



**T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
NÖROŞİRÜRJİ ANABİLİM DALI**

**PERİFERİK SİNİR KESİSİNDE SİSTEMİK UYGULANAN SİTİDİN,
KOLİN VE SİTİKOLİNİN; AKSONAL REJENERASYON VE EPİNÖRAL SKAR
DOKUSU ÜZERİNE ETKİLERİNİN ERKEN PRİMER SÜTÜR MODELİNDE
ARAŞTIRILMASI**

Dr. Başak CANER

UZMANLIK TEZİ

BURSA – 2008



**T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
NÖROŞİRÜRJİ ANABİLİM DALI**

**PERİFERİK SİNİR KESİSİNDE SİSTEMİK UYGULANAN SİTİDİN, KOLİN VE
SİTİKOLİNİN; AKSONAL REJENERASYON VE EPİNÖRAL SKAR DOKUSU
ÜZERİNE ETKİLERİNİN ERKEN PRİMER SÜTÜR MODELİNDE
ARAŞTIRILMASI**

(UZMANLIK TEZİ)

Dr. Başak CANER

Danışman: Doç. Dr. AHMET BEKAR

BURSA – 2008

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i-ii
SUMMARY	iii-iv
GİRİŞ	1-2
GEREÇ VE YÖNTEM	3-8
BULGULAR	9-19
TARTIŞMA	20-25
KISALTMALAR	26
KAYNAKLAR	27-33
ÖZGEÇMİŞ	34
TEŞEKKÜR	35

ÖZET

Periferik sinir yaralanması nadiren fonksiyonların tam kazanımı ile sonuçlanmakta ve bir çok değişik nedenler de rejenerasyonu engellemektedir. Çalışmamızda, siyatik sinirde kesiden sonra primer anastomoz uygulanarak sistemik CDP-kolin (sitikolin), sitidin, kolin ve sitidin+kolin uygulanmasının perinöral skar dokusu, aksonal rejenerasyon ve fonksiyonel geri kazanım üzerine etkileri araştırıldı.

Çalışmada ağırlıkları 200-270 (± 23) mg arasında değişen 70 adet Spraque-Dawley tipi dişi yetişkin sıçan kullanıldı. Tüm sıçanlarda sağ siyatik sinire mikromakas ile kesi yapılarak 8/0 prolene ile hemen primer anastomoz yapıldı. Takiben sıçanlar kontrol (KG) (n=10), CDP-Kolin (CDP-KoG) (n=15), sitidin (SiG) (n=15), kolin (KoG) (n=15), sitidin+kolin (Si-KoG) (n=15) olacak şekilde 5 gruba ayrıldı. Sıçanlara intraperitoneal olarak sırasıyla 2 cc serum fizyolojik (SF), 2 cc SF içinde sulandırılmış 600 $\mu\text{mol/kg}$ CDP-kolin, 600 $\mu\text{mol/kg}$ sitidin, 600 $\mu\text{mol/kg}$ kolin, 600 $\mu\text{mol/kg}$ sitidin+kolin uygulandı.

12.haftada tüm sıçanlar yüksek doz Tiopental sodyum uygulamasıyla sakrifiye edildi. Makroskopik değerlendirmede sinir yapışıklığı ve ayrılabilirliği açısından yapılan değerlendirmede CDP-KoG'de KG'ye oranla anlamlı farklılık saptandı ($p<0.05$). Diğer gruplar arasında anlamlı farklılık yoktu.

Siyatik fonksiyon indeksi (SFI) ile takip edilen fonksiyonel geri kazanımın, tüm gruplara kendi içinde analiz yapıldığında 4. haftadan 12. haftaya doğru arttığı saptandı. Fakat gruplar arasında anlamlı farklılık saptanmadı ($p>0.5$).

12. hafta sonunda yapılan elektrofizyolojik kayıtlarda sinir aksiyon potansiyelinin amplitüdlerinde CDP-KoG'de KG'ye göre anlamlı derecede yüksek farklılık saptandı ($p<0.01$).

Yapılan histomorfolojik değerlendirmede toplam akson sayıları ve aksonal dansite değerlendirildiğinde KG'ye göre hem KoG'de ($p<0.01$), hem CDP-KoG'de ($p<0.01$) hem de Si-KoG'de ($p<0.05$) istatistiksel olarak anlamlı ölçüde artış saptandı.

CDP-Kolinin 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 göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Periferik sinir, sitikolin, kolin, sitidin

SUMMARY

THE ANALYSIS OF THE EFFECTS OF INTRAPERITONEAL ADMINISTERED CYTIDINE, CHOLINE AND CITICOLINE ON AXONAL REGENERATION AND EPINEURAL SCAR FORMATION IN EARLY SUTURING MODEL OF RAT PERIPHERAL NERVE SECTION

Peripheral nerve injuries seldom results in complete recovery of functions and many factors interfere with regeneration. In the present study we investigated the effects of systemic administered CDP-choline (citicoline), cytidine, choline and cytidine plus choline on perineural scar formation, axonal regeneration and functional recovery in early suturing model of rat sciatic nerve section.

70 Sprague-Dawley female rats weighting 200-270 (± 23) gr were used in this study. Right sciatic nerve was sectioned with a microscissor. Rats underwent immediate suturing of their nerves with 8/0 prolene just after nerve section. Rats received Control (KG) (n=10), CDP-Choline (CDP-KoG) (n=15), cytidine (SiG) (n=15), choline (KoG) (n=15), cytidine plus choline (Si-KoG) (n=15) received 2 cc Saline ip , 600 $\mu\text{mol/kg}$ CDP-kolin ip , 600 $\mu\text{mol/kg}$ cytidine ip, 600 $\mu\text{mol/kg}$ cholin ip , 600 $\mu\text{mol/kg}$ cytidin+ cholin ip in 2 cc Saline respectively.

12 weeks after surgery all rats were sacrificed. A thick connective tissue surrounding the suture site was observed in CDP-Choline treated rats on macroscopical examination. Scar formation index values were found significantly lower only in the CDP-KoG group ($p < 0.05$). There were no significant differences in between the other groups ($p > 0.05$).

The functional recovery as assessed by sciatic function index (SFI) was better in all groups from the 4th week to the 12th week but there were no significant differences between the groups ($p > 0.05$).

On the electrophysiological recordings there were significantly higher nerve action potential amplitudes in CDP-KoG ($p < 0.01$).

Results of the histomorphological evaluation revealed larger axon counts and axonal density scores in KoG ($p<0.01$), CDP-KoG ($p<0.01$) and Si-KoG1 ($p<0.05$) then the control group.

Our study suggests sistemically administered CDP-Cholin is effective in preventing scar tissue formation and improves funtional recovery by potentializing axonal regeneration.

Key Words: Peripheral nerve, citicoline, choline, cytidine, regeneration

GİRİŞ

Travmatik hasarlanma veya iskemik serebral patolojilerde ve serebral ödemin patofizyolojisinde hücre membranı ve bunun en önemli yapıtaşı olan fosfolipidlerin önemi bilinmektedir (1). Sitikolin geçici serebral iskemi ve travmaya sekonder hücre membrane bütünlüğünün bozulduğu patolojilerde fosfotidilkolin ve sfingomyelin sentezini arttırmakta ve aynı zamanda fosfolipaz A₂ inhibisyonu ile hasarın ilerlemesini engellemektedir (2). Sitikolinin nöroprotektif etkilerinin fosfotidilkolin sentezini artırarak (3,4), glutatyon salınımını azaltarak (5), glutatyon sentezini ve glutatyon reduktaz aktivitesini artırarak (6), fosfolipaz A₂ inhibisyonu (7) veya aktivasyonunu önleyerek (8) gerçekleştirdiği görülmüştür. Son zamanlarda yapılan bir çalışmada antiapoptotik etkisinin de olduğu gösterilmiştir (9). Genel kanı sitikolinin nöronal hasarda iyileşme için gerekli olduğudur (1,2,3,6,10,11,12,13).

Yapılan birçok klinik çalışmada sitikolinin iskemik stroke ve kafa travması tedavisinde yan etkisi olmadan güvenle kullanılmasına rağmen (4,11,13,14, 15,16,17,18,19) etki mekanizması tam olarak anlaşılabilmiş değildir (20).

Sistemik verilen sitikolinin bir çok deneysel modelde iskemi ve/veya hipoksi gelişimini önlediği ve geri döndürdüğü; kafa travması modellerinde de hücre hasarını önlediği gösterilmiştir (5,7,12,13,21,22,23,24,25,26,27,28,29).

Kolin ise birçok gıdada bulunan vital bir amindir ve normal beyin dokusunun gelişiminde de önemli rol oynar (14,30,31). Kolinerjik nöronlarda serbest kolinin birçoğu asetilkoline dönüşür (32,33). Eksojen verilen sitikolinin plazma kolin düzeylerini arttırdığı gösterilmiştir (32,34). Kolinle ilgili yapılan çalışmalar kolinin santral sinir sistemi üzerine ve periferik etkilerine yoğunlaşmaktadır (30, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43).

Sitidin ise sitikolin oluşumunda ara eleman olarak görev yapar (44). Sitikolin üzerinde yapılmış bazı çalışmalarda sitikolinin membran fosfolipid yıkımının önlenmesinde sitidinin sitidin trifosfata (CTP) dönüşerek kolinden bağımsız ve aynı zamanda kolinin etkini artırarak etkili olduğu düşünülmüştür

(32,45,46,47). Deneysel olarak kafa travması oluşturulmuş sıçanlarda intraperitoneal verilen CTP ile motor fonksiyonda belirgin düzelme saptanmıştır (29).

Literatürde sitikolin ve metabolitlerinin iskemik veya travmatik sinir sistemi hasarlarında olumlu etkileri bildirilmiş olmasına rağmen periferik sinir hasarındaki etkilerinin araştırıldığı bir çalışma yapılmamıştır. Daha önce kliniğimizde bu konuda Özay ve ark 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 (48). Takiben Aslan 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 (49).

Çalışmamızda kliniğimizde daha önce yapılan bu çalışmalardan yola çıkarak primer anastomoz modelinde sistemik olarak uygulanan CDP-kolin, sitidin, kolin ve sitidin+kolinin siyatik sinir iyileşmesine etkileri araştırıldı.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Yetiştirme ve Araştırma Merkezi'nde Ağustos 2007-Ocak 2008 tarihleri arasında gerçekleştirildi.

UÜTF Deney Hayvanları Bakım ve Kullanım Komitesi'nin onayını takiben (25.07.2006/2) sıçanlar UÜTF Deney Hayvanları Yetiştirme ve Araştırma Merkezi'nden temin edildi.

Çalışmamızda ağırlıkları 200-270 (± 23) gram arasında değişen 70 adet erişkin Sprague Dawley cinsi dişi sıçan kullanıldı. Tarafsız bir görevli tarafından rastgele seçilen sıçanlardan 5 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 Iodine (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 güdükleri 8-0 polypropylene suture ile (Prolene, Ethicon® Ltd, Somerville NJ, USA) ile

aralarında 180° bulunan iki ayrı noktadan suture 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 suture edilmedi. Cilt 4-0 polypropylene (Prolene, Ethicon ® Ltd, Somerville NJ, USA) suture ile suture edildi.

1. Kontrol Grubu (n:10): Oluşturulan sinir hasarını ve tamirini takiben hemen tüm sıçanlara intraperitoneal (ip) 2 cc SF enjekte edildi.
2. Sitidin Grubu (n:15): Oluşturulan sinir hasarını ve tamirini takiben hemen tüm sıçanlara 2 cc SF içinde sulandırılmış 600 umol/kg ip Sitidin enjekte edildi.
3. Kolin Grubu (n:15): Oluşturulan sinir hasarını ve tamirini takiben hemen tüm sıçanlara 2 cc SF içinde sulandırılmış 600 umol/kg ip Kolin enjekte edildi.
4. CDP-Kolin 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.
5. Sitidin+ Kolin Grubu (n:15): Oluşturulan sinir hasarını ve tamirini takiben hemen tüm sıçanlara 2 cc SF içinde sulandırılmış 600 umol/kg Kolin + 600 umol/kg Sitidin ip 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 5 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

a) 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 ile 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. tarafından tarif edilen numerik grade'leme şeması kullanılarak kantitatif skorlara dönüştürüldü (50) (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 tarafından tanımlanan Makroskopik Değerlendirme İçin Sayısal Değerlendirme Şeması (50)

Doku	Grade	Tanımlama
	1	Tamamen Kapanmış
Cilt ve adele fasyası	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

b) 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 OsO₄ ile postfikse edilen doku örnekleri, artan yüzdelerdeki alkol serileri içerisinde dehidrate edilerek, propilen oksit ile muamele edildi ve Spur's resin içerisinde 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 yakalan 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 Student's t 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 (SFI) formülü kullanılarak kaydedildi (51).

Elektrofizyolojik Değerlendirme:

Tüm EMG kayıtları Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Nörofizyoloji laboratuvarında Dantec Keypoint 4 (Medtronik) marka cihazda gerçekleştirildi. 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. Topak elektrod olarak kullanılan cup elektrod karına yerleştirildi. Uyarıcı katod elektrod olarak monopolar iğne, 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 iğne 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 gözlendiği konumda EMG'de en iyi cevap kaydedildi. Cevabın izoelektrik hattan elektronegatif olarak başlamasına ve artefaktın az olmasına dikkat edildi. Oluşan bileşik kas aksiyon potansiyelinin amplitüd süresi, alanı ve latansı kaydedildi.

İstatistiksel Analiz :

SF (kontrol), Sitidin, Kolin, CDP-kolin ve Sitidin +Kolin gruplarından elde edilen makroskopik, fonksiyonel ve elektrofizyolojik değerlendirme skorları Kruskal-Wallis testiyle değerlendirilerek anlamlı olan gruplar Mann-Whitney-U testi ile analiz edildi. Aksonal dansite ve akson sayısı ölçümleri Student's t testi ile değerlendirildi. Kantitatif sonuçların tümü aritmetik ortalama ve standart hata olarak ifade edildi ve istatistiksel analizde $p < 0,05$ sonucu anlamlı olarak kabul edildi.

BULGULAR

Cerrahi girişim sonuçları:

1. gruptan 1 hayvan, 2. gruptan 2, 3. gruptan 2, ve 4. gruptan 1 hayvan cerrahi işlemden sonra 1 gün içinde kaybedildi.
2. gruptan 3, 4. gruptan 2 hayvan takipeden 12 haftalık süre içerisinde değişik zamanlarda kafeslerinde ölü olarak bulundu.
3. gruptan 1 ve 5. gruptan 2 hayvan 12. hafta sonunda EMG anestezisi sırasında kaybedildi.

İlk 4 haftalık süreçte tüm hayvanlar içinde (n:70) toplam 4 tanesinde sağ ayak 3-4 ve 5. parmaklarda nöropatik ağrıya bağlı ülser yaralar ve amputasyon görüldü.

Deneklerin kendilerine yönelik zarar verici davranışları ilk 4 haftada ortaya çıktı. Bu parmak kayıplarının yürüme yolu analizlerini etkileyeceği düşünülerek bu hayvanlar yürüme yolu testine tabi tutulmadı.



Resim 1: Self mutasyona bağlı 3.,4.,5. parmakta amputasyon

Makroskopik değerlendirme:

Tüm sıçanlarda 12. hafta sonunda yapılan değerlendirmede cilt ve adele fasyasının tamamen kapandığı, insizyon hattında enfeksiyon veya enflamatuvar bulgu olmadığı görüldü. 12. hafta sonunda SF grubundan 7 hayvan, Sitidin grubundan 8 ve diğer 3 gruptan 9'ar hayvanın tamamen kapanmış olan insizyon hattı yeniden açılarak makroskopik değerlendirmeye tabi tutuldu. Değerlendirme Petersen ve ark. tarafından tanımlanan numerik değerlendirme skalasına göre yapıldı (Tablo 1).

12. Hafta sonunda cilt ve adele kapanması açısından 5 grup arasında Kruskal wallis testi ile yapılan analiz ile gruplar arasında anlamlı farklılık saptanmadı. ($p > 0.05$) (Tablo 2).

Tablo 2: Cilt ve adale kapanması ortalama ve standart hata değerleri

	Ortalama + SEM
Kontrol n=7	1,00 ± 0,00
Sitidin n=8	1,12 ± 0,12
Kolin n=9	1,00 ± 0,00
CDP – Kolin n=9	1,11 ± 0,11
Sitidin + Kolin n=9	1,11 ± 0,11

12.hafta sonunda cilt ve adele fasyası kapanması açısından 5 grubun ortalama ve standart hata değerleri verilmiştir. 5 grup arasında Kruskal Wallis testi ile yapılan istatistiksel analizde anlamlı farklılık saptanmamıştır ($p > 0.05$).

12. Hafta sonunda sinir yapışıklığı ve ayrılabilirliği açısından 5 grup arasında Kruskal Wallis testi ile yapılan analiz ile gruplar arasında anlamlı farklılık saptandı ($p<0.05$). Mann - Whitney U testi ile yapılan analizlerde 1 ve 4. Gruplar arasında anlamlılık görüldü ($p<0.05$) (Tablo 3). Diğer gruplar arasında anlamlı farklılık yoktu. Yani CDP-kolin ile tedavi edilen sıçanlarda SF ile tedavi edilen sıçanlara göre sinir yapışıklığı ve ayrılabilirliği açısından anlamlı olarak daha iyi sonuçlar elde edildi.

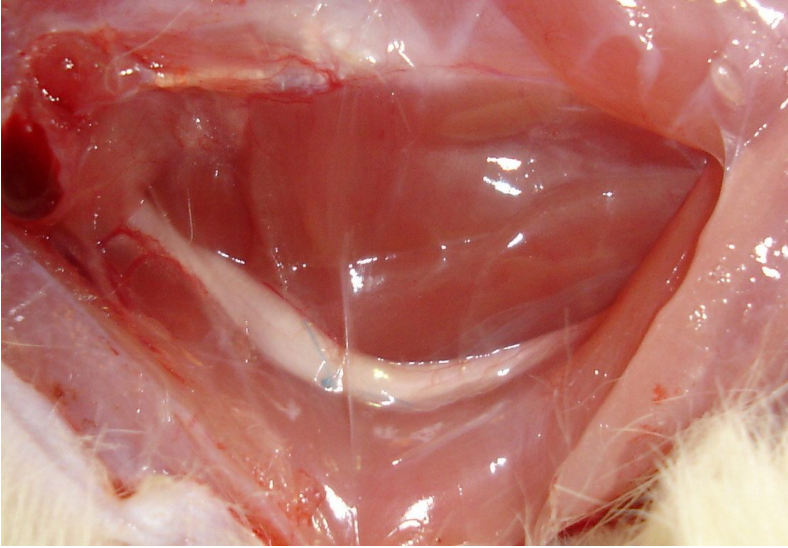
Tablo 3: Sinir ayrılabilirliği ve yapışıklığı ortalama ve standart hata değerleri

	Ortalama + SEM
Kontrol n=7	2,33 ± 0,21
Sitidin n=8	2,25 ± 0,16
Kolin n=9	2,11 ± 0,26
CDP – Kolin n=9	1,33 ± 0,17
Sitidin + Kolin n=9	2,25 ± 0,31

12.hafta sonunda sinir ayrılabilirliği ve yapışıklığı açısından 5 grubun ortalama ve standart hata değerleri. SF ile tedavi edilen sıçanlar (Resim 2) ile sitikolin ile tedavi edilen sıçanlar (Resim 3) arasında Mann-Whitney U testi ile yapılan istatistiksel analizde sinir ayrılabilirliği ve yapışıklığı açısından anlamlı farklılık saptandı ($p<0.05$). Diğer gruplar arasında anlamlı farklılık saptanmadı.



Resim 2: Cerrahi sahada gelişen kalın membranöz doku x4



Resim 3: Cerrahi sahada gelişen ince konnektif doku x4

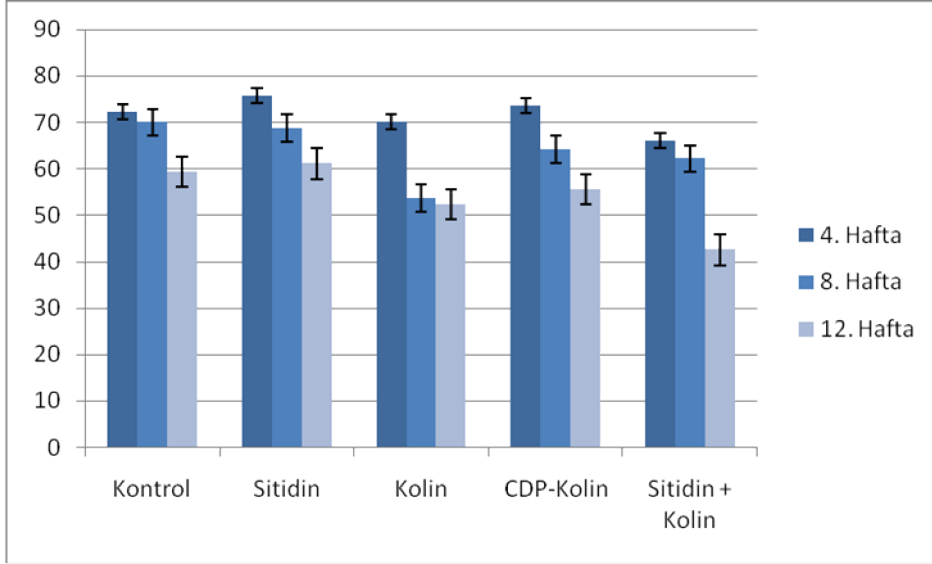
Fonksiyonel Değerlendirme:

4, 8, 12. haftalarda yapılan yürüme yolu analizi sonucunda hesaplanan siyatik fonksiyon indeksi sonuçlarının ortalama değerleri ve standart hata değerleri Tablo 4'de verilmiştir. Tüm gruplara kendi içlerinde 4. 8. ve 12. haftalar arasında Kruskal Wallis testi ile analiz yapıldığında 12. haftaya doğru siyatik fonksiyon indeksinde (SFİ) anlamlı olarak düşme gözlemlendi ($p < 0,05$) (Tablo 5). Fakat 4, 8, 12. haftalarda 5 grup arasında Kruskal Wallis testi ile yapılan analiz ile gruplar arasında anlamlı farklılık saptanmadı ($p > 0,05$).

Tablo 4: 4-8-12. haftalardaki siyatik fonksiyon indeksi ortalama ve standart hata değerleri

		4.hafta	8.hafta	12.hafta
Kontrol n=7	Ortalama + Sem	72, 20 ± 2,40	69,92 ± 4,01	59,30 ± 4,31
Sitidin n=8	Ortalama + Sem	75,74 ± 4,41	68,81 ± 4,49	61,11 ± 3,82
Kolin n=9	Ortalama + Sem	70,06 ± 5,65	53,73 ± 8,52	52,32 ± 8,55
CDP– Kolin n=9	Ortalama + Sem	73,54 ± 2,3	64,24 ± 3,22	55,52 ± 50,41
Sitidin+Kolin n=9	Ortalama + Sem	66,05 ± 4,29	62,20 ± 2,96	42,50 ± 5,35

Tablo 5: 4-8-12. hafta siyatik fonksiyon indeksi sonuçlarının grafiksel karşılaştırılması



Tüm grupların kendi içinde yapılan analizinde 12. haftaya doğru siyatik fonksiyon indeksinde Kruskal Wallis testi ile istatistiksel olarak anlamlı ölçüde düşme saptandı ($p < 0.05$). Yani tüm gruplarda 12. haftaya doğru fonksiyonel iyileşme mevcuttu. Fakat gruplar arasında anlamlı farklılık saptanmadı ($p > 0.05$).

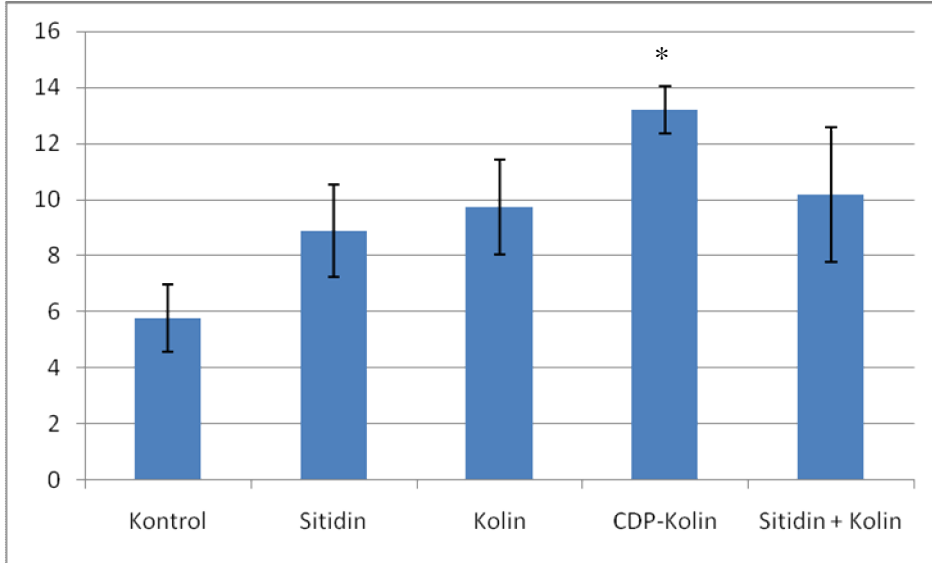
Elektrofizyolojik değerlendirme:

Elde edilen elektrofizyolojik kayıtlamalardan sinir aksiyon potansiyel amplitüd değerleri istatistiksel olarak analiz edildi. 12. hafta sonunda 5 grup arasında Kruskal Wallis testi ile yapılan analiz ile gruplar arasında anlamlı farklılık saptandı ($p < 0.05$). Mann Whitney U testi ile yapılan analizlerde 1 ve 4. gruplar arasında anlamlılık görüldü ($p < 0.01$). Diğer gruplar arasında anlamlı farklılık yoktu (Tablo 6-7).

Tablo 6: Gastroknemius kasından elde edilen amplitüd değerlerinin gruplara göre ortalama ve standart hata değerleri:

	Ortalama + SEM
Kontrol n=7	5,77 ± 1,20
Sitidin n=8	8,9 ± 1,65
Kolin n=9	9,73 ± 1,70
CDP– Kolin n=9	13,19 ± 0,85
Sitidin + Kolin n=9	10,17 ± 2,41

Tablo 7: EMG amplitüd değerlerinin gruplara göre grafiksel dağılımı



Kruskal Wallis testi ile yapılan analizlerde gruplar arasında EMG değerleri açısından anlamlı farklılık saptandı ($p < 0,05$).

*: Sitikolin ile tedavi edilen sıçanlarda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ölçüde yüksek amplitüd değerleri elde edildi ($p < 0,01$)

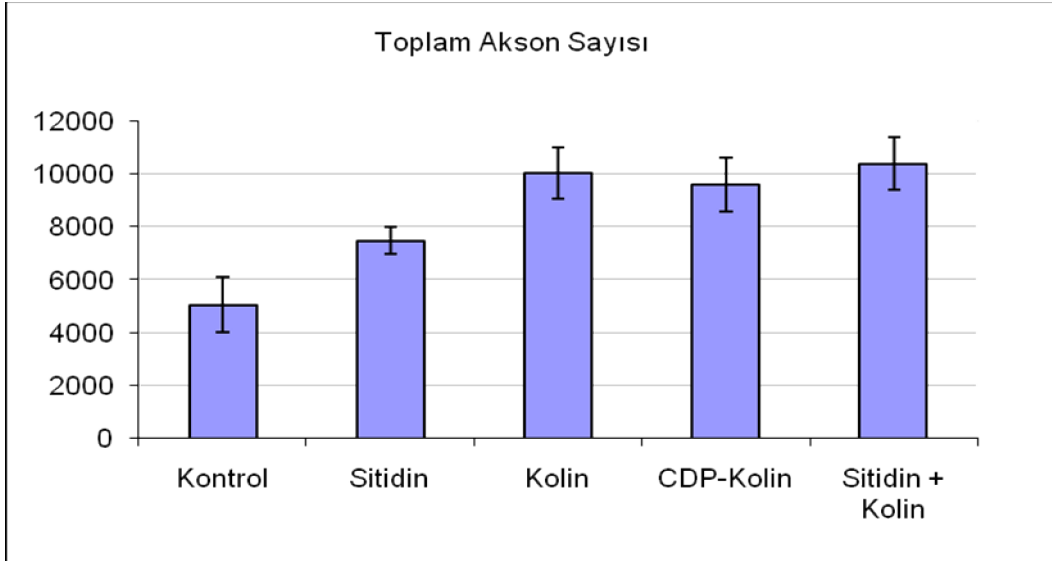
Histomorfolojik değerlendirme:

Toplam akson sayıları değerlendirildiğinde KoG, CDP-KoG ve Si-KoG'de KG'ye göre anlamlı yükseklik saptandı. Hatta kolin ve sitidin + kolin uygulanan grupta akson sayısı CDP-kolin grubundan daha fazla olarak ölçüldü (Tablo 8 -9). Bu gruplarda aksonlar daha küçük olduğu için aksonal dansite değerlendirildiğinde CDP-KoG'de aksonal dansite ve dolayısıyla rejenerasyon daha yüksek olarak saptandı (Tablo 10). Aksonal dansite ve toplam akson sayıları Student's t testi ile değerlendirildiğinde aksonal dansite açısından 1 ila 3 ($p<0.01$) 1 ila 4 ($p<0.01$) 1 ila 5 ($p<0.05$) grupları arasında anlamlı fark görüldü. Toplam akson sayıları açısından da 1 ila 3 ($p<0.05$) 1 ila 4 ($p<0.05$) 1 ila 5 ($p<0.05$) grupları arasında anlamlı fark görüldü. (Resim 4-8)

Tablo 8: Toplam akson sayısı ve aksonal dansitenin gruplara göre numerik ortalama ve standart hata değerleri

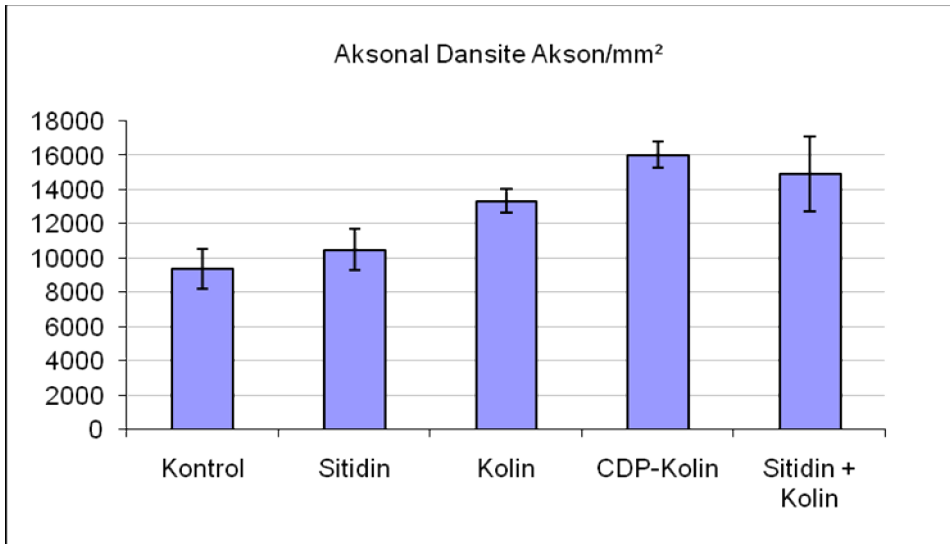
	Kontrol n=7	Sitidin n=8	Kolin n=9	CDP-Kolin n=9	Sitidin + Kolin n=9
BİRİM ALANDAKİ AKSON SAYISI	32,64	33,68	40,03	48,11	40,40
Aksonal Dansite Akson/mm ²	9386,67 ±1160,75	10526,51 ±1210,57	13343,75 ±679,37	16036,77 ±764,69	14920,63 ±2196,91
Toplam akson sayıları	5048,55 ±1045,51	7489,15 ±497,86	10048,83 ±969,40	9618,15 ±1017,23	10403,81 ±1009,89

Tablo 9: Toplam akson sayıları

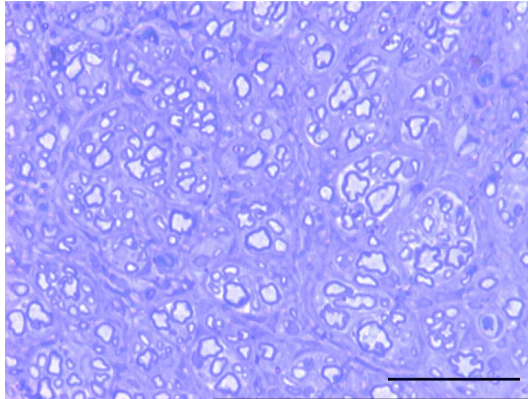


Toplam akson sayıları Student's t testi ile değerlendirildiğinde kontrol ve kolin grubu arasında ($p < 0,05$), kontrol ve CDP-Kolin grubu arasında ($p < 0,05$), kontrol ve sitidin + kolin ($p < 0,05$) grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı.

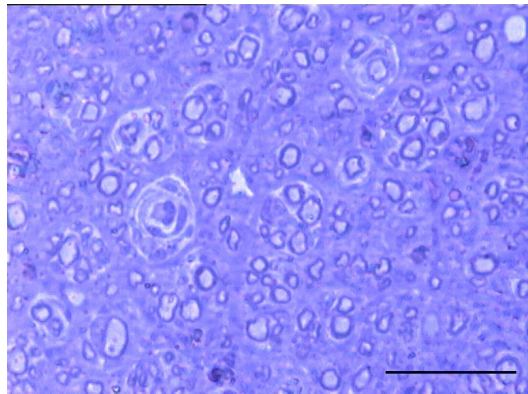
Tablo 10: Gruplara göre aksonal dansite dağılımı



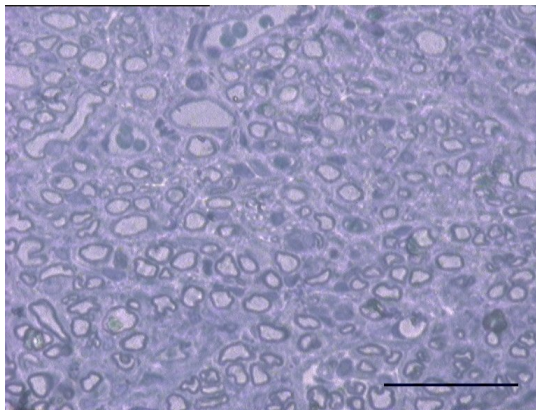
Aksonal dansite Student's t testi ile değerlendirildiğinde kontrol ve kolin grubu ($p < 0,01$); kontrol ve CDP-Kolin grubu arasında ($p < 0,01$), kontrol ve sitidin + kolin grupları arasında ($p < 0,05$) anlamlı fark görüldü.



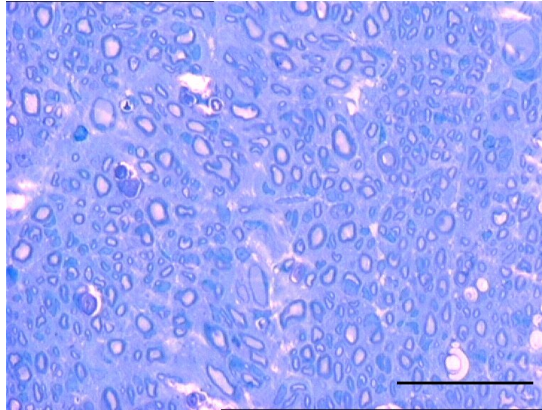
Resim 4: Kontrol grubuna ait sinir kesiti, Toluidine blue, X40, Skale Bar 40 μ m.



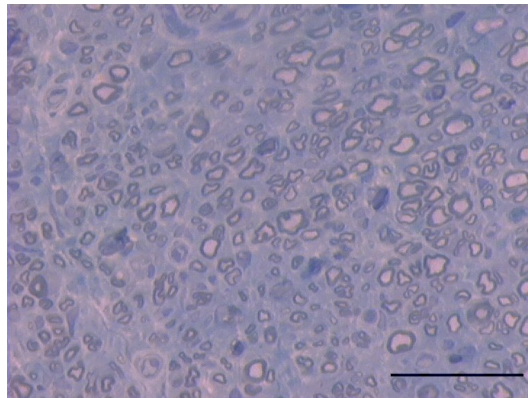
Resim 5: Sitidin grubuna ait sinir kesiti, Toluidine blue, X40, Skale Bar 40 μ m.



Resim 6: Kolin grubuna ait sinir kesiti, Toluidine blue, X40, Skale Bar 40 μ m.



Resim 7: CDP-Kolin grubuna ait sinir kesiti, Toluidine blue, X40, Skale Bar 40 μ m.



Resim 8: Sitidin + Kolin grubuna ait sinir kesiti, Toluidine blue, X40, Skale Bar 40 μ m.

TARTIŞMA

İdeal sinir onarımında etkili olabilecek bir çok faktör vardır. Sinir yaralanması sonrası canlı kalan nöron sayısı, aksonal büyümenin kalitesi, rejenerere olan aksonun oryantasyonu, hedef dokunun durumu gibi faktörler bu süreçte önemli rol oynamaktadır (52, 53). Aksonun yaralanması sonrası tamir tüm nöronu boydan boya (sinir gövdesinden son organa kadar) kapsayan bir süreçtir. Aksonal filizlenme, büyüme ve reinnervasyon ile sonuçlanan aksonal rejenerasyon ise bu sürecin en önemli bölümünü üstlenmektedir (53). Başarılı rejenerasyonun gelişimi kısmından büyüme faktörlerinin ekspresyonu, sitokinler, nöropeptidler, transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu, enflamatuvar yanıt gibi mekanizmalar sorumludur (54). Günümüzde periferik sinir yaralanmasını takiben tam rekonneksiyon ve fonksiyonların tamamen geri kazanımı hala bir ideal olarak kabul edilmektedir (55). Ciddi sinir yaralanması sonrası geliştirilmiş mik्रोşirürjikal primer sütün tekniği ile anatomik olarak akson aksone tekrar birleştirme günümüzde hala altın standart yöntem olarak kabul edilmektedir (53).

Aksonal rejenerasyonu ve dolayısıyla fonksiyonel geri kazanımı etkileyen pek çok faktör ortaya atılmıştır. Nörinom gelişimi, travma ve onarım yerinde enfeksiyon, uygulanan sütün teknikleri, skar dokusu gelişimi, sinirde meydana gelen traksiyonun etkileri gibi bir çok faktör sinir iyileşmesinde rol oynamaktadır (53). Proksimal sinir ucunda nörinom gelişimi aksonal rejenerasyon dolayısıyla fonksiyonel geri kazanımı etkileyen en önemli faktörlerden biridir. Nörinom gelişimini engellemek için otolog bypass teknikleri (56,57), Schwann hücreleri içeren sinir greftleri (58,59,60), çeşitli büyüme faktörleri (30,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73), sinir boşluğuna çeşitli maddeler içeren tübüler sistemlerin yerleştirilmesi (74,75,76,77,78,79,80) gibi tekniklerle yapılan çalışmalarda olumlu sonuçlar elde edilmiştir. Fakat bu deneysel çalışmaların çok az bir kısmı klinik uygulamaya geçirilebilmiştir.

Epinöral skar dokusu gelişiminin de fonksiyonel kayıp gelişiminde önemli faktörlerden birisi olduğu gösterilmiş ve iyileşmenin skar formasyonu ile

Schwann hücrelerindeki rejenerasyon arasındaki balansa bağlı olduğu düşünülmüştür (81). Sunderland 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 (82). Skar dokusu ekstranöral ya da intranöral olsun sinirin mikrovasküler yatağını etkileyerek sekonder aksonal dejenerasyona yol açmaktadır (83). Literatürde bildirilen bir çok çalışmada topikal uygulanan aprotinin, mitomycin C, insan amniyon mayi, hyalüronik asit, Adcon T, TPA gibi bir çok madde ile skar formasyonunun engellenebildiği gösterilmiştir (84,85,86,87,50,88). Aynı şekilde sistemik uygulanan metilprednizolon ve cishidroksiprolinin antienflamatuar etkileriyle skar dokusu olumunu azalttığı gösterilmiştir (82). Yapılan klinik çalışmalarda sistemik kullanımıyla yan etki oluşturmayan ve nöronal hasarda iyileşme için gerekli olduğu düşünülen sitikolinin daha önce kliniğimizde yapılan bir çalışmada periferik sinir kesisini takiben primer sütürasyon sonrası topikal uygulamasının skar dokusunu önleyerek kontrol grubuna göre aksonal rejenerasyonu anlamlı ölçüde arttırdığı gösterildi (48). Bu etkinin detay incelemesi için Aslan siyatik sinirde kesi ve primer anastomoz sonrası CDP-kolin, sitidin, kolin, sitidin+kolinin topikal etkilerini primer anastomoz modelinde incelemiş ve sitidin+kolin ve CDP-kolin uygulamasının skar dokusu oluşumunda etkili olduğu, aksonall rejenerasyonu potansiyelize ederek fonksiyonel geri kazanımı arttırdığı ve bu etki için sitidin ve kolinin ortamda birlikte bulunmaları gerektiğini saptamıştır (49).

Çalışmamızda ise topikal uygulandığında etkili olan bu maddelerin kullanım kolaylığı amacıyla sistemik kullanımında aynı etkilerin elde 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 dokusu geliştiği gözlemlendi.

Toplam akson sayıları incelendiğinde kontrol grubuna göre sitidin verilen grupta farklılık saptanmazken; kolin, CDP-kolin ve kolin+sitidin verilen gruplarda kontrol grubuna göre toplam akson sayısında belirgin artış olduğu bulundu. Fakat kolin ve sitidin+kolin verilen gruplarda yeni gelişen bu aksonların daha küçük çaplı olduğu görüldü. Dolayısıyla aksonal dansite değerlendirildiğinde en iyi sonuçlar CDP-kolin uygulanan grupta elde edildi. Tek başına sitidin uygulanan grupta ne aksonal dansite ne de toplam akson sayısı açısından kontrol grubuna göre farklılık saptanmadı.

Fuminori ve ark. 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 (52). Kim ve ark. tavşan posterior tibial sinir üzerinde yaptıkları bir çalışmada sinir aksiyon potansiyeli amplitüd değerinin fonksiyonel geri kazanımın değerlendirilmesinde kullanılabileceğini göstermişlerdir (77). Bizim çalışmamızda m. gastroknemiustan yapılan kayıtlamalarda oluşan aksiyon potansiyelinin amplitüdü ve latansı kaydedilmiştir. Fonksiyonel geri kazanımın değerlendirilmesinde aksiyon potansiyelinin amplitüdü kullanılmıştır. 12. hafta sonunda yapılan değerlendirmede CDP-kolin uygulanan grupta diğer gruplara göre belirgin olarak anlamlı yüksek değerler saptandı. Elde edilen elektrofizyolojik bulgular diğer bulgularla korelasyon göstermektedir. Bu nedenle elektrofizyolojik kayıtlamaların periferik sinir hasarında fonksiyonel geri kazanımın değerlendirilmesinde kullanılabileceği ve uyguladığımız sistemik sitikolin tedavisinin oluşan aksiyon potansiyelinin amplitüdünü arttırdığını söylemek mümkündür.

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 (6). Santral sinir sisteminde özellikle iskemi ve nörodejeneratif hastalıklarda sitikolinin etkisi kanıtlanmış fakat etki mekanizması tam olarak açıklanamamıştır (20). İskemi

modelinde yapılan bir diğerk çalışmada sistemik olarak uygulanan sitikolinin doza bağımlı olarak apoptozisi engellediği ve nöron koruyucu etki gösterdiği saptanmıştır (9). Bir diğerk çalışmada ise invitro lokal uygulanmasıyla retinal ganglion hücrelerinde nöron koruyucu potansiyelinin olduğu, hasar görmüş retinal ganglion hücrelerinde antiapoptotik etkisinin mitokondri hücre bağımlı ölüm mekanizmasını önleyerek gerçekleştirildiği düşünölmüşür (89). Aksotomize nöronların apoptozis ile öldükleri ve karakteristik morfolojik değişiklikleri ile DNA fragmentasyonun gerçekleştiği bilgisinden yola çıkarak (90) sitikolinin hem topikal hem de sistemik uygulamasının aksonetmezisin neden olduğu apoptozis ile gerçekleşen nöronal ölümü engellediği ve aksonal rejenerasyonu potansiyelize ettiği düşünölebilir.

Sitikolinin nöroprotektif etki mekanizmalarından bir diğeri de Fosfolipaz A₂ (PLA₂) aktivasyonunu önlemesidir (7,8). De ve ark.'nın 2003 yılında yayınladıkları bir çalışmada sıçan siyatik sinirinde sağlam sinirde PLA₂ görölmezken periferik sinir hasarı sonucu Schwann hücrelerinde ilk 5 saat önemli ölçüde PLA₂'nin eksprese olduğu ve sonra hasar bölgesine makrofajların ilerlediğini göstermişlerdir. Travma sonrasında 10 gün boyunca distal segmentte Schwann hücrelerinde ve immün hücrelerde PLA₂'nin artan oranda eksprese edildiğini 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 (91) . Serebral iskemi modellerinde PLA₂'nin membran fosfolipidlerinin yıkımıyla araşidonik asit salınımını arttırdığı ve bunun da nöronal hücre ölümünü teşvik ettiği düşünölmektedir (7,8,92). Buradan yola çıkarak sitikolinin periferik sinir hasarında Wallerian dejenerasyonun tetikleyicisi olan PLA₂'nin aktivasyonunu dolayısıyla akson ve myelin yıkımını önleyip enflamatuar yanıtı ve skar dokusu oluşumunu engelleyerek aksonal iyileşmeyi arttırdığı düşünölebilir.

Fosfotidilkolin biyosentezinde önemli olan kolin kinaz, kolinfosfotransferaz ve fosfokolin sitidiltransferaz enzimleri nöronların aksonlarında bulunur. Araki ve ark. sıçan siyatik sinirinde yaptıkları çalışmada PC12 hücrelerinde nörit oluşumunun filizlendiği dönemde fosfotidilkolin sentezinin arttığını ve bu artışın da primer olarak kolinfosfotransferazdaki aktiviteyle ve onun diaçilgliserolle doymasıyla kontrol edildiğini düşünmüşler ve fosfotidilkolin sentezinin NGF'nin açığa çıkmasıyla indüklenen nörit gelişimini arttırdığını bildirmişlerdir (93). Periferik sinirde hasar sonucu Schwann hücreleri ve bazal laminadan oluşan Bugner bantları önderliğinde proksimal uçtan nörit uzanımı ile rejenerasyon gerçekleşmektedir (59). Aksonal büyüme ve rejenerasyon için gerekli olan protein lipid gibi maddelerin hücre gövdelerinde barındıkları ve anterograd olarak aksonlara taşındıkları bildirilmiştir (94). Fakat Vance ve ark.'nın bildirdiklerine göre aksonların da fosfotidilkolin, sfingomyelin, fosfotidiletanolamin, fosfotidilserin, fosfotidilinositol ve serbest yağ asitlerini sentezleme yetenekleri vardır (95). Bu sebeple aksonal filizlenme için aksonlarda biyosentetik yolla fosfotidilkolin sentezinde sitikolinin enzimatik reaksiyonları gerekmektedir (95,96,97). Bir çok çalışmada ortak görüş sitikolinin fosfotidilkolin sentezini arttırarak nöroprotektif etkisini gösterdiğidir (3,14). Sitidin ve kolinin aynı anda verilmesi ile yapılan deneysel çalışmalarda serbest yağ asitlerinin fosfolipidlerle birleşmesini arttırarak (98) ve amiloid prekürsör proteininin (APP) salınımını ve ekspresyonunu stimüle ederek (99) membran fosfolipidlerinin sentezini arttırdıkları gösterilmiştir. Daha önce Aslan'ın da saptadığı gibi çalışmamızda ortaya çıkan hem CDP-kolin hem de sitidin+ kolin verilen sıçanlar da aksonal dansite artışı hem sitidinin tek başına etkisi hem de kolinin etkisini potansiyalize ederek ikisi birlikte fosfolipid sentezini arttırması yoluyla aksonal filizlenmede etki ettiğini düşündürmektedir (49).

Bulgulardan çıkan sonuçlara bakılacak olursa kolin, sitidin+kolin ve CDP-kolin uygulaması aksonal rejenerasyonu arttırmaktadır; fakat bunlardan sadece CDP-kolin elektrofizyolojik değerlendirme ve skar formasyonu oluşumunda

olumlu etki sağlamaktadır. Sinir iyileşmesinin hiç bir aşamasında tek başına uygulanan sistemik sitidinin yararlı etkisi gösterilmemiştir.

Sonuç olarak çalışmamızda sistemik uygulanan CDP-kolinin hem skar formasyonu oluşumunu engelleyerek hem de aksonal rejenerasyonu potansiyelize ederek fonksiyonel düzelmeyi sağladığı saptanmıştır.

KISALTMALAR

KG: Kontrol Grubu
CDP-KoG: CDP-Kolin grubu
SiG: Sitidin grubu
KoG: Kolin grubu
Si-KoG: Sitidin+Kolin grubu
CMP: Sitidin monofosfat
SFİ: Siyatik Fonksiyon İndeksi
PLA₂: Fosfolipaz A₂
CPT: Kolin fosfotransferaz
ALCAR: Acetyl – L –Carnitine:
EMG: Elektromyelografi
SEM: Standart hata
TPA: Doku plazminojen aktivatörü

KAYNAKLAR

- 1) Secades JJ, Frontera G. CDP-Choline: Pharmacological and clinical review. *Meth Find Exp Clin Pharmacol* 1995;17:1-54.
- 2) Adibhatla RM, Hatcher JF. Citicoline mechanism and clinical efficacy in cerebral ischemia. *J Neurosci Res* 2002; 70:133-139.
- 3) Adibhatla RM, Hatcher JF, Dempsey RJ. Citicoline: Neuroprotective mechanisms in cerebral ischemia. *J Neurochem* 2002; 80:12-23.
- 4) Davalos A, Castillo J, Alvarez-Sabin J, et al. Oral citicoline in acute ischemic stroke : An individual patient data pooling analysis of clinical trials. *Stroke* 2002; 33:2850-2857.
- 5) Hurtado O, Moro Ma, Cardenas A, et al. Neuroprotection afforded by prior citicoline administration in experimental brain ischemia: Effects on glutamate transport. *Neurobiol Dis* 2005;18: 336-345.
- 6) Adibhatla RM, Hatcher JF, Dempsey RJ. Effects of citicoline on phospholipid and glutathione levels in transient cerebral ischemia. *Stroke* 2001; 32:2376-2381.
- 7) Adibhatla RM, Hatcher JF. Citicoline decreases phospholipase A2 stimulation and hydroxyl radical generation in transient cerebral ischemia. *J Neurol Res* 2003; 73: 308-315.
- 8) Rao AM, Hatcher JF, Dempsey RJ. Does CDP-choline modulate phospholipase activities after transient forebrain ischemia. *Brain Res* 2001; 893:268-272.
- 9) Alvarez XA, Sampedro C, Lozano R, Cacabelos R. Citicoline protects hippocampal neurons against apoptosis induced by brain β -amyloid deposits plus cerebral hypoperfusion in rats. *Meth Find Exp Clin Pharmacol* 1999; 21(8):535-540.
- 10) Weiss GB. Minireview. Metabolism and actions of CDP-Choline as an endogenous compound and administered exogenously as citicoline. *Life Sci* 1995; 56(9): 637-660.
- 11) Adibhatla RM, Hatcher JF. Cytidine 5'-diphosphocholine (CDP-Choline) in stroke and other CNS disorders. *Neurochem Res* 2005; 30(1):15-23.
- 12) Adibhatla RM, Hatcher JF, Dempsey RJ. Cytidine 5'-diphosphocholine affects CTP-Phosphocholine cytidyltransferase and lyso-phosphatidylcholine after transient brain ischemia. *J Neurosci Res* 2004; 76:390-396.
- 13) Clark WM, Warach MD, Pettigrew LC, Gammans RE, Sabounjian LA. A randomized dose-response trial of citicoline in acute ischemic stroke Patients. *Neurology* 1997; 49:671-678.
- 14) Maldonado VC, Perez JB, Escario JA. Effects of CDP-choline on the recovery of patients with head injury. *J Neurol Sci* 1991; 103:15-18.
- 15) Adibhatla RM, Hatcher JF, Türeyen K. CDP-Choline liposomes provide significant reduction in infarction over free CDP-Choline in stroke. *Brain Res* 2005; 1058:193-197.

- 16) Clark WM, Williams BJ, Selzer KA, et al. A randomized efficacy trial of citicoline in patients with acute ischemic stroke. *Stroke* 1999; 30:2592-2597.
- 17) Secades JJ, Sabin JE, Rubio F, et al. Citicoline in intracerebral hemorrhage: double-blind, randomized, placebo-controlled, multi-centre pilot study. *Cerebrovasc Dis* 2006; 21(5-6):380-385.
- 18) Tazakı Y, Sakai F, Otomo E, et al. Treatment of acute cerebral infarction with a choline precursor in a multicenter double-blind placebo-controlled study. *Stroke* 1988; 19:211-216.
- 19) Warach S, Pettigrew LC, Dashe JF, et al. Effect of citicoline on ischemic lesions as measured by diffusion-weighted magnetic resonance imaging. Citicoline 010 investigators. *Ann Neurol* 2000; 48:713-22.
- 20) Rao AM, Hatcher JF, Dempsey RJ. Lipid alterations in transient forebrain ischemia: possible new mechanisms of CDP-choline neuroprotection. *J Neurochem* 2000; 75: 2528-2535.
- 21) Alkan T, Kahveci N, Goren B, Korfaı E, Özluk K. Ischemic brain injury caused by interrupted versus uninterrupted occlusion in hypotensive rats with subarachnoid hemorrhage: neuroprotective effects of citicoline. *Arch Physic and Biochem* 2001; 109(2):161-167.
- 22) Başkaya MK, Dogan A, Rao M, et al. Neuroprotective effects of citicoline on brain edema and blood-brain breakdown after traumatic brain injury. *J Neurosurg* 2000; 92: 448-452.
- 23) Cakır E, Usul H, Peksoylu B, et al. Effects of citicoline on experimental spinal cord injury. *J Clin Neurosci* 2005; 12(8):923-926.
- 24) Clark WM, Gunion-Rinker L, Lessov N, Hazel K. Citicoline treatment for experimental intracerebral hemorrhage in mice. *Stroke* 1998; 29:2136-2140.
- 25) Dempsey RJ, Vemuganti L, Rao AM. Cytidinediphosphocoline treatment to decrease travmatic brain injury-induced hippocampal neuronal death, cortical contusion volume, and neurologic dysfunction in rats. *J Neurosurg* 2003; 98:867-873.
- 26) Krupinski J, Slevin M, Badimon L. Citicholine inhibits MAP kinase signalling pathways after focal cerebral ischemia. *Neurochem Res* 2005; 30(8):1067-1073.
- 27) Krupinski J, Ferrer I, Barrachina M, et al. CDP-choline reduces pro-caspase and cleaved caspase-3 expression, nuclear DNA fragmentation, and specific parp-cleaved products of caspase activation following middle cerebral artery occlusion in rat. *Neuropharmacology* 2002; 42: 846-854.
- 28) Rao AM, Hatcher JF, Dempsey RJ. CDP-choline: Neuroprotection in transient forebrain ischemia of gerbils. *J Neurosci Res* 1999; 58:697-705.
- 29) Zhao J, Liu Q, Cui J, Hong J, Song Z. Research on motor dysfunction and the role of CTP after travmatic brain injury in rats. *Sichum Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 2003; 34(3) :559-561.
- 30) Blusttajn JK, Wurtman RJ. Choline and cholinergic neurons *Science* 1983; 221:614-619.

- 31) Blusttajn JK. Choline, a vital amine. *Science* 1998; 281:794-795.
- 32) Lopez GI, August J, Savcı V, Ortiz JA, Wurtman RJ. Evidence that 5'-cytidinediphosphocholine can effect brain phosphocholine composition by increasing choline and cytidine plasma levels. *J Neurochem* 1995; 65:889-894.
- 33) Ulus HI, Wurtman RJ, Mauron CJ Blusttajn JK. Choline increases acetylcholine release and protects against the stimulation –induced decrease in phosphatide levels within membranes of rat corpus striatum. *Brain Res* 1989; 484:217-227.
- 34) Wurtman RJ, Meredikt R, Ulus HI, Yu L. Effects of oral CDP-Choline on plasma choline and uridine levels in humans. *Biochem Pharmacol* 2000; 60(7): 989-992.
- 35) Gürün SM, Savcı V, Ulus HI, Kiran B. Centrally administered choline increases plasma prolactin levels in conscious rats. *Neurosci Lett* 1997; 232:79-82.
- 36) Özarda IY, Yılmaz Z, Ulus HI. Endotoxin alters serum–free choline and phospholipid-bound choline concentration, and choline administration attenuates endotoxin–induced organ injury in dogs. *Schock* 2005; 24(3):288-293.
- 37) Savcı V, Gürün SM, Ulus HI, Kiran B. Effect of intracerebroventricularly injected choline on plasma ACTH and β -endorfin levels in conscious rats. *Eur J Pharmacol* 1996; 309:275-280.
- 38) Savcı V, Gürün SM, Kiran B. Intracerebroventricularly injected choline increases plasma oxytocin levels in conscious rats. *Brain Res* 1996; 709:97-102.
- 39) Savcı V, Ulus HI. Choline administration reverses hypotension in spinal cord transected rats: the involvement of vazopressin. *Neurochem. Res* 1998; 23(5):733-741.
- 40) Savcı V, Goktalay G, Cansev M, Cavun S, Yılmaz MS, Ulus HI. Intra venously injected CDP-choline increases blood pressure and reverses hypotension in hemorrhagic shock : Effect is mediated by central cholinergic activation. *Eur J Pharmacol* 2003; 468:129-139.
- 41) Unal CB, Demiral Y, Ulus HI. The effect of choline on body temperature in conscious rats. *Eur J Pharmacol* 1998; 363:121-126.
- 42) Yang Y, Liu Z, Cermak J, et al. Protective effects of prenatal choline supplementation on seizure induced memory impairment. *J Neurosci* 2000; 20:1-6.
- 43) Yılmaz Z, Özarda IY, Torun S, Ulus HI. Intravenous administration of choline or CDP-choline improves platelet count and closure times in endotoxin-treated dogs. *Schock* 2006; 25(1):73-79.
- 44) Kennedy EP, Weiss S. The function of cytidine coenzymes in the biosynthesis of phospholipids. *J Biol Chem* 1956; 222:193-214.
- 45) Lopez GI, August J, Von Borstel R, Wurtman RJ. Metabolism of cytidine (5') diphosphocholine following oral and intravenous administration to human and the rat. *Neurochem Int* 1987; 11(3): 293-297.

- 46) Lopez GI, Wurtman RJ. Enhancement by cytidine of membrane phospholipid synthesis. *J Neurochem* 1992; 59: 338-343.
- 47) Savcı V, Wurtman RJ. Effect of cytidine on membran phospholipid sythesis in rat slices. *J Neurochem* 1995; 64:378-384.
- 48) [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(6):615-22.
- 49) Aslan E: Periferik sinir kesisinde topikal uygulanan sitidin, kolin, ve sitikolinin aksonal rejenerasyon ve epinöral skar dokusu üzerine etkilerinin erken ve geç primer sütün modelleriyle araştırılması, Uzmanlık Tezi, Bursa, Uludağ Üniversitesi; 2006.
- 50) Petersen J, Russell L, Andrus K, et al. Reduction of extaneural scarring by adcon-T/N after surgical intervention. *Neurosurgery* 1996; 38(5):976-984.
- 51) Hare GMT, Evans PJ, Mackinnon SE et al. Walking Track Analysis: A long term assesment of peripheral nerve recovery. *Plastic and Reconstructive Surgery*; 1992; 89(2):251-258.
- 52) 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(7):1264-1271.
- 53) Lundborg G. 25 th Anniversary Presentation. A 25-Year perspective of peripheral nerve surgery: evolving neuroscientific concepts and clinical significance. *J Hand Surg* 2000; 25A(3):391-414.
- 54) Makwana M, Raivich G. Molecular Mechanism in succesful peripheral regeneration . *FEBS Journal* 2005; 272:2628-2638.
- 55) Terzis JK, Sun D, Thanos PK. Historical and basic science review: Past, present, and future of nerve repair. *J Reconstr Microsurg* 1997; 13(3):215-224.
- 56) 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(1 suppl):78-84.
- 57) 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 (4):408-415.
- 58) 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(3):149-152.
- 59) Hall SM. Regeneration in cellular and acellular autografts in the peripheral nervous system. *Neuropath Appl Neurobiol* 1986; 12:27-46.
- 60) 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; 134:133-140.

- 61) 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; 20:124-127.
- 62) Chai H, Wu W, So KF, Prevetie DM, Oppenheim RW. Long term effects of a single dose of brain-derived neurotropic factor on motoneuron survival following spinal root avulsion in the adult rat. *Neurosci Lett* 1999; 274:147-150.
- 63) Hansson HA, Dahlin LB, Danielsen N, et al. Evidence indicating trophic importance of IGF-I in regenerating peripheral nerves. *Acta Physiol Scand* 1986; 126:609-614.
- 64) 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; 104:1623-1631.
- 65) 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; 26A: 478-488.
- 66) Mcdonald DS, Zocodone W. An injectable nerve regeneration chamber for studies of unstable soluble growth factors. *J Neurosci Methods* 2003; 122:171-178.
- 67) 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.
- 68) 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; 91:265-271.
- 69) 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; 9:157-160.
- 70) 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; 85:119-127.
- 71) 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(29):9675-9686.
- 72) 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; 47:208-215.
- 73) 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(9):2901-2911.
- 74) Champe PC. Phospholipid Metabolism, Lippincott's Illustrated Review, 1994.

- 75) Evans PJ, Bain JR, Mackinnon SE, et al. Selective reinnervation: A comparison of recovery following microsuture and conduit nerve repair. *Brain Res* 1991; 559: 315-321.
- 76) 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; 16A:251-261.
- 77) Kim DH, Connolly SE, Zhao S, et al. Comparison of macropore, semipermeable, and nonpermeable collagen conduits in nerve repair. *J Reconstr Microsurg* 1993; 9(6):415-420.
- 78) Labrador RO, Buti M, Navarro X. Influence of collagen and laminin gels concentration on nerve regeneration after resection and tube repair. *Exp Neurology* 1998; 149:243-252.
- 79) Maeda T, Mackinnon SE, Best TJ, et al. Regeneration across "stepping-stone" nerve grafts. *Brain Res.* 1993; 618:196-202.
- 80) Rosen JM, Padilla JA, Nguyen KD, et al. Artificial nerve graft using collagen as an extracellular matrix for nerve repair compared with sutured autograft in a rat model. *Ann Plast Surg* 1990; 25(5).
- 81) Davison SP, Thomas M, Nora PM, Ernest M. Improved nerve regeneration with neutralization of transforming growth factor-[beta]1. *Laryngoscope* 1999; 109(4):631-635.
- 82) 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; 19:255-260.
- 83) Hall SM: The response to injury in the peripheral nervous system. *J Bone Joint Surg* 2005; 87:1309-1319.
- 84) Görgülü A, İmer M, Şimşek O, et al. The effect of aprotinin on extraneural scarring in peripheral nerve surgery: An experimental study. *Acta Neurochir* 1998; 140:1303-1307.
- 85) İlbay K, Etus V, Yıldız K, İlbay G, Ceylan S. Topical application of mitomycin C prevents epineural scar formation in rats. *Neurosurg Rev* 2005; 28:148-153.
- 86) Özgenel GY, Filiz G. Effects of human amniotic fluid on peripheral nerve scarring and regeneration in rats. *J Neurosurg* 2003; 98:371-377.
- 87) Özgenel GY. Effects of hyaluronic acid on peripheral nerve scarring and regeneration in rats. *Microsurgery* 2003; 23:575-581.
- 88) 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(1):78-86.
- 89) Oshitari T, Fujimoto N, Adachi-Usami E. Citicoline has a protective effect on damaged retinal ganglion cells in mouse culture retina. *Neuroreport* 2002; 13:2109-2111.
- 90) Fu SY, Gordon T. The cellular and molecular basis of peripheral nerve regeneration. *Mol Neurobiol.* 1997; 14(1):67-116.

- 91) 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; 24:753-765.
- 92) Adibhatla RM, Hatcher JF, Larsen EC, et. al. CDP-Choline significantly restores phosphatidylcholine A2 and CTP: phosphocholine cytidyltransferase after stroke. *J Biol Chem* 2006; 281(10):6718-6725.
- 93) Araki W, Wurtman RJ. Control of membrane phosphatidylcholine biosynthesis by diacylglycerol levels in neuronal cells undergoing neurite outgrowth. *Proc Natl Acad Sci* 1997; 94:11946-11950.
- 94) Alberts B, Bray D, Lewis J, Roberts K, Watson JD, *Molecular Biology of the Cell*. 2nd edit. Garland Press, New York, 1989.
- 95) 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; 62:329-337.
- 96) Vance JE, Pan D, Campenot RB. Biosynthesis of membrane lipids in rats axons . *J Cell Biol* 1991; 115(4):1061-1068.
- 97) Vance JE, Chaves EP, Campenot RB, Vance DE. Role of axons in membrane phospholipid synthesis in rat sympathetic neurons. *Neurobiol Aging* 1995; 16(3):493-499.
- 98) Knapp S, Wurtman RJ. Enhancement of free fatty acid incorporation into phospholipids by choline plus cytidine. *Brain Res* 1999; 822:52-59.
- 99) Wang CS, Lee KR. Choline plus cytidine stimulate phospholipid production, and expression of amyloid precursor protein in rat PC12 cells. *Neurosci Lett* 2000; 283:25-28.

ÖZGEÇMİŞ

1976 yılı, İstanbul doğumluyum. İlkokul öğrenimimi Mehmet Karamancı İlkokulu'nda, ortaöğrenimimi Sankt Georg Avusturya Kız Lisesi'nde tamamladım. 1-3 Temmuz 2000 tarihlerinde Nordstadt Krankenhaus Nöroşirurji Kliniği'nde Prof Dr M. Samii'nin yanında gözlemci olarak bulundum. 2001 yılında Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi'nden mezun oldum. 26 Kasım 2001'de Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroşirürji Anabilim Dalı'nda araştırma görevlisi olarak göreve başladım. 1 Eylül - 30 Şubat tarihleri arasında Münih Üniversitesi Nöroşirurji Departmanı Tümör Biyolojisi laboratuvarında hücre kültürü ve endotel progenitor hücrelerinin izolasyonu konusunda araştırma yaptım.

TEŞEKKÜR

Tez çalıőmamda her tűrlű desteği veren Prof.Dr.İ.Hakkı ULUS, Doç.Dr.Ahmet BEKAR'a, EMG kayıtlarının gerçekleőtirilmesinde Doç Dr Necdet KARLI'ya, histomorfolojik değerlendirmenin elde edilmesinde Uzm Dr İlker Mustafa KAFA'ya, tezin deney aőamasında yardımlarını esirgemeyen Dr Mehmet SAVRAN'a, Narin AKINARSLAN'a ve Deney Hayvanları Araőtırma ve Yetiőtirme Merkezi çalıőanlarına ve tez yazımında teknik destek veren Elif TANYER'e yardımlarından dolayı teőekkűr ederim.