



T.C

BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

BEYİN VE SİNİR CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

DENEYSEL SİYATİK SİNİR HASARI MODELİNDE ÜRİDİN TEDAVİSİNİN
SİNİR REJENERASYONU VE SKAR DOKUSU OLUŞUMU ÜZERİNE
ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

Dr. Marzieh KARIMI KHEZRI

UZMANLIK TEZİ

BURSA-2020



T.C

BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

BEYİN VE SİNİR CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

DENEYSEL SİYATİK SİNİR HASARI MODELİNDE ÜRIDİN TEDAVİSİNİN
SİNİR REJENERASYONU VE SKAR DOKUSU OLUŞUMU ÜZERİNE
ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

Dr. Marzieh KARIMI KHEZRI

UZMANLIK TEZİ

Danışman: Prof. Dr. Ahmet BEKAR

BURSA-2020

İÇİNDEKİLER

Özet.....	ii
İngilizce Özet.....	iv
Giriş.....	1
Materyal ve Metod.....	5
Bulgular.....	15
Tartışma ve Sonuç.....	28
Kaynaklar.....	37
Ekler.....	43
EK-1: Kısaltmalar.....	43
EK-2: Resim, Şekil, Tablo açıklama.....	44
Teşekkür.....	47
Özgeçmiş.....	48

ÖZET

Periferik sinir rejenerasyonu, günümüzde hala çözülemeyen bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır. Üridin majör pirimidin nükleozididir ve Kennedy yolağı aracılığıyla membran fosfolipid sentezinin bir prekürsörüdür. Çalışmamızın amacı; tek taraflı siyatik sinir hasarı sonrasında sistemik verilen üridin'in rejenerasyon ve skar dokusu oluşumu üzerine etkisinin araştırılmasıdır.

Çalışmada 96 adet Sprague Dawley erişkin erkek sıçan kullanıldı. Denekler erken (4 grup) ve geç dönem (4 grup) olarak ayrıldı. Birinci grup hariç tüm gruplarda sağ siyatik sinir transeksiyon ve sütürasyon uygulandı. Birinci ve ikinci grupta salin (Sham ve Kontrol), üçüncüde Üridin 100mg/kg (U100), dördüncüde ise Üridin 500mg/kg (U500) intraperitoneal yolla 1 hafta boyunca günde bir kez enjeksiyonu yapıldı. Erken gruplar 1., geç ise 12. haftada sakrifiye edildi. Erken gruplarda apoptotik belirteç, oksidasyon hasarı ve antioksidatif savunma mekanizmaları incelendi. Geç dönemde ise siyatik fonksiyonel (SFI) ve elektrofizyolojik (EMG) testlerinden sonra siyatik sinirleri çıkarılarak akson iyileşmesi incelendi. U500 sıçanlarda anti-apoptoz etkisi kontrole göre anlamlı görüldü ($p<0,05$). U100 ve U500 gruplarında oksidasyon parametreleri kontrol gruba göre anlamlı düzeyde azalmış ($p<0,001$) ve anti-oksidasyon parametreleri yükselmiştir ($p<0,001$). U500 grubunda, kontrol gruba göre sinir ayrılabilirliği açısından anlamlı olarak daha iyi sonuçlar saptandı ($p=0,002$). 6. ve 12. haftadaki SFI U100 ve U500 gruplarında kontrole göre belirgin iyileşme saptandı ($p<0,001$). 12.haftada EMG analizlerinde U500 ile tedavi edilen grupta kontrol ve U100 gruplarına göre yüksek amplitüd değerleri saptandı ($p<0,001$). Akson sayısı açısından; U100 ve U500 gruplarında kontrole göre anlamlı istatistiksel artış görüldü ($p<0,05$).

Sonuçlarımız, sistemik uygulanan üridinin doza bağımlı olarak anti-apoptotik ve anti-oksidatif etkinliğe sahip olduğunu göstermektedir. Ayrıca SFI iyileşme, sinir dokusu rejenerasyonunda artış, perinöral skar dokusunda

azalma, EMG latansında kısalma, sinir adhezyon ve seperabilite skorlarında iyileşme ve miyelinli akson sayısında anlamlı artışlar tespit edilmiştir. Bulgularımıza göre üridin periferik sinir hasarında iyileşmeyi artırıcı etkinlik göstermektedir.

Anahtar kelimeler: Apoptozis, periferik sinir, Üridin, rejenerasyon, skar.



SUMMARY

Investigation Of The Effectiveness Of Uridine Treatment On Nerve Regeneration And Scar Tissue Formation In Experimental Sciatic Nerve Damage Model

Peripheral nerve regeneration is still unsolved problem in regenerative medicine. Uridine as bloodstream major pyrimidine nucleoside is a precursor of membrane phospholipid synthesis via the Kennedy pathway. Our purpose is investigation the effect of systemic uridine administration after unilateral sciatic nerve injury on regeneration and scar tissue formation.

In this study, 96 adult male Sprague Dawley rats were used. They were divided into two main groups as early (4 groups) and late (4 groups). Right sciatic nerve transection and suturing were performed in all groups except first one. Intraperitoneally once a day for a week, saline in the first and second groups (Sham and Control), Uridin 100mg/kg (U100) in the third, Uridine 500mg/kg (U500) in the fourth groups, had been injected. Early groups were sacrificed at the 1st and late at the 12th week. In early groups, apoptotic marker, oxidation damage and antioxidative defense mechanisms were examined. In the late ones, after the sciatic functional (SFI) and electrophysiological (EMG) tests, the sciatic nerves were removed and axon healing was examined. Anti-apoptosis effect was found to be significant in U500 rats compared to control ($p < 0.05$). In the U100 and U500 groups, oxidation parameters decreased significantly compared to control ($p < 0.001$) and anti-oxidation parameters increased ($p < 0.001$). In the U500 group, significantly better results were found in terms of nerve separability than control ($p = 0.002$). In the 6th and 12th week SFI U100 and U500 groups showed significant improvement compared to control ($p < 0.001$). At 12th week EMG analysis showed high amplitude values in U500 group compared to control and U100 ($p < 0.001$). In terms of the number of myelinated axons;

statistically increase observed in U100 and U500 groups compared to control ($p < 0.05$).

Systemically Uridine administration has anti-apoptotic and anti-oxidative effects, especially in a dose-dependent manner. In addition, SFI improvement, nerve tissue regeneration, perineural scar tissue decrease, shortening of EMG latency, nerve separability score improvement and myelinated axones increase were observed.

Keywords: Apoptosis, peripheral nerve, Uridine, regeneration, scar.



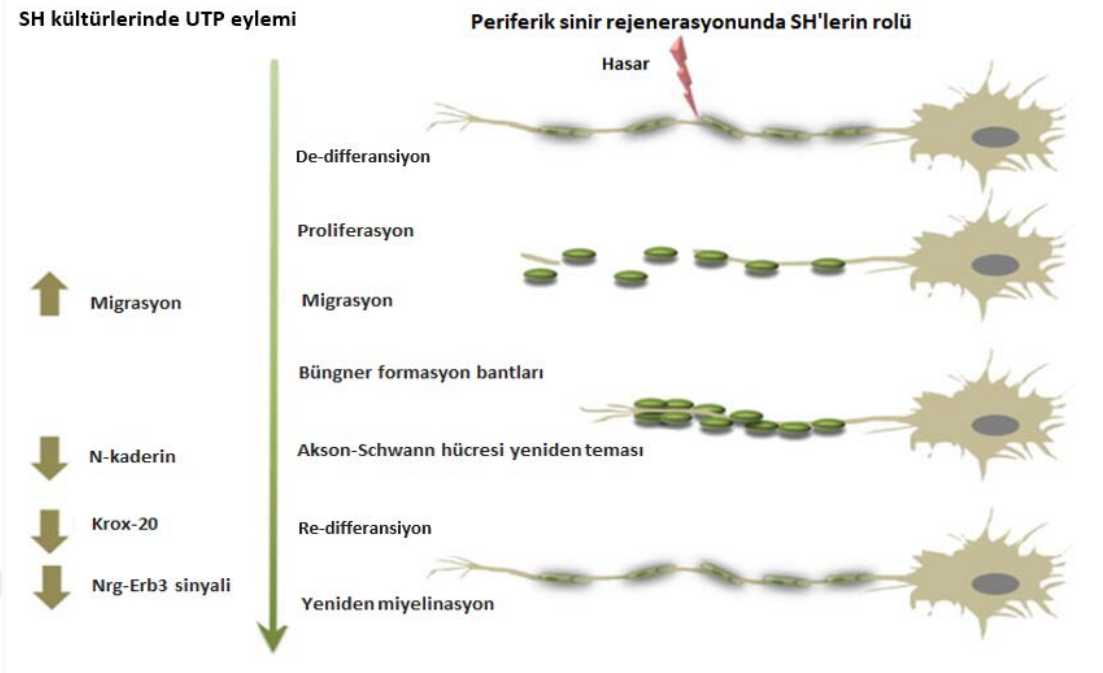
GİRİŞ

Amerika Birleşik Devletleri'nde, birinci seviye travma merkezlerinde periferik sinir hasarı (PSH) prevalansı yaklaşık olarak %2,8'dir (1, 2). Travmatik PSH; delici yaralanmalar, laserasyonlar, gerilme, iskemi ve/veya ezilme mekanizmaları nedeniyle meydana gelebilir (3). Travmatik PSH'ında, sinir uçları gerilmeden yaklaştırılabilirse primer onarım önerilir ve bu tüm yaralanmaların %50'ini oluşturmaktadır (4-6). Sinir onarımının kalitesi iyileşme sürecinde önemlidir. Ancak tüm vakalarda rejenerasyon süreci 1mm/gün hızıyla gerçekleşmektedir ve hedef kasların tekrar innerve olması aylar sürebilmektedir (7). Önceki çalışmalar, yaralanma sonrası geri dönüşümsüz kas atrofisi olmaması için, yeniden innervasyonun 16 aydan önce tamamlanması gerektiğini iddia etmektedir (8, 9). PSH'nin tedavisinde direkt cerrahi tedavi veya sinir greftleme yapılıyor olsa da sadece bu yöntemlerle elde edilen klinik sonuçlar yüz güldürücü olmaktan uzaktır.

Periferik sinir hasarındaki yeniden yapılanma sürecinde aksonal dejenerasyon ve takiben rejenerasyon meydana gelir (10, 11). Nöral rejenerasyon ve hedef dokuların re-innervasyonu; nöron tipi, ortamdaki büyüme faktörleri ve hedef doku gibi çeşitli faktörlerden etkilenir (12).

Nöronlar travmatik yaralanma geçirdiğinde, hücre içi moleküller ve bunların arasında nükleotidler, hücre dışı çevreye salınır ve birçoğu, çevresindeki hücreler üzerinde hareket ederek hasarlı bölgede erken hücrel yanıtı teşvik edebilir. Genel olarak nükleotidlerin birçok patofizyolojik cevapta yer aldığı kabul edilir (13, 14). Ekstraselüler P2Y pürinerjik reseptör sinyal yollarının, hücrel hasardan sonra aktive edilmesiyle birçok hücre tipinde yaralanmaya yanıt olarak hücre göçü ve yara onarım süreçlerine katkıda bulunurlar (15-19). Urasil nükleotidler, glial hücrelerdeki bu spesifik membran reseptörlerine bağlanır ve artan kanıtlar, periferik sinir hasarından sonra aktive olan sinyal moleküllerinden bazılarını oluşturabileceklerini göstermektedir. Uridin-5p-trifosfatın (UTP) nöropatik ağrı

sıçan modellerinde ağrı iletim mekanizmalarına dahil olduğu gösterilmiştir (6, 20, 21). Ayrıca, hücre dışı UTP konsantrasyonunun, çeşitli hayvan ve hücrel modellerde yaralanmadan sonra büyük ölçüde arttığı gözlenmiştir (22-24). Son zamanlarda, UTP'nin hücre iskeleti morfolojisindeki değişiklikleri indükleyebildiğini, göçü arttırdığını ve bir Schwann hücre (SH) hattında yara iyileşmesini destekleyebildiğini bildirilmiştir (25,26). Aynı grup tarafından yapılan son çalışmada, in vitro olarak UTP uygulamasının, iki ana akson türevi sinyal yolunu bloke ederek, Krox-20'nin cAMP'ye bağlı yukarı regülasyonunu azaltarak ve sınırlandırarak dengesiz bir Schwannom hücrelerinin korunmasını desteklediğini göstermektedir ve Neuregulin (NRG) sinyalleşmesi ile ErbB3 reseptöründe down regülasyon gösterilmiştir. UTP ayrıca Schwann hücre-akson kontaklarında N-kaderin ekspresyonunu önler ve daha fazla göç eden farklılaşmamış fenotipi destekler. Tüm bu süreçlerin periferik sinir rejenerasyonundaki etkileri nedeniyle, sonuçları in vivo rejenerasyon işlemi boyunca UTP'nin Schwann hücresi üzerindeki potansiyel rolünün daha fazla araştırılmasının önemini vurgulamaktadır (27) (Resim-1).



Resim-1: UTP'nin kültürdeki SH davranışı üzerindeki etkilerine genel bakış: in vivo potansiyel alaka düzeyi. Ne dervne bir fenotip edinilmesi ne de SH'lerin proliferasyon hızı, izole SH'lerde in vitro olarak, UTP varlığında modüle edilmemiştir; yaralanmadan kısa bir süre sonra gerçekleşen iki önemli olay. SH'lerin kültürde göçü, hasardan sonra yaralı alandan SH'lerin göçünü teşvik etmekle ilgili olabilecek UTP ile artırılmıştır. UTP ayrıca akson kılavuzluğu ve SH redifferentasyonu için önemli bir süreç olan SH-akson teması sırasında N-kaderin geri kazanımını azaltmıştır. Yeniden farklılaştırma işlemindeki bu potansiyel etki, dbcAMP gibi farklılaşma sinyallerinin varlığında Krox-20 artışının UTP tarafından büyük ölçüde bozulduğu gözlemiyle de desteklenir. Ayrıca, UTP aksonal NRG1 sinyalini engelleyebilen ve SH yeniden dağıtım işleminin bozulmasına ve sonuç olarak miyelinsiyonun bozulmasına katkıda bulunabilen ErbB3 reseptörünün SHG'de NRG tarafından aktivasyonunu azaltmıştır (27).

Travmatik nöronal hasarlanma, iskemik serebral patolojilerde ve serebral ödemin patofizyolojisinde hücre membranı ve bunun en önemli yapıtaşı olan fosfolipitlerin önemi bilinmektedir (28). Bu nedenle membran fosfolipid sentezini arttıran bileşiklerin membranlarda koruyucu etkinlik gösterebileceği öngörülmektedir. Nitekim Kennedy yolağının hız kısıtlayıcı basamağında üretilen ve membran fosfolipid sentezinin bir prekürsörü olan CDP-kolin (Sitidin difostat-kolin)'in dışarıdan uygulanmasıyla geçici serebral iskemi ve travmaya sekonder hücre membran bütünlüğünün bozulduğu patolojilerde fosfotidilkolin ve sfingomiyelin sentezini attırdığı ve aynı

zamanda Fosfolipaz A2 inhibisyonu ile hasarın ilerlemesini engellediği bilinmektedir (29, 30).

Bu bilgilerle uyumlu olarak, sıçan sıyatik sinirinin primer kesi ve sütür modelinde sitikolin tedavisinin fonksiyonel geri kazanımı sağladığı, sinir rejenerasyonunu arttırdığı ve post-operatif skar dokusunu azalttığı önceki çalışmalarımızda gösterilmiştir (31-35). Bu modeldeki muhtemel etki mekanizmaları araştırıldığında, Sitikolin tedavisinin sinir dokusunda MMP-9 ve MMP-2 düzeylerini ve aktivitelerini azalttığı ve TIMP-1 ile TIMP-3 düzeylerini arttırdığı literatürde ilk kez gösterilmiştir (35).

Üridin, insanların kan dolaşımında ve anne sütünde bulunan majör pirimidin nkleozididir (36-38). Üridin aynı zamanda Kennedy yolağı aracılığıyla membran fosfolipid sentezinin bir prekürsörüdür ve bu yolağın hız kısıtlayıcı basamağında üretilen CDP-kolin sentezini in vitro ve in vivo koşullarda arttırdığı bilinmektedir (29, 39, 40).

Bu alışmamızda ise, bir n madde olarak CDP-kolin düzeylerini arttırdığı bilinen ve insan kan dolaşımının majör pirimidin nkleozidi olan üridin'in sistemik yolla verilmesi suretiyle deney hayvanlarında oluşturulan tek taraflı sıyatik sinir hasarında sinirin rejenerasyonu üzerine etkinliği araştırılmıştır.

MATERYAL VE METOD

Bu çalışma Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi (BUÜTF) Deney Hayvanları Yetiştirme, Uygulama ve Araştırma Merkezi (DEHYUAM), Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı ve Anatomi Anabilim Dalı laboratuvarlarında Eylül 2018- Ocak 2020 tarihleri arasında gerçekleştirildi.

BUÜTF Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (HADYEK)'nin onayını (2017-15/04) takiben sıçanlar BUÜTF DEHYUAM'dan temin edildi.

Çalışmamızda 96 adet ağırlıkları 220-350 gram arasındaki Sprague Dawley cinsi erkek sıçan kullanıldı. Tarafsız bir görevli tarafından rastgele seçilen sıçanlardan 4 farklı tedavi grubu aşağıda belirtilen şekilde oluşturuldu.

A) Sham Grubu: Siyatik sinir kesisi yapılmadan sadece cilt-ciltaltı insizyonu ile kapatılan ve %0,9 NaCl (salin) tedavisi verilen grup.

B) Kontrol Grubu: Siyatik sinir tam kat kesisi ve sütürasyonu uygulanan ve salin tedavisi verilen grup.

C) Üridin 100 Grubu: Siyatik sinir tam kat kesisi ve sütürasyonu uygulanan ve günlük 100 mg/kg üridin tedavisi verilen grup.

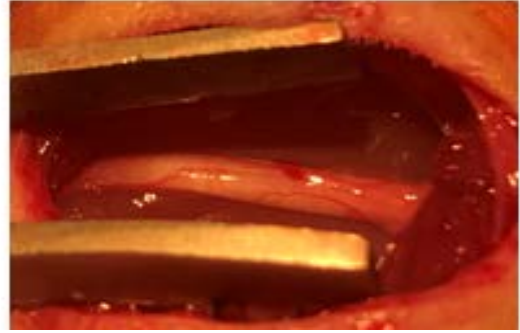
D) Üridin 500 Grubu: Siyatik sinir tam kat kesisi ve sütürasyonu uygulanan ve günlük 500 mg/kg üridin tedavisi verilen grup

Siyatik sinir kesisi yapılması:

Tüm sıçanlar Sevofluran (Sevorane®likid, Aesica Queenborough Ltd. Queenborough Kent MG11 5EL, İngiltere) anestezisi altında sol yan yatar pozisyonda ekstremiteleri operasyon masasına tespit edildiler. Sağ uyluk ve inguinal bölge altına yerleştirilmiş 1 cm kalınlığında rulo gazlı bez ile operasyon sahasına yükseklik kazandırıldı. Operasyon sahası önce %70 alkol ve sonra %10'luk povidone iyodine (Glividon®, Bikar İlaç San, İstanbul)

solüsyonu ile temizlendikten sonra girişim yapılacak saha açık kalacak şekilde sıçanların üzeri steril olarak örtüldü. Cerrahi girişimler, mikroskop (Zeiss Opmi, Carl Zeiss Meditec Inc. ABD) altında mikrocerrahi yöntemler kullanılarak yapıldı.

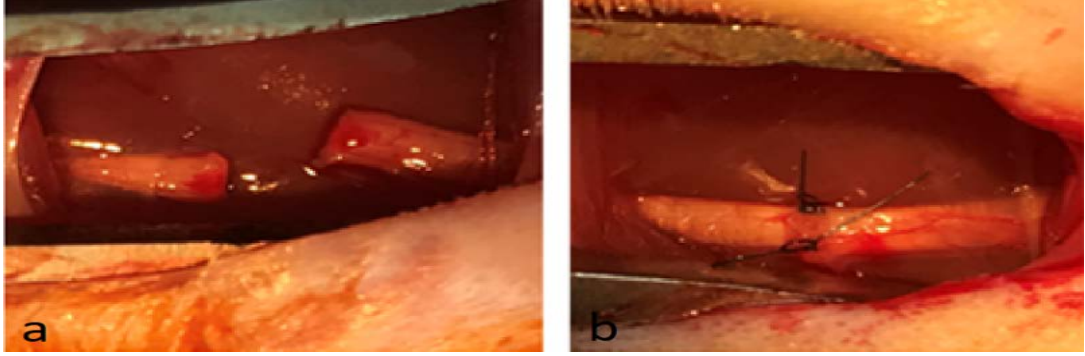
Tüm sıçanlarda sağ gluteal bölgeden uyluk posterioruna uzanan 3 cm uzunluğunda posterolateral cilt insizyonu yapıldı. M. biceps femoris ve m. gluteus superficialis bileşke hattı ve üzerini çevreleyen fasya künt diseksiyonla açılarak siyatik sinir ortaya konuldu. Siyatik sinir siyatik foramenden tibial ve peroneal dalların ayrıldığı noktaya kadar olan unifasiküler olduğu bölümde üzerindeki membranöz yapılar diseke edilerek çevre dokulardan izole edildi (Resim-2).



Resim-2: Sol yan yatar pozisyonda sağ gluteal bölgede insizyon sonrasında künt diseksiyonla açılarak siyatik sinir ortaya konuldu.

Takiben sham grubu hariç diğer gruplarda siyatik sinir foramenden 1 cm uzaklıkta kesinin düzgün ve üniform olabilmesi için altına metal bir disektör konularak dermatom bıçağı ile tam kat sinir kesisi yapıldı. Sham grubunda ise deneklerde aynı cerrahi işlemler ile siyatik sinir ortaya konuldu, ancak sinir kesisi yapılmadı. Kesisi yapılan diğer grup deneklerde epinöral sinir anastomoz tekniği kullanılarak mikrocerrahi yöntemle proksimal ve distal sinir güdükları 8-0 polypropylene suture ile (Prolene, Ethicon ©Ltd, Somerville NJ, ABD) aralarında 180° bulunan iki ayrı noktadan suture edildi ve primer anastomoz sağlandı. Anastomoz işlemleri sırasında gerginlik oluşturulmamasına dikkat edildi. Künt diseksiyon ile aralanan fasya ve kas dokusuna uygulanan traksiyon serbestleştirildiğinde spontan olarak siyatik sinirin üzerini kapattığı için suture edilmedi. Cilt 5-0 polypropylene (Prolene,

Ethicon ®Ltd, Somerville NJ, ABD) sütür ile sütür edilerek kapatıldı (Resim-3).



Resim-3: a) Siyatik sinir foramenden 1 cm uzaklıkta dermatom bıçağı ile tam kat kesisi yapıldı. b) Epinöral sinir anastomoz tekniği kullanılarak mikrocerrahi yöntemle proksimal ve distal sinir gdkleri 8-0 polypropylene sütür ile aralarında 180° bulunan iki ayrı noktadan sütüre edildi.

Deney grupları:

A. Erken dönem gruplar:

1. Erken Dönem Sham Grubu (n:8): Anestezi altında sağ siyatik sinir diseke edildi ancak kesilmedi. Takiben deneklere 1 hafta boyunca 1 ml/kg salin (%0,9 NaCl) intraperitoneal yolla günde bir kez enjekte edildi.
2. Erken Dönem Kontrol Grubu (n:8): Anestezi altında sağ siyatik sinir tam kat kesisi ve epinöral teknikle primer sinir anastomozu sonrası cilt kapatılmasını takiben deneklere 1 hafta boyunca 1 ml/kg salin (%0,9 NaCl) intraperitoneal yolla günde bir kez enjekte edildi.
3. Erken Dönem ridin 100 Grubu (n:8): Anestezi altında sağ siyatik sinir tam kat kesisi ve epinöral teknikle primer sinir anastomozu sonrası cilt kapatılmasını takiben deneklere 1 hafta boyunca 100mg/kg üridin intraperitoneal yolla günde bir kez enjekte edildi.
4. Erken Dönem ridin 500 Grubu (n:8): Anestezi altında sağ siyatik sinir tam kat kesisi ve epinöral teknikle primer sinir anastomozu sonrası cilt

kapatılmasını takiben deneklere 1 hafta boyunca 500mg/kg üridin intraperitoneal yolla günde bir kez enjekte edildi.

B. Geç dönem gruplar

1. Geç Dönem Sham Grubu (n:16): Anestezi altında sağ siyatik sinir diseke edildi ancak kesilmedi. Takiben deneklere 1 hafta boyunca 1 ml/kg salin (%0,9 NaCl) intraperitoneal yolla günde bir kez enjekte edildi.
2. Geç Dönem Kontrol Grubu (n:16): Anestezi altında sağ siyatik sinir tam kat kesisi ve epinöral teknikle primer sinir anastomozu sonrası cilt kapatılmasını takiben deneklere 1 hafta boyunca 1 ml/kg salin (%0,9 NaCl) intraperitoneal yolla günde bir kez enjekte edildi.
3. Geç Dönem Üridin 100 Grubu (n:16): Anestezi altında sağ siyatik sinir tam kat kesisi ve epinöral teknikle primer sinir anastomozu sonrası cilt kapatılmasını takiben deneklere 1 hafta boyunca 100 mg/kg üridin intraperitoneal yolla günde bir kez enjekte edildi.
4. Geç Dönem Üridin 500 Grubu (n:16): Anestezi altında sağ siyatik sinir tam kat kesisi ve epinöral teknikle primer sinir anastomozu sonrası cilt kapatılmasını takiben deneklere 1 hafta boyunca 500 mg/kg üridin intraperitoneal yolla günde bir kez enjekte edildi.

Cerrahi ve enjeksiyonlar sonrası tüm sıçanların spontan olarak uyanmaları beklendi ve takiben kafeslerine bırakıldı. Her bir kafese 4 adet sıçan olacak şekilde numaralandırıldı. Cerrahi işlem sonrasında tüm sıçanlar standart sıçan yemi ve su ile beslendi, mobilize olmalarına izin verildi.

Erken dönem gruplar biyokimyasal ve moleküler biyolojik parametrelerin analiz edilmesi amacıyla 7 günlük tedaviyi takiben anestezi altında sakrifiye edildi. Siyatik sinir örneklerinde değişimleri erken dönemde saptanabilen apoptotik belirteç ve biyokimyasal parametreleri (lipid peroksidasyonu ve reaktif oksijen türevleri) incelemek amacıyla, siyatik sinirler tamir edilen segmentini içerecek şekilde enblok olarak çıkarıldı ve

-80°C derecede saklanmak üzere alüminyum folyo içinde soğutucuya yerleştirildi.

Geç dönem gruplar cerrahi işlemleri takiben motor fonksiyonel ve elektrofizyolojik analizler için 12. haftaya kadar takip edildiler. Geç dönem sıçanlar farklı analizlerin yapılabilmesi amacıyla Geç-A ve Geç-B grupları olarak 2 alt gruba ayrıldı. Geç-A grubu sıçanlarda 6. ve 12. haftada her gruptan 8'er sıçana motor fonksiyonel ve elektrofizyolojik testler uygulandı. Bu grupta sakrifiye edilmeden önce (12. haftada) sevofloran anestezisi altında sıçanların eski cilt insizyonları açılarak siyatik sinirleri tamir edilen segmentini içerecek şekilde enblok olarak çıkarıldı ve -80°C derecede saklanmak üzere alüminyum folyo içinde soğutucuya yerleştirildi.

Geç dönem gruplardaki deneklerin diğer yarısını oluşturan 8'er sıçan (Geç-B grubu) sevofloran anestezisi altında eski cilt insizyonları açılarak künt diseksiyonla siyatik sinirleri ortaya çıkarıldı. Takiben direkt fiksasyon amacıyla 3 kez 10'ar dakika süreyle siyatik sinirin proksimal ve distal kısımlarını kapsayacak şekilde 2-3 ml paraformaldehit (0,1 M Fosfat tampon içerisinde %4'lük paraformaldehit, pH: 7,4) uygulandı. Fiksasyon sonrası siyatik sinirin distal kısmı daha uzun olacak şekilde çıkarıldı ve paraformaldehit ile dolu cam şişelere konuldu.

Değerlendirme:

A. Erken dönem mekanizmaya yönelik çalışmalar

A1. Apoptozis değerlendirmesi:

Siyatik sinirde Üridin'in apoptotik süreçlere etkisi Western Blot yönteminde Caspase-3 proteininin analizi ile yapıldı. Western Blot analizleri için siyatik sinir örnekleri homojenize edildi. Total protein içeriği Lowry yöntemine (41) göre tayin edilen homojenatlar Laemmi tamponu (42) ile 5 dakika kaynatıldı. Daha sonra eşit miktarda protein içeren homojenatlar

sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezinde (SDS-PAGE; Mini Protean II, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) elektroforetik olarak yürütülüp poliviniliden florid (PVDF) membranlara (Millipore, Billerica, MA, USA) aktarıldı. Membranların %5 süt tozu çözeltisi ile bloke edilmesini takiben spesifik anti-Caspase-3 birinci antikoruyla (1: 1000, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) gece boyunca inkübe edildi. Ertesi gün TBST (tris buffered saline with tween 20) tamponuyla yıkanan membranlar uygun ikinci antikorla (1: 1000, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) 1 saat inkübe edildikten sonra kemiluminesans deteksiyon kitiyle (Millipore, Billerica, MA, USA) muamele edildi. Protein bantları dijital bir tarayıcıda (CDigit, LI-COR Biotechnology, Lincoln, NE, USA) okutularak Kaspaz-3 proteininin optik dansiteleri sayısal değere dönüştürüldü. Kaspaz-3 düzeyleri tayin edildikten sonra membranlar temizleme tamponu (Thermo Fisher Scientific, Rockford IL, USA) ile yıkanarak aktin antikoru (Millipore, Temecula, CA, USA) ile yeniden muamele edildi ve üstteki süreç tekrarlandı.

A2.Biyokimyasal değerlendirme:

Çalışmamızda oksidasyon hasarı ve antioksidatif savunma mekanizmaları biyokimyasal olarak incelendi. Bu amaçla ticari ELISA kitleri (YL Biotech, Shangai, PRC) kullanılarak sinir dokusu homojenatlarında süperoksid dismutaz (SOD), miyeloperoksidaz (MPO), glutatyon peroksidaz (GPx), malondialdehid (MDA) ve katalaz (CAT) düzeyleri ölçüldü. Ölçümler kit prosedürlerine bağlı kalınarak spektrofotometrik (mQuant, Biotek, Winooski, VT) olarak gerçekleştirildi.

B. Geç dönem davranışsal çalışmalar ve mekanizmaya yönelik diğer değerlendirmeler

B1. Fonksiyonel değerlendirme:

Fonksiyonel değerlendirme, siyatik fonksiyon indeksi (SFI) testi ile Geç-A grubu sıçanlarda yapıldı. SFI testine daha iyi motive olmaları amacıyla Geç-A grubundaki sıçanlar bir gece önceden aç bırakıldılar. Ertesi gün her iki arka ayakları mürekkebe batırıldıktan sonra 144x10x10 cm boyutlarında oluşturulmuş bir yürüme koridorunda bitiş noktasına yem konularak

yürütüldüler. Yürüme işlemi en iyi bası uzunluğu ve parmak arası mesafeler görülene dek birkaç defa tekrarlandı. SFI testi cerrahi işlemi takiben 6 ve 12. haftalarda yapıldı. Sonuçlar SFI testi formülü kullanılarak hesaplandı (43).

B2. Elektrofizyolojik değerlendirme:

Elektrofizyolojik değerlendirme, elektromyografi (EMG) ile Geç-A grubu sıçanlarda yapıldı. Tüm EMG kayıtları Bursa Uludağ Üniversitesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Laboratuvarlarında Sinir İleti Hızı Ölçüm Seti (MP36, BIOPAC Systems, CA, USA) ile gerçekleştirildi.

Cerrahi takiben 6 ve 12. haftalarda, SFI testinin hemen ardından, Geç-A grubundaki tüm sıçanlar Sevofluran (Sevorane ®likid, Aesica Queenborough Ltd. Queenborough Kent ME II SEL, İngiltere) anestezisi altında prone pozisyonda masaya yatırıldı. Sıçanların ekstremiteleri serbest bırakılırken kuyrukları flaster yardımıyla gevşek bir şekilde EMG uygulanacak masaya fikse edildi ve sırtları traş edildi. Sırtta spina iliaca'ları birleştiren çizginin kranial tarafına ve 2 cm distaline keçeli kalem ile birer çizgi çekildi ve sinir uyarıları traşlı cilt üzerine konan yüzey uyarıcı (surface stimulator) aracılığıyla bu çizgiler üzerinden yapıldı. Uyarıcı cup elektrodun anod ve katod elektrodları medulla spinalis ortalanmak suretiyle ve her uygulamada aynı tarafa kondu. Kayıtlar gastroknemius kasından alındı. Aktif kayıtlayıcı elektrod olarak kullanılan iğne elektrod m. gastroknemius karıncığının üzerine, referans iğne elektrod gastrokinemius kasının tendonuna ve toprak elektrod olarak kullanılan iğne elektrod abdomene yerleştirildi. Uyarılar 1 msn'lik sürelerle 30 mV'luk sabit şiddette verildi. Klinik olarak plantar fleksiyonun gözlendiği konumda EMG'de en iyi 3 cevap 10 ms boyunca kaydedildi ve sonuçlar bu 3 cevabın ortalaması olarak verildi. Cevabın izoelektrik hattan elektronegatif olarak başlamasına ve artefaktın az olmasına dikkat edildi. İki cm'lik sabit aralıklı iki farklı konumdan yapılan elektriksel uyarılar sonucu kaydedici elektrodan elde edilen bileşik kas aksiyon potansiyellerinin amplitüd süresi ve latansı kaydedilerek sinir ileti hızları hesaplandı.

B3. Makroskopik değerlendirme:

Geç-B grubundaki sıçanlar ise postoperatif 12. haftada makroskopik, histomorfolojik değerlendirme için kullanıldı. Bu 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 sıçanlar sevofloran anestezisi altında 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. (44), tarafından tarif edilen numerik grade'leme şeması kullanılarak kantitatif skorlara dönüştürüldü (Tablo-1).

Tablo-1: Petersen ve ark tarafından tanımlanan Makroskopik Değerlendirme İçin sayısal değerlendirme şeması

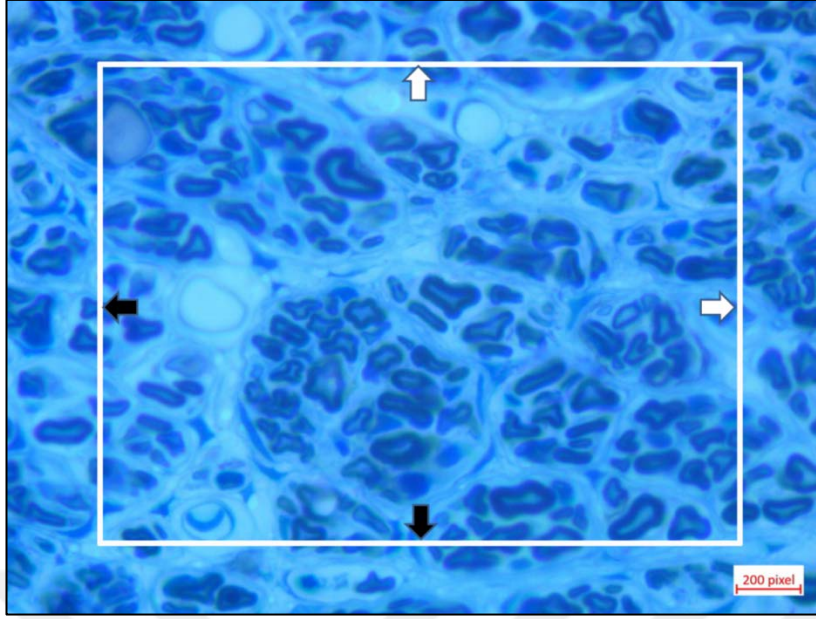
Doku	Grade	Tanımlama
Cilt ve adele fasyası	1	Tamamen Kapanmış
	2	Kısmen Açık
	3	Tamamen açık
Sinir yapışıklığı ve ayrılabilirliği	1	Diseksiyon yok veya hafif künt diseksiyon
	2	Biraz kuvvetli künt diseksiyon
	3	Keskin diseksiyon

B4. Histomorfolojik değerlendirme:

Geç-B grubu sıçanların siyatik sinir dokularında histomorfolojik değerlendirme Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Anatomi laboratuvarında gerçekleştirildi.

Siyatik sinir dokularının (0,5-1 cm) tespiti anastomoz alanını da içerek ve distal bölüm işaretli olarak 0,1 mol/L fosfat tamponu ve %4 gluteraldehit

(pH: 7,4) içerisinde devam edildi. Gece boyu süren tespit sonrasında 0,1 mol/L fosfat tamponu içerisindeki %1 osmium tetroxide (OsO_4) ile 2 saat boyunca postfikse edildi. Takiben artan yüzdelerdeki alkol serileri içerisinde dehidrate işlemi ve sonrasında da propilen oksit ile muamele edildi. Polimerizasyon için Spur's resin (Agar Scientific) içerisine gömülerek ve kodlanarak 70C° de bir gece süresince etüve alındı (Nüve, EN-400). Resin bloklardan $0,5\ \mu\text{m}$ kalınlığında transvers yarı ince kesitler ultramikrotom kullanılarak alındı. Lam üzerine her lamda 3 kesit örneği olacak şekilde %1 toludin mavisi - %1 boraks karışımı ile boyandı. Lam üzerine alınan kesitler arasında ikişer kesit atlanarak alındı ve her örneğin farklı kesit düzeylerinden olması sağlandı. Kesitler üzerinden rastgele örnekleme ile Zeiss Primo Star ışık mikroskop sistemi ve Zeiss Labscope yazılımı kullanılarak, 5 megapixel çözünürlükte görüntüler elde edildi. $100\ \times$ büyütme ile alınan görüntüler BMP görüntü formatına çevrildi. Görüntüsel analizler için Scion Image (versiyon 4.0.3.2) yazılımı ve masaüstü bilgisayar kullanıldı. Sayım, ölçüm ve analizler öncesinde mikroskop sistemi ve yakalanan görüntülerin kalibrasyonu yapıldı. Kalibrasyon için Olympus mikrometrik lam kullanıldı. Scion Image yazılımı kullanım için her açıldığında kalibrasyon işlemi tekrarlandı. Yazılım üzerinde makrolar kullanılarak önce bir sayım çerçevesi ($80 \times 60\ \mu\text{m}$, $4800\ \mu\text{m}^2$) belirlendi. Sayım çerçevesi her görüntü üzerine süperimpoze edildikten sonra miyelinli aksonlar sayıldı. Akson sayımında üst ve sağ kenara değen aksonlar ve sayım çerçevesi içerisinde kalan aksonlar sayılırken sol ve alt kenara değen aksonlar ve çerçeve dışındakiler sayılmadı (Resim-4). Akson sayımı ile birlikte görüntülerdeki miyelinli aksonların sınırları çizilerek alanları, çevre uzunlukları, kısa ve uzun çapları hesaplandı. Her slatta, kısa ve uzun çaplar üzerinden sayım çerçevesi içerisinde kalan en az 10 aksonun bu şekilde ortalama çapı hesaplandı. Elde edilen verilerden ölçüm alanında sayılan akson sayısı, milimetre karedeki akson sayısı ve ortalama akson çapları elde edildi (32, 34).



Resim- 4: Yazılım üzerinde akson sayımından önce oluşturulan sayım çerçevesi (Beyaz oklar sayıma dahil edilen kenarlar, siyah oklar sayıma dahil edilmeyen kenarlar)

İstatistiksel Analiz:

Erken ve geç sham grubu(n:16), Erken ve geç kontrol grubu (n:16), Erken ve geç U100 grubu (n:16) ve Erken ve geç U500 gruplarından elde edilen biyokimyasal, fonksiyonel ve elektrofizyolojik değerlendirme skorları gruplar arası karşılaştırmalar için Tek Yönlü Varyans Analizi'ni (ANOVA) takiben gruplar arasındaki sonuçların analizinde post-hoc Tukey testi kullanıldı. Makroskopik ve anatomik analizler ile Kruskal-Wallis ve Mann-Whitney U testiyle değerlendirildi. Tüm karşılaştırmalarda $p < 0,05$ sonucu anlamlı olarak kabul edildi.

BULGULAR

Cerrahi girişim sonuçları:

12 haftalık süreç içerisinde, geç dönem kontrol gruptan 1 sıçan 4. haftada ve 1 sıçan 8. Haftada; geç dönem U100 gruptan 1 sıçan 4. haftada ve U500 gruptan 1 sıçan 9. haftada kafeslerinde ölü olarak bulundu. Diğer hayvanlar deney süreci boyunca yaşamaya devam ettiler.

12 haftalık süre içerisinde, nöropatik ağrıya bağlı sadece 1 hayvanda sağ ayak parmaklarda ülsere yaralar oluştu ve self amputasyon görüldü. Bu sıçanda parmak kayıplarının yürüme yolu analizlerini etkileyeceği düşünülerek, yürüme yolu testine ve sonuçlara dahil edilmedi (Resim-5).

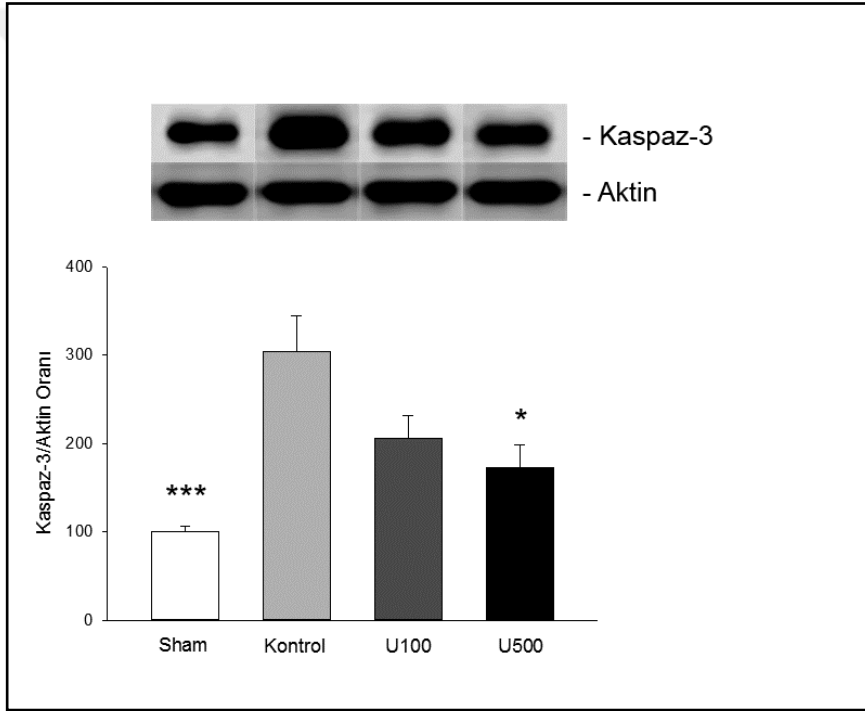


Resim-5: Self amputasyona bağlı 3,4,5 parmakta amputasyon

Erken dönem apoptozis değerlendirme sonuçları:

Tek taraflı siyatik sinir tam kat kesi ve suture hasarını takiben 7 gün boyunca günde tek doz intraperitoneal yolla verilen üridin 100 mg/kg (U100) veya 500 mg/kg (U500) tedavisinin hasardan sonraki 7. günde apoptotik

değişimlere etkisi Western Blot yöntemi ile aktif Kaspaz-3 düzeylerinin analiz edilmesi suretiyle belirlenmiştir. Sonuçlar aktif Kaspaz-3 protein bantlarının optik dansitelerinin Aktin bantlarının optik dansitelerine orantılanması ile elde edilmiştir. Sham grubunda elde edilen değerlerin ortalaması 100'e sabitlenmesi suretiyle diğer gruplardaki değerler yüzde değişim olarak bildirilmiştir. Veriler ortalama±standart hata olarak sunulmuştur. İstatistiksel analizler Tek Yönlü ANOVA'yı takiben post-hoc Tukey testi ile yapılmıştır. Kontrol grubuna göre kıyaslandığında * $p < 0,05$, ve *** $p < 0,001$ olarak belirtilmiştir (Şekil-1).



Şekil-1: Tek taraflı siyatik sinir tam kat kesi ve sutür hasarında aktif-Kaspaz-3 analizi ile belirlenen apoptotik değişimler ve üridin tedavisinin bu apoptoza etkisi

Tek taraflı siyatik sinir tam kat kesi ve sutür hasarını takiben 7 gün boyunca günde tek doz intraperitoneal yolla verilen üridin 100 mg/kg (U100) veya 500 mg/kg (U500) tedavisinin hasardan sonraki 7. günde apoptotik değişimlere etkisi Western Blot yöntemi ile aktif Kaspaz-3 düzeylerinin analiz edilmesi suretiyle belirlenmiştir. Sonuçlar aktif Kaspaz-3 protein bantlarının optik dansitelerinin Aktin bantlarının optik dansitelerine orantılanması ile elde edilmiştir. Sham grubunda elde edilen değerlerin ortalaması 100'e sabitlenmesi suretiyle diğer gruplardaki değerler yüzde değişim olarak bildirilmiştir. Veriler ortalama±standart hata olarak sunulmuştur. İstatistiksel analizler Tek Yönlü ANOVA'yı takiben post-hoc Tukey testi ile yapılmıştır. Kontrol grubuna göre kıyaslandığında * $p < 0,05$, ve *** $p < 0,001$ olarak belirtilmiştir.

Erken dönemdeki siyatik sinirden elde edilen örneklerde kaspaz-3/aktin oranı Üridin 100 mg/kg ve Üridin 500 mg/kg grubunda kontrol grubuna göre daha düşük düzeylerde tespit edildi ancak sadece yüksek doz Üridin (500 mg/kg) ile tedavisi alan sıçanlarda antiapoptoz etkisi açısından istatistiksel olarak anlamlı görüldü.

Erken dönem oksidasyon parametrelerine etkisi sonuçları:

Tek taraflı siyatik sinir tam kat kesi ve sütür hasarını takiben 7 gün boyunca günde tek doz intraperitoneal yolla verilen Üridin 100 mg/kg (U100) veya 500 mg/kg (U500) tedavisinin hasardan sonraki 7. günde oksidasyon parametrelerine etkisi ELISA yöntemi ile belirlenmiştir ve süperoksid dismutaz (SOD), miyeloperoksidaz (MPO), glutatyon peroksidaz (GPx), malondialdehid (MDA) ve katalaz (CAT) düzeyleri ölçüldü. Veriler ortalama±standart hata olarak sunulmuştur (Tablo-2).

Tablo-2: Erken dönem tek taraflı siyatik sinir tam kat kesi ve sütür hasarında oksidasyon parametrelerindeki değişimler ve üridin tedavisinin bu parametrelere etkisi

	Sham	Kontrol	U100	U500
MPO (ng/ml)	9,9±0,2***,αα	12,3±0,3	11,6±0,3	10,1±0,3***,α
MDA(nmol/ml)	0,68±0,02***,αα	0,93±0,03	0,82±0,02*	0,72±0,01***,α
SOD (ng/ml)	1,85±0,03***,αα	1,45±0,04	1,60±0,04	1,78±0,04***,α
GPx (ng/ml)	14,6±0,3***,αα	11,5±0,1	12,6±0,5	13,4±0,2**
CAT (ng/ml)	18,5±0,2***,αα	14,4±0,6	16,2±0,4*	17,5±0,3***

İstatistiksel analizler Tek Yönlü ANOVA'yı takiben post-hoc Tukey testi ile yapılmıştır. Kontrol grubuna göre kıyaslandığında *p<0,05, **p<0,01 ve ***p<0,001 ve U100 grubuna göre kıyaslandığında αp<0,05 ve ααp<0,01 olarak belirtilmiştir. Miyeloperoksidaz (MPO), Malondialdehid (MDA) Süperoksid Dismutaz (SOD), Glutatyon Peroksidaz (GPx) ve Katalaz (CAT).

Siyatik sinirden elde edilen erken dönem örneklerinde; Miyeloperoksidaz (MPO) miktarı kontrol grubunda en yüksek, sham grubunda en düşük düzeylerde tespit edildi. Siyatik sinir hasarını takiben U100 uygulanan grupta MPO düzeyleri kontrol gruba göre azalırken anlamlı istatistiksel fark saptanmadı. Siyatik sinir hasarını takiben U500 uygulanan

grupta MPO düzeyleri kontrol ve U100 gruplarına göre anlamlı derecede azalmış olarak tespit edildi. Siyatik sinirden elde edilen erken dönem örneklerinde; Malondialdehid (MDA) miktarı kontrol grubunda en yüksek, sham grubunda en düşük düzeylerde tespit edildi. Siyatik sinir hasarını takiben U100 ve U500 uygulanan gruplarda MDA düzeyleri kontrol gruba göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalmıştı. Ayrıca MDA düzeyleri açısından U500 ve U100 grupları arasında anlamlı fark mevcuttu.

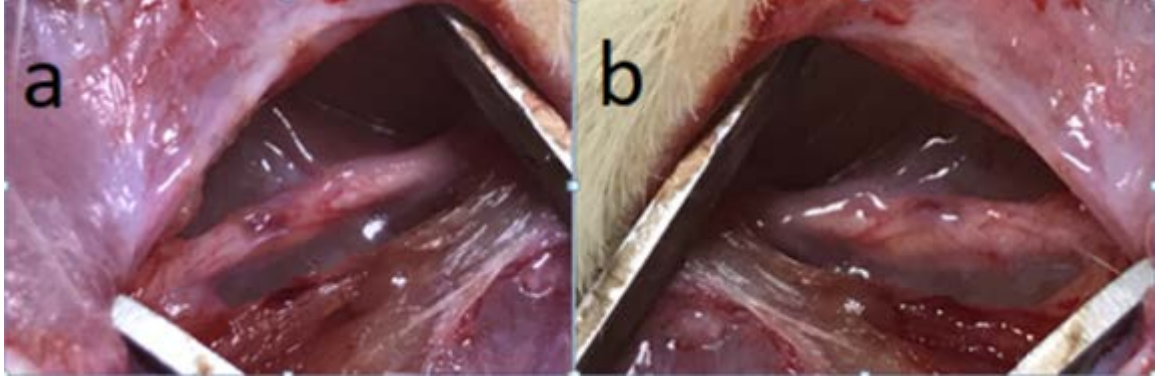
Erken dönem örneklerinde; Süperoksit Dismutaz (SOD) miktarı kontrol grubunda en düşük, sham grubunda en yüksek düzeylerde tespit edildi. Siyatik sinir hasarını takiben U100 uygulanan grupta SOD düzeyleri kontrol gruba göre artarken anlamlı istatistiksel fark saptanmadı. Siyatik sinir hasarını takiben U500 uygulanan grupta SOD düzeyleri kontrol ve U100 gruplarına göre anlamlı derecede artmış olarak tespit edildi. Erken dönem örneklerinde; Glutatyon Peroksidaz (GPx) miktarı kontrol grubunda en düşük, sham grubunda en yüksek düzeylerde tespit edildi. Siyatik sinir hasarını takiben U100 uygulanan grupta GPx düzeyleri kontrol grubuna göre artarken anlamlı istatistiksel fark saptanmadı. Siyatik sinir hasarını takiben U500 uygulanan grupta GPx düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı derecede artarken, U100 grubuna göre anlamlı fark saptanmadı. Erken dönem örneklerinde; Katalaz (CAT) miktarı kontrol grubunda en düşük, sham grubunda en yüksek düzeylerde tespit edildi. Siyatik sinir hasarını takiben U100 ve U500 uygulanan gruplarda CAT düzeyleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artış görüldü. U100 ve U500 gruplarında CAT düzeyleri açısından anlamlı fark saptanmadı.

Geç dönem makroskopik değerlendirme bulguları:

Tüm geç dönemdeki sıçanlarda 12 hafta sonunda yapılan değerlendirmede cilt ve adele fasyasının tamamen kapandığı ve insizyon hattında enfeksiyon veya enflamatuvar bulgu olmadığı görüldü. Takiben hayvanların tamamen kapanmış olan insizyon hattı yeniden açılarak makroskopik değerlendirildi. Değerlendirme, Petersen ve ark. (44), tarafından tanımlanan numerik değerlendirme skalasına göre yapıldı.

12. hafta sonunda cilt ve adele fasyası kapanması açısından 4 grup ortalama ve standart hata değerleri verilmiştir. 4 grup arasında Kruskal Wallis testi ile yapılan istatistik analizde anlamlı farklılık saptanmamıştır ($p>0.05$).

12. hafta sonunda sinir yapışıklığı ve ayrılabilirliği açısından Kruskal Wallis testi ile yapılan analiz ile gruplar arasında anlamlı farklılık saptandı. Mann-Whitney U Test ile yapılan analizlerde kontrol grup; sham grup ve U500 gruplarına göre anlamlı farklılık görüldü [Sham grup ve Kontrol grup arasındaki p value=0.004; kontrol grup ve U500 grup arasındaki p value=0.002 olarak saptandı ($p<0.05$)]. Sonuç olarak Üridin 500 mg/kg ile 1 hafta intraperitoneal tedavi edilen sıçanlarda, SF ile 1 hafta intraperitoneal enjeksiyon yapılan kontrol gruba göre sinir yapışıklığı ve ayrılabilirliği açısından anlamlı olarak daha iyi sonuçlar elde edildi. Ancak U100 grubunda ve kontrol grup arasında anlamlı fark saptanmadı ($p>0.05$) (Resim-6) (Tablo-3).



Resim 6: a) Cerrahi sahada gelişen ince konnektif doku (Üridin 500 grub) **b)** Cerrahi sahada gelişen kalın konnektif doku (Kontrol grup) x4

Tablo-3: Sinir ayrılabilirliği ve yapışıklığı ortalama ve standart sapma değerleri

Grup	Sıçan sayısı	Ortalama	Standart Sapma	Minimum	Maksimum
Sham	16	1.62	0.500	1	2
Kontrol	14	2.36	0.497	2	3
Uridin 100 mg/kg	15	2.00	0.535	1	3
Uridin 500 mg/kg	15	1.53	0.516	1	2

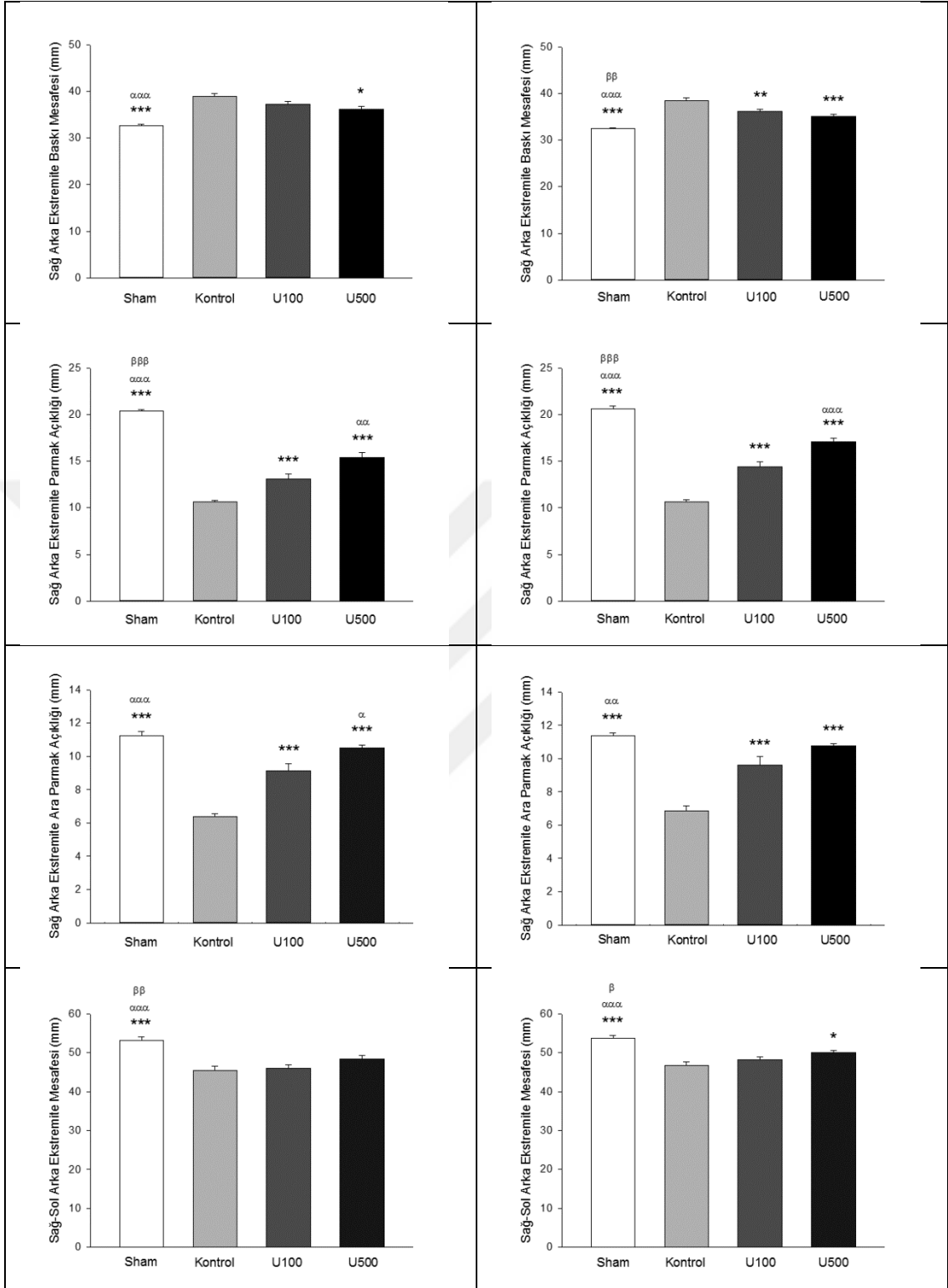
Geç dönem Fonksiyonel değerlendirme bulguları:

Tek taraflı siyatik sinir tam kat kesi ve sütür hasarını takiben 7 gün boyunca günde tek doz intraperitoneal yolla verilen üridin 100 mg/kg (U100) veya 500 mg/kg (U500) tedavisinin hasardan sonraki 6. hafta ve 12. haftada siyatik fonksiyon indeksine (SFI) etkisi yürüme testleri sonuçlarına dayanarak analiz edilmiştir. Yürüme testindeki parametreler aşaşıdaki gibi analiz edilmiştir (45) (Resim-7).



Resim-7: Yürüme testindeki parametrelerin analizi. SFI (Sciatic Funtional Index):Siyatik Sinir Fonsiyon İndeksi, E (Experimental): Deneysel, N(Normal): Normal, Print length (PL): Sağ arka ekstremite baskı mesafesi, Toe Spread (TS): Sağ arka ekstremite parmak açıklığı, Intermediate Toe Spread (ITS): Sağ arka ekstremite ara parmak açıklığı, Distance to other foot (TOF): Sağ-sol arka ekstremite mesafesi olarak değerlendirildi.

Yürüme testinin sonuçları şekil-2'de bildirilmiştir.

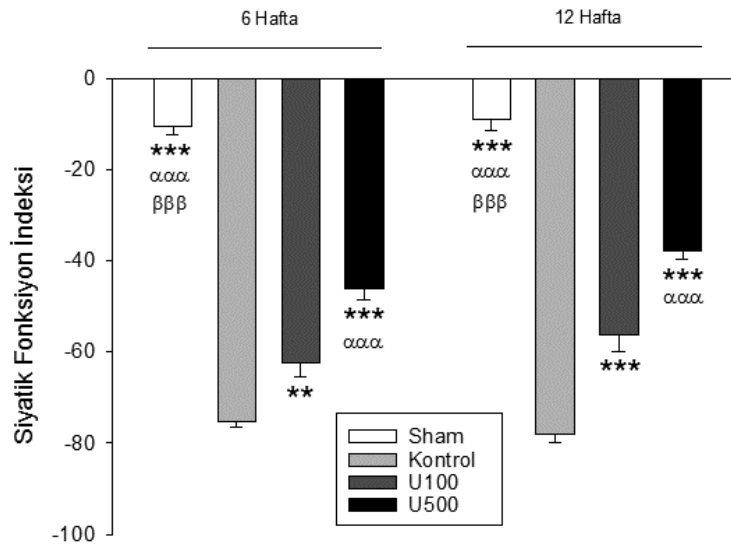


Şekil-2: Yürüme testi sonuçları. Tek taraflı siyatik sinir tam kat kesi ve sütür hasarını takiben 7 gün boyunca günde tek doz intraperitoneal yolla verilen üridin 100 mg/kg (U100) veya 500 mg/kg (U500) tedavisinin hasardan sonraki 6. haftada (sol sütun) ve 12. haftada (sağ sütun) siyatik fonksiyonlara etkisinin yürüme testi kullanılarak analizi yapılmıştır. Veriler ortalama±standart hata olarak sunulmuştur. İstatistiksel analizler Tek Yönlü ANOVA'yı takiben post-hoc Tukey testi ile yapılmıştır. Kontrol grubuna göre kıyaslandığında * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ ve *** $p < 0,001$; U100 grubuna göre kıyaslandığında ^{aa} $p < 0,01$ ve ^{aaa} $p < 0,001$; ve U500 grubuna göre kıyaslandığında ^b $p < 0,05$, ^{bb} $p < 0,01$ ve ^{bbb} $p < 0,001$ olarak belirtilmiştir.

Yürüme testinin sonuçlarına göre SFI analizi Bain ve ark. (46,47), hesaplama yöntemine göre yapılmıştır.

$$SFI = -38.3 \times \frac{EPL - NPL}{NPL} + 109.5 \times \frac{ETS - NTS}{NTS} + 13.3 \times \frac{EIT - NIT}{NIT} - 8.8$$

SFI sıfır değeri normal, -100 değeri total kayıp iken, -11 ve +11 arasındaki değerler normal olarak değerlendirildi (46). SFI sonuçları Şekil-3'te bildirilmiştir.

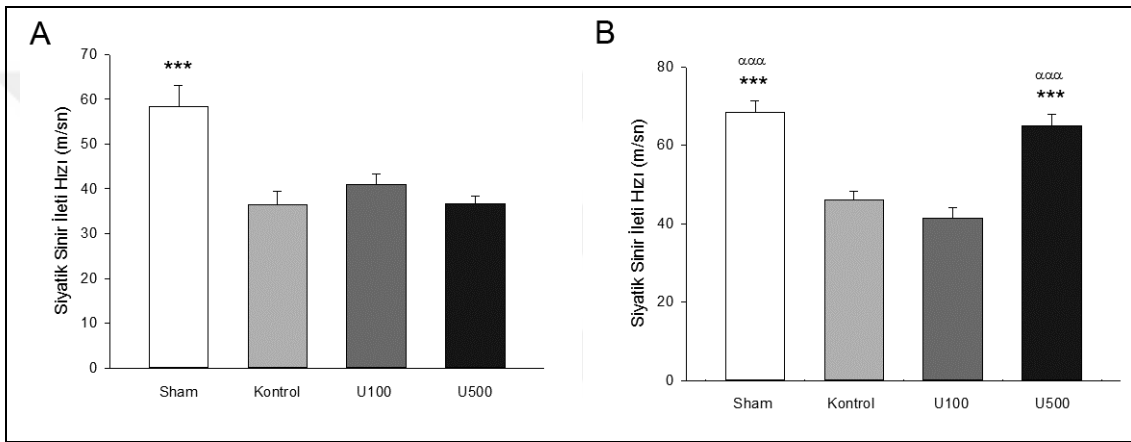


Şekil-3: SFI sonuçları. Tek taraflı siyatik sinir tam kat kesi ve sutür hasarını takiben 7 gün boyunca günde tek doz intraperitoneal yolla verilen üridin 100 mg/kg (U100) veya 500 mg/kg (U500) tedavisinin hasardan sonraki 6. hafta ve 12. haftada siyatik fonksiyon indeksine (SFI) etkisi yürüme testleri sonuçlarına dayanarak analiz edilmiştir. Veriler ortalama±standart hata olarak sunulmuştur. İstatistiksel analizler Tek Yönlü ANOVA'yı takiben post-hoc Tukey testi ile yapılmıştır. Kontrol grubuna göre kıyaslandığında **p<0,01 ve ***p<0,001; U100 grubuna göre kıyaslandığında ^{aaa}p<0,001; ve U500 grubuna göre kıyaslandığında ^{bbb}p<0,001 olarak belirtilmiştir.

Sonuç olarak 6. ve 12. haftadaki yürüme testi ve SFI sonuçlarında U100 ve U500 gruplarında kontrol grubuna göre belirgin iyileşme saptandı. Ayrıca U500 ve U100 grup arasındaki yapılan karşılaştırmada hem 6. ve hem 12 haftada SFI açısından anlamlı fark görüldü.

Geç dönem Elektrofizyolojik (EMG) değerlendirme bulguları:

Tek taraflı siyatik sinir tam kat kesi ve suture hasarını takiben 7 gün boyunca günde tek doz intraperitoneal yolla verilen Üridin 100 mg/kg (U100) veya 500 mg/kg (U500) tedavisinin hasardan sonraki (A) 6. hafta ve (B) 12. haftadaki siyatik sinir ileti hızına etkisi elektromiyografi (EMG) kaydı yapılarak analiz edilmiştir (Şekil-4).

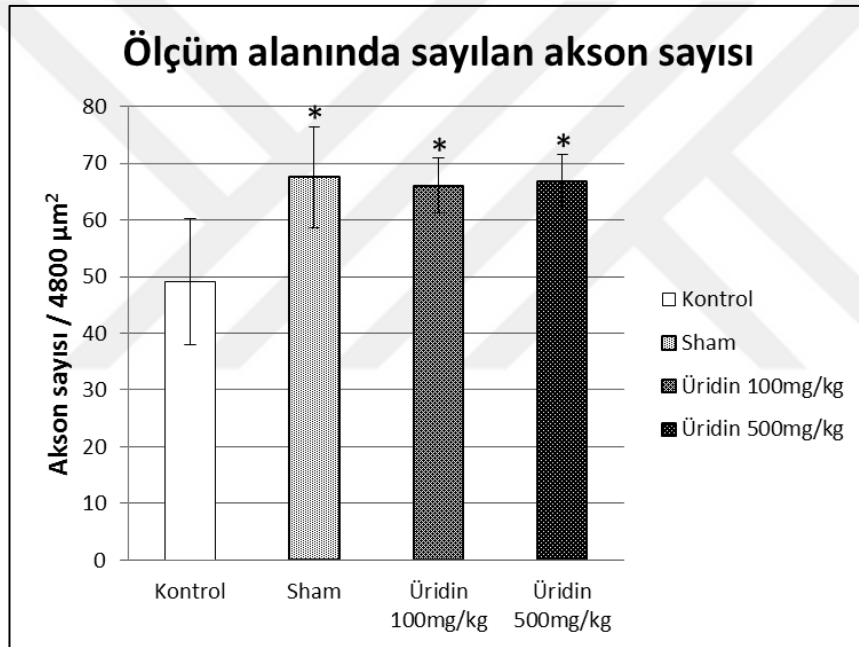


Şekil-4: EMG kayıtlarının analizi. Tek taraflı siyatik sinir tam kat kesi ve suture hasarını takiben 7 gün boyunca günde tek doz intraperitoneal yolla verilen üridin 100 mg/kg (U100) veya 500 mg/kg (U500) tedavisinin hasardan sonraki (A) 6. hafta ve (B) 12. haftadaki siyatik sinir ileti hızına etkisi elektromiyografi (EMG) kaydı yapılarak analiz edilmiştir. Veriler ortalama±standart hata olarak sunulmuştur. İstatistiksel analizler Tek Yönlü ANOVA'yı takiben post-hoc Tukey testi ile yapılmıştır. Kontrol grubuna göre kıyaslandığında $***p<0,001$ ve U100 grubuna göre kıyaslandığında $aaaa p<0,001$ olarak belirtilmiştir.

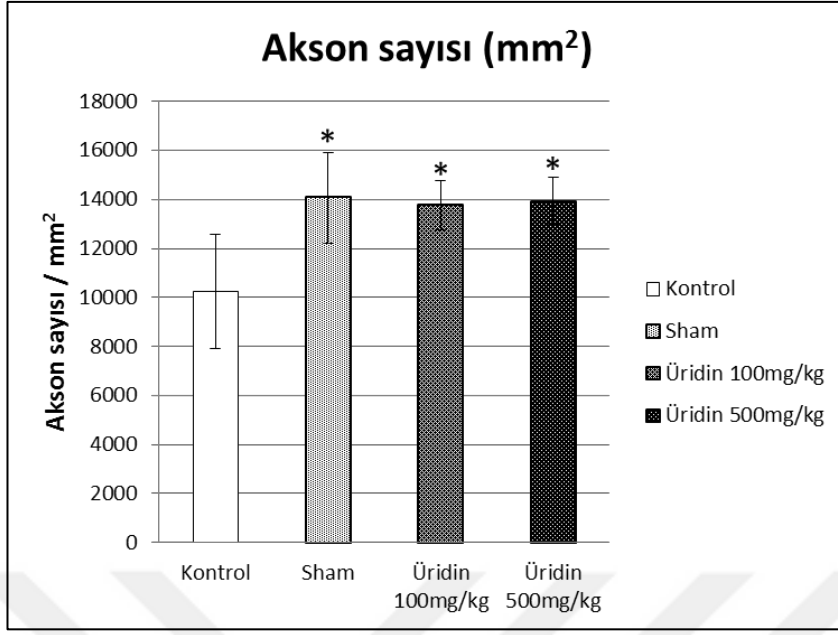
6. haftadaki EMG sonuçlarında U100 ve U500 gruplarında kontrol grubuna göre iyileşme mevcuttu, ancak 4 grup arasında Tek Yönlü ANOVA'yı takiben post-hoc Tukey testi ile yapılan istatistik analizde anlamlı farklılık saptanmamıştır ($p>0.05$). 12.Haftadaki yapılan analizlerde sadece U500 ile tedavi edilen sıçanlarda kontrol ve U100 gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,001$) ölçüde yüksek amplitüd değerleri elde edildi.

Geç dönem histomorfolojik değerlendirme bulguları:

Akson sayımında; sayım çerçevesi içerisinde sayılan akson adetleri kontrol grubu için $49,1 \pm 11,1$ sham grubu için $67,5 \pm 8,8$ U100 grubu için $66,0 \pm 4,9$ ve U500 grubu için $66,8 \pm 4,6$ olarak bulundu. Milimetrekare üzerinden hesaplanan sonuçlar kontrol grubu için $10,23 \pm 23,2$ sham grubu için $14,07 \pm 18,4$ U100 grubu için $13,7 \pm 10,1$ ve U500 grubu için $13,9 \pm 9,6$ olarak tespit edildi (Şekil-5, Şekil-6).



Şekil-5: Ölçüm alanında sayılan akson sayıları ve standart sapmaları, * $p < 0.05$ kontrol grubu ile karşılaştırma.



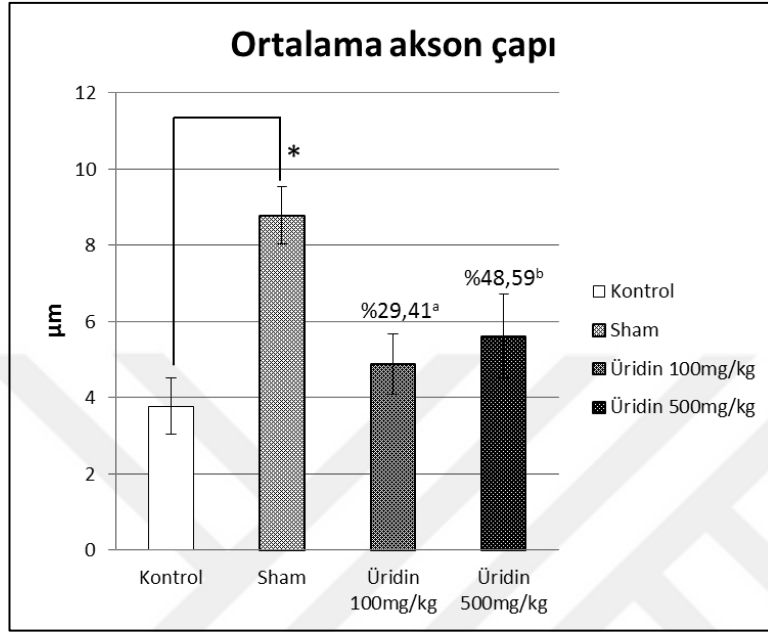
Şekil-6: Milimetrekaredeki akson sayıları ve standart sapmaları, *p<0.05 kontrol grubu ile karşılaştırma.

Kruskal Wallis testi sonucunda akson sayımı açısından gruplar arasında farklılık olduğu bulundu ($p=0,048$). Bu farklılığın hangi gruplar arasında olduğuna bakıldığında ise kontrol ve sham grupları arasında akson sayımı açısından beklenildiği gibi anlamlı istatistiksel farklılık olduğu görüldü ($p=0,010$). Kontrol ve U100 grubu arasında ($p=0,036$) ve Kontrol ve U500 grubu arasında da ($p=0,026$) istatistiksel anlamlılık görüldü. Gruplar arası diğer karşılaştırmalarda anlamlı farklılık saptanmadı.

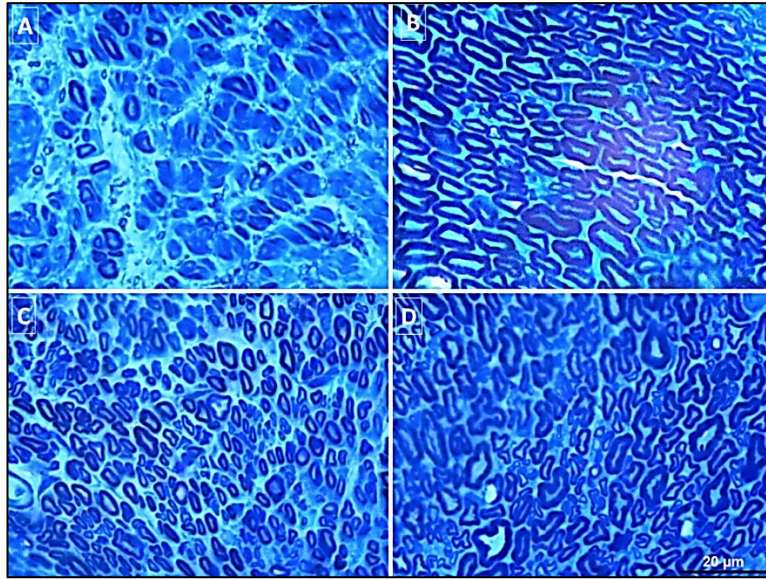
Ortalama akson çapı açısından değerler kontrol grubu için $3,8\pm 0,7$ sham grubu için $8,8\pm 0,7$ U100 grubu için $4,9\pm 0,8$ ve U500 grubu için $5,6\pm 1,1$ mikrometre olarak bulundu.

Kruskal Wallis testi sonucunda ortalama akson çaplarında gruplar arasındaki farklılığın $p=0,006$ değeri ile anlamlı olduğu tespit edildi. Grupların karşılaştırmalı istatistik analizinde kontrol ve sham grupları arasındaki anlamlılığın $p=0.001$ değerinde olduğu görüldü. U100 ve U500 gruplarında kontrole göre artış olmasına rağmen p değerleri sırasıyla $p=0,209$ ve $p=0,061$ olarak bulundu. Özellikle U500 grubu için anlamlılığa yakın bu değerlerin kontrole göre ne kadarlık bir artışı ifade ettiğinin görülebilmesi için yüzdeler artışlara bakıldı. Akson çaplarındaki yüzdeler artış U100 grubunda kontrole

göre %29,41 ve U500 grubu için kontrole göre %48,59 olarak hesaplandı (Şekil-7, Resim-8).



Şekil-7: Ortalama akson çapları ve standart sapmaları. * (Kontrol grubu ile karşılaştırma), p = 0,001. ^a Üridin 100 mg/kg grubunda kontrole göre artış, ^b Üridin 500 mg/kg grubu için kontrole göre artış.



Resim 8: %1 toludin mavisi - %1 boraks ile boyanan ince kesitler. A, Kontrol grubu; B, Sham grubu; C, Üridin 100 mg/kg grubu; D, Üridin 500 mg/kg grubu. Bar, 20 mikrometre.

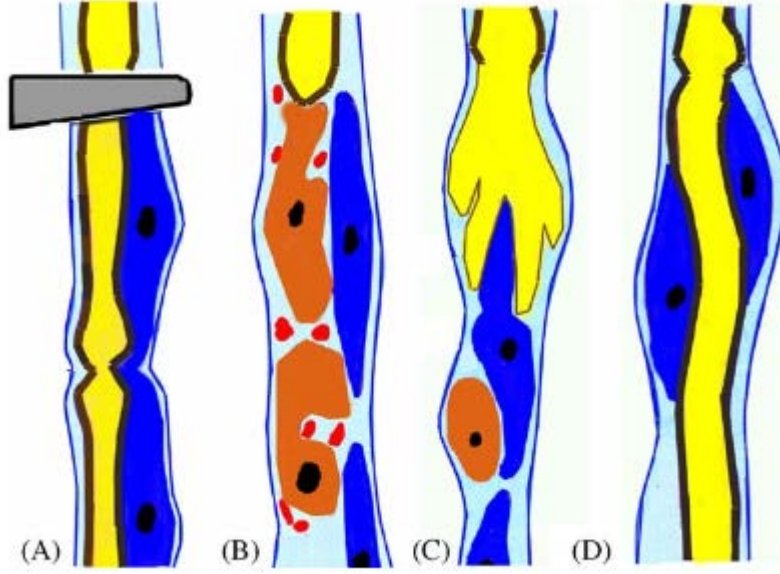
TARTIŞMA VE SONUÇ

Periferik sinir yaralanmasını takiben sinirin rejenerasyonu ve fonksiyonlarını tamamen geri kazanımı günümüzde hala rejeneratif tıbbın tam olarak çözemediği bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır. Periferik sinir onarım stratejilerinin nihai amacı maksimum fonksiyonel kazanımı sağlamak ve iyileşme süresini kısaltmaktır. Amerika Birleşik Devletleri'nde periferik sinirin hasar tedavisi için yıllık milyarlarca dolar harcanmaktadır (48, 49). PSH sonrasında optimal sinir onarımında birçok faktör etkilidir ancak ciddi sinir yaralanması sonrası erken dönemde mikroşirürjikal yöntemle primer sütün tekniği ile anatomik olarak akson aksone anastomoz hala altın standart tedavi olarak kabul edilmektedir (50). Ayrıca aksonal büyümenin kalitesi, canlı kalan nöron sayısı, rejenerasyon olan aksonun oryantasyonu, hedef dokunun durumu gibi faktörler ideal sinir onarımında oldukça önem taşımaktadır (51, 52).

Periferik sinir hasarından sonra nörotrofik faktörler; hedef dokular, nöral somalar, glial hücreler, fibroblastlar, makrofajlar ve Schwann hücreleri dahil olmak üzere çeşitli bölgelerden eksprese edilir. Hayatta kalan nöronlar büyüme modundan iletim moduna geçer ve morfolojik, fizyolojik ve moleküler değişiklikler yapar (53, 54). Distal ve proksimal sinir uçları periferik sinir kesilmesinden sonra farklı tepki gösterir. Hasarlı bölgeye uzak kalan sinir kısmı, büyüme ortamı için yeterli desteği sağlamalı ve rejenerasyon aksonu da denervasyon atrofisine karşı kapasitesini koruyarak uygun hedef organı yeniden canlandırmalıdır (53).

Periferik sinir hasarı, hem distal hem de proksimal sinir bölgelerinde birçok değişikliğe neden olur. Yaralanma sonrası hayatta kalan bir sinirde, lezyonun proksimalindeki sinir kısmı genellikle ilk Ranvier düğümüne kadar kalsiyum akışının ve kalsiyum ilişkili proteazların aktivasyonunun etkisiyle dejenerasyon olur. Proksimal kısımlar, yavaş ve hızlı aksoplazmik taşıma yoluyla oraya ulaşan hücre iskelet proteinlerinin ve organellerinin etkisiyle şişer.

Hasarlı aksonun dinamik olarak uzayan bir büyüme konisine ihtiyacı vardır (53, 54). Lokal protein sentezi, transkripsiyonel olayların katkısı olmadan bu ön değişiklikleri uyarır. Aksonlarda önceden var olan sitoskeletal elementler proksimal sinir kütüğünden büyümeye başlayan rejenere olan aksonlarına taşınır. Mikrotübüller, eski aksonlar ve yeni ortaya çıkan aksonlar arasındaki aksonal uzama için gerekli malzemeleri taşıyan köprüler gibi işlev görür. Rejenere olan akson kısımları, lezyonun proksimalindeki ilk Ranvier düğümünden uzamaya başlar. Bu ince sinir lifleri, distal sinir filizlerinin destekleyici mikroçevresinden distal sinir ucuna doğru uzar (53, 54). Aksonal rejenerasyon üzerinde doğrudan veya dolaylı etkileri olan moleküller genellikle nörotrofik faktörler, hücre adezyon molekülleri ve hücre dışı matris proteinleri olarak sınıflandırılabilir (53). Çevresel etkenler; distal sinir ucundan büyüme ve başarılı periferik sinir rejenerasyonu için önemlidir. Rejenere olan aksonlar, sağlam aksonlar ve miyelin kılıfı tarafından düzenlenen endonöral tüplerde denerve hedeflere doğru büyür. Distal sinir ucundaki birincil değişiklikler dejeneratiftir ve aksonal fragmanları ve miyelin kalıntılarını gideren "Wallerian dejenerasyonu" ile ilişkilidir. PSH'ndan sonra tetiklenen sıralı bir yanıt Wallerian dejenerasyonu olarak bilinir (15). Daha sonra Schwann hücreleri aksonal ve miyelin kalıntılarını giderir ve sitokinleri salgılar, böylece aksonal rejenerasyonu hızlandırır (55, 56). Ek olarak, periferik sinir mikro-çevresi, sinir rejenerasyonunda yeri doldurulamaz bir rol oynayan çeşitli nörotrofik faktörler veya büyüme faktörleri içerir (57). Sonuç olarak, nörotrofik faktörlerle duysal veya motor iyileşmeyi arttırmak, alternatif olarak da aşırı doku inflamasyonunu ve skarlaşmasını önlemek ve hasarlı sinir onarımlarındaki etkisini araştırmak için büyük bir klinik ilgi vardır (58). Bu işlemin sonunda, bağ dokusu iskeleleri ve destekleyici Schwann hücrelerinden oluşan bir distal sinir bölgesi kalır (53, 54, 59). Periferik sinirler; mikro çevresindeki çeşitli adezyon molekülleri, hücre dışı matris molekülleri ve nörotrofik faktörler nedeniyle omuriliğe göre daha kolaylıkla rejenere olabilir (60, 61).



Resim-9: Periferik sinir liflerinin dejenerasyonu ve rejenerasyonu süreci. (A) Sağlam bir sinir lifi periferik olarak kesilir. (B) Yakın kılcıl damarlardan endonöral tüpe giren makrofajlar, dejenere olan miyelin kılıfından kopan miyelin parçalarını içine alır. (C) Rejenerasyonla distal güdük içinde bir aksonal filiz meydana gelir. Schwann hücrelerinin yüzeyi bu büyüme konisini yönlendirir. (D) Yeni rejenerasyonun miyelinasyonu proksimal olarak başlar (58).

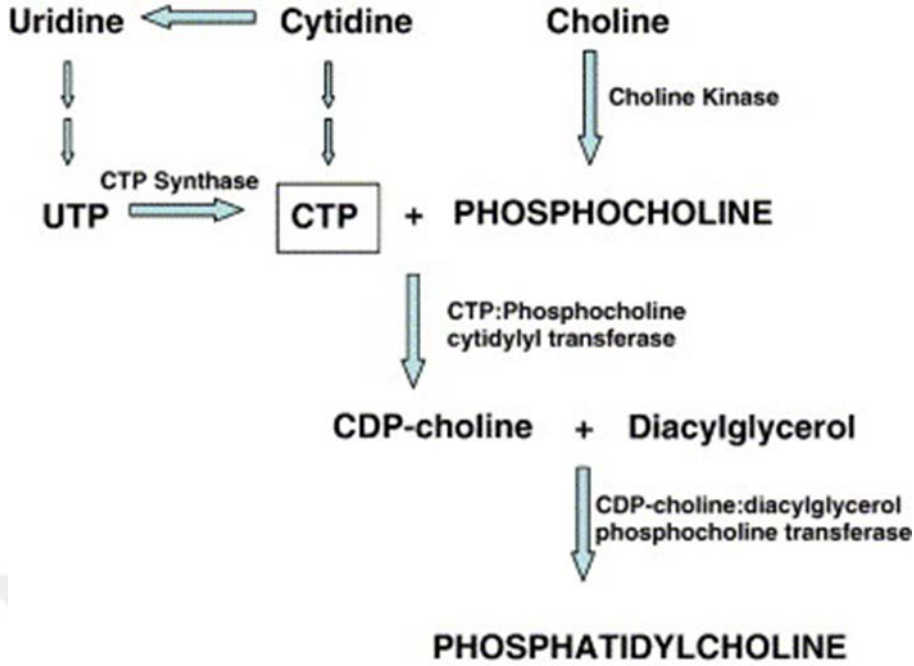
Birçok çalışma (58, 62), büyüme faktörlerinin kullanımı ile sinir rejenerasyonunun geliştirilmesine ve bu sorunların üstesinden gelmeye odaklanmıştır. İnsülin benzeri büyüme faktörü I (IGF-I), yaralanma sonrası motor ve duyu nöronlarının kurtarılmasını teşvik etmenin yanı sıra Schwann hücrelerinin hayatta kalmasını ve çoğalmasını arttırmaktadır. IGF-I ayrıca aksonal rejenerasyonu ve miyelinasyonu da teşvik etmektedir. Lokal olarak kullanılan IGF-I'in ilgili reseptöründeki bağlayıcı proteine bağlanması ve hücre gövdesine doğru retrograd yönde taşınması; IGF-I'in aksonal rejenerasyona dolaylı olan etkilerini açıklamaktadır. IGF-I'in aksonal tubulin üretimini uyararak aksonal uzamayı arttırdığı gösterilmiştir. IGF-I, fibroblast ve makrofaj farklılaşmasını uyarmakta ve motonöronun hayatta kalmasını teşvik etmektedir. Son olarak, IGF-I, Schwann hücrelerinin proliferasyonunu da teşvik etmektedir.

Travmatik nöronal hasarlanma veya iskemik serebral patolojilerde ve serebral ödemin patofizyolojisinde hücre membranı ve bunun en önemli

yapıtaşı olan fosfolipitlerin önemi bilinmektedir. CDP-kolin vücudumuzda endojen olarak oluşan doğal bir bileşiktir. Yapısal olarak bir nükleotiddir. Hücre membran fosfolipidlerinden fosfatidilkolin sentezi sırasında hız kısıtlayıcı basamakta ortaya çıkar (28, 29). Dışarıdan verilen CDP-kolin in (bu durumda sitikolin adını alır) fosfatidilkolin artışını sağlayarak hücre membranının yenilenmesi ve onarılmasını arttırıcı etkileri mevcuttur. Bu yararlı etkileri çeşitli deneysel ve klinik çalışmalar ile kanıtlanmıştır (35).

Bu çalışmada, insan kan dolaşımının majör primidin nükleozidi olan ve bir ön madde olarak CDP-kolin düzeylerini arttırdığı bilinen Üridin' in sistemik yolla verilmesi suretiyle deney hayvanlarında oluşturulan tek taraflı siyatik sinir hasarında sinirin rejenerasyonu ve skar dokusu oluşumu üzerine etkinliği araştırılmıştır. Üridin etkinliği; motor fonksiyonel (Siyatik Fonksiyon İndeksi; SFI, elektromiyografi; EMG, makroskopik (numerik değerlendirme skalası), biyokimyasal (lipid peroksidasyon ve reaktif oksijen türevleri; ROS, moleküler biyolojik (apoptotik belirteçler), histomorfolojik analizlerle değerlendirilmiştir.

Üridin, insanların kan dolaşımında ve anne sütünde bulunan majör primidin nükeozididir (36-38). Ayrıca Üridin-5p-trifosfatın (UTP) bir yapı taşı olarak aynı zamanda Kennedy yolağı aracılığıyla membran fosfolipid sentezinin bir prekürsörüdür ve bu yolağın hız kısıtlayıcı basamağında üretilen CDP-kolin sentezini in vitro ve in vivo koşullarda arttırdığı bilinmektedir (29, 39, 40) (Resim-10).



Resim-10: Kennedy yolağı yoluyla fosfatidilkolin (PC) biyosentezi. Sıçanlarda plazma sitidin, ana dolaşan pirimidindir, ancak insanlarda primer dolaşımdaki pirimidin, uridindir. Sıçan kan-beyin bariyerinde (KBB), Sitidin için yüksek afiniteli bir taşıyıcı bulunmadığından, sadece küçük miktarlarda dolaşan Sitidin beyin CTP(Sitidin Trifosfat)'sine dönüştürülür; bununla birlikte Üridin, beyne, yüksek afiniteli bir taşıyıcı (CNT2) yoluyla kolayca girerek UTP (Üridin Tri fosfat)'yi verir; bu daha sonra CTP sentaz ile CTP'ye dönüştürülür. Bu CTP, PC (Fosfokolin) oluşturmak için diasilgliserol (DAG) ile birleştirilen endojen CDP-kolini oluşturmak için fosfokolin ile reaksiyona girer(37).

Bizim bu çalışmada PSH modelimizde Üridin'i koruyucu madde olarak tercih etme nedenimiz, Üridin'in sinir hücresi gelişimini artırıcı ve nöronal hasardan koruyucu etkinliklerinin daha önce başka birçok modelde gösterilmiş olmasıdır. Önceki çalışmalarda dışarıdan üridin uygulamasının sinir hücrelerinin dallanmasını arttırdığı gösterilmiştir (63). Bu özelliğiyle siyatik sinir hasar modellerinde denenen sinir hücresi büyüme faktörlerinin (Nerve Growth Factor; NGF) bu modelde bildirilen etkinliğini taklit edebileceği ispat edilmiştir (64) Üridin'in periferik sinirlerde oluşturulan hasara karşı kullanılabilir olma ihtimali sadece sinir hücrelerinde proliferatif etkinliği değil aynı zamanda anti-apoptotik etkinliği ile de ilişkilidir. Cansev ve ark. (65-68), Üridin bileşiğinin yenidoğan sıçan hipoksik-iskemik ensefalopati (HIE) ve hiperoksik beyin hasarı modellerinde apoptotik sinir hücresi ölümünü baskılamak suretiyle nöroprotektif etkinlik gösterdiği ve uzun dönemli

takiplerde genç erişkin sıçanlardaki kognitif fonksiyon bozukluğunu anlamlı şekilde azalttığını göstermişlerdir.

Bunun yanı sıra Üridin tedavisi HIE modelinde histon deasetilaz (HDAC) aktivitesini de azaltmak suretiyle beyin hasarını iyileştirmeye katkıda bulunmaktadır (67). Siyatik sinir hasarında da apoptozis ve inflamasyon gibi benzer mekanizmalar sinir hasarına katkıda bulunmakta ve sinirin fonksiyonel iyileşmesine engel olmaktadır. Ayrıca, HDAC inhibitörlerinin PSH sonucu ortaya çıkan nöropatiyi azalttığı birçok çalışmada gösterilmiştir (69-72).

Üridin uygulaması PC12 hücrelerinde, striatal dilimlerde ve kemirgen beyinlerinde sitidin-5p-difoskokolin (CDP-kolin) seviyelerini arttırmaktadır. CDP-kolinin inme ve HIE dahil diğer nörodejeneratif durumlar üzerinde yapılan deneysel ve klinik çalışmalarda yararlı etkiler sergilediği bildirilmiştir. Üridin nükleotidlerinin (UTP ve uridin-5p-difosfat [UDP]), P2Y reseptörlerine (P2Y2, P2Y4 ve P2Y6) bağlanmasıyla oluşan uyarı, apoptozu azaltarak nöroprotektif etki sağlar. Üridin uygulaması PC12 hücrelerinde ve kemirgen beyinlerinde UTP düzeylerinde artışa neden olur. Hipoksik iskemik beyin hasarını takiben art arda 3 gün boyunca intraperitoneal Üridin uygulamasının, yenidoğan sıçanlarda hipokampusun cornu ammonis'deki CA1 ve CA3 bölgelerinin enfarktüs hacmini, TUNEL (+) hücre oranını ve aktif Kaspaz-3 ekspresyonunu azalttığını gösterilmiştir (65).

Bizim çalışmamızda ise ilk kez intraperitoneal Üridin uygulanmasının periferik sinir rejenerasyonu ve skar azalmasındaki etkisi araştırılmıştır. Erken dönem sıçan siyatik sinir kesisi ve primer anastomoz modelinde 7 günde tek doz intraperitoneal yolla verilen üridin 100mg/kg (düşük doz) veya 500mg/kg (yüksek doz) tedavisinin hasardan sonraki 7 günde apoptotik değişimlere etkisi aktif Kaspaz-3 düzeylerinin analiz edilmesi suretiyle belirlenmiştir. Yapılan değerlendirmede U500 grubun kontrol grubuna göre anlamlı derecede anti-apoptotik etkisi gösterilmiştir ($p < 0,05$). Ancak U100 grup için anti-apoptotik etki açısından artış olmasına rağmen kontrol gruba göre anlamlı değildi ($p > 0,05$). Bu da doza bağımlı bir etki olarak değerlendirilmiştir.

Erken dönemde çalışmamızda oksidasyon hasarı ve anti-oksidadif savunma mekanizmaları biyokimyasal olarak incelendi ve oksidasyon parametrelerine etkisi ELISA yöntemi ile belirlendi. Siyatik sinirden elde edilen erken dönem örneklerinde; bir oksidasyon parametresi olarak, siyatik sinir hasarını takiben U100 uygulanan grupta MPO düzeyleri kontrol gruba göre azalırken anlamlı istatistik fark saptanmadı ($p>0,05$). Siyatik sinir hasarını takiben U500 uygulanan grupta MPO düzeyleri kontrol ($p<0,001$) ve U100 ($p<0,05$) gruplarına göre anlamlı derecede azalmış olarak tespit edildi. Siyatik sinirden elde edilen erken dönem örneklerinde; Diğer oksidasyon parametresi olarak; U100 ($p<0,05$) ve U500 ($p<0,001$) uygulanan gruplarda MDA düzeyleri kontrol gruba göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalmıştı. Ayrıca MDA düzeyleri açısından U500 ve U100 grupları arasında anlamlı fark mevcuttu ($p<0,05$). Erken dönem örneklerinde; Bir anti-oksidadan parametresi olarak, Süperoksid Dismutaz (SOD) miktarı kontrol grubunda en düşük, sham grubunda en yüksek düzeylerde tespit edildi. Siyatik sinir hasarını takiben U100 uygulanan grupta SOD düzeyleri kontrol gruba göre artarken anlamlı istatistiksel fark saptanmadı ($p>0,05$). Siyatik sinir hasarını takiben U500 uygulanan grupta SOD düzeyleri kontrol ($p<0,001$) ve U100 ($p<0,05$) gruplarına göre anlamlı derecede artmış olarak tespit edildi. Erken dönem örneklerinde; Glutasyon Peroksidaz (GPx) miktarı kontrol grubunda en düşük, sham grubunda en yüksek düzeylerde tespit edildi. Siyatik sinir hasarını takiben U100 uygulanan grupta GPx düzeyleri kontrol grubuna göre artarken anlamlı istatistik fark saptanmadı ($p>0,05$). Siyatik sinir hasarını takiben U500 uygulanan grupta GPx düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı derecede artarken ($p<0,01$), U100 grubuna göre anlamlı fark saptanmadı ($p>0,05$). Erken dönem örneklerinde; Katalaz (CAT) miktarı kontrol grubunda en düşük, sham grubunda en yüksek düzeylerde tespit edildi. Siyatik sinir hasarını takiben U100 ($p<0,05$) ve U500 ($p<0,001$) uygulanan gruplarda CAT düzeyleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artış görüldü. U100 ve U500 gruplarında CAT düzeyleri açısından anlamlı fark saptanmadı ($p>0,05$). Sonuç olarak anti-oksidadan etkisi U500 grubunda daha belirgin anlamlı artmış olmakla birlikte, U500 ve U100 gruplarının ikisinde de anlamlı etki görüldü.

Diğer yandan üridinin anti-enflamatuvar etkisi sinir sistemi ile sınırlı değildir ve diğer organlardaki son çalışmalar Üridin'in anti-inflamatuvar ve anti-fibrotik özelliklere sahip olduğunu göstermiştir. Örneğin; Üridin'in bleomisin kaynaklı akciğer hasarında inflamasyonu ve fibrozisi inhibe ettiği, ayrıca iskemi / reperfüzyon hasarı sırasında sıçan miyokardındaki metabolik süreçler üzerindeki koruyucu etkisi gösterilmiştir (73, 74).

Çalışmamızda; Üridin'in sinirin rejenerasyonu ve skar dokusu oluşumu üzerine etkinliği değerlendirildiğinde; geç dönem makroskopik değerlendirmede, Üridin 500mg/kg ile 1 hafta intraperitoneal tedavi edilen sıçanlarda, SF ile 1 hafta intraperitoneal enjeksiyon yapılan kontrol gruba göre sinir yapışıklığı ve ayrılabilirliği açısından anlamlı olarak daha iyi sonuçlar elde edildi ve daha az skar dokusu geliştiği görüldü ($p<0.002$). Ancak Üridin 100mg/kg grubunda ve kontrol grup arasında anlamlı fark saptanmadı ($p>0.05$). Bir başka deyişle, Üridin etkisinin doza bağımlı olarak ortaya çıktığı görüldü. Histomorfolojik değerlendirme sonuçlarımıza göre ise; akson sayımı açısından kontrol ve U100 grubu arasında, aynı zamanda kontrol ve U500 grubu arasında da istatistiksel olarak anlamlı fark görüldü. Ayrıca akson çapları açısından gruplar arasındaki farklılıkta U100 ve U500 gruplarında kontrole göre artış olmasına rağmen, p değerleri sırasıyla $p=0,209$ ve $p=0,061$ olarak bulundu ($p>0.05$). Özellikle U500 grubu için anlamlılığa yakın bu değerlerin kontrole göre ne kadarlık bir artışı ifade ettiğinin görülebilmesi için yüzdelik artışlara bakıldı. Akson çaplarındaki yüzdelik artış U100 grubunda kontrole göre %29,41 ve U500 grubunda kontrole göre %48,59 olarak hesaplandı. Geç dönem siyatik fonksiyon indeksinde değerlendirme zamanı olan 6. ve 12. haftadaki SFI sonuçlarında; U100 ve U500 gruplarında kontrol gruba göre anlamlı derecede iyileşme saptandı ($p<0.001$). Ayrıca U100 ve U500 grupları arasında yapılan karşılaştırmada hem 6. hem 12. haftada SFI açısından anlamlı fark görüldü ($p<0.001$).

Fuminori ve ark. (51), sinir ileti hızı ve akson çaplarını ölçerek, bu ölçümün akson çapının internodal aralığı ve myelinizasyonu ile alakalı olduğu bildirmişlerdir. Sinir aksiyon potansiyelinin amplitüd değeri myelinize aksonların oluşturduğu toplam elektrik akımına bağlıdır. Kim ve ark. (75),

Tavşan posterior tibial siniri üzerinde yaptıkları bir çalışmada, sinirin aksiyon potansiyeli amplitüd değerlerinin fonksiyonel geri kazanımın değerlendirilmesinde kullanılabileceğini göstermişlerdir. Bizim çalışmamızda M. Gastroknemius'tan yapılan kayıtlarda elde edilen aksiyon potansiyelinin amplitüd ve latans kayıtlarında, 6. haftadaki EMG sonuçlarında U100 ve U500 gruplarında kontrol gruba göre iyileşme mevcuttu ancak 4 grup arasında istatistik analizde anlamlı farklılık saptanmadı ($p>0.05$). EMG sonuçlarından 12. haftada yapılan analizlerde sadece U500 ile tedavi edilen sıçanlarda kontrol ve U100 gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı ölçüde yüksek amplitüd değerleri elde edildi.

Sonuç olarak çalışmada ilk kez periferik sinir yaralanması üzerine sistemik uygulanan Üridin'in özellikle doza bağımlı olarak erken dönemde anti-apoptotik ve anti-oksidatif savunma mekanizmalarına sahip olduğu görülmüştür. Ayrıca geç dönemde siyatik fonksiyon indeksinde iyileşme, sinir dokusu rejenerasyonunda artış, perinöral skar dokusunda azalma, EMG latansında kısalma, sinir adhezyon ve seperabilite skorlarında iyileşme ile total miyelinli akson sayısı ve dansitesinde anlamlı artışlar tespit edilmiştir. Bu sonuçlar Üridin ile ilgili daha ileri çalışmaların yapılmasını gerektirmektedir.

KAYNAKLAR

- (1) Noble J, Munro CA, Prasad VS, Midha R. Analysis of upper and lower extremity peripheral nerve injuries in a population of patients with multiple injuries. *J Trauma* 1998;45(1):116-22.
- (2) Farinas AF, Manzanera Esteve IV, Pollins AC. Diffusion MRI Predicts Peripheral Nerve Recovery in a Rat Sciatic Nerve Injury Model. *Plast Reconstr Surg* 2020;doi:10.1097/PRS.0000000000006638.
- (3) Taylor CA, Braza D, Rice JB, Dillingham T. The incidence of peripheral nerve injury in extremity trauma. *Am J Phys Med Rehabil* 2008;87(5):381-5.
- (4) Moore AM, Wagner IJ, Fox IK. Principles of nerve repair in complex wounds of the upper extremity. *Semin Plast Surg* 2015;29(1):40-7.
- (5) Castillo-Galván ML, Martínez-Ruiz FM, de la Garza-Castro O, Elizondo-Omaña RE, Guzmán-López S. Study of peripheral nerve injury in trauma patients. *Gac Med Mex* 2014;150(6):527-32.
- (6) Li A, Hokugo A, Yalom A et al. A bioengineered peripheral nerve construct using aligned peptide amphiphile nanofibers. *Biomaterials* 2014;35(31):8780-90.
- (7) Ovalle F, Patel A, Pollins A et al. A simple technique for augmentation of axonal ingrowth into chondroitinase-treated acellular nerve grafts using nerve growth factor. *Ann Plast Surg* 2012;68(5):518-24.
- (8) Pasternak O, Sochen N, Gur Y, Intrator N, Assaf Y. Free water elimination and mapping from diffusion MRI. *Magn Reson Med* 2009;62(3):717-30.
- (9) Alexander AL, Lee JE, Lazar M, Field AS. Diffusion Tensor Imaging of the Brain. *Neurotherapeutics* 2007;4(3):316-29.
- (10) Fawcett JW, Keynes RJ. Peripheral nerve regeneration. *Annu Rev Neurosci* 1990;13:43-60.
- (11) Griffin JW, Hoffman DN (eds). Degeneration and regeneration in the peripheral nervous system. 3rd ed. Philadelphia: Saunders WB; 1993.
- (12) Carlson BM (eds). Principles of Regenerative Biology. 1st ed. USA: Academic Press; 2007.
- (13) Franke H, Krügel U, Illes P. P2 receptors and neuronal injury. *Pflugers Arch* 2006;452:622-644.
- (14) Pineau I, Lacroix S. Endogenous signals initiating inflammation in the injured nervous system. *Glia* 2009;57:351-361.

- (15) Yang L, Cranson D, Trinkaus-Randall V. Cellular injury induces activation of MAPK via P2Y receptors. *Journal of cellular biochemistry*.2004;91(5):938-950.
- (16) Klepeis VE, Weinger I, Kaczmarek E, Trinkaus-Randall V. P2Y receptors play a critical role in epithelial cell communication and migration. *Journal of cellular biochemistry* 2004;93(6):1115-1133.
- (17) Boucher I, Rich C, Lee A, Marcincin M, Trinkaus-Randall V. The P2Y2 receptor mediates the epithelial injury response and cell migration. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 2010;299(2):C411-C421.
- (18) Jin H, Seo J, Eun SY et al. P2Y2R activation by nucleotides promotes skin wound-healing process. *Experimental dermatology* 2014;23(7):480-485.
- (19) Silva TM, França GR, Ornelas IM et al. Involvement of nucleotides in glial growth following scratch injury in avian retinal cell monolayer cultures. *Purinergic signalling* 2015;11(2):183-201.
- (20) Okada M, Nakagawa T, Minami M, Satoh M. Analgesic effects of intrathecal administration of P2Y nucleotide receptor agonists UTP and UDP in normal and neuropathic pain model rats. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2002;303(1):66-73.
- (21) Ando RD, Mehesz B, Gyires K, Illes P, Sperlagh B. A comparative analysis of the activity of ligands acting at P2X and P2Y receptor subtypes in models of neuropathic, acute and inflammatory pain. *British journal of pharmacology* 2010;159(5):1106-1117.
- (22) Lazarowski ER, Homolya L, Boucher RC, Harden TK. Direct demonstration of mechanically induced release of cellular UTP and its implication for uridine nucleotide receptor activation. *Journal of Biological Chemistry* 1997;272(39):24348-24354.
- (23) Lazarowski ER, Harden TK. Quantitation of extracellular UTP using a sensitive enzymatic assay. *British journal of pharmacology* 1999;127(5):1272-1278.
- (24) Erlinge D, Harnek J, van Heusden C, et al. Uridine triphosphate (UTP) is released during cardiac ischemia. *International journal of cardiology* 2005;100(3):427-433.
- (25) Martiáñez T, Carrascal M, Lamarca A et al. UTP affects the Schwannoma cell line proteome through P2Y receptors leading to cytoskeletal reorganisation. *Proteomics*.2012;12(1):145-156.
- (26) Lamarca A, Gella A, Martiane T et al. Uridine 5'-triphosphate promotes in vitro Schwannoma cell migration through matrix metalloproteinase-2 activation. *PLOS One* 2014;9(6).
- (27) Palomo-Guerrero M, Cosgaya JM, Gella A, Casals N, Grijota-Martinez C. Uridine-5'-Triphosphate Partially Blocks Differentiation Signals and Favors a more Repair State in Cultured rat Schwann Cells. *Neuroscience* 2018;372:255-265.

- (28) Secades JJ, Frontera G. CDP-choline: pharmacological and clinical review. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 1995;17:1-54.
- (29) Kennedy EP, Weiss SB. The function of cytidine coenzymes in the biosynthesis of phospholipides. *Journal of Biological Chemistry* 1956;222(1):193-214.
- (30) Adibhatla RM, Hatcher JF. Citicoline mechanisms and clinical efficacy in cerebral ischemia. *J Neurosci Res* 2002;70(2):133-9.
- (31) Özay 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.
- (32) 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(7):766-73.
- (33) Caner B, Kafa MI, Bekar A et al. 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(3):238-45.
- (34) Kaplan T, Kafa IM, Cansev M et al. Investigation of the dose-dependency of citicoline effects on nerve regeneration and functional recovery in a rat model of sciatic nerve injury. *Turk Neurosurg* 2014;24(1):54-62.
- (35) Gundogdu EB, Bekar A, Turkyilmaz M et al. CDP-choline modulates matrix metalloproteinases in rat sciatic injury. *J Surg Res* 2016;200(2):655-63.
- (36) 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(7):989-92.
- (37) Cansev M. Uridine and cytidine in the brain: their transport and utilization. *Brain Res Rev* 2006;52(2):389-97.
- (38) Thorell L, Sjöberg LB, Hernell O. Nucleotides in human milk: sources and metabolism by the newborn infant. *Pediatr Res* 1996;40(6):845.
- (39) Richardson UI, Watkins CJ, Pierre C, Ulus IH. Stimulation of CDP-choline synthesis by uridine or cytidine in PC12 rat pheochromocytoma cells. *Brain Res* 2003;971(2):161-7.
- (40) Cansev M, Watkins CJ, Van der Beek EM, Wurtman RJ. Oral uridine-5'-monophosphate (UMP) increases brain CDP-choline levels in gerbils. *Brain Res* 2005;1058(1-2):101-8.
- (41) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-75.

- (42) Laemmli UK. Relevant page on gel electrophoresis. *Nature* 1970;227:681.
- (43) Hare GMT, Evans PJ, Mackinnon SE et al. Walking Track Analysis: A Long-Term Assessment of Peripheral Nerve Recovery. *Plastic and Reconstructive Surgery* 1992;82(2):251-258.
- (44) Petersen J, Russell L, Andrus K et al. Reduction of extraneural scarring by ADCON-T/N after surgical intervention. *Neurosurgery* 1996;38(5):976-84.
- (45) Sarikcioglu L, Demirel BM, Utuk A. Walking track analysis: an assessment method for functional recovery after sciatic nerve injury in the rat. *Folia morphologica* 2009;68(1):1-7.
- (46) Marcolino AM, Barbosa RI, Neves LMS et al. Assessment of functional recovery of sciatic nerve in rats submitted to low-level laser therapy with different fluences. An experimental study. *Journal of hand and microsurgery* 2013;5(2):49-53.
- (47) Bain JR, Mackinnon SE, Hunter DA Functional evaluation of complete sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the rat. *Plastic and Reconstructive Surgery* 1989;83(1):129-138.
- (48) Razaa C, Riaz HA, Anjuma R, Shakeela NA. Repair strategies for injured peripheral nerve. *Life Sci* 2020;243:117308.
- (49) Grinsell D, Keating CP. Peripheral nerve reconstruction after injury: a review of clinical and experimental therapies. *Biomed Res Int* 2014;2014:698256.
- (50) Terzis JK, Sun DD, Thanos PK. Historical and basic science review: past, present, and future of nerve repair. *Journal of reconstructive microsurgery* 1997;13(03):215-225.
- (51) Kanaya F, Firrell JC, Breidenbach WC. Sciatic function index, nerve conduction tests, muscle contraction, and axon morphometry as indicators of regeneration. *Plast Reconstr Surg* 1996;98(7):1264-71.
- (52) Lundborg G. A 25-year perspective of peripheral nerve surgery: evolving neuroscientific concepts and clinical significance. *The Journal of hand surgery* 2000; 25(3):391-414.
- (53) Fu SY, Gordon T. The cellular and molecular basis of peripheral nerve regeneration. *Mol Neurobiol* 1997;14(1-2):67-116.
- (54) Zochodne DW (eds). *Neurobiology of Peripheral Nerve Regeneration*. 1st ed. London: Cambridge University Press; 2008.
- (55) Ma KH, Duong P, Moran JJ, Junaidi N, Svaren J. Polycomb repression regulates Schwann cell proliferation and axon regeneration after nerve injury. *Glia* 2018;66(11):2487-2502.
- (56) Stierli S, Napoli I, White IJ et al. The regulation of the homeostasis and regeneration of peripheral nerve is distinct from the CNS and independent of a stem cell population. *Development* 2018;145(24):170316.

- (57) Shi G, Zhou X, Wang X et al. Signatures of altered DNA methylation gene expression after central and peripheral nerve injury. *J Cell Physiol* 2019;235(6):5171-5181.
- (58) Johnson EO, Zoubos AB, Soucacos PN. Regeneration and repair of peripheral nerves. *Injury* 2005;36(4):24-9.
- (59) Rodríguez FJ, Valero-Cabré A, Navarro X. Regeneration and functional recovery following peripheral nerve injury. *Drug discovery today: disease models* 2004;1(2):177-185.
- (60) Haggerty AE, Bening MR, Pherribo G, Dauer EA, Oudega M. Laminin polymer treatment accelerates repair of the crushed peripheral nerve in adult rats. *Acta biomaterialia* 2019;86:185-193.
- (61) Zhu W, Tringale KR, Woller SA et al. Rapid continuous 3D printing of customizable peripheral nerve guidance conduits. *Materials Today* 2018;21(9):951-959.
- (62) Kanje M, Skottner A, Sjoberg J, Lundborg G. Insulin-like growth factor (IGF-I) stimulates regeneration of the rat sciatic nerve. *Brain Res* 1989;486:39-8
- (63) Pooler AM, Guez DH, Benedictus R, Wurtman RJ. Uridine enhances neurite outgrowth in nerve growth factor-differentiated pheochromocytoma cells. *Neuroscience* 2005;134(1):207-14.
- (64) Huang EJ, Reichardt LF. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci* 2001;24(1):677-736.
- (65) Cansev M, Minbay Z, Goren B et al. Neuroprotective effects of uridine in a rat model of neonatal hypoxic–ischemic encephalopathy *Neurosci Lett* 2013;542:65-70.
- (66) Goren B, Cakir A, Sevinc C et al. Uridine treatment protects against neonatal brain damage and long-term cognitive deficits caused by hyperoxia. *Brain Res* 2017;1676:57-68.
- (67) Koyuncuoglu T, Turkyilmaz M, Goren B et al. Uridine protects against hypoxic-ischemic brain injury by reducing histone deacetylase activity in neonatal rats. *Restor Neurol Neurosci* 2015;33(5):777-84.
- (68) Goren B, Cakir A, Ocalan B et al. Long-term cognitive effects of uridine treatment in a neonatal rat model of hypoxic-ischemic encephalopathy. *Brain Res* 2017;1659:81-7.
- (69) Zhao Z, Li X, Li Q. Curcumin accelerates the repair of sciatic nerve injury in rats through reducing Schwann cells apoptosis and promoting myelinization. *Biomed Pharmacother* 2017;92:1103-10.
- (70) Feng X, Yuan W. Dexamethasone enhanced functional recovery after sciatic nerve crush injury in rats. *Biomed Res Int* 2015;627923.
- (71) Denk F, Huang W, Sidders B et al. HDAC inhibitors attenuate the development of hypersensitivity in models of neuropathic pain. *PAIN* 2013;154(9):1668-79.

- (72) Matsushita Y, Araki K, Omotuyi O, Mukae T, Ueda H. HDAC inhibitors restore C-fibre sensitivity in experimental neuropathic pain model. *Br J Pharmacol* 2013;170(5):991-8.
- (73) Cicko S, Grimm M, Ayata K et al. Uridine supplementation exerts anti-inflammatory and anti-fibrotic effects in an animal model of pulmonary fibrosis. *Respir Res* 2015;16(1):105.
- (74) Bulion VV, Selina EN, Krylova IB. Protective effect of uridine on metabolic processes in rat myocardium during its ischemia/reperfusion damage. *Biomed Khim* 2019;65(5):398-402.
- (75) Kim DH, Connolly SE, Zhao S et al. Comparison of macropore, semipermeable, and nonpermeable collagen conduits in nerve repair. *Journal of reconstructive microsurgery* 1993;9(06):415-420.



EK-1: KISALTMALAR

CDP-kolin	Sitidin difostat-kolin
SF	Normal Salin
SOD	Süperoksid dismutaz
MPO	Miyeloperoksidaz
GPx	Glutasyon peroksidaz
MDA	Malondialdehid
CAT	Catalaz
SFI	Siyatik Fonksiyonel Index
EMG	Elektromiyografi
U100	Üridin 100 Grubu
U500	Üridin 500 Grubu
PSH	Periferik Sinir Hasar
MMP	Matrix Metallopeptidaz
TIMP	Tissue metalloproteinaz inhibitör
IGF-I	İnsülin benzeri büyüme faktörü I
BUÜTF	Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi
DEHYUAM	Deney Hayvanları Yetiştirme, Uygulama ve Araştırma Merkezi
HADYEK	Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

EK-2: Resimler, Şekiller ve Tablolar Açıklamalar

Resim-1: UTP'nin kültürdeki SH davranışı üzerindeki etkilerine genel bakış: in vivo potansiyel alaka düzeyi. Ne denerve bir fenotip edinilmesi ne de SH'lerin proliferasyon hızı, izole SH'lerde in vitro olarak, UTP varlığında modüle edilmemiştir; yaralanmadan kısa bir süre sonra gerçekleşen iki önemli olay. SH'lerin kültürde göçü, hasardan sonra yaralı alandan SH'lerin göçünü teşvik etmekle ilgili olabilecek UTP ile arttırılmıştır. UTP ayrıca akson kılavuzluğu ve SH redifferentiasyonu için önemli bir süreç olan SH-akson teması sırasında N-kaderin geri kazanımını azaltmıştır. Yeniden farklılaştırma işlemindeki bu potansiyel etki, dbcAMP gibi farklılaşma sinyallerinin varlığında Krox-20 artışının UTP tarafından büyük ölçüde bozulduğu gözlemiyle de desteklenir. Ayrıca, UTP aksonal NRG1 sinyalini engelleyebilen ve SH yeniden dağıtım işleminin bozulmasına ve sonuç olarak miyelinasyonun bozulmasına katkıda bulunabilen ErbB3 reseptörünün SHG'de NRG tarafından aktivasyonunu azaltmıştır (27).

Resim-2: Sol yan yatar pozisyonda sağ gluteal bölgede insizyon sonrasında künt diseksiyonla açılarak siyatik sinir ortaya konuldu.

Resim-3: a) Siyatik sinir foramenden 1 cm uzaklıkta dermatom bıçağı ile tam kat kesisi yapıldı. b) Epinöral sinir anastomoz tekniği kullanılarak mikrocerrahi yöntemle proksimal ve distal sinir güdükleri 8-0 polypropylene suture ile aralarında 180° bulunan iki ayrı noktadan suture edildi.

Resim-4: Yazılım üzerinde akson sayımından önce oluşturulan sayım çerçevesi (Beyaz oklar sayıma dahil edilen kenarlar, siyah oklar sayıma dahil edilmeyen kenarlar)

Resim-5: Self amputasyona bağlı 3,4,5 parmakta amputasyon

Resim-6: a) Cerrahi sahada gelişen ince konnektif doku (Üridin 500 grub) **b)** Cerrahi sahada gelişen kalın konnektif doku (Kontrol grup) x4

Resim-7: SFI(Sciatic Funtional Index): Siyatik Sinir Fonsiyon İndeksi, E (Experimental): Deneysel, N(Normal): Normal, Print length (PL): Sağ arka

ekstremitte baskı mesafesi, Toe Spread (TS): Sağ arka ekstremitte parmak açıklığı, Intermediate Toe Spread (ITS): Sağ arka ekstremitte ara parmak açıklığı, Distance to other foot (TOF): Sağ-sol arka ekstremitte mesafesi olarak değerlendirildi

Resim-8:%1 toludin mavisi - %1 boraks ile boyanan ince kesitler. A, Kontrol grubu; B, Sham grubu; C, Üridin 100 mg/kg grubu; D, Üridin 500 mg/kg grubu. Bar, 20 mikrometre.

Resim-9: Periferik sinir liflerinin dejenerasyonu ve rejenerasyonu süreci. (A) Sağlam bir sinir lifi periferik olarak kesilir. (B) Yakın kılcal damarlardan endonöral tüpe giren makrofajlar, dejenere olan miyelin kılıfından kopan miyelin parçalarını içine alır. (C) Rejenerasyonla distal güdük içinde bir aksonal filiz meydana gelir. Schwann hücrelerinin yüzeyi bu büyüme konisini yönlendirir. (D) Yeni rejenerasyonun miyelinasyonu proksimal olarak başlar (58).

Resim-10: Kennedy yolağı yoluyla fosfatidilkolin (PC) biyosentezi. Sıçanlarda plazma sitidin, ana dolaşan pirimidindir, ancak insanlarda primer dolaşımdaki pirimidin, üridindir. Sıçan kan-beyin bariyerinde (KBB), Sitidin için yüksek afiniteli bir taşıyıcı bulunmadığından, sadece küçük miktarlarda dolaşan Sitidin beyin CTP(Sitidin Trifosfat)'sine dönüştürülür; bununla birlikte Üridin, beyne, yüksek afiniteli bir taşıyıcı (CNT2) yoluyla kolayca girerek UTP (Üridin Tri fosfat)'yi verir; bu daha sonra CTP sentaz ile CTP'ye dönüştürülür. Bu CTP, PC (Fosfokolin) oluşturmak için diasilgliserol (DAG) ile birleştirilen endojen CDP-kolini oluşturmak için fosfokolin ile reaksiyona girer(37).

Şekil-1: Tek taraflı siyatik sinir tam kat kesi ve sutür hasarında aktif-Kaspaz-3 analizi ile belirlenen apoptotik değişimler ve üridin tedavisinin bu apoptoza etkisi

Şekil-2: Grupların 6. hafta (sol sütun) ve 12. haftada (sağ sütun) SFI sonuçları

Şekil-3: Tüm gruplarda 6. hafta ve 12. haftada SFI karşılaştırmaları

Şekil-4: (A) 6. hafta ve (B) 12. haftadaki siyatik sinir ileti hızına etkisi elektromiyografi (EMG)

Şekil-5: Ölçüm alanında sayılan akson sayıları ve standart sapmaları, * kontrol grubu ile karşılaştırma ($p<0.05$).

Şekil-6: Milimetre karedeki akson sayıları ve standart sapmaları, * kontrol grubu ile karşılaştırma ($p<0.05$).

Şekil-7: Ortalama akson çapları ve standart sapmaları. * (Kontrol grubu ile karşılaştırma), $p = 0,001$. ^a Üridin 100 mg/kg grubunda kontrole göre artış, ^b, Üridin 500 mg/kg grubu için kontrole göre artış.

Tablo-1: Petersen ve ark tarafından tanımlanan Makroskopik Değerlendirme için sayısal değerlendirme şeması

Tablo-2: Erken dönem tek taraflı siyatik sinir tam kat kesi ve sütür hasarında oksidasyon parametrelerindeki değişimler ve üridin tedavisinin bu parametrelere etkisi; İstatistiksel analizler Tek Yönlü ANOVA'yı takiben post-hoc Tukey testi ile yapılmıştır. Kontrol grubuna göre kıyaslandığında * $p<0,05$, ** $p<0,01$ ve *** $p<0,001$ ve U100 grubuna göre kıyaslandığında ^a $p<0,05$ ve ^{aa} $p<0,01$ olarak belirtilmiştir. Miyeloperoksidaz (MPO), Malondialdehid (MDA) Süperoksid Dismutaz (SOD), Glutasyon Peroksidaz (GPx) ve Katalaz (CAT)

Tablo-3: Sinir ayrılabilirliği ve yapışıklığı ortalama ve standart sapma değerleri

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimi süresince her zaman bana destek ve yardımını esirgemeyen, yeterli bir uzman olarak yetişmem için emeğini esirgemeyen; ikinci ailem olarak gördüğüm başta tezimde bana danışmanlık yapan Prof. Dr. Ahmet BEKAR ve diğer saygıdeğer hocalarım Prof. Dr. Selçuk YILMAZLAR, Prof. Dr. Şeref DOĞAN, Prof. Dr. Hasan KOCAELİ, Doç. Dr. Mevlüt Özgür TAŞKAPILIOĞLU ve kısa zamanda bana deneyimlerini aktaran sevgili Dr. Öğr. Gör Pınar ESER OCAK, ayrıca tezimin hazırlanma sürecinde destek ve kolaylık sağlayan, bana rehberlik eden Farmakoloji AD Prof. Dr. Mehmet CANSEV, Anatomi AD Doç. Dr. İlker Mustafa KAFA hocalarıma ve çalışma arkadaşlarına da teşekkürlerimi sunarım. Zorlu yıllarda hayatımın değişmez bir parçası olan iyi ve kötü zamanlarımda yanımda olan asistan arkadaşlarıma, hemşireler, teknisyenler ve personele teşekkürü bir borç bilirim. Özellikle tezimi yazım aşamasında yardımlarını sıkça gördüğüm Sevgili Uzm. Dr. Ömer Gökay ARGADAL ve Dr. Buket SÖNMEZ arkadaşlarıma teşekkür ederim. Ameliyathanede beraber çalıştığım anestezi ekibi ve başta Prof. Dr. Hülya BİLGİN olmak üzere sonsuz teşekkürler.

Bugünlere gelmemde en büyük etken olan ve yanımda olmasalar da desteklerini her daim hissettiğim Sevgili Annem ve babama ve en yakın arkadaşım olan kardeşime en içten teşekkür ederim.

ÖZGEÇMİŞ

1980 yılında Tahran'da doğdum. İlkokul ve ortaokul eğitimimi Tahran'da aldım. Lise eğitimimi Tahran Fazilat Özel Lisesi'nde tamamladım. Tıp eğitimime 1998 yılında Tahran Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde başlayıp 2006 yılında mezun oldum. 2 Aralık 2014 tarihinden beri Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Beyin ve Sinir Cerrahi Anabilim Dalı'nda araştırma görevlisi olarak çalışmaktayım.