascular dementia. *Pharmacol Sci.* 2011; 116: 232-37.
- 13) Hansson HA, Dahlin LB, Danielsen N, et al. Evidence indicating trophic importance of IGF-I in regenerating peripheral nerves. *Acta Physiol Scand.* 1986; 126: 609-14.

- 14) Meyer M, Matsuoka I, Wetmore C, Olson L, Thoensen H. Enhanced synthesis of brain-derived neurotrophic factor in the lesioned peripheral nerve: different mechanisms are responsible for the regulation of BDNF and NGF mRNA. *J Cell Biol.* 1992; 119: 45-54.
- 15) G-Coviella I, Agut J, Wurtman RJ. Metabolism of cytidine 5-diphosphocholine (CDP-choline) following oral and intravenous administration to the human and the rat. *Neurochem Int.* 1987;11: 293-7.
- 16) Lundborg G. 25 th Anniversary Presentation. A 25-Year perspective of peripheral nerve surgery: evolving neuroscientific concepts and clinical significance. *J Hand Surg.* 2000; 25: 391-414.
- 17) Heumann R, Korsching S, Bandtlow C, Thoenen H. Changes of nerve growth factor synthesis in nonneural cells in response to sciatic nerve transection. *J Cell Biol.* 1987; 104: 1623-31.
- 18) Arenth PM, Russell KC, Ricker JH, Zafonte RD. CDP-choline as a biological supplement during neurorecovery: a focused review. *PM&R* 2011; 3: 123-31.
- 19) Conant R, Schauss AG. Therapeutic applications of citicoline for stroke and cognitive dysfunction in the elderly: a review of the literature. *Altern Med Rev.* 2004; 9: 17-31.
- 20) Schauss AG, Somfai-Relle S, Financsek I, et al. Single and repeated-dose oral toxicity studies of citicoline free-base (choline cytidine 5-pyrophosphate) in Sprague-Dawley rats. *Int J Toxicol.* 2009; 28: 479-87.
- 21) Arslan E, Kocaeli H, Bekar A, Tolunay Ş, Ulus İ.H. CDP-choline and its endogenous metabolites, cytidine and choline, promote the nerve regeneration and improve the functional recovery of injured rat sciatic nerves. *Neurol Res.* 2011; 33: 766-73.
- 22) Caner B: Periferik sinir kesisinde sistemik uygulanan sitidin, kolin, sitikolinin; aksonal rejenerasyon ve epinöral skar dokusu üzerine etkilerinin erken primer doku modelinde araştırılması, Uzmanlık Tezi, Bursa, Uludağ Üniversitesi; 2008.
- 23) Petersen J, Russell L, Andrus K, et al. Reduction of extraneural scarring by adcon-T/N after surgical intervention. *Neurosurgery* 1996; 38: 976-84.
- 24) Hare GMT, Evans PJ, Mackinnon SE et al. Walking track analysis: long term assessment of peripheral nerve recovery. *Plast Reconstr Surg.* 1992; 89: 251-8.
- 25) Monte-Raso VV, Barbieri CV, Mazzer N, Yamasita AC, Barbieri G. Is the Sciatic Functional Index always reliable and reproducible? *J Neurosci Methods.* 2008; 170: 255-61.
- 26) Beris AE, Lykissas MG. Experimental results in end-to-side neurorrhaphy. *Int Rev Neurobiol.* 2009; 87: 269-79.
- 27) Makwana M, Raivich G. Molecular mechanism in successful peripheral regeneration. *FEBS Journal* 2005; 272: 2628-38.
- 28) Adelson D, Bonarito EA, Thompson TP, Tran M, Nystrom NA. End-to-side neurorrhaphies in a rodent model of peripheral nerve injury: A preliminary report of a novel technique. *J Neurosurg.* 2004; 101: 78-84.

- 29) Shah MH, Kasabian AK, Karp NS, et al. Axonal regeneration through an autogenous nerve bypass: an experimental study in the rat. *Ann Plast Surg.* 1997; 38: 408-15.
- 30) Brown RE, Detlev E, Lyons SF, Suchy H. The use of cultured schwann cells in nerve repair in rabbit hind-limb model. *J Reconstr Microsurg.* 1996; 12: 149-52.
- 31) Komiyama T, Nakao Y, Toyama Y, et al. Novel technique for peripheral nerve reconstruction in the absence of an artificial conduit. *J Neurosci Methods.* 2004; 134: 133-40.
- 32) Blusttajn JK, Wurtman RJ. Choline and cholinergic neurons. *Science* 1983; 221: 614-9.
- 33) Baykal S, Usul H, Aliyacioğlu Y, Efe H, Duru S. Effects of nerve growth factor on acetylcholinesterase activity of the proximal stump of the transected nerve. *Neurosurg Rev.* 1997; 20: 124-7.
- 34) Mccallister WV, Tang P, Smith J. Axonal regeneration stimulated by the combination of nerve growth factor and ciliary neurotrophic factor in end-to-side model. *J Hand Surg.* 2001; 26: 478-88.
- 35) McDonald DS, Zocodone W. An injectable nerve regeneration chamber for studies of unstable soluble growth factors. *J Neurosci Methods.* 2003; 122:171-8.
- 36) Saika T, Senba E, Noguchi K, et al. Effects of nerve crush and transection on mRNA levels for nerve growth factor receptor in the rat facial motoneurons. *Brain Res Mol Brain Res.* 1991; 9: 157-60.
- 37) Santos X, Rodrigo J, Hontanilla B, Bilbao G. Evaluation of peripheral nerve regeneration by nerve growth factor locally administered with a novel system. *J Neurosci Methods* 1998; 85: 119-27.
- 38) Tanabe K, Bonilla I, Winkles JA, Strittmatter SM. Fibroblast growth factor-inducible-14 is induced in axotomized neurons and neurite outgrowth. *J Neurosci.* 2003; 23: 9675-86.
- 39) Tham S, Dowsing B, Finkelstein D, et al. Leukemia inhibitory factor enhances the regeneration of transected rat sciatic nerve and the function of reinnervated muscle. *J Neurosci Res.* 1997; 47: 208-15.
- 40) Zhou X, Rush R, Mclachlan EM. Differential expression of the p75 nerve growth factor receptor in glia and neurons of the rat dorsal root ganglia after peripheral nerve transection. *J Neurosci.* 1996; 16: 2901-11.
- 41) Evans PJ, Bain JR, Mackinnon SE, et al. Selective reinnervation: A comparison of recovery following microsuture and conduit nerve repair. *Brain Res.* 1991; 559: 315-21.
- 42) Hentz VR, Rosen JM, Xiao S, McGill KC, Abraham G. A comparison of suture and tubulization nerve repair techniques in a primate. *J Hand Surg.* 1991; 16: 251-61.
- 43) Kim DH, Connolly SE, Zhao S, et al. Comparison of macropore, semipermeable, and nonpermeable collagen conduits in nerve repair. *J Reconstr Microsurg.* 1993; 9: 415-20.

- 44) Labrador RO, Buti M, Navarro X. Influence of collagen and laminin gels concentration on nerve regeneration after resection and tube repair. *Exp Neurology*. 1998; 149: 243-52.
- 45) Maeda T, Mackinnon SE, Best TJ, et al. Regeneration across "steppingstone" nerve grafts. *Brain Res*. 1993; 618: 196-202.
- 46) Martins RS, Siqueira MG, Da Silva CF, Plese JPP. Overall assessment of regeneration in peripheral nerve lesion repair using fibrin glue, suture, or a combination of the 2 techniques in a rat model. Which is the ideal choice? *Surg Neurol*. 2005; 64: 10-6.
- 47) Davison SP, Thomas M, Nora PM, Ernest M. Improved nerve regeneration with neutralization of transforming growth factor-[beta]1. *Laryngoscope* 1999; 109: 631-5.
- 48) Nachemson AK, Lundborg G, Myrhage R, Kank F. Nerve regeneration and pharmacological suppression of the scar reaction at the suture site. *Scand J Plast Reconstr Surg*. 1985; 19: 255-60.
- 49) Görgülü A, İmer M, Şimşek O, et al. The effect of aprotinin on extra neural scarring in peripheral nerve surgery: An experimental study. *Acta Neurochir*. 1998; 140: 1303-7.
- 50) İlbay K, Etus V, Yıldız K, İlbay G, Ceylan S. Topical application of mitomycin C prevents epineural scar formation in rats. *Neurosurg Rev*. 2005; 28: 148-53.
- 51) Özgenel GY, Filiz G. Effects of human amniotic fluid on peripheral nerve scarring and regeneration in rats. *J Neurosurg*. 2003; 98: 371-7.
- 52) Özgenel GY. Effects of hyaluronic acid on peripheral nerve scarring and regeneration in rats. *Microsurgery* 2003; 23: 575-81.
- 53) Zou T, Ling C, Xiao Y, et al. Exogenous tissue plasminogen activator enhances peripheral nerve regeneration and functional recovery after injury in mice. *J. Neuropathol. Exp Neurol*. 2006; 65: 78-86.
- 54) Wolthers M, Moldovan M, Binderup T, Schmalburch H, Krarup C. Comparative electrophysiological, functional and histological studies of nerve lesions in rats. *Microsurgery* 2005; 25: 508-19.
- 55) Adibhatla RM, Hatcher JF, Dempsey RJ. Effects of citicoline on phospholipid and glutathione levels in transient cerebral ischemia. *Stroke* 2001; 32: 2376-81.
- 56) Lee HJ, Kang JS, Kim YI. Citicoline Protects Against Cognitive Impairment in a Rat Model of Chronic Cerebral Hypoperfusion. *J Clin Neurol*. 2009; 5: 33-8.
- 57) Rao AM, Hatcher JF, Dempsey RJ. Lipid alterations in transient forebrain ischemia: possible new mechanisms of CDP-choline neuroprotection. *J Neurochem*. 2000; 75: 2528-35.
- 58) Cobos RG, García AF, Fernández MG, Tejedor ED. Citicoline, use in cognitive decline: Vascular and degenerative. *J Neurol Sci*. 2010; 299: 188-92.
- 59) Maldonado VC, Perez JB, Escario JA. Effects of CDP-choline on the recovery of patients with head injury. *J Neurol*. 1991; 103: 15-8.

- 60) Alvarez XA, Sampedro C, Lozano R, Cacabelos R. Citicoline protects hippocampal neurons against apoptosis induced by brain beta-amyloid deposits plus cerebral hypoperfusion in rats. *Meth Find Exp Clin Pharmacol*. 1999; 21: 535-40.
- 61) Bagdas D, Sonat FA, Hamurtekin E, Sonal S, Gurunc MS. The antihyperalgesic effect of cytidine-5 –diphosphatecholine in neuropathic and inflammatory pain models. *Behav Pharmacol*. 2011; 22: 589-98.
- 62) Oshitari T, Fujimoto N, Adachi-Usami E. Citicoline has a protective effect on damaged retinal ganglion cells in mouse culture retina. *Neuroreport* 2002; 13: 2109-11.
- 63) Fu SY, Gordon T. The cellular and molecular basis of peripheral nerve regeneration. *Mol Neurobiol*. 1997; 14: 67-116.
- 64) Adibhatla RM, Hatcher JF. Citicoline decreases phospholipase A2 stimulation and hydroxyl radical generation in transient cerebral ischemia. *J Neurol Res*. 2003; 73: 308-15.
- 65) Rao AM, Hatcher JF, Dempsey RJ. Does CDP-choline modulate phospholipase activities after transient forebrain ischemia. *Brain Res*. 2001; 893: 268-72.
- 66) De S, Trigueros MA, Kalyvas A, David S. Phospholipase A2 plays important role in myelin breakdown and phagocytosis during wallerian degeneration. *Mol Cell Neurosci*. 2003; 24: 753-65.
- 67) Agut J, Lopez IG, Ortiz JA, Wurtman RJ. Oral cytidine 5'-diphosphate choline administration to rats increases brain phospholipid levels. *Ann N Y Acad Sci*. 1993; 695: 318-20.
- 68) Dávalos A, Castillo J, Álvarez-Sabín J, Secades JJ, et al. Oral citicoline in acute ischemic stroke : an individual patient data pooling analysis of clinical trials. *Stroke* 2002; 33: 2850-7.
- 69) Parisi V, Coppola G, Ziccardi L, Gallinaro G, Falsini B. Cytidine-5'-diphosphocholine (Citicoline): a pilot study in patients with non-arteritic ischaemic optic neuropathy. *Euro J Neurol*. 2008; 15: 465-74.
- 70) Yücel N, Çaylı SR, Ateş Ö, Karadağ N, Fırat S, Türköz Y. Evaluation of the neuroprotective effects of citicoline after experimental spinal cord injury: improved behavioral and neuroanatomical recovery. *Neurochem Res*. 2006; 31: 767-75.
- 71) Hurtado O, Cárdenas A, Pradillo JM. A chronic treatment with CDP-choline improves functional recovery and increases neuronal plasticity after experimental stroke. *Neurobiol Dis*. 2007; 26: 105-11.
- 72) Araki W, Wurtman RJ. Control of membrane phosphatidylcholine biosynthesis by diacylglycerol levels in neuronal cells undergoing neurite outgrowth. *Proc Natl Acad Sci*. 1997; 94: 11946-50.
- 73) Alberts B, Bray D, Lewis J, Roberts K, Watson JD, *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. New York: Garland Press; 2002.
- 74) Vance JE, Pan D, Campenot RB, Bussiere M, Vance DE. Evidence that the major membrane lipids, except cholesterol, are made in axons of cultured rat sympathetic neurons. *J Neurochem*. 1994; 62: 329-37.

- 75) Vance JE, Pan D, Campenot RB. Biosynthesis of membrane lipids in rats axons . J Cell Biol. 1991; 115: 1061-8.
- 76) Vance JE, Chaves EP, Campenot RB, Vance DE. Role of axons in membrane phospholipid synthesis in rat sympathetic neurons. Neurobiol Aging. 1995; 16: 493-9.
- 77) Adibhatla RM, Hatcher JF, Dempsey RJ. Citicoline: Neuroprotective mechanisms in cerebral ischemia. J Neurochem. 2002; 80: 12-23.
- 78) Knapp S, Wurtman RJ. Enhancement of free fatty acid incorporation into phospholipids by choline plus cytidine. Brain Res. 1999; 822: 52-9.
- 79) Wang CS, Lee KR. Choline plus cytidine stimulate phospholipid production, and expression of amyloid precursor protein in rat PC12 cells. Neurosci Lett. 2000; 283: 25-8.
- 80) Martins RG, Siqueira MG, Da Silva CF, Plese CPP. Correlation between parameters of electrophysiological, histomorphometric and sciatic functional index evaluations after rat sciatic nerve repair. Arq Neuropsiquiatr. 2006; 64: 750-6.

TEŞEKKÜR

Eğitimim süresince benden desteklerini esirgemeyen değerli öğretim üyeleri; Prof. Dr. Ahmet Bekar, Prof. Dr. Ender Korfalı, Prof. Dr. Selçuk Yılmazlar, Doç. Dr. Şeref Doğan, Doç. Dr. Hasan Kocaeli ve Uzm. Dr. M. Özgür Taşkapılıoğlu'na; tezimin yapım aşamasında her türlü desteği veren Doç. Dr. Mehmet Cansev'e, ,Doç. Dr. Necdet Karlı'ya, Prof. Dr. Ayberk Kurt'a, Yrd. Doç. Dr. İlker Kafa'ya teşekkürlerimi sunarım. Çalışmaktan her zaman mutluluk duyduğum asistan arkadaşlarıma, kliniğimiz hemşire, sekreter ve tüm personel arkadaşlarıma da teşekkürler ederim. Son söz olarak eğitimim süresince tüm desteğini bana veren eşim Emine, hayatımın tek renkleri olan kızım Işıl ve oğlum Kıvanç Mete'ye sonsuz sevgi ve teşekkürü borç bilirim.

ÖZGEÇMİŞ

1981 Silifke doğumluyum. 1992 yılında Mersin İleri İlkokulu'ndan mezun oldum. 1999 yılında ise orta öğrenimimi İçel Mersin Anadolu Lisesi'nde tamamladım. 1999 yılında girdiğim Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi'nden 2005 yılında mezun oldum. 2006 yılından bu yana Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroşirurji Anabilim Dalı'nda asistan olarak çalışmaktayım.