



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

ÜRİDİN TEDAVİSİNİN SIÇAN SİYATİK SİNİR HASARINDAKİ
REJENERATİF ETKİNLİĞİNDE EPİGENETİK MEKANİZMALARIN
ARACILIĞININ ARAŞTIRILMASI

Dr. Ali İmran ÖZMARASALI

UZMANLIK TEZİ

Bursa-2023



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

ÜRİDİN TEDAVİSİNİN SIÇAN SİYATİK SİNİR HASARINDAKİ
REJENERATİF ETKİNLİĞİNDE EPİGENETİK MEKANİZMALARIN
ARACILIĞININ ARAŞTIRILMASI

Dr. Ali İmran ÖZMARASALI

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Ahmet BEKAR

UZMANLIK TEZİ

Bursa-2023

ÖZET.....	ii
SUMMARY.....	iv
GİRİŞ.....	1
GEREÇ VE YÖNTEM.....	12
I. Genel Hazırlık ve Deney Prosedürü.....	13
II. Makroskopik Değerlendirmeler.....	16
III. Dokuların Elde Edilmesi.....	17
IV. Enzim ve Protein Analizleri.....	18
IV.A. ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) Analizleri.....	18
IV.B. Western Blot Analizleri.....	19
V. Histomorfolojik Çalışmalar.....	20
V.A. Osmiyum Tetroksit ile Resin Bloklama.....	20
V.B. Ultramikrotom ile Kesitleme.....	21
V.C. Toluidin Mavisi ile Boyama.....	22
V.D. Doku Örneklerinin Histomorfolojik Analizleri.....	23
VI. İstatistiksel Analizler.....	24
BULGULAR.....	25
I. Operatif ve Makroskopik Değerlendirme Verileri.....	25
II. Enzim ve Protein Analizleri.....	27
II.A. ELISA Sonuçları.....	27
II.B. Western Blot Sonuçları.....	27
III. Histomorfolojik Analizler.....	30
TARTIŞMA VE SONUÇ.....	32
KAYNAKLAR.....	38
EK-1: KISALTMALAR.....	44
EK-2: ŞEKİL, RESİM, TABLO VE GRAFİK AÇIKLAMALARI.....	46
TEŞEKKÜR.....	49
ÖZGEÇMİŞ.....	50

ÖZET

Periferik sinirlerin hasar sonrası rejenerasyonu güncel literatürdeki gelişmelere rağmen problem olmaya devam etmektedir. Periferik sinir hasarının tedavisinde sinir greftleme veya primer onarım tedavileri ile sinir rejenerasyonu yetersiz kalmakta, tam fonksiyonel iyileşme mümkün olmamaktadır. Çalışmamızda sıçan siyatik sinir transeksiyon modelinde rejeneratif etkinliği gösterilen üridinin epigenetik mekanizmalarının muhtemel aracılığı incelendi.

Sıçanlarda tek taraflı siyatik sinir transeksiyon ve primer anastomoz modeli uygulaması sonrasında intraperitoneal olarak 1 hafta süreyle günlük tek doz salin (kontrol) ya da üridin (500mg/kg) verilmesini takiben 8. gün siyatik sinirler blok olarak çıkartıldı. Eksize edilen materyallerden oluşan homojenatlarda histon deasetilaz 1 (HDAC1) enzim miktarı Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) ile ölçüldü ve ayrıca asetillenmiş Histon-H3 ve asetillenmiş Histon-H4 proteinlerinin miktarları yarı-kantitatif olarak Western Blot yöntemi ile analiz edildi. Paraformaldehit fiksasyonu yapılan siyatik sinir örneklerinde ise toplam miyelinli akson sayıları histomorfolojik olarak analiz edildi.

Sham ile karşılaştırıldığında Kontrol grubunda HDAC1 seviyesinin anlamlı seviyede yüksek ($p<0,001$), Kontrol grubu ile Üridin grubu karşılaştırıldığında, Üridin grubunda HDAC1 seviyesinin anlamlı seviyede düşük olduğu görüldü ($p<0,01$). Asetillenmiş Histon-H3 ve Histon-H4 düzeyleri sırayla Kontrol grubunda %18,51 ve %20,02'ye düşerken ($p<0,001$), Üridin grubunda %62,54 ve %51,68'e yükseldi ($p<0,01$, $p<0,05$). Akson sayısı olarak da gruplarda anlamlı fark olduğu ($p<0,001$) görüldü.

Sonuç olarak sistemik üridin tedavisinin siyatik sinir hasarı primer anastomoz modelinde HDAC1 enzim miktarında azalma, asetillenmiş Histon-H3 ve Histon-H4 proteinlerinde artış, miyelinli akson sayısında artış ile periferik sinirde rejeneratif etkinliğini artırdığı gösterildi.

Anahtar kelimeler: Üridin, siyatik sinir hasarı, periferik sinir rejenerasyonu, histon deasetilaz, mekanizma

SUMMARY

Investigation of Mediation of Epigenetic Mechanism in the Regenerative Effects of Uridine Treatment in Rat Sciatic Nerve Damage

Post-injury regeneration of peripheral nerves is still a problem despite advances medical literature. In the treatment of peripheral nerve damage, nerve regeneration is insufficient with nerve grafting or primary repair treatments, and full functional recovery is not always achieved. In this study, the possible mediation of epigenetic mechanisms in the regenerative activity of uridine is investigated in the rat sciatic nerve transection model.

After unilateral sciatic nerve transection model in rats, a single daily dose of saline (control) or uridine (500mg/kg) was administered intraperitoneally for 1 week. The amount of histone deacetylase 1 (HDAC1) enzyme in the homogenates was measured by Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) and the amounts of acetylated Histone-H3 and acetylated Histone-H4 proteins were analyzed semi-quantitatively by Western blot method. Total myelinated axon counts were analyzed histomorphologically.

Compared with Sham, HDAC1 level was found sufficiently higher in Control group ($p < 0.001$) and sufficiently lower in Uridine group ($p < 0.01$). Acetylated Histone-H3 and acetylated Histone-H4 levels in order decreased to %18.51 and %20.02 in Control group ($p < 0.001$), increased to %62.54 and %51.68 in Uridine group ($p < 0.01$, $p < 0.05$). There was also a significant difference between the groups in terms of axon count ($p < 0.001$).

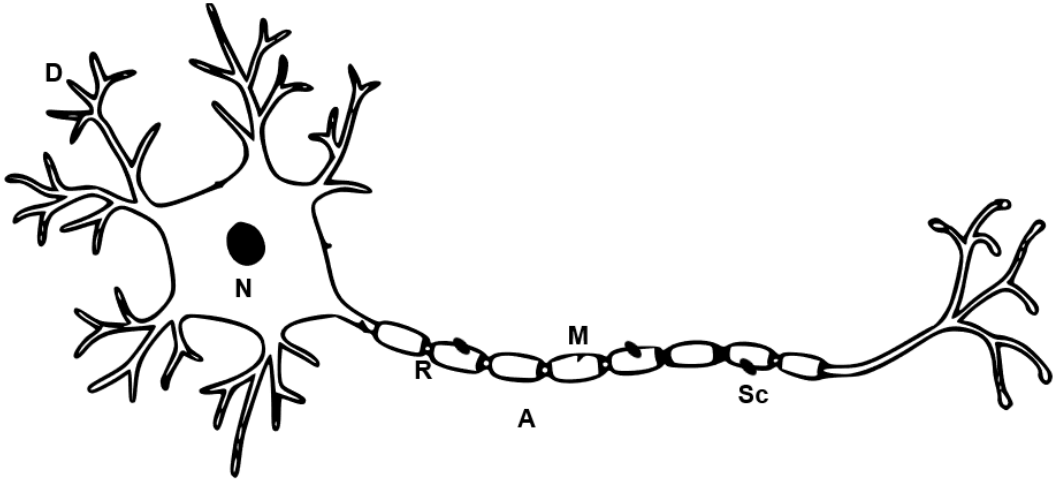
We showed that systemic uridine treatment increased the regenerative efficiency of the peripheral nerve with a decrease in the amount of HDAC1 enzyme, an increase in acetylated Histone-H3 and acetylated

Histone-H4 proteins, an increase in the unit of myelinated axons in the primary anastomosis model of sciatic nerve injury.

Key words: Uridine, sciatic nerve injury, peripheral nerve regeneration, histone deacetylase, mechanism.

GİRİŞ

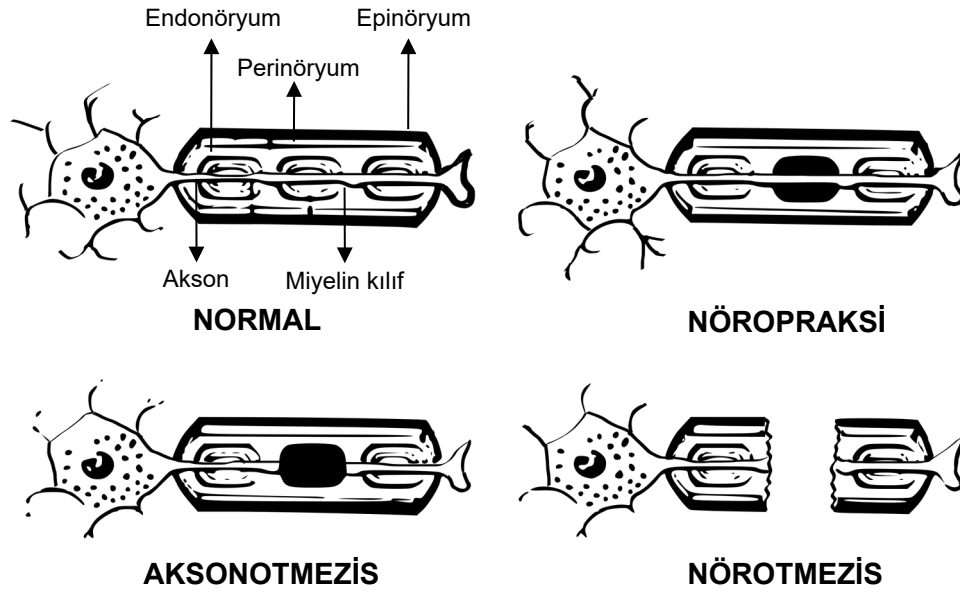
Sinir hücreleri (nöronlar); sayısız uzantıları, aksonları ve dendritleri aracılığıyla diğer hücrelerden sinyal alan ve gönderen özel hücrelerdir. Nöronlar akson ve dentritik uzantılardan oluşur. Dendritler gelen sinaptik uyarıyı sitoplazmaya alır, aksonlar ise sinaptik terminale uyarıları iletir. Periferik sinir yapısı ise endonöryumlarla sarılı miyelinli/miyelinsiz akson lifleri ve Schwann hücrelerinin toplanarak perinöryumlar tarafından sarılan fasiküllerden ve nihayetinde epinöryum tarafından sarılan sinir demetlerinden oluşmaktadır. Schwann hücrelerinin fonksiyonları merkezi sinir sistemindeki glial hücrelerin işlevlerine benzerdir ve periferik sinirlerde oldukça önemli görevleri mevcuttur. Sağlıklı bir nöronda Schwann hücreleri miyelin kılıf sentezi ve çevre ortam stabilitesinden sorumlu olup sinir yaralanması durumlarında miyelin klirensi, immün sistem aktivasyonu, nörotrofik faktörlerin salınımı ve aksonal filiz ve büyüme konisini yönlendirmekle görevlidir (1,2) (Şekil-1).



Şekil-1: Nöronun şematik gösterimi **D:** Dentrit, **N:** Nöron, **R:** Ranvier düğümü, **A:** Akson, **M:** Miyelin kılıf, **Sc:** Schwann hücresi.

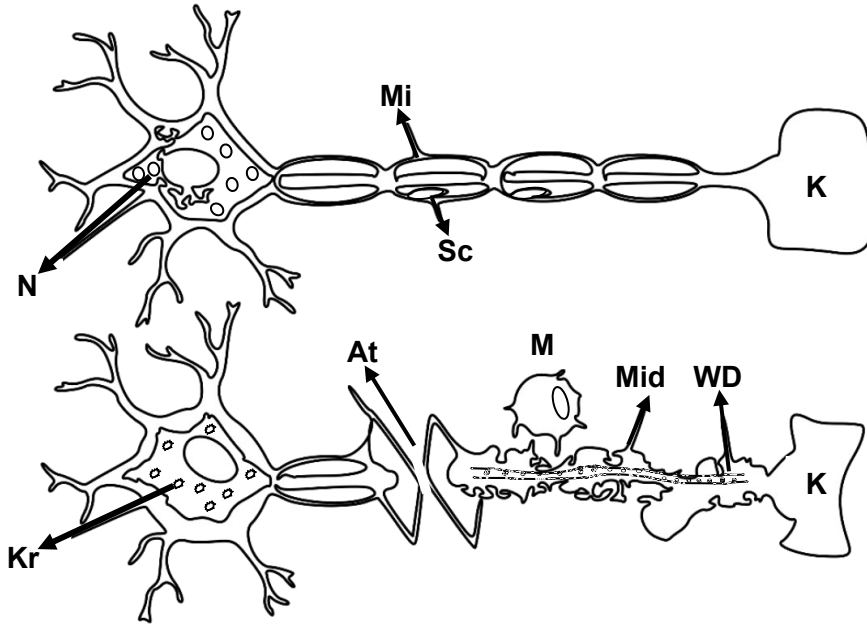
Periferik sinir hücrelerinin santral sinir sistemindeki hücrelerin aksine rejenerasyon yeteneğinin olduğu bilirse de hasar sonrası rejenerasyon hızı (1 mm/gün) yeterli değildir ve sinir hasarı meydana geldiğinde tam fonksiyonel iyileşme mümkün olmamaktadır (2,3). Bunların sebepleri arasında skar dokusu oluşması ve Schwann hücre disfonksiyonu, aksonal filizin yanlış yönleneşmesi, denervasyon kaybı sonrası irreversible kas atrofileri sayılabilir. Nöronların 1 mm/gün'lük sinir iyileşme hızı göz önünde bulundurulduğunda hedef organdan 2,8 cm'den daha proksimaldeki bir lezyonun kronik denervasyonun zararlı etkileri nedeniyle yetersiz iyileşme ile karşı karşıya kalacağı bilinmektedir (2). Periferik sinir hasarının tedavisinde sinir greftleme veya primer onarım tedavileri ile sinir rejenerasyonu yetersiz kalmakta, tam fonksiyonel iyileşme gerçekleşmemektedir. Periferik sinir hasarında duysal/motor fonksiyonun geri kazanımı arttırmak için bugüne kadar birçok yaklaşım ortaya atılmış olsa da (4-6) hasar sonrası %100 fonksiyonel geri kazanımı sağlayabilen bir tedavi henüz bulunamamıştır (3).

Periferik sinir yaralanmaları sıklıkla çalışma çağındaki genç erişkinlerin etkilendiği ciddi morbiditeye ve fonksiyon kaybına yol açan bir durumdur. Amerika Birleşik Devletleri'nde birinci seviye travma merkezinde yapılan bir dekatlık süreyi kapsayan araştırmada periferik sinir yaralanma prevalansı %2,8 olarak bildirilmiştir (7). En sık künt ve penetran travmalar sonrası sinirde kesilme veya ezilme şeklinde hasar meydana gelir. Akson hasarlandığında ilişkili değişiklikler lezyonun her iki tarafında da ortaya çıkar (2) ve kısmi veya tam duysal/motor kayıplar gözlenir. Hasarın derecesine göre periferik sinir yaralanmaları ilk olarak Seddon tarafından 1943 yılında sınıflandırılmıştır (8). 1951 yılında Sunderland ise bu sınıflamayı 5 dereceye ayırarak geliştirmiştir ve sinir yaralanmaları ana olarak 3 kategoride incelenmiştir; nöropraksi, aksonotmezis ve nörotmezis (9). Nöropraksi ve aksonotmezis genellikle kompresyon, aşırı gerilme ve sinir sıkışması sonrasında görülür. Nörotmezise kıyasla daha az semptomatiktir ve daha iyi prognoza sahiptir. Yaralanmanın derecesi ve gerekirse yapılan cerrahiye göre prognoz değişmekle birlikte nörotmezis en kötü prognoza sahiptir ve spontan iyileşme hiç görülmez (9)(Şekil-2).



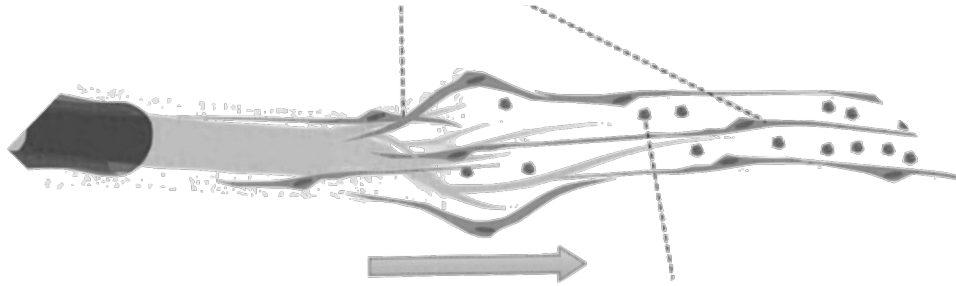
Şekil-2: Periferik sinir yaralanma tiplerinin şematik gösterimi.

Periferik sinir transeksiyon hasarında, dejeneratif değişiklikler sinirin her iki tarafında da ortaya çıkar (4-6). Hussain ve ark.'ları (3) periferik sinir hasarında sinirin proksimal segmenti dejeneratif değişikliğe giderken distal segmentinin 1850'de Waller tarafından tanımlanan Wallerian dejenerasyona (WD) uğradığını bildirmişlerdir (Şekil-3). Patofizyolojik anlamda apoptoz (10), oksidatif stres (11), inflamasyon (12), ekstrasellüler matriksin yıkımı (13) ve daha pek çok olay periferik sinir hasarını karmaşık hale getirir. Aksotomiye takiben Schwann hücre fenotipi değişikliğe uğrar ve ortama sitokin salınımı ile immünreaksiyon başlatılır. Schwann hücreleri ve makrofajlar distal güdükte miyelin kalıntılarını fagosite eder. Nörotrofik ajanların salınımı nöronal hayatta kalma ve büyümeyi destekler (4,14). Schwann hücreleri çoğalır ve Bungner bantlarını (Şekil-4) oluşturmak üzere belirgin bir uzamayla (üç kat) morfolojik değişikliklere uğrar, bu bantlar yeniden şekillenir ve yenilenen akson için bazal laminayı hazırlarlar (15). Sinir rejenerasyon süreci Schwann hücrelerinin rehberliğinde aksonal filiz ve büyüme konisi oluşarak devam eder.



Şekil-3: Nöronal hasar sonrası Wallerian dejenerasyonun şematik görüntüsü
N: Nissl substratları, **Mi:** Miyelin, **Sc:** Schwann hücresi, **K:** Kas, **Kr:** Kromatoliz, **At:** Aksonal transeksiyon, **M:** Makrofaj, **Mid:** Miyelin debris, **WD:** Wallerian dejenerasyon.

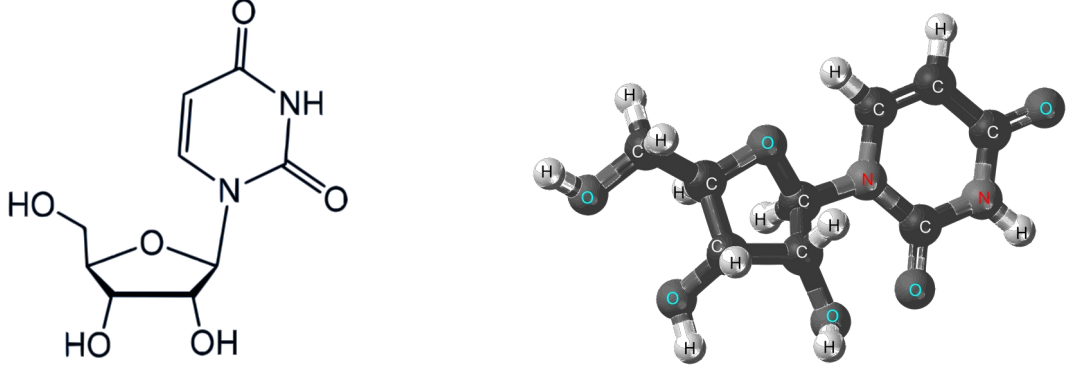
Onarım fenotipindeki Schwann hücreleri "Bungnerin Bantları" adı verilen formasyona dönüşerek distal güdüğe uzanır.



Schwann hücreleri nörotrofinleri sekrete ederek nöronal rejenerasyona kılavuzluk eder.

Şekil-4: Schwann hücreleri distal köprüler (Bungner' in bantları) oluşturarak rejenerasyon sürecine kılavuzluk eder. Aksonal rejenerasyon (ok yönünde) distale doğrudur ve rejenerasyon 1 mm/gündür (2).

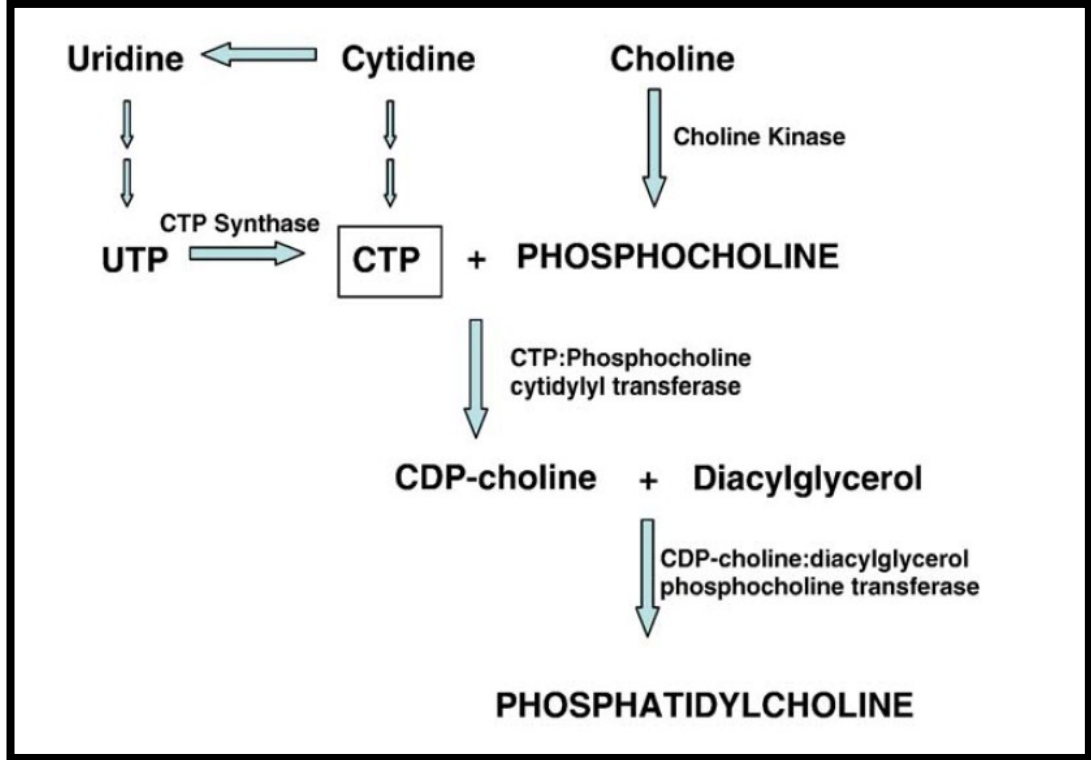
Üridin insanlarda ve diğer memelilerde başlıca dolaşımında (16,17) ve anne sütünde (18) bulunan major pirimidin nükleozidi olup dokularda da hem kendisi hem de fosfat bağlı nükleotidleri yaygın olarak bulunur (Şekil-5).



Şekil-5: Üridinin ($C_9H_{12}N_2O_6$) moleküler yapısı. Üridin RNA'nın yapısına katılan major pirimidin nükleozididir. Molekül ağırlığı 244,20 g/mol olup post-translasyonel modifikasyon ve gen ekspresyonunda önemli görevleri mevcuttur.

Üridin; Kennedy yolağı (19) aracılığıyla membranlardaki fosfolipidlerin üretiminin prekürsörü olup bu yolakta hız kısıtlayıcı basamak olarak sentezlenen sitidin difosfat-kolin (CDP-kolin) biyosentezini laboratuvar ortamında (20) ve in vivo (17) koşullarda artırdığı bilinmektedir (Şekil-6).

Geçmiş yayınlarda sistemik yolla üridin uygulanmasının nöronların sinaptik bağlantılarını artırdığı bildirilmiştir (21). Bu özelliğiyle siyatik sinir transeksiyon ve primer anastomoz modellerinde denenen NGF (Nöronal Growth Faktör)'lerin bu modelde bildirilen etkinliğini taklit edebileceği düşünülmektedir (22).



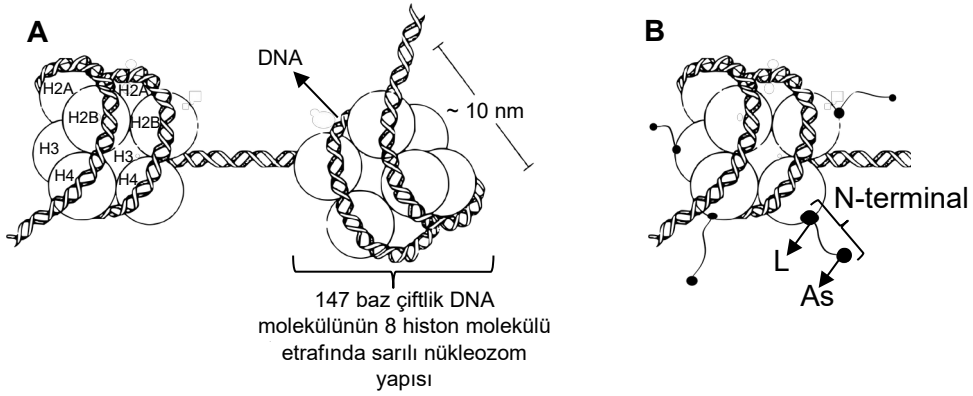
Şekil-6: Kennedy yolağı aracılığı ile fosfatidilkolin biyosentezi. Üridin Kennedy yolağı aracılığı ile membran fosfolipid biyosentezinin öncüsüdür ve hız kısıtlayıcı basamağı olan CDP-kolin sentezini deneysel ve in vivo koşullarda artırdığı bilinmektedir. UTP: Üridin trifosfat, CTP: Sitidin trifosfat, CDP: Sitidin difosfat. (23).

Üridinin periferik sinirlerde oluşturulan hasara karşın etkinliği tek başına nöronlarda proliferasyonu artırıcı etkisi ile değil, ek olarak apoptozu önleyici etkisi ile de ilgilidir. Yapılan araştırmalarda üridin molekülünün dışarıdan uygulanması suretiyle deneysel hipoksik-iskemik ensefalopati (HİE) (24-26) ve hiperoksik (27) beyin yaralanması modellerinde apoptozu sekonder nöronların kaybını önleyerek nöroproteksiyon sağladığı ve uzun dönemde sıçanlardaki kognitif disfonksiyonu anlamlı şekilde azalttığı gösterilmiştir (26,27). Buna ek olarak üridin tedavisi HİE modelinde histon deasetilaz (HDAC) etkinliğini azaltarak ve asetillenmiş Histon-H3 ile asetillenmiş Histon-H4 seviyelerini artırarak (25) nöron iyileşmesini sağlamaktadır. Siyatik sinir yaralanmasında da apoptotik değişiklikler (10) ve nöroinflamasyon (12) gibi değişiklikler nöronal tahribata katkıda bulunmakta

ve nöronun fonksiyonel iyileşmesini engellemektedir. HDAC inhibitörlerinin periferik sinir hasarı sonucu gelişen nöropatik ağrıyı azalttığı da literatürde gösterilmiştir (28,29). Yakın zamanda yapılan bir araştırma ise, periferik sinir hasarının tedavisinde ve fonksiyonel geri kazanımın artırılmasında epigenetik mekanizmaların önemini net olarak ortaya koymaktadır. Bu çalışmaya göre histon deasetilaz 3 (HDAC3) enzimine bağlı bir yolak periferik miyelin gelişimine ve fonksiyonel rejenerasyona engel olmakta ve bu yolağın inhibisyonu periferik miyelinizasyonu artırmaktadır (30).

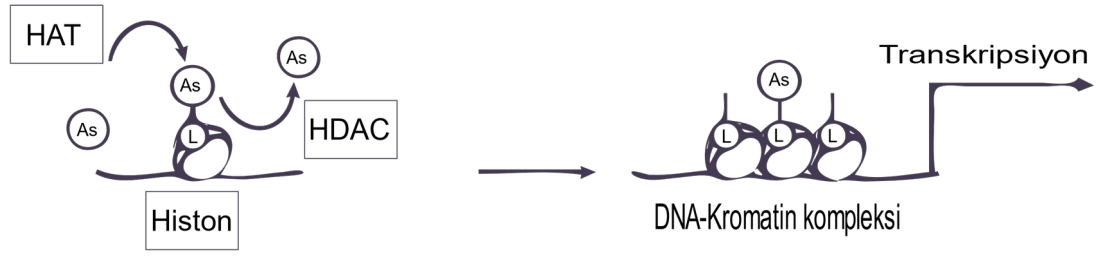
Nörodejenerasyon dâhil olmak üzere çeşitli nörolojik hastalıkların patofizyolojisinde anormal histon asetilasyonu veya histon asetilasyon mekanizmasının disfonksiyonu rol oynamaktadır (31,32). Post-translasyonel modifikasyonlar proteinlerin asetilasyonunu gerektirir ve hücrel aktivite için önemlidir. İn situ ortamda protein asetilasyonu işlevsel olarak zıt olan protein asetilazlar ve deasetilazlar tarafından yapılmaktadır (33). Hücre içindeki deoksiribonükleik asit (DNA) kromatin formunda muhafaza edilir. Metabolizma, yaşlanma gibi birçok önemli hücrel işlevi düzenleyen DNA kromatin yapısı remodeling ve transkripsiyonel regülasyona uğrar. Bu regülasyonda post-translasyonel modifikasyonlardan olan protein asetilasyonu önemlidir (33).

Nükleozomlar kromatinin temel birimidir. Yaklaşık 147 baz çiftten oluşan, oktamer yapıya sahip histon proteinlerine sarılı haldeki DNA formudur. Histonun oktamerik yapısı ikişer adet H2A, H2B, H3 ve H4 histon proteinlerinden oluşur (34). Histonlar, N-terminal ve lizin kalıntıları bulundurur. Histonlarda bulunan bu N-terminallerindeki lizin uzantılarının ϵ -amino grubuna bir asetil molekülünün eklenmesi sonucu asetilasyon sağlanır (Şekil-7). Asetilasyon ise histon modifikasyonu için en temel olaydır (33).



Şekil-7: Nükleozomun **(A)** ve N-terminalin **(B)** şematik gösterimi L: Lizin, As: Asetil.

Proteinlerin karmaşık yapısının biyolojisinin düzenlenmesinde başlıca olay spesifik lizin kalıntıları ile kovalent bağlı asetil gruplarının modifikasyonudur. Her modifikasyon histon konfigürasyonunu ve bu da DNA erişilebilirliğini değiştirir. Bu asetilasyon mekanizmaları dinamik bir olaydır ve histon asetilaz-histon deasetilaz (HAT-HDAC) enzim grupları tarafından düzenlenir. Güncel literatürdeki birçok çalışmada histon asetilasyonu yoluyla modifikasyonunu ve transkripsiyonu sağlaması sebebiyle bu proteinlerin hücre fonksiyonlarındaki ve çeşitli hastalıkların patofizyolojisindeki rollerini araştırılmıştır. Histonların asetilasyonu protein substratlarına asetil grubu ekleyen HAT'lar ve asetil grubunu uzaklaştıran HDAC'ların aktivitesi ile gerçekleşir. Histonların lizin kalıntılarının asetillenmesini gerçekleştiren HAT'lar; DNA ve histonlar arasındaki sağlam olan nükleozom yapısının gevşemesini sağlayarak transkripsiyon faktörlerinin hedef gene ulaşması ve sonrasında gen ekspresyonunun gerçekleşmesini sağlar. Histonların lizin kalıntılarının deasetilasyonu ise HDAC'lar tarafından gerçekleştirilir ve DNA histonlara sıkı bir şekilde tutunarak bunun sonucunda transkripsiyon gerçekleşemez (Şekil-8) (33).



Şekil-8: Spesifik lizin (L) kalıntılarındaki histon asetil (As) molekülünün asetilasyon seviyeleri, histon asetilazlar (HAT'ler) ve histon deasetilazlar (HDAC'ler) tarafından asetilasyon ve deasetilasyonun eşzamanlı gerçekleşmesi ile belirlenir. Histonların asetilasyonu ve deasetilasyonu, DNA-Kromatin komplekslerinin konformasyonel yapısını ve ardından transkripsiyonel gen ekspresyonunu oluşturmak için hayati öneme sahiptir. (33).

HDAC ailesinin gen haritalaması yapılarak 11 izoformu kapsamlı olarak tanımlanmıştır (35,36). İzoformları; sınıf I, II (a,b), III ve IV olacak şekilde beş temel sub-gruba ayrılmıştır (Tablo-1).

Tablo-1: HDAC sınıflandırılması ve hücre içi lokalizasyonları (37).

HDAC İzoformu	Sınıf	Hücre içi lokalizasyon
HDAC 1	1	Genellikle nükleus
HDAC 2	1	Nükleus
HDAC 3	1	Genellikle nükleus/sitoplazma
HDAC 8	1	Genellikle sitoplazma
HDAC 4	2-a	Sitoplazma/nükleus
HDAC 5	2-a	Sitoplazma/nükleus
HDAC 7	2-a	Sitoplazma/mitokondri/nükleus
HDAC 9	2-a	Sitoplazma/nükleus
HDAC 6	2-b	Sitoplazma
HDAC 10	2-b	Sitoplazma/nükleus
SIRT 1-7	3	Sitoplazma/mitokondri/nükleus
HDAC 11	4	Genellikle nükleus

HDAC: Histon deasetilaz.

SIRT: Sirtüinler.

Sınıf I HDAC'lar 4 alt grupta incelenmektedir: HDAC1, HDAC2, HDAC3 ve HDAC8. HDAC1 ve 2 daha çok nükleustadır, HDAC3 ise sitoplazma ve nükleus arasında seyrederek. HDAC1'in aktivitesi henüz aydınlatılamamıştır fakat nöronal progresyon ve diferansiyasyonlarında rol oynadığı düşünülmektedir (38). HDAC2'nin de nöron diferansiyasyonunda etkili olabileceğini düşündüren araştırmalar mevcuttur (39). HDAC3 nöronal sağkalım ve patofizyolojik mekanizmalarda rol oynar ve serebellar granül hücrelerinde yüksek oranda eksprese edilir. Deneysel Huntington hastalığı (HH) modelinde poliglutaminin toksisitesini artırdığı bildirilmiştir (40). HDAC8'in araştırıldığı gen ekspresyonu analizi yapılan bir araştırmada, beyin tümöral dokusunda tespit edilmiştir ve normal merkezi-periferik sinir sistemi dokularında görülmediği bildirilmiştir (36).

Sınıf II HDAC'lar ikiye ayrılır: Sınıf II-a HDAC'lar (4,5,7 ve 9) ve sınıf II-b HDAC'lar (6 ve 10). Sınıf II-a HDAC'lar sitoplazma ve nükleus arasında seyrederek. HDAC4'ün serebellum granüler hücrelerinde in vitro ortamda apoptozisi indüklediği bildirilmiştir (41). HDAC5'in HH'da korteks nöronlarında görüldüğü ve serebellum granüler nöronlarında apoptotik olduğu bildirilmiştir (42). Periferik sinir rejenerasyonunda ise HDAC5'in kalsiyuma duyarlı nükleer eksportunun, periferik aksotomiden sonra gerçekleştiği ve in vitro rejeneratif gen ekspresyonunu başlatmak için dorsal root ganglion nöronlarında histon asetilasyonunu arttırdığı gösterilmiştir (43). HDAC9'un ise dendritik sinaptik bağlantıları azalttığı ve HDAC9 delesyonu ile dendrit büyümesini desteklediği gösterilmiştir (44). Deneysel çalışmalar normal gelişim sürecinde HDAC6'nın etkisinin olmadığını ancak sinir hasarı ya da patolojik durumlarda önemli rol oynadığını göstermiştir (45). Deneysel çalışmalar ile HDAC10'un, HDAC3 ve HDAC4'e benzer miktarda asetillenmiş Histon-H4 peptidinin deasetilasyonunu sağladığı gösterilmiştir (46).

Sınıf III HDAC'lar Sirtüinler (SIRT 1-7) olarak tanımlanmıştır. Sirtüinlerin fonksiyon ve yapısı diğer HDAC'lardan farklıdır (33). Diğer HDAC grupları çinko bağımlıyken, SIRT'ların kofaktörü NAD⁺ (Nikotinamid adenin

dinükleotid)'e bağımlıdır. SIRT'ların sinir sistemi gelişim ve rejenerasyonunda etkili olduğu bildirilmiştir (47).

Sınıf IV HDAC (HDAC11) diğer sınıflardan yapıcı farklıdır ve çoğunlukla nükleustadır (33). HDAC11,-3,-5 beyin dokusunda fazlaca sentezlenirken HDAC10,-9,-7 daha düşük oranlarda sentezlenir. Çoğu HDAC11; CA1, CA3 ve dentat girusta daha az oranda granüler tabaka ve purkinje hücre tabakasında eksprese edilir (35).

Son yıllarda yapılan araştırmalar neticesinde epigenetik mekanizmaların daha iyi anlaşılması periferik sinir rejenerasyonunun tedavisinde yeni pencereler açmıştır.

Çalışmamızda üridinin sıçan siyatik sinir transeksiyon ve primer anastomoz modelinde daha önce gözlemlenmiş olan rejeneratif etkinliğinde periferik sinir rejenerasyonu açısından önemli olan epigenetik mekanizmaların (HDAC1 enzim seviyeleri ile asetillenmiş Histon-H3 ve asetillenmiş Histon-H4 düzeyleri) aracılığı araştırılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi (BUÜTF) Deney Hayvanları Yetiştirme ve Araştırma Merkezi'nde (DENHAB) üretilen Sprague Dawley ırkı, 3-6 aylık, erkek cinsiyette, 300-400 gr ağırlığında, 50 adet sıçandan faydalanıldı. Bağımsız bir görevli tarafından randomize edilen sıçanlar 3 grupta; grup 1'de 18, diğer gruplarda 16 adet olacak şekilde sınıflandırıldı ve tedavileri aşağıda belirtildiği şekilde yapıldı.

Grup 1 (n=18) Sham Grubu: Cerrahi uygulanan ancak sinir kesisi yapılmayan ve 1 ml/kg salin tedavisi uygulanan grup.

Grup 1-a: 8 sıçan enzim ve protein analizlerinde kullanıldı.

Grup 1-b: 10 sıçan histomorfolojik incelemelerde kullanıldı.

Grup 2 (n=16) Kontrol Grubu: Sinir kesisi uygulanan ve intraperitoneal 1 ml/kg salin tedavisi uygulanan grup.

Grup 2-a: 8 sıçan enzim ve protein analizlerinde kullanıldı.

Grup 2-b: 8 sıçan histomorfolojik incelemelerde kullanıldı.

Grup 3 (n=16) Üridin Grubu: Sinir kesisi uygulanan ve intraperitoneal 500 mg/kg üridin (Uridine U37550-10G, Merck KGaA, Darmstadt, Almanya) tedavisi uygulanan grup.

Grup 3-a: 8 sıçan enzim ve protein analizlerinde kullanıldı.

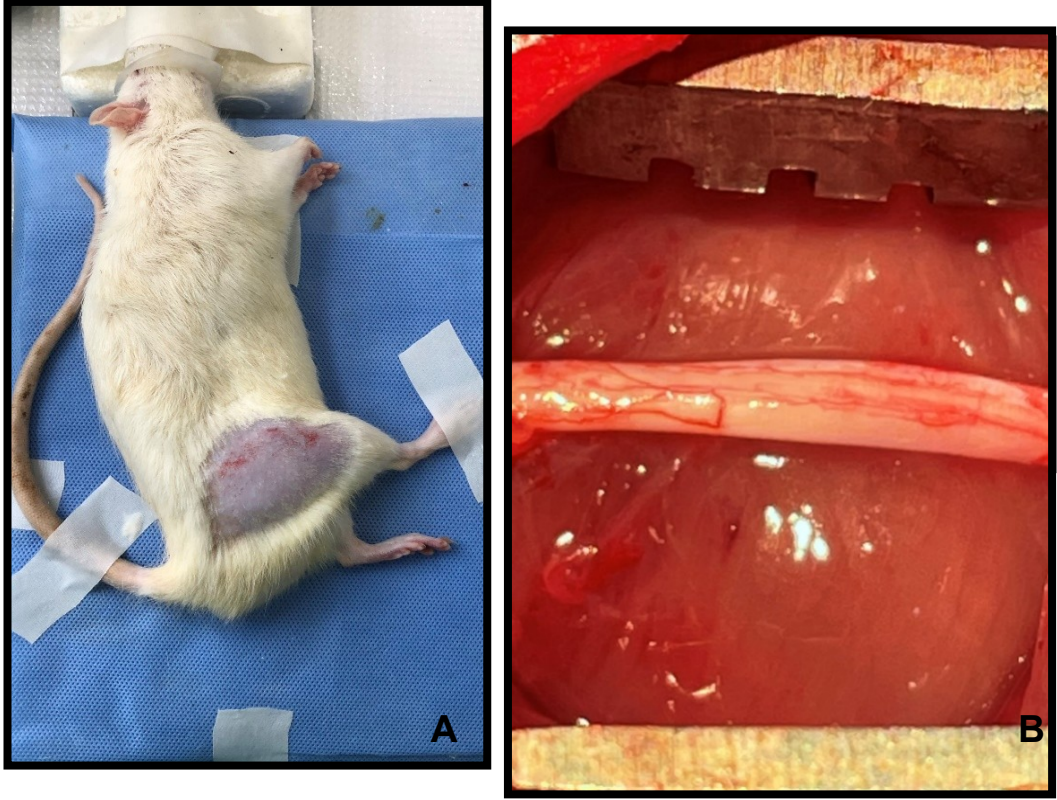
Grup 3-b: 8 sıçan histomorfolojik incelemelerde kullanıldı.

Çalışma için BUÜTF Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (HADYEK)'nin 2021-08/02 numaralı ve 15.06.2021 tarihli onayı alındı, TTU-2021-708 proje koduyla Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi desteği alındı. BUÜTF DENHAB'dan sıçanlar temin edildi ve Aralık 2021-Ocak 2023 tarihlerinde deney tamamlandı.

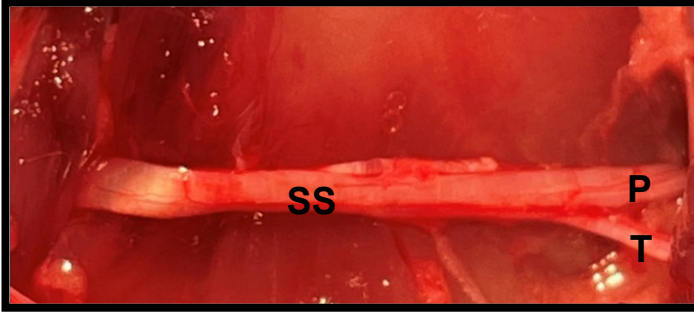
Çalışmanın analiz aşaması Tıbbi Farmakoloji ve Anatomi Anabilim Dalı laboratuvarlarında yapıldı. Anatomik diseksiyonun tüm aşamaları operasyon mikroskobu (Zeiss Opmi, Carl Zeiss Meditec Inc. Almanya) ile yapıldı ve profesyonel fotoğraf makinesi (Canon EOS 600D tm, Japonya) ile arşivlendi.

I. Genel Hazırlık ve Deney Prosedürü

Sıçanlar %2-3 sevofluran (Sevorane®likid, Aesica Queenborough Ltd. Queenborough Kent MG11 5EL, İngiltere) içeren bir indüksiyon kabına yerleştirilerek genel anestezi için hazırlandı. Ardından anestezi uygulanmış sıçanlar bir diseksiyon masasının üstüne sol yan yatar pozisyonda yerleştirildi ve idame için %1-2'lik doza geçildi (Resim-1). Anestezi derinliğini test etmek amacı ile sıçanların arka ayaklarına pedal çekme testi yapıldı ve gözün medial kantusuna dokunarak gözlerde palpebral reflekslerin yokluğu kontrol edildi. Operasyon sahasını açığa çıkarmak için arka bacakta tüyler tıraş edildi ve tıraşlı bölgeler %70 etanol ve %10'luk povidone iyodine (İsolol®, Merkez İlaç A.Ş., İstanbul) ile muamele edilerek antisepsi sağlandı ve girişim yapılacak saha açıkta bırakılarak steril örtüm gerçekleştirildi. Bir neşter veya makasla, arka bacak boyunca femur başı palpe edildikten sonra (Femur, siyatik sinirin hemen proksimalindedir) dizden torakanterin üst kısmına kadar 2-3 cm'lik posterolateral cilt insizyonu yapıldı. Cilt insizyonu yaptıktan sonra biceps femoris ile gluteus kası arasındaki düzlem bulunarak mikrodiseksiyon makası yardımıyla diseksiyona devam edildi ve alttaki fasyayla ayrıldı, küt diseksiyonla ilerlenerek her iki kas bloğu arasına ekartör yerleştirildi ve siyatik sinirin 1-2 cm'si ortaya çıkarıldı. İnce forseps ve iris makasıyla, siyatik siniri sıkıştırmamaya veya kesmemeye özen göstererek siniri çevreleyen bağ dokusundan dikkatlice diseke edilerek foramenden çıkan siyatik sinirin tibial ve peroneal dallarının bifurkasyonuna kadar olan unifasiküler sinir segmenti görünür hale getirildi (Resim-2).



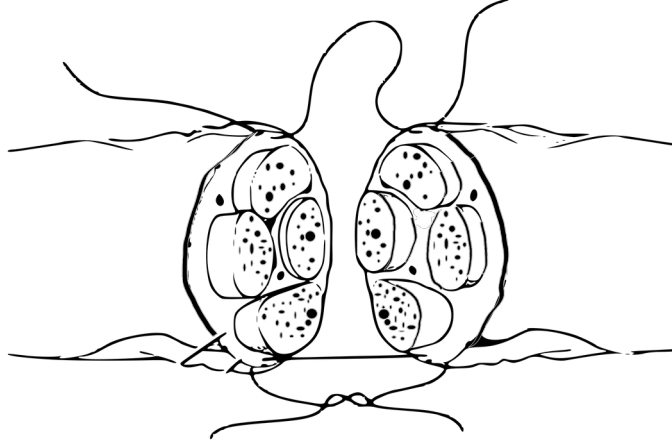
Resim-1: Sol lateral dekübit pozisyonda **(A)** posterolateral insizyonu takiben künt diseksiyon ile ilerlenerek sağ siyatik sinir **(B)** açığa çıkarıldı.



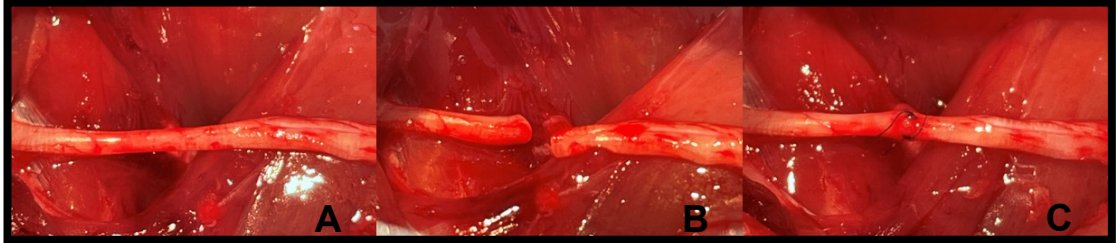
Resim-2: Siyatik sinir ve distal fasiküler dallanma noktası **SS:** Siyatik Sinir, **P:** Peroneal Fasikül, **T:** Tibial Fasikül.

Bu işlemi takiben, foramenin 10 mm uzağında root hooku ile kaldırılan sinirde dermatom bıçağı kullanılarak lineer tam kat kesi yapıldı. Mikroşirurjikal teknikle sinir epinöriyumlarından yapılmak suretiyle sütürasyon tekniği kullanılarak 8-0 prolen sütün (Prolene, Ethicon® Ltd, Somerville NJ,

ABD) ile iki ayrı noktadan aralarında 180° bulunacak şekilde birleştirilerek primer anastomoz gerçekleştirildi (Şekil-9, Resim-3).



Şekil-9: Epinöral sütün tekniğinin şematik gösterimi.



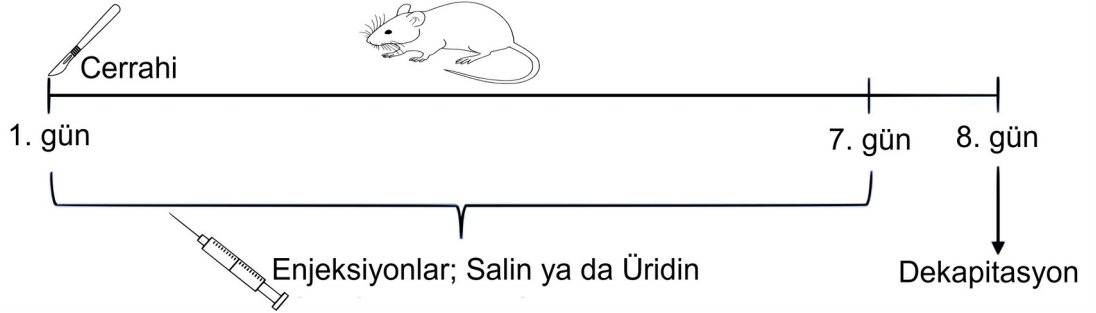
Resim-3: Künt diseksiyon ile ilerlenerek unifasiküler siyatik sinir segmenti ortaya kondu (A). Takiben root hooku ile kaldırılan siyatik sinirde dermatom bıçağı yardımı ile tam kat sinir kesisi oluşturuldu (B). Epinöral sinir sütünasyon yöntemi yardımıyla aralarında 180° bulunan iki adet sütün ile distal ve proksimal güdük arasında primer anostomoz sağlandı (C).

Künt diseksiyon sonrası açılan fasya ve kas dokuları traksiyon serbestleştikten sonra spontan olarak siyatik sinirin üstünü kapattığından sütünasyon işlemi uygulanmadı. Cilt 5-0 prolen sütün ile kapatıldı ve ardından sıçanlara analjezik olarak tek doz buprenorfin (0,05 mg/kg; subkutan) ve

profilaktik olarak tek doz 50 mg/kg intraperitoneal sefazolin (İespor®, İE Menarini İlaç Sanayi A.Ş., İstanbul, Türkiye) uygulandı.

Mikrocerrahi ve tedaviler sonrasında tüm deneklerin uyanması beklenerek kafeslere alındı. Cerrahi işlem sonrasında tüm sıçanlar 12 saatlik döngüye sahip aydınlık/karanlık odalarda, yiyecek ve su alımları serbest bırakılarak tekli kafeslerde takip edildi.

Tedaviler cerrahinin yapıldığı gün itibariyle başlatıldı, enjeksiyon tedavileri öncesinde tüm sıçanlar tartıldı ve ağırlık kaybı olmadığı teyit edilerek tedavileri 7 gün süreyle verildi. Cerrahiden sonraki 8. günde sıçanlar; enzim ve protein çalışmaları (her gruptan n=8) ve histomorfolojik çalışmalar (1. gruptan n=10, diğer 2 gruptan n=8) için anestezi altında sakrifiye edilerek çalışmanın deneysel kısmı tamamlandı (Şekil-10).



Şekil-10: Deney akış şeması.

II. Makroskopik Değerlendirmeler

Deney kapsamındaki bütün sıçanlar makroskopik değerlendirme kapsamına alındı. Kesi yapılan insizyon hattı ve 8. gün deneyin sonlandırılmasını izleyen cerrahi esnasında operasyon loju kontrol edildi. Cilt, adele ve fasyanın durumu, siyatik sinirin etraf dokuyla olan ilişkisi, enfektif bulgular varsa not edildi. Değerlendirmede Petersen ve ark. (48) tarafından tarif edilen derecelendirme sisteminden faydalanıldı (Tablo-2).

Tablo-2: Petersen ve arkadaşları tarafından cilt ve adele fasya durumunu, sinir yapışıklığı ve ayırılabilirliğini tanımlayan derecelendirme sistemi (48).

	Derece	Tanım
Cilt ve adele durumu	1	Tamamen iyileşmiş
	2	Kısmen iyileşmiş
	3	Tamamen açık
Sinir diseksiyonu	1	Diseksiyon yok ya da hafif künt diseksiyon
	2	Biraz kuvvetli künt diseksiyon
	3	Keskin diseksiyon

III. Dokuların Elde Edilmesi

Cerrahiden sonra 8. günde rutin prosedürleri takiben sıçanların eski insizyonları açıldı ve cerrahi alan diseke edilerek siyatik sinirleri ortaya kondu. Enzim ve protein analizleri için siyatik sinirler kesinin 2 mm proksimal ve distalinden kesilmek suretiyle en block olarak çıkarıldı. Histomorfolojik analizler için ise açığa çıkarılan sinir için operasyon lojuna yeterli Trump fiksatif [100 ml başına 1,16 gr $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ile 1xPBS (fosfat tamponlu salin) içinde %4 formaldehit, %1 glutaraldehit] eklendi ve 10 dakika bekletildi. 10 dakika sonra fiksatif cerrahi sahadan temizlendi ve bu adım iki kez daha tekrarlandı. Mikroskop altında ince diseksiyon makası kullanarak siyatik siniri germemeye ve sıkıştırmamaya özen gösterilerek her iki taraftan transeksiyon ve tam kat sütür yapılan sağ siyatik sinir anostomoz hattını içerecek şekilde distali işaretli olarak eksize edildi, eksize edilen parçalar 4°C'de Trump'ın fiksatifini içeren 15 ml'lik tüplere koyularak histomorfolojik analizler için hazırlanmak üzere laboratuvara bırakıldı. Enzim ve protein analizleri için çıkarılan örnekler ise eppendorf tüplerde -80°C'de muhafaza edildi. Tüm doku örneklerinin alınmasını takiben siyatik sinir dokusu 2 ml fosfatlı salin içerisinde homojenize edildikten sonra bu homojenatlar 5 dakika +4°C'de 10,000 rpm'de santrifüj işlemiyle ELISA ve Western Blot analizlerine tabi tutulmak üzere hazır hale getirildi. Doku

örnekleri alınan sıçanlar yüksek doz sevofluran anestezisi altında sakrifiye edildi.

IV. Enzim ve Protein Analizleri

IV.A. ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) Analizleri

Epigenetik mekanizmaların araştırılması amacıyla, Histon deasetilaz 1 (HDAC1) enzim miktarı ELISA yöntemiyle tayin edildi. Enzim analizleri için sıçan uyumlu HDAC (Bioassay Technology Laboratory, Shanghai, Çin) ELISA kiti kullanıldı. Kit prosedürüne uygun şekilde çalışıldı ve spektrofotometrik (BioTek Quant, BioTek Instruments Inc., ABD) olarak incelendi. Prosedür aşağıda belirtilmiştir;

1. Tüm solüsyonlar, standart çözeltiler ve numuneler talimatlara uygun olarak hazırlandı. Analizden önce tüm maddeler oda sıcaklığına getirildi.

2. Test için gereken strip sayısı belirlendi. Kullanılmayan stripler 2-8°C'de saklandı.

3. Standart dilüsyonları hazırlandı. Standart kuyucuklarına her dilüsyondan eklendi. Not: Standart solüsyon biyotinlenmiş antikor içerdiğinden standart kuyucuklarına antikor eklenmedi.

4. Örnek kuyucuklarına örnek ve ardından biyotinli antikor eklendi. Bir kuyucuk boş bırakıldı ve diğer kuyucuklara streptavidin-HRP eklendi. Plate 37°C'de 60 dakika inkübasyona bırakıldı.

5. Yıkama solüsyonu ile 5 kere plate yıkandı. Son yıkamada kuyucukların içindeki sıvı vakumlandı.

6. Substrat solüsyonu A ve B her kuyucuğa eklendi. 37°C'de karanlıkta 10 dakika boyunca inkübasyona bırakıldı.

7. Her kuyucuğa durdurma solüsyonu eklendi, mavi renk hemen sarıya döndü.

8. Durdurma solüsyonu ilave edilmesini takiben 10 dakikalık sürede 450 nm'ye kalibre edilmiş bir spektrofotmetre cihazıyla her kuyucuğun optik dansiteleri (OD değeri) belirlendi.

IV.B. Western Blot Analizleri

Asetillenmiş Histon-H3 ve asetillenmiş Histon-H4 protein analizleri ise Western Blot yöntemi kullanılarak tamamlandı. Total proteinlerin miktarı Bikinkoninik asit yöntemine göre incelenmesini takiben bire bir Laemmli tamponu ile hazırlanarak 100 derecede beş dakika süreyle kaynatıldı. Yükleme volümleri tüm örneklerde eşit ölçüde protein içerecek biçimde hesaplandı ve SDS-PAGE (SDS-PAGE; Mini Protean II, Bio-Rad, Hercules, CA, ABD) yöntemiyle örnekler ilerletildi. İlerletme aşamasını geçtikten sonra jel üstündeki protein dokuları PVDF (Millipore, Billerica, MA, ABD) membranlara aktarıldı. Membranlar tris tamponu ve tween 20 (TBST) içinde dağıtılmış %5 yağdan arınmış süt tozu çözeltisi (Carnation, Glendale, CA, ABD) ile yarım saat bloklandı. Membranların bloke edilmesini takiben membranlar TBST ile temizlendi. İncelenecek proteinlerin miktarları denk olmadığından dolayı membranlar uygun olarak kısaltılarak primer antikolar ile tüm gece inkübasyon işlemine tabi tutuldu. Primer antikor olarak anti-Asetil-Histon H3 (1:1000; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, ABD) ve anti-Asetil Histon H4 (1:1000; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, ABD) ve pozitif kontrol anti-Beta-Aktin (β -Actin; 1:1000; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, ABD) kullanıldı. Ertesi gün membranlar TBST ile yıkanarak uygun ikincil antikolar (1:5000, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, ABD) ile 60 dakika inkübasyon yapıldı. Membranlar tekrar TBST ile temizlendi ve kemilüminesans çözeltisi (Millipore, Billerica, MA, ABD) ile inkübasyon sonrası Licor CDigit tarayıcısı (CDigit, LI-COR Biotechnology, Lincoln, NE, ABD) ile örneklerin bant görüntüleri dijital ortama aktarılarak analiz edildi.

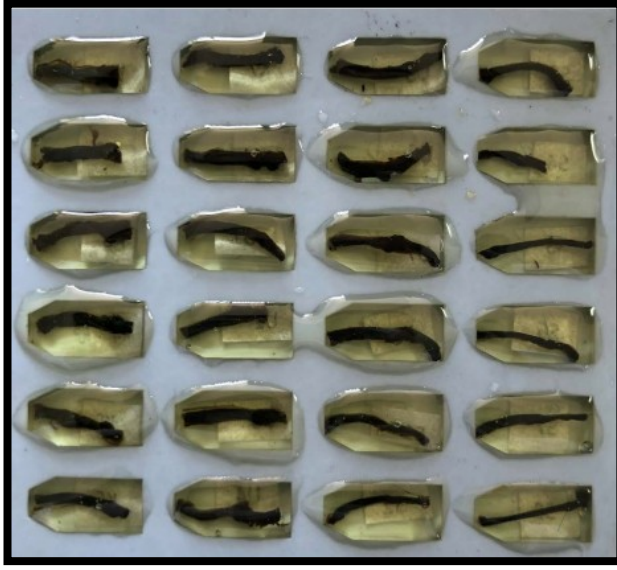
V. Histomorfolojik Çalışmalar

V.A. Osmiyum Tetroksit ile Resin Bloklama

4°C'de Trump'ın fiksatifini içeren 15 ml'lik tüplerde laboratuvara getirilen doku örnekleri her 48 saatte bir fiksatifler yenilenecek 1 hafta süre ile fiksasyon işlemine tabi tutuldu. Bu doku daha sonra post-fiksasyon işlemlerine tabi tutularak (2 saat boyunca 0,1 mol/L fosfat bufferlı %1 osmium tetroksit (OsO_4) içerisinde) histomorfolojik analizler için hazırlanmak üzere bekletildi.

Fiksasyondan sonra, sinirden kalan yağ ve bağ dokuları dikkatlice çıkarıldı ve siniri yaklaşık 5 mm uzunluğunda bölümlere ayırmak için keskin bir neşter kullanılarak plastik tüplerde numaralandırıldı. Trump'ın fiksatif solüsyonunda seyreltilmiş taze %1 OsO_4 hazırlandı ve cam tüp içinde saklandı. Kısa süre için plastik tüplerde saklanan sinir parçaları 2 saat boyunca %1 OsO_4 ile muamele edildi. Epoksi yerleştirme kiti (Sigma, Epoxy Embedding Medium Kit, 45359-1EA-F, Merck KGaA, Darmstadt, Almanya) kullanarak solüsyon formülü hazırlandı: 8 ml DDSA (dodesenil süksinik anhidrit) çözeltisi ve 5 ml epoksi solüsyonu (karışım A) ile, 7 ml NMA (metilnadik anhidrit) çözeltisi ve 8 ml epoksi solüsyonu (karışım B) ile karıştırıldı. A ve B karışımları karıştırıcı (MK318, Nuve, Türkiye) ile yarım saatten az olmamak üzere karıştırıldı. Kullanmadan hemen önce, A (13 ml) ve B (15 ml) karışımı tekrar karıştırıldı ve aktivatör DPM-30 (2,4,6-tris(dimetilaminometil)fenol) karışımının toplam hacminin %2'si oranında eklendi. Bloğun renginin koyulaşmasını ve kırılkan olmasını önlemek için DPM-30 solüsyonu hassas bir şekilde ölçülerek post-fiksasyon işlemine devam edildi. 1,5 ml tüpler ile PBS kullanılarak örnekler temizlendi ve farklı etanol/distile su pasajlarına yerleştirilerek dehidrasyon sürecini başlatıldı (%30,%50,%70,%90,%95'lik konsantrasyonların her biri için kısa bir süre beklendi ve takiben 2 kez %100 etanolde bekletildi). Resin infiltrasyonu için dokular yarım saat süreyle bir kısmı solüsyona ve bir kısmı %100 etanol karışımına, ardından yarım saat süreyle her iki kısmı da %100 etanol karışımına yerleştirildi. Son olarak sinir parçaları 30 dakika boyunca

solüsyona konuldu ve doku örnekleri silikon kauçuk kalıplara yerleştirildi ve kodlandı (Ted Pella INC. PELCO® Flat Embedding Mold, 24 Numbered Cavities, Kanada). Spur's resin (Agar Scientific, Agar Low Viscosity Resin Kit, Essex, İngiltere) sinirlerin üzerine tüm sinir segmentlerini kapladığından ve hava kabarcığı oluşturmadığından emin olunarak dikkatlice eklendi (Resim-4). Resin ile sinir segmentleri içeren kalıp 68-70°C'de polimerize etmek için bir gece bırakıldı.

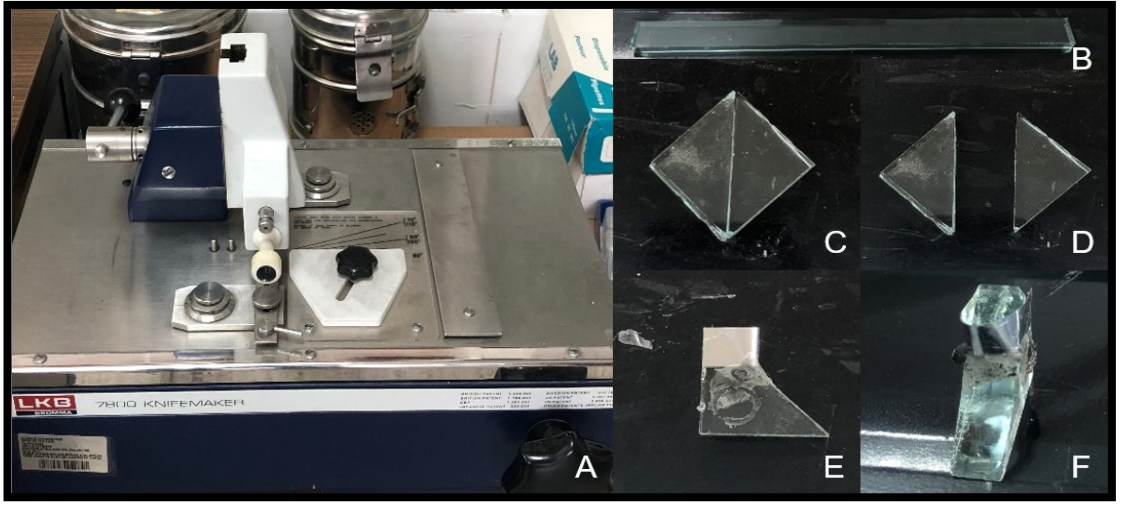


Resim-4: Histomorfolojik analizler için eksize edilen siyatik sinir segmentlerinin post-fiksasyon işlemlerinin tamamlanarak resin bloklara yerleştirildiği görülmektedir.

V.B. Ultramikrotom ile Kesitleme

Bir cam bıçak makinesi (LKB 7800 Knifemaker, A-1150, Viyana, Avusturya) kullanarak camlardan (UltraMicrotome Grade Glass, 07667-CE, 2SPİ Supplies, West Chester, ABD) bıçaklar hazırlandı ve distile su üzerinde yüzen doku örneklerini biriktirmek için teknelerle cam bıçaklar yapıldı (Resim-5). Resin gömülü sinir blokları yamuk tarafı yukarı bakacak şekilde ultramikrotom cihazına (LKB Ultratome Main Unit Type 4801 A, Viyana, Avusturya) yerleştirildi. Ultramikrotom ve düz bir cam bıçak kullanarak sinir dokusunun tek tip bir kesit yüzeyini ortaya çıkarmak için yeterli birden çok

kesi yapıldı. İşlemi takiben teknesi 23 derece sıcaklıkta distile suyla doldurulmuş bir cam bıçağa geçildi, ince kesitleri oluşturmak için ultramikrotom 1-2 µm'ye ayarlandı ve transvers yarı ince kesitler elde edildi. Metal halka kullanarak cam bıçak teknesinde yüzen ince sinir dokuları alındı ve lam üzerindeki bir damla deiyonize suya aktarıldı. Bölümleri aşırı ısıtmamaya dikkat ederek, kısa bir süre ısı yayan cihaz üzerinden birkaç kez geçirerek bölümleri içeren slaytlar kurutuldu. Her lamda 3 kesit örneği olacak şekilde dokular yerleştirildi.



Resim-5: 1-2 µm kalınlığında kesitleme amacı ile cam bıçak hazırlanması. **A** Cam bıçak makinesi **B** Cam **C-D-E-F** Cam bıçak ve tekne hazırlanışını göstermektedir.

V.C. Toluidin Mavisi ile Boyama

2 g sodyum boratı 100 ml deiyonize suda çözerek %1 toluidin mavisi çözeltisi hazırlandı. Ardından 1 g toluidin mavisi (Toluidin Blue, SERVA, Heidelberg, Almanya) eklendi ve eriyene kadar karıştırıldı. Çözelti filtre kâğıdı (gözenek boyutu: 11 µm) kullanarak süzüldü ve çözelti iki haftaya kadar oda sıcaklığında opak bir şişede bekletildi. Mikro-pipet kullanarak sinir bölümlerinin üstüne bir damla toluidin mavisi solüsyonu eklendi ve 20-30 saniye bekletildi. Slaytlar distile su kavanozuna hafifçe daldırılarak tüm toluidin mavisi solüsyonunun fazlası durulandı ve bu işlem bölümler temizlenene kadar birkaç kere tekrarlandı. Preparatlar 60°C'de yaklaşık 15

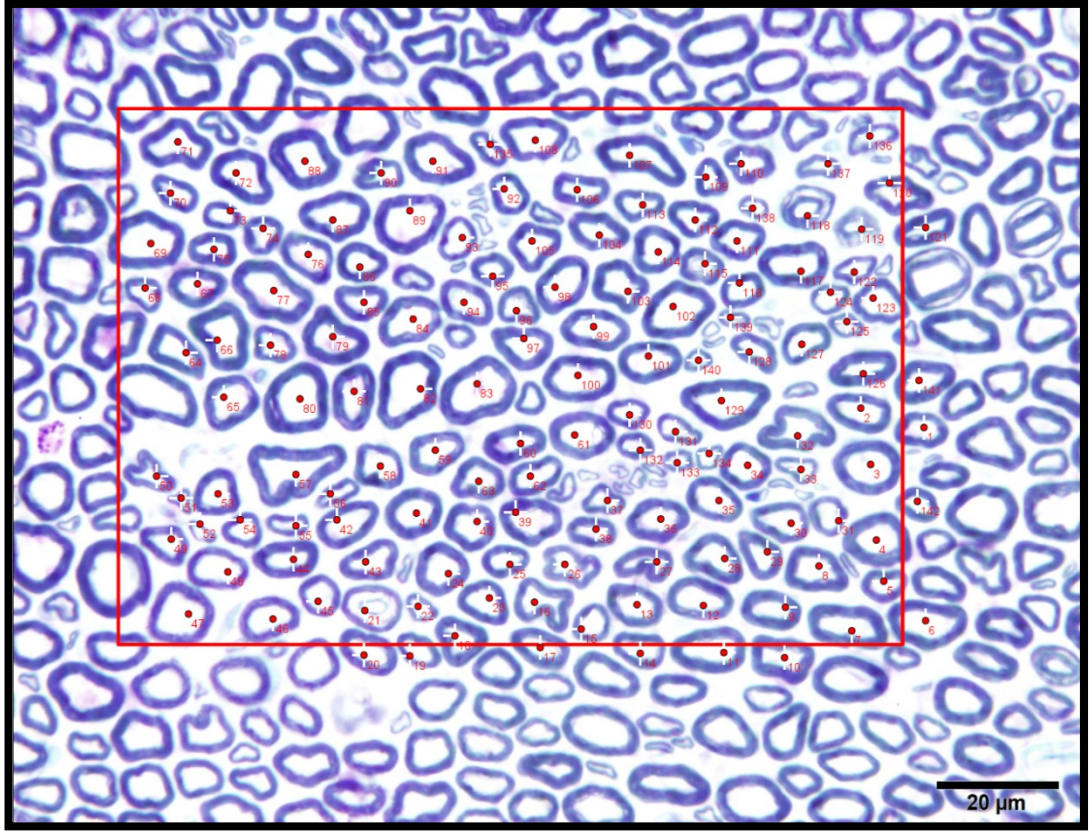
dakika kurutuldu ve bir lamel (Objektträger, Isolab, Almanya) ile kapatıldı. Takiben slaytlar mikroskopik analiz için hemen incelenmeye hazır hale getirilerek oda sıcaklığında saklandı (49).

V.D. Doku Örneklerinin Histomorfolojik Analizleri

Post-fiksasyon işlemlerini takiben boyanan preparatlar akson sayısı ve milimetre karede miyelinli aksonların dansitesi belirlenmesi için aşağıdaki aşamalardan geçirildi:

Preperatlara alınan örnekler kesit atlanarak ve her örneğin farklı kesit seviyesinden olması sağlanarak incelemeye hazır hale getirildi. Zeiss Primo Star ışık mikroskop sistemi ve Zeiss Labscope yazılımı yardımıyla randomize örnekleme yöntemi kullanılarak kesitlerden 5 megapixel çözünürlükte imajlar elde edildi. 100'lük büyütme ile alınan kesitler BMP formatına dönüştürüldü. Bu amaçla "ImageJ 1.53t" yazılımı işleten bir bilgisayar kullanıldı ve tüm inceleme ve sayımlar öncesinde, imaj analiz programının "tabla mikrometresi" vasıtasıyla kalibrasyonu sağlandı. Kalibrasyon için Olympus mikrometrik lam kullanıldı.

Tüm preperatlar için 100x objektifle elde edilen imajların üstüne makrolar kullanılarak bir "sayım çerçevesi" (1500X1000 piksel; 127,19X84,74 µm; 10772 µ²) oluşturuldu ve alanda bulunan miyelinli aksonlar non-biased sayım kuralları kullanılıp sayıldı. Takiben milimetrekaredeki akson sayıları (aksonal dansite) belirlendi. Bu amaçla sayım alanı çerçevesinin sol ve üst kenarlarına değen aksonlar sayım dışı bırakılırken, sağ ve alt kenarlarına değenler ve çerçeve içindeki tüm miyelinli aksonlar sayıma dahil edildi (Resim-6).



Resim-6: ImageJ yazılımı üzerinde akson sayımından önce oluşturulan sayım çerçevesi görülmektedir.

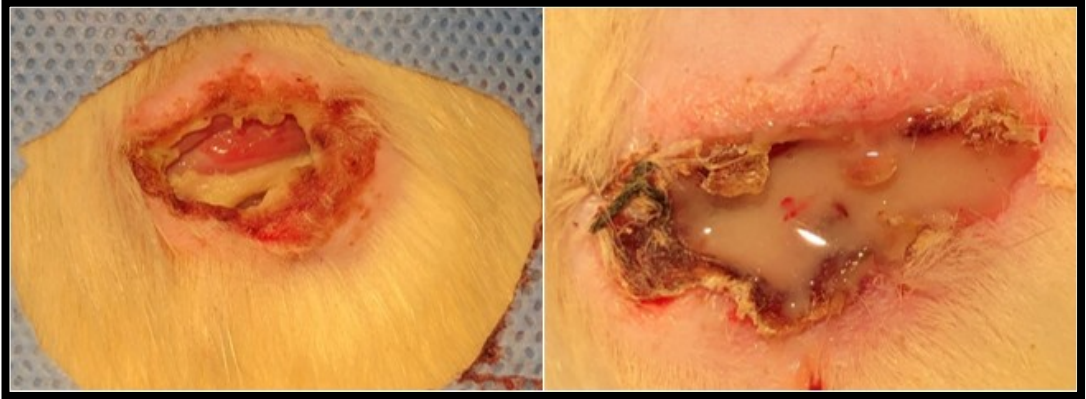
VI. İstatistiksel Analizler

Sham, Kontrol ve Üridin grubuna ayrılan sıçanlardan elde edilen siyatik sinir dokularının biyokimyasal değerlendirme sonuçlarının istatistiksel analizi için SigmaPlot (version 12.5) yazılımı kullanıldı. Değerler ortalama \pm standart hata olarak belirtildi. İstatistiksel analizler tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve takiben post-hoc Tukey testi, histomorfolojik analizler ise Kruskal-Wallis testiyle değerlendirildi. İstatistiki anlamlılık değeri $p < 0,05$ olarak kabul edildi.

BULGULAR

I. Operatif ve Makroskopik Değerlendirme Verileri

Deney süresi boyunca 50 adet sıçandan faydalandı. Petersen ve ark. tarafından tanımlanan derecelendirme sistemine göre cilt ve adele fasyasının durumu 3 sıçanda 2 (kısmen iyileşmiş); 2 sıçanda 3 (tamamen açık); diğer bütün sıçanlarda 1 (tamamen iyileşmiş) olarak kaydedildi. Derece 3 olarak değerlendirilen histomorfolojik analizler için kullanılan 1-b grubundan 2 sıçanda yara yeri enfeksiyonu tespit edilerek yüksek doz anestezi altında sakrifiye edildi ve araştırmadan çıkarıldı (Resim-7). Diğer sıçanlar deney bitimine kadar komplikasyonsuz bir şekilde yaşadılar.

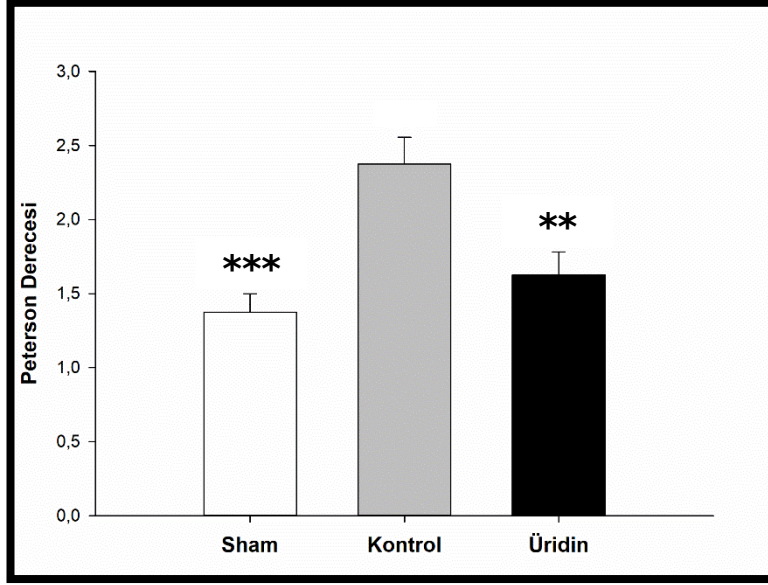


Resim-7: Yara yeri enfeksiyonu gelişen sıçanların makroskopik görüntüsü.

Cilt ve adele fasya kapanması açısından yapılan değerlendirmemizde tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile gruplar arasında istatistiksel anlamlı farklılık saptanmadı ($p>0,05$).

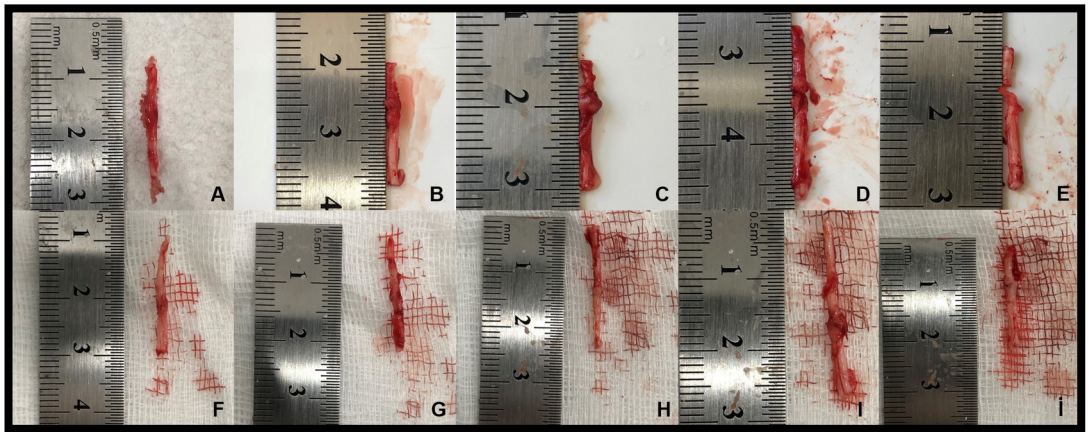
Sinirin yapışıklık ve ayrılabilirlik durumu değerlendirildiğinde tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar olduğu görüldü. Tedavi verilmeyen Kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında sinir kesisi uygulanmayan Sham grubunda sinir yapışıklığı ve fibrotik skar oluşumu yüksek derecede anlamlı ($p<0,001$) olarak düşük

sonuçlanırken Üridin grubunda ise Kontrol grubu ile kıyaslandığında tedavinin sinir yapışıklığını, fibrotik skar oluşumunu azalttığı ve yapışıklık derecesinin anlamlı olarak düşük olduğu ($p<0,01$) görüldü (Grafik-1).



Grafik-1: Sinir yapışıklık ve ayrılabilirliğini gösteren Peterson derecelendirmesinin kantitatif sonuçları. ** $p<0,01$; *** $p<0,001$ Kontrol grubuna göre. Her grupta $n=16$.

Eksize edilen siyatik sinir segmentleri makroskobik olarak incelendiğinde Kontrol grubunda daha çok nöroma ve yanlış kaynama olduğu, Üridin grubunda ise sinir segmentlerinin daha intakt ve uniform karakterde olduğu görüldü (Resim-8).



Resim-8: Üridin ve Kontrol gruplarının eksize edilen sinir örnekleri; **A, B, C, D ve E** Kontrol grubu, **F, G, H, I ve İ** Üridin grubuna ait siyatik sinir segmentlerini göstermektedir.

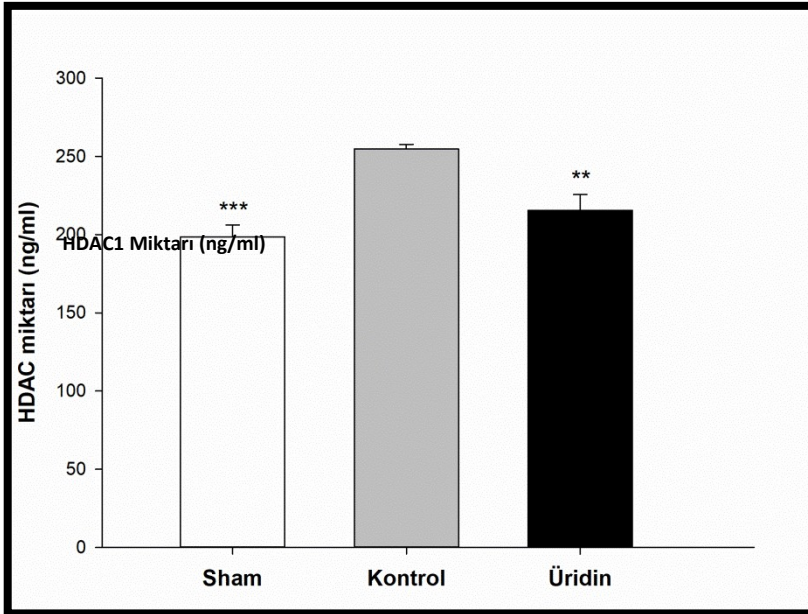
II. Enzim ve Protein Analizleri

II.A. ELISA Sonuçları

ELISA yöntemi ile homojenatlardaki HDAC1 enzim miktarı ölçülmüş ve yapılan istatistiksel analizler sonucunda;

Sham grubu ile karşılaştırıldığında Kontrol grubunda HDAC1 seviyesinin anlamlı olarak yüksek olduğu görülmüştür ($p < 0,001$) (Grafik-2).

Kontrol grubu ile Üridin grubu karşılaştırıldığında, Üridin grubunda HDAC1 seviyesinin anlamlı olarak düşük olduğu görülmüştür ($p < 0,01$) (Grafik-2).



Grafik-2: HDAC1 miktarı. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ Kontrol grubuna göre. Her grupta $n=8$ (ortalama değer \pm standart hata).

II.B. Western Blot Sonuçları

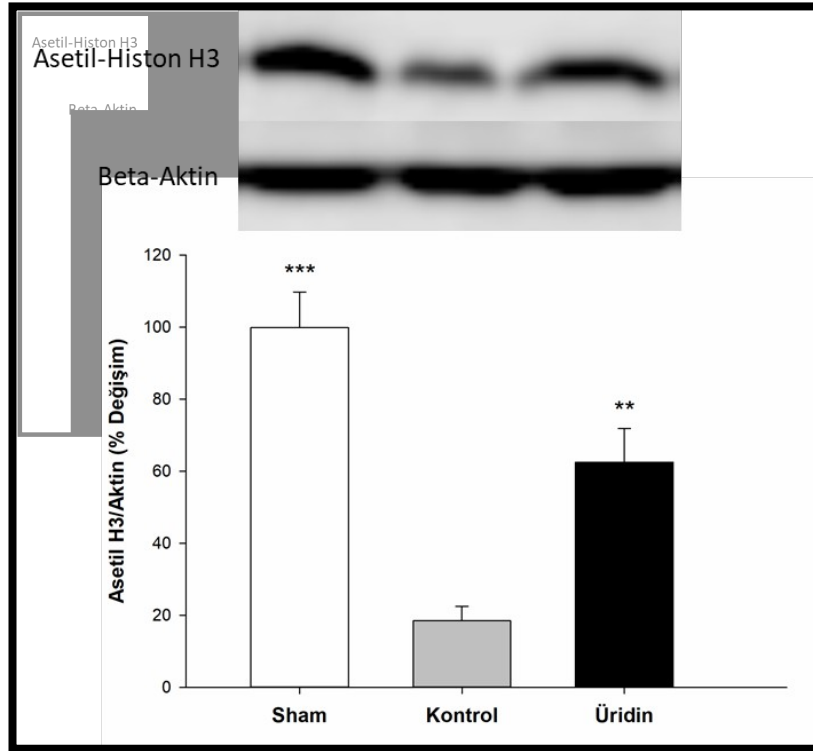
Unilateral siyatik sinir hasarı ve primer anastomozunu takiben 1 hafta boyunca günlük sistemik yolla verilen üridin 500 mg/kg tedavisinin hasardan sonraki 8. günde asetillenmiş Histon-H3 ve asetillenmiş Histon-H4 protein düzeylerine etkisi Western Blot yöntemi ile belirlendi. Asetillenmiş Histon-H3 ve asetillenmiş Histon-H4 proteinlerinin ekspresyonları Sham grubuna göre yüzde değişim olarak sunuldu.

Asetillenmiş Histon-H3 düzeyleri Kontrol grubunda %18,51'e düşerken ($p < 0,001$), Üridin grubunda %62,54'e yükseldi ($p < 0,01$) (Tablo-3, Grafik-3).

Tablo-3: Western Blot Analizi ile Hesaplanan Asetillenmiş Histon-H3 Protein Düzeyleri.

Asetillenmiş Histon-H3 protein düzeyleri \pm SH (% değişim)	
Sham	100 \pm 9,86 ^{***}
Kontrol	18,51 \pm 4,01
Üridin (500mg/kg)	62,54 \pm 9,32 ^{**}

^{**}p<0,01; ^{***}p<0,001 Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, SH: Standart hata.



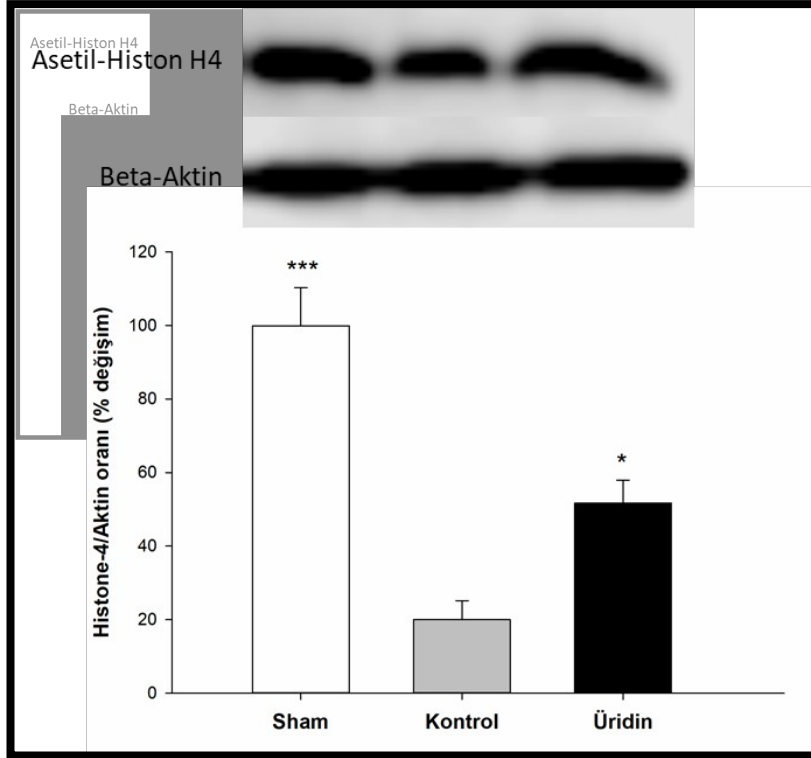
Grafik-3: Asetil-Histon H3 Protein Düzeyleri. ^{**}p<0,01; ^{***}p<0,001 Kontrol grubuna göre. Her grupta n=8 (ortalama değer \pm standart hata).

Asetillenmiş Histon-H4 düzeyleri Kontrol grubunda %20,02'ye düşerken (p<0,001), Üridin grubunda %51,68'e yükseldi (p<0,05) (Tablo-4, Grafik-4).

Tablo-4: Western Blot Analizi ile Hesaplanan Asetillenmiş Histon-H4 Protein Düzeyleri.

	Asetillenmiş Histon-H4 protein düzeyleri \pm SH (% değişim)
Sham	100 \pm 10,39 ^{***}
Kontrol	20,02 \pm 5,13
Üridin (500 mg/kg)	51,68 \pm 6,25 [*]

*p<0,05; ***p<0,001 Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, SH: Standart hata.



Grafik-4: Asetil-Histon H4 Protein Düzeyleri. *p<0,05; ***p<0,001 Kontrol grubuna göre. Her grupta n=8 (ortalama değer \pm standart hata).

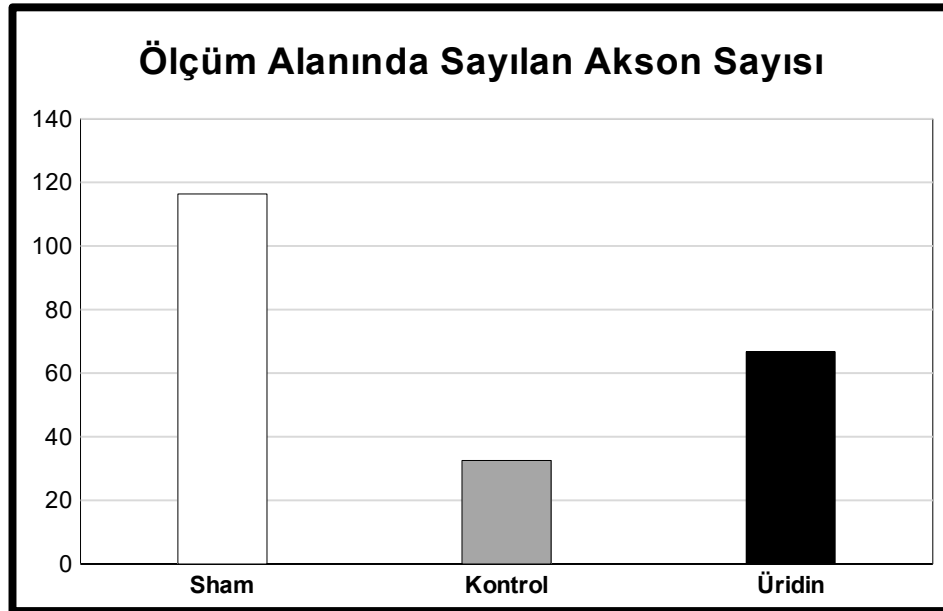
III. Histomorfolojik Analizler

Sayım çerçevesinde sayılan akson miktarları Kontrol grubu için $32,5217 \pm 0,85111$, Sham grubu için $116,3704 \pm 3,85904$, Üridin grubu için $66,75 \pm 1,73954$ (Ortalama \pm SEM) olarak bulundu (Tablo-5, Grafik-5).

Tablo-5: Sayım alanındaki akson sayıları.

	Minimum	Maksimum	Ortalama	SH	SD
Sham	72	147	116,37	3,86	20,05
Kontrol	20	42	32,52	0,85	5,77
Üridin	49	92	66,75	1,74	10,44

SH: Standart hata, SD: Standart deviasyon.



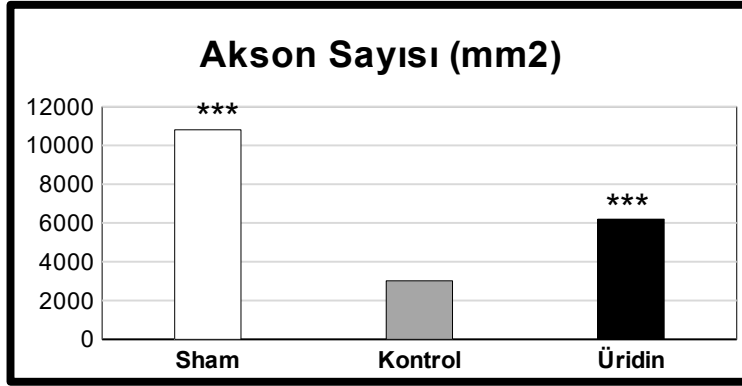
Grafik-5: Ölçüm alanında sayılan akson sayıları. *** $p < 0,001$ Kontrol grubuna göre. Her grupta $n=8$ (ortalama değer \pm standart hata).

Milimetrekare üzerinden hesaplanan sonuçlar Kontrol grubu için $3019,09 \pm 79,01$ Sham grubu için $10803,04 \pm 358,24$, Üridin grubu için $6196,6 \pm 161,48$ (Ortalama \pm SEM) olarak tespit edildi (Tablo-6, Grafik-6).

Tablo-6: Milimetrekaredeki akson sayıları.

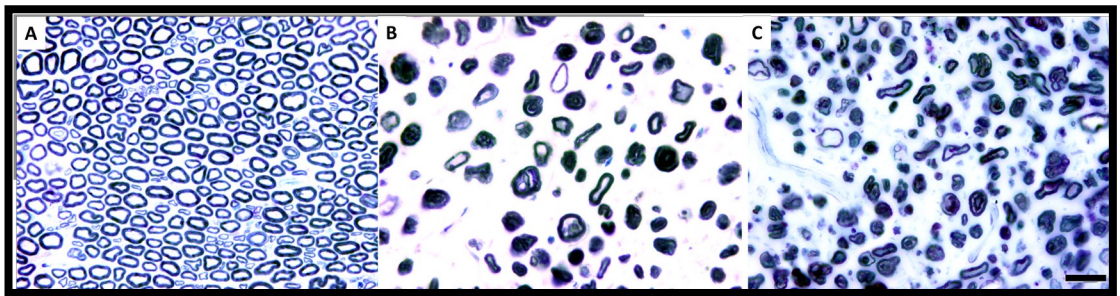
	Ortalama	Standart Hata
Sham	10803,04	358,25
Kontrol	3019,10	79,01

Üridin	6196,62	161,49
--------	---------	--------



Grafik-6: Milimetre karede akson sayıları. *** $p<0,001$ Kontrol grubuna göre. Her grupta $n=8$ (ortalama değer \pm standart hata).

Kruskal Wallis testi kullanılarak akson sayısı gruplar arasında değerlendirildi. Tüm gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı sonuç ($p<0,001$) saptandı. Cerrahi sinir kesisi yapılmayan Sham grubunun ölçüm alanına giren miyelinli akson sayıları ve milimetre karedeki aksonal dansiteleri Üridin ve Kontrol grubuna göre yüksek, tedavi verilen Üridin grubunun da Kontrol grubuna göre yüksek olduğu, bu sonuçların da istatistiksel olarak yüksek derecede anlamlı ($p<0,001$) olduğu görüldü (Resim-9).



Resim 9: %1 boraks-toluidin mavisi ile boyanan ince kesitler. A, Sham grubu; B, Kontrol grubu; C, Üridin grubu; Bar, 20 mikrometre.

TARTIŞMA VE SONUÇ

Periferik sinir yaralanmaları özellikle genç erişkin erkeklerde karşılaşılan, gelişmekte olan ülkelerde prevalansı yaklaşık %2,8 (7), insidansı 13-23/100,000 olan (50), ciddi morbiditelere yol açan problemlerden birisidir. En sık künt ve penetran travmalar sonrası görülmektedir. Hasarın derecesine göre periferik sinir yaralanmaları ilk olarak Seddon tarafından 1943 yılında sınıflandırılmıştır ve sinir yaralanmaları ana olarak 3 kategoride incelenmiştir; nöropraksi, aksonotmezis ve nörotmezis (8). 1951 yılında Sunderland ise bu sınıflamayı 5 dereceye ayırarak geliştirmiştir (9). Nörotmezis en kötü prognoza sahiptir ve spontan iyileşme neredeyse mümkün değildir, cerrahi altın standart tedavidir. Cerrahiye rağmen bu hastalığın prognozu kötüdür ve tam fonksiyonel iyileşme neredeyse hiç görülmez.

Hussain ve ark.'ları (3) periferik sinir hasarında sinirin proksimal segmenti dejeneratif değişikliğe giderken distal segmentinin 1850'de Waller tarafından tanımlanan Wallerian dejenerasyona (WD) uğradığını bildirmişlerdir. Patofizyolojik anlamda pek çok olay periferik sinir hasarını karmaşık hale getirir. Aksotomiyi takiben Schwann hücre fenotipi değişikliğe uğrar ve ortama sitokin salınımı ile immünreaksiyon başlatılır. Schwann hücreleri ve makrofajlar distal güdükte miyelin kalıntılarını fagosite eder. Nörotrofik ajanların salınımı nöronal hayatta kalma ve büyümeyi destekler (14). Schwann hücreleri çoğalır ve Bungner bantlarını oluşturmak üzere belirgin bir uzamayla (üç kat) morfolojik değişikliklere uğrar, bu bantlar yeniden şekillenir ve yenilenen akson için bazal laminayı hazırlarlar (15). Sinir rejenerasyon süreci Schwann hücrelerinin rehberliğinde aksonal filiz ve büyüme konisi oluşarak devam eder.

Gürünlüoğlu ve ark.'larının (51) bildirdiğine göre periferik sinir hasarının tedavisinde yedinci yüzyılda Paulus Aegineta tarafından nörorafi teknikli mikrocerrahi yöntem tanımlanmış, bin yılı aşkın süre geçmesine rağmen hasarlı sinirin onarımı ve tam fonksiyonel iyileşmede anlamlı ilerleme kaydedilememiştir. Mafi ve ark.'larının (52) bildirdiğine göre 1873'te Hueter tarafından epinöriyumları içiren sütürasyon tekniği tanımlanmıştır ve bunu

izleyen dönemde otojen sinir greftleme yöntemi, vaskülarize sinir greftleme, sentetik tüp ile greftleme, uç yan anastomoz gibi birçok teknik kullanılmış olsa da bu tedavilerin sonuçları da küratif olmaktan uzaktır.

Periferik sinir hasarı sonrası sinir rejenerasyonu hakkında birçok çalışma mevcuttur. Literatürde yayınlanan çalışmalara göre rejenerasyonun indüklenmesini amaçlayan ilaç tedavileri (koenzim Q10 ve vitamin E (53), mezenkimal kök hücre (54-56), zencefil ve susam yağı (57), telmisartan (58), kuersetin (59), hiperbarik oksijen tedavisi (60), ginkgo (61), elektrik stimilasyonu ve pulse manyetik alan (62-64), pioglitazon (65), levatirasetam (66), lityum (67)); büyüme konisinin yanlış yönlendirilmesini önlemek amacı ile sentetik greft kullanımı (68); hasar sonrası fibrozis ve skar oluşumunu önlemek için lokal tedavi yöntemleri (anti-transforming growth faktör beta, hyalüronik asit ve insan amniyon sıvısı (69), aprotinin (70), 5-fluorourasil (71), düşük doz radyasyon (72)) ve ayrıca bölümümüzde daha önce yapılan çalışmalarda sitidin, sitikolin, kolin, CDP (sitidin difosfat) kolin (73-77) denenmiştir ve kısmen faydalı olan tedaviler mevcuttur. Fakat tüm tedavilere rağmen tam iyileşme mümkün olmamaktadır.

Üridin insanlarda başlıca dolaşımında (16,21) ve anne sütünde (18) bulunan major pirimidin nükleozidi olup dokularda da hem kendisi hem de fosfat bağlı nükleotidleri yaygın olarak bulunur. Üridin; Kennedy yolağı (19) aracılığıyla membranlardaki fosfolipidlerin üretiminin prekürsörü olup bu yolda hız kısıtlayıcı basamak olarak sentezlenen CDP-kolin biyosentezini labratuvar ortamında (20) ve in vivo (17) koşullarda artırdığı bilinmektedir. Geçmiş yayınlarda sistemik yolla üridin uygulanmasının nöronların sinaptik bağlantılarını artırdığı bildirilmiştir (21). Bu özelliğiyle siyatik sinir transeksiyon ve primer anastomoz modellerinde denenilen NGF (Nöron Growth Faktör)'lerin bu modelde bildirilen etkinliğini taklit edebileceği düşünülmektedir (22).

Üridinin periferik sinirlerde oluşturulan hasara karşın etkinliği tek başına nöronlarda proliferasyonu artırıcı etkisi ile değil, ek olarak apoptozu

önleyici etkisi ile de ilgilidir. Yapılan araştırmalarda üridin molekülünün dışarıdan uygulanması suretiyle deneysel HİE (24-26) ve hiperoksik (27) beyin yaralanması modellerinde apoptoza sekonder nöronların kaybını önleyerek nöroproteksiyon sağladığı ve uzun dönemde sıçanlardaki kognitif disfonksiyonu anlamlı şekilde azalttığı gösterilmiştir (26, 27). Buna ek olarak üridin tedavisi HİE modelinde histon deasetilaz (HDAC) etkinliğini azaltarak ve asetillenmiş Histon-H3 ile asetillenmiş Histon-H4 seviyelerini artırarak (25) nöron iyileşmesini sağlamaktadır. Siyatik sinir yaralanmasında da apoptotik değişiklikler (10) ve nöroinflamasyon (12) gibi değişiklikler nöronal tahribata katkıda bulunmakta ve nöronun fonksiyonel iyileşmesini engellemektedir. HDAC inhibitörlerinin periferik sinir hasarı sonucu gelişen nöropatik ağrıyı azalttığı da literatürde gösterilmiştir (28, 29).

Yakın zamanda yapılan bir araştırma ise, periferik sinir hasarının tedavisinde ve fonksiyonel geri kazanımın artırılmasında epigenetik mekanizmaların önemini net olarak ortaya koymaktadır. Bu çalışmaya göre histon deasetilaz 3 (HDAC3) enzimine bağlı bir yolak periferik miyelin gelişimine ve fonksiyonel rejenerasyona engel olmakta ve bu yolağın inhibisyonu periferik miyelinizasyonu artırmaktadır (30).

Yaşlılık ve rejeneratif tıp alanında son yıllarda yapılan bir çalışmaya göre yüksek rejeneratif kapasiteye sahip bir omurgalının (aksolotl) blastema hücrelerinde ve memelilerde tam rejeneratif kapasiteye sahip tek organ olan geyik boynuzunda metabolomik analizler gerçekleştirilmiştir. Aynı zamanda genç ve yaşlı insan kök hücreleri de incelenmiştir. Yapılan analizlerde yüksek pirimidin ve yağ asidi metabolizmasının daha yüksek rejeneratif kapasite ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Aynı zamanda türler arasında korunan rejeneratif aktivitede çok önemli bir metabolit efektör belirlenmiştir ki bu madde yaşlı insan kök hücrelerini yenileyebilen, in vivo ortamda rejenerasyonu teşvik edebilen pirimidin nükleozidi olan üridindir. Üridin molekülünün birçok dokuda rejenerasyonu artırdığı, yaşlanan kök hücreleri reaktifte ettiği, fibrozis ve inflamasyonu azalttığı gösterilmiştir. Üridin tedavisinin iskelet kası, kalp, karaciğer, deri, eklem kıkırdağı dahil olmak üzere pek çok dokuda rejenerasyonu indüklediği görülmüştür (78). Ayrıca aynı çalışmada yaşlı

farelerde 2 ay boyunca oral üridin tedavisin artmış kognitif fonksiyon ve lokomotor aktivite ile ilişkili olduğu saptanmıştır (78). Bu tedavilerin tümörögenезisi artırıp artırmadığı da irdelenmiştir ve çalışmanın devamında intraperitoneal olarak 5 ay, oral olarak 7 aya kadar verilen üridin tedavisinin onkojenik olmadığı da gösterilmiştir (78).

Nörodejenerasyon dâhil olmak üzere çeşitli nörolojik hastalıkların patofizyolojisinde anormal histon asetilasyonu veya histon asetilasyon mekanizmasının disfonksiyonu rol oynamaktadır (31,32). Post-translasyonel modifikasyonlar proteinlerin asetilasyonunu gerektirir ve hücrel aktivite için önemlidir. İn situ ortamda protein asetilasyonu işlevsel olarak zıt olan protein asetilazlar ve deasetilazlar tarafından yapılmaktadır (33). Hücre içindeki DNA kromatin formunda muhafaza edilir. Metabolizma, yaşlanma gibi birçok önemli hücrel işlevi düzenleyen DNA kromatin yapısı remodeling ve transkripsiyonel regülasyona uğrar. Bu regülasyonda post-translasyonel modifikasyonlardan olan protein asetilasyonu önemlidir.

Histon metabolizmasına dahil olan enzimlerin ve histon proteinlerinin sinir sisteminde yaygın olarak bulunduğunu, periferik sinir hasarlarının patofizyolojisinde önemli rolü olduğunu ve HDAC inhibisyonunun nöroprotektif etkinlik gösterdiğini söylemek literatür kanıtları çerçevesinde (45,79,80) mümkündür. Çalışma grubumuzun daha önce gerçekleştirdiği araştırmada, sistemik yolla verilen üridinin sıçan siyatik sinir transeksiyon ve primer anastomoz modelinde anti-apoptotik ve anti-oksidan özellikleri ile üridinin sinir hasarını azalttığı, siyatik sinirin rejenerasyonunu sağladığı, yara yeri fibrozisini azalttığı (81), bu çalışmanın devamında üridin tedavisinin kronik dönemde elektrofizyolojik parametreleri düzelttiği, myelinizasyonu artırdığı ve fonksiyonel geri kazanımı sağladığını göstermiştik (82). Şu ana kadar biriken kanıtlar, üridinin beyin hasarında HDAC aktivitesini azaltarak asetillenmiş Histon-H3 ve asetillenmiş Histon-H4 seviyelerini artırdığını (25) ve siyatik sinir hasarında sinirin rejenerasyonunu uyardığını (81) ortaya koymuştur. Siyatik sinir hasarında epigenetik mekanizmaların rolü de bilinmektedir (30,45,80,81). Son olarak Liu ve ark.'ları (78) yayınladıkları benzer çalışmada üridinin yüksek derecede rejeneratif kapasite ile ilişkili

olduğunu ve tedavinin bizim bulgularımızı destekleyen sonuçları olduğunu bildirmişlerdir. Bu bilgiler ışığında üridinin sıçan siyatik sinir hasarı sonrası primer anostomoz modelinde rejenerasyonu üzerinde epigenetik mekanizmaların aracılığının araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmamızda sistemik 7 gün süreyle verilen üridin 500 mg/kg tedavisinin hasardan sonraki 8. günde asetillenmiş Histon-H3 ve asetillenmiş Histon-H4 protein düzeylerine etkisi Western Blot yöntemi ile belirlendi. Asetillenmiş Histon-H3 düzeyleri Kontrol grubunda %18,51'e düşerken ($p<0,001$), Üridin grubunda %62,54'e yükseldi ($p<0,01$). Asetillenmiş Histon-H4 düzeyleri Kontrol grubunda %20,02'ye düşerken ($p<0,001$), Üridin grubunda %51,68'e yükseldi ($p<0,05$). ELISA yöntemi ile homojenatlardaki HDAC1 enzim miktarı ölçüldü. Sham grubu ile karşılaştırıldığında Kontrol grubunda HDAC1 seviyesinin anlamlı olarak yüksek olduğu görüldü. Kontrol grubu ile Üridin grubu karşılaştırıldığında, Üridin grubunda HDAC1 seviyesinin anlamlı olarak düşük olduğu görüldü ($p<0,01$). Üridin 500 mg/kg tedavisinin hasardan sonraki 8. günde eksiz edilen sinir örneklerinin histopatolojik incelemesi (akson sayısı ve aksonal dansite) değerlendirildi. Tüm gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı sonuç ($p<0,001$) saptandı. Cerrahi sinir kesisi yapılmayan Sham grubunun ölçüm alanına giren miyelinli akson sayıları ve milimetre karedeki aksonal dansiteleri Üridin ve Kontrol grubuna göre yüksek, tedavi verilen Üridin grubunun da Kontrol grubuna göre yüksek olduğu, bu sonuçların da istatistiksel olarak yüksek derecede anlamlı ($p<0,001$) olduğu görüldü.

Sonuç olarak sistemik yolla verilen üridin tedavisinin erken dönemde sinir rejenerasyonuna katkısı olduğu, yara yeri fibrozisini azalttığı, toplam miyelinli akson sayısını ve aksonal dansiteyi arttırdığı kanıtlanmıştır ve bulgularımız literatür ile uyumlu bulunmuştur. Çalışmamızda ilk kez sistemik yolla verilen üridin tedavisinin siyatik sinir transeksiyon ve primer anostomoz modelinde HDAC1 seviyesini azaltarak, asetillenmiş Histon-H3 ve asetillenmiş Histon-H4 protein düzeylerinde ise artışa yol açarak sinir rejenerasyonda anlamlı artış sağladığı görülmüştür. Çalışmamız siyatik sinir

hasarında üridin tedavisinin epigenetik mekanizmalarını inceleyen ilk araştırmadır. Epigenetik mekanizmaların daha iyi anlaşılması, sinir rejenerasyon sürecindeki kompleks patofizyolojik olayların daha hızlı çözüme ulaştırılması adına önemli bir kanıttır. Bu sonuçlar ile üridin tedavisinin rejeneratif etkinliği epigenetik mekanizmaları ile gösterilmiştir. Tedavinin daha etkin olabilmesi adına ilacın dozu ve süresinin araştırılabileceği daha ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Johnson EO, Zoubos AB, Soucacos PN. Regeneration and repair of peripheral nerves. *Injury* 2005;36(4):24-9.
2. McMorrow LA, Kosalko A, Robinson D, Saiani A, Reid AJ. Advancing Our Understanding of the Chronically Denervated Schwann Cell: A Potential Therapeutic Target? *Biomolecules* 2022;12(8):1128.
3. Hussain G, Wang J, Rasul A, et al. Current status of therapeutic approaches against peripheral nerve injuries: A detailed story from injury to recovery. *Int J Biol Sci* 2020;16(1):116-34.
4. Byrne PJ, Stuart RM, Fakhry C, Lehar M, Flint PW. An Electrophysiologic Model for Functional Assessment of Effects of Neurotrophic Factors on Facial Nerve Reinnervation, *Arch Facial Plast Surg* 2005;7(2):114-8.
5. Lindsay RW, Heaton JT, Edwards C, Smitson C, Hadlock TA. Nimodipine and Acceleration of Functional Recovery of the Facial Nerve After Crush Injury. *Arch Facial Plast Surg* 2010;12(1):49-52.
6. Mohammadi R, Yadegarazadi MJ, Amini K. Peripheral nerve regeneration following transection injury to rat sciatic nerve by local application of adrenocorticotrophic hormone. *J Craniomaxillofac Surg* 2014;42(6):784–9.
7. 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.
8. Seddon HJ. Three types of nerve injury. *Brain* 1943;66(4):237-88.
9. Sunderland S. A classification of peripheral nerve injuries producing loss of function. *Brain* 1951;74:491–516.
10. Olivera ALR. Apoptosis of sensory neurons and satellite cells after sciatic nerve transection in C57BL/6J mice. *Braz J Med Biol Res* 2001;34:375-80.
11. Naik AK, Tandan SK, Dudhgaonkar SP, et al. Role of oxidative stress in pathophysiology of peripheral neuropathy and modulation by N-acetyl-L-cysteine in rats. *Eur J Pain* 2006;10(7):573.
12. Nadeau S, Filali M, Zhang J, et al. Functional recovery after peripheral nerve injury is dependent on the pro-inflammatory cytokines IL-1 β and TNF: Implications for neuropathic pain. *J Neurosci* 2011;31(35):12533–42.
13. Hughes PM, Wells GMA, Clements JM, et al. Matrix metalloproteinase expression during experimental autoimmune neuritis. *Brain* 1998;121(3):481–94.
14. Jessen KR, Arthur-Farraj P. Repair Schwann cell update: Adaptive reprogramming, EMT, and stemness in regenerating nerves. *Glia* 2019;67(3):421-37.
15. Gomez-Sanchez JA, Pilch KS, van der Lans M, et al. After Nerve Injury, Lineage Tracing Shows That Myelin and Remak Schwann Cells Elongate Extensively and Branch to Form Repair Schwann Cells, Which Shorten

Radically on Remyelination. *J Neurosci* 2017;37(37):9086-99.

16. 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.

17. 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.

18. Thorell L, Sjöberg LB, Hernell O. Nucleotides in human milk: Sources and metabolism by the newborn infant. *Pediatr Res* 1996;40(6):845–52.

19. Kennedy EP, Weiss SB. The function of cytidine coenzymes in the biosynthesis of phospholipides. *J Biol Chem* 1956;222(1):193–214.

20. Richardson UI, Watkins CJ, Pierre C, Ulus IH, Wurtman RJ. Stimulation of CDP-choline synthesis by uridine or cytidine in PC12 rat pheochromocytoma cells. *Brain Res* 2003;971(2):161–7.

21. 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.

22. Huang EJ, Reichardt LF. Neurotrophins: Roles in neuronal development and function. *Ann Rev Neurosci* 2001;24:677–736.

23. Cansev M. Uridine and cytidine in the brain: Their transport and utilization. *Brain Res Rev* 2006;52(2):389–97.

24. 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.

25. 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.

26. 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.

27. 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.

28. 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.

29. 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.

30. He X, Zhang L, Queme LF, et al. A histone deacetylase 3-dependent pathway delimits peripheral myelin growth and functional regeneration. *Nat Med* 2018;24(3):338–51.
31. Faraco G, Pancani T, Formentini L, et al. Pharmacological inhibition of histone deacetylases by suberoylanilide hydroxamic acid specifically alters gene expression and reduces ischemic injury in the mouse brain. *Mol Pharmacol* 2006;70(6):1876–84.
32. Sadri-Vakili G, Cha J-H. Histone Deacetylase Inhibitors: A Novel Therapeutic Approach to Huntingtons Disease (Complex Mechanism of Neuronal Death). *Curr Alzheimer Res* 2006;3(4):403–8.
33. Kazantsev AG, Thompson LM. Therapeutic application of histone deacetylase inhibitors for central nervous system disorders. *Nat Rev Drug Discov* 2008;7(10):854–68.
34. Kiefer JC. Epigenetics in development. *Dev Dyn* 2007;236(4):1144–56.
35. Broide RS, Redwine JM, Aftahi N, Young W, Bloom FE, Winrow CJ. Distribution of histone deacetylases 1-11 in the rat brain. *J Mol Neurosci* 2007;31(1):47–58.
36. De Ruijter AJM, Van Gennip AH, Caron HN, Kemp S, Van Kuilenburg ABP. Histone deacetylases (HDACs): Characterization of the classical HDAC family. *Biochem J* 2003;370(3):737–49.
37. Shukla S, Tekwani BL. Histone Deacetylases Inhibitors in Neurodegenerative Diseases, Neuroprotection and Neuronal Differentiation. *Front Pharmacol* 2020;11:537.
38. Cunliffe VT. Histone deacetylase 1 is required to repress Notch target gene expression during zebrafish neurogenesis and to maintain the production of motoneurons in response to hedgehog signalling. *Development* 2004;131(12):2983–95.
39. Romm E, Nielsen JA, Kim JG, Hudson LD. Myt1 family recruits histone deacetylase to regulate neural transcription. *J Neurochem* 2005;93(6):1444–53.
40. Bates EA, Victor M, Jones AK, Shi Y, Hart AC. Differential contributions of *Caenorhabditis elegans* histone deacetylases to Huntingtin polyglutamine toxicity. *J Neurosci* 2006;26(10):2830–38.
41. Bolger TA, Yao TP. Intracellular trafficking of histone deacetylase 4 regulates neuronal cell death. *J Neurosci* 2005;25(41):9544–53.
42. Linseman DA, Bartley CM, Le SS, et al. Inactivation of the Myocyte Enhancer Factor-2 Repressor Histone Deacetylase-5 by Endogenous Ca²⁺/Calmodulin-dependent Kinase II Promotes Depolarization-mediated Cerebellar Granule Neuron Survival. *J Biol Chem* 2003;278(42):41472–81.
43. Weng YL, Joseph J, An R, Song H, Ming GL. Epigenetic regulation of axonal regenerative capacity. *Epigenomics* 2016;8(10):1429–42.

44. Sugo N, Oshiro H, Takemura M, et al. Nucleocytoplasmic translocation of HDAC9 regulates gene expression and dendritic growth in developing cortical neurons. *Eur J Neurosci* 2010;31(9):1521–32.
45. Rivieccio MA, Brochier C, Willis DE, et al. HDAC6 is a target for protection and regeneration following injury in the nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106(46):19599–604.
46. Fischer DD, Cai R, Bhatia U, et al. Isolation and characterization of a novel class II histone deacetylase, HDAC10. *J Biol Chem* 2002;277(8):6656–66.
47. Cho Y, Cavalli V. HDAC signaling in neuronal development and axon regeneration. *Curr Opin Neurobiol* 2014;27:118–26.
48. 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.
49. Ghnenis AB, Czaikowski RE, Zhang ZJ, Bushman JS. Toluidine blue staining of resin-embedded sections for evaluation of peripheral nerve morphology. *J Vis Exp* 2018;2018(137):e58031.
50. Brull R, Hadzic A, Reina MA, Barrington MJ. Pathophysiology and etiology of nerve injury following peripheral nerve blockade. *Reg Anesth Pain Med* 2015;40(5):479-90.
51. Gurunluoglu R, Gurunluoglu A. Paul of Aegina: landmark in surgical progress. *World J Surg* 2003;27(1):18-25.
52. Mafi P, Hindocha S, Dhital M, Saleh M. Advances of Peripheral Nerve Repair Techniques to Improve Hand Function: A Systematic Review of Literature. *Open Orthop J* 2012;6:60-8.
53. Ölke HC, Biçer ÖS, Mirioğlu A, et al. Clinical, electrophysiological, and histomorphological effects of local coenzyme Q10 and vitamin E use in a rat model of peripheral nerve injury. *Acta Orthop Traumatol Turc* 2023;57(1):23-9.
54. Yarar E, Kuruoglu E, Kocabıçak E, et al. Electrophysiological and histopathological effects of mesenchymal stem cells in treatment of experimental rat model of sciatic nerve injury. *Int J Clin Exp Med* 2015;8(6):8776-84.
55. Kustepe E, Altunkaynak BZ, Alkan I, et al. Potential Effects of Stem Cells Derived from the Peripheral Nerve and Adipose Tissue after the Nerve Crush Injury in Control and Obese Rats. *J Invest Surg* 2022;35(5):1021-33.
56. Sakar M, Korkusuz P, Demirbilek M, et al. The effect of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) (PHBHHx) and human mesenchymal stem cell (hMSC) on axonal regeneration in experimental sciatic nerve damage. *Int J Neurosci*. 2014;124(9):685-96.
57. Delibaş B, Kaplan AA, Marangoz AH, et al. The effect of dietary sesame oil and ginger oil as antioxidants in the adult rat dorsal root ganglia after

peripheral nerve crush injury. *Int J Neurosci* 2022;20:1-11.

58. Yuksel TN, Halici Z, Demir R, et al. Investigation of the effect of telmisartan on experimentally induced peripheral nerve injury in rats. *Int J Neurosci* 2015;125(6):464-73.

59. Türedi S, Yuluğ E, Alver A, Bodur A, İnce İ. A morphological and biochemical evaluation of the effects of quercetin on experimental sciatic nerve damage in rats. *Exp Ther Med* 2018;15(4):3215-24.

60. Khademi E, Mahabadi VP, Ahmadvand H, Akbari E, Khalatbary AR. Anti-inflammatory and anti-apoptotic effects of hyperbaric oxygen preconditioning in a rat model of cisplatin-induced peripheral neuropathy. *Iran J Basic Med Sci* 2020;23(3):321-28.

61. Al-Adwani DG, Renno WM, Orabi KY. Neurotherapeutic effects of Ginkgo biloba extract and its terpene trilactone, ginkgolide B, on sciatic crush injury model: A new evidence. *PLoS One* 2019;14(12):e0226626.

62. Cavalcante Miranda de Assis D, Martins Lima Ê, Teixeira Goes B et al. The parameters of transcutaneous electrical nerve stimulation are critical to its regenerative effects when applied just after a sciatic crush lesion in mice. *Biomed Res Int* 2014;2014:572949.

63. Kavlak E, Belge F, Unsal C, et al. Effects of pulsed electromagnetic field and swimming exercise on rats with experimental sciatic nerve injury. *J Phys Ther Sci* 2014;26(9):1355-61.

64. Bademoğlu G, Erdal N, Uzun C, Taşdelen B. The effects of pulsed electromagnetic field on experimentally induced sciatic nerve injury in rats. *Electromagn Biol Med* 2021;40(3):408-19.

65. Rahimian R, Fakhfouri G, Rasouli MR, et al. Effect of pioglitazone on sciatic nerve ischemia/reperfusion injury in rats. *Pediatr Neurosurg* 2009;45(2):126-31.

66. Apaydın SA, Sahin C, Cayli S, et al. Levetiracetam treatment in an experimental model of sciatic nerve injury: A randomized controlled trial. *Neurol Res* 2023;45(1):86-96.

67. Bu Y, Wang X, Li L, et al. Lithium Loaded Octa-Poly(Ethylene Glycol) Based Adhesive Facilitates Axon Regeneration and Reconnection of Transected Peripheral Nerves. *Adv Healthc Mater* 2020;9(13):e2000268.

68. Yuan B, Zheng X, Wu ML, et al. Platelet-Rich Plasma Gel-Loaded Collagen/Chitosan Composite Film Accelerated Rat Sciatic Nerve Injury Repair. *ACS Omega* 2023;8(3):2931-41.

69. Ozgenel GY, Filiz G. Combined application of human amniotic membrane wrapping and hyaluronic acid injection in epineurectomized rat sciatic nerve. *J Reconstr Microsurg* 2004;20:153-7.

70. Görgülü A, Imer M, Şimşek O, et al. The effect of aprotinin on extraneural scarring in peripheral nerve surgery: An experimental study. *Acta Neurochir*

1998;140(12):1303-7.

71. Oktay MF, Askar I, Yildirim A, et al. Effects of antineoplastic agents on the peripheral nerves under a surgical tissue expansion procedure: an experimental study. *Microsurgery* 2006;26(6):473-9.

72. Gocmen S, Sirin S, Oysul K, Ulas UH, Oztas E. The effects of low-dose radiation in the treatment of sciatic nerve injury in rats. *Turk Neurosurg* 2012;22(2):167-73.

73. Özay R, Bekar A, Kocaeli H, Karlı 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(6):615-22.

74. 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.

75. 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.

76. 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.

77. 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.

78. Liu Z, Li W, Geng L, et al. Cross-species metabolomic analysis identifies uridine as a potent regeneration promoting factor. *Cell Discov* 2022;8(1):6.

79. Sakloth F, Manouras L, Avrampou K, et al. HDAC6-selective inhibitors decrease nerve-injury and inflammation-associated mechanical hypersensitivity in mice. *Psychopharmacology* 2020;237(7):2139–49.

80. Duman M, Martinez-Moreno M, Jacob C, Tapinos N. Functions of histone modifications and histone modifiers in Schwann cells. *Glia* 2020;68(8):1584–95.

81. Khezri KM, Turkkan A, Koc C, et al. Anti-apoptotic and anti-oxidant effects of systemic uridine treatment in an experimental model of sciatic nerve injury. *Turk Neurosurg* 2021;31(3):373-78.

82. Khezri KM, Turkkan A, Koc C, et al. Uridine treatment improves nerve regeneration and functional recovery in a rat model of sciatic nerve injury. *Turk Neurosurg* 2022;32(6):935-43.

EK-1: KISALTMALAR

ELISA

Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

WD	Wallerian dejenerasyon
CDP-kolin	Sitidin difosfat-kolin
NGF	Nöronal Growth Faktör
UTP	Üridin trifosfat
CTD	Sitidin trifosfat
CDP	Sitidin difosfat
HİE	Hipoksik iskemik ensefalopati
DNA	Deoksiribonükleik asit
HDAC	Histon deasetilaz
HAT	Histon asetilaz
HH	Hungtington hastalığı
SIRT	Sirtüinler
NAD	Nikotinamid adenin dinükleotid
BUÜTF	Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi
DENHAB	Deney Hayvanları Yetiştirme ve Araştırma Birimi
HADYEK	Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
PBS	Fosfat tamponlu salin
OD	Optik dansite
TBST	Tris tamponu ve tween
DDSA	Dodesinil süksinik anhidrit
NMA	Metilnadik anhidrit
DPM-30	2,4,6-tris dimetilaminometil fenol
ANOVA	Tek yönlü varyans analizi

SEM	Ortalamanın standart hatası
SH	Standart hata
SD	Standart deviasyon

EK-2: ŞEKİL, RESİM, TABLO VE GRAFİK AÇIKLAMALARI

Şekil-1: Nöronun Şematik gösterimi **D:** Dentrit, **N:** Nöron, **R:** Ranvier düğümü, **A:** Akson, **M:** Miyelin kılıf, **Sc:** Schwann hücresi.

Şekil-2: Periferik sinir yaralanma tiplerinin şematik gösterimi.

Şekil-3: Nöronal hasar sonrası Wallerian dejenerasyonun şematik görüntüsü
N: Nissl substratları, **Mi:** Miyelin, **Sc:** Schwann hücresi, **K:** Kas, **Kr:** Kromatoliz, **At:** Aksonal transeksiyon, **M:** Makrofaj, **Mid:** Miyelin debris, **WD:** Wallerian dejenerasyon.

Şekil-4: Schwann hücreleri distal köprüler (Bungner' in bantları) oluşturarak rejenerasyon sürecine kılavuzluk eder. Aksonal rejenerasyon (ok yönünde) distale doğrudur ve rejenerasyon 1 mm/gündür. (2).

Şekil-5: Üridinin ($C_9H_{12}N_2O_6$) moleküler yapısı. Üridin RNA'nın yapısına katılan major pirimidin nükleozididir. Molekül ağırlığı 244,20 g/mol olup post-translasyonel modifikasyon ve gen ekspresyonunda önemli görevleri mevcuttur.

Şekil-6: Kennedy yolağı aracılığı ile fosfatidilkolin biyosentezi. Üridin Kennedy yolağı aracılığı ile membran fosfolipid biyosentezinin öncüsüdür ve hız kısıtlayıcı basamağı olan CDP-kolin sentezini deneysel ve in vivo koşullarda artırdığı bilinmektedir. UTP: Üridin trifosfat, CTP: Sitidin trifosfat, CDP: Sitidin difosfat. (23).

Şekil-7: Nükleozomun (**A**) ve N-terminalin (**B**) şematik gösterimi L: Lizin, As: Asetil.

Şekil-8: Spesifik lizin (L) kalıntılarındaki histon asetil (As) molekülünün asetilasyon seviyeleri, histon asetilazlar (HAT'ler) ve histon deasetilazlar (HDAC'ler) tarafından asetilasyon ve deasetilasyonun eşzamanlı gerçekleşmesi ile belirlenir. Histonların asetilasyonu ve deasetilasyonu, DNA-Kromatin komplekslerinin konformasyonel yapısını ve ardından transkripsiyonel gen ekspresyonunu oluşturmak için hayati öneme sahiptir. (33).

Şekil-9: Epinöral sütür tekniğinin şematik gösterimi.

Şekil-10: Deney akış şeması.

Resim-1: Sol lateral dekübit pozisyonda (A) posterolateral insizyonu takiben künt diseksiyon ile ilerlenerek sağ siyatik sinir (B) açığa çıkarıldı.

Resim-2: Siyatik sinir ve distal fasiküler dallanma noktası **SS:** Siyatik Sinir, **P:** Peroneal Fasikül, **T:** Tibial Fasikül.

Resim-3: Künt diseksiyon ile ilerlenerek unifasiküler siyatik sinir segmenti ortaya kondu (A). Takiben root hooku ile kaldırılan siyatik sinirde dermatom bıçağı yardımı ile tam kat sinir kesisi oluşturuldu (B). Epinöral sinir sütürasyon yöntemi yardımıyla aralarında 180° bulunan iki adet sütün ile distal ve proksimal güdük arasında primer anostomoz sağlandı (C).

Resim-4: Histomorfolojik analizler için eksize edilen siyatik sinir segmentlerinin post-fiksasyon işlemlerinin tamamlanarak resin bloklara yerleştirildiği görülmektedir.

Resim-5: 1-2 µm kalınlığında kesitleme amacı ile cam bıçak hazırlanması. **A** Cam bıçak makinesi **B** Cam **C-D-E-F** Cam bıçak ve tekne hazırlanışını göstermektedir.

Resim-6: ImageJ yazılımı üzerinde akson sayımından önce oluşturulan sayım çerçevesi görülmektedir.

Resim-7: Yara yeri enfeksiyonu gelişen sıçanların makroskopik görüntüsü.

Resim-8: Üridin ve Kontrol gruplarının eksize edilen sinir örnekleri; **A, B, C, D** ve **E** Kontrol grubu, **F, G, H, I** ve **İ** Üridin grubuna ait siyatik sinir segmentlerini göstermektedir.

Resim 9: %1 boraks-toluidin mavisi ile boyanan ince kesitler. A, Sham grubu; B, Kontrol grubu; C, Üridin grubu; Bar, 20 mikrometre.

Tablo-1: HDAC sınıflandırılması ve hücre içi lokalizasyonları (37).

Tablo-2: Petersen ve arkadaşları tarafından cilt ve adele fasya durumunu, sinir yapışıklığı ve ayrılabilirliğini tanımlayan derecelendirme sistemi (48).

Tablo-3: Western Blot Analizi ile Hesaplanan Asetillenmiş Histon-H3 Protein Düzeyleri.

Tablo-4: Western Blot Analizi ile Hesaplanan Asetillenmiş Histon-H4 Protein Düzeyleri.

Tablo-5: Sayım alanındaki akson sayıları.

Tablo-6: Milimetre karedeki akson sayıları.

Grafik-1: Sinir yapışıklık ve ayrılabilirliğini gösteren Peterson derecelendirmesinin kantitatif sonuçları. **p<0,01; ***p<0,001 Kontrol grubuna göre. Her grupta n=16.

Grafik-2: HDAC1 miktarı. **p<0,01; ***p<0,001 Kontrol grubuna göre. Her grupta n=8 (ortalama değer ± standart hata).

Grafik-3: Asetil-Histon H3 Protein Düzeyleri. **p<0,01; ***p<0,001 Kontrol grubuna göre. Her grupta n=8 (ortalama değer ± standart hata).

Grafik-4: Asetil-Histon H4 Protein Düzeyleri. *p<0,05; ***p<0,001 Kontrol grubuna göre. Her grupta n=8 (ortalama değer ± standart hata).

Grafik-5: Ölçüm alanında sayılan akson sayıları, * Kontrol ve Üridin grupları arasında (p < 0.001).

Grafik-6: Milimetre karede akson sayıları, * Kontrol ve Üridin grupları arasında (p < 0.001).

TEŞEKKÜR

Eğitimim boyunca bilgi ve tecrübesinden çok şey öğrendiğim, öğrencisi olmaktan gurur duyduğum, aynı zamanda tez danışman hocam olan Prof. Dr. Ahmet Bekar başta olmak üzere kıymetli hocalarım Prof. Dr. Selçuk

Yılmazlar, Prof. Dr. Şeref Doğan, Prof. Dr. Hasan Kocaeli ve eğitimim boyunca hiçbir desteğini esirgmeden bizlere birşeyler öğretmeye çalışan aynı zamanda abim olan Prof. Dr. M. Özgür Taşkapılıoğlu ve ablam olan Dr. Öğr. Üyesi Dr. Pınar Eser'e, tezimin her aşamasında nöro bilim laboratuvarını ve imkanlarını bizden esirgemenyen Prof. Dr. Mehmet Cansev ve ekibine, anatomi laboratuvarını bizimle paylaşan Prof. Dr. İlker Mustafa Kafa ve ekibine minnetlerimi sunuyorum. İhtisasım boyunca birlikte çalışmaktan büyük mutluluk duyduğum çalışma arkadaşlarım Dr. Oğuz Altunyuva, Dr. Rabia Nur Balçın, Dr. Yazan Banishamsah, Dr. Reyhan Kasap ve diğer asistan arkadaşlarıma teşekkürü borç bilirim. Multidisipliner çalışma hayatımızda birlikte pek çok başarıya ulaştığımız diğer branştan arkadaşlarım, klinik, yoğun bakım ve polikliniğimiz başta olmak üzere tüm hastanemiz personellerine ve yönetimine şükranlarımı sunuyorum.

Tıp fakültesini beraber bitirdiğim ve uzakta olsak da bizim için mesafelerin önemi olmadığı kardeşlerim Dr. Fatih Alpkıray, Dr. Fevzi Aydoğdu, Dr. Emin Kalay, Dr. Ahmet Baysal, gerek İstanbul'da gerek Bursa'da beni hiç yalnız bırakmayan kıymetli abim Dt. İsmail Kaplan ve kıymetli ailelerine teşekkürlerimi sunuyorum.

Bu zorlu eğitim sürecimde duası ve desteğini hiç esirgemeyen büyüklerim, başta anne ve babam olmak üzere çok kıymetli ailem, bilgisinden hep faydalandığım dayım Hasan Uzanulu ve diğer akrabalarıma sonsuz teşekkür ediyorum.

Herşeyim, biricik eşim Buket Erkan Özmarasalı ve ailesine kalpten sevgilerimle..

ÖZGEÇMİŞ

28.08.1992'de Malatya'da doğdum. İlk öğrenimimin ilk dört yılını Manisa/Soma Naciye Evren İlköğretim Okulu'nda tamamladıktan sonra beşinci sınıf ve orta öğrenimimi Malatya Derme İlköğretim Okulu'nda

tamamladım. Lise öğrenimimi Malatya Fen Lisesi'nde tamamladım. Öğrenim sürem boyunca bilgisayar olimpiyat ekibinde görev aldım. Üniversite sınavı neticesinde İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde okumaya hak kazandım. Öğrenimim boyunca klinik ve temel bilimlere olan ilgim dışında 2014 ve 2015 yıllarında kurucu üyesi olduğum Nadir Hastalıklar Kulübü'nde çalışmalarımız oldu. 2016 mezuniyet yılı içerisinde intern komitesinde yer aldım ve pratisyen hekimler için ilk olarak yazılan Hekimliğe Merhaba, Dahili, Cerrahi, Adli aciller adlı el kitabının yazımı esnasında katkıda bulundum. Mecburi hizmetimin bir kısmını Adıyaman Sincik Devlet Hastanesinde tamamladıktan sonra TUS sonucuma göre Malatya İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroşirurji Anabilim Dalı'nda ihtisas yapmaya hak kazandım. Burada kısa süre çalıştım. Girmiş olduğum sınavın yeniden yerleştirme sonuçlarına göre Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroşirurji Anabilim dalında Nöroşirurji eğitimi almaya hak kazandım.