



T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
NÖROŞİRÜRJİ ANABİLİM DALI

**PERİFERİK SİNİR KESİLERİNDE SİTİKOLİN UYGULAMASININ KORUYUCU
ETKİ MEKANİZMALARININ ARAŞTIRILMASI**

Dr. Elif BAŞARAN GÜNDOĞDU

UZMANLIK TEZİ

BURSA – 2014



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

**PERİFERİK SİNİR KESİLERİNDE SİTİKOLİN UYGULAMASININ KORUYUCU
ETKİ MEKANİZMALARININ ARAŞTIRILMASI**

Dr. Elif BAŞARAN GÜNDOĞDU

UZMANLIK TEZİ

Danışman: Prof. Dr. Ahmet BEKAR

BURSA – 2014

İÇİNDEKİLER

Kısaltmalar	i
Özet	ii
İngilizce Özet.....	iv
Giriş.....	1
Gereç ve Yöntemler	8
Bulgular	17
Tartışma	29
Kaynaklar	35
Teşekkür	42
Özgeçmiş	43

KISALTMALAR

ACE: Anjiyotensin Konvertirg Enzim
ACTH: Adrenokortikotropik hormon
ANOVA: Tek Yönlü Varyans Analizi
ATPaz: Adenozintrifosfataz
BCL-2: B-cell lymphoma 2
Ca: Kalsiyum
CDP-kolin: Sitidindifosfo-kolin
EMG: Elektromyografi
G: Gauge
IL-1: İnterlökin-1
 $\mu\text{mol/kg}$: mikromol/kilogram
MMP: Matriks metalloproteinaz
M: Mol
MBP: Myelin bazik proteini
P: Probability
PVDF: Poliviniliden florür
SFİ: Siyatik Fonksiyon İndeksi
TIMP: Tissue Inhibitors of Metalloproteinases
TNF alfa: Tümör nekroz faktör alfa
TGF beta: Transformin growth faktör-beta
Zn: Çinko

ÖZET

CDP-kolin (sitikolin), fosfolipid metabolizmasında yer alan önemli bir endojen metabolittir. Nöral iyileşmede, iskemik nöral hastalıklarda, nörodejeneratif hastalıklarda, nöropatik ağrıda, bazı kardiyovasküler ve endokrin hastalıklarda yararları bilinmektedir. MMP ve TIMP, hücre dışı matriksin remodelizasyonunda anahtar role sahip proteinlerdir. Bu çalışmada CDP-kolinin, siyatik sinirin transseksiyon-sütürasyon modeliyle oluşturulan nöral hasar sonrası bu moleküller üzerindeki etkisi araştırıldı.

Çalışmada 108 adet Wistar albino erkek sıçan kullanıldı. Hayvanlar eşit sayıda üç gruba ayrıldı. Birinci grupta sağ siyatik sinir cerrahi olarak ortaya kondu ancak transseksiyon ve enjeksiyon yapılmadı (Sham grubu). İkinci ve üçüncü gruplarda sağ siyatik sinire transseksiyon ve sütürasyon uygulandı. İkinci grupta 3 ml salin, üçüncü grupta 0,3 ml CDP-kolin işlem gününde intraperitoneal olarak enjekte edildi. Her grup üçer alt gruba ayrılarak işlemin 1. 3. ve 7. günlerinde sağ siyatik sinirler eksize edildi. Hayvanların yarısına eksizyondan önce anatomik çalışma amacıyla perfüzyon işlemi yapıldı. Alınan siyatik sinir örneklerinde Western blot yöntemi ile aktin, MMP-9, MMP-2, TIMP-1 ve TIMP-3 protein konsantrasyonlarına ve Zimografi yöntemiyle MMP-9 ve MMP-2 aktivitelerine bakıldı. Aynı zamanda anatomik olarak akson iyileşmesi incelendi.

MMP-9 ve MMP-2 miktarları ve aktiviteleri siyatik sinir hasarını takip eden 1. günde Salin ve CDP-kolin gruplarında Sham grubuna göre anlamlı olarak artarken, 3. ve 7. günlerde CDP-kolin grubunda Salin grubuna göre anlamlı olarak azaldı ($p<0.001$). TIMP-1 ve TIMP-3 miktarları ise siyatik sinir hasarını takip eden 1. günde her üç grupta da değişmezken, 3. ve 7. günlerde CDP-kolin grubunda Sham ve Salin gruplarına kıyasla anlamlı olarak artış gösterdi; Salin grubunda ise Sham grubuna göre hiçbir dönemde anlamlı değişiklik olmadı. Histomorfolojik değerlendirmede, CDP-kolin grubunda yeni akson oluşumları, adacık formasyonları (kompartmanlar) şeklinde akson toplulukları ve bu aksonlar üzerinde myelin oluşumunun başladığı ve ilerlediği gözlemlendi. Myelinize akson dansitesinin Salin grubunda zamanla kötüleşerek azaldığı, sham grubunda anlamlı bir değişim göstermediği tespit edildi. CDP-

Kolin grubunda ise her üç zaman diliminde alınan örnekler salin grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı derecede iyileşme ve artmış myelinli akson dansitesi gösterdiği görüldü.

Çalışmamızda sıçan siyatik sinirinin primer kesi ve suture modelinde CDP-kolin tedavisinin MMP-9 ve MMP-2 düzeylerini ve aktivitelerini azalttığı ve TIMP-1 ile TIMP-3 düzeylerini arttırdığı literatürde ilk kez gösterilmiştir. Çalışmamız periferik sinir kesilerinde CDP-kolin uygulaması ile sağlanan nöroproteksiyonun etki mekanizmasının aydınlatılması bakımından önemlidir. Bulgularımız gelecekte CDP-kolin'in periferik sinir hasarındaki etkinliğinin inceleneceği klinik çalışmalara ışık tutar niteliktedir.

Anahtar kelimeler: Sitikolin, periferik sinir hasarı, koruyucu mekanizmalar.

SUMMARY

Investigation of The Protective Effects of Citicoline on Peripheral Nerve Injuries

CDP-choline (citicoline) is an endogenous metabolite which plays an important role in phospholipid metabolism. It has known beneficial effects in neural trauma, ischemic conditions such as stroke and cerebral infarcts, neurodegenerative conditions such as Alzheimer's or Parkinson's disease, and neuropathic pain, as well as various cardiovascular and endocrine diseases. MMPs and TIMPs are key molecules in the remodelling of the extracellular matrix. In the current study, the effect of CDP-choline on these molecules after sciatic nerve injury in the transection-suturation model in rats was evaluated.

108 Wistar albino male rats were included in the study. Rats were divided into three groups of equal quantities. The first group was composed of rats whose right sciatic nerves were surgically exposed but no transection or injection was made (the Sham group). The rats in the second and third groups underwent transection and immediate primary suturation of the right sciatic nerve. 3 ml of normal saline and 0.3 ml of CDP-choline were injected intraperitoneally to rats in the second (the Saline group) and the third (the CDP-choline group) groups, respectively, at the same time with the intervention. Each group was further divided into 3 subgroups, of which the right sciatic nerves were excised at the 1st, 3rd and 7th days after the initial intervention. Half of the animals underwent perfusion process for the purpose of anatomic study. The sciatic nerve specimens were then analyzed with the Western blot technique for levels of MMP-9, MMP-2, TIMP-1, TIMP-3, and actin and with Zymography method for MMP-9 and MMP-2 activities. Axonal regeneration was also studied anatomically.

Levels and activities of MMP-9 ve MMP-2 were significantly higher in the Saline and CDP-choline groups than in the Sham group on the 1st day postinjury, albeit being significantly higher in the CDP-choline group than in the Saline group on the 3rd and 7th days postinjury ($p < 0.001$). On the other hand, levels of TIMP-1 and TIMP-3 were not different among the three groups on the

1st day postinjury, but they were significantly higher in the CDP-choline group than that of the Sham and Saline groups. No significant difference was observed between the Sham and the Saline groups throughout the study period (i.e. 1st or 3rd or 7th days). On histomorphological evaluation, new axon formation, and formation and advancement of myelination on newly formed islets (compartments) of axonal regrowth were observed in the CDP-choline group. Myelinated axon density was increasingly deteriorating in the saline group while it was steady and significantly increasing in the saline and the CDP-choline groups respectively.

In our study, for the first time in the literature, CDP-choline was shown to decrease MMP-2 and MMP-9 levels and activities while increasing TIMP-1 and TIMP-3 levels in rat sciatic nerve transection and suturation model. These data are significant in terms of revealing the mechanism of action of CDP-choline in providing neuroprotection in peripheral nerve transection. Our findings may shed light on future clinical studies investigating the effect of CDP-choline in peripheral nerve injuries.

Key words: Citicoline, peripheral nerve injury, protective mechanisms.

GİRİŞ

Wallerian dejenerasyon, bir periferik sinirin transeksiyonunu takiben oluşan olaylar silsilesidir. Periferik sinir hasarındaki yeniden yapılanma sürecinde aksonal dejenerasyon ve rejenerasyon meydana gelir (1, 2). Travma sonrasında distal sinir segmentinde meydana gelen Wallerian dejenerasyon, akson ve myelin kalıntılarının ortadan kaldırılmasını sağlar. Rejenere olan aksonlar, proksimal sinir matriksine girdiğinde Schwann hücreleri bunların etrafını sarar ve bunları remyelinize eder (3-5).

Sıçanda aksonal dejenerasyon 3 günde tamamlanmaktadır (6). Aksonal debrisin temizlenmesi ve myelin yıkımı santral ve periferik sinir sisteminde farklılık göstermektedir (6). Sıçan siyatik sinirinde myelin yıkımı ortalama 25 günde tamamlanmaktadır (7).

Periferik sinir hasarının gerçekleşmesinin hemen ardından Schwann hücreleri dedifferansiye ve proliferasyon olarak myelinin yıkılmasını başlatırlar (8-11). Merkezi sinir sisteminde de oligodendrositler demyelinize olurlar ancak myelin yıkımı ve ortadan kaldırılmasında aktif değildirler (12, 13). Makrofajlar, geç dönemde (sıçan siyatik sinirinde transeksiyonu izleyen 3. günde) ortaya çıkarlar (7, 14). Periferik sinir sisteminde makrofajlar ortamda bulunmasa bile Schwann hücrelerinin myelin debrisin büyük bir bölümünü temizleyebildiği görülmüştür (15, 16). Dolaşımdaki makrofajların periferik sinire ulaşmaları, kan-sinir bariyerinin, dejenerasyonun başladığı sinir segmenti boyunca yıkıma uğramış olmasından dolayı mümkün olmaktadır (17). Ancak santral sinir sisteminde kan beyin bariyeri sadece hasara uğrayan bölgede bozulduğundan, Wallerian dejenerasyon sürecine bu bölgeden geçen az miktarda makrofaj katılmaktadır (18). Bu nedenle santral sinir sisteminde myelin debrisin ortadan kaldırılması, primer olarak, fagositoz yeteneği makrofajlar kadar yüksek olmayan mikroglialar tarafından yerine getirilir (19, 20).

Proteolitik aktivite, Wallerian dejenerasyonun tüm aşamalarında izlenmektedir. Proteolizin nöral hasarı takiben çok kısa bir süre içerisinde başlaması, kan-sinir bariyerinin yıkımını sağlayarak makrofaj infiltrasyonunu kolaylaştırmaktadır. Aynı zamanda hücreler arası matriksin yıkımı sağlanarak hücreler arası hareket ve debris yıkımı artmaktadır (21).

Matriks metalloproteinazlar (MMP), dokunun normal gelişimi, yaranın iyileşmesi ve dokuların tamiri sırasında hücre dışı matriksin yapılanmasını düzenlemekle görevli proteolitik enzim ailesidir. Bu enzimleri dengeleyen temel öge, MMP'ların doku inhibitörü (Tissue Inhibitors of Metalloproteinases – TIMP) olarak adlandırılan inhibitör protein ailesidir. Bu iki protein ailesi hücre ve matriks etkileşimini düzenler. Doku hasarlarında ve hücrel disfonksiyonda bu denge bozulur (22).

MMP ailesi, en az 23 proteinden oluşmaktadır. Bu proteinler; kollajenazlar (MMP-1, 8, 13), jelatinazlar (MMP-2 ve 9), sitomelinler (MMP-3, 10, 11), matrilisin (MMP-7), metalloelastaz (MMP-12) ve membran tipi metalloproteinazlar (MMP-14, 15, 16, 17) olarak gruplandırılmıştır. Her bir MMP farklı bir gen tarafından eksprese edilir. Membran tipi metalloproteinazlar bir transmembran alt ünite ile hücre yüzeyine bağlanmış halde bulunurken (23), diğerleri ise ekstraselüler alanda latent proenzimler olarak salgılanmakta ve aktifleşmek için posttranslasyonel modifikasyona uğramaktadır (24). MMP'ler gen transkripsiyonu, proenzim aktivasyonu ve TIMP aktivasyonu olmak üzere üç değişik aşamada kontrol edilmektedir (25). MMP'yi transkripsiyon aşamasında arttırıp azaltabilen stokinler; TNF alfa (26), IL-1 (27), TGF beta (24) ve prostaglandin E2'dir (28, 29).

Memelilerde bilinen 4 adet TIMP (TIMP-1, 2, 3 ve 4) molekülü mevcuttur (30). TIMP molekülleri, MMP molekülünün katalitik alt ünitesine bağlanarak 1:1 nonkovalent kompleksler oluştururlar ve sonuçta enzim inhibe olur (31, 32).

Yapılan bir çalışmada, MMP-9, MMP-3 ve TIMP-1'in, travma sonrasında sıçanların siyatik sinirinin ezilen ve distal segmentlerinde indüklendikleri; hasarlanan sinirde TIMP-1 aktivitesinin, proteaz aktivitesine göre daha fazla arttığı gösterilmiştir. TNF alfa ve TGF beta; TIMP-1'in bilinen modülatörlerdir. Bunların ekspresyonu erken (1. gün) ve geç faz (4. gün) boyunca, TIMP-1 ve MMP-9'un ekspresyonu ile paralellik göstermektedir. Sonuç olarak hasar sonrasında TIMP-1, bazal membranı kontrolsüz yıkımdan korumaktadır (33).

MMP-9 ve MMP-2, periferik sinir hasarına bağlı nöropatik ağrının gelişiminde ve sürdürülmesinde önemlidir. MMP-9 ve MMP-2 nin inhibisyonu sırayla TIMP-1 ve TIMP-2 tarafından sağlanmaktadır. Bir çalışmada TIMP-1 ve

TIMP-2'nin, periferik sinir hasarında dorsal kök ganglionu üzerindeki etkisi ölçülmüş; gerçek zamanlı PCR incelemesinde TIMP-1'in arttığı, TIMP-2'nin de geç fazda azaldığı görülmüştür. Normal şartlarda satellit hücrelerde mevcutken, periferik sinir hasarında satellit hücrelerde arttığı gibi sensöryal sinirlerde de indüklendiği gösterilmiştir (34). MMP-9 geni kapatıldığında Schwann hücrelerinin farklılaşmamış ve immatür olarak kaldığı, mitotik aktivitenin arttığı görülmüştür (35).

Spinal kord hasarında MMP'lerin kan-spinal kord bariyerinin erken yıkımında önemli rol oynadıklarına dair kanıtlar mevcuttur. Lökositler, damar duvarından dokuya migrasyonları sırasında salgıladıkları MMP'ler ile bazal laminanın yapısal proteinlerini yıkıma uğratırlar. Zonula occludens-1, VE-cadherin ve occludin, MMP-2 ile MMP-9'un spesifik substratlarıdır (36-39). Spinal kord hasarı yapılmadan önce nötrofillerin ortadan kaldırılması hasar sonrasında MMP-9 aktivitesinin azalması ile sonuçlanmıştır (40). MMP-9 geninden yoksun farelerde ve MMP inhibitör ilaçları verilen farelerde bariyer yıkımının azaldığı saptanmıştır (41).

MMP'ler, reaktif oksijen radikalleri ile regüle olurlar (42,43). Major bir endojen antioksidan olan süperoksit dismutaz-1'in arttırıldığı farelerde normal bireylere göre spinal kord hasarı sonrası MMP-9 aktivitesinin artmadığı görülmüştür (41).

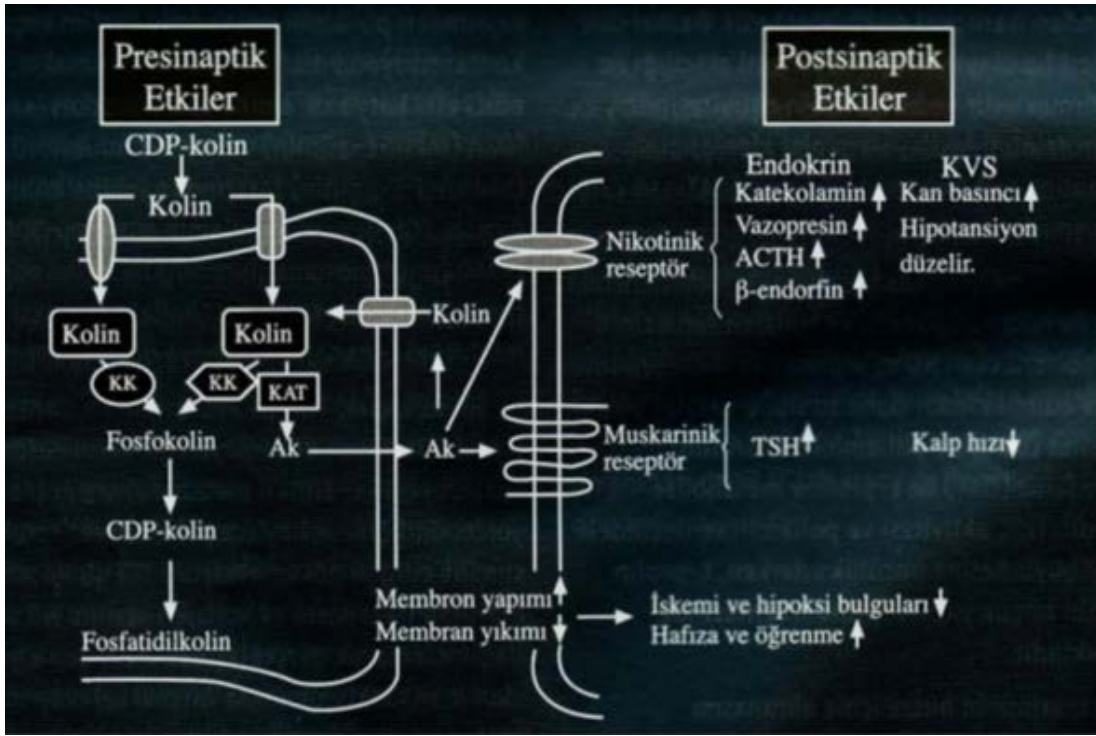
MMP-2'nin apoptotik hücre ölümünü teşvik ettiği yönünde kanıtlar mevcuttur. MMP-2 inhibitörlerinin verildiği spinal kord hasarlı farelerde nöronal ve glial hücrelerde kontrole göre azalmış apoptoz düzeyleri saptanmıştır (44).

Bu veriler ışığında; MMP'lerin nöral hasar sonrasında gerçekleşen bariyer yıkımı, lökosit infiltrasyonu ve apoptotik nöron kaybı hususlarında önemli rolleri olduğu açıktır. Dolayısıyla; MMP aktivitesinin özellikle akut dönemde inhibe edilmesinin kısa ve uzun vadede nöroprotektif etkisinin olabileceği düşünülebilir (30).

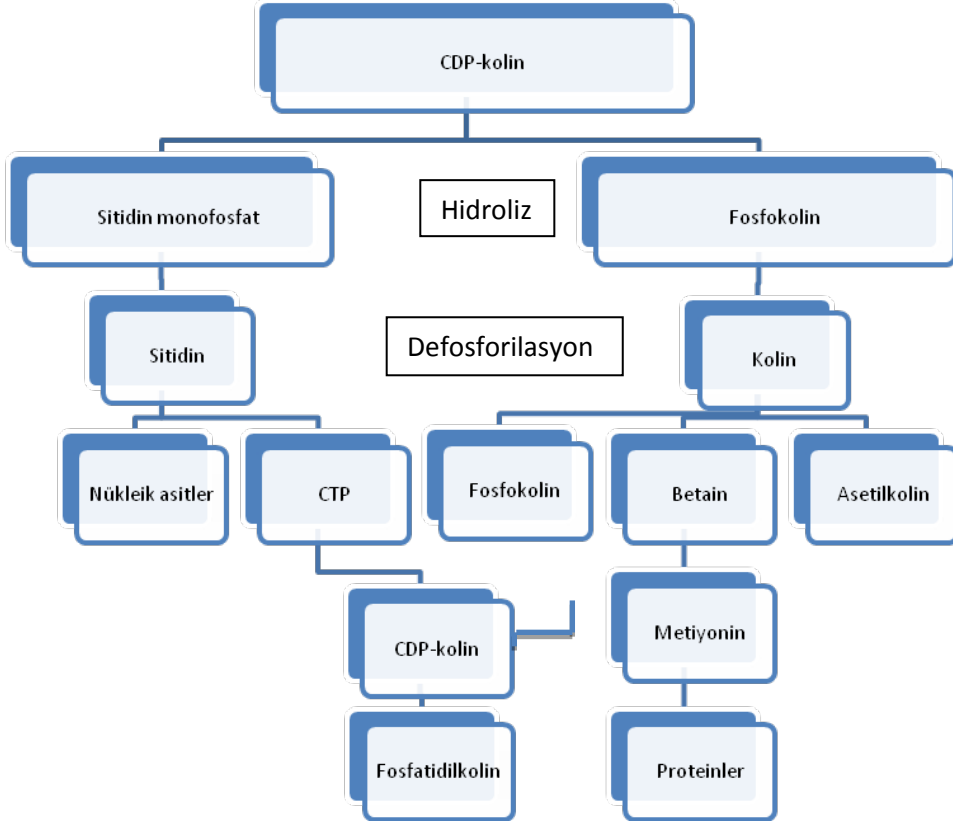
MMP-9 ve MMP-2'nin nöropatik ağrı oluşumunda dejeneratif ve proinflamatuvar yollarla etkili olabileceği düşünülmektedir. Periferik sinirin mekanik olarak hasarlanması sonrasında Schwann hücreleri MMP-9 salgılayarak myelin bazik proteininin (MBP) yıkımını ve makrofaj infiltrasyonunu başlatır (45, 46). Demyelinize olan aksonal membranda Na⁺ kanalları sayıca

artar ve hipereksitabilite gelişir. Oluşan santral sensitizasyon nöropatik ağrıya neden olur (47).

Tam formülü 5'-O[hidroksi((hidroksi[2-(trimetilamonyo)etoksi]fosforil)oksi)fosforil]sitidin olan CDP-kolin, başta fosfatidilkolin olmak üzere hücre membranının yapısal fosfolipitlerinin biosentezi için gerekli bir moleküldür. CDP-kolin, mitokondrial ATPaz ile membranal Na⁺/K⁺ ATPaz aktivitesini artırarak serebral metabolizmayı hızlandırır; ayrıca, nöroadrenalin ve dopamin gibi bazı nörotransmitterlerin merkezi sinir sistemindeki düzeylerini arttırdığı gösterilmiştir (48).



Şekil-1: CDP-kolinin hücre içindeki etkileri.



Şekil-2: CDP-kolinin metabolizması.

CDP-kolin oral yoldan alındıktan sonra ince bağırsakta sitidin ve kolin alt birimlerine hidrolize olur (49). Bağırsaktan emilimi takiben, fosfatidilkolin sentezindeki hız sınırlayıcı enzim olan CTP-fosfokolin sitidiltransferaz tarafından tekrar CDP-kolin formuna dönüştürülür (50, 51).

Nöronal doku, asetilkolin üretmek için kolin kullanmayı tercih eder. Bu nedenle fosfatidilkolin sentezi için gereken kolin miktarı sınırlanmış olur. Kolin miktarının düştüğü veya asetilkolin miktarının arttığı durumlarda, nöronal membranlarda bulunan ve kolin içeren sfingomyelin ve fosfatidilkolin gibi yapısal fosfolipidler katabolize edilmeye başlar (52). Dışarıdan CDP-kolin sağlanması, nöronal dokudaki kolin miktarını arttırarak, dolaylı yoldan nöronal membran sentezinin artışını ve yıkımının azaltılmasını sağlar (53). Ayrıca fosfolipazların aktivitesini azaltarak kardiolipin yıkımını ve hidroksil radikallerin üretimini azaltır, dolayısıyla oksidatif stres düşürür (53-55).

CDP-kolinin nöroprotektif etkileri; nöronal dokudaki kardiolipin ve sfingomyelin yıkımını engellemesi, fosfatidilkolin seviyelerini yükseltmesi,

glutasyon sentezini ve glutasyon redüktaz aktivitesini uyarması ve fosfolipaz A2 aktivitesini azaltması ile bağdaştırılabilir (52).

Alzheimer hastalarında hipokampüsteki nöronal dejenerasyonu tersine çevirdiği, apoptotik hücre sayısını azalttığı gösterilmiştir (32).

Bir çalışmada, iskemik stroke gelişen hastaların CDP-kolin tedavisi uygulanmaya başlandıktan sonra lezyonlarının küçüldüğü bildirilmiştir (56). İskemik stroke sonrası mortalite ve morbiditeyi azalttığı da idda edilmiştir (57). Bununla birlikte, Avrupa'da yürütülen orta ve yüksek şiddetli akut iskemik stroke ile takip edilen 2298 hastayı içeren randomize ve plasebo kontrollü çalışmada CDP-kolinin stroke mortalite ve morbiditesi üzerine herhangi bir olumlu etkisinin olmadığı saptanmıştır (58). CDP-kolin, Japonya'da ve Avrupa'da kafa travması, stroke ve nörodejeneratif hastalıkların tedavisi için onay almıştır. CDP-kolinin glokom, ambliopi ve nonarteritik iskemik optik nöropati vakalarında görme fonksiyonunu arttırdığı bildirilmiştir (48, 59). Kokain bağımlılığında azalan beyin dopamin seviyelerini arttırarak yeme isteğini azalttığı gösterilmiştir (60).

Yapılan bir çalışmada sistemik CDP-kolin uygulamasının; skar dokusu oluşumunu engelleyerek, fonksiyonel geri kazanımı arttırarak ve aksonal rejenerasyonu potansiyelize ederek periferik sinir kesisini takiben primer onarımda pozitif etki gösterdiği bildirilmiştir (61).

Diğer bir çalışmada doz bağımlı olarak CDP-kolin (300 µmol/kg, 600 µmol/kg ve 900 µmol/kg) nöral yapışiklıkta azalma, daha iyi siyatik fonksiyon indeksi ve elektrofizyolojik sonuçlar sağlamıştır. Fonksiyonel myelinli aksonların total sayısında belirgin artış saptanmış ve sitikolinle tedavi edilen tüm gruplarda perinöral skar dokusu azalmıştır. Araştırmacılar; sitikolinin, sıçan periferik sinir kesilme ve primer anostomoz modelinde, aksonal rejenerasyonda ve skar dokusu oluşmadan iyileşmede doza bağımlı olarak olumlu etki gösterdiğini belirtmişlerdir (62).

Bu çalışmada CDP-kolinin sıçan siyatik sinir transeksiyon-sütürasyon modelinde iyileştirici etkinliğinin muhtemel etki mekanizması olarak hücre dışı matrikse olan etkileri incelendi.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

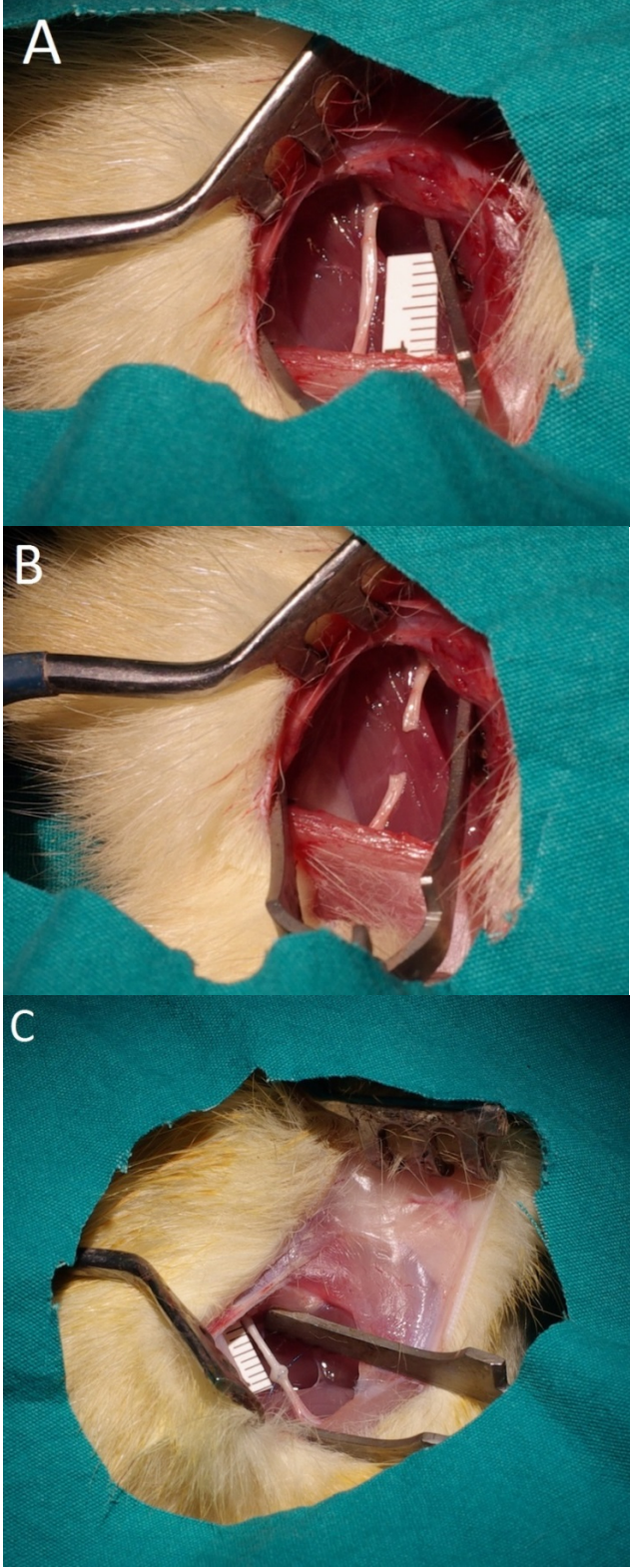
Bu çalışma, Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Yetiştirme ve Araştırma Merkezi'nde Ağustos 2012-2013 tarihleri arasında gerçekleştirildi.

UÜTF Deney Hayvanları Bakım ve Kullanım Komitesi'nin onayını takiben (Etik kurul onay tarihi: 23/08/2011; numarası: 2011-09/02), çalışmada kullanılacak hayvanlar UÜTF Deney Hayvanları Yetiştirme ve Araştırma Merkezi'nden temin edildi.

I. Cerrahi İşlem

Çalışmamızda ağırlıkları 250-300 gr arasında değişen 108 adet Wistar Albino cinsi erkek sıçan kullanıldı. Sıçanlar randomize olarak altta belirtilen 9 gruba ayrıldı. Sevofluran (Sevorane ® likit, Abbott Laboratories, Illinois, ABD) anestezisi altında prone pozisyonuna getirilen sıçanların ekstremiteleri operasyon masasına tespit edildi. %10'luk Povidon-iyot solüsyonu (Glividon ®, Bikar İlaç San., İstanbul) ile saha temizliği sağlandıktan sonra sağ gluteal bölgeden uyluk posterioruna uzanan 3 cm uzunluğunda posterior longitudinal cilt insizyonu yapıldı. M. gluteus süperfisialis ve m. biceps femoris kaslarının bileşke hattı ve üzerini çevreleyen fasya künt diseksiyon ile açılarak siyatik sinir ortaya konuldu. Bundan sonraki diseksiyon, kesi ve anastomoz işlemleri mikroskop altında yapıldı (Zeiss Opmi-6, Carl Zeiss Meditec Inc., ABD).

Anestezi altında sağ siyatik sinir steril şartlar altında diseke edildi. Sham grubu hariç, siyatik foramenden 10 mm uzakta root hooku ile kaldırılarak mikromakas ile düzgün kat sinir kesisi oluşturuldu. Epinöral sinir anastomoz tekniği kullanılarak proksimal ve distal sinir güdükleri 8-0 polipropylene suture (Prolene, Ethicon R Ltd, Somerville NJ, ABD) ile aralarında 180 derece bulunan iki ayrı noktadan suture edilmek suretiyle primer anastomoz yapıldı. Cilt anatomisine uygun olarak kapatıldı.



Şekil-3: Cerrahi işlemin aşamaları. Siyatik sinir disseke edildikten sonra (A), siyatik foramene 1 cm uzaklıktan mikromakas ile sinire tam kat düzgün kesi yapıldı (B) ve 180 derece aralıklarla 2 adet 8-0 polipropilen suture materyali ile suture edildi (C).

II. Gruplar

II.A. Sham Grubu

Anestezi altında sağ siyatik sinir steril şartlar altında diseke edildi. Cilt anatomisine uygun olarak kapatıldı (n=36).

II.B. Salin Grubu

Düzgün kat sinir kesisi ve primer anostomoz sonrası cilt kapatmasını takiben sıçanlara 1 ml/kg salin (%0,9 NaCl) intraperitoneal yolla bir kez enjekte edildi (n=36).

II.C. CDP-Kolin Grubu

Düzgün kat sinir kesisi ve primer anostomoz sonrası cilt kapatmasını takiben sıçanlara CDP-kolin (600 μ mol/kg; 1 ml/kg salin içinde) intraperitoneal yolla tek doz olarak enjekte edildi (n=36).

Cerrahi ve enjeksiyonları takiben tüm sıçanların spontan olarak uyanması beklendi. Serbest hareket edebilmeleri için kafeslerine bırakıldı. Sıçanlar cerrahi girişim öncesi ve sonrasında gruplara uygun olarak her bir kafese 3 adet sıçan düşecek şekilde numaralandırıldı. Tüm sıçanlar serbest yemleme yöntemiyle standart pellet sıçan yemi ve su ile beslendi. Çalışma süresi boyunca 12'şer saatlik aydınlık-karanlık döngüsü sağlandı. Mobilize olmalarına izin verildi.

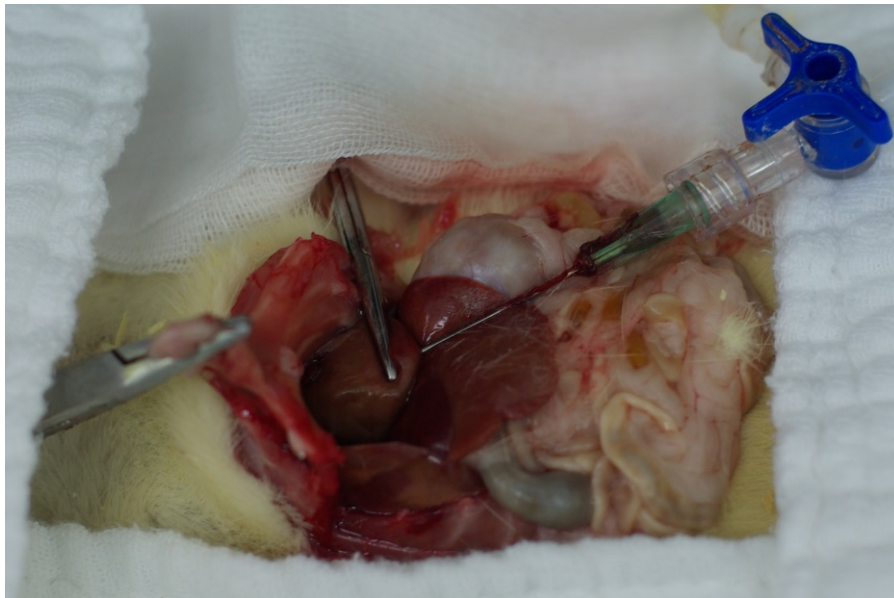
III. Sinir Örnekleme

Sham, Salin ve CDP-kolin gruplarının her birinde cerrahiye takip eden 1., 3., ve 7. günlerde siyatik sinir örnekleri elde edildi (her örnekleme gününde grup başına n=12). Sonraki analizler göz önüne alınarak iki farklı yöntemle örnek elde etme gerçekleştirildi. Her gruptaki sıçanların yarısında (n=6) sevofluran anestezisi altında eski cilt insizyonunun açılmasını takiben siyatik sinir tamir edilen kısmı içerecek şekilde enblok olarak çıkarıldı. -20 santigrat derecede saklamak üzere soğutucuya yerleştirildi.

IV. Perfüzyon

Gruplardaki sıçanların diğeri yarısında (n=6) ketamin (21 mg; Ketalar®, Eczacıbaşı, Türkiye) ve ksilazin (3 mg; XylazinBio %2, Bayer, Türkiye) anestezisi altında perfüzyon uygulandı. Bu amaçla supin pozisyonda sıçanların ekstremitelemi sabitlendikten sonra ksifoid altı cilt insizyonu yapıldı. İnsizyon yanlara ve yukarıya doğru genişletildi. Ksifoid çevre kas yapılarından ayrıldıktan sonra bilateral kotlar da kesilerek göğüs kafesi kaldırıldı. Diafragma açıldı, kalp çevre dokulardan diseke edildi. Kalbin apeksi dişsiz penset ile tutulduktan sonra paraformaldehit (%2 M fosfat tampon içerisinde % 4'lük paraformaldehit; Ph:7,4) ve heparinli % 0,9'luk serum fizyolojik (salin) solüsyonuna bağılı bulunan enjektör ucu (18 G) apekse yerleştirildi ve klemp ile sabitlendi. Takiben sağ atrium tek darbe ile kesildi ve hemen heparinli salin infüzyonuna başlandı. Sıçanın dolaşım sistemindeki kan tamamen boşalana kadar salin infüzyonuna devam edildi (50-100 ml). Sonra paraformaldehit infüzyonuna başlandı ve sıçan katılaşına kadar (300-450 ml) bu işleme devam edildi.

Paraformaldehit perfüzyonu ile dokuların fiksasyonunu takiben eski cilt insizyonu açıldı. Siyatik sinir tamir edilen kısmı içerecek şekilde enblok olarak çıkarıldı. Siyatik sinirin proksimal kısmı ipek sütür ile bağılandı. Çıkarılan siyatik sinir paraformaldehit ile dolu cam şişelere koyuldu. Ağızı parafilm (Parafilm®, Sigma-Aldrich Co., LLC, St Louis, MO, ABD) ile sarıldı.



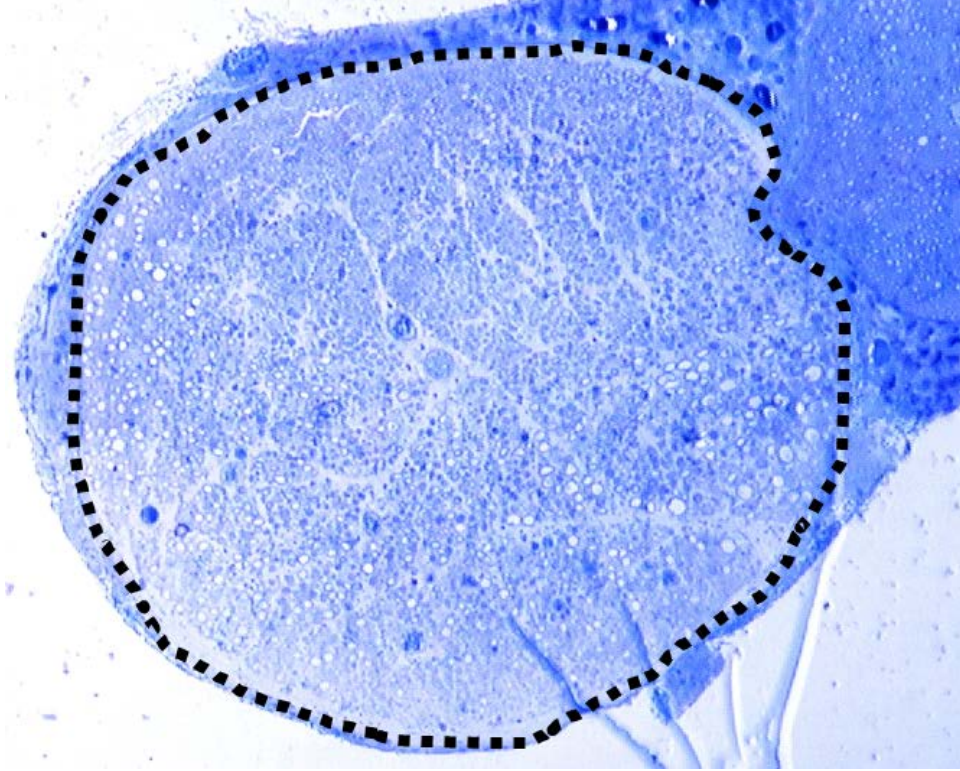
Şekil-4: Perfüzyon işlemi.

V. Değerlendirme

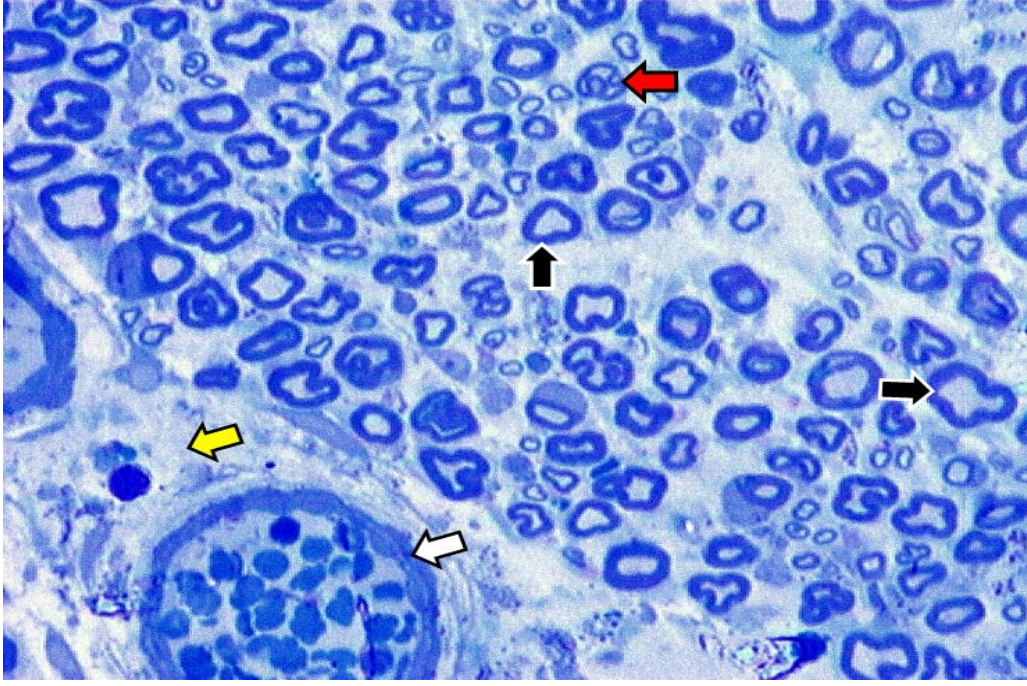
V.A. Histomorfolojik Değerlendirme

Çalışmada üç ayrı deneysel prosedür (Sham, Salin ve CDP-Kolin) ve üç ayrı zaman dilimine (1., 3. ve 7. günler) ait gruplar arasında yapılan transseksiyonun etkilerini incelemek ve CDP-kolinin koruyucu etkisini göstermek amacı ile resin bloklama ve yarı ince kesitler kullanılarak morfolojik değerlendirme yapıldı (her grup için n=6, toplam 9 grup). Bu amaçla yaklaşık 1 - 1,5 cm'lik siyatik sinir örnekleri, anastamoz ve distal segmenti içerecek ve 0,5 cm boyutlarına gelecek şekilde diseke edildi. Elde edilen örnekler kodlanarak, gece boyu pH 7,4, 0,1 mol/L fosfat tamponlu %4'lük glutaralaldehit içerisinde oda ısısında ve rotator kullanılarak fikse edildiler. Takip eden gün, artan oranlarda etanol serileri ile dehidratasyon işlemine tabi tutulan örnekler 0,1 mol/L fosfat tamponlu %1 osmium tetraoksit (OsO₄) içerisinde postfikse edildi. Örnekler, propilen oksit ve resin propilen oksit karışımı ile işleme tutulduktan sonra tekrar kodlanarak resin (Spur's resin, Agar Scientific, Stansted, UK) içerisine gömüldüler. Resin polimerizasyon işlemi gece boyu 70°C'de gerçekleştirildi. Elde edilen resin bloklardan ultramikrotom kullanılarak 0,5 µm'lik yarı ince kesitler alındı. Lam üzerine geçirilen kesitler distile su içerisinde %1 toluidin mavisi, %1 borax karışımı ile boyanarak transvers sinir kesitlerinin doku elemanları ve myelin kılıflar görünür hale getirildi. Preparatlar dijital kamera takılı bir ışık mikroskobu altında fotoğraflandı. Dijital örnekleme yapıldığında her deney hayvanı için 4 farklı sinir kesiti kullanıldı. Her sinir kesitinde 10x büyütmede tüm sinir alanı, 40x büyütmede ise myelinli aksonların görüntüsü alındı. 40x büyütmede görüntülerin alınmasında randomize olarak 10 farklı alanın görüntüsü fotoğraflandı. Elde edilen dijital görüntüler BMP formatına çevrildi. Analiz programı olarak Scion Image yazılımı (NIH, ver 4.0.2) kullanıldı ve Scion image programı her analiz öncesi 10x ve 40x büyütmelemler kullanılarak alınmış milimetrik lam görüntüleri ile kalibre edildi. 10x büyütmedeki görüntülerde tüm sinir alanı mikrometre kare düzeyinde hesaplanırken (Şekil-5), 40x büyütmelemler görüntülerde 13674 µm²'lik alana sahip bir çerçeve içerisindeki myelinli aksonların sayısı hesaplandı (Şekil-6). Aksonlar sayılırken çerçeve içerisindeki tüm aksonlar, sağ ve üst kenara temas eden aksonlar sayıma dâhil edildi ancak sol ve alt kenara temas eden aksonlar sayım dışı bırakıldı. Alan

hesabında Scion Image programının alan hesaplama aracı kullanılırken, akson sayımında hücre sayımı için hazırlanmış özel bir makro kullanıldı. Elde edilen veriler Excel programına geçirilerek saklandılar. Verilerden, önce gruplar ve deney hayvanları arasında daha az hassas bilgiler veren total fasikül alanları hesaplandı. Takiben myelinli akson sayıları ve sayım çerçevesi alanı verilerinden milimetre karedeki akson sayısı yani aksonal dansite hesaplandı. Son olarak bu verilerden total myelinli akson sayısı hesaplanarak tüm morfolojik veriler tablo ve grafik haline getirildi.



Şekil-5: Tüm siyatik sinir kesit alanı (10X büyütme). Tüm sinir alanının (total fasikül alanı) Scion Image programı kullanılarak hesaplanması.



Şekil-6: Myelinli aksonların sayımı amacıyla kullanılan çerçeve örneği (40X). Siyah oklar: örnek myelinli akson transvers kesitleri, kırmızı ok: yeni oluşan aksonlar etrafındaki ince myelin formasyonu; beyaz ok: kan damarı ve damar içi hücreler; sarı ok: bağ dokusu ve bağ dokusu elemanları.

V.B. Western Blot Analizleri

Total protein içerikleri Lowry yöntemine göre tayin edilen siyatik sinir homojenatları (her gruptan n=6) eşit hacimde Laemmi solüsyonu ile muamele edilerek 5 dakika kaynatıldı. Örnekler eşit miktarda protein içerecek şekilde Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrezinde (SDS-PAGE; Mini Protean II, Bio-Rad, Hercules, CA, ABD) elektroforetik olarak yürütülüp protein bantları poliviniliden florür (PVDF) membranlara (Millipore, Temecula, CA, ABD) aktarıldı. Bu membranlar birinci antikorlar olan anti-MMP-2 (1:1000; Millipore, Temecula, CA, ABD), anti-MMP-9 (1:1000; Millipore, Temecula, CA, ABD), anti-TIMP-1 (1:1000; Millipore, Temecula, CA, ABD) ve anti-TIMP-3 (1:1000; Millipore, Temecula, CA, ABD) ile gece boyunca inkübe edildi. Ertesi gün uygun ikinci antikorlarla (1:5000; GE Healthcare UK, Buckinghamshire, İngiltere) 1 saat inkübe edilen membranlar kemiluminesans deteksiyon kitiyle (GE Healthcare UK, Buckinghamshire, İngiltere) muamele edilip oluşan kemiluminesans film baskı makinesinde (Hyperprocessor RPN1700; Amersham

Life Science, Buckinghamshire, İngiltere) fotoğraf filmine (Kodak Medical X-ray film; Carestream Health, Fransa) bastırıldı.

Film üzerinde tespit edilen protein bantlarının dijital görüntüleri transparan adaptörlü tarayıcı (UMAX Powerlook 1000, Atlanta, GA, ABD) kullanılarak elde edildi. Bantların dansitesi Image J programı kullanılarak analiz edildi. Her membran üzerindeki birinci ve ikinci antikolar özel bir solüsyon (Restore Western Blot Stripping Buffer; Thermo Scientific, Rockford, IL, ABD) kullanılarak uzaklaştırıldı ve yeniden anti-Aktin (1:1000; Sigma, St. Louis, MO, ABD) birinci antikor ve uygun ikinci antikorla muamele edilerek Aktin protein düzeyleri tespit edildi. Sonuçlar MMP-2, MMP-9, TIMP-1 ve TIMP-3 proteinlerinin optik dansitelerinin Aktin proteininkine orantılanması suretiyle ifade edildi.

V.C. Jelatin Zimografi

Siyatik sinir homojenatları (her gruptan n=6) 150 mg jelatin içeren Laemmi solüsyonu ile eşit hacimde kaynatmaksızın karıştırıldı. Örnekler eşit miktarda protein içerecek şekilde Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrezinde (SDS-PAGE; Mini Protean II, Bio-Rad, Hercules, CA, ABD) elektroforetik olarak yürütüldü. Jeller elektrofrezden çıkarılarak %2,5 Triton X-100 ile 37°C'de 30 dakika yıkandı ve ardından 5 mM CaCl₂ ve 1 M ZnCl₂ içeren 50 mM Tris çözeltisi (pH 7,5) içinde 37°C'de 18 saat inkübe edildi. İnkübasyonu takiben jeller %0,5'lik Coomassie Brilliant Blue G-250 içeren %20 asetik asit ve %20 metanol solüsyonunda 2 saat inkübe edilerek boyandı. Boyanın fazlalığı ise jellerin Coomassie Brilliant Blue G-250 içermeyen aynı solüsyonda 30 dakika inkübe edilmesi suretiyle uzaklaştırıldı. MMP-2 ve MMP-9 aktiviteleri jel üzerindeki jelatinolitik (jelatin proteininin sindirildiğine işaret eden) bantların transparan adaptörlü tarayıcı (UMAX Powerlook 1000, Atlanta, GA, ABD) yardımıyla dijital görüntülere dönüştürülmesini takiben bu bantlara ait dansitometrik değerlerinin Image J programı ile analiz edilmesi ile belirlendi. Sonuçlar Sham grubundaki bantların dansitometrik değerlerinin yüzdesi olarak ifade edildi.

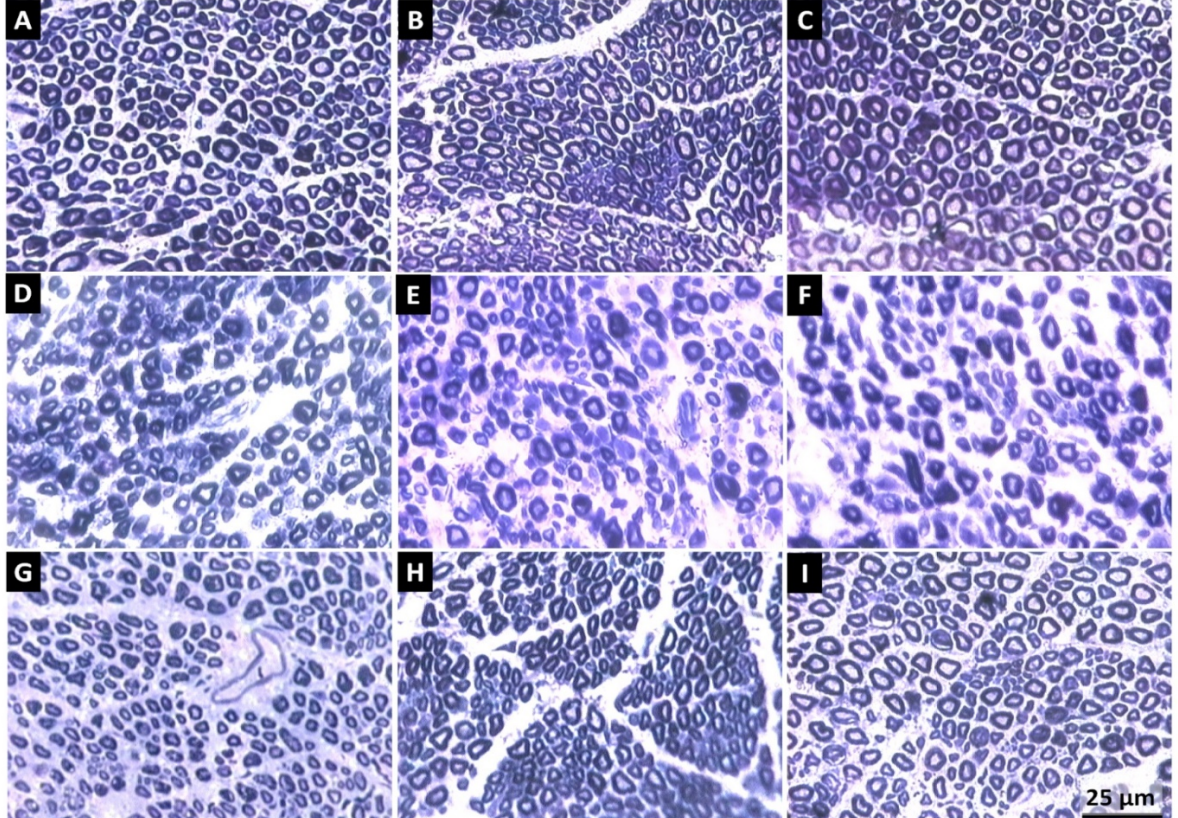
V. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler Sigma Plot 12.0 programı kullanılarak yapıldı. Veriler ortalama \pm standart hata (SEM) olarak sunuldu. Gruplar arası karşılaştırmalar için Tek Yönlü Varyans Analizi'ni (ANOVA) takiben post-hoc Tukey testi kullanıldı. Tüm karşılaştırmalarda $p < 0,05$ anlamlı olarak kabul edildi.

BULGULAR

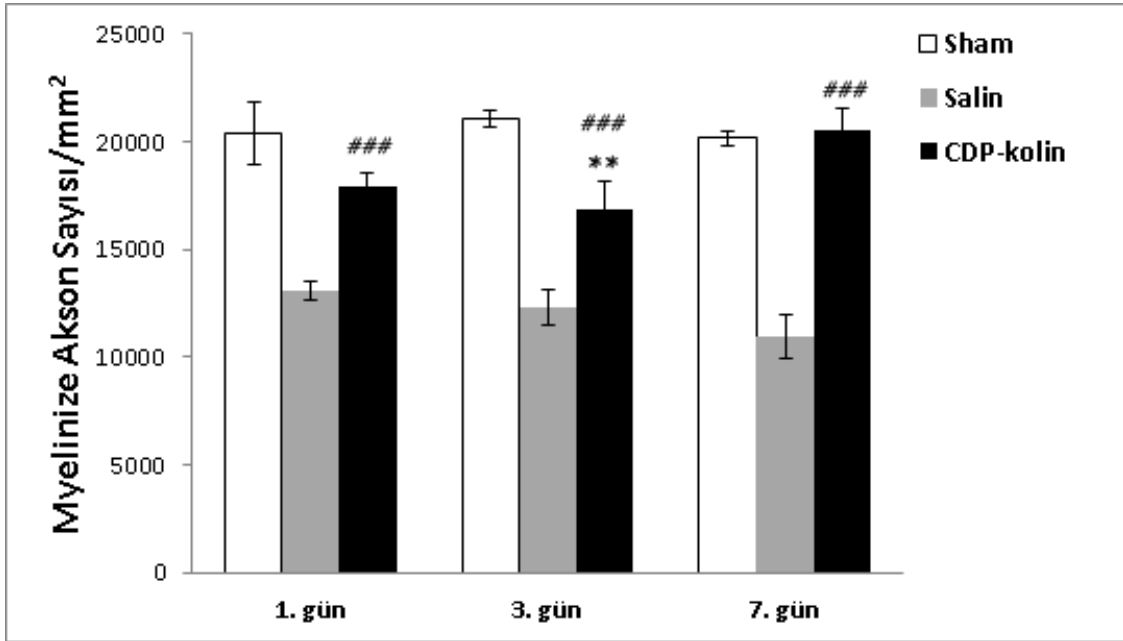
I. Histomorfolojik Değerlendirme

Histomorfolojik olarak CDP-Kolin grubunda yüksek aksonal dansite yüksek akson sayıları ile birlikte iyileşme ve koruyucu etki gözlemlendi. Söz konusu grup verileri normal sham grubu verilerine yakın, harabiyetin artmasının beklendiği salin grubundan ise yüksekti. CDP-kolin grubunda yeni akson oluşumları, adacık formasyonları (kompartmanlar) şeklinde akson toplulukları ve bu aksonlar üzerinde myelin oluşumunun başladığı ve ilerlediği gözlemlendi. CDP-Kolin ve sham gruplarında büyük ve küçük enine kesitli aksonların düzenli dağıldıkları, perinöriumun daha iyi gözlemlendiği ve düzenli olduğu tespit edildi.



Şekil-7: (A-C) Sham grubu, (D-F) Salin grubu ve (G-I) CDP-Kolin grubu örneklerinde Toluidin mavisi ile boyanmış yarı ince kesitler (0,5 µm). Bar skala 25 µm.

Çalışmamızda elde ettiğimiz akson sayıları ve sayım yapılan çerçeve alanından hesapladığımız “myelinize akson sayısı” mikronkareden milimetrekareye çevrilerek myelinize akson dansitesi elde edildi (Şekil-8 ve Tablo-1). Myelinize akson dansitesi (Myelinize Akson Sayısı / mm²) verilerine bakıldığında. Salin grubunda 1. gün 13090,54 ± 436,75; 3. gün 12261,71 ± 15,42 ve 7. gün 10925,84 ± 1017,18 olarak gözüken ve giderek kötüleşerek azaldığı tespit edilen akson dansitesinin; sham operasyonu yapılan deney hayvanlarında 1. gün 20367,12 ± 479,69; 3. gün 21061,87 ± 58,26 ve 7. gün 20147,73 ± 328,41 olduğu ve normal değerlerinde tespit edildiği, deneyin 7. güne kadar olan ilerleyişinde anlamlı bir azalma veya yükselme göstermediği tespit edildi. CDP-Kolin grubunda ise her üç zaman diliminde alınan örnekler salin grubundaki ilgili zaman dilimindeki örnekler ile karşılaştırıldığında anlamlı derecede iyileşme ve artmış myelinli akson dansitesi gösterdiği görüldü (1., 3. ve 7. gün örneklerinin tümü için p<0,001). Yine CDP-Kolin grubu verilerinin 1. ve 3. gün zaman dilimlerinde Sham grubuna yakın değerler verdiği; 7. gün verilerinin ise sham grubundan daha fazla artmış oranda olduğu görüldü (p>0,05).

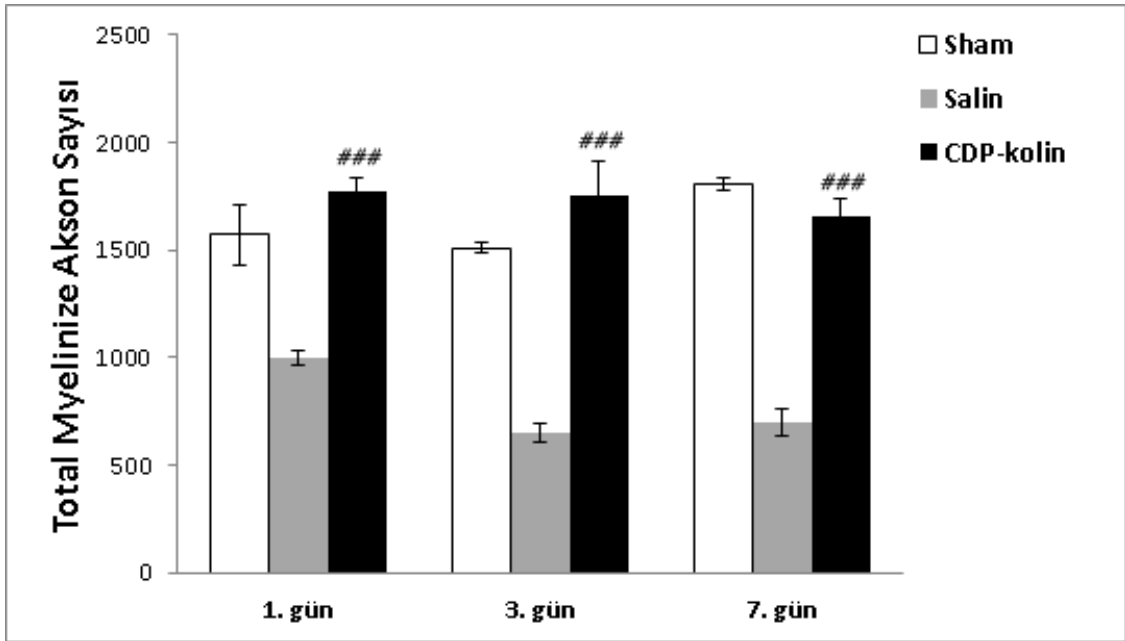


Şekil-8: Milimetrekarede myelinize akson sayısı (dansite). Sham grubu ile kıyaslandığında **p<0.01; Salin grubu ile kıyaslandığında ###p<0.001.

Tablo-1: Myelinize Akson Sayısı / mm².

Myelinize Akson Sayısı / mm ² (Ortalama ± SEM)			
	1. gün	3. gün	7. gün
Sham	20367,12 ± 479,69	21061,87 ± 58,26	20147,73 ± 328,41
Salin	13090,54 ± 436,75	12261,71 ± 15,42	10925,84 ± 1017,18
CDP-kolin	17875,43 ± 634,71	16882,93 ± 228,66	20568,23 ± 995,75

Myelinize akson dansitesi ve tüm fasikül alanı verilerinden elde edilen total myelinize akson sayısı verilerine bakıldığında, CDP-Kolin grubunun salin grubundan anlamlı derecede ($p < 0,001$) yüksek ve sham grubuna yakın ($p > 0,05$) değerler gösterdiği tespit edildi (Şekil-9 ve Tablo-2).

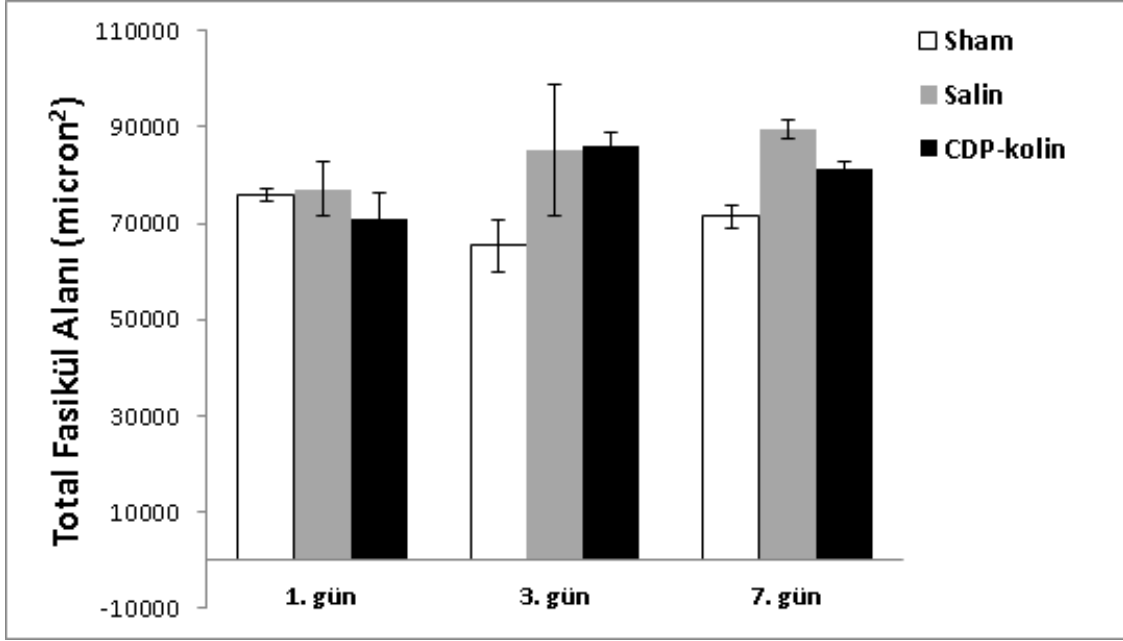


Şekil-9: Total myelinize akson sayısı. Salin grubu ile kıyaslandığında ### $p < 0,001$.

Tablo-2: Total myelinize akson sayısı.

Total Myelinize Akson Sayısı (Ortalama ± SEM)			
	1. gün	3. gün	7. gün
Sham	1571,65 ± 139,84	1510,35 ± 25,69	1805,07 ± 29,42
Salin	994,18 ± 33,17	648,58 ± 43,13	695,55 ± 64,75
CDP-kolin	1772,92 ± 62,95	1750,77 ± 160,87	1654,26 ± 80,08

Myelinli akson dansitesi verilerinden daha az hassas bilgiler edinebileceğimiz total fasikül alanı sonuçları açısından her deney hayvanı grubunda farklı olmakla birlikte yakın sonuçlar ortaya çıktığı gözlemlendi. Bu sonuçlar da fiksasyon, gömme, ağırlık ve yaş gibi sinir kalınlığını etkileyebilecek faktörlerin minimumda tutulduğuna işaret etmekteydi (Şekil-10).



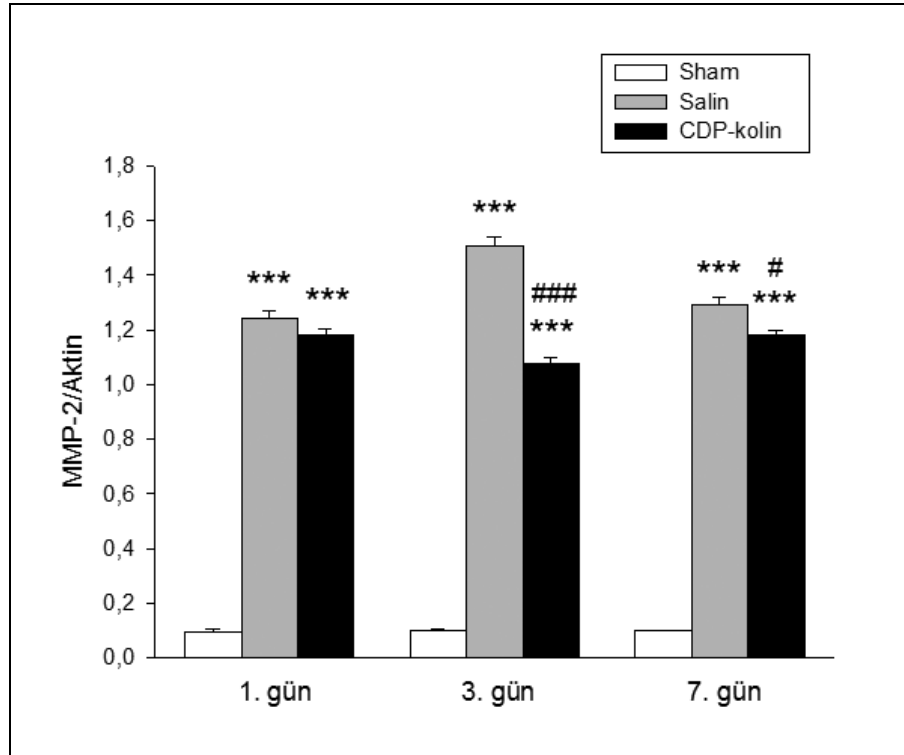
Şekil-10: Total fasikül alanları.

II. Western Blot Analizleri

II.A. MMP-2 Protein Düzeyleri

Siyatik sinirden elde edilen örneklerde MMP-2 miktarı Sham grubunda çok düşük düzeylerde tespit edildi. MMP-2 protein düzeyleri siyatik sinir hasarını takip eden Salin ve CDP-kolin gruplarında anlamlı olarak artarken, hasarı takip eden 3. ve 7. günlerde CDP-kolin tedavisi alan sıçanların siyatik sinir örneklerinde Salin tedavisi alanlara göre anlamlı olarak azalmış bulundu (Şekil-11). Siyatik sinir hasarını takip eden 1. günde MMP-2/Aktin oranı Sham grubunda $0,095 \pm 0,008$ iken Salin ve CDP-kolin gruplarında bu oran sırası ile $1,24 \pm 0,027$ ($p < 0,001$) ve $1,18 \pm 0,022$ ($p < 0,001$) olarak bulundu. Hasarın 3. gününde MMP-2/Aktin oranı Sham grubunda $0,099 \pm 0,004$ iken, Salin ve CDP-kolin gruplarında sırası ile $1,50 \pm 0,032$ ($p < 0,001$) ve $1,07 \pm 0,020$ ($p < 0,001$) idi.

CDP-kolin tedavisi alan sıçanların siyatik sinir örneklerindeki MMP-2 miktarı Salin alanlarına kıyasla anlamlı ($p<0.001$) olarak azalmış bulundu. Hasarın 7. gününde ise MMP-2/Aktin oranı Sham grubunda $0.097 \pm 0,002$ iken, Salin ve CDP-kolin gruplarında sırası ile $1.29 \pm 0,026$ ($p<0,001$) ve $1.18 \pm 0,018$ ($p<0,001$) olarak hesaplandı. CDP-kolin tedavisi alan sıçanların siyatik sinir örneklerindeki MMP-2 miktarı hasarın 7. gününde Salin alanlarına kıyasla hala anlamlı ($p<0,05$) olarak azalmış idi.

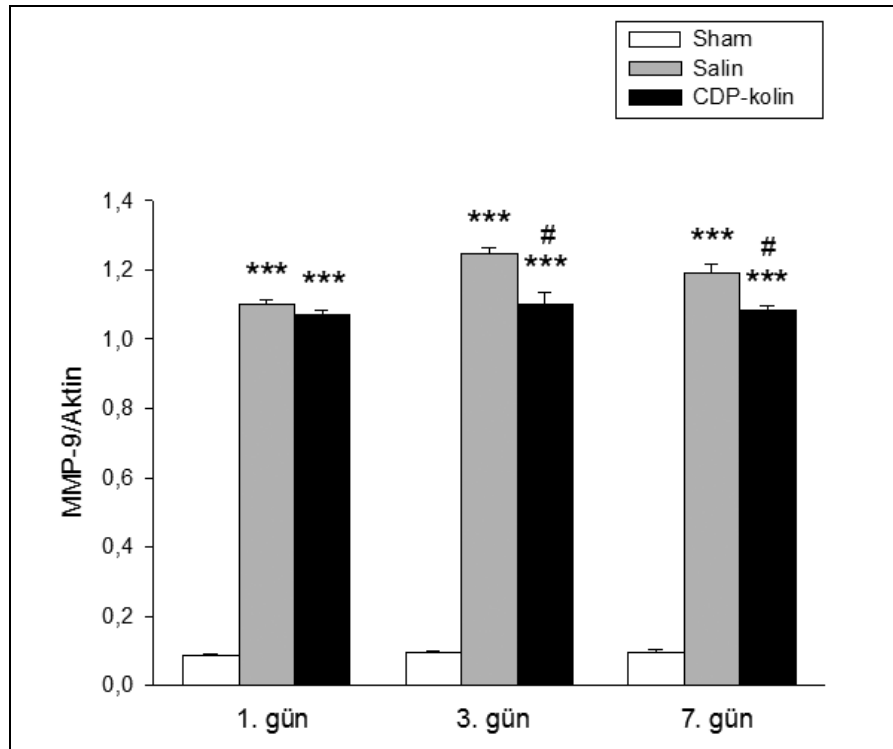


Şekil-11: Siyatik sinir hasarını takiben 1., 3., ve 7. günlerde elde edilen örneklerde MMP-2 protein düzeylerinin analizi. Sonuçlar MMP-2 proteininin dansitometrik analizlerinin Aktin proteinine orantılanması suretiyle ifade edildi. Sham grubu ile kıyaslandığında $***p<0,001$; Salin grubu ile kıyaslandığında $\#p<0,05$ ve $###p<0,001$.

II.B. MMP-9 Protein Düzeyleri

Sham grubuna ait siyatik sinir örneklerinde de MMP-9 miktarı çok düşük bulundu. MMP-9 protein düzeyleri siyatik sinir hasarını takiben Salin ve CDP-kolin gruplarında anlamlı olarak artarken, hasarı takip eden 3. ve 7. günlerde CDP-kolin tedavisi alan sıçanların siyatik sinir örneklerinde Salin tedavisi alanlara göre anlamlı olarak azalmış bulundu (Şekil-12). Siyatik sinir hasarını

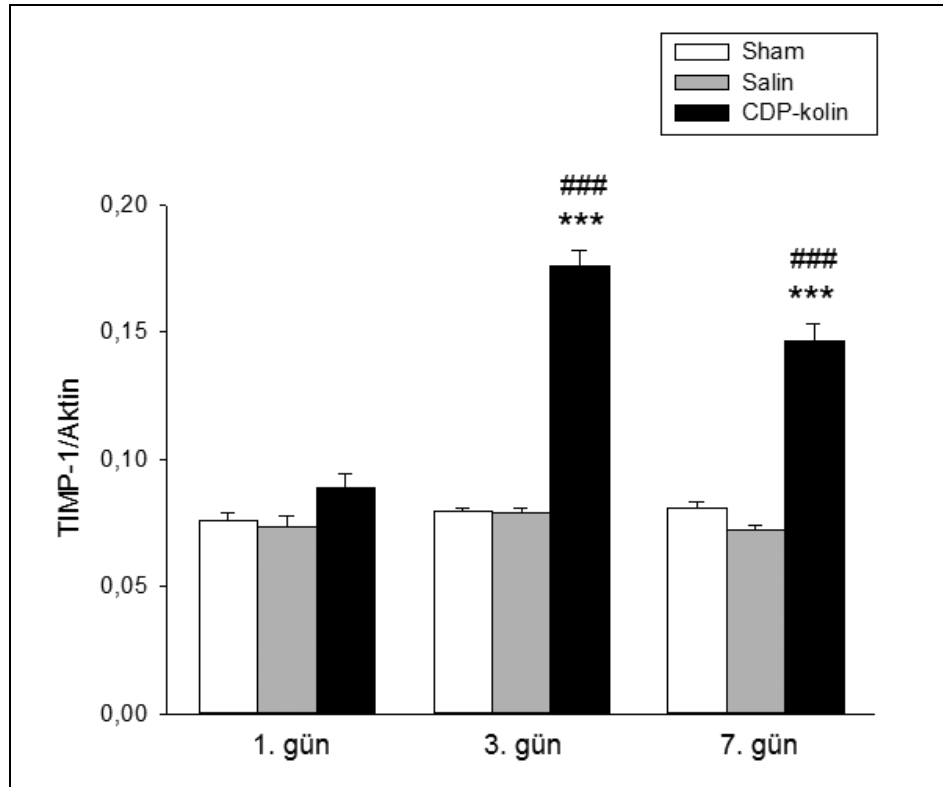
takip eden 1. günde MMP-9/Aktin oranı Sham grubunda $0,085 \pm 0,004$ iken Salin ve CDP-kolin gruplarında bu oran sırası ile $1,10 \pm 0,010$ ($p < 0,001$) ve $1,06 \pm 0,014$ ($p < 0,001$) olarak bulundu. Hasarın 3. gününde MMP-9/Aktin oranı Sham grubunda $0,096 \pm 0,002$ iken, Salin ve CDP-kolin gruplarında sırası ile $1,24 \pm 0,015$ ($p < 0,001$) ve $1,09 \pm 0,036$ ($p < 0,001$) idi. CDP-kolin tedavisi alan sıçanların siyatik sinir örneklerindeki MMP-9 miktarı Salin alanlarınkine kıyasla anlamlı ($p < 0,05$) olarak azalmış bulundu. Hasarın 7. gününde ise MMP-9/Aktin oranı Sham grubunda $0,096 \pm 0,006$ iken, Salin ve CDP-kolin gruplarında sırası ile $1,19 \pm 0,025$ ($p < 0,001$) ve $1,08 \pm 0,013$ ($p < 0,001$) olarak hesaplandı. CDP-kolin tedavisi alan sıçanların siyatik sinir örneklerindeki MMP-9 miktarı hasarın 7. gününde Salin alanlarınkine kıyasla hala anlamlı ($p < 0,05$) miktarda azalmış olarak bulundu.



Şekil-12: Siyatik sinir hasarını takiben 1., 3., ve 7. günlerde elde edilen örneklerde MMP-9 protein düzeylerinin analizi. Sonuçlar MMP-9 proteininin dansitometrik analizlerinin Aktin proteininkine orantılanması suretiyle ifade edildi. Sham grubu ile kıyaslandığında *** $p < 0,001$; Salin grubu ile kıyaslandığında # $p < 0,05$.

II.C. TIMP-1 Protein Düzeyleri

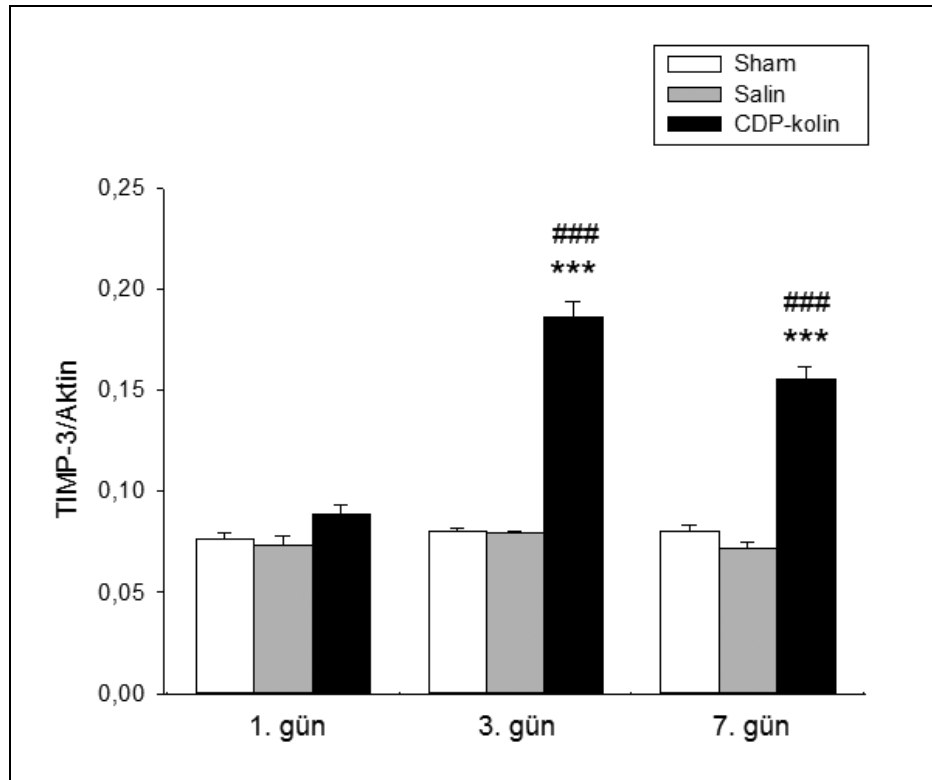
Tıpkı MMP proteinleri gibi, Sham grubuna ait örneklerde TIMP-1 proteininin siyatik sinirdeki düzeyleri de çok düşük bulundu. TIMP-1 proteininin düzeyleri siyatik sinir hasarını takiben Salin grubunda değişmezken, CDP-kolin grubunda özellikle hasarı takip eden 3. ve 7. günlerde anlamlı artışlar gösterdi (Şekil-13). Siyatik sinir hasarını takip eden 1. günde TIMP-1/Aktin oranı Sham, Salin ve CDP-kolin gruplarında sırası ile $0,076 \pm 0,003$, $0,073 \pm 0,003$ ve $0,088 \pm 0,005$ idi ve aralarında anlamlı fark bulunamadı. Hasarın 3. gününde TIMP-1/Aktin oranı Sham ve Salin gruplarında sırası ile $0,079 \pm 0,001$ ve $0,078 \pm 0,001$ iken, CDP-kolin grubunda ($0,175 \pm 0,006$) her iki gruba göre anlamlı ($p < 0,001$) olarak artmış idi. Hasarın 7. gününde CDP-kolin grubu örneklerinde TIMP-1/Aktin oranı ($0,146 \pm 0,006$), Sham ($0,080 \pm 0,002$) ve Salin ($0,072 \pm 0,001$) gruplarınıninkine göre hala anlamlı ($p < 0,001$) olarak artmış bulundu.



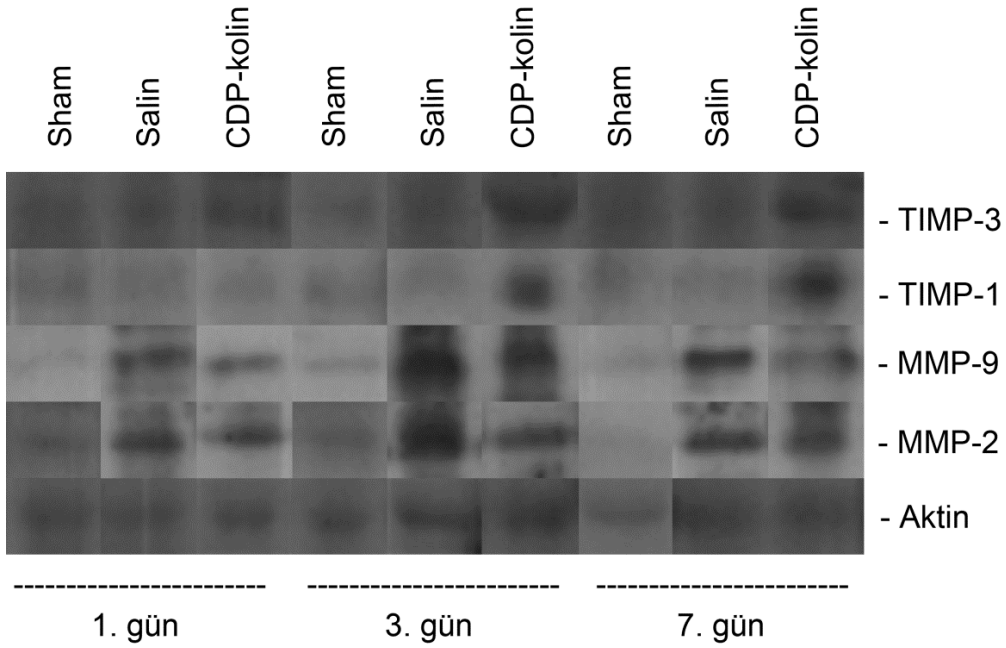
Şekil-13: Siyatik sinir hasarını takiben 1., 3., ve 7. günlerde elde edilen örneklerde TIMP-1 protein düzeylerinin analizi. Sonuçlar TIMP-1 proteininin dansitometrik analizlerinin Aktin proteininkine orantılanması suretiyle ifade edildi. Sham grubu ile kıyaslandığında $***p < 0,001$; Salin grubu ile kıyaslandığında $###p < 0,001$.

II.D. TIMP-3 Protein Düzeyleri

TIMP-3 proteininin siyatik sinirdeki düzeyleri de Sham grubuna ait örneklerde çok düşük bulundu. TIMP-3 protein düzeyleri siyatik sinir hasarını takiben Salin grubunda değişmezken, CDP-kolin grubunda yine hasarı takip eden 3. ve 7. günlerde anlamlı artışlar gösterdi (Şekil-8). Siyatik sinir hasarını takip eden 1. günde TIMP-3/Aktin oranı Sham, Salin ve CDP-kolin gruplarında sırası ile $0,076 \pm 0,002$, $0,073 \pm 0,004$ ve $0,089 \pm 0,004$ idi ve aralarında anlamlı fark yoktu. Hasarın 3. gününde TIMP-3/Aktin oranı Sham ve Salin gruplarında sırası ile $0,080 \pm 0,001$ ve $0,079 \pm 0,0008$ iken, CDP-kolin grubunda ($0,186 \pm 0,007$) her iki gruba göre anlamlı ($p < 0,001$) olarak artmış idi. Hasarın 7. gününde CDP-kolin grubu örneklerinde TIMP-3/Aktin oranı ($0,155 \pm 0,006$), Sham ($0,080 \pm 0,002$) ve Salin ($0,071 \pm 0,003$) gruplarınıninkine göre hala anlamlı ($p < 0,001$) olarak artmış bulundu.



Şekil-14: Siyatik sinir hasarını takiben 1., 3., ve 7. günlerde elde edilen örneklerde TIMP-3 protein düzeylerinin analizi. Sonuçlar TIMP-3 proteininin dansitometrik analizlerinin Aktin proteininkine orantılanması suretiyle ifade edildi. Sham grubu ile kıyaslandığında $***p < 0,001$; Salin grubu ile kıyaslandığında $###p < 0,001$.



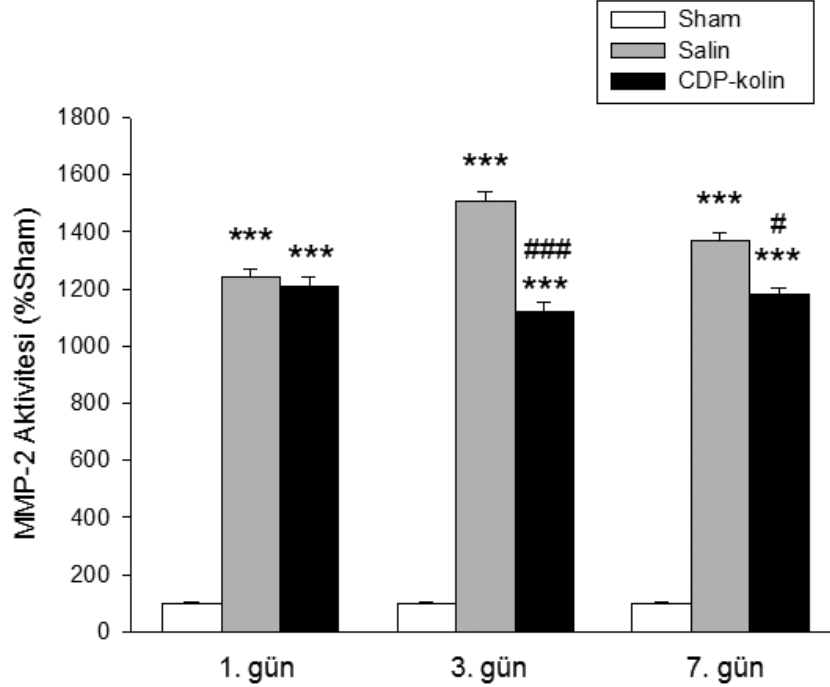
Şekil-15: Tüm deney gruplarından elde edilen siyatik sinir örneklerindeki Aktin, MMP-2, MMP-9, TIMP-1 ve TIMP-3 proteinlerine ait temsili Western Blot bantları.

III. Jelatin Zimografi Analizleri

III.A. MMP-2 Protein Aktivitesi

Siyatik sinirden elde edilen örneklerde MMP-2 aktivitesi Sham grubunda çok düşük düzeylerde tespit edildi. MMP-2 aktivitesi siyatik sinir hasarını takiben Salin ve CDP-kolin gruplarında anlamlı olarak artarken, hasarı takip eden 3. ve 7. günlerde CDP-kolin tedavisi alan sıçanların siyatik sinir örneklerinde Salin tedavisi alanlara göre anlamlı olarak azalmış bulundu (Şekil-16). Siyatik sinir hasarını takip eden 1. günde MMP-2 aktivitesi Sham grubuna göre Salin ve CDP-kolin gruplarında sırası ile 12.4 kat ($p<0,001$) ve 12.1 kat ($p<0,001$) artmış bulundu. Hasarın 3. gününde MMP-2 aktivitesi Sham grubuna göre Salin ve CDP-kolin gruplarında sırası ile 14.8 kat ($p<0,001$) ve 11.2 kat ($p<0,001$) artmış idi. CDP-kolin tedavisi alan sıçanların siyatik sinir örneklerindeki MMP-2 aktivitesi Salin alanlarınkine kıyasla anlamlı ($p<0,001$) olarak azalmış bulundu. Hasarın 7. gününde ise MMP-2 aktivitesi Sham grubuna göre Salin ve CDP-kolin gruplarında sırası ile 13.6 kat ($p<0,001$) ve 11.8 kat ($p<0,001$) artmış

bulundu. CDP-kolin tedavisi alan sıçanların siyatik sinir örneklerindeki MMP-2 aktivitesi hasarın 7. gününde Salin alanlarınkine kıyasla hala anlamlı ($p<0,05$) olarak azalmış idi.

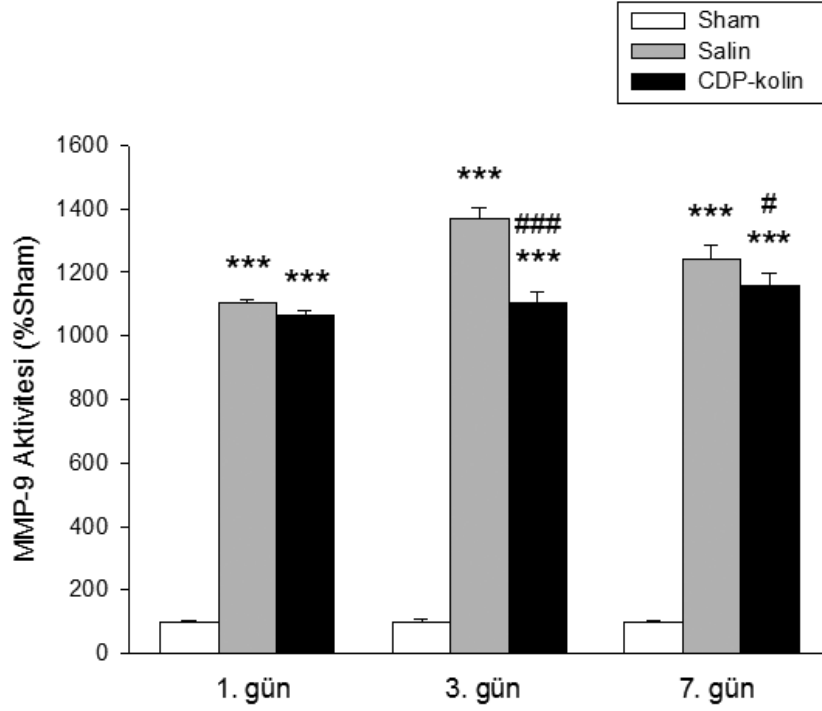


Şekil-16: Siyatik sinir hasarını takiben 1., 3., ve 7. günlerde elde edilen örneklerde MMP-2 aktivitesinin analizi. Sonuçlar Sham grubundaki bantların dansitometrik değerlerinin yüzdesi olarak ifade edildi. Sham grubu ile kıyaslandığında *** $p<0,001$; Salin grubu ile kıyaslandığında # $p<0,05$ ve ### $p<0,001$.

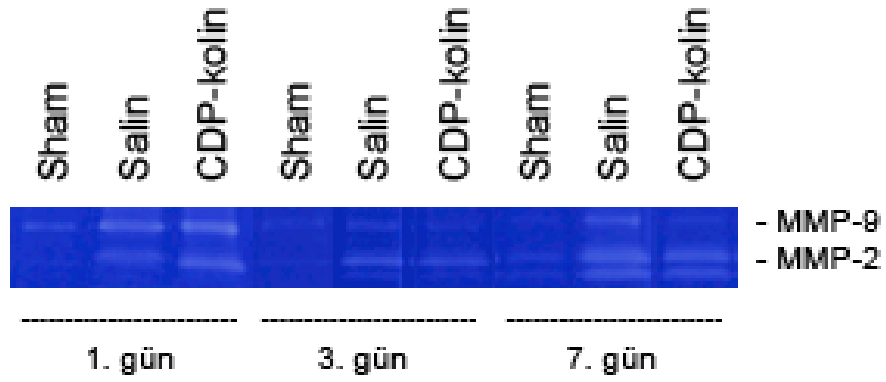
III.B. MMP-9 Protein Aktivitesi

Siyatik sinir örneklerinde MMP-9 aktivitesi Sham grubunda çok düşük düzeylerde tespit edildi. MMP-9 aktivitesi siyatik sinir hasarını takiben Salin ve CDP-kolin gruplarında anlamlı olarak artarken, hasarı takip eden 3. ve 7. günlerde CDP-kolin tedavisi alan sıçanların siyatik sinir örneklerinde Salin tedavisi alanlara göre anlamlı olarak azalmış bulundu (Şekil-17). Siyatik sinir hasarını takip eden 1. günde MMP-9 aktivitesi Sham grubuna göre Salin ve CDP-kolin gruplarında sırası ile 11 kat ($p<0,001$) ve 10,6 kat ($p<0,001$) artmış bulundu. Hasarın 3. gününde MMP-9 aktivitesi Sham grubuna göre Salin ve CDP-kolin gruplarında sırası ile 13,7 kat ($p<0,001$) ve 11 kat ($p<0,001$) artmış idi. CDP-kolin tedavisi alan sıçanların siyatik sinir örneklerindeki MMP-2

aktivitesi Salin alanlarınkine kıyasla anlamlı ($p<0.001$) olarak azalmış bulundu. Hasarın 7. gününde ise MMP-9 aktivitesi Sham grubuna göre Salin ve CDP-kolin gruplarında sırası ile 12,4 kat ($p<0,001$) ve 11,5 kat ($p<0,001$) artmış bulundu. CDP-kolin tedavisi alan sıçanların siyatik sinir örneklerindeki MMP-9 aktivitesi hasarın 7. gününde Salin alanlarınkine kıyasla hala anlamlı ($p<0,05$) olarak azalmış idi.



Şekil-17: Siyatik sinir hasarını takiben 1., 3., ve 7. günlerde elde edilen örneklerde MMP-9 aktivitesinin analizi. Sonuçlar Sham grubundaki bantların dansitometrik değerlerinin yüzdesi olarak ifade edildi. Sham grubu ile kıyaslandığında *** $p<0,001$; Salin grubu ile kıyaslandığında # $p<0,05$ ve ### $p<0,001$.



Şekil-18: Tüm deney gruplarından elde edilen siyatik sinir örneklerinde MMP-2 ve MMP-9 aktivitelerine ait temsili jelatin zimografi bantları.

TARTIŞMA

Bu çalışmada, CDP-kolin tedavisinin periferik sinir hasarında fonksiyonel iyileşmeyi arttırıcı etkisinin mekanizması, sıçan siyatik sinir kesisi ve primer anostomoz modelinde araştırılmıştır. Bu amaçla cerrahi takip eden 1., 3., ve 7. günlerde elde edilen siyatik sinir örneklerinde histomorfolojik ve moleküler biyolojik analizler yapılmıştır. Sonuçlarımız CDP-kolin tedavisinin birim alana düşen ve total myelinize akson sayısını anlamlı şekilde arttırdığını göstermektedir. Bu artışlara hücre dışı matriks proteinlerinden MMP-2 ve MMP-9 düzeyleri ile aktivitelerinin baskılanmasının yanında TIMP-1 ve TIMP-3 düzeylerinin artışı eşlik etmektedir. Bulgularımız, CDP-kolin'in periferik sinir hasarında fonksiyonel iyileşmeyi arttırıcı etkinliğine hücre dışı matriks proteinlerini düzenlemesinin aracılık ettiğini düşündürmektedir.

CDP-kolin vücudumuzda endojen olarak oluşan doğal bir bileşiktir (63). Yapısal olarak bir nükleotiddir. Hücre membran fosfolipidlerinden fosfatidilkolin sentezi sırasında hız kısıtlayıcı basamakta ortaya çıkar (64). Dışarıdan verilen CDP-kolin'in (ki bu durumda sitikolin adını alır) fosfatidilkolin artışını sağlayarak hücre membranının yenilenmesi ve onarılmasını arttırıcı etkileri mevcuttur (65). Bu yararlı etkileri çeşitli deneysel ve klinik çalışmalar ile kanıtlanmıştır. Sitikolin, Alzheimer ve multiinfarkt demans gibi nörodejeneratif hastalıklarda (66), Parkinson hastalığında (67), öğrenme ve hafızanın geliştirilmesinde (68), akut ve kronik serebrovasküler patolojilerde (52), travmatik beyin hasarında (69) ve glokom (70) ile ambliyopi (71) gibi çeşitli göz hastalıklarında yararlı kullanımı olabileceği bildirilen bir maddedir. Bu hastalıklardaki etki mekanizmalarının üzerinde tek tek durmak gerekir. Alzheimer hastalığında etkilenmiş nöronlarda fosfatidilkolin ve fosfatidiletanolamin miktarında azalma tespit edilmiş olup (72) CDP-kolin verilmesi bu fosfolipidlerin artışını mümkün kılmaktadır (50). Ayrıca, Alzheimer hastalığında kolinerjik yetmezlik de mevcuttur (66) ve kolin vericisi olması dolayısıyla CDP-kolin bu eksikliği tamamlayabilmektedir. Stroke geçiren hastalarda, CDP-kolin verilmesinin lezyon hacmini azalttığı (73), motor ve kognitif bozukluklarda erken geri dönüşümü sağladığı gösterilmiştir (52). Parkinson hastalarında, CDP-kolin dopamin miktarını arttırır (74) ve bunu da muhtemelen beyin asetilkolin miktarını arttırarak (75) yapmaktadır; levodopa ile

CDP-kolin'in kombine kullanımı, levodopa ihtiyacını anlamlı derecede azaltır (74). Kafa travmalı hastalarda CDP-kolin tedavisinin motor, bilişsel ve psikolojik gelişimi hızlandırdığı ve hastanede kalış süresinin kısalttığı rapor edilmiştir (76). Bu etki CDP-kolinin beyinde, asetilkolin ve noradrenalinden bağımsız olarak, ACE ve Na/K ATP'az aktivitesini artırması ve membranda fosfatidilkoline dönüşmesi ile gerçekleştiği ortaya koyulmuştur (77) .

Periferik sinir hasarındaki yeniden yapılanma sürecinde aksonal dejenerasyon ve rejenerasyon meydana gelir (1, 2). Travma sonrasında distal sinir segmentinde meydana gelen Wallerian dejenerasyon, akson ve myelin kalıntılarının ortadan kaldırılmasını sağlar. Rejenere olan aksonlar, proksimal sinir matriksine girdiğinde Schwann hücreleri bunların etrafını sarar ve bunları remyelinize eder (3-5). Wallerian dejenerasyonun tüm aşamalarında proteolitik aktivite izlenmektedir. Proteolizin nöral hasarı takiben çok kısa bir süre içerisinde başlaması, kan-sinir bariyerinin yıkımını sağlayarak makrofaj infiltrasyonunu kolaylaştırmaktadır. Aynı zamanda hücreler arası matriksin yıkımı sağlanarak hücreler arası hareket ve debris yıkımı artmaktadır (21). Sinir hasarı (aksonal yaralanma) sonrasında, meydana gelen tamir süreci tüm nöronu kapsamaktadır. Aksonal rejenerasyonun en önemli bölümünü; aksonal filizlenme, büyüme ve reinnervasyon oluşturmaktadır (21). İyileşme aşamasında gözlenen epinöral skar dokusu, onarım sahasında oluşan aksonal gelişimi engelleyen mekanik bir bariyer oluşturarak (78, 79) ve nöral dokuyu çevre dokulara yapışması suretiyle immobilize edip iskemiye maruz bırakarak (80) iyileşmeyi olumsuz yönde etkilemektedir. Sinir ucunda nörinom gelişimi, aksonal rejenerasyon dolayısıyla fonksiyonda iyileşmeyi etkileyen en önemli faktördür. Nörinom gelişimini engellemek için; otojen by-pass teknikleri (81), Schwann hücreleri içeren sinir grefti (82), endojen ve eksojen büyüme faktörleri (83-86) ve sinir boşluğuna çeşitli maddeler içeren tübüler sistemlerin yerleştirilmesi (87) yöntemlerinde anlamlı sonuçlar elde edilmiştir. Oluşmuş olan sinir yaralanması sonrası, mikroşirürjikal olarak primer sütür ile anatomik olarak akson aksona anastomoz hala altın standart yöntem olarak kabul edilmektedir (88, 89).

Matriks metalloproteinazlar (MMP) ve bunların primer endojen inhibitörleri olan TIMP molekülleri (Tissue Inhibitors of MetalloProteinases) hücre dışı matriksin travma sonrası remodelizasyonunda kritik önem taşımaktadırlar (22). MMP'ler, aktif bölgelerinde Zn^{++} bulunduran geniş bir

enzim ailesi olup, bunlardan jelatinaz A ve B olarak bilinen MMP-2 ve MMP-9 normal şartlarda dokuda eser miktarlarda bulunurken, nöral hasar sonrasında dokudaki konsantrasyonlarının yükseldiği kanıtlanmıştır (30). Hasarın mahiyeti ne olursa olsun (kompresyon, kontüzyon veya transseksiyon), bu moleküllerde artış aynı şekilde olmaktadır (90, 91). Yapılan birçok çalışmada da gösterildiği gibi, MMP-9 yaralanmayı takiben ilk 24 saatte hızla artarken, MMP-2'nin artışı daha yavaş olmakta ve 2. ila 5. günlerde belirginleşmektedir (32, 40, 45, 90-92).

Doku tamiri esnasında hücre dışı matriksin yıkılması, hücrelerin matriks içerisinde optimal biçimde yeniden yapılandırılması için gereklidir. Ancak aşırı yıkım olumsuz etkilere yol açabilir. TIMP molekülleri MMP'lerin substrata bağlanan alt üniteleri ile 1:1 nonkovalent bağ oluşturmak suretiyle inhibisyon yaparak matriks yıkım miktarını sınırlamaktadırlar (31, 32). TNF alfa ve TGF beta da TIMP-1'in bilinen modülatörlerdir. Bunların ekspresyonu erken (1. gün) ve geç faz (4. gün) boyunca, TIMP-1 ve MMP-9'un ekspresyonu ile paralellik göstermektedir. Sonuç olarak hasar sonrasında TIMP-1, bazal membranı kontrolsüz yıkımdan korumaktadır (33).

Sitikolin tedavisinin periferik sinir rejenerasyonundaki etkinliğini inceleyen önceki çalışmalarımızda Siyatik Fonksiyon İndeksi (SFİ) kontrole göre anlamlı olarak iyileşmiş, akson sayısı ve aksonal organizasyon skoru artmış, EMG ile değerlendirilen sinir rejenerasyonu kuvvetlenmiş ve skar dokusu oluşumu azalmıştır (93). Daha sonra yapılan çalışmada, CDP-kolin'nin aksonal rejenerasyonu potansiyalize ederek fonksiyonel iyileşmeyi artırma anlamındaki etkinliği için sitidin ve kolinin ortamda birlikte bulunmaları gerektiği saptanmıştır (94). Siyatik Fonksiyon İndeksi'nin, topikal yolla CDP-kolin veya sitidin+kolin uygulanan gruplarda sadece sitidin veya kolin verilen gruplara göre anlamlı olarak iyileştiği gözlenmiştir (94). İlaveten, sadece topikal olarak değil, sistemik yolla uygulanan CDP-kolin veya sitidin+kolin tedavilerinin de siyatik sinir rejenerasyonunu arttırdığı ortaya konmuştur (61). Yakın zamanlı bir çalışmamızda ise CDP-kolin'in siyatik sinir kesisi ve primer anastomoz modelinde rejenerasyonu arttırıcı etkinliğinin doza bağımlı olarak ortaya çıktığı gözlenmiştir (62). Özellikle çalışmada kullanılan en yüksek dozda (900 µmol/kg) görülmek üzere, doza bağımlı olarak siyatik fonksiyon indeksinde iyileşme, sinir dokusu rejenerasyonunda artış, perinöral skar dokusunda azalma, EMG

latansında kısıalma, sinir adhezyon ve seperabilite skorlarında iyileşme ile total miyelinli akson sayısı ve dansitesinde anlamlı artışlar tespit edilmiştir (62).

MMP'lerin çok sayıda selektif ve nonselektif inhibitörleri denenmiş fakat bunların büyük bir kısmının biyo-yararlanımlarının ve sağkalım oranlarının düşük olması nedeni ile çalışmalarına son verilmiştir (30). Ancak bazı ekzojen ajanların bu proteinazlar üzerine olan etkileri halen araştırılmaktadır. Örneğin, MMP'lerin Zn⁺⁺ bağlayan aktif bölgesini işgal ederek inhibisyon yapan hidroksumik asit türevleri veya anti-MMP9 antikorlarının siyatik sinir kesisinin ardından intraperitoneal olarak verildiği hayvanlarda Wallerian dejenerasyonun ve miyelin fagositozunun azaldığı, bu etkilerin hidroksumat verilen hayvanlarda anti-MMP9 verilenlere göre daha belirgin olduğu saptanmıştır. Aynı çalışmada, MMP-9 miktarları da ölçülmüş, her iki grupta da MMP-9 ölçümlerinde kontrol grubu ile anlamlı fark saptanmamıştır; ancak yazarlar bu sonucu elektroforez sırasında jelin içindeki MMP-antikor veya MMP-hidroksumat komplekslerinin ayrılmış olabileceğine bağlamışlardır (95). Kontrollü bir hayvan çalışmasında doksisisiklin ve diğer tetrasiklinlerin iskemiye maruz bırakılan nöral dokuda MMP-9 ve MMP-2 miktarlarını azalttığı gösterilmiştir (96). Yine sıçanlarda serebral iskemi yoluyla nöral hasar oluşturulan bir başka çalışmada, kalpain veya kathepsin B'nin inhibisyonunun, insan glioblastoma ve lösemik hücre kültürlerinde MMP-9 aktivasyonunu önlediği yönündeki kanıtlardan (97,98) yola çıkılarak, bir kalpain + kathepsin B inhibitörü olan e64d verilen hayvanlarda postiskemik MMP-9 ekspresyonunun kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaldığı saptanmıştır (99). Hidroksumik asit türevi bir MMP inhibitörü olan BB-1101'in pnömokokal menenjitli sıçanlara verilmesinin, kontrol grubuna göre MMP-9 miktarında anlamlı azalmaya, ayrıca nöbet sıklığı ve mortalitede düşüş ile öğrenme yeteneğinin korunmasına neden olduğu bildirilmiştir (100).

MMP ve TIMP moleküllerinin nöral hasardan sonraki değişimleri, bunların çeşitli ekzojen moleküllerle karşılıklı etkileşimleri ile regülasyonları çeşitli çalışmalarla belirlenmiş, ancak doğal metabolik yollarla endojen olarak oluşan ve deneysel çalışmaların ötesine geçerek bazı nörodejeneratif hastalıklarda kullanıma sunulmuş bir ajan olan CDP-kolin'in bu moleküller üzerindeki etkisi hakkında kontrollü bir çalışma yapılmamıştır.

Sunulan çalışmada sıçan siyatik sinir kesisi ve primer anostomoz modelinde CDP-kolin tedavisinin MMP ve TIMP molekülleri üzerine etkileri araştırıldı. Bu amaçla 600 µmol/kg CDP-kolin intraperitoneal enjeksiyonu sonrası 1., 3., ve 7. günlerde elde edilen siyatik sinir örneklerinde histomorfolojik ve moleküler biyolojik analizler yapıldı.

Histomorfolojik değerlendirmede, CDP-kolin grubunda yeni akson oluşumları, adacık formasyonları (kompartmanlar) şeklinde akson toplulukları ve bu aksonlar üzerinde myelin oluşumunun başladığı ve ilerlediği gözlemlendi. CDP-Kolin grubunda, perinöriumun kontrol (Salin) grubuna kıyasla daha iyi gözlemlendiği ve düzenli olduğu tespit edildi. Myelinize akson dansitesi (Myelinize Akson Sayısı / mm²) verilerine bakıldığında; Salin grubunda 1., 3. ve 7. günlerde giderek kötüleşerek azaldığı tespit edilen akson dansitesinin, CDP-Kolin grubunda her üç zaman diliminde alınan örnekler salin grubundaki ilgili zaman dilimindeki örnekler ile karşılaştırıldığında anlamlı derecede artmış myelinli akson dansitesi gösterdiği görüldü. Hatta CDP-Kolin grubu verilerinin 1. ve 3. gün zaman dilimlerinde Sham grubuna yakın değerler verdiği; 7. gün verilerinin ise sham grubundan daha artmış oranda olduğu görüldü. Myelinize akson dansitesi ve tüm fasikül alanı verilerinden elde edilen total myelinize akson sayısı verilerine bakıldığında, CDP-Kolin grubunun salin grubundan anlamlı derecede yüksek ve sham grubuna yakın değerler gösterdiği tespit edildi. Myelinli akson dansitesi verilerinden daha az hassas bilgiler edinebileceğimiz total fasikül alanı sonuçları açısından her deney hayvanı grubunda farklı olmakla birlikte yakın sonuçlar ortaya çıktığı gözlemlendi. Bu sonuçlar da fiksasyon, gömme, ağırlık ve yaş gibi sinir kalınlığını etkileyebilecek faktörlerin minimumda tutulduğuna işaret etmektedir.

Western blot analizlerde, siyatik sinirden elde edilen örneklerde MMP-2 ve MMP-9 miktarları Sham grubunda literatür ile uyumlu olarak çok düşük düzeylerde tespit edildi. MMP-2 ve MMP-9 proteinlerinin düzeyleri siyatik sinir hasarını takiben Salin ve CDP-kolin gruplarında anlamlı olarak artarken, hasarı takip eden 3. ve 7. günlerde CDP-kolin tedavisi alan sıçanların siyatik sinir örneklerinde Salin tedavisi alanlara göre anlamlı olarak azalmış bulundu. Jelatin zimografi ile gerçekleştirilen enzimatik aktivite analizlerinde CDP-kolin'in, bu proteinlerin miktarlarına paralel olarak aktivitelerine de aynı şekilde etki ettiği

gösterildi. Özellikle hasarı takip eden 3. ve 7. günlerde CDP-kolin grubunda Salin grubuna kıyasla anlamlı azalmalar görüldü.

Tıpkı MMP proteinleri gibi, Sham grubuna ait örneklerde TIMP-1 ve TIMP-3 proteininin siyatik sinirdeki düzeyleri de çok düşük bulundu. TIMP-1 ve TIMP-3 proteininin düzeyleri siyatik sinir hasarını takiben Salin grubunda değişmezken, CDP-kolin grubunda özellikle hasarı takip eden 3. ve 7. günlerde anlamlı artışlar gösterdi.

Bu çalışmada; literatür ile uyumlu olarak, MMP-9 ile MMP-2 seviyelerinin ve aktivitelerinin, nöral travmanın doğal seyrinde (Salin grubu) anlamlı artışlar gösterdiği teyit edildi. Mevcut literatüre katkı olarak; kullandığımız CDP-kolin'in, hem MMP-9 hem de MMP-2 seviyeleri ile aktivitelerini anlamlı olarak düşürdüğü, aynı zamanda TIMP-1 ve TIMP-3 seviyelerinde anlamlı artışlar sağladığı saptandı.

Sonuç olarak CDP-kolin'in, moleküler düzeydeki çeşitli etkileşimleri ve hücre dışı matriksin yapılandırılmasında görev alan proteinlerin düzenlenmesindeki olumlu etkileri sebebiyle, gelecekte birçok yararlı amaç için kullanılabileceği ihtimal dâhilindedir. Bu nedenle, bu madde ile ilgili moleküler düzeyde daha kapsamlı çalışmalar yapılması uygun olabilir.

KAYNAKLAR

1. Fawcett J.W, Keynes R.J. Peripheral nerve regeneration. *Annu Rev Neurosci* 1990;13:43–60.
2. Griffin JW, Hoffman DN. Degeneration and regeneration in the peripheral nervous system. In: P.J. Dyck, P.K. Thomas, J.W. Griffin, P.A. Low, and J.F. Poduslo (eds). *Peripheral Neuropathy*. 3rd edition. Philadelphia: W.B. Saunders; 1993. 361–76.
3. Bunge RP. Expanding roles for the Schwann cell: ensheathment, myelination, trophism and regeneration. *Curr Opin Neurobiol*. 1993;3:805–9.
4. Sanes JR. Extracellular matrix molecules that influence neural development. *Annu Rev Neurosci* 1989;12:491–516.
5. Martini R. Expression and functional roles of neural cell surface molecules and extracellular matrix components during development and regeneration of peripheral nerves. *J Neurocytol* 1994;23:1–28.
6. George R, Griffin JW. The proximo-distal spread of axonal degeneration in the dorsal columns of the rat. *J Neurocytol* 1994;23:657-67.
7. Stoll G, Griffin JW, Li CY, Trapp BD. Wallerian degeneration in the peripheral nervous system: participation of both Schwann cells and macrophages in myelin degradation. *J Neurocytol* 1989;18:671-83.
8. Carroll SL, Miller ML, Frohnert PW, Kim SS, Corbett JA. Expression of neuregulins and their putative receptors, ErbB2 and ErbB3, is induced during Wallarian degeneration. *J Neurosci* 1997;17:1642-59.
9. Martini R, Bollensen E, Schachner M. Immunocytological localization of the major peripheral nervous system glycoprotein P0 and the L2/HNK-1 and L3 carbohydrate structures in developing and adult mouse sciatic nerve. *Dev Biol* 1988;129:330-8.
10. Meyer M, Matsuoka I, Wetmore C, Olson L, Thoenen 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.
11. Perry VH, Tsao JW, Fearn S, Brown MC. Radiation-induced reductions in macrophage recruitment have only slight effects on myelin degeneration in sectioned peripheral nerves of mice. *Eur J Neurosci* 1995;7:271-80.
12. Ludwin SK. Oligodendrocyte survival in Wallerian degeneration. *Acta Neuropathol (Berlin)* 1990;80:184-91.
13. Stoll G, Trapp BD, Griffin JW. Macrophage function during Wallerian degeneration of rat optic nerve: clearance of degenerating myelin and Ia expression. *J Neurosci* 1989;9:2327-35.
14. Perry VH, Brown MC, Gordon S. The macrophage response to central and peripheral nerve injury: a possible role for macrophages in regeneration. *J Exp Med* 1987;165:1218-23.
15. Fernandez-Valle C, Bunge RP, Bunge MB. Schwann cells degrade myelin and proliferate in the absence of macrophages: evidence from in vitro studies of Wallerian degeneration. *J Neurocytol* 1995;24:667-79.
16. Perry VH, Tsao JW, Fearn S, Brown MC. Radiation-induced reductions in macrophage recruitment have only slight effects on myelin degeneration in sectioned peripheral nerves of mice. *Eur J Neurosci* 1995;7:271-80.

17. Bouldin TW, Earnhardt TS, Goines ND. Sequential changes in the permeability of the blood-nerve barrier over the course of ricin neuropathy in the rat. *Neurotoxicology* 1990;11:23-34.
18. George R, Griffin JW. The proximo-distal spread of axonal degeneration in the dorsal columns of the rat. *J Neurocytol* 1994;23:657-67.
19. Ling EA. Electron microscopic studies of macrophages in Wallerian degeneration of rat optic nerve after intravenous injection of colloidal carbon. *J Anat* 1978;126:111-21.
20. Lawson LJ, Frost L, Risbridger J, Fearn S, Perry VH. Quantification of the mononuclear phagocyte response to Wallerian degeneration of the optic nerve. *J Neurocytol* 1994;23:729-44.
21. Hughes PM, Wells GM, Clements JM, Gearing AJ, Redford EJ, Davies M, Smith KJ, Hughes RA, Brown MC, Miller KM. Matrix metalloproteinase expression during experimental autoimmune neuritis. *Brain* 1998;121: 481-94.
22. International Conference on Metalloproteinases and Their Inhibitors in the Nervous System: Physiology and Disease. Held in Banff, Canada;27 February- 3 March 1999. Meeting Report
23. Takino T, Sato H, Yamamoto E, Seiki M. Cloning of a human gene potentially encoding a novel matrix metalloproteinase having a C-terminal transmembrane domain. *Gene* 1995;155:293-8.
24. Birkedal-Hansen H. Proteolytic remodeling of extracellular matrix. *Curr Opin Cell Biol* 1995;7:728-35.
25. Ries C, Petrides PE. Cytokine regulation of matrix metalloproteinase activity and its regulatory dysfunction in disease. *Biol Chem Hoppe-Seyler* 1995;376:345-55.
26. Unemori EN, Hibbs MS, Amento EP. Constitutive expression of a 92-kD gelatinase (type V collagenase) by rheumatoid synovial fibroblasts and its induction in normal human fibroblasts by inflammatory cytokines. *J Clin Invest* 1991;88:1656-62.
27. Lyons JG, Birkedal-Hansen B, Pierson MC, Whitelock JM, Birkedal-Hansen H. Interleukin-1 beta and transforming growth factor-alpha /epidermal growth factor induce expression of MW 95 000 type IV collagenase / gelatinase and interstitial fibroblast-type collagenase by rat mucosal keratinocytes. *J Biol Chem* 1993;268:19143-51.
28. Busiek DF, BaragiV, Nehring LC, Parks WC, Welgus HG. Matrilysin expression by human mononuclear phagocytes and its regulation by cytokines and hormones. *J Immunol* 1995;154:6484-91.
29. Hartung HP, Kieseier BC. The role of matrix metalloproteinases in autoimmune damage to the central and peripheral nervous system *J Neuroimmunol* 2000;107:140-147.
30. Zhang H, Chang M, Hansen CN, Basso DM, Noble-Haeusslein LJ. Role of matrix metalloproteinases and therapeutic benefits of their inhibition in spinal cord injury (Review). *Neurotherapeutics* 2011;8:206-20.
31. Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2001;17:463-516.
32. Crocker SJ, Pagenstecher A, Campbell IL. The TIMPs tango with MMPs and more in the central nervous system. *J Neurosci Res* 2004;75:1-11.

33. Fleur M. Basement membrane and repair of injury to peripheral nerve: Defining a potential role for macrophages, matrix metalloproteinases, and tissue inhibitor of metalloproteinases-1. *JEM*. 1996;184:2311.
34. Huang B, Zhao X, Zheng B, Zhang I, Wang W: Different expression of tissue inhibitor of metalloproteinase family members in rat dorsal root ganglia and their changes after peripheral nerve injury. *Neuroscience* 2011;193:421–8.
35. Kim Y, Remacle AG, Chernov AV, et al. The MMP-9/TIMP-1 Axis Controls the Status of Differentiation and Function of Myelin-Forming Schwann Cells in Nerve Regeneration. *PLoS ONE* 2012;7): e33664. doi:10.1371/journal.pone.0033664
36. Yang Y, Estrada EY, Thompson JF, Liu W, Rosenberg GA. Matrix metalloproteinase-mediated disruption of tight junction proteins in cerebral vessels is reversed by synthetic matrix metalloproteinase inhibitor in focal ischemia in rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 2007;27:697-709.
37. Buhler LA, Samara R, Gusman E, et al. Matrix metalloproteinase-7 facilitates immune Access to the CNS in experimental autoimmune encephalomyelitis. *BMC Neurosci* 2009;10:17.
38. Asahi M, Wang X, Mori T, et al. Effects of matrix metalloproteinase-9 gene knock-out on the proteolysis of blood-brain barrier and White-matter components after cerebral ischemia. *J Neurosci* 2001;21:7724-32
39. Caron A, Desrosiers RR, Beliveau R. Ischemia injury alters endothelial cell properties of kidney cortex: stimulation of MMP-9. *Exp Cell Res* 2005;310:105-16.
40. de Castro RC Jr, Burns CL, McAdoo DJ, Romanic AM. Metalloproteinase increases in the injured rat spinal cord. *Neuroreport* 2000;11:3551-4.
41. Yu F, Kamada H, Niizuma K, Endo H, Chan PH. Induction of mmp-9 expression and endothelial injury by oxidative stress after spinal cord injury. *J Neurotrauma* 2008;25:184–95.
42. Haorah J, Ramirez SH, Schall K, Smith D, Pandya R, Persidsky Y. Oxidative stress activates protein tyrosine kinase and matrix metalloproteinases leading to blood-brain barrier dysfunction. *J Neurochem* 2007;101:566–76.
43. Alexander JS, Elrod JW. Extracellular matrix, junctional integrity and matrix metalloproteinase interactions in endothelial permeability regulation. *J Anat* 2002;200:561–74.
44. Dang AB, Tay BK, Kim HT, Nauth A, Alfonso-Jaume MA, Lovett DH. Inhibition of MMP2/MMP9 after spinal cord trauma reduces apoptosis. *Spine [Phila Pa 1976]* 2008;33:576-9.
45. Kobayashi H, Chattopadhyay S, Kato K, et al. MMPs initiate Schwann cell-mediated MBP degradation and mechanical nociception after nerve damage. *Mol Cell Neurosci* 2008;39:619–27.
46. Chandler S, Coates R, Gearing A, Lury J, Wells G, Bone E. Matrix metalloproteinases degrade myelin basic protein. *Neurosci Lett* 1995;201:223–6.
47. Devor M. Sodium channels and mechanisms of neuropathic pain. *J Pain* 2006;7:3-12.
48. Parisi V, Coppola G, Centofanti M, Oddone F, Angrisani AM, Ziccardi L, Ricci B, Quaranta L, Manni G. Evidence of the neuroprotective role of citicoline in glaucoma patients. *Prog Brain Res* 2008;173:541-54.

49. Wurtman RJ, Regan M, Ulus I, Yu L. Effect of oral CDP-choline on plasma choline and uridine levels in humans. *Biochem Pharmacol* 2000;60:989-92.
50. 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. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 1999;21:535-40.
51. Carlezon WA, Pliakas AM, Parow AM, Detke MJ, Cohen BM, Renshaw PF. Antidepressant-like effects of cytidine in the forced swim test in rats. *Biol Psychiatry* 2002;51:882-9.
52. Adibhatla RM, Hatcher JF, Dempsey RJ. Citicoline: neuroprotective mechanisms in cerebral ischemia. *J Neurochem* 2002;80:12-23.
53. D'Orlando KJ, Sandage BW Jr. Citicoline (CDP-choline): mechanisms of action and effects in ischemic brain injury. *Neurol Res* 1995;17:281-4.
54. Rao AM, Hatcher JF, Dempsey RJ. Does CDP-choline modulate phospholipase activities after transient forebrain ischemia? *Brain Res* 2001;893:268-72.
55. Secades JJ, Lorenzo JL. Citicoline: pharmacological and clinical review, 2006 update. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 2006;28 Suppl B:1-56.
56. Warach S, Pettigrew LC, Dashe JF, Pullicino P, Lefkowitz DM, Sabounjian L, Harnett K, Schwiderski U, Gammans R. Effect of citicoline on ischemic lesions as measured by diffusion-weighted magnetic resonance imaging. Citicoline 010 Investigators. *Ann Neurol* 2000;48:713-22.
57. Saver JL. Citicoline: update on a promising and widely available agent for neuroprotection and neurorepair. *Rev Neurol Dis* 2008;5:167-77.
58. Dávalos A, Alvarez-Sabín J, Castillo J, Díez-Tejedor E, Ferro J, Martínez-Vila E et al. Citicoline in the treatment of acute ischaemic stroke: an international, randomised, multicentre, placebo-controlled study (ICTUS trial). *Lancet* 2012;380:349-57.
59. 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. *Eur J Neurol* 2008;15:465-74.
60. Renshaw PF, Daniels S, Lundahl LH, Rogers V, Lukas SE. Short-term treatment with citicoline (CDP-choline) attenuates some measures of craving in cocaine-dependent subjects: a preliminary report. *Psychopharmacology (Berl)* 1999;142:132-8.
61. Caner B, Kafa MI, Bekar A, Kurt MA, Karli N, Cansev M, Ulus IH: Intraperitoneal administration of CDP-choline or a combination of cytidine plus choline improves nerve regeneration and functional recovery in a rat model of sciatic nerve injury. *Neurol Res* 2012;34:238-45.
62. Kaplan T, Kafa İM, Cansev M, Bekar A, Karlı N, Taskapılıoğlu MÖ, Kanar F. Investigation of the dose-dependency of citicoline effects on nerve regeneration and functional recovery in a rat model of sciatic nerve injury. *Turkish Neurosurgery* 2014;24: 54-62.
63. Secades JJ. Citicoline: Pharmacological and clinical review, 2010 update. *Rev Neurol* 2011;52 (Suppl. 2):1-62
64. Kennedy EP, Weiss SB. The function of cytidine coenzymes in the biosynthesis of phospholipides. *J Biol Chem* 1956;222:193-214.
65. Savci V, Wurtman RJ. Effect of cytidine on membrane phospholipid synthesis in rat striatal slices. *J Neurochem* 1995;64:378-84.

66. Cacabelos R, Caamano J, Gomez MJ, Fernandez-Novoa L, Franco-Maside A, Alvarez XA. Therapeutic effects of CDP-choline in Alzheimer's disease. Cognition, brain mapping, cerebrovascular hemodynamics, and immune factors. *Ann NY Acad Sci* 1996;777:399-403.
67. Eberhardt R, Birbamer G, Gerstenbrand F, Rainer E, Traegner H. Citicoline (CDP-choline) in the treatment of Parkinson's disease. *Clin Ther* 1990;12:489-95.
68. Teather LA, Wurtman RJ. Dietary cytidine (5')-diphosphocholine supplementation protects against development of memory deficits in aging rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2003;27:711-7.
69. Dixon CE, Xiecheng MA, Donald WM. Effects of CDP_choline treatment on neurobehavioral deficits after TBI and on hippocampal and neocortical acetylcholine release. *J Neurotrauma* 1997;14:161-9.
70. Grieb P, Rejdak R. Pharmacodynamics of citicoline relevant to the treatment of glaucoma. *J Neurosci Res* 2002;67:143-8.
71. Porciatti V, Schiavi C, Benedetti P, Baldi A, Campos EC. Cytidine-5'-diphosphocholine improves visual acuity, contrast sensitivity and visually-evoked potentials of amblyopic subjects. *Curr Eye Res* 1998;17:141-8.
72. Nitsch RM, Blusztajn JK, Pittas AG, Slack BE, Growdon JH, Wurtman RW. Evidence for a membrane defect in Alzheimer disease brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:1671-5.
73. Warach S. Dose dependent reduction in infarct growth with citicoline treatment: evidence of neuroprotection in human stroke? *Stroke* 2002;33:354.
74. Secades JJ. CDP-choline: Update and review of its pharmacology and clinical use. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 2002;24(Supp B):1-53.
75. Blusztajn JK, Wurtman RJ. Choline and cholinergic neurons. *Science* 1983;221:614-20.
76. Calatayud-Maldonado V, Calatayud- Perez JB, Aso Escario J. Inclusion body myositis and Welander distal myopathy: a clinical, neurophysiological and morphological comparison. *Neurol Sci* 1991;103:15-18.
77. Plataras C, Tsakitis S, Angelogianni P. Inclusion body myositis and Welander distal myopathy: a clinical, neurophysiological and morphological comparison. *Clin Biochem* 2000;33:351-7.
78. Petersen J, Russell L, Andrus K, MacKinnon M, Silver J, Kliot M. Reduction of extraneural scarring by ADCON-T/N after surgical intervention. *Neurosurgery* 1996;38:976-83.
79. Görgülü A, İmer M, Şimşek Ö, Sencer A, Kutlu K, Çobanoğlu S. The effect of aprotinin on extraneural scarring in peripheral nerve surgery: an experimental study. *Acta Neurochir (Wien)* 1998;140:1303-7.
80. Görgülü A, Uzal C, Doğanay L, İmer M, Eliuz K, Çobanoğlu S. The effect of low-dose extraneural scarring after peripheral nerve surgery in rats. *Neurosurgery* 2003;53:1389-95.
81. 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.
82. 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.

83. 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.
84. 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.
85. Chai H, Wu W, So KF, Prevette DM, Oppenheim RW. Long term effects of a single dose of brain-derived neurotropic factor on motorneuron survival following spinal root avulsion in the adult rat. *Neurosci Lett* 1999;274:147-50.
86. 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.
87. Labrador RO, Buti M, Navarro X. Influence of collagen and laminin gels concentration on nerve regeneration after resection and tube repair. *Exp Neurol* 1998;149:243-52.
88. 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.
89. Beris AE, Lykissas MG. Experimental results in end-to-side neurorrhaphy. *Int Rev Neurobiol* 2009;87:269-79.
90. Wells JE, Rice TK, Nuttall RK, et al. An adverse role for matrix metalloproteinase 12 after spinal cord injury in mice. *J Neurosci* 2003;23:10107-15.
91. Veravalli KK, Dasari VR, Tsung AJ, et al. Human umbilical cord blood stem cells upregulate matrix metalloproteinase-2 in rats after spinal cord injury. *Neurobiol Dis* 2009;36:200-12.
92. Kawasaki Y, Xu ZZ, Wang X, et al. Distinct roles of matrix metalloproteases in the early- and late-phase development of neuropathic pain. *Nat Med* 2008;14:331-36.
93. Ozay R, Bekar A, Kocaeli H, Karli N, Filiz G, Ulus IH. Citicoline improves functional recovery, promotes nerve regeneration, and reduces postoperative scarring after peripheral nerve surgery in rats. *Surg Neurol* 2007;68:615-22.
94. Aslan E, Kocaeli H, Bekar A, Tolunay S, Ulus IH. 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.
95. Siebert H, Dippel N, Mader M, Weber F, Bruck W. Matrix metalloproteinase expression and inhibition after sciatic nerve axotomy. *J Neuropathol Exp Neurol* 2001;60:85-93.
96. Burggraf D, Trinkl A, Dichgans M, Hamann GF. Doxycycline inhibits MMPs via modulation of plasminogen activators in focal cerebral ischemia. *Neurobiol Dis* 2007;25:506-13.
97. Popp O, Heidinger M, Ruiz-Heinrich L, Ries C, Jochum M, Gil-Parrado S. The calpastatin-derived calpain inhibitor CP1B reduces mRNA expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 and invasion by leukemic THP-1 cells. *Biol Chem* 2003;384:951-58.
98. Yanamandra N, Gumidyala KV, Waldron KG, et al. Blockade of cathepsin B expression in human glioblastoma cells is associated with suppression of angiogenesis. *Oncogene* 2004;23:2224-30.

99. Tsubokawa T, Solaroglu I, Yatsushige H, Cahill J, Yata K, Zhang JH. Cathepsin and calpain inhibitor E64d attenuates matrix metalloproteinase-9 activity after focal cerebral ischemia in rats. *Stroke* 2006;37:1888-94.
100. Leib SL, Clements JM, Lindberg RL, et al. Inhibition of matrix metalloproteinases and tumour necrosis factor alpha converting enzyme as adjuvant therapy in pneumococcal meningitis. *Brain* 2001;124:1734-42.

TEŞEKKÜR

Tez çalıőmamda bana her tűrlű desteęi saęlayan Prof. Dr. Ahmet BEKAR'a; tezimin her aőamasında bana yardımcı olan Prof. Dr. Mehmet CANSEV'e, anatomik çalıőmaların yapılmasında ve histomorfolojik sonuçların elde edilmesinde yardımcı olan Doç. Dr. İlker Mustafa KAFA'ya, protein analizlerindeki yardımları için Mesut TŲRKYILMAZ ve Abdullah GŲMŲŐ'e, hayvan deneyleri sırasında bana yardımcı olan baőta Vet. Hek. Faruk KŲŲKYILDIZ olmak űzere Uludaę Ųniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Yetiőtirme Merkezindeki tűm personele teőekkűr ederim. Ayrıca, bu zorlu sűrete her zaman yanımda olan eőim Op. Dr. Ercan GŲNDOęDU'ya teőekkűr ederim.

ÖZGEÇMİŞ

1983, Bandırma/Balıkesir doğumluyum. İlköğrenimimi 1989-1994 yılları arasında Cumhuriyet İlköğretim Okulu'nda, orta öğrenimimi 1994-1997'de Bandırma Ortaokulu'nda, Lise eğitimimi 1997-2001 yılları arasında Şehit Mehmet Gönenç Yabancı Dil Ağırlıklı Lisesi'nde, üniversite eğitimimi 2001-2007 yılları arasında İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi'nde aldım. 2008 yılından beri Uludağ Üniversitesi Beyin ve Sinir Cerrahisi Anabilim Dalı'nda araştırma görevlisi olarak çalışmaktayım.