

**T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
PLASTİK VE REKONSTRÜKTİF CERRAHİ
ANABİLİM DALI**

**DENEYSEL PERİFERİK SİNİR HASARINDA
FARKLI FORMÜLLERDEKİ
ERİTROPOETİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

DR. GÜLAY BOZTOSUN

TEZ DANIŞMANI

PROF. DR. B. İNCİ GÖKALAN KARA

DENİZLİ – 2008

**T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
PLASTİK VE REKONSTRÜKTİF CERRAHI
ANABİLİM DALI**

**DENEYSEL PERİFERİK SİNİR HASARINDA
FARKLI FORMÜLLERDEKİ
ERİTROPOETİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

DR. GÜLAY BOZTOSUN

TEZ DANIŞMANI

PROF. DR. B. İNCİ GÖKALAN KARA

DENİZLİ – 2008

Prof.Dr. İnci GÖKALAN KARA danışmanlığında Dr. Gülay BOZTOSUN tarafından yapılan “Deneysel Periferik Sinir Hasarında Farklı Formüllerdeki Eritropoetinin Karşılaştırılması” başlıklı çalışma jürimiz tarafından Plastik ve Rekonstrüktif Cerrahi Anabilim Dalı UZMANLIK TEZİ olarak kabul edilmiştir.

BAŞKAN Prof.Dr. İnci GÖKALAN KARA

ÜYE Prof.Dr.Cüneyt Orhan KARA

ÜYE Yrd.Doç.Dr.R.Hakan ÖZCAN

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

01.06.2009

T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANI

Prof. Dr. Cüneyt Orhan KARA

TEŞEKKÜR

Eğitimim süresince ve bu araştırmanın gerçekleştirilmesi esnasında yardımlarını esirgemeyen proje yürütücüm ve danışmanım, Plastik Cerrahi Anabilim Dalı Başkanı Prof.Dr. İnci Gökalan Kara ve KBB Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof.Dr. Cüneyt Kara başta olmak üzere, bu araştırmanın planlanması ve gerçekleştirilmesinde değerli zamanını ve yardımlarını, emeğini hiç bir zaman esirgemeyen, 24 saat boyunca destekleyen Nöroşirürji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç.Dr. Bayram Çırağ'a, pratik zekası ve varlığıyla her zaman çözüm üreten ve mikroskopi aşamasında değerli katkılarını esirgemeyen güzel insan ve sevgili abim Anatomi Anabilim Dalı Başkanı Doç.Dr. Esat Adıgüzel'e, yoğunluğa rağmen yardımlarını esirgemeyen Nöroloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Atilla Oğuzhanoğlu'na ve asistan arkadaşımla Dr. Utku Cenikli'ye, Patoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyelerine ve asistan arkadaşlarıma, başta Vet.Dr. Barbaros Şahin'e ve Deneysel Araştırma Merkezinin tüm çalışanlarına teşekkür ederim. Özel insan sevgili dostum Op. Dr. Funda Cabar Tümkeya'ya destekleri için teşekkür ederim.

Ayrıca eğitim hayatım ve zorlu geçen asistanlık hayatım boyunca benden ve plastik cerrahi bölümünden MADDİ ve MANEVİ desteklerini esirgemeyen benimle her nefesde bu yola başkoyan sevgili annem **Ayşe Boztosun** ve babam **Mehmet Boztosun**, canım kardeşlerim **Dr. Cem Boztosun** ve **Cemal Boztosun'a** SONSUZ TEŞEKKÜR EDERİM.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	3
PERİFERİK SİNİR ANOTOMİSİ	3
PERİFERİK SİNİR MİKROVASKÜLER ANOTOMİ ...	8
PERİFERİK SİNİR YARALANMALARI	9
PERİFERİK SİNİR CERRAHİSİ	13
ERİTROPOETİN	22
GEREÇ ve YÖNTEM	29
SİYATİK SİNİR ANOTOMİSİ	30
ÇALIŞMA GRUPLARI	31
CERRAHİ TEKNİK	31
İLAÇ UYGULANMASI	34
DEĞERLENDİRME YÖNTEMLERİ	34
BULGULAR	41
GENEL DEĞERLENDİRME BULGULARI	41
FONKSİYONEL DEĞERLENDİRME BULGULARI ...	41
KASLARIN HİSTOLOJİK DEĞER. BULGULARI	45
SİNİRLERİN HİSTOLOJİK DEĞER. BULGULARI	48
TARTIŞMA ve SONUÇ	54
ÖZET	71
SUMMARY	72
KAYNAKLAR	73

TABLolar

	Sayfa No
Tablo 1: Siyatik Fonksiyon İndeks (SFI) değerleri	41
Tablo 2: EMG bulguları	42
Tablo 3: Deney/Kontrol bacak kas ağırlık oranları (%)	45
Tablo 4: Gastrokinemus kas lifi ortalama çapları (μm)	47
Tablo 5: Epinöral skar doku indeksi (μm) değerleri	49
Tablo 6: Kontrol ve deneysel bacaklarda toplam myelinli akson sayıları	51
Tablo 7: Ortalama myelinli sinir lifi çapı (μm)	52
Tablo 8: Ortalama akson çapı (μm)	52
Tablo 9: “g-oranı” sonuçları	52
Tablo 10: Deneysel bacakda ortalama myelin kalınlığı (μm)	53

ŞEKİLLER

	Sayfa No
Şekil 1: Omurilik ve periferik sinir gövdesi	3
Şekil 2: Nöron anatomisi	4
Şekil 3: Periferik sinir yapısal anatomisi	5
Şekil 4: Normal periferik sinir anatomisi	6
Şekil 5: Sinir kılıfları	7
Şekil 6: Periferik sinirlerin fasiküler yapılarına göre	8
Şekil 7: Periferik sinirlerin mikrovasküler dolaşımı	9
Şekil 8: Sunderland sinir hasarının sınıflandırılması	12
Şekil 9: Epinöral onarım	14
Şekil 10: Perinöral onarım	15
Şekil 11: Sinir dejenerasyon ve rejenerasyonu	14
Şekil 12: Çalışma gruplarının şematik görünümü	31
Şekil 13: Siyatik sinir diseksiyonu	32
Şekil 14: Deney ve kontrol gruplarında uygulanan cerrahi işlem	33
Şekil 15: SFI değerlendirmede kullandığımız “yürüme analiz testi”	35
Şekil 16: Siyatik fonksiyon indeksinin hesaplanması	36
Şekil 17: Siyatik fonksiyon indeksinin hesaplanması için kullanılan formül	36
Şekil 18: EMG de kullanılan cihaz,ve EMG çekimi ..	37
Şekil 19: EMG şeması görülmekte	38
Şekil 20: Kas iyileşme oranının hesaplanması	39
Şekil 21: Epinöral skar doku indeksinin hesaplanması	40
Şekil 22: Toplam miyelinli akson sayısının hesaplanması	40
Şekil 23: Ortalama SFI değerlerinin karşılaştırılması	42
Şekil 24: Sağ bacak / Sol bacak latans oranları	43
Şekil 25: Deneysel bacak / kontrol bacak kasılma amplitüdü oranları	44
Şekil 26: Deneysel bacak/ kontrol bacak kasılma eğrisi alan oranları	44
Şekil 27: Gruplara göre gastrokinemus makroskopik görünümü	45
Şekil 28: Deneysel bacak/kontrol bacak kas ağırlığı oranları	46
Şekil 29: Gastrokinemus mikroskopik görünümü	47
Şekil 30: Ortalama kas lifi çapları	48
Şekil 31: Epinöral skar doku indeksi değerleri	49

Şekil 32: Epinöral skar dokusu	50
Şekil 33: Aksonal rejenerasyonun değerlendirilmesi	50
Şekil 34: Miyelinli akson sayılarının karşılaştırılması	51
Şekil 35: Miyelinli sinir lifi çapları ve akson çaplarının karşılaştırılması	52
Şekil 36: Ortalama myelin kalınlıklarının karşılaştırılması	53
Şekil 37: Eponun aracılığıyla oluşan aksonkoruyucu yol	59

KISALTMALAR

PSS	Periferik Sinir Sistemi
SSS	Santral Sinir Sistemi
Epo	Eritropoetin
Ep-α	Epoetin-α
Ep-β	Epoetin- β
Dp-α	Darbopoetin-α
r-hEpo	Rekombinant human eritropoetini
r-mEpo	Rekombinant mice eritropoetini
NGF	Sinir büyüme faktörü
EpoR	Eritroid prekürsör hücre yüzey reseptörü
SC	Schwan hücresi
DRG	Dorsal kök gangliyonu
NO	Nitrik oksit
sc	Subkutan ilaç uygulaması
M-CSF	Makrofaj koloni stimülatör faktör
G-CSF	Granülosit stimülatör faktör
CFU-E	Koloni şekillendiren eritroid ünitesi
BFU-E	Küme şekillendiren eritroid ünitesi
L-NAME	Nitro-L-arginin metil ester
BDNF	Beyin kaynaklı nörotrofik faktör
CNTF	Silier nörotrofik faktör
LIF	Lökemi inhibitör faktör

FGF	Fibroblast büyüme faktörü
GDNF	Glia kaynaklı nörotrofik faktör
TNF	Tümör nekroz faktörü
VEGF	Vasküler endotelyal büyüme faktörü
EGF	Epidermal büyüme faktörü
PDGF	Trombosit kaynaklı büyüme faktörü
H&E	Hematoxylin Eosin
ESDİ (μm)	Epinöral skar doku indeksi
TMAS	Toplam myelinli akson sayısı
OMSLÇ	Ortalama myelinli sinir lifi çapı
OAC (μm)	Ortalama akson çapı
MK (μm)	Deneysel bacakda myelin kalınlığı

GİRİŞ

Merkezi sinir sisteminden medulla spinalisteki motor nöronlara, dorsal ganglionlardaki duyuusal nöronlara ve sempatik ganglionlardaki sempatik nöronlara uzanan ve gövdelerinde aksonal uzantılardan oluşan ve sonlandıkları hedef organa göre motor, duyuusal veya otonomik fonksiyonları olan yapılara periferik sinir sistemi adı verilir (1).

Periferik sinir hasarının en sık nedeninin travma olduğu bilinmektedir (2). Yaralanmalar sonrası tedavideki ana amaç, sinir bütünlüğünü tekrar sağlayarak iletimin geri dönüşünü ve kaybolan motor veya duyu fonksiyonları yeniden kazanmaktır. Travma, enfeksiyon, iskemik olaylar gibi nedenler sonucu oluşan periferik sinir hasarının cerahisinde temel prensip, hasarlı alanda skar ve fibrotik dokunun eksize edilmesi ve sinir uçları karşılıklı getirilerek anastomoz edilmesidir. Sonuçta fonksiyonların maksimum düzeyde geri dönüşünü elde etmek için aksonların uygun doğrultuda distale yönlendirmeleri gerekmektedir. Tedavide planlanan yaralanma sonrasında sinir uçları arasında defekt ve gerginlik olmadan bir araya getirilerek primer onarıma olanak sağlamaktır. Primer onarımın mümkün olduğu durumlarda bile, onarım bölgesinde gelişen fibrozis ve rejenerasyonun epinöriyum dışına çıkmasıyla meydana gelen nöroma oluşumu, rejenerasyonu olumsuz yönde etkileyebilir ve fonksiyonların dönüşü yeterli düzeyde olmayabilir (3).

Bu güne kadar bu alanda yapılmış sayısız çalışma olmasına rağmen, onarım hattında skar dokusunun azaltılması ve uygun doğrultuda aksonal rejenerasyonun sağlanması için yapılan çalışmalar halen rekonstrüktif cerrahinin en önemli araştırma konularından biri olmaya devam etmektedir. Başarıyı artırmak için teknik yöntemler üzerinde yoğunlaşmış ve farklı onarım teknikleri (4, 5, 6) ve farklı dikiş materyalleri tanımlanmış (7, 8) onarım alanına manyetik alan (9, 10), lazer (11), radyasyon (12) veya hiperbarik oksijen uygulaması (13) gibi yöntemler denenmiş; sistemik olarak kullanılan birçok ilaç veya hormonun (14, 15, 16) bu alandaki etkisi araştırılmıştır. Benzer şekilde onarım hattındaki kesik sinir uçlarının epinöral tüp (17,

18), arter (19), ven (20), fasya (21), omentum (22), prezerve dura (23), pseudosinovya (24) ve kollajen film (25) gibi non-sentetik materyaller ile sarılması ya da bu amaçla polietilen ve laktat polimerleri (26), tantalyum ve kauçuk (27), silikon (28) gibi sentetik materyaller kullanılması denenmiş, fakat rutin klinik uygulamaya geçememiştir. Üzerinde çalışılan bir diğer konu da, aynı amaçla anastomoz sonrası onarım hattına topikal ve sistemik olarak uygulanan tedaviler ile ilgilidir. Tiroid hormonu (29), insan amnion sıvısı (30), hyalüronik asit (31, 32), aprotinin (33), trombosit zengin plazma (34), mitomisin C (35), eritropoetin (36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44), birçok büyüme faktörü ve bunlardan biri olan sinir büyüme faktörü (NGF) gibi nörotrofik faktörler (45, 46) ve sitokinler (46) bu kapsamda kullanılan maddelerden bazılarıdır.

Eritropoetin(Epo); eritropoezi uyaran sitokin bir hormondur, ve bir çok büyüme faktörünün öncüsüdür. Günümüzde Epo Kronik böbrek yetmezliği nedeniyle hemodiyaliz uygulanan hastalardaki anemi tedavisinde ve kemoterapi uygulanan hastalardaki aneminin tedavisinde kullanılmaktadır.

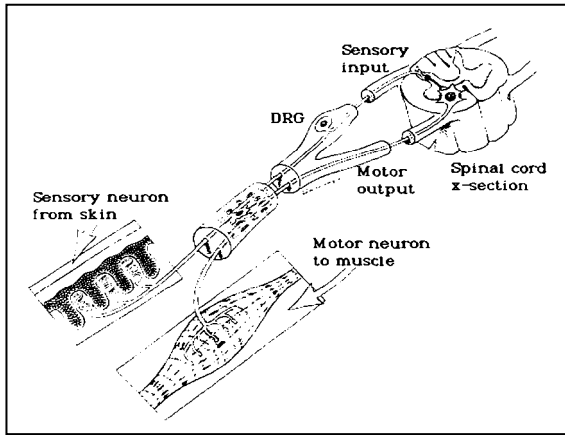
Son yıllarda Epo; pek çok iskemi-reperfüzyon modelinde (47, 48, 49, 50), spinal kord iskemi modellerinde (47, 48, 49) ve periferik sinir yaralanmalarında (36, 37, 38, 46) yoğun bir şekilde klinik ve deneysel olarak kullanılmaktadır. Etkinliği anlaşıldıkça, etkin uygulama yolları ve etkin dozların araştırılmasına gidilmiştir (37). Campana ve Myers; Epo verilmesinin DRG (Dorsal kök gangliyonu) duyu nöronlarının apoptozisini önlediğini kanıtladı (41). Duyu aksonlarının kesisinden sonra, kesik aksonlarla ilişkili Schwann hücrelerinden Epo salınmakta olduğu belirlendi (38, 41). Epo'nin nöronlarda antiapoptotik özelliği yanında nörotrofik ve nöroprotektif etkilere sahip olduğuda takip eden çalışmalarda gösterildi (37, 44).

Bu çalışmada, NGF- β dahil pek çok büyüme faktörünün öncülü Epo'nin, üç değişik formunun Epoetin- α (Ep- α), Epoetin- β (Ep- β), Darbepoetin- α (Dp- α), aynı dozda (2000ü/kg) intraperitoneal uygulanması sonucu deneysel olarak ratlarda oluşturulan siyatik sinir kesi tamirinin iyileşmesi üzerine etkinlikleri açısından formlar arasında fark olup olmadığının araştırılması amaçlanmıştır.

GENEL BİLGİLER

PERİFERİK SİNİR ANATOMİSİ

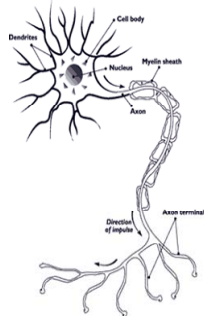
Santral sinir sistemi (SSS) ile periferik hedef organlar arasında uyarı iletimini sağlayan, böylece motor, duyu ve otonomik fonksiyonlarının düzenlenmesinde önemli rol oynayan, aracı yoldur periferik sinir sistemi (PSS). Dorsal ve ventral spinal köklerin birleşmesinden oluşan, duysal ve motor lifler içeren periferik sinirler şematik olarak görülmektedir (**Şekil 1**). Motor, duyu ve otonom olmak üzere üç tip periferik sinir bulunur. Motor sinirlerin hücre gövdeleri medulla spinalis ön boynuzunda, duyu sinirlerinin hücre gövdeleri ise dorsal spinal arka kökler içerisindedir. Otonom sinir sistemine ait nöronlar santral sinir sistemi içinde ve dışında bulunan, nükleus ve ganglionlarda toplanmışlardır (51).



Şekil 1: Omurilik ve omurilikten uzanan periferik sinir gövdesi, motor ve duyu ayrımı Reproduced with modifications from Lundborg, 18) Appenzeller 0, Parks RD, MacGee J,(1968) Peripheral neuropathy in chronic disease of the respiratory tract. Am J Med 44: 873-880.

Nöronların hücre gövdelerine 'soma' veya 'perikaryon' denir (**Şekil 2**). Hücre gövdesi sinir liflerinin beslenmesini, korunmasını ve devamlılığını sağlayan, kısaca nöronun metabolik ve genetik merkezi olan temel fonksiyonel ünitesidir. Nöronun hücre gövdesi nükleus, nükleolus ve protein sentezinden sorumlu aparatları olan Nissle cisimcikleri'ni (ribozomlu endoplazmik retikulum) içerir (52). Sitoplazma içerisinde bulunan diğer önemli bir yapı da, dendrit ve aksonların sonlarına kadar uzanan nörofibrillerdir, nörotübül ve nörofilamentlerden oluşur. Metabolitlerin taşınması, hücre şeklinin korunması ve desteklenmesinde nörofibriller görev alır(51). Nöronun bilgi alıcısı olan bölgeleri dendritler ve hücre gövdeleridir. Dendritler, nöronlar arasındaki bağlantının sağlanmasından ve çevreden gelen uyarıların hücre

gövdesine iletilmesinden sorumludur. Aksonlar daha uzun ve tek uzantılar olup daha sonra kollara ayrılır ve primer görevi sinirsel uyarıyı periferdeki kas dokusuna aksiyon potansiyeli olarak iletmektir. Aksonlar sıklıkla düzgün konturlu ve uniformdur, aksonların ortalama çapları 1-24 μm arasında değişir, uzunlukları 50 μm 'den birkaç metreye kadar uzayabilir. Uzantılarının sayısı, uzunluk ve şekline göre nöronlar; unipolar, bipolar ve multipolar olmak üzere üç grup olarak bulunurlar (51).



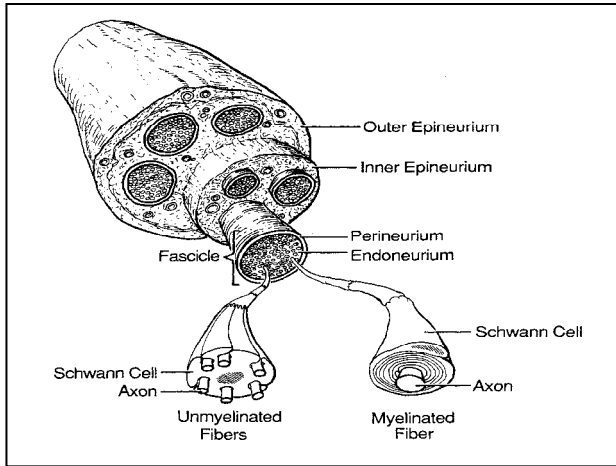
Şekil 2: Nöron sinir sisteminin anatomik ve fonksiyonel olarak en küçük birimidir.

Nöronlar 3 temel bölgeye ayrılır:
Hücre gövdesi,
Dentritik bölge,
Akson

Akson, “aksolemma” denilen plazma membranı ile çevrilmiştir ve hücre sitoplazması aksonda “aksoplazma” adını alır. Aksonlarda Nissl cisimcikleri bulunmaz, sitoplazma çeşitli proteinler ve nörofilamentler ile mikrotübülleri içerir, bu filament ve tübüller içeren hücre iskeleti “cytoskeleton” akson boyunca uzanır. Aksonlar yan dallar verebilir ve bu dallarla diğer dendrit, akson ya da perikaryonlar ile sinaps yapar. “Teledendria” olarak adlandırılan bu dallanmalar hücre gövdesine yakın kısımlarda gözlenmez (51).

Myelin, merkezi sinir sisteminde oligodendrositler, periferik sinir sisteminde ise Schwann hücreleri (SC) tarafından yapılır. Miyelinli ya da miyelinsiz olabilir sinir lifleri, her sinir lifinde aksonlar mutlaka uç uca dizilmiş Schwann hücreleri ile sarılmışlardır. Miyelinli liflerde her akson tek bir SC tarafından sarılırken, miyelinsiz liflerde bir SC birden fazla aksonu çevrelemektedir (**Şekil 3**). SC'lerden üretilen ve temel olarak ekstraselüler matriks proteinlerinden (kollajen tipIV ve laminin) oluşan bir bazal membran sinir lifini çevrelemektedir ve bu yapının rejenerasyon için önemi büyüktür. SC akson çevresindeki alanda iyon dengesinin sağlanmasına, nörotransmitterlerin dağılımına ve aksolemma boyunca sodyum kanallarının yerleşimine katkıda bulunan, proteofosfolipid yapıda myelin yapan hücrelerdir(53).

Miyelin esas olarak santral sinir sisteminde oligodentrositlerin, periferik sinir sisteminde ise Schwann hücrelerinin plazma membranlarından oluşmaktadır. Gestasyonun 12-18. haftalarında miyelin kılıfın gelişimi başlar ve doğum sonrasında da devam etmektedir. Miyelinin içeriği diğer plazma membranlarına benzemekle birlikte, içeriği nedeniyle diğerlerinden farklıdır. % 75 lipit ve % 25 proteinden meydana gelmektedir. Miyelinin içerdiği lipitlerin % 20-30'unu oluşturan kolesterol multilameller yapının stabilizasyonunu sağlamaktadır. Glikolipit yapısında olan diğer lipitler ise galaktoserebrosid, sülfatid ve gangliosidlerdir. PSS'nin ve SSS'in miyelini arasında da farklar vardır. Periferik miyelin dokusunda santraldekine göre sfingomiyelin, kolin ve gliserofosfatid oranı daha fazla, galaktoserebrozid oranı ise daha azdır. PSS miyelininin % 20-30'unu oluşturan proteinler, çoğunlukla glikoprotein yapısındadır. Po, PMP22, MAG, epitelyal kadherin ve periaksin baskın olarak bulunan glikoproteinlerdir (54).



Şekil 3: Periferik sinir yapısal anatomisi. Miyelinli ve myelinsiz sinir liflerinin periferik sinir sisteminde yer almasının şematik görünümü (Terzis J.K. & Smith L. The Peripheral Nerve Structure, Function and Reconstruction Raven Press, 1990).

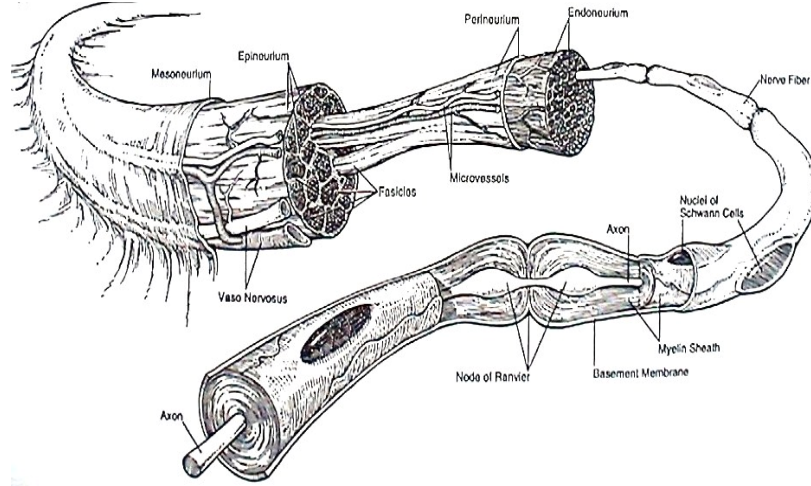
Bir sinirin miyelinli olması, aksiyon potansiyelinin iletim hızını artırır. Nöronların, büyük çaplı somatik sinir liflerinin hemen hepsi miyelinli iken, 1 µm'den küçük aksonlar genellikle miyelinsizdir. Memelilerde dorsal spinal köklerin ve kutanöz sinirlerin yaklaşık %75'i, kas liflerinin %50'si ve postganglionik otonomik liflerin tamamına yakını miyelinsizdir (55). İletim hızları ve çaplarına göre sinir lifleri üç gruba ayrılırlar. Bu lifler;

A grubu lifler, miyelinli somatik afferent ve efferent liflerden oluşur.

B grubu lifler ise miyelinli otonomik pregangliyonik lifleri içerir.

C grubu lifler, en ince çaplı ve en yavaş iletim sağlayan liflerdir. Miyelinsiz somatik ve viseral afferent lifler ile postgangliyonik lifler bu gruptadır (55).

Miyelinli liflerde, akson boyunca dizilmiş SC'leri arasında miyelin kılıfı olmayan 1 µm alanlar mevcuttur (Şekil 4). Miyelin kılıf boyunca iletilen impulslar “Ranvier düğümü” adı verilen bu alanlarda bir sıçrama (saltatorik iletim) yaparak bir sonraki miyelin kılıfa geçerler (55).

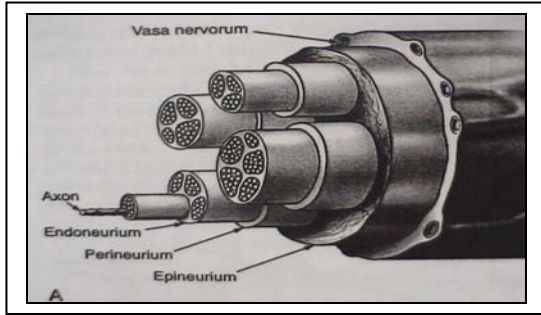


Şekil 4: Normal periferik sinir anatomisi. (Myckatyn TM., Mackinnon SE., Microsurgical repair of peripheral nerves and nerve grafts. Grabb Plastic Surgery, 6th edition, eds: Aston SJ, Beasley RW, Thorne CHM., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia (2007). P: 73.)

Saltatorik ileti şeklinin önemli sonuçları vardır, birincisi miyelin, uyarı iletimi için gereken enerjiyi düşürür ve ikincisi artmış akım hızı oluşturur . İki Ranvier düğümü arasında kalan ve aksonun tek bir Schwann hücresi ile temasta olduğu bölgeye ise “internod” adı verilir. İnternodal mesafe sinir lifinin çapıyla orantılı olarak 150 µm ile 1500 µm arasında değişir. Sinir elemanları Ranvier düğümlerine gelen akımı artırıcı yapıdadırlar. Bu bölgede bulunan mitokondri gibi enerji üreten hücre elemanlarının sayısı normal alanlara oranla 5 kat fazladır (55). Sinir lifleri bağ doku tabakası ile çevrelenmişlerdir. Bu bağ doku sinirin kesit alanının % 25-85 kadarını oluşturmaktadır. Bu oran sinire ve yer aldığı bölgeye göre değişmektedir örneğin eklem bölgelerinde bu oran artmaktadır. PSS'de sinirler üç ayrı destek bağ doku tabakası ile çevrelenmişlerdir (Şekil 5). Sinir lifleri, dıştan en içe doğru epinöryum, perinöryum ve endonöryum adı verilen bağ dokuları ile çevrelenmektedir (56, 57).

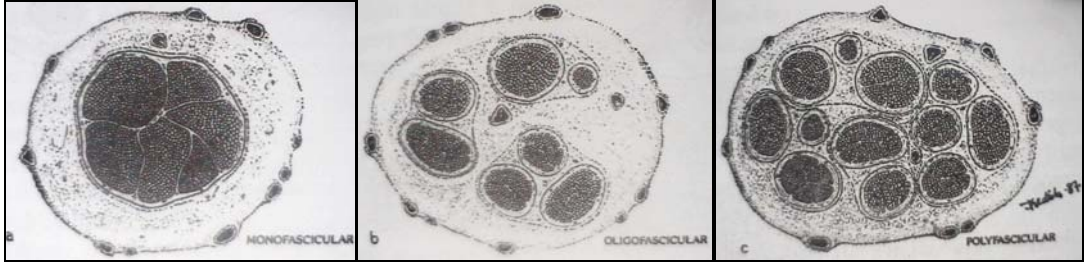
En içte mezoderm kaynaklı “endonöryum” bulunur. Endonöryum

mukopolisakkarit temel madde içerisinde yer alan kollajen ve retiküler lifler, fibroblastlar, makrofajlar, mast hücreleri ve kapiller sistemden oluşan bir bağ dokudur; buna karşın elastin içermemektedir. Birkaç sinir lifinin bir araya gelerek oluşturduğu yapıya fasikül denilmektedir. Fasikül mekanik olarak sağlam, dens bir lameller tabaka olan “perinöryum” ile sarılmıştır. Perinöryum içinde SC ile sarılı aksonlar ve onlarında etrafını saran bağ dokusu endonöryum yer alır (56, 57).



Şekil 5: Sinir kılıfları (Saleh MS. John YS KIM. Repair and grafting of the peripheral nevre. Plastic Surgery. 2th edition. ed: Stephen J. Mathes. Saunders Elsevier. Phillph.2006.Pp: 722.).

Perinöryum, yassı perinöral hücrelerin oluşturduğu çok katlı bir tabakadır ve travmalara karşı bir bariyer görevi görerek korur ve kan-sinir “bariyerinden sorumlu olan yapıdır (56, 57). En dış tabakada sinir kılıflarını saran bağ doku ise “epinöryum” adını almaktadır. Epinöryumun bağ dokusu kollajen tip I ve III, fibroblastlar ve değişen oranlarda yağ dokusundan meydana gelmiştir. Fasikülleri travmalardan koruyan epinöryum eklem bölgelerinde daha kalın ve sinirin tipi, seviyesi ve bireylere göre epinöryumun kalınlığı farklılık gösterir. Epinöryumun kalınlığı toplam sinir kesit alanının % 35-75’i arasında değişen kalınlıktadır ve distale doğru azalmaktadır. Fonksiyonel olarak iki tabakadan oluşan epinöryumun dışta yer alan tabakası “Eksternal (epifasiküler) epinöryum” paranöryum olarak da bilinen bağ dokusu yapısında bir kılıftır. “İnternal (interfasiküler) epinöryum” olarak adlandırılan bu tabaka fasiküllerin etrafını tek tek sararak fasikülleri gevşekçe bir arada tutar ve daha derin tabakasıdır (23). Periferik sinirler fasiküler yapılarına göre üç ana gruba ayrılırlar. Fasiküller gruplar halinde veya grup oluşturmaksızın bir arada bulunabilirler (Şekil 6).



Şekil 6: Periferik sinirlerin fasiküler yapılarına göre sınıflandırılması

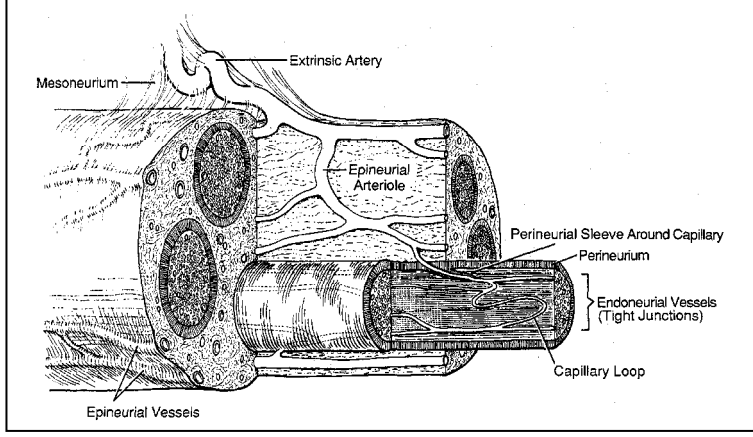
1. Monofasiküler yapı: Birçok sinir lifi içeren tek bir fasikül bulunur (**a**).
2. Oligofasiküler yapı: Birkaç büyük fasikülden oluşan sinirdir (**b**).
3. Polifasiküler yapı: Çok sayıda fasikül mevcuttur(**c**) (23). (Saleh MS., John YS. KIM, Repair and grafting of the peripheral nerve, Plastic Surgery, 2th edition, ed: Stephen J. Mathes. Saunders Elsevier, Philadelphia (2006) Pp: 722.).

PERİFERİK SİNİR MİKROVASKÜLER ANATOMİSİ

Periferik sinirler; epinöryum, perinöryum ve endonöryum tabakalarında bulunan, birbirleriyle ileri derecede bağlantıları olan ve uyarı iletimi ve aksonal transport için gerekli olan enerjiyi, bir vasküler sistem sayesinde sağlamaktadır (58).

Başlıca iki sistem periferik sinirlerin vaskülarizasyonundan sorumludur: ekstresek sistem ve intrinsek sistem (**Şekil 7**).

İntrinsek sistem, epinöryum, perinöryum ve endonöryum içerisinde yer alan vasküler pleksuslardan meydana gelmektedir. İki sistem arasındaki denge ve kompanzatuvar mekanizmalar siniri vasküler dolaşım problemlerine karşı korumaktadır. Ekstresek sistem, gevşek adventisyal dokuyla kaplı dış yüzeyi damarlardan oluşmaktadır. Bu damarlara vasa nervorum adı verilir, mezonöryum denilen gevşek bir kılıf içerisinde uzanan sinirlere yandaş olarak seyreden damarlardan gelen besleyici dalcıklardır (58). Mezonöryum, kan damarlarını ve epinöryumu çevreleyen ayrı, gevşek bir kılıf olarak tanımlanmış olmasına rağmen, ayrı yapı olmayıp bir diseksiyon kalıntısı olabileceği de ileri sürülmüştür(59). Mezonöryumda longitudinal uzanan damarlar, mezonöryumu delerek intrinsek sistem ile bağlantılar yaparlar. Epinöryumun içerisinde uzanan epinöral damarlar, her fasikül veya fasikül demetine besleyici dallar gönderirken aynı zamanda değişik seviyelerde perinöral vasküler pleksus ile de anastomozlar yapmaktadır (58).



Şekil 7: Periferik sinirlerin mikrovasküler dolaşımı. Periferik sinirde ekstrinsik ve intrinsik sistem. (Terzis J.K. & Smith K.L. The Peripheral Nerve Structure, Function and Reconstruction NY Raven Press, 1990).

Perinöral damarlar uzunlamasına seyrederken birçok alanda oblik olarak perinöryumun iç tabakasını delerek endonöral aralığa geçerler ve bu damarların uzantıları endonöral vasküler pleksusu oluştururlar. Bu kapillerlerin sıkı endotelyal bağlantıları, kan-sinir bariyerinin korunmasında önemlidirler. Endonöral vasküler yatak, fasiküller boyunca devamlı bir anastomotik ağ oluşturmaktadır ve bu sayede sabit bir fasiküler kan akımı sağlanmaktadır (60). Perinöryumun dolaşımı daha dış tabakalarında geçerli olan sempatik inervasyonla dengelenirken, endonöral alandaki dolaşım, perinöryumun aksine lokal perfüzyon basıncı ile dengede tutulmaktadır (61). Bu vasküler sistemler periferik sinirler içerisinde longitudinal olarak uzanım gösterirken aynı zamanda sinüzoidal bir yapıya da sahiptirler. Bu sinüzoidal yapı, vasküler sistemin gerilme tarzı travmalarda hasar görmesini engellemektedir. Venöz sistem içermezler ama lenfatik sistem vardır. Bilinen klasik bir lenfatik sistem bulunmasa da, perinöryumun dışında ve endonöryumun içinde lenfatiklere benzer taşıma görevi yapan kanalların varlığı bilinmekle birlikte bunların epinöral alandaki gerçek lenfatiklerle bağlantılı olmadığı düşünülmektedir (61).

PERİFERİK SİNİR YARALANMALARI

Yaralanmanın sebepleri ve çeşitliliği bilinmektedir şöyle ki, yaralanmaya neden olan mekanik etkinin keskin, künt, avulzif veya kompresif olması, bu etkinin süresi ve şiddeti, birde sinir hasarına sinir defektinin eşlik edip-etmemesi önemli faktörlerdir. Meydana gelen sinir hasarı yaralanmanın mekanizmasının yanında, hastanın yaşı ve mevcut yapısal hastalıkları gibi birçok faktöre bağlı olarak değişmektedir. Sonuçta bu etkenlerin sinirin iç yapısında oluşturduğu hasarın derecesi önemlidir. Bu nedenle travmayı tanımlayıp uygun tedavilerin seçileceği iki

tip sınıflama vardır (23).

İlk sınıflandırma 1941 yılında Cohen tarafından yapılmıştır ve daha sonra bu sınıflandırma 1947 yılında Seddon tarafından popüler hale getirilmiştir. Seddon sinir hasarını nöropraksi, aksonotmezis ve nörotmezis olarak üç gruba ayırmıştır (23).

Nöropraksi: Geçici olarak periferik sinirde fonksiyon kaybı olarak tanımlanmıştır. Lokal olarak iletimin azaldığı yada tam olarak kesildiği yaralanmanın en hafif şekildir. Wallerian dejenerasyon yoktur. Motor fonksiyon tutulumu duyu fonksiyonlarının tutulumundan daha fazladır. Nöropraksinin, direk mekanik bası, vasküler olaya ikincil iskemi, metabolik yetersizlik ve sinirde demiyelinizasyona yol açan hastalıklar ve toksinlerden kaynaklandığı deneysel ve klinik gözlemlerle belirlenmiştir. Ayrıca klinikte geçici bası, gerilme ve künt travma nöropraksiye neden olabilmektedir. Çoğunlukla cerrahi bir lezyon değildir ve sinir ortalama 6-8 hafta içerisinde tam olarak normal hale döner. Sırasıyla travmadan sonra motor, propriosepsiyon, dokunma, sıcaklık duyusu, ağrı duyusu ve sempatik fonksiyon etkilenir, iyileşme genellikle bu sıralamanın tersi şeklinde olur (62, 23).

Aksonotmezis: Periferik sinirde bir alanda sadece miyelin kılıf ve akson devamlılığında bir kesilme mevcuttur. SC'lerinin hücrelerinin bazal membranı, endonörium, perinörium ve epinörium sağlamdır. Yaralanma sonrasında lezyon distal ucunda Wallerian dejenerasyon ve proksimal ucunda aksonal tomurcuklanma görülür. Burada endonöral doku ve bazal membran, SC'leri için kılavuz tüp görevi ile yeni kolonlar oluşturacak şekilde prolifer olmalarını sağlar. Bütünlük sadece bağ doku ile korunduğu için proksimalden distale ilerler genellikle prognoz iyidir ve fonksiyonların geri dönüşü tamdır. İyileşme süresi yaşa, hedef adale, duysal son organ gibi uç organların innerve ve rejenerasyon zamanına, lezyonlar arasındaki mesafeye ve rejenerasyon hızına bağlı olarak değişmektedir. Rejenerasyon duyu lifi boyunca Tinel bulgusu ile takip edilir. Rejenerasyon 1-2 mm/gün hızla ilerlemesine rağmen, iyileşme süresi kaslarda denervasyon atrofisi gelişebilmektedir (23, 62).

Nörotmezis: Sinirin devamlılığının tamamen kesintiye uğradığı en şiddetli periferik sinir yaralanmasıdır ve cerrahi onarım yapılmazsa genellikle bir fonksiyonel gelişme beklenmez. Bu tür hasardan sonra lezyonun distalinde denervasyon ve tüm

fonksiyonlarda kayıp ortaya çıkmaktadır. Nedeni, sinirde tam kat bir kesi, iletimi tamamen engelleyen bir tümör veya skar dokusu da olabilir. Cerrahi onarım yapılmaması durumunda proksimal uçtaki aksonal rejenerasyon nöroma oluşumuna neden olacaktır (23).

1951 yılında Sunderland periferik sinir yaralanmalarını beş derecede değerlendiren yeni bir sınıflandırma önermiştir (**Şekil 8,**) (23).

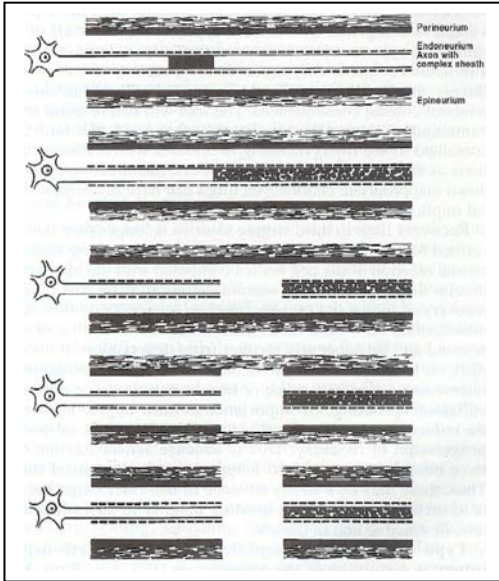
1. derece hasar: Seddon sınıflamasında karşılığı nöropraksiye eşdeğerdir. Bu tip hasarda, sinir dokusunun bütünlüğü devam etmektedir. Travma alanındaki sinir segmentinde iletim kaybı söz konusudur ve aksonlar, sinir kılıfı yapıları intaktır. Sadece elektrofizyolojik olarak tespit edilebilen bu iletim bloğu lezyon alanında sınırlıdır ve distalde iletim normaldir. Duyu ve motor kayıp gözlenir, kayıp motor fonksiyonlarda daha fazladır. Klinikte turnike kullanımı gibi lokal basınç yaratan durumlar ve kompresyon nöropatilerin erken dönemlerinde ortaya çıkan sinir hasarı bu grupta incelenmektedir. 6-8 hafta içinde aksonal iletim tam olarak düzelir.

2. derece hasar: Seddon'un sınıflamasındaki aksonotmezise eşdeğerdir. Aksonun bütünlüğü kesintiye uğramıştır ve sinir kılıfı yapıları sağlam olmakla birlikte, distal segmentte Wallerian dejenerasyon gelişir. SC kılıfı sağlam olduğundan prognozu iyidir. Ancak iyileşme 1. derece hasara oranla daha uzun süre alır.

3. derece hasar: SC bazal laminası, endonörium ve aksonda harabiyeti vardır ve epinörium ve perinörium sağlamdır. Fasiküler yapı korunmuştur. Distalde Wallerian dejenerasyon izlenir. Endonörium ve Schwann hücre kılıfının hasarlı olması nedeniyle iyileşme tam olmaz. Rejenerasyon sırasında nöroma oluşması veya motor lifler ile duyuşal liflerin karışması sık görülen bir sorundur. Genellikle işlevsiz bir nöroma ile iyileşen üçüncü derece yaralanmaların ikinci derece yaralanmalardan klinik farkı, çok uzun sürede iyileşmesi nedeniyle motor fonksiyon yetersizliği ve duyularda dezoryantasyondur. Bu tür yaralanmalar Seddon sınıflandırmasındaki aksonotmezis ve nörotmezisin karışımı olarak da kabul edilebilir. İlimli bir üçüncü derece lezyon söz konusu olduğunda intrafasiküler alanda minimal bir fibrozis ve önemli derecede rejenerasyon gözlenecektir, bu da aksonotmezise karşılık gelmektedir. Buna karşın şiddetli bir üçüncü derece hasar, rejenerasyonu engelleyen fibrozise neden olacağından nörotmezis olarak kabul edilebilir.

4. derece hasar: Epinöriyum sağlamdır diğer tüm tabakaların devamlılığı bozulmuştur. Sinir gövdesinin bütünlüğü fiziksel olarak devam etmekle birlikte skar dokusunun yarattığı blok rejenerasyonu engeller ve yaralanma seviyesinde nöroma (solid skar dokusu) oluşumuna neden olur. Spontan iyileşme görülebilmese rağmen tedavi uygulanmadığında fonksiyonel dönüş nadirdir. Bu travmada mevcut segmentin cerrahi olarak eksizyonu ve uygun olarak sinir onarımı gerekmektedir.

5. derece hasar: Seddon'un sınıflamasındaki nörotmezise eşdeğerdir ve epinöral bütünlük bozulmuştur. Çoğunlukla penetran travmalar sonrasında görülür ve sinir devamlılığı tam olarak kesintiye uğramıştır. Ayrılan sinir uçları ayrı kalabilecekleri gibi skar köprüsü ile birleşebilirler. Proksimal nöroma, distal soğan oluşur, skar rejenerasyon için en büyük engeldir. Rezeksiyon ve sinir onarımı ile tam iyileşme, akson kaybı ve yanlış yönelimli aksonlar nedeniyle yetersizdir. Tedavi cerrahidir.



Şekil 8: Sunderland sinir hasarının sınıflandırılması. 1, İletim bloğu. 2, Endonöral kılıfın korunduğu hasarın aksonda sınırlandırıldığı sekonder Walleryan dejenerasyon. 3, Perinöryum sağlam akson parçalanmıştır. 4, Epinöryum dışında bütün nöral elementler parçalanmıştır. 5, Sinir gövdesinin komplet kesiklik. (Sunderland S: Nerve İnjuries and Their Repair: A Critical Appraisal. Edinburgh, Churchill Living, 1991)

6. derece hasar: Mackinnon bu sınıflandırmaya 6. derece sinir hasarı adı altında bir ekleme yapmıştır (63). Sinir boyunca değişik seviyelerde ve farklı derecelerde sinir hasarlarının bir arada bulunması söz konusudur. Özellikle ezici tipte yaralanmalarda ortaya çıkmaktadır. Tedavisinde intranöral nöroliz ile sağlam fasiküllere zarar vermeden 4. ve 5. derecede hasarlı fasiküllerin cerrahi onarımı gerekmektedir (23).

PERİFERİK SİNİR CERRAHİSİ

Tarihçe

Periferik sinir sistemine ait ilk veriler Hippocrates'e (MÖ 460-370) kadar uzanmaktadır, fakat sinir kesilerinin duyu ve motor kayba yol açtığını ilk olarak bildiren Galen (MS 130-200) olmuştur (64). Periferik sinirlerin dikilmesi ile ilgili ilk kayıtlar ise P. Aegineta (7. yy), William'a (13. yy) aittir (23). Kesilmiş bir sinirde, sinir uçlarının karşılıklı olarak onarımı ilk kez Ferrara (1608) tarafından gerçekleştirilmiştir (1). Kayıtlara geçen ilk başarılı sinir onarımı ise 1847 yılında Paget tarafından gerçekleştirilmiştir (23). Sinir defektlerini sinir greftleri ile onarma fikri ilk kez Philippeaux ve Vulpian tarafından ortaya atılmış, ilk klinik uygulama ise 1878 yılında Albert tarafından yapılmıştır. Bu konuda ilk başarılı sonuç ancak 20. yüzyılın başlarında Mayo Robson tarafından yayınlanmıştır (1).

Yirminci yüzyılın başlarında sinir onarımlarındaki başarı oranı artmaya başlamış, birinci ve ikinci dünya savaşları nedeniyle büyük gelişmeler kaydedilmiştir. 1963 yılında operasyon mikroskoplarının kullanıma girmesi de sinir cerrahisi açısından önemli bir dönüm noktası olmuştur (65). Mikrocerrahi tekniklerin gelişmesi ile birlikte sinir cerrahisinde gözlenen önemli ilerlemelerden birisi de, 1967 yılında Bora tarafından gerçekleştirilen perinöral onarımın keşfidir (66).

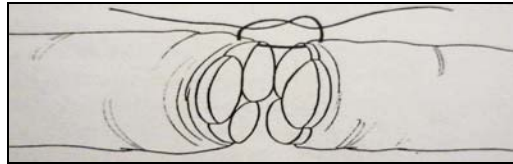
Onarım Teknikleri

Onarımın hedefi, fonksiyonel ileti ünitesi olan fasiküllerde devamlılığın sağlanması için bu yapıların cerrahi olarak doğru konumlarda karşılıklı getirilmesi, yani sinir uçlarının 'koaptasyonu'dur (67, 68). Hasarlı sinirin onarımı için en uygun zaman yaralanmadan sonraki mümkün olan en erken dönemdir. Erken dönemde fasiküler dizilimin ve epinöral damarların, proksimal ve distal uçların doğru olarak karşı karşıya getirilmesinde yol gösterici etkileri vardır. Ayrıca yaralanma sonrası erken dönemde gerginlik minimaldir. Daha geç dönemlerde ise proksimal ve distal sinir segmentlerinde retraksiyon ve sinir uçlarında skar dokusu gelişir ve onarım sırasında genellikle gerginlik söz konusudur. Denervasyon süresinin 18-24 aya kadar uzadığı durumlarda kas dokusunda geri dönüşümsüz değişiklikler geliştiği ve sinir onarımı sağlansa bile motor fonksiyonların geri dönmediği bilinmektedir (69). Buna karşın duyu organların denervasyona daha dirençli olduğu bildirilmiştir (70).

Periferik sinir cerrahisi, sinir devamlılığını restore etmek ve sinirin rejenerasyonu ve fonksiyonel düzelmeyi optimal düzeyde oluşturabilmek amacıyla yapılmalı ve planlanmalıdır. Çünkü rejenerasyonda iki anahtar faktör önemli rol oynar; *devamlılık* (rejenerasyonu tesvik etmek için bir rehber görevi görür) ve *uygun diziliş* (duyusal lifler uygun duyusal hedeflere, motor lifler uygun kaslara yönlendirilir) (71).

Sinir onarım metodları; direkt onarım (nörorafi) ve greft ile onarım tekniği olarak ikiye ayrılır. Direkt onarım ise; epinöral onarım, grup fasiküler onarım ve fasiküler onarım olarak ayrılır. Greft ile onarım, hastanın kendisinden alınan (otojen) duyusal sinir segmentleri ile yapılır (71).

a. Epinöral Onarım: En sık kullanılan onarım tekniğidir. Epinöryumu uç- uca sütüre ederek yapılan nörorafi tekniğidir. Dikiş proksimal ve distal uçlardaki epinöryumdan geçer (**Şekil 9**). Sinir uçlarının uygun pozisyonda karşı karşıya gelmesini sağlamak için longitudinal seyreden kan damarları ve fasiküller karşılıklı getirilmeye çalışılır (69). Kalın sinirlerde 8/0, ince sinirlerde 9/0 veya 10/0 dikişler tercih edilir. Dikiş materyali olarak emilen ya da emilmeyen dikişler kullanılabilir. Kullanılan dikiş ipliğinin iğnesi de yuvarlak tercih edilmelidir. Dikiş sayısı sinir uçlarını yaklaştıracak ve gerginlik yaratmayacak şekilde, mümkün olan en az sayıda olmalı ve fasiküller dikiş aralarından çıkmamalıdır (65).



Şekil 9: Epinöral onarım. (Bayramiçli M., Sinirde mikrocerrahi çalışması, Deneysel Mikrocerrahi Temel Arastırma Doku Modelleri. Argos, İstanbul, 2005).

Epinöral onarımın kısa sürmesi ve basit olması en önemli avantajlarıdır. Ayrıca cerrahi müdahale sırasında sinir içi yapılara ek zarar verilmez ve sinir içerisinde reaksiyona neden olabilecek dikiş materyali kullanılamaz. Yöntemin en önemli dezavantajı ise, eş fasiküllerin her zaman karşılıklı gelememesidir. Ufak bir gerginlik bile fasiküller arasında açıklık oluşmasına neden olabilir. Yapılan araştırmalar fasiküller arasında açıklık, üst-üste binme ve katlanma olmasının başarısızlığa yol açtığını göstermektedir (65).

b. Perinöral (Fasiküler) Onarım: Perinöral onarım ilk kez 1967 yılında Bora tarafından tanımlanmış olan bir tekniktir (66). Optimal eşleşmeyi sağlayabilmek için proksimal ve distal sinir uçlarındaki eş fasiküllerin birbirlerine dikilmesi amaçlanır (**Şekil 10**). Fasiküler onarımda her fasikülün 2-4 adet dikiş ile tutturulması genellikle yeterli olmaktadır ve fasiküllerin hatalı yönlenebilmesi için. Tekniğin en önemli ve zor yönü fasiküllerin uygun eşlerini saptamaktır ve sinirin fasiküler dağılımını bilmek gerekmektedir. Yaralanmadan sonraki ilk 72 saatte yapılan ameliyatlarda, intraoperatif elektrodiagnostik yöntemler ile fasiküler dağılımı tanımlamak mümkün olabilmektedir(60).



Şekil 10: Perinöral onarım (Bayramiçli M., Sinirde mikrocerrahi çalışması, Deneysel Mikrocerrahi Temel Arastırma Doku Modelleri. Argos, İstanbul, (2005)).

Duyusal liflerin hatalı fasiküler onarımına bağlı olarak oluşacak fonksiyon kayıpları kortikal yeniden tanımlama ile önlenmektedir. Ancak motor aksonların duyuşal aksonlara veya interfasiküler epinöryuma yönelmesi durumunda fonksiyon kaybı kaçınılmaz olmaktadır (60). Fasiküller arasında bol miktarda doku bulunan bir oligofasiküler sinirde fasikülleri ayırmak için internal nöroliz yapıldıktan sonra fasiküler onarım yapılır. Bu polifasiküler sinirde çok daha zordur çünkü bunlarda interfasiküler doku daha azdır ve fasiküllere zarar verme riski daha çoktur. Eksternal epinöryumun onarımı cerrahi sırasında tansiyonu azaltmada faydalı olabilir. İnternal epinöryuma gerekli olan en az sayıda (genellikle iki) sütün konur. Tek tek fasikül tamiri için fasiküllerin izolasyonu gereklidir. Buradaki sinir tamiri de fasiküler grup onarımındaki cerrahi prosedür ile aynı özelliktedir. Fasiküler onarım perinöryuma konan 10/0 naylon sütünler aracılığıyla gerçekleştirilir (71). Fasiküler onarımın avantajı sağlam fasiküllere dokunulmadan, sadece hasarlanan fasiküllerin onarımına imkan verebilmesidir (selektif onarım) (60). Perinöral dikiş tekniğinin en önemli dezavantajı, sinir içine konulan dikiş materyalinin yarattığı yabancı cisim reaksiyonu ve ek diseksiyonlar sonucu artan intranöral fibrozis riskidir. Ayrıca bu yöntem diğerlerine nazaran daha fazla zaman almaktadır. Yapılan çalışmalar epinöral ve

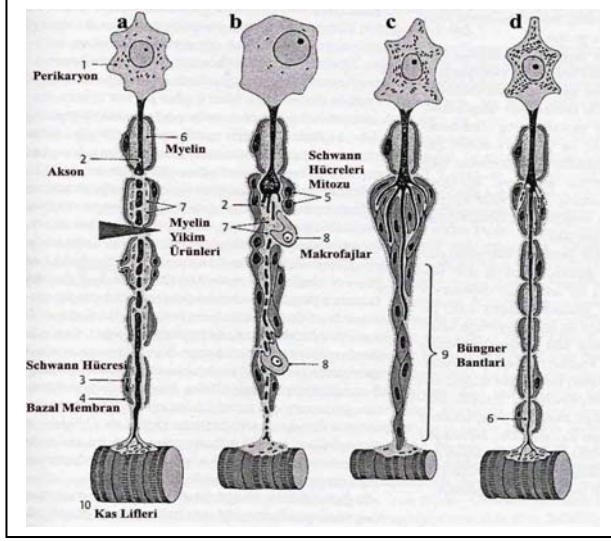
perinöral dikiş tekniklerinin birbirlerine bariz bir üstünlüğünün olmadığını göstermiştir (67, 70). “Grup fasiküler onarım” terimi ise fasiküllerin gruplar halinde karşılıklı olarak dikilmesi için kullanılan bir terimdir (71).

c. Epiperinöral Onarım: Her iki yöntemin birleşimi olan bu teknik, 1964 yılında Edshage tarafından tanımlanmıştır. Teknik olarak epinöral dikiş tekniğine benzemekle beraber, dikişler karşılıklı olarak perinöral tabakadan da geçilmektedir. Epinöral dikişlerin yeterli fasikül uyumu sağlayamadıkları, buna karşın perinöral dikişlerin ise hem aşırı intranöral diseksiyon, hem de içerdeki dikiş materyalleri nedeniyle fazla skar oluşumuna yol açtıkları düşüncesinden ortaya çıkmıştır. Buna rağmen intranöral travma riski yüksektir (72).

d. Diğer Yöntemler: Periferik sinir yaralanmalarının cerrahi onarımında kullanılan dikiş materyalleri ve cerrahi manipülasyon sırasındaki travmaya ikincil gelişen fibrozis, dikiş kullanılmadan yapılacak olan onarım yöntemleri üzerinde bir arayışa neden olmuştur. Lazer; bu yöntemlerden biridir. Bu yöntemde kesik sinir uçları yaklaştırılarak iki tespit dikişi konulduktan sonra, lazer ışınları ile uçlar birbirine tespit edilir. Anastomoz sağlandıktan sonra tespit dikişleri alınabilir. Bu yöntemin, aksonların tüp dışına çıkmasını önlediği belirtilmektedir, ancak ne ölçüde tensil kuvvet sağladığı tartışmalıdır (72). Fibrin yapıştırıcı da sinir onarımında kullanılan bir biyomateryaldir. Bu konuda yapılan deneysel çalışmalar iki adet dikiş konulduktan sonra fibrin yapıştırıcı kullanılmasının daha uygun olduğunu göstermektedir (73). Ancak onarım bölgesinde inflamatuvar reaksiyonu arttırması ve yeterli tensil kuvvet sağlayamaması gibi dezavantajları bulunmaktadır. Menovsky tarafından rat siyatik siniri üzerinde yapılan bir çalışmada lazer, fibrin yapıştırıcı ve epinöral dikiş teknikleri karşılaştırılmış ve fonksiyonel iyileşme açısından tekniklerin birbirlerinden üstün olmadıkları gösterilmiştir (74).

Sinir Dejenerasyonu ve Rejenerasyonu

Periferik sinir yaralanmalarında, hücre gövdesinde de değişiklikler meydana gelir, beklendiği gibi yaralanmanın proksimalinde ve distalinde birtakım yapısal ve işlevsel değişiklikler ortaya çıkar (**Şekil 11**) (60).



Şekil 11: Sinir dejenerasyon ve rejenerasyonu **a.**Akson ve miyelin yıkımı **b.** SC hücre proliferasyonu **c.** Aksonal tomurcuklanma ve Büngner bantlarının oluşumu **d.**Matürasyon (Mumenthaler M, Stöhr M, Mülner-Vahl H: Periferik Sinir Sisteminin Düzenlenme İlkeleri ve Gelişimi 8. Baskı Börü ÜT. Nobel İst 2005, 15).

Travmada, aksonal yaralanmayı takiben sinir hücresinde meydana gelen değişiklikler “kromatoliz” olarak tanımlanmaktadır. Takip eden süreçte hücre gövdesinde oluşan tipik yanıt, hücre hacminin artması, hücre çekirdeğinin periferik doğru yer değiştirmesi ve sitoplazmadaki bazofilik materyalin ortadan kalkmasıdır. Protein sentezinin hücre içerisinde arttığını gösteren bu bulgu, RNA konsantrasyonunun artmasına bağlıdır. Hücrede nükleik asitlerin ve lipidlerin sentezi için gerekli olan glikoz-6-fosfat dehidrojenaz enzim aktivitesinde de artış gözlenir ve protein sentezindeki artış, *iyileşme* ve *rejenerasyona* hazırlık yönünde olmaktadır. Yine nörofilaman ve mikrotübüler yapıdaki proteinlerin, aktin, tübülün ve periferin’in sentezi artarken; transport fonksiyonu için gerekli proteinlerin sentezi azalmaktadır. Travmaya bağlı meydana gelen reaksiyonun şiddeti, lezyonun yerleşim yerine ve tipine göre farklılık göstermektedir. Eğer yaralanma hücre gövdesine çok yakın ise, lezyon hücre ölümüne neden olabilir (60). Travma seviyesinin proksimaline bakıldığında, bu bölgedeki aksonlarda bir kaç internodal segment boyunca ilerleyebilen bir dejenerasyon olduğu görülür. Meydana gelen bu olaya “retrograd dejenerasyon” adı verilir ve bu segmentte endonörium boş bir tüp haline gelir. Takip eden bir kaç gün içerisinde, bu segmentte distale doğru ilerleyen terminal ve kollateral aksonal tomurcuklanmalar meydana gelir. Aksonal kollateral tomurcuklar aksonun sağlam olduğu bölgedeki Ranvier düğümlerinden köken alırken, terminal tomurcuklar ise zedelene aksonun proksimal ucundan rejenerasyon konisi şeklinde gelişmektedir. Oluşan rejenerasyon üniteleri, çok sayıda miyelinsiz akson demetlerinden oluşmaktadır. Proksimal güdükteki kesik akson uçları, mini

fasiküller halinde gruplar oluştururlar ve buna “kompartman fenomeni” denir (60). Rejenere olan aksonal tomurcukların uç kısımlarına ise “büyüme konisi” adı verilir. Büyüme konisinin büyüme ve gelişme için gerekli çok sayıda veziküller içerdiği bilinmektedir. Büyüme konisi, sivri uç şeklinde (filopodia) veya membranlan geçecek şekilde (lamellopodia) hareket edebilir (75).

SC kolonları ve SC bazal laminası, büyüme ve hareketin etkin bir şekilde gerçekleşmesi için uygun bir ortam sağlarlar. “Wallerian dejenerasyon” ise, distal sinir segmentindeki aksonlarda ve miyelin kılıfta meydana gelen hücresel olaylardır. August Waller isimli araştırmacı tarafından 1950'de tanımlanan dejenerasyon, hücre gövdesi ile distal sinir segmenti arasındaki bağlantının kaybolmasına bağlı olarak gelişen sürecin yapısal ve fonksiyonel bütünlük kaybı ile karakterizedir. Makrofajlar ve SC'leri bu alandaki akson ve miyelin kılıfı fagosite ederler. Nörofilamentöz yapılar ve mikrotübüller gibi hücre iskeletini oluşturan yapılar granüler ve amorf yapılar haline dönüşürler (76).

Aksonlar içerisinde artan Ca^{2+} konsantrasyonunun, dejenerasyon sürecini başlatan mekanizma olduğu düşünülmektedir. Normalde akson ile endonöral ortam arasındaki kalsiyum konsantrasyonu farkı, aktif kalsiyum pompası sayesinde dengede tutulmaktadır ve hücre içindeki düşük kalsiyum seviyesi korunmaktadır. Buna rağmen aksonal hasar oluştuğunda artan hücre içi kalsiyum, proteazların aktivasyonuna yol açarak akson içerisinde proteolizi başlatmaktadır. Dejenerasyon sürecinde aksonun internodal bölgesinde segmental miyelin kaybı ortaya çıkmaktadır. Parçalanmış miyelin ki SC'leri tarafından yapılır, daha sonra makrofajlar tarafından fagosite edilerek ortamdan uzaklaştırılmaktadır. Aksonotomi sonrası SC'si nükleusu daha yuvarlak ve belirgin bir görünüm kazanırken, sitoplazma nispeten daha saydam bir hal almaktadır. Travmadan sonra ilk 24 saatte SC'si proliferasyonu başlar ve proliferasyon alan SC'leri “Büngner bantları” adı verilen longitudinal dizilimler gösterirler. Bu hücreler aksonal tomurcukları içine alarak, gelişen rejenere aksonların çevresinde bir miyelin kılıf meydana getirirler (76). Aksonlar için fiziksel bir konduit oluşturmaları yanında, aksonal gelişmeyi destekleyen ekstrasellüler proteinleri salgılamak görevini de üstlenmişlerdir. Yaralanma sonrası proksimal ve distal sinir güdükleri arasında gerçekleşen kimyasal ve hücresel reaksiyonlar, sinir rejenerasyonunun kalitesi açısından çok önemlidir. Bu alanda kan hücreleri ve

makrofajları içeren eksuda, aralığı doldurarak fibrin pıhtı oluşumunu sağlamaktadır. Takip eden günlerde de kapillerlerin ve epinöral kökenli fibroblastların bu aralığa göçü gözlenir ve burada rol alan fibroblastların prolifer olmaları oldukça uzun zaman alır, kollajen depolanması prolifer fibroblast ve SC'leri tarafından gerçekleştirilmektedir. Cajal 1905 yılında, distal sinir segmentindeki bazı maddelerin rejenerere olan sinir liflerini kendilerine yönlendirdiğini gözlemlemiştir. Bu olay "Nörotropizm" olarak adlandırılır sorumlu olan faktörler, prolifer olan SC'leri tarafından sentezlenen ve hücre sel adezyon molekülleri (CAM) olarak adlandırılan bir takım molekülleridir. Moleküllerden bilinen en belli başlıcaları L1, N-CAM (nöral hücre adezyon molekülü), N-caderin ve Po proteindir. Bu moleküllerden N-caderin dışında kalanlar, rejenerere aksonlar ile SC kolonları arasındaki temasın sağlanmasından sorumludur. N-caderin SC'leri üzerinde düzenleyici etki gösterir ve aksonlar ile SC'leri arasında temas kurulmasını sağlar. Ayrıca, N-caderin'in sinir hücre kültürleri üzerindeki etkisini inceleyen deneysel çalışmalar, bu maddenin rejenerere olan aksonlarda büyümeyi hızlandırıcı etkisi olduğunu da ortaya koymuştur (77). SC'leri tarafından üretilen bazal membran ise, tip IV kollajen matriks içerisinde laminin gibi çok güçlü bir adezyon molekülü içermektedir. Bu hücre sel adezyon moleküllerinin tümünün sentezi, özellikle dejenerasyon sırasında oluşan demiyelinizasyon evresinde artmaktadır (78).

Rejenerasyon Üzerine Etkili Büyüme Faktörleri

Rejenerasyon evresinde, yaralanmayı takiben aksonların canlılıklarını sürdürmesinde ve aksonal büyümede etkili olan endojen kaynaklı çok sayıda faktör tanımlanmıştır. Akson ile SC'si arasındaki ilişkinin bozulması bu faktörlerin sentez ve salınmasına neden olmaktadır. Sinir büyüme faktörü (NGF), beyin kaynaklı büyüme faktörü(BDNF), nörotropin-3 ve nörotropin 4/5 gibi nörotropinler ile silier nörotrofik faktör(CNTF), lökemi inhibitör faktör(LIF) ve interlökin-6(İL-6) gibi nöropoetik sitokinlerle birlikte 'nörotrofik faktörler' olarak anılmaktadırlar (53,45,79)

Geçmişte bunlar içerisinde üzerinde en çok çalışılan madde *NGF* olmuştur. *NGF ilk* tanımlanmış olan nörotrofik faktördür ve sinir sistemi üzerinde değişken etkileri vardır. *NGF* yaralanma sonrasında SC, makrofajlar ve fibroblastlar tarafından sentezlenerek ortama salınır. *NGF*'nin sinir rejenerasyonundaki rolü, SC'lerine etki

ederek göç etmelerini ve aksonal çıkıntılara yapışmalarını sağlamaktır (80,45,81,79). NGF'nin duyuşal arka kök ganglionlarının yaşayabilirliğı üzerindeki etkisi kanıtlanmış, NGF'nin fibronektin ile birlikte kullanılması durumunda motor nöronlar üzerinde etkili olduğı bildirilmiştir (82, 83). Diğer nörotrofik faktör olan beyin kaynaklı büyüme faktörü (*BDNF*), NGF ile moleküler yapı benzerdir, *BDNF*'nin siyatik sinir onarım alanına kollajen tüp içerisinde uygulanmasının fonksiyonel iyileştirmeyi hızlandırdığı gösterilmiştir (84). Yapısal olarak *BDNF*'ye benzeyen *nörotropin-3* ve *nörotropin-4/5* de ve sinir hücreleri üzerinde apoptozu önleyici etkileri olan nötrofik faktörlerdir. Nörotropin-3' ün spinal kord yaralanmalarında rejenerasyonu artırdığı, nörotropin-4/5'in in vitro ortamda iskelet kası nörotizasyonu üzerinde olumlu etkileri olduğı saptanmıştır (85, 86). *CNTF* sağlam SC'de yüksek düzeylerde bulunan, yapısal özellikler ve reseptörü bakımından NGF'den farklı olan bir nörotrofik proteindir. Yaralanma sonrasında ortamda artan nöron kaynaklı bir miyojenik faktör *CNTF*'nin aksonal büyüme hızlandırdığı ve motor nöron ölümünü engellediğı, çalışmalar da gösterilmiştir. Tedavi amacıyla *CNTF* kaslarda denervasyona bağı gelişen atrofiyi azaltmakta ve kas gücünün yeniden kazanılmasına yardımcı olmaktadır (45). Fibroblast büyüme faktörü (*FGF*), SSS ve PSS'de astrositler, nöronlar ve mikrogilyal hücreler tarafından sentezlenen potent mitojenik etkili bir proteindir. Asidik (aFGF veya *FGF-I*) ve bazik (bFGF veya *FGF-II*) olmak üzere başlıca iki tipi vardır (87, 88). Laird ve ark., rat siyatik sinirinde oluşturdukları ezilme tarzı yaralanma için onarım alanına uygulanan tek doz *FGF-I* ile sistemik olarak düzenli uygulanan *FGF-I*'in etkilerini karşılaştırmışlar ve her iki durumda da motor ve duyuşal sinir liflerinde gözlenen rejenerasyonun kontrol gruplarına oranla belirgin olarak fazla olduğunu saptamışlardır (87). Davis ve ark. *FGF-I*'nin bu etkisini gösterebilmesi için ortama forskolin eklenmesi gerektiğini belirtmişlerdir (89). Danielsen ve arkadaşları ise *FGF-II*'nin sinir rejenerasyonu üzerindeki etkilerini araştırmışlar ve bu faktörün SC'leri için mitojen etki göstererek sinir rejenerasyonunu artırdığını belirtmişlerdir (90). Hansson'da PDGF ile birlikte uyguladığı *FGF-I* ve *II*'nin rejenerasyonu benzer şekilde artırdığını saptamıştır(58).

İnsülin benzeri büyüme faktörlerinin de (*IGF I* ve *II*) lokal uygulamaları sonrasında duyuşal ve motor liflerde rejenerasyonu artırdıkları elektrofizyolojik testler ile gösterilmiştir (91). Kanje ve ark. rat siyatik sinir modelinde, ozmotik

pompa ile uyguladıkları IGF-I'in rejenerasyon için hücre içine alındığını, retrograd transport ile hücre gövdesine taşındığını ve burada rejenerasyon için gerekli proteinlerin sentezini artırdığını belirtmişlerdir (92, 93). Tiangco ve ark. da uç yan sinir anastomozunda değişen oranlarda IGF-I kullanmış ve rejenerasyonun kontrol grubuna göre artış gösterdiğini ancak konsantrasyonun belli bir yerden sonra artırılmasının rejenerasyonu daha fazla arttırmadığını saptamışlardır (94). Ishii ve ark. ise, IGF-II'nin duyu ve motor sinirlerin her ikisi üzerinde de olumlu etki gösterdiğini saptamışlardır (95). Hansson, IGF-I ve IGF-II'yi, PDGF ile birlikte uygulamış ve IGF-I ve PDGF bileşiminin IGF-II ve PDGF birleşimine oranla daha etkili olduğunu da belirtmiştir (58). Oudega ve ark. ise rat spinal korduna uyguladıkları IGF-I ve PDGF bileşiminin aksonal rejenerasyonu azalttığını, fakat miyelinizasyonu artırdığını tespit etmişlerdir (96). *TGF- α* ve *TNF- β* ise SC'leri ve makrofajların her ikisinden de salınan faktörlerdir. Bu faktörler Wallerian dejenerasyonunu hızlandırırken, aynı zamanda differansiye olmamış miyelinsiz SC'lerinin çoğalmasında da sağlayarak rejenerasyonun gelişmesine katkıda bulunurlar (46, 97). Sinir iyileşmesinde SC'leri üzerinde etkili bir faktör olan *TGF- β* 'nin tedavi amacıyla kullanılması Sulaiman ve ark. tarafından denenmiştir. Araştırmacılar in-vitro ortamda *TGF- β* ile inkübe edilen SC'lerinin sinir onarım alanına uygulanmasının rejenerasyon akson sayısını kontrol grubuna oranla 2 kat artırdığını bildirmişlerdir (98). Lin ve ark. *VEGF*'in pelvik ganglionlardan elde edilen sinir hücre kültürleri üzerinde nörotropik etkisinin olduğunu ve rejenerasyonu olumlu yönde etkilediğini bulmuşlardır (99). Sondell ve ark. da servikal ganglionlardan elde ettikleri hücre kültürleri üzerinde benzer bir çalışma yapmışlar ve *VEGF*'in aksonal büyümeyi indükleyen etkisi yanında, nöronlar ve SC'leri üzerinde mitojenik etkisinin de olduğunu belirtmişlerdir (100). Trombosit kaynaklı büyüme faktörünün (PDGF) rolü tam olarak bilinmemekle birlikte, tam ayrılma veya ezilme tarzı yaralanmalardan sonra proksimal sinir segmentinde miktarının arttığı ve SC'leri üzerinde mitojenik etkisi olduğu gösterilmiştir (101, 45). Welis ve ark. periferik sinir defekti modelinde PDGF ve IGF-I kombine tedavisinin aksonal rejenerasyonu önemli derecede artırdığını belirtmişlerdir (102). Oya ve ark. PDGF'nin rejenerasyon üzerindeki olumlu etkilerini, aksonlar ve SC'leri arasındaki ilişkiyi sağlamasına bağlamışlardır (101). Sinir iyileşmesi sırasında ortamda artan EGF miktarı, bu faktörün de sinir rejenerasyonunda rolü olduğuna işaret etmektedir (78). Fakat tedavi

amacıyla EGF etkilerini araştıran Dubuisson ve ark. yaptıkları sinir defekti modelinde EGF'nin rejenerasyon üzerinde herhangi etkisinin olmadığını bildirmişlerdir(103).

Hücre dışı matriks proteinleri rejenerasyonda hücreler arasındaki ilişkinin sağlanması için gerekli olan glikoproteinlerdir. Fibronektin ve laminin gibi matriks proteinleri SC'lerinin bazal membran yapısında bulunan ve nörit oluşumunda önemli görevleri olan glikoproteinlerdir(30,31). Sinir iyileşmesi üzerine etkili büyüme faktörleriyle ilgili çalışmalar da bunların rekombinan formları kullanılmıştır, ama insan amnion sıvısının anastomoz sonrası sinir onarım hattına lokal olarak uygulanmasının sinir rejenerasyonunu artırdığı saptayan Özgenel ve arkadaşları, bu etkiyi insan amnion sıvısı içerisinde ki NGW, IGF ve FGF ile fibronektin ve laminin gibi ekstraselüler makromoleküllere bağlamışlardır. Tek doz uygulanan hyalüronik asit solüsyonunun da benzer etkileri gösterdiğini belirtmişlerdir (31).

ERİTROPOETİN

Yapısı ve fizyokimyasal özellikleri

Eritropoetin (Epo), esas olarak böbreklerden salgılanan glikoprotein yapısında bir hormondur (104). Molekül ağırlığı, metoduna göre 30.400-34.000 dalton arasında olup, %30 ile %49 oranında karbonhidrat ihtiva etmektedir (105, 106). Epo'nun helikal yapısının, globüler protein olduğu kabul edilmektedir (107). Plazmadaki Epo'nin molekül ağırlığı 30400 dalton'dur (108). Epo'nun etkisi, ünitelerle ifade edilir. Bir ünite, aç bırakılarak 5 µmol kobalt² verilen ratlarda üretilen Epo miktarı (serum Epo'ni artışı) olarak tanımlanmıştır (109). Pürifiye r-hEpo'su α ve β formunda, benzer biyolojik aktivitesi, moleküler kitleleri ve aminoasit bileşimleri olan hidroksi-apatit kolonlarından oluşmaktadır. Eritropoetin α formu, klinikte Epo-jen olarak kullanılmaktadır ve β formuna göre daha yüksek oranda karbonhidrat kompozisyonu içerir (108).

Yapım yeri ve etki mekanizması

Epo; renal peritübüler interstisyel hücreler, hepatositler ve kupffer hücreleri tarafından sentezlenmektedir (110, 111, 112). Anemik fare ve ratlarda; anemi oluşuktan 1-1,5 saat sonra böbreklerinde ve karaciğerlerinde Epo-mRNA'sı tespit edilmiştir (113, 114). Yapılan çalışmalarda, anemi oluşturdukları ratlarda karaciğerde

eser miktarda Epo-mRNA belirlenmesine karşın dalak, beyin, kas ve akciğerlerde tespit edememişlerdir (115, 116). Anemide proksimal arterlerin daralması ve uç bölgelerde mevcut oksijenin kullanılamamasına bağlı olarak gelişen hipoksi sonucunda, fokal hipoksi alanları ortaya çıkmaktadır (117). Epo, hipoksiye cevap olarak sentezlenir ve plazmada biyolojik olarak aktif formda bulunmaktadır. Spivak dolaşımdaki Epo seviyesi ile üretimi arasında negatif bir etkinin olmadığını bildirmiştir. Hipoksik uyarı, tüm Epo üreten hücrelerde homojen değildir (118). Epo üreten özel hücreler, renal parankimin interstisyumunda, tübüler bazal membranın dışında, çoğunlukla korteksin iç ve medulların dış kısmında bulunmaktadır (119). Anemide bu hücrelerin sayıları ve Epo-mRNA düzeyi artmaktadır. Epo üretimindeki aşırı artış, Epo mRNA'yı üreten hücrelerin sayılarının artışıyla ilişkilidir (117, 120). Ayrıca yaş, cinsiyet, menstrüel siklus ve sigara dolaşımdaki Epo seviyesini etkilememektedir (121, 122). Dalakta da Epo aktivitesi bildirilmiştir, ancak makrofaj kaynaklı olduğu sanılmaktadır(123, 124).

Son günlerde yapılan hem in vivo, hem de in vitro çalışmalarda SSS ve PSS'de Epo aktivitesi gösterilmiştir; Schwann hücreleri aksonların kesisinden çok uzaktaysa ve ya kesilmemiş aksonlarla ilişkili Schwann hücrelerinde Epo üretiminin up regülasyonu olmamaktadır (36-38). Keswani ve ark. yaptıkları çalışmada, duyu aksonları ve PSS'in majör gilyal hücreleri Schwann hücreleri arasında etkileşimi sorgulayarak; Schwann hücre kaynaklı-Epo salgılayan endojen “aksonkoruyucu” yeni bir ara yol gösterdiler. Önceleri yapılan Campana ve Myers (2003) çalışmasında Epo verilmesinin DRG (Dorsal kök gangliyonu) duyu nöronlarının apoptozisini önlediğini kanıtladı. Bununla birlikte aksonal dejenerasyonu önleyici Epo etkisi henüz keşfedilmemişti. Çeşitli nedenlerle oluşan aksonal hasar yakınındaki SC hücrelerinden Epo üretimini uyarmakta, nöronlardaki EpoR bağlayan yolla axonal bozulmayı önlemekte olduğunu gösterdiler. Schwann hücrelerine yakın Epo üretimini stimüle eden nöronal/aksonal hasar faktörlerini ayırıştırıp β -neuregulin-1 ve insülin büyüme faktörü-1 (IGF-1) bulmayı Keswani ve ark. yaptıkları çalışmada başardı, daha önce Campana ve Myers Epo'nun nöron koruyucu etkisinin insulin-like growth factor I (IGF-I)'in etkisi ile sinerjik olduğunu gösterdi (38, 41). Sonuçta izleyen gözlemlerle kaynağın sinyal moleküllerle alakalı nitrik oksid olabileceğini keşfettiler. Yaptıkları kültürlerde aksonal dejenerasyon nedeni bütün ajanları

gösterdiler, bunlar gp120, ddC ve akrilamid'dir, ve bunlar nöronal hücre içi NO üretimini artırır. Keswani ve ark. ayrıca SNAP ve NOR-3 gibi tanınmış NO donörleriyle; saf Schwann hücre kültürlerinde Epo mRNA seviyelerinde uygulamadan sonra artışın erken dönemde 30 dk da başladığını ve 1 saatte üç dört kat arttığını gördüler. Spesifik olmayan bir NOS inhibitörü L-NAME'in beraber verilmesi, DRG kültüründe Epo salınımını uyaran gp120'nin bu amacını neredeyse tamamen yok eder. Bundan başka Haga ve ark. çalışmasında spesifik bir NOS inhibitörü TRIM, gilyal hücreler etrafında Epo üretimini başlatmaktan sorumlu nNOS tarafından üretilen NO uyardığı, bu kültürlerde gp120 tarafından yapılacak Epo mRNA'nın 18 kat artışını tamamen önledi (125, 38).

Schwann hücre kaynaklı Epo ilişkisi ne? anti-Epo siRNA ile transfekte SC'leri Epo genini susturduğunda, ddC ve gp120 tarafından DRG aksonların dejenerasyonu ile çok uzağı dahi zedeleyebildiği bilinir. ddC ve gp120 yaptığı aksonal dejenerasyonda artma, Epo veya EpoR'nin antagonist antikollarının beraber verilmesi benzer etki gösterdi, bu da endojen Epo'nun aksonkoruyucu etkisi hakkında daha ileri fikir verdi. NO'in hem nörotoksik ve hemde nöronkoruyucu çift etkisi literatürde biliniyordu. Bu tartışmadaki ile uyuşan; Keilhoff ve kolejindeki bir çalışmada, nNOS ile sersemletilen fare, yabani fareler ile karşılaştırıldığında siyatik sinire işlemi takiben aksonal dejenerasyon kötüleştiği görüldü (38, 126).

EpoR iskelet kasında bulunmuş ve sinir rejenerasyonundan bağımsız olarak nöromusküler bileşke ve kasa direk etkileri gösterilmiştir. Son günlerde yapılan bir çalışmada sistemik Epo tedavisi ile in vivo iskelet kas proteinlerinin salındığı gösterilmiştir (127, 128). Uzun süren kas denervasyonu sonrası reinervasyonda kasın fonksiyonel sonuçları negatif etkilenmektedir. Nörorafi sonrası rhEpo kullanarak erken dönemde kas fonksiyonel gelişmenin iyi yönde olduğunu gösterdiler ve önceki yayınlarla sonuçlarının benzerlik paraleldi (129, 147). Karaciğer ve böbreklerde Epo'nun yıkımı esas olarak yapılmaktadır. Nefrektomi yapılan ya da üreterleri bağlanan köpeklerde Epo'nun yarı ömrünün uzaması, böbreğin Epo metabolizmasında görev aldığını düşündürmektedir (130, 118, 131). Epo, primer olarak eritroid seri ön hücrelerin çoğalması (proliferasyon) ve olgunlaşmasını (maturasyon) uyararak için kemik iliği üzerine etki eder. En az iki büyüme faktörü (IL-3, GM-CSF) tarafından uyarılan çok yönlü (pluripotent) hematopoietik kök

hücreler, Epo'ya cevap veren spesifik eritroid seri ön hücelere dönüşürler (125).

Eritropoetin reseptörleri

Epo, son zamanlarda tanımlanan büyüme faktörü reseptörleri ailesinin bir üyesi olan spesifik Epo reseptörüne (EpoR) bağlanır. Spesifik EpoR'leri, sadece insanlarda, sıçan eritroid hücrelerinde, eritrolökemik hücrelerde, fetal karaciğer dokusunda, fare ve rat plasentasında ve megakaryositlerde tespit edilmiştir (132). Epo'yu bağlayan düşük ve yüksek affiniteli iki tip EpoR'ü tespit edilmiştir (133). EpoR'leri, insan küme şekillendiren eritroid hücresinde (BFU-E) otoradyografik olarak tespit edilebilir ve eritroid seri hücrelerin BFU-E'ler, koloni şekillendiren eritroid ünitesine (CFU-E) doğru olgunlaşma sürecinde bu reseptörlerin sayısında da artış gözlenir. Ortokromatik eritroblast evresinde reseptörler ortadan kalkar (134, 125). Bir nükleer DNA bağlayıcı protein olan GATA-1'in EpoR regülasyon ve fonksiyonunda önemli rolü bulunmaktadır. Membran reseptörüne bağlanmasını takiben Epo, endositoz yoluyla hızlı bir şekilde hücre içine alınır ve parçalanır. Bunun ardından hücre içi Ca konsantrasyonu, cAMP, cGMP, tirozin spesifik protein kinaz, fosfotidilinositol ve protein-kinaz C düzeylerinde artış görülmesi, Epo'nun bu yolla etkili olduğunu düşündürmektedir (111, 125).

Önceleri Epo'nun hematopoetik sistem hücrelerindeki reseptörlere spesifik olarak bağlandığı düşünülürken (135), epitelyal hücrelerde (136, 137), nöral orijinli hücrelerde de Epo reseptörleri bulunduğu bildirilmiştir (138, 38) ve ratlarda hipokampusta ve primer hipokampal nöron kültürlerinde EpoR'lerinin varlığı da gösterilmiştir (139, 140). Campana ve Myers Epo'nun ratların dorsal kök normal ganglionlarının gövde ve aksonlarında üretildiğini ve periferik sinir hasarı sonrasında (chronic constriction injury=CCI) SC'de Epo seviyelerinin arttığını gördüler. Epo'nun nöron koruyucu etkisinin insulin-like growth factor I(IGF-I)'in etkisi ile sinerjik olduğu görüldü. Bu sinerjik etki ise phosphatidylinositol 3 kinase (PI3-K) üzerinden olmaktadır ve kombine etki görülür. Epo ve IGF-I'in kombine etkisi için gerekli dozun, her bir sitokin için gerekenden daha düşük olduğu gösterildi (41, 38).

Siyatik sinir nöronal mRNA içermez (Pss nöronal hücre gövdesinde yoktur), muhtemelen SC'de Epo mRNA yapımında artma nöronlardan nadir olacaktır. Bu durum Campana ve ark. (2001) çalışması ile koreledir; in vivo aksotomiden sonra

Pss SC'de Epo immunboyanmasında artma gördüler. İlginçtir ki çalışmada; kesi alanından DRG de EpoR mRNA seviyelerindeki artma, nöronal EpoR arttığı fikrini verdi. Bu korelasyonu, in vitro kültürlerde aksotomiden sonra nöronal EpoR immunboyanma şiddetinde artma şeklinde görmüşler (125, 139). Van der meer ve ark. ile Depping ve ark. yaptıkları çalışmada insan kalp dokusunda EpoR ekspresyonunu bildirmişlerdir, erişkin insan kalbinde hem ventriküler myositlerde hem de endotelial hücrelerde EpoR pozitifdir (141).

Epo farmakokinetiği ve metabolizması

Depo edilmeyen bir hormon olan Epo metabolizmasında karaciğer primer organdır. Sirkülasyondaki Epo'nun konsantrasyonu, üretim oranını etkilemezken, plazma klirensi çok yavaştır (insanlarda 4-12 saat) ve plazma Epo seviyesinden bağımsızdır (142). Hayvanlarda Epo klirensi, hızlı ve yavaş olmak üzere iki fazlı bir şekilde olmaktadır (133). Epo 0.5 ml/dk oranında böbreklerden yavaş bir şekilde atılmaktadır (143). İnsanda plazma Epo klirensi yaklaşık 10 ml/dk'dan azdır (108). Epo yarılanma ömrünün yaklaşık ratlarda 1,5-3,5 saat, tavşanlarda 8-10 saat, koyunlarda 11 saat ve köpeklerde 9 saat olduğu saptanmıştır (144, 145). Normal insanlarda pürifiye rhEpo ve endojen Epo'nun yarılanma ömrü 4-12 saattir(135, 136).

İnsanlarda r-hEpo (rekombinant Epo), iv. bolus verildiğinde doza bağlı seviyeler 1,5 saat oluşur, iv. yarı ömrü 5 saattir. Subkutan (Sc) uygulamalardan sonra ise serum pik seviyesine 12-24 saat sonra ulaşır ve yarı ömrü yaklaşık 20 saattir, bu seviye 48 saat kadar kalır, serumda daha kalıcı Epo düzeylerinin olması, tedavide daha etkili olmaktadır (128, 146). r-hEpo'nun Dp- α formu uzun etkidir ve plazma yarı ömrü 24 saattir, klinik uygulamalarda dozu (diğer formların %40'ı) azaltılarak verilir ve uygulamadaki etkinlik 1 gün sonra oluşmaktadır(135, 141). Ep- β formu daha uzun etkidir ve plazma yarı ömrü 16 saattir, Ep- α 'nın plazma yarı ömrü 12 saattir (135, 147). Ortalama Sc verilen dozun sadece %25'i absorbe olur. Sc uygulama, iv. ve ip. uygulamadan daha etkindir (137, 138). Ancak farelere haftada 3 kez ip. olarak Epo enjekte edildiğinde hematokrit cevabının fazla olduğu tespit edilmiştir (148). Epo'nun ip. olarak ratlarda efektif kullanılabileceğine dair yayınlar vardır (149). Egrie ve ark. (1988) yaptıkları çalışmayla, subkütenöz yolla rhEpo'nun yarı ömrü 24h'den uzun iken iv. yolla rhEpo'nun yarı ömrü 4h'dir. Campana ve

Myers (2003), Sekiguchi ve ark. (2003), yaptıkları çalışmalarda 2680 ü/ kg bw orta dozun en etkili olduğu, düşük doz 1000 ü/ kg bw etkisiz, yüksek doz 5000 ü/ kg bw etkili ama orta dozdan daha etkili olmadığını bulmuşlardır (37). Yine yapılan başka bir çalışmada spinal kord hasarında tek doz ip. yolla verilen Epo 1000 ü/ kg bw ve 5000 ü/ kg bw dozlarında her iki grupta nörolojik gelişmelerde anlamlı artış gösterildi. Ardışık 3. ve 7. günlerde 500 ü/ kg bw verilmesi sonucu iyileşme görülmedi (150). Ratlarda kavernoöz sinus kesisi oluşturulan modellerde yapılan çalışmada rhEpo tek doz ip. 5000 ü/ kg bw verilip 14 gün sonra erektil fonksiyonun ve distal segmentin morfololojik görünümünün iyileştiği gösterildi (151).

Epo ve SSS, PSS

Epo, doku oksijenizasyonunun temel belirleyicisidir (127). Eritrosit formasyonunun stimülasyonu Epo'nun fizyolojik fonksiyonudur, bununla birlikte son zamanlarda Epo'nun nörotropik fonksiyonunun bulunduğu da sözü edilmektedir (131, 132). Epo'nun glia ve nöronlarda, makrofaj koloni stimülatör faktör (M-CSF) ve granülosit stimülatör faktör (G-CSF) gibi hematopoetik sitokinler ve çeşitli interlökinler ürettikleri bildirilmiştir. Bu hücrelerde beyin gelişimi süresince ve beynin homeostazisinin sağlanmasında parakrin ve otokrin etkileşim yeteneğinin her ikisinin de bulunduğunu düşündüren bu peptidlere ait reseptörlerin üretiminin varlığı bildirilmektedir (127). SSS'de Epo'nun, hem astrosit hem de nöron kaynaklı olması, otokrin ve parakrin yollar aracılığı ile fonksiyon gösterdiğini düşündürmektedir (128). Tsai ve ark. endojen Epo ve EpoR'nin memeli sinir sisteminin *gelişme ve tamirinde* rol oynadığını değerlendirdi ve belirledi (152).

Düşük oksijen basınçlarında, Epo üretiminin mRNA'sının artışı ile primer astrosit kültürlerinde stimüle edildiği, ayrıca travmatik beyin yaralanması olan hastalardan elde edilen beyin omurilik sıvılarında da Epo saptandığı rapor edilmiştir. Yapılan çalışmalarda serebral iskemide Epo'nun kemirgenlerde santral sinir sistemine direkt uygulanması ile nöron ölümünün anlamlı bir şekilde azaldığı bildirilmiştir . SSS'de Epo ve EpoR'lerinin gelişmekte olan beyinde bulunması ve matür beyinde de varlığının sürmesi nedeniyle Epo'nun gelişimsel ve daha sonra da homeostazide rol aldığı şeklinde görüşler öne sürülmüş (128); hipoksik ortamda Epo üretiminin indüklenmesi ve eritrosit sayısında artış ile doku oksijenizasyonu için

daha iyi koşullar sağlandığı bildirilmiştir (153).

Keswani ve ark. Nitrik oksit (NO)'in bitişik SC hücrelerinden Epo üretimini stimüle eden “aksonal hasar faktörü” ile alakası olduğunu gösterdiler. Sonuçta görüldü ki; bu endojen axon koruyucu yol tedavi amacıyla kullanılabilir. Distal duyumotor aksonal polinöropatinin iyi oluşturulduğu hayvan modelinde; Keswani ve ark. sistemik Epo uygulayarak aksonal dejenerasyon, ekstremitelerde kuvvetsizlik, nöropatik ağrı bulgularında iyileşme olduğunu gösterdikler. Bu verilerle; periferal nöropatiler ve arka kök aksonal dejenerasyon ile karakteristik diğer nörodejeneratif hastalıklarda rhEpo'nun tedavi amaçlı klinikte kullanılabiliceği fikri oluşmuştur (38).

Epo'nun SSS ve PSS de *aksonkoruyucu* etkisi, *nöron besleyici* etkisi, *nöron stimüle* etkisi ile *antiapoptotik* etkileri kombine oluşur (39). Hipoksiyle artan glutamat toksisitesi hipoksi bağlı sinir hücre ölümüne neden olur ve bundan sinir hücrelerini Epo'nun koruduğu in vitro gösterilmiştir (154, 155). Spinal kordun akut travmaları sonrası Epo ve Metilprednisolon karşılaştırıldığı Fumagalli ve ark. (2008) en yeni çalışmasında. Spinal kordun akut travmasından sonraki 3 saat'de travma merkezinde NGF mRNA seviyeleri incelendiğinde Epo'nun salınımı artırdığını, Metilprednisolon'un ise azalttığını göstermişler. 7. gün hem Epo'nun hem de Metilprednisolon'un NGF mRNA seviyelerini artırdığı görülmüş ve iki ilaç arasındaki fark giderilmiş (39). Gordon ve ark. (2003) sonuçları değerlendirdiklerinde; nörotrofik faktörler (Brain-derived neurotrophic factor=) BDNF gibi; uzamış aksotominin negatif etkilerine karşı koyarak, aksonların rejenerasyon kapasitesini yönetmektedir. Düşük doz BDNF aksonal dejenerasyonun etkinliğini artırmaktadır. Yüksek doz BDNF p75 reseptörü ile etkileşerek aksonal dejenerasyonu inhibe eden ve ayrıca iskelet kasında nöromusküler bağlantıları durduran bir faktör olabilmektedir. Sitokinler(İmmunofilin ligand ve FK506); kronik denerve SC'nin aksonal rejenerasyonu destekleme kapasitesini artırdığı ve kısa süreli elektrik stimülasyonunun; hasarın tamirinden sonra karşı tarafa doğru aksonal büyümeyi hızlandırarak iyileşmeyi artırdığını görmüşler. Aynı zamanda makrofaj/SC etkileşiminin eksojen sitokinler gibi davrandıklarını göstermişlerdir. Uzun zaman denerve SC'lerinin aksonal büyüme desteği azalmaktadır, ilk 3 aydan sonra p75 reseptörünün hızlıca azalmakta olduğu görülmüştür(156).

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma, ağırlıkları 200 ± 30 gram arasında değişen 31 adet Wistar tipi dişi sıçan kullanılarak gerçekleştirildi. Cerrahi işlemler 50 mg/kg Ketamine-HCL (Alfamine®-im) ve 9 mg/kg Ksilazin HCl (Rompun®-im) karışımı ile sağlanan anestezi altında gerçekleştirildi. Cerrahi girişim sağlamak amacı ile hayvanlara özel tespit tahtaları üzerinde uygun pozisyonlar verildi ve işlemler operasyon mikroskobu (107 Series, Seiler Instrument, St. Louis, Missouri) kullanılarak gerçekleştirildi. Tüm gruplarda sağ arka ekstremitte çalışma için kullanıldı, ameliyat yapılmayan sol arka ekstremitte ise kontrol olarak korundu. Tüm cerrahi işlemler aynı cerrah tarafından ve standart mikrocerrahi teknikler uygulanarak gerçekleştirildi. Cerrahi işlemler siyatik sinir üzerinde gerçekleştirildi.

Cerrahi işlemlerde; sham=kontrol grubunda siyatik sinir diseke edilip deri kapatıldı. Diğer dört grubda siyatik sinir kesisinden sonra standart teknikle 4 adet sütürle koaptasyon yapıldı. Eritropoetinle ilgili literatürde yapılan çalışmalarda intraperitoneal uygulamanın daha etkili olduğu görülmüş ve iki hafta boyunca intraperitoneal eritropoetin her gün uygulandı. Hayvanlar postoperatif dönemde standart laboratuvar şartlarında, uzman veteriner kontrolünde, 7'şerli gruplar halinde kafeslerde izlendi, yem ve su ihtiyaçları düzenli olarak karşılandı. Bakımları sırasında insizyon bölgelerine povidone iyot ile pansuman yapıldı. II. ve III. gruptan birer hayvanda 7. haftada zayıflama gözlemlendi ve ilerleme olunca hayvanlar ayrı kafeslere alınarak izole edildi. Takiplerde bu hayvanlardan II. gruptan 2 numaralı hayvan EMG çekilmesi sırasında kaybedildi. Diğeri III. gruptan 2 numaralı hayvan EMG çekimi sonrası günde kaybedildi.

Sonuçta tüm hayvanların SFI(=Siyatik Fonksiyon İndeksi) ve EMG ölçümleri yapılabildi fakat kas ve sinir, makroskopik ve mikroskopik değerlendirilmeler 2 hayvan eksik olarak yapıldı. Cerrahi tamlandıktan sonra ötenazi intrakardiyak kan alınarak yapıldı.

Bu çalışma Pamukkale Üniversitesi Rektörlüğü Deney Hayvanları Etik Kurul Başkanlığının 15.01.2008 tarih ve B.30.2.PAÜ.0.01EU.00.00.400-1/03 sayılı izni ile gerçekleştirilmiştir.

SİYATİK SİNİR ANATOMİSİ

Deneysel periferik sinir çalışmalarında daima kullanılan siyatik sinir L₄, L₅, L₆ ve S₁ gelen spinal sinirlerin oluşturduğu lumbo-sakral trunkustan çıkar ve sıçanlardaki en kalın periferik sinirdir. Medulla spinalisden çıkan ve siyatığe dahil olan lifler değişkenlik göstermekle birlikte sıklıkla L₅, L₆ ve S₁ kaynaklanan liflerin birleşmesinden oluşmaktadır.

Siyatik sinir pelvis içerisinde adını alıp, iskiyumun dorsal kenarı ile kuyruk sokumu arasındaki derin olukta ilerler ve siyatik çentikten çıktıktan sonra piriform kasın ventralinde seyrederek. Arka bacak kaslarının çoğunu inerve eden siyatik sinirin ana gövdesi piriform kas seviyesinin 1-2mm aşağısında kuadratus femoris kasının üzerinden ilerleyerek abduktor femoris fasyasının üzerinde oblik olarak bacağı doğru iner (67).

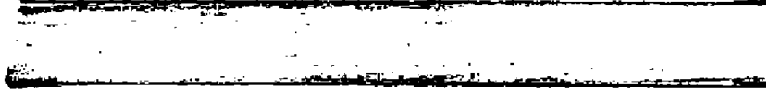
Siyatiğin ana gövdesiyle birlikte çıkan ince bir dalcık piriformis seviyesinde ventrale doğru kuadratus femorisin altından geçer, biceps femoris, semitendinöz ve semimembranöz kaslarının motor inervasyonunu sağlar.

Siyatik sinir, diz eklemi seviyesinin yaklaşık yarım santimetre üzerinde ventrale doğru seyreden kalın tibial sinir ve dorsale doğru seyreden ince peroneal sinir dallarına ayrılır.

Siyatikten ayrılan peroneal sinir daha aşağıya doğru gastrokinemiusun lateral karnını ve derin parmak fleksörlerini çaprazlayıp önce daha ince olan peroneus longus dalını verir ve daha sonra yüzeysel ve derin peroneal sinir dallarına ayrılarak sonlanır. Bu dallardan yüzeysel olan peroneus longus ve brevis kaslarını ve parmak ekstansörlerini inerve edip, ayak sırtı ve parmaklarının bir bölümünün duyusunu sağlar; ve derin dal tibialis anterior ve uzun parmak ekstansörlerini inerve ederek ikinci parmak arası bölgeye ulaşır. Ventrale doğru uzanan tibial sinir ise, ilk dalı olan sural siniri, ayrım noktasının 1-2 mm proksimalinde popliteaya girmeden hemen önce gastrokinemiusun iki başı arasında verir ve plantaris, soleus, gastrokinemiuslar, fleksör hallusis longus, fleksör digitorum longus ve tibialis posteriorları inerve eder. Dallardan hemen sonra ayak bileğinin üzerinde lateral ve medial plantar sinirlere ayrılarak sonlanır (67).

ÇALIŞMA GRUPLARI

Cerrahi işlemler 31 adet sıçanda 5 farklı grup oluşturularak gerçekleştirildi.



Sham Kontrol

Grup I



Dört Adet Epinöral Sütürle Onarım

Grup II, III, IV, V

Grup I : Sham kontrol (n=5). Eksternal sirkumferansiyel nöroliz.

Grup II : Kontrol (n=5). 4 adet epinöral sütür ile onarım

Grup III: Deney grubu (n=7). 4 adet epinöral sütür ile onarım 2000 Ü Epo- α .

Grup IV: Deney grubu (n=7). 4 adet epinöral sütür ile onarım 2000Ü Eritropoetin- β .

Grup V : Deney grubu (n=7). 4 adet epinöral sütür ile onarım 2000Ü Darbopoetin- α .

Şekil 12: Çalışma gruplarının şematik görünümü.

CERRAHİ TEKNİK

Cerrahi yapılacak gruplarda yer alan deneklere 60-100 mg/kg Ketamine-HCl (Alfamine®-im) ve 5 mg/kg Ksilazin HCl (Rompun®-im) karışımı ile anestezi uygulandı. Operasyon alanı olan gluteal ve uyluk bölgeleri traş edildikten sonra, prone pozisyonda ayakları tespit edildi ve povidon iodine ile cerrahi alan temizliği yapıldı. İnsizyon sağ alt ekstremitede kalça eklemi katlantısını izleyecek şekilde oblik gluteal alanda yapıldı ve cilt kenarları ekarte edilerek biceps femoris kasına ulaşıldı (**Şekil 13a**). Bu kas, femur ve diz eklemi posterior sınırı boyunca künt diseksiyonla açıldı ve kenarları ekarte edilerek siyatik sinir ortaya çıkarıldı (**Şekil 13b**).



a.



b.

Şekil 13: Siyatik sinir diseksiyonu a) Cilt insizyonunun planlanması; b) Biceps femoris kasının künt diseksiyonu ile açılması sonucu sinirin ortaya konması.

Ardından sinir ince uçlu bir diseksiyon makası yardımıyla, siyatik çentikten popliteal alandaki dallanma bölgesine kadar çevre dokulardan serbestleştirildi. Diseksiyon başlangıcında popliteal dallanma noktasının yaklaşık 2 cm proksimalinde siyatik sinirden ayrılan ve biceps femoris, semitendinöz ve semimembranöz kasların innervasyonunu sağlayan ince motor dal korundu. Siyatik sinirin çevre dokulardan serbestleştirilmesinden sonraki basamaklar tüm gruplarda aynı şekilde gerçekleştirildi. Bütün deneysel gruplarda (Grup I hariç) serbest sinir uçları epinöral teknikte, 10/0 Ethilon dikiş (Ethicon, Norderstedt, Germany) kullanılarak dört adet epinöral dikiş ile onarıldı (**Şekil 14**).

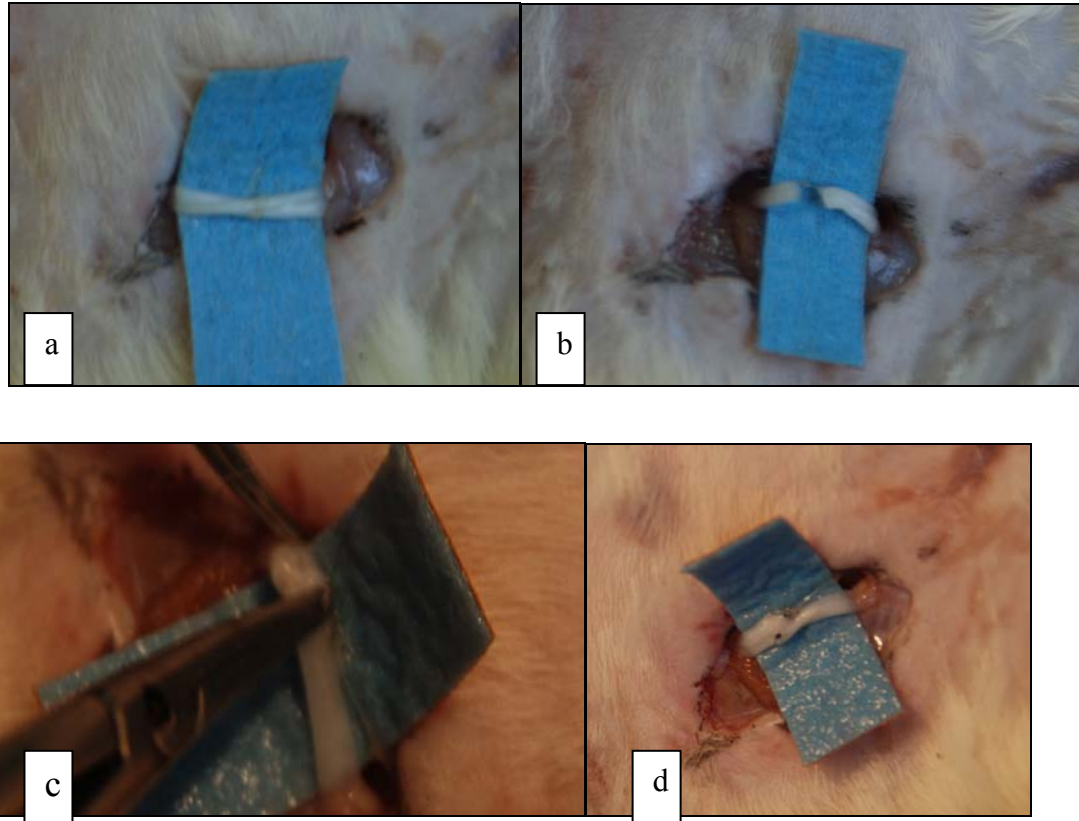
Grup I: Sham grubu (n=5): Bu grupta siyatik sinir diseke edildi, ek bir cerrahi işlem uygulanmadı.

Grup II: Kontrol grubu (n=5): Siyatik sinir, koaptasyon seviyesi olarak belirlenen tibial ve peroneal sinirlerin ayrımının 1 cm proksimalinden keskin bir mikromakas yardımıyla tam kat kesildi. Serbest sinir uçları 10/0 Ethilon dikiş (Ethicon, Norderstedt, Germany) kullanılarak geçilen 4 adet epinöral dikiş ile onarıldı.

Grup III: Deney grubu (n=7): Siyatik sinir, koaptasyon seviyesi olarak belirlenen tibial ve peroneal sinirlerin ayrım noktasının 1 cm proksimalinden keskin bir mikromakas yardımıyla tam kat kesildi. Serbest sinir uçları 10/0 Ethilon dikiş (Ethicon, Norderstedt, Germany) kullanılarak geçilen dört adet epinöral dikiş ile onarıldı. 2000 Ü / kg Epo- α (Epoetin Alfa; Eprex®) i.p. uygulandı.

Grup IV: Deney grubu (n=7): Siyatik sinir, koaptasyon seviyesi olarak belirlenen tibial ve peroneal sinirlerin aynı noktasının 1 cm proksimalinden keskin bir mikromakas yardımıyla tam kat kesildi. Serbest sinir uçları 10/0 Ethilon dikiş (Ethicon, Norderstedt, Germany) kullanılarak geçilen dört adet epinöral dikiş ile onarıldı. 2000 Ü / kg Epo- β (Epoetin Beta; NeoRecormon®) i.p. uygulandı.

Grup V: Deney grubu (n=7): Siyatik sinir, koaptasyon seviyesi olarak belirlenen tibial ve peroneal sinirlerin aynı noktasının 1 cm proksimalinden keskin bir mikromakas yardımıyla tam kat kesildi. Serbest sinir uçları 10/0 Ethilon dikiş (Ethicon, Norderstedt, Germany) kullanılarak geçilen dört adet epinöral dikiş ile onarıldı. 2000 Ü / kg Dp- α (Darbepoetin Alfa; Aranesp®) i.p. uygulandı.



Şekil 14: Deney ve kontrol gruplarında uygulanan cerrahi işlem. a) Siyatik sinirin koaptasyona hazırlanması; b) Keskin bir mikromakas yardımıyla tam kat kesilmesi ve kesilmiş olan sinir uçları; c) 180 derece açılar ile geçilen iki adet epinöral dikiş ile onarım; d) 60 derece açılar ile geçilen dört adet epinöral dikiş ile onarım.

Tüm deneklerde, cerrahi işlemlerin tamamlanmasının ardından, kaslar 5/0 vicryl, cilt ise 5/0 ipek dikiş kullanılarak devamlı dikiş tekniği ile onarıldı.

İLAÇ UYGULAMASI

Rekombinant insan eritropoetini (r-hEpo)'nin üç değişik formu kullanıldı.

Epoetin Alfa (Ep- α) (Eprex® 2000, Cilag AG. International Zug, İsviçre)

Epoetin Beta (Ep- β) (NeoRecormon® 2000, F.Hoffmann-La Roche Ltd.,Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Almanya)

Darbepoetin Alfa (Dp- α) (Aranesp® 2000, Amgen Europe B.V., The Netherlands)

Literatürde; Campana ve Myers (2003), Sekiguchi ve ark. (2003), yaptıkları çalışmalarda 2680 Ü/ kg bw orta dozun en etkili olduğu, düşük doz 1000 Ü/ kg bw etkisiz, yüksek doz 5000 Ü/ kg bw etkili ama orta dozdan daha etkili olmadığını bulmuşlardır (38). Klinik bir çalışmada ise; akut ST elevasyonlu MI olan primer koroner anjioplasti (PCI) ile tedavi edilen hastalara tek doz iv. 60.000 İÜ / kg bw Dp- α vermişler (141).

Bizim çalışmamızda Epo 2000 Ü/ kg/ bw dozda intraperitoneal olarak verildi. Bu üç Epo formunun ortalama olarak plazma yarılanma ömürleri hemen hemen yakın ve 8- 10 saat arasında değişmektedir, ilacın verilmiş yolu da doğal olarak bunu etkilemektedir. Klinik uygulamalarda sc yol ile 8 saat olmakta fakat deneysel uygulamalarda en etkin yolun ip olduğu çalışmalarda gösterilmiştir. Sonuçta üç formun farkı plazmada kalış süresi ve etki oluşma hızı ile farklılık göstermektedir ve klinikte Dp- α en uzun plazma süresi ve en kısa sürede etki oluşturması ile diğerlerinde ayrılmaktadır.

DEĞERLENDİRME YÖNTEMLERİ

Oniki haftalık takip süresinde sorun yaşanmadı fakat Grup I ve II'den 2 numaralı birer hayvan EMG esnasında ve sonrasında kaybedildi, Siyatik Fonksiyon İndeksi (=SFI) hepsine yapılabildi ama kalabalık kafese bağlı olduğu düşünülen 3 hayvanda sonuçlar diğerlerine oranla beklenildiği gibi daha kötü idi. Kafesler 6-7. haftalarda ayrıldı ve histolojik değerlendirmeye kalan 29 hayvan dahil edildi.

Genel Değerlendirme

Çalışma süresinde değerlendirmeye alınan hayvanlarda gözlenen genel değişiklikler belirlendi.

Fonksiyonel Değerlendirme

Çalışmada yer alan grupların fonksiyonel değerlendirilmesinde yürüme analizi = “walking-track” analiz ve elektromiyografi (EMG) kullanıldı. Deneklerin yürüme analizi ile geç postoperatif SFI değerleri hesaplandı.

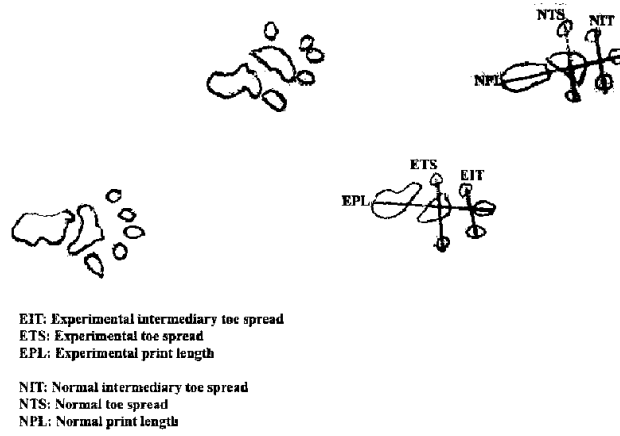
a- Yürüme Analizi ve SFI



Şekil 15: Siyatik fonksiyon indeksini elde etmek için yapılan “yürüme analiz testi” değerlendirmede kullandığımız, ve hazırladığımız (a) düzenek. Deneklerin ayaklarının işaretlenmesi (b). Yürüme alanı ve mürekkep-ıstampa görülmekte (c).

Değerlendirme için sıçanların aynı düzlemde yürümelerini sağlamak amacı ile ilk olarak Borwn ve arkdş. tarif ettiği 8,2 cm eninde, 42 cm boyunda, kenar yüksekliği 12 cm düzenek hazırlandı fakat yürüme kulvarının yüksekliği 12 cm olunca deneklerin kulvarın dışına çok kolay yöneldikleri görölerek yükseklik 20 cm yapıldı ama deneklerin yürümesi sağlanamayınca son olarak 8,2 cm eninde, 67 cm boyunda, kenarları 27 cm kulvar ve sonunda kapaklı karanlık oda olan bir yürüme alanı hazırlandı (157). Bunun için yürüme kulvarının içine 8,2 x 42 cm boyutlarında A4 fotokopi kağıtlarından kesilen 2 adet beyaz kağıt şeritler yerleştirildi (Şekil 15a). Daha sonra Şekilde görüldüğü gibi sıçanların her iki arka ayakları siyah mürekkep

emdirilmiş ıstampaya bastırıldı ve hazırlanan kulvarda yürütülerek arka ayak izleri kaydedildi (158) (Şekil 15b ve c).



Şekil 16: Siyatik fonksiyon indeksi PL (“print length”), TS (“toe spread”) ve İT’nin (“intermediate toe spread”) deneysel (E) ve kontrol (N) ekstremiteler için ölçüm şekli

Elde edilen kağıt şeritteki en belirgin ve uygun ayak izleri kullanılarak ayak izlerinde, topuk ile parmak ucu arasındaki mesafe [print length (PL)], birinci ve beşinci parmaklar arasındaki mesafe [toe spread (TS)], ikinci ve dördüncü parmaklar arasındaki mesafe [intermediate toe spread (IT)] milimetrik cetvel aracılığıyla ölçüldü (Şekil 16). Yürüme analizi ile ölçümler yapıp sonucunda elde edilen değerler siyatik fonksiyon indeks skalasına uyarlandı (159). Bain, Mackinnon ve Hunter tarafından geliştirilen bu multiple lineer regresyon formülü yardımıyla Siyatik Fonksiyon İndeksleri (SFİ) hesaplandı (Şekil 17). SFİ değerleri açısından gruplar arasında istatistiksel farklılık olup olmadığı araştırıldı.

$$SFİ = -38,3 \frac{(EPL-NPL)}{NPL} + 109,5 \frac{(ETS-NTS)}{NTS} + 13,3 \frac{(EIT-NIT)}{NIT} - 8,8$$

Şekil 17: Siyatik fonksiyon indeksinin hesaplanması için kullanılan formül.

b- Elektromiyografik Değerlendirme (EMG)

Cerrahiden sonraki onikinci haftada yürüme analizlerinin tamamlanmasının ardından tüm sıçanlar elektrofizyolojik değerlendirmeye alındılar. EMG işlemleri Teca Medelec Premiere Plus cihazı yardımıyla gerçekleştirildi (Şekil 19). Değerlendirmeye alınan hayvanlarda anestezi, intraperitoneal yoldan verilen 50 mg/kg Ketamine-HCl (Alfamine®) ile sağlandı. İlk cerrahi işleme benzer şekilde

siyatik sinir çevre dokulardan serbestleştirildi ve koaptasyon hattı bulundu. Gastrokinemius kasına ulaşmak için, biceps femoris kası insersiyosundan keskin diseksiyon ile ayrılarak posteriora ekarte edildi. Hayvanın sırt bölgesine Ag-AgCl disk elektrod topraklama olarak yerleştirildi (Şekil 18).



a.



b.

Şekil 18: EMG de kullanılan cihaz (a), sağ ve sol siyatik sinire modifiye ederek kullandığımız elektrodların yerleştirilmesi (b).

Sinir uyarımları siyatik sinir üzerinden, koaptasyon hattının 1 cm proksimalinden, anot-katot arası uzaklığı 2 mm olan termoplastik materyale gömülü bipolar tungsten metal elektrotlar ile yapıldı. Kayıtlar ise aktif elektrot ve referans elektrot ile alındı. Gastrokineimus kasının maksimum büyüklükte birleşik kas aksiyon potansiyeli (CMAP=compound maximal action potential) ölçülerek, bu potansiyelin amplitüdü ve alanı hesaplandı (Şekil 19). Ayrıca supramaksimal uyarım

ile elde edilen CMAP’ de, uyarımdan sonra defleksiyonunun başlangıcına kadar geçen zaman “latans” olarak değerlendirildi. Deney uygulanan sağ ve sağlam olan kontrol sol bacaklardaki gastrokinemius kaslarının CMAP’lerinin amplitüd, alan ve latans değerleri ölçülerek deneysel bacak/kontrol bacak oranları hesaplandı ve oranlar istatistiksel olarak karşılaştırıldı. Bu esnada anestezi over doza bağımlı olarak II. Gruptan 2 numaralı hayvan kaybedildi EMG elde edilemedi, ertesi gün ise III. Gruptan 2 numaralı hayvan kaybedildi.



Şekil 19: EMG şeması görülmekte, yatay ok “Latans”, dik olan ok “Tepe-Tepe Amlitüdü”, 2 ve 4’ün altındaki alanlar toplam “Alan” değerini göstermektedir.

Kasların Histolojik Değerlendirilmesi

Fonksiyonel analizleri tamamlanan deneklerde her iki bacakta gastrokinemius kasları eksize edildi ve kasların renk ve görünüm açısından makroskopik incelemeleri, ıslak ağırlıklarının ölçümü yapıldı.

a- Kas Ağırlık Ölçümü

Siyatik sinirin bir dalı olan tibial sinir ile inerve edilen gastrokinemius kası her iki arka ekstremitede eksize edilerek ıslak kas ağırlığı hassas dijital terazi (Precisa XB 220A, BJ600, max e: 0.001 gr., min d: 0,0001 gr.) ile ölçüldü. Her hayvanda, deney yapılan sağ bacak gastroknemius kas ağırlığı, opere edilmeyen sol bacakta gastroknemius kas ağırlığına bölünerek iyileşme oranı hesaplandı (Şekil 20).

$$\text{Kas iyileşme oranı (\%)} = \frac{\text{Sağ bacak gastroknemius kas ağırlığı}}{\text{Sol bacak gastroknemius kas ağırlığı}} \times 100$$

Şekil 20: Kas ağırlıkları yardımıyla kas iyileşme oranının hesaplanması.

b- Mikroskop ve Histopatolojik değerlendirme

Işık mikroskobunda incelenmesi amacıyla, takip işlemi sonrası parafin içine gömülerek bloklandı. Histopatolojik değerlendirme için her kas preparatından x400 büyütme altında 6 farklı alan değerlendirmeye alındı. Kas kesitlerinin incelenmesinde, ışık mikroskobundan (Olympus CX 31, U-TVO. 5XC-3) elde edilen görüntüler mikroskopa bağlı bir kamera (ExwaveHAD color video CAMERA, SONY) aracılığıyla 19 inch LCD (LCD monitör, model no: LMD-2010, SONY) ekrana yansıtılıp, ekran üzerine 6 adet kare çizilen asetat ekrana yerleştirildi. Asetat'da kullanılan 6 kare, mikrolam mikroskopa yerleştirilerek elde edilen alan mikrolam'ın LCD monitöre iz düşümleri kullanılarak hazırlandı. Her bir alanın içine tam olarak giren kas lifleri dahil edildi ve kas liflerinin en küçük ve en geniş çap uzunlukları ölçüldü ve bu iki değer aritmetik ortalaması hesaplanarak her bir alan için ortalama kas lifi çapı hesaplandı. Daha sonra 6 alan için aynı şey yapıp sonuç ortalama kas lifi çapı hesaplandı. Elde edilen bu değer "µm" çavrilerek kaydedildi.

Sinirlerin Histolojik Değerlendirilmesi

Makroskopi

Siyatik sinirlerde görülen makroskopik değişiklikler belirlendi. Çevre dokulara yapışıklık gösterip göstermedikleri ve koaptasyon hattında bir skar olup olmadığı değerlendirildi.

Mikroskopi ve Histopatolojik değerlendirme

Örneklemler alınırken siyatik sinirlerin koaptasyon alanından longitudinal 1,5 cm kesit alınıp ve ortasından geçen insizyonla bu materyal ikiye bölünerek örneklendi. Daha sonra 0,5 cm kalınlıkta distal ve proksimal horizontal kesitler alındı ve örneklendi. Bu kesitler epinöral dokudaki kollajeni gösterebilmek için Masson-trikrom ile boyandı. Siyatik sinir rejenerasyonunun değerlendirilmesi için alınan örnekler, 1 µm kalınlığında seri kesitler alındı ve toluidine mavisi ile boyandı. Longitudinal planda hazırlanmış kesitlerde, sinir çevresinde daha koyu boyanan epinöral skar dokusunun kalınlığı ölçmek için hazırlanan kesitler x400 ışık mikroskobundan (Olympus CX 31, U-TVO. 5XC- 3) elde edilen görüntüler mikroskopa bağlı bir kamera (ExwaveHAD color video CAMERA, SONY) aracılığıyla 19 inch LCD (LCD monitör, model no: LMD-2010, SONY) ekrana yansıtılıp, en az 10 farklı noktadan tekrar edildi ve elde edilen değerler sinirin

transvers çapına oranlanarak deney gruplarındaki her bir sinir için epinoral skar doku indeksi değeri hesaplandı (Şekil 21).

$$\text{Epinoral Skar Doku İndeksi} = \frac{\text{Epinoral Skar Doku Kalınlığı}}{\text{Sinir Transvers apı}}$$

Şekil 21: Sinir kesitlerinden epinoral skar doku indeksinin hesaplanması.

Her bir deneğin proksimal ve distal alanlarından hazırlanan her sinir kesiti x400 büyütme altında incelendi; yukarda kas ve epinoral skar dokusundaki aynı sistem kullanıldı. Elde edilen bu değerler “µm” çevrilerek kaydedildi. Her bir sinir rneği kesitinin 6 farklı alanında miyelinli sinir sayıları belirlendi ve x40 büyütme altında ölçülen toplam sinir kesit alanı yardımıyla toplam miyelinli akson sayısı hesaplandı (Şekil 22). Beraberinde inceleme alanına tam olarak giren sinir liflerinin ve aksonların en büyük ve en kk çapları ölçülerek ortalama sinir lifi çapları, ortalama akson çapları ve ortalama g oranları (akson çapı / sinir lifi çapı) hesaplandı.

$$\text{Toplam Miyelinli Akson Sayısı} = \frac{\text{Sinir Kesit Alanı}}{\text{Değerlendirilen Alan}} \times \frac{\text{Değerlendirilen Alandaki Miyelinli Akson Sayısı}}{\text{Değerlendirilen Alan}}$$

Şekil 22: Siyatik sinirin toplam miyelinli akson sayısının hesaplanması.

İstatistiksel Değerlendirme

Uygulanan tüm parametrelerden elde edilen verilen istatistiksel değerlendirme için SPSS for Windows v.10.0 programına aktarıldı. Parametreler açısından gruplar arasında genel karşılaştırma yapıldı, bu değerlendirme non parametrik bir test olan Kruskal-Wallis testi ile yapıldı; her parametre açısından gruplar kendi aralarında da karşılaştırıldı ve çift yönlü non-parametrik bir test olan Mann Whitney-U testi kullanıldı. Sonuçları değerlendirmelerde $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

GENEL DEĞERLENDİRME BULGULARI

İlk yapılan EMG sonrası dört gruba cerrahi yapıldı, birinci gruba sadece sinir diseksiyonu uygulandı, oniki haftanın sonunda ilk olarak yürüme analiz testi yapıldı daha sonra EMG uygulandı bu esnada ikinci gruptan 2 nolu denek kaybedildi, üçüncü gruptan 2 nolu denek ise EMG den sonraki saatlerde kaybedildi. Elde edilen değerler kayıp deneklerin olup olmadığı testler değerlendirmeye dahil edildi. Kontrol grubu dışında kalan diğer tüm gruplarda cerrahi sonrasında opere edilen alt ekstremitede tam motor paralizi gelişti. Oniki hafta sonunda tüm gruplarda paralizilerde kısmi düzelme olduğu ve minimal kas atrofilerinin geliştiği gözlenirken, deney grubundaki bazı deneklerde parsiyel otomutilasyon geliştiği saptandı.

FONKSİYONEL DEĞERLENDİRME BULGULARI

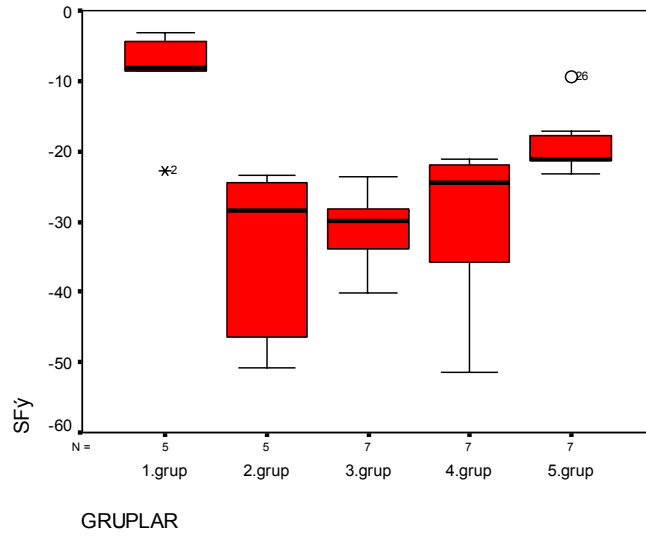
Yürüme Analizi ve Siyatik Fonksiyon İndeksi Bulguları

Deneyde yer alan beş gruba oniki hafta sonunda yürüme analizi yapıldı ve siyatik fonksiyon indeksi değerleri (SFI) saptandı. Grup 1'de ortalama $-9,42 \pm 7,76$, Grup 2'de ortalama $-36,48 \pm 9,10$, Grup 3'de ortalama $-31,11 \pm 5,36$, Grup 4'de ortalama $-30,32 \pm 11,40$ ve Grup 5'de ortalama $-18,83 \pm 4,62$ idi (**Tablo 1**).

Tablo 1: Siyatik Fonksiyon İndeksi (SFI) değerleri

Denek	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	Grup 5
1	-4,48	-50,84	-23,68	-33,30	-18,46
2	-22,69	-23,41	-34,31	-22,02	-9,39
3	-3,21	-46,32	-33,62	-51,39	-23,26
4	-8,12	-24,46	-29,87	-24,38	-21,02
5	-8,63	-28,39	-28,93	-38,37	-21,07
6			-40,08	-21,02	-21,48
7			-27,31	-21,80	-17,19
Ort±SD	-9,42±7,76	-36,48±9,10	-31,11±5,36	-30,32±11,40	-18,83±4,62

Siyatik fonksiyon indeksi açısından değerlendirildiğinde, Grup 1 olan kontrol grubundan elde edilen SFI değerlerinin Dp- α uygulanan Grup 5 ile benzerliği dikkat çekiciydi ve gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmedi ($p>0,05$). Grupların kendi aralarında karşılaştırılmasında ise, Grup 2, 3 ve 4 kendi aralarında, ayrıca grup 4-5 arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmedi ($p>0,05$). Grup 3-5 ve 2-5 belirgin bir fark olduğu saptandı ($p<0,01$ ve $p=0,05$) (**Şekil 23**).



Şekil 23: Ortalama SFI değerlerinin karşılaştırılması (Mann-Whitney U)

- Grup 1-2, 1-3 ve 1-4 arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p < 0,01$).
- Grup 1 ile Grup 5 arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ($p > 0,05$).

Elektromiyografik Değerlendirme Bulguları

Oniki hafta sonunda tüm deneklere elektromiyografi yapılmasına rağmen, işlem sırasında ölmesi nedeniyle Grup 2’de iki nolu denekten veri elde edilemedi. Deney (sağ) tarafındaki kaslardan elde edilen ölçümler, sol bacak ölçümlerine oranlanarak iyileşme oranları hesaplandı (Tablo 2). **Tablo 2:** EMG bulguları.

Sağ bacak / sol bacak **kasılma latansı** oranları (ms)

Denek	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	Grup 5
1	1,56	2,12	1,22	1,27	1,22
2	1,18	1,47	—	1,12	1,30
3	0,30	1,84	2,03	1,03	1,04
4	1,03	1,56	1,14	1,32	1,06
5	0,30	1,08	2,20	1,02	0,97
6			2,10	1,01	1,04
7			1,28	1,06	1,16
Ort±SD	0,87 ± 0,55	1,61 ± 0,39	1,66 ± 0,49	1,12±0,12	1,11±0,11

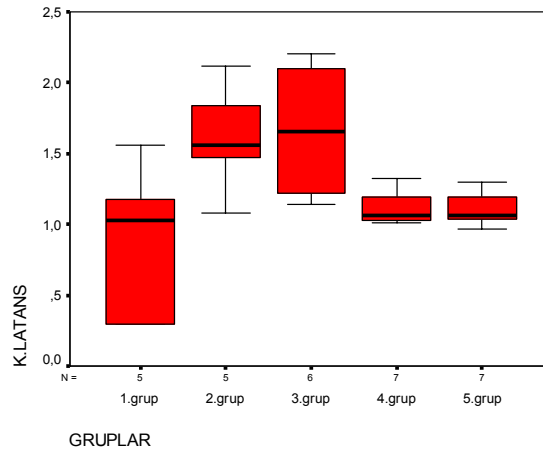
Sağ bacak / sol bacak **kasılma amplitüdü** oranları (mV)

Denek	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	Grup 5
1	0,80	0,48	0,24	0,75	0,71
2	0,74	0,43	—	0,61	0,41
3	1,22	0,19	0,36	0,72	0,62
4	0,67	0,26	0,57	0,25	0,74
5	0,94	0,61	0,68	0,37	0,49
6			0,03	0,98	0,90
7			0,48	0,11	0,43
Ort±SD	0,87±0,21	0,39±0,16	0,39±0,23	0,54±0,30	0,61±0,18

Sağ bacak / sol bacak kasılma eğrisi alanı oranları (μ Vs)

Denek	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	Grup 5
1	0,89	0,22	0,32	0,77	0,73
2	1,93	0,72	—	0,67	0,95
3	0,90	0,36	0,54	0,46	0,81
4	0,67	0,47	0,38	0,23	0,78
5	0,88	0,38	0,42	0,63	0,47
6			0,40	0,86	0,53
7			0,59	0,57	0,64
Ort±SD	1,05±0,49	0,43±0,18	0,44±0,10	0,59±0,20	0,70±0,16

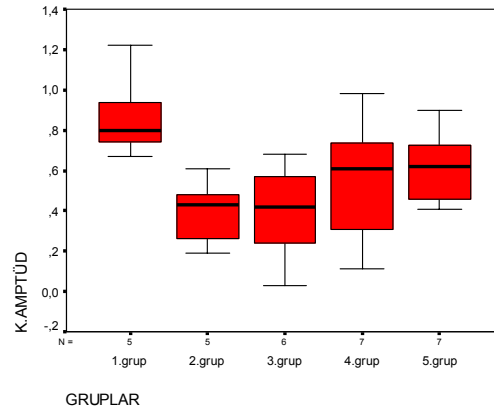
Gastrokinemus kası operatif bacak/deneysel bacak **kasılma latansı oranı**; Grup 1’de ortalama $0,87 \pm 0,55$, Grup 2’de ortalama $1,61 \pm 0,39$, Grup 3’de ortalama $1,66 \pm 0,49$, Grup 4’de ortalama $1,12 \pm 0,12$ ve Grup 5’de ortalama $1,11 \pm 0,11$ olarak hesaplandı. Kasılma latansı oranları açısından kontrol grubu olan Grup 1 en kısa latans değerine sahip olan gruptu. Kontrol grubu ile Grup 2 ve 3 arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı (sırayla $p < 0,05$ ve $p = 0,01$) (Şekil 24).



Şekil 24: Sağ bacak / Sol bacak latans oranları (Mann-Whitney U)

- Grup 1 ile Grup 2 ve 3 arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardı ($p < 0,05$).
- Grup 1 ile Grup 4 ve 5 arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı ($p > 0,05$)

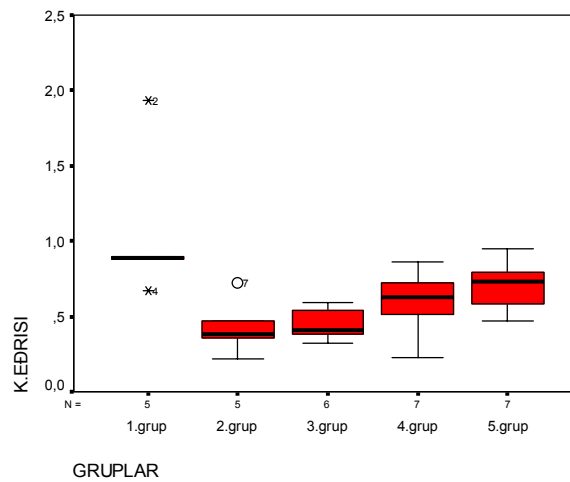
Gastrokinemus sağ bacak/sol bacak **kasılma amplitüdü oranı**; Grup 1’de ortalama $0,87 \pm 0,21$, Grup 2’de ortalama $0,39 \pm 0,16$, Grup 3’de ortalama $0,39 \pm 0,23$, Grup 4’de ortalama $0,54 \pm 0,30$ ve Grup 5’de ortalama $0,61 \pm 0,18$ olarak hesaplandı. Kasılma amplitüdü oranları açısından kontrol grubu ile diğer deney gruplarından sadece Grup 2 ve Grup 3 arasında saptanan farklar istatistiksel olarak anlamlı iken ($p > 0,05$ ve $p = 0,01$), kontrol grubu ile Grup 4 ve 5 arasında bir fark saptanmadı ($p > 0,05$). (Şekil 25).



Şekil 25: Deneysel bacak/kont. bacak kasılma amplitüdü oranları (Mann-Whitney U):

- Grup 1 ile Grup 2 arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p < 0,05$).
- Grup 1 ile Grup 3 arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p = 0,01$).
- Grup 1 ile Grup 4 ve 5 istatistiksel olarak anlamlı fark saptanamadı ($p > 0,05$).

Gastroknemus sağ bacak / sol bacak **kasılma eğrisi alanı oranı**; Grup 1’de ortalama $1,05 \pm 0,49$, Grup 2’de ortalama $0,43 \pm 0,18$, Grup 3’de ortalama $0,44 \pm 0,10$, Grup 4’de ortalama $0,59 \pm 0,20$ ve Grup 5’de ortalama $0,70 \pm 0,16$ olarak hesaplandı. Kasılma eğrisi alanı oranları açısından kontrol grubu ile Grup 2 ve 3 arasında belirgin fark olduğu ($p < 0,01$), Grup 1 ile Grup 4 arasında fark olduğu ($p < 0,05$) görüldü, buna rağmen Grup 1-5 arasında ve cerrahi grupların kendi aralarında ki farkların anlamlı olmadığı saptandı ($p > 0,05$) (**Şekil 26**).



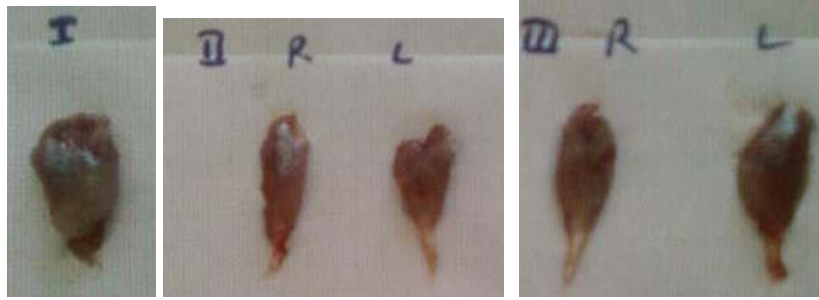
Şekil 26: Deneysel bacak/kontrol bacak kasılma eğrisi alan oranları (Mann-Whitney U)

- Grup 1 ile Grup 2 ve 3 arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p < 0,01$).
- Grup 1 ve 4 arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p < 0,05$).

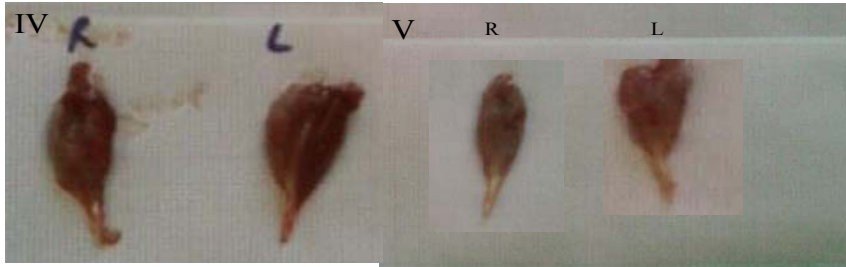
KAS DEĞERLENDİRME BULGULARI

Makroskopi, Islak Kas Ağırlık Oranları

Gastrokinemus kaslarının makroskopik görünümü kontrol sol bacak ve kontrol Grup 1'de normaldi fakat nispeten daha atrofik görünümdeki cerrahi gruplar arasında belirgin fark yoktu. Sağ bacak gastrokinemus kasları arasında atrofi görünümü Grup 2'de daha belirgindi. Grup III , Grup IV , Grup V'de deneklerde sağ bacak gastrokinemus kasları arasında atrofi benzerdi, sonuçta mevcut parametrelere göre değerlendirmeler yapıldı (Şekil 27).



Şekil 32: Gruplara göre kontrol sol bacak ve deneysel sağ bacak gastrokinemus kaslarının makroskopik görünümü. Deneysel bacak gastrokinemus kasları arasında gözlenen atrofi Grup 2 ile 3,4,5'de kendi aralarında ve sham grubuna nazaran daha belirgindi.

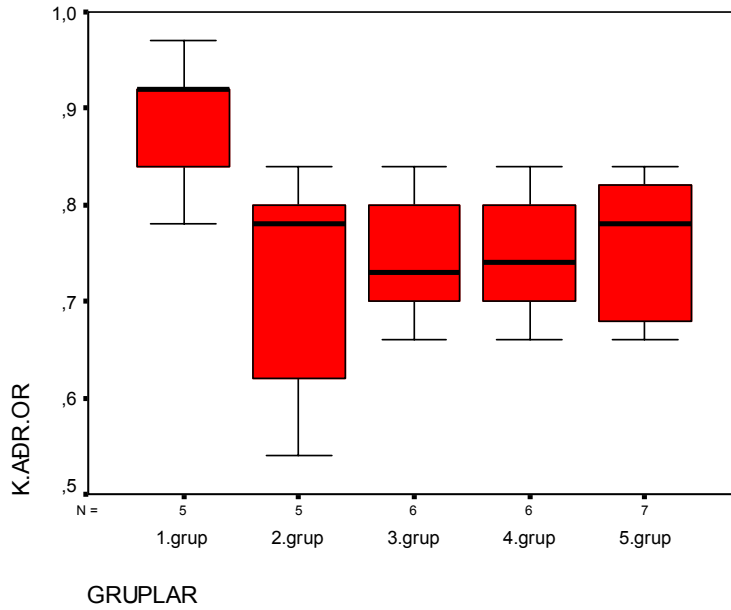


Gastrokinemus kası ıslak ağırlık oranları,

Grupların hepsinde deney uygulanan sağ bacak gastrokinemus kası **ıslak ağırlığı**, kontrol sol bacak gastrokinemus kası ıslak ağırlığına oranlanarak kas iyileşme oranları hesaplandı. Kas iyileşme oranları; Grup 1'de ortalama $0,90 \pm 4,87$, Grup 2'de ortalama $0,71 \pm 0,12$, Grup 3'de ortalama $0,74 \pm 6,86$, Grup 4'de ortalama $0,74 \pm 7,00$ ve Grup 5'de ortalama $0,75 \pm 7,97$ idi (**Tablo 3**). Deneysel bacak/kontrol bacak kas ağırlık oranı açısından Grup 1'in diğer deney grubu Grup 2'den farklı olduğu ($p < 0,05$), buna karşın diğer deney grupları arasında anlamlı bir farkın bulunmadığı saptandı ($p > 0,05$) (Şekil 28).

Tablo 3: Gastroknemius kası Deneysel/Kontrol bacak kas ağırlık oranları (%) yüzdeleri

Denek	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	Grup 5
1	0,92	0,62	0,70	0,66	0,84
2	0,84	0,80	--	--	0,66
3	0,97	0,54	0,76	0,70	0,78
4	0,92	0,78	0,80	0,84	0,70
5	0,88	0,84	0,66	0,78	0,80
6			0,84	0,80	0,66
7			0,70	0,70	0,84
Ort±SD	0,90±4,87	0,71±0,12	0,74±6,86	0,74±7,00	0,75±7,97



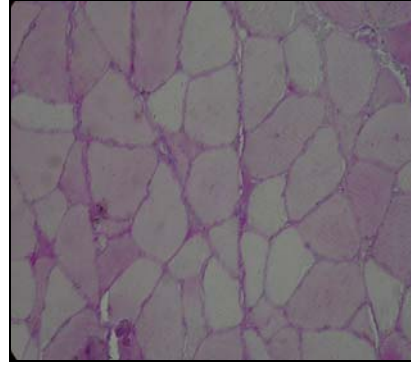
Şekil 28: Deneysel bacak ağırlığı / kontrol bacak kas ağırlığı oranları (Mann-Whitney U):

- Grup 1 ile Grup 2 arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p < 0,05$).
- Grup 1 ile Grup 3, 4 ve 5 arasında anlamlı fark olmadığı saptandı ($p > 0,05$).
- Grup 2, 3, 4 ve 5 arasında anlamlı bir farkın bulunmadığı saptandı ($p > 0,05$).

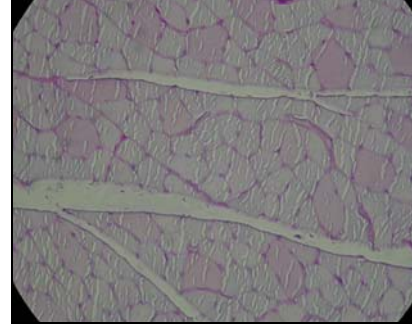
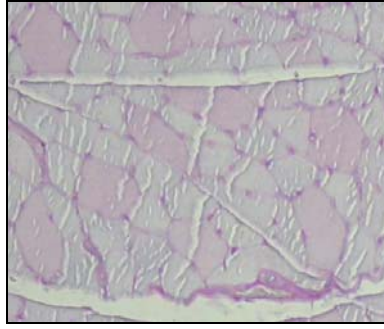
Mikroskopi ve Ortalama Kas Lifi Çapları

40x büyütme ile mikroskopik incelemede gastrokinemus kaslarının kontrol sol bacak grubu ile Grup 1 arasında fark saptanmadı ve koaptasyon uygulanan gruplardan alınan kas örneklerinin bu kontrol gruplarına oranla daha küçük çaplı ve atrofik lifler içerdiği gözlemlendi. Koaptasyon uygulanan grupların arasında ise belirgin bir fark saptanmadı. (Şekil 29). Gastrokinemus **kası ortalama lif çapları**

Grup 1'de $48,13 \pm 6,37 \mu\text{m}$, Grup 2'de $23,58 \pm 7,56 \mu\text{m}$, Grup 3'de $30,53 \pm 7,39 \mu\text{m}$, Grup 4'de $29,78 \pm 3,42 \mu\text{m}$, Grup 5'de $39,12 \pm 3,32 \mu\text{m}$ idi (Tablo 4).



Kontrol (sham)



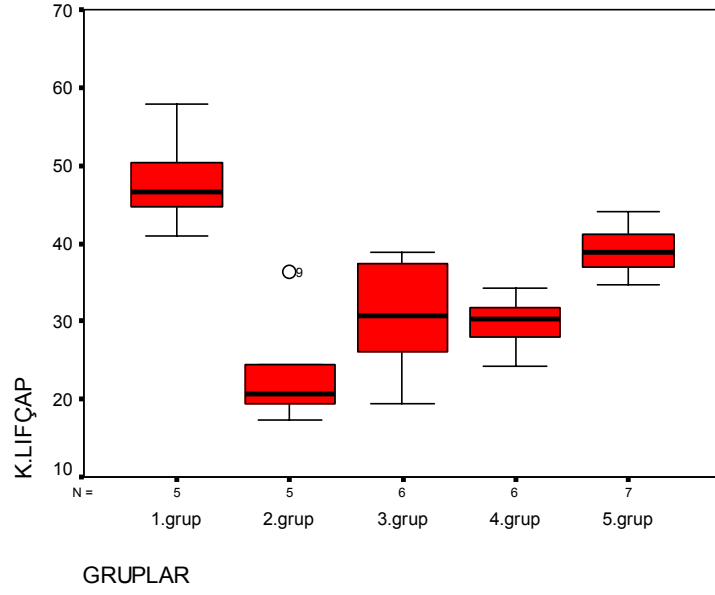
Uç-uca tamir yapılan gruplar

Şekil 29: Gastrokinemus kaslarının mikroskopik görünümü. (Hematoksilen-eozin, gösterge çizelgesi= 100 μ m).

Tablo 4: Gastrokinemus kas lifi ortalama çapları (μ m)

Denek	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	Grup 5
1	50,37	19,47	38,8	27,98	35,82
2	41,04	24,36	--	--	44,02
3	57,83	17,23	33,58	24,25	40,29
4	46,64	36,29	19,40	29,85	42,16
5	44,77	20,56	26,11	31,71	38,80
6			27,98	34,32	34,70
7			37,31	30,59	38,05
Ort\pmSD	48,13\pm6,37	23,58\pm7,56	30,53\pm7,39	29,78\pm3,42	39,12\pm3,32

Ortalama lif çapı açısından kontrol ile Grup 2, 3 ve 4 arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptandı ($p < 0,01$). Buna karşın, değerler daha yakın olarak görülen kontrol ile Grup 5 arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($p > 0,05$). Grup 2 ve 5 ile Grup 4 ve 5 arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($p < 0,01$ ve $p = 0,05$) (**Şekil 30**)



Şekil 30: Ortalama kas lifi çaplarını karşılaştırılması (Mann-Whitney U):

- Grup 1 ile Grup 2, 3,4 arasında istatistiksel olarak anlamlı fark izlendi ($p < 0,01$).
- Grup 2-5 ve Grup 4-5 arasında anlamlı fark saptandı (sırayla $p < 0,01$ ve $p < 0,05$).
- Grup 2-3, 2-4 ve 3-4, 3-5 ve aynı şekilde 1-5 arasında fark saptanmadı ($p > 0,05$).

SİNİRLERİN HİSTOLOJİK DEĞERLENDİRİLMESİ

Makroskopi

Kontrol sol bacak ve kontrol grubunda siyatik sinir trasesi boyunca herhangi bir değişiklik görülmedi. Sağ bacak; yani cerrahi kesi + sütür uygulanan gruplarda ise koaptasyon seviyelerinde dikişler görülebiliyordu ve bir dolgunluk vardı.

Cerrahi yapılan üç grupta ve kontrol bacak ve birinci grupta sinir diseksiyonu keskin diseksiyona gerek olmadan, künt diseksiyon ile kolaylıkla yapılabilir. Sütür hattında, grupların hepsinde siyatığın renk ve konturları normaldi, ayrılma veya nöroma izlenmedi. Cerrahi uygulanan gruplarda anastomoz hattında sinirin çevre dokulara yapışıklık olduğu gözlemlendi.

Epinöral Skar Dokus İndeksi

Toluidin Blue ve H&E ile hazırlanan sinir kesitlerinin, 40x büyütmede incelenmesi ile Grup I'in operasyon yapılmayan kontrol sol baktan alınan örneklerle benzediği görüldü. Koaptasyon yapılan tüm gruplarda kontrol grubuna

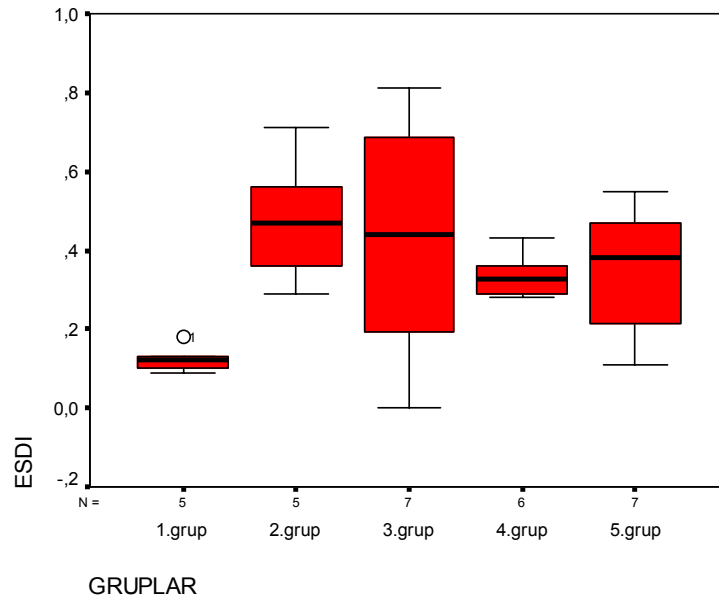
oranla sinir çevresinde belirgin bir kalınlaşma olması önemli bir bulgu idi (Şekil 31).

Epinöral skar doku indeksi (ESDİ);

Grup 1 'de ortalama $0,12 \pm 3,50$, Grup 2'de ortalama $0,47 \pm 0,16$, Grup 3'de ortalama $0,50 \pm 0,27$, Grup 4'de ortalama $0,33 \pm 3,68$, Grup 5'de $0,34 \pm 0,17$ idi (Tablo 5).

Tablo 5: Epinöral skar doku indeksi (μm) değerleri

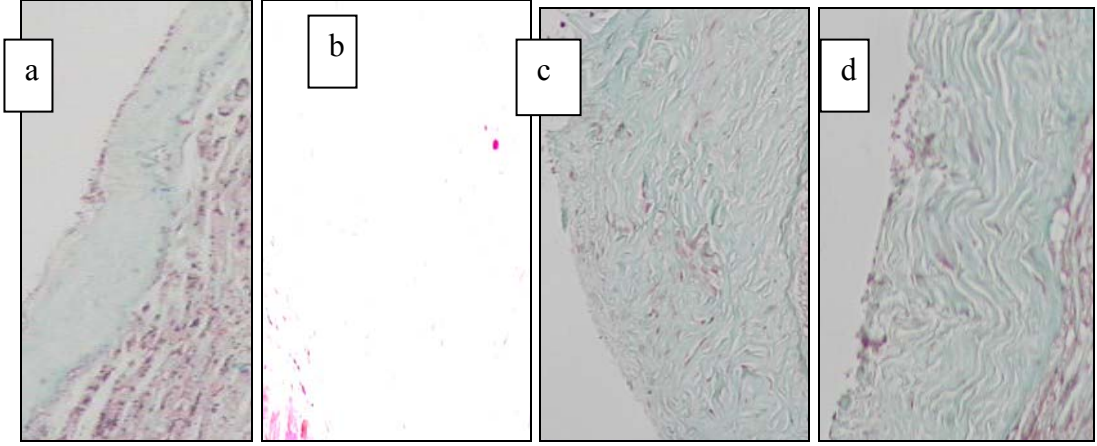
Denek	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	Grup 5
1	0,18	0,47	0,11	0,30	0,38
2	0,12	0,36	--	--	0,12
3	0,13	0,71	0,44	0,28	0,42
4	0,09	0,29	0,81	0,43	0,55
5	0,10	0,56	0,73	0,36	0,11
6			0,28	0,29	0,52
7			0,64	0,35	0,31
Ort±SD	0,12±3,50	0,47±0,16	0,50±0,27	0,33±3,68	0,34±0,17



Şekil 31: Epinöral skar doku indeksi değerlerinin karşılaştırılması (M-Whitney U):

- Grup 1 ve 2 arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p < 0,05$).
- Diğer grup karşılaştırmaları arasında istatistiksel fark bulunamadı ($p > 0,05$).

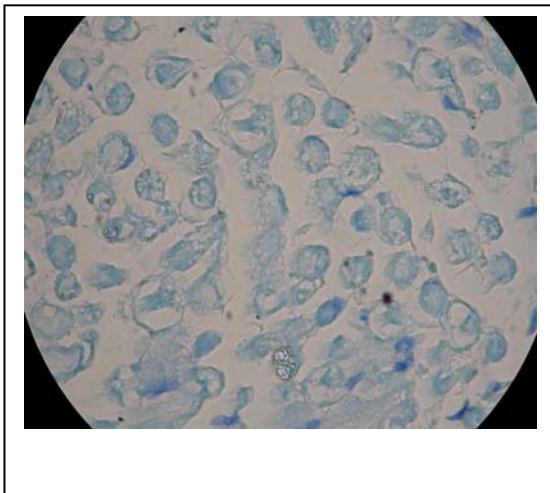
Grupların değerlendirilmesi sonucunda, Grup 1'in ESDİ ortalamasının sinir onarımı uygulanan gruplardan sadece Grup 2'nin ESDİ değerlerine göre anlamlı fark görüldü ($p=0,05$). Grup 1 ve Grup 3, 4, 5 arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($p > 0,05$). Sinir onarımı uygulanan grupların kendi aralarında karşılaştırmalarında ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($p > 0,05$).



Şekil 32: Kontrol bacak ve operatif gruplarda epinöral skar dokusunun değerlendirilmesi. Epinöral skar dokusunun, onarım yapılan gruplar bunlar şekil b,c,d görülmekte, sham kontrol (resim a) grubuna oranla belirgin olarak daha kalın olduğu gözlemlendi (Masson-Trikrom, gösterge çizelgesi=100 µm).

Sinir Rejenerasyonunun Mikroskopik Değerlendirilmesi

Sinir onarımı yapılan gruplar ile kontrol bacak siyatik sinirin karşılaştırılmasında miyelinli akson sayılarının arttığı, Grup 1'in ise aksomal yapılar açısından kontrol bacak siniri ile benzerlik gösterdiği izlendi. Sinir onarımı uygulanan gruplarda koaptasyon distalinden alınan örneklerde bol miktarda rejenerasyon küçük çaplı miyelinli akson gözlemlendi ve aynı aksonların bazılarında miyelin dejenerasyonu dikkati çekmekteydi (Şekil 33).



Şekil 33: Kontrol bacak ve deney gruplarında hazırlanan sinir kesitlerinden aksomal rejenerasyonun değerlendirilmesi (Toluidine Blue).

Sol bacak ile cerrahi uygulanan sinirlerin proksimal ve distallerinden hazırlanan sinir kesitlerinde, toplam miyelinli akson sayısı, miyelinli sinir

liflerin ortalama çapları, ortalama akson çapları, g-oranı değerleri ve ortalama miyelin kalınlıkları hesaplandı.

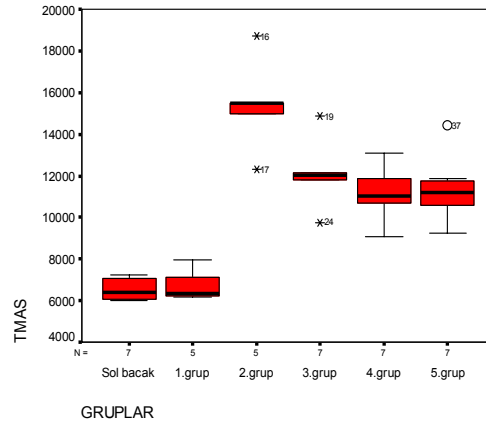
Myelinli Akson Sayısı

Toplam miyelinli akson sayısı (TMAS), 40x büyütme altında; (Tablo 6).

Tablo 6: Kontrol ve deneysel bacaklarda toplam miyelinli akson sayıları

Denek	Sol Bacak	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	Grup 5
Ort±SD	6503±759	6763±760	15285±2825	12115±744	11353±947	11400±973

Sinir onarımı yapılan gruplardaki toplam miyelinli akson sayısı, kontrol bacak ve Grup 1'e oranla belirgin derecede yüksek idi ($p<0,01$). Sol bacak ve Grup 1'den elde edilen sonuçlar Grup 2 ile karşılaştırıldığında ise aralarında anlamlı fark vardı ($p<0,01$). Sinir onarımı ve Epo kullanılan gruplar (Grup 3, 4,5), Grup 2 ile karşılaştırıldığında ise fark anlamlı derecede yüksek idi ($p<0,01$) (Şekil 34).



Şekil 34: Miyelinli akson sayıları açısından grupların karşılaştırılması (M-W U)

- Grup 1 ile sol bacak arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı ($p>0,05$).
- Sol bacak ve Grup 1 ile 2,3,4 ve 5 arasında istatistiksel olarak fark bulundu ($p<0,01$)
- Grup 3, 4 ve 5 arasında istatistiksel olarak fark bulunamadı ($p>0,05$).

Ortalama Miyelinli Sinir Lifi Çapı (OMSLÇ),

Grup 1'de $7,96 \pm 1,58 \mu\text{m}$, Grup 2'de $3,53 \pm 0,87 \mu\text{m}$, Grup 3'de $3,93 \pm 0,74 \mu\text{m}$, Grup 4'de $3,67 \pm 0,83 \mu\text{m}$ ve Grup 5'de $5,16 \pm 1,88 \mu\text{m}$ idi (Tablo 7).

Ortalama Akson Çapı (OAC),

Grup 1'de $4,62 \pm 1,06 \mu\text{m}$, Grup 2'de $2,71 \pm 0,52 \mu\text{m}$, Grup 3'de $2,71 \pm 0,56 \mu\text{m}$, Grup 4'de $2,80 \pm 0,33 \mu\text{m}$ ve Grup 5'de $2,91 \pm 0,87 \mu\text{m}$ idi (Tablo 8).

Ortalama g-oranı Değerleri,

Grup 1'de $0,58 \pm 0,08$, Grup 2'de $0,68 \pm 0,25$, Grup 3'de $0,69 \pm 0,07$, Grup 4'de $0,79 \pm 0,01$ ve Grup 5'de $0,58 \pm 0,08$ idi (Tablo 9).

Tablo 7: Ortalama myelinli sinir lifi çapı (µm)

Denek	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	Grup 5
1	8,97	2,78	2,96	5,26	5,89
2	6,62	3,96	--	--	3,56
3	10,21	2,45	3,23	3,75	7,13
4	7,45	3,96	4,29	3,36	4,29
5	6,58	4,52	4,52	2,96	8,09
6			3,77	3,12	3,72
7			4,85	3,58	3,44
Ort±SD	7,96±1,58	3,53±0,87	3,93±0,74	3,67±0,83	5,16±1,88

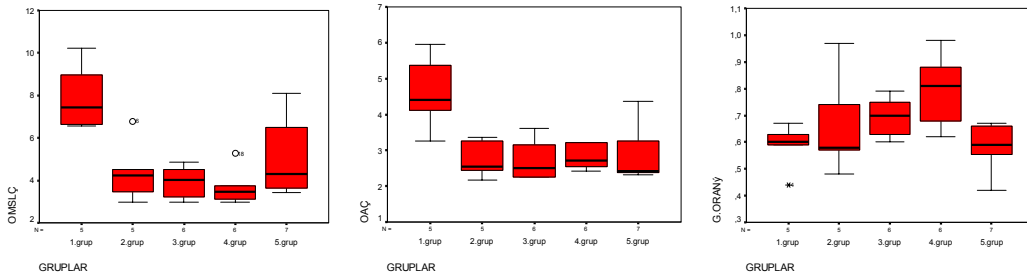
Tablo 8: Ortalama akson çapı (µm)

Denek	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	Grup 5
1	5,37	2,25	2,32	3,21	2,42
2	4,41	3,18	--	--	2,32
3	5,96	2,24	2,25	2,70	3,98
4	3,25	3,36	2,70	2,54	2,52
5	4,11	2,54	3,15	3,22	4,37
6			2,25	2,71	2,42
7			3,62	2,42	2,36
Ort±SD	4,62±1,06	2,71±0,52	2,71±0,56	2,80±0,33	2,91±0,87

Tablo 9: “g-oranı” sonuçları

Denek	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	Grup 5
1	0,60	0,29	0,79	0,62	0,42
2	0,67	0,80	--	--	0,66
3	0,59	0,91	0,70	0,98	0,56
4	0,44	0,84	0,63	0,75	0,59
5	0,63	0,57	0,70	0,87	0,55
6			0,60	0,88	0,66
7			0,75	0,68	0,67
Ort±SD	0,58±0,08	0,68±0,25	0,69±0,07	0,79±0,01	0,58±0,08

OMSLÇ açısından, Grup 1’le karşılaştırıldığında sinir onarımı yapılan Grup 2, 3, 4 ve 5’e oranla anlamlı derecede yüksek idi ($p \leq 0,01$) (Grup 2 için $p=0,004$, Grup 3 için $p=0,001$, Grup 4 için $p=0,0001$, Grup 5 için $p=0,01$). OAÇ açısından, Grup 1’de, Grup 2, 3, 4 ve 5’e oranla anlamlı derecede yüksek idi ($p < 0,01$). Ortalama g-oranı değerlerinde, gruplar arasında fark saptanmadı ($p > 0,05$) (Şekil 35).

**Şekil 35: Miyelinli sinir lifi çapları ve akson çaplarının karşılaştırılması (Mann-Whitney U):**

- OMSLÇ'da Grup 1; Grup 2, 3, 4 ve 5'e oranla anlamlı derecede yüksekti ($p \leq 0,01$).
- OMSLÇ'da Grup 2, 3, 4 ve 5 arasında fark saptanmadı ($p > 0,05$).
- OAÇ'da Grup 1; Grup 2, 3, 4 ve 5'e oranla anlamlı derecede yüksekti ($p < 0,01$).
- OAÇ'da Grup 2, 3, 4 ve 5 arasında fark saptanmadı ($p > 0,05$).
- "g-oranı" değerleri açısından gruplar arası fark bulunamadı ($p > 0,05$)

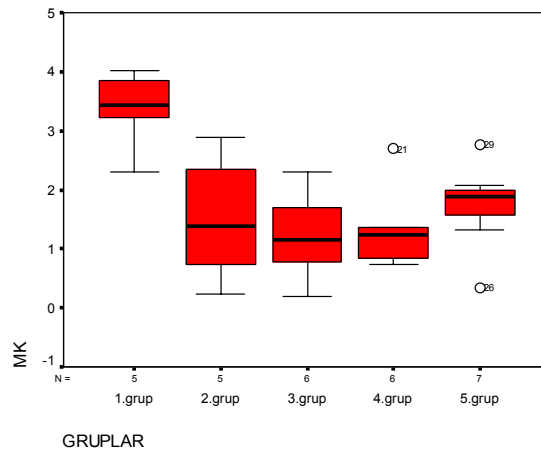
Ortalama miyelin kalınlığı değerleri (MK),

Grup 1'de $3,37 \pm 0,67 \mu\text{m}$, Grup 2'de $1,28 \pm 0,79 \mu\text{m}$, Grup 3'de $1,21 \pm 0,76 \mu\text{m}$, Grup 4'de $1,35 \pm 0,71 \mu\text{m}$ ve Grup 5'de $1,73 \pm 0,74 \mu\text{m}$ idi (Tablo 10).

Tablo 10: Deneysel bacakda ortalama miyelin kalınlığı (μm)

Denek	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	Grup 5
1	3,44	0,73	1,52	1,12	1,32
2	3,86	2,34	--	--	0,34
3	4,02	0,32	0,78	1,37	2,08
4	2,30	1,38	0,80	2,70	1,92
5	3,23	1,67	1,70	0,83	2,77
6			0,19	1,37	1,82
7			2,31	0,73	1,89
Ort±SD	3,37±0,67	1,28±0,79	1,21±0,76	1,35±0,71	1,73±0,74

Elde edilen MK değerlerinin gruplar arasında karşılaştırılmasında Grup 1 ve Grup 2, 3, 4 ve 5 sinir örnekleri arasında fark anlamlıydı ($p \leq 0,01$) (Grup 2 ve Grup 5 için $p=0,01$, Grup 3 için $p=0,002$, Grup 4 için $p=0,003$). Gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında, cerrahi uygulanan deney gruplarındaki miyelin kalınlığı değerleri arasındaki farkların istatistiksel olarak anlam taşımadığı saptandı ($p > 0,05$) (Şekil 36).



Şekil 36: Ortalama miyelin kalınlıklarının karşılaştırılması (Mann-Whitney U):

- Grup 1 ile 2, 3, 4 ve 5 arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p \leq 0,01$).

TARTIŞMA

Teknolojinin gelişmesi insanlığa pek çok avantajlar sunmakla birlikte bir o kadar problemide beraberinde getirmektedir. Çok hızlı ilerleyen teknoloji ve ürünlerini takip etmek son yıllarda nerdeyse mümkün olmamaktadır, bu nedenle amacı kavranmadan günlük hayatta ya da iş ortamın da uygulanmaya çabalanmaktadır. Bunun sonucu olarak da teknoloji ve ürünlerinin kullanımı ile artan kazalar; günümüzde acil servise başvuran travmaların önemli kısmını oluşturmaktadır.

Bu travmaların geniş bir kısmıda periferik sinir yaralanmalarıyla birlikte olmaktadır. Bu travmaların büyük çoğunluğunun nedeni ev ve iş kazalarıdır. Travma dışında cerrahi, traksiyon, çeşitli nedenlerle oluşan kompresyonlar, inflamatuvar durumlar ya da enfeksiyonlar gibi sebeplerlede hasar oluşmaktadır.

70'li yıllarla birlikte sinir yaralanmalarının patofizyolojisi ve tedavisine yönelinmiş ve bu alandaki gelişmelerle birlikte son yıllarda sinir hasarlarının tedavisinde pek çok ajanın denenmesi ile önemli yol kat edilmiştir. Periferik sinir yaralanmalarının tedavisinde ana amaç sinirin bağlantılı olduğu kas, duyu cisimcikleri gibi son organ fonksiyonlarının en az kayıpla yerine konulmasıdır.

Sinirin primer onarımın mümkün olmadığı durumlar dışında, periferik sinir yaralanmalarının tedavisindeki altın standart sinir uçlarının primer olarak koapte edilmesidir. Skar ve fibrotik dokuların eksize edilmesini takiben sinir uçlarının tazelenerek gerginlik olmaksızın bir araya getirilmesidir primer onarım. Primer sinir onarımlarında tedavi için gerekli tüm şartların uygun olarak yerine getirilmesi öngörülen fonksiyonel iyileşmenin kazanılması için yeterli olmayabilir. Periferik sinirde hasar sonrası oluşan sinir hücresi ölümü, yetersiz ve uygun olmayan doğrultuda büyüyen aksonlar, cerrahi uygulanan bölgede gelişecek epinöral skar dokusu ve denervasyon süresinde meydana gelen son organ atrofisi cerrahideki başarısızlığın esas nedenleri sayılabilir.

Skar dokusu ektranöral ya da intranöral olsun sinirin mikrovasküler yatağını etkileyerek sekonder aksonal dejenerasyona yol açmaktadır (160).

Fu ve ark. bildirdiğine göre, aksotomize nöronların apopitozis ile öldüklerini, apopitozun karakteristik morfolojik değişiklikleri ile birlikte sonuçta DNA fragmentasyonunun gerçekleştiğini Lo ve ark. göstermişlerdir (161).

Fuminori ve ark., rejenere olmuş çok sayıda akson bulunmasına rağmen hedef organın uygun olmaması nedeniyle, miyelinizasyonun akson hedef organa ulaşmadan meydana geldiğini, yani hedef organ cevabı oluşmadığını; akson çapı değerinin ise sinirin kaynaklandığı yere bağlı olduğunu belirtmişlerdir (162).

Bu nedenlere bağlı olarak akson sayısı ve lif çapı değerlerinin aksonal matürasyon ile alakalı olduğu gösterilmiş, akson sayısı değerinin anlamlı olabilmesi için fonksiyonel değerlendirmede *altın standart* olarak kabul edilen **Siyatik Fonksiyon İndeksi** ile korele olması gerektiği vurgulanmıştır. Bu parametrelerin fonksiyon ile ilişkili olabilmesi için uygun hedef organ ve santral sinir sistemi ile integrasyonuna ihtiyaç olduğu bilinmektedir (162).

Yapılan çalışmalarda hasar sonrası sinir tamirinde zamanlama (primere karşı sekonder) sorusu; sinir hücresi içindeki metabolik değişikliklere göre cevaplanabilmektedir. Sinir hasarı sonrası sinir hücresi içinde optimal metabolik potansiyelin iki haftadan üç haftaya kadar uzadığını düşündürmektedir (163).

Deneysel ve klinik çalışmalarda görüldüğü üzere ve bunun birlikte klinik olarak hiç bir bilgi primer gecikmiş onarımın, primer erken onarıma göre avantajlı olduğunu göstermemiştir (163).

Urabe ve ark.'nın yaptığı çalışma kesiye uğrayan periferik sinir tamirinin zamanlaması için oluşturulan modeldir, bu çalışma sonucunda; rejenerasyon üzerine en iyi sonuçların sinir kesisi sonrası 1. ve 3. gün tamir edilen sıçanlarda görüldüğünü bildirilmiştir. 1. gün sütürasyon yapılan sıçanlarda epinöral skar dokusunun, 3. gün

sütüre edilen gruba göre daha az olduğu görülmüştür. 3. gün sütüre edilen grupta, 2. operasyonda kesiye uğratılan sinir etrafında olan adezyon nedeniyle siniri disseke edip, taze uçların bulunması esnasında mikroskopi altında disseksiyon yapılsada sinirin etkilendiği düşünülmektedir. Yapılan manüplasyonlar sonucu zaten var olan inflamatuvar yanıtın tekrar tetiklenerek, skar formasyonun 1. gün sütünasyon grubuna göre 3. gün sütün grubunda daha fazla geliştiği saptanmıştır. 1. ve 3.gün gruplar karşılaştırıldığında 1. gün sütünasyon gruplarında daha iyi sonuçlar bulunmuş ama bunula birlikte aksonal iyileşme için kritik kabul edilen ilk 3 günlük süreçte SFİ, aksonal organizasyon, lif çapı ve akson sayısı yönünden istatistiksel olarak fark olmadığı saptanmıştır (164).

Sonraki günlerde ise kesilen sinirlerin uçlarının identifiye edilmesi, siniri çevreleyen dokularda oluşan skar dokusu nedeniyle güçleşmektedir. 10.günden sonra sinir uçlarının bulunup sütüre edilmesi ile sinirde gerginlik, hem tamir bölgesinde hem de sinir gövdesinde dolaşım bozukluğuna ve/veya aynı zamanda sütünasyon sonrası gerginlik nedeniyle iki sinir ucunun ayrılmasına yol açmaktadır (164).

Uç-uca anastomozun gerilimsiz olmasının aksonal aktivite üzerindeki önemi ve olumlu etkileri çalışmalarda kanıtlanmıştır (165). Sinir kesisi sonrası 14-28. günler arasında ve sonrasında ise sinir grefti gerekmektedir (165). Fakat sinir greftinin; rejenerasyon olan aksonun iki sütün hattını geçmesi gerekliliği, donör ve alıcı arasında fasiküler paternin değişiklik göstermesi, uzayan operasyon süresi, skar dokusu riski, sensoriyal kayıp veya donör de nöroma formasyonu gibi potansiyel dezavantajlarının olması nedeniyle mutlaka her sinir hasarında kullanılması önerilmemekte ve sinirler arası boşluk küçükse (6-9 mm) primer sütünasyon önerilmektedir (166).

Nachemson ve ark. bildirdiğine göre Abaercrombie ve ark., kesiye uğramış sinirin distalinde artan kollajen formasyonu ve miyelo fibrozisin, denerve olmuş sinirde geç sinir onarımındaki kötü sonuçların nedeni olduğunu düşünmektedir (167).

Kesi olan bölgede dikkate değer ölçüde hem intra hem de ekstra nöral

fibrozis görülmektedir. Klinik deneyimlerle sekonder vakalarda fibrotik sinir segmentinin, sinir uçlarının görülüp fasiküler paternin identifiye edilene kadar hasar görmüş bölgeden diseke edilmesi gerekmektedir (167).

Periferik sinir yaralanmalarının tedavisinde primer sinir anastomozu hala altın standarttır ve şartların uygun olması durumunda öncelikle tercih edilecek yöntemlerin başında gelmektedir. Bu nedenle de çalışmamızda primer sinir anastomoz modeli kullanılmıştır ve Epo'nun etkisi farklı formları karşılaştırılarak yapılan primer onarımlar üzerinde araştırılmıştır.

Periferik sinir tamirinden sonra oluşacak skar dokusu azaltmak için kullanılacak ajanın bazı özellikleri olması gerekmektedir:

1. Kolay bulunabilir olması,
2. Kullanıldığı dozlarıyla ve de uygulama şekli ile (sistemik ya da topikal) ajanın diğer dokulara toksisitesinin olmaması,
3. Hem nöronkoruyucu etki de, hem de nörotrofik etki de olmasıyla sinir iyileşmesini hızlandırması,
4. İmmun cevabı azaltarak inflasyonu önlemeli ve apoptozise engel olmalı, yani sinir dokusunun iyileşmesi esnasında oluşabilecek skar dokusunu minimuma indirebilmesi gerekmektedir.

Bu alanda en fazla çalışmada yer alan Epo'nin bu özelliklere sahip olduğu görülmüş ve etkinliğinin tartışmasız olduğu kanısına varılmıştır (36, 37, 38, 39, 41, 43, 45). Artık yapılan çalışmalar Epo'nun uygun veriliş süresi, etkin uygulama yolları ve yeterli doz çalışmalarına yoğunlaşmıştır. Bu konudada önemli aşamalar kaydedilmiştir (37, 38).

Epo, gen aracılığı ile üretilen 193 aminoasitlik bir proteindir ve hücrelerden salgılanma öncesinde N terminalinden 23 aminoasitlik bir rezidüel bölümü ayrılarak periferik kana verilir (108). Eritropoetin, esas olarak böbreklerden salgılanan glikoprotein yapısında bir hormondur (104). %30 ile %49 oranında karbonhidrat ihtiva etmektedir. Bu karbonhidratın %11'ini sialik asit, %11'ini heksoz ve %8'ini N-

asetilglukozamin'in oluşturduğu bildirilmektedir (106).

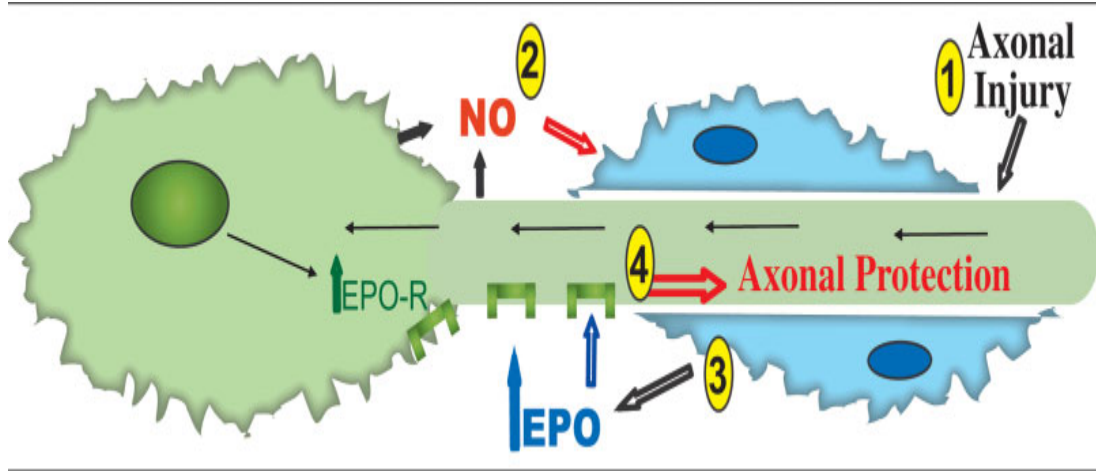
Son günlerde yapılan hem in vivo, hem de in vitro çalışmalarda SSS ve PSS'de Epo aktivitesi gösterilmiştir (38, 36, 37); SSS'de astrositler tarafından endojen Epo üretiminin önceden oluşan iskemik olay aracılığıyla olduğu düşünülmektedir. şöyle ki; SSS'de hipoksi, hipoglisemi, glutamat toksisitesi, büyüme faktörü yokluğu, serbest radikal hasarının neden olduğu nöronal ölümden Epo tedavisi korumaktadır, yine saf SC hücre kültürlerine nöronal hasar sonucu NO oluşmadığı için Epo indüksiyonu bulunmamıştır. Schwann hücreleri aksonların kesisinden çok uzaktaysa ve ya kesilmemiş aksonlarla ilişkili Schwann hücrelerinde Epo üretiminin up regülasyonu olmamaktadır (38).

Keswani ve ark. yaptıkları çalışmada, duyu aksonları ve PSS'in majör gilyal hücreleri Schwann hücreleri arasında etkileşimi sorgulayarak; Schwann hücre kaynaklı-Epo salgılayan endojen “aksonkoruyucu” yeni bir ara yol gösterdiler (38).

Önceleri yapılan Campana ve Myers (2003) alışmasında Epo verilmesinin DRG (Dorsal kök gangliyonu) duyu nöronlarının apoptozisini önlediğini kanıtladı. Bununla birlikte aksonal dejenerasyonu nleyici Epo etkisi henüz keşfedilmemişti. Çeşitli nedenlerle oluşan aksonal hasar yakınındaki SC hücrelerinden Epo üretimini uyarmakta, nöronlardaki EpoR bağlayan yolla axonal bozulmayı önlemekte olduğunu gösterdiler (38).

NO'in hem nörotoksik ve hemde nöronkoruyucu çift etkisi literatürde biliniyordu. NO aracılı nrotoksitesini yıllarca çeşitli gruplarca araştırdı, buna rağmen NO aracılı nronkoruyuculuğu yetersiz biliniyordu. Keswani ve ark., gp120 ile yapılan aksonal dejenerasyonu, ortama verilen nNOS inhibisyonu ile ktleştirildi yani dejenerasyonu nledi. Bu veride aksonal hasara cevaben SC kaynaklı Epo retiminin TRIM tarafından önlenmesi ile koreledir. Bu tartışmadaki ile uyuşan; Keilhoff ve kolejindeki bir çalışmada, nNOS ile sersemletilen fare, yabani fareler ile karşılaştırıldığında siyatik sinire işlemi takiben aksonal dejenerasyoun kötüleştirdiği görüldü (38, 126).

Etidyum homodimer (yarada hem apoptotik hemde nekrotik ölümü gösterir) boyası ile dejenerasyonla beraber nöronal ölüme artış olmadığı gösterildi ve Epo/EpoR antagonizmasının artırdığı aksonal dejenerasyonun nöronal ölüme neden olmadığı gösterildi. Schwann hücre kaynaklı Epo'nun endojen aksonkoruyuculuğu örnek şekilde izlenmektedir (Şekil 37) (38).



Şekil 37: Epo'nun aracılığıyla oluşan aksonkoruyucu yol (Keswani SC. Buldanlioğlu U. Novel Endogenous Erythropoietin Mediated Pathway Prevents Axonal Degeneration; Ann Neurol; 2004; 56 : 815–826).

Önceleri Epo'nun hematopoetik sistem hücrelerindeki reseptörlere spesifik olarak bağlandığı düşünülürken (135), epitelyal hücrelerde (136, 137), nöral orijinli hücrelerde de Epo reseptörleri bulunduğu bildirilmiştir (138, 38) ve ratlarda hipokampusta ve primer hipokampal nöron kültürlerinde EpoR'lerinin varlığı da gösterilmiştir (139, 140).

Glikoprotein yapıdaki Epo ve onun reseptörü EpoR, hem SSS, hem de PSS salınır (38). Campana ve Myers Epo'nun ratların dorsal kök normal ganglionlarının gövde ve aksonlarında üretildiğini ve periferik sinir hasarı sonrasında (chronic constriction injury=CCI) SC'de Epo seviyelerinin arttığını gördüler. Epo'nun nöron koruyucu etkisinin insulin-like growth factor I (IGF-I)'in etkisi ile sinerjik olduğu görüldü. Bu sinerjik etki ise phosphatidylinositol 3 kinase (PI3-K) üzerinden

olmaktadır ve p85 reglutar subunitin fosforilasyonu ile PI3-K'ün katalitik bölümü ayrılarak PI3-K aktive olur kombine etli görülür. Epo ve IGF-I'in kombine etkisi için gerekli dozun, her bir sitokin için gerekenden dozdan daha düşük olduğu gösterildi (41, 38).

Siyatik sinir nöronal mRNA içermez (Pss nöronal hücre gövdesinde yoktur), muhtemelen SC'de Epo mRNA yapımında artma nöronlardan nadir olacaktır. Bu durum Campana ve arkadaşlarının (2001) çalışması ile koreledir; in vivo aksotomiden sonra Pss SC'de Epo immunboyanmasında artma gördüler. İlginçtir ki çalışmada; kesi alanından DRG de EpoR mRNA seviyelerindeki artma, nöronal EpoR arttığı fikrini verdi. Bu korelasyonu, in vitro kültürlerde aksotomiden sonra nöronal EpoR immunboyanma şiddetinde artma şeklinde görmüşler (139, 125, 139).

rhEpo klinik uygulamada kullanılan bir çok formu mevcut ve bu formların klinik çalışmalarla birbiriyle karşılaştırıldıklarında, etkilerinin farklı yarılanma ömürleri, süreleri ve etkinliklere sahip olduğu görülmüştür. Bizde bu çalışmamızda; klinkte pek çok nörolojik(152, 127) ve kardiyolik hastalıkta(141) ve deneysel olarak periferik sinir hasarlarında(36, 38) etkinliği gösterilmiş üç değişik rhEpo formunu karşılaştırdık.

- Epoetin Alfa (Ep- α) (Eprex® 2000, Cilag AG. International Zug, İsviçre)
- Epoetin Beta (Ep- β) (NeoRecormon® 2000, F.Hoffmann-La Roche Ltd.,Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Almanya)
- Darbepoetin Alfa (Dp- α) (Aranesp® Amgen Europe B.V., The Netherlands)

r-hEpo'nun Dp- α formu uzun etkidir ve plazma yarılanma ömrü 24 saattir, o nedenle klinik uygulamalarda dozu (diğer formların %40'ı) azaltılarak verilir (135).

Ep- β formu Ep- α 'dan daha uzun etkidir ve plazma yarılanma ömrü 16 saattir, Ep- α 'nın plazma yarılanma ömrü 12 saattir (135, 147).

Ortalama Sc verilen dozun sadece %25'i absorbe olur. Sc uygulama, iv. ve ip. uygulamadan daha etkindir (137, 138). Ancak farelere haftada 3 kez ip. olarak Epo enjekte edildiğinde hematokrit cevabının fazla olduğu tespit edilmiştir (148). Epo'nun ip. olarak ratlarda efektif kullanılabileceğine dair yayınlar vardır (149).

Epo, kemik iliğinde eritroid progenitör hücreleri uyaran ve eritrositlerin diferansiyasyonunu sağlayan bir hematopoetik büyüme faktörüdür (168). Temel olarak böbrek ve karaciğerden salgılanan, glikoprotein yapısında olan bir hormondur (104). Sentezlenmesi sürekli ve vücutta depo formu yoktur. Eritroid prokürsör hücre yüzeylerindeki reseptörlerine (EpoR) bağlanarak, onları apoptozise karşı korur ve proliferasyon ve diferansiyasyon için uyarır (111, 169).

Epo, hipoksiye yanıt olarak sentezlenir ve hormonun birikimi olmaması nedeniyle gerekli miktarı plazmada ve sadece biyolojik olarak aktif formda bulunur. Dolaşımdaki Epo seviyesinin artmasının, bu hormonun üretimi üzerine negatif etkisi bulunmamaktadır (118).

Epo'nun en sık kullanım alanı kronik böbrek yetmezliğine bağlı anemi ve prematüre anemisidir. EPO; diyaliz hastalarında eritropoezisi düzenlemek amacıyla kullanılan nöroprotektif etkisi yeni keşfedilmiş bir glikoproteindir. EPO'nun anjiogenezisi arttırarak ve apoptozisi önleyerek kanser oluşumunu indüklediğini veya varolan tümörün gelişimine sebep olduğunu bildiren çalışmalar bulunmaktadır. Bununla birlikte kanser ve hemodiyaliz hastalarında yaşam kalitesini arttırmak amacıyla kullanılan elzem bir moleküldür (170).

Ayrıca, renal fonksiyonlan normal olan anemiler, romatoid artrit, orak hücreli anemi, multiple myeloma, hemolitik anemi, myelodisplazi, kemoterapiye bağlı anemiler, aplastik anemi, hematolojik malignensiler ve kazanılmış immun yetmezlik sendromu diğer kullanım alanlarıdır (171).

Nöronlarda Epo reseptörlerinin varlığı belirlendi, ve nöron koruyucu etkisi son yıllarda keşfedildi; Epo'nun çok az bir kısmı (%1) kan beyin bariyerini

geçebilmesi sebebiyle nöroprotektif etkisinin gözlenebilmesi için yüksek dozda kullanılması gerekliliği gözlenmiştir. 1000-5000 U/kg'a kadar kullanıldığı çalışmalar mevcuttur (172, 170).

Yapılan çalışmalarda antiapoptotik, antioksidan, antiinflamatuvar, kalsiyum ve glutamat metabolizmaları üzerine modüle edici etkileri bulunmuştur (173, 170).

Bu konuda yapılan literatür taramasında EPO'nun hipoksi, etanol kullanımı, Parkinson, spinal kord travması, NO hasarı, subarachnoid hemoraji, glutamat toksisitesi gibi durumlarda antioksidan ve nöroprotektif etki gösterdiği bulunmuştur (173, 174).

Epo üretimini etkileyen farmakolojik ajanların rhEpo'yla beraber kullanımında ki etkileri elde edilmekle birlikte, sonuçların kesinleşmesi açısından araştırmalar hala devam etmektedir.

Epo'nun aksonkoruyucu etkisi, nöron besleyici etkisi, nöron stimüle etkisi ile antiapoptotik etkileri kombine oluşur (39). Hipoksiyle artan glutamat toksisitesi hipoksi bağlı sinir hücre ölümüne neden olur ve bundan sinir hücrelerini Epo'nun koruduğu in vitro gösterilmiştir (154, 155).

Spinal kordun akut travmaları sonrası Epo ve Metilprednisolon karşılaştırıldığı Fumagalli ve ark. (2008) en yeni çalışmasında. Spinal kordun akut travmasından sonraki 3 h de travma merkezinde NGF mRNA seviyeleri incelendiğinde Epo'nun salınımı artırdığını, Metilprednisolon'un ise azalttığını göstermişler. 3. gün hem kaudal hem de rostral lezyon alanlarında Epo'nun NGF mRNA salınımı anlamlı olarak artırdığı gösterilmiş. Nörotrofin (NGF) gibi uygun kemoatraktanlar esas olarak hasarlı aksonun büyümesini kolaylaştırmakta ve NGF'den zengin alana doğru rejenerasyonun ilerlemesini yükseltmeye katkıda bulunmaktadır. 7. gün hem Epo'nun hem de Metilprednisolon'un NGF mRNA seviyelerini artırdığı görülmüş ve iki ilaç arasındaki fark giderilmiş (39).

Gordon ve ark. (2003) sonuçları değerlendirdiklerinde; nörotrofik faktörler (Brain-derived neurotrophic factor=) BDNF gibi; uzamış aksotominin negatif etkilerine karşı koyarak, aksonların rejenerasyon kapasitesini yönetmektedir. Düşük doz BDNF aksonal dejenerasyonun etkinliğini artırmaktadır (156).

Yüksek doz BDNF p75 reseptörü ile etkileşerek aksonal dejenerasyonu inhibe eden ve ayrıca iskelet kasında nöromusküler bağlantıları biçimlendiren aksonal rejenerasyonu durduran bir faktör olabilmektedir (156).

Sitokinler (İmmunofilin ligand ve FK506) ; kronik denerve SC'nin aksonal rejenerasyonu destekleme kapasitesini artırdığını. Kısa süreli elektrik stimülasyonunun; hasarlı sinirlerin cerrahi tamirinden sonra sütür alanında karşı tarafa doğru aksonal büyümeyi hızlandırarak iyileşmeyi artırdığını görmüşler. Aynı zamanda makrofaj/ SC etkileşiminin eksojen sitokinler gibi davrandıklarını göstermişlerdir. Uzun zaman denerve SC lerinin aksonal büyüme desteği azalmaktadır, ilk 3 aydan sonra p75 reseptörünün hızlıca azalmakta olduğu gösterilmiştir (156).

Yapılan çalışmaların sonucunda kazanılan bilimsel gerçeklikler, bu konuda klinik beklentilerin artmasına neden olmuştur. Bu çalışmalar ve bizim çalışmamızın gelecekteki periferik sinir hasarının rejenerasyonu tedavisine yönelik çalışmalara ışık tutacağını düşünüyoruz. Çalışmamızın sonuçlarını aşağıda değerlendirdik.

Periferik sinir rejenerasyonunun değerlendirilmesinde elektrofizyolojik, morfolojik ve histolojik çalışmalar yapılmıştır. Bunlar içerisinde 1982 yılında Medinaceli tarafından tanımlanmış olan ve daha sonra Bain, Mackinnon ve Hunter tarafından değiştirilen yürüme analizi, eski olmasına rağmen popülerliğini hiç kaybetmeyen bir yöntemdir (159, 175).

Fonksiyonel iyileşmenin değerlendirilmesi için sıkça kullanılan yürüme analizi, doğru, güvenilir ve tekrarlanabilir bir değerlendirme yöntemi olarak geniş kabul görmektedir. Buna rağmen ratların total paralizi olan ekstremitelerini ısırma

sonucu gelişen otomutilasyon değerlendirme aşamasında güçlük yaratmaktadır.

Bizim çalışmamızda da fonksiyonel iyileşmenin değerlendirilmesi amacıyla yürüme analizleri yapılmış fakat sadece iki hayvanda distal tek parmak uç otomutilasyon gelişmiş ve SFI'nin değerlendirilmesi mümkün olmayacak düzeyde otomutilasyon gelişmesi olmamıştır. Yapılan SFI ölçümlerinde sham kontrol grubuna ait değerlerin, diğer deney gruplarından belirgin derecede yüksek olduğu ($p<0,01$), fakat Dp- α kullanılan Grup 5 ile arasında istatistiksel fark bulunamadı ($p>0,05$).

Buna karşın sinir koaptasyonu uygulanan grupların kendi aralarında karşılaştırılmasında ise yalnızca Grup 2-5 ve 3-5 arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür ($p=0,05$ ve $p<0,01$). Deney grupları Grup 2, 3, 4 arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmedi ($p>0,05$). SFI güvenilir sonuçları ile kullanılan Dp- α formülünün diğer Epo formüllerinden daha etkili olduğu, Grup 1'e en yakın sonuçları ile gösterilmiştir.

Kullanılan parametrelerden en değerlisi olan SFI'nin Grup 5'in başarılı olduğunu göstermesi gerçekten önemli ve şaşırtıcı bir sonuç olup diğer parametrelerle paralellik gösterir ise spesifitesini artacağı literatürde özellikle belirtilmiştir.

Periferik sinir rejenerasyonunun elektromiyografi ile değerlendirilmesi çok önemli veriler elde edilen bir inceleme yöntemidir. Kas liflerinden geçen aksiyon potansiyelinin oluşturduğu elektrik sinyallerinin bir amplikatör aracılığı ile büyütülerek incelenmesi esasına dayanan bu yöntem, klinikte bir çok sinir ve kas hastalığının teşhis edilmesinde kullanılmaktadır. İnceleme sonucunda elde edilen temel değerler oluşturulan bileşik kas aksiyon potansiyelinin latans, amplitüd ve alan değerleridir. Bunlardan amplitüd, aktif kas liflerinin elektroda ulaşabilen depolarizasyon değeridir ve uyarılan en geniş motor ünite ile ilgili bilgi verir (176).

Bu nedenle amplitüd değeri görüldüğü gibi doğrudan aktif nöron sayısı ile ilişkilidir. Latans değeri ise uyarım ile kasılma potansiyelinin başlaması arasında

geçen zamandır ve miyelinizasyon için önemli bir gösterge olarak kabul edilmektedir. Latans ile myelinize lifler paralellik göstermektedir. Bileşik kas aksiyon potansiyelinin süresi ve amplitüdün çarpımı da, alan ölçümü olarak değerlendirilen bir diğer parametredir ve alan ölçümü geniş bir bölgede yayılmış olan liflerin aktivitesi hakkında bilgi verdiğiinden değerlidir (177).

Bizim çalışmamızdan elde edilen sonuçlar içerisinde cerrahi deney grupları arasında latans, amplitüd ve alan ölçümü açısından fark saptanmamıştır ($p>0,05$). Latans ve amplitüd değerleri açısından sham kontrol grubu ile cerrahi kontrol grubu ve Ep- α kullanılan Grup 3 karşılaştırıldığında latans değerinin belirgin derecede kısa olduğu ($p<0,05$, $p=0,01$), aynı şekilde aktif nöron sayısının fazla olduğu saptanmıştır ($p<0,05$, $p=0,01$).

Yine elde edilen latans ve amplitüd değerleri açısından sham kontrol grubu ile Ep- β ve Dp- α kullanılan Grup 4 ve 5 karşılaştırılırsa sonuçlar arasında anlamlı farkın olmadığı ($p>0,05$) dikkat çekmiştir. Ancak sham kontrol grubu ile Ep- β kullanılan Grup 4'ün kasılma eğrisi alan oranları değerlendirildiğinde anlamlı bir fark saptanmıştır ($p<0,05$). EMG ile elde edilen latans, amplitüd ve alan ölçüm değerleri Grup 1 ve 5'de diğer gruplara nazaran birbirine daha yakın olduğu ve aralarında istatistiksel bir fark olmayışı bize Dp- α kullanılmasının olumlu sonuçlarını göstermiştir.

Hedef kas dokusunda meydana gelen denervasyon ve bunu takip eden reinnervasyon sürecinden sonra yapısal değişikliklerin incelenmesi, periferik sinir rejenerasyonun değerlendirilmesinde sıkça kullanılan bir diğer yöntemdir. Siyatik sinir ile innerve olan gastrokinemus kasında gözlenen yapısal değişiklikler incelenmiş ve gruplar arasında makroskobik, mikroskobik ve histomorfometrik değerlendirilme parametreleri açısından fark aranmıştır.

Sinir onarımı yapılan tüm grupların kendi aralarında karşılaştırılmasında, makroskobik olarak Grup 2'den alınan kas örneklerinin daha atrofik görünümde olduğu ama kas ağılıkları ve histomorfometrik değerlendirmeler açısından aralarında

istatistiksel fark olmadığı ($p>0,05$) ve sham grubu ile Grup 2 arasında anlamlı fark olduğu ($p<0,05$); mikroskopik inceleme de ise cerrahi yapılan gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı saptanmıştır ($p>0,05$). Kas lifi çapını yansıtan parametreler açısından cerrahi uygulanan deney gruplarının sham kontrol grubundan anlamlı derecede farklı olduğu saptanmıştır.

Cerrahi uygulanmayan sham kontrol grubu ile cerrahi gruplar arasında anlamlı istatistiksel fark olması hedef organ olan kas dokusundaki yetersizliği gösterir ki; Fuminori ve ark. vurduladığı gibi sinir regenerasyonunu gösteren parametrelerle ile fonksiyonun ilişkili olabilmesi için uygun hedef organ ve santral sinir sistemi ile integrasyonuna gerekliliğini göstermiştir.

Cerrahi uygulanmasından sonra oluşacak skar dokusunu azaltmaya yönelik girişimlerin sinir rejenerasyonunu geliştireceğine inanan bir çok araştırmacı, epinöral skar dokusunun aksonal büyümeye engel olması yanında sinirin çevre dokulara yapışmasına ve hareketliliğini kaybetmesine neden olduğunu, bunun da traksiyon yaralanması ve iskemiye zemin hazırladığını belirtmektedirler (33).

Araştırmacılar sinir çevresinde oluşan skarın yalnızca iyileşmenin erken dönemlerini etkilediğini ve rejenerasyonun önemli bir kısmının skar dokusu oluşmadan tamamlandığını belirtmişlerdir. Bu nedenlerden ötürü çalışmamızda sinir çevresinde oluşan epinöral skar dokusunun ve bunun aksonal rejenerasyona etkisinin değerlendirilmesi de amaçlandı.

Daha önce yapılmış olan çalışmalar sinir onarımı sonrasında epinöral skar dokusunun oluşması için 6 haftalık bir sürenin yeterli olduğuna, fonksiyonel iyileşmenin değerlendirilmesi için ise 3 aylık bir iyileşme dönemine gereksinim olduğuna dikkat çekmektedir (9). Bu nedenle bizim çalışmamızda da değerlendirme için 90 gün beklenmiştir.

Tüm gruplarda cilt insizyonlarının sorunsuz olarak iyileştiği ve ciltte ya da kasta ayrılma olmadığı gözlenmiştir. Sinirlerin diseksiyonu için keskin diseksiyona

gereksinim olmadı ve künt diseksiyon ile sinir izolasyonu yapılabilmiştir. Epinöral skar dokusunun(ESDİ) değerlendirilmesi sonucu, sinir onarımı yapılan tüm grupların sham kontrol grubundan belirgin olarak fazla skar oluşunu gösterdiği saptanmıştır ama kendi aralarında istatistiksel olarak fark anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$).

Burada da Epo kullanılan cerrahi gruplardaki değerlerin Grup 1'e yakın olması ve farkın istatistiksel olarak anlamlı olmaması, Epo kullanılmayan Grup 2 ile Grup 1 arasında istatistiksel olarak da fark olması bize Epo'nun epinöral skar doku oluşumunu daha az oluşturduğunu düşündürtmektedir.

Sinir dokusunun histolojik incelemeleri sonucunda anastomoz distalinden yapılan kesitlerin 6 farklı alanında ve mikroskopun x40 büyütmesi altında her alanın aritmetik ortalaması alınarak elde edilen ortalama sinir lifi apı(OMSL), ortalama miyelin kalınlığı(MK), ortalama akson apı(OA) ve ortalama g-oran değerleri ölçülmüştür.

DeneySEL gruplar karşılaştırıldığında onarım yapılan gruplar ve Grup 1 arasında ortalama miyelin kalınlığı, ortalama miyelinli sinir lifi çapı ve ortalama akson çapı değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($p\leq 0,01$). Ama cerrahi yapılan grupların kendi aralarında karşılaştırılması sonucunda istatistiksel olarak anlamlı fark olmamıştır.

Fuminori ve ark. vurguladığı gibi sinir rejenerasyonunu gösteren parametreler olan SFI değeri ve akson çapı ve kas lifi çapı değerlerinin birbirine paralel olması elde edilen sonuçları daha da değerli kılmaktadır. SFI değerleri açısından cerrahi gruplardan Grup 5 , sham kontrol grubu karşılaştırıldığında diğer cerrahi gruplardan farklı olarak çok yakın değerlere sahipti ve istatistiksel olarak anlamlıydı; akson çapı ve kas lifi çapı değerlerinin fakat fonksiyonun ilişkili olabilmesi için uygun hedef organ ve santral sinir sistemi ile integrasyonuna gerekliliğini göstermiştir.

“g-oranı” akson çapının sinir lifi çapına oranlanması ile elde edilen ve rejenerasyon olan sinir liflerinin matürasyonunu gösteren önemli bir parametredir.

Akson çapı ve sinir lifi çapı ortalamaları açısından Grup 1 ile diğer gruplar arasında fark bulunmuş ama aksion çapı ve sinir lifi çapı oranlaması ile elde edilen “g-oranı” değerlendirilmesinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür genel değerlendirme açısından göz ardı edilmiştir ve matematiksel sonuç olarak değerlendirilmiştir.

Sonuçlarda “g-oranı” değerleri açısından deneysel gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı için dataylı değerlendirilmemiştir ($p>0,05$). Ama Grup 1 ile 5 deki değerlerin tabloda da görüldüğü gibi yakın olduğu Grup 1 deki değerlerin diğer gruplarla belirgin farklı olduğu ama istatistiksel olarak hiçbirinin anlamlı olmayıp, Grup 4 ile 5 arasındaki farkın anlamlı olması açıklanamamıştır.

Toplam myelinli aksion sayısı(TMAS) sonuçları tek tek myelinli aksionların 40x büyütmede altı alandan sayılması ve literatürde kullanılan formül ile elde edilmiştir ve literatürde de göreceli spesifitesi düşük bir parametere olarak gösterilmektedir. TMAS sonuçları karşılaştırıldığında kontrol bacak olan sol bacak ve sham kontrol grubunda değerler benzerdi diğer cerrahi uygulanan gruplarda ise kendi aralarında benzerdi ve cerrahi yapılanlarda beklenildiği gibi daha yüksekti, istatistiksel olarak değerlendirme yapıldığında tüm gruplar arasında anlamlı bir fark olduğu görüldü ($p<0,05$).

Sinir onarımı yapılan tüm grupların kendi aralarında karşılaştırılmasında, Grup 2 ile 3, 4 ve 5 arasında istatistiksel fark olduğu ($p<0,05$) ama Epo uygulanan grupların (Grup 3, 4 ve 5) kendi aralarında fark olmadığı saptanmıştır ($p>0,05$). Bu sonuçta bize ve Epo'nun sinir iyileşmesi yönünde olumlu etkisini göstermiştir. Aynı şekilde sham grubu ile kontrol sol bacak arasında anlamlı fark olmaması($p>0,05$) bunu doğrulamıştır. Bu verilerle çalışmada kullanılan Epo'nun myelinli aksion sayısını artırdığını söyleyebiliriz.

Sonuç olarak, sinir rejenerasyonu üzerinde etkileri olduğu bilinen çok sayıda

büyüme faktörü bulunmaktadır ve Epo bu büyüme faktörlerinin bir çoğunun öncülüdür. Periferik sinirlerde Epo'nin reseptörleri olduğu belirlendikten sonra, hasara bağlı meydana gelen hipoksiyle ortaya çıkan NO, Glutamat gibi mediyatörlerin Epo salınımına ve reseptör aktivitesine neden olduğu fakat hasardan uzakta bulunan alanlarda Epo'nun salınmadığı literatürde gösterilmiştir (38,39,40).

Hali hazırda hangi inhibitörlerin reseptör düzeyinde Epo salınımını engellediği, hangi uyaranların Epo salınımını artırdığı tam bilinmemektedir ama aynı zamanda pek çok çalışmada bu yönde devam etmektedir.

Epo'nun SSS ve PSS de *aksonkoruyucu* etkisi, *nöron besleyici* etkisi, *nöron stimüle* etkisi ile *antiapoptotik* etkileri kombine olduğu artık bilinmekte. Buna rağmen klinik olarak Epo'nun uygulanabilmesi için pek çok in vivo ve in vitro deneysel çalışmalara, veriliş süresi ve dozu belirleyen çalışmalara ihtiyaç olduğu görülmektedir.

Epo;

- Bir çok büyüme faktörlerine kıyasla ucuz olması ve
- Özellikle hazır preparatların mevcut olması,
- Kısa sürede etkinin ortaya çıkması Epo'nun üstün yanlarıdır.

Periferik sinir hasarının patofizyolojisinin tam olarak anlaşılmasıyla tedavisinde aydınlanacağını bilinmektedir.

rhEpo'nun sinir rejenerasyonunu üzerine etkileri literatürde bilinmekle birlikte; çalışmamızdan elde ettiğimiz veriler ile Epo'nun etki başlama süresi en kısa ve plazmada kalma süresi en uzun formu olan Dp- α 'nın diğer formlara nazaran avantajlı olduğunu ve hasara bağlı rejenerasyonu artırmak amacıyla klinik çalışmalarda da kullanılabilecek bir ürün olduğunu düşünmekteyiz.

SONUÇLAR

Epo'nun bir çok farklı alanda etkisi gösterilmiş ve farklı formlarının etkileri üzerine diyaliz hastalarında yapılan pek çok çalışma olmasına rağmen, bu çalışma Epo'nun farklı formlarının sinir rejenerasyonu üzerindeki etkilerini ortaya koyan ilk deneysel çalışmadır ve elde edilen bulgular;

SFI ölçümlerinde sham kontrol grubuna ait değerlerin, deney gruplarından belirgin derecede yüksek olduğu ($p<0,01$), fakat Dp- α kullanılan Grup 5 ile arasında istatistiksel fark bulunamadı ($p>0,05$), buna karşın sinir koaptasyonu uygulanan grupların kendi aralarında karşılaştırılmasında ise yalnızca Grup 2-5 ve 3-5 arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür ($p=0,05$ ve $p<0,01$). Latans ve amplitüd değerleri açısından sham kontrol grubu ile cerrahi kontrol grubu ve Ep- α kullanılan Grup 3 karşılaştırıldığında latans değerinin belirgin derecede kısa olduğu ($p=0,01$), aynı şekilde aktif nöron sayısının fazla olduğu saptanmıştır ($p=0,01$).

ESDİ değerlendirilmesi sonucu, onarım yapılan tüm gruplar da sham kontrol grubundan belirgin olarak fazla skar oluşumu görüldü ama gruplar arasında istatistiksel olarak fark yoktu ($p>0,05$). OMSLÇ, MK ve OAÇ değerlendirmesi açısından sonuçlar Grup 5'de Grup 2,3 ve 4'e göre daha iyiydi, ancak gruplar arasında farkı saptanmadı ($p>0,05$). TMS sinir onarımı yapılan tüm gruplar karşılaştırıldığında, Grup 2 ile 3,4 ve 5 arasında istatistiksel fark ($p<0,05$); Epo'nun sinir iyileşmesi yönünde olumlu etkisini göstermiştir.

Elde edilen sonuçlar; Epo'nun etki başlama süresi en kısa ve plazmada kalma süresi en uzun formu olan Dp- α 'nın diğer formlara nazaran avantajlı olduğunu ve Epo'nun sinir rejenerasyonunu artırmak amacıyla kullanılabilirliğini düşündürmektedir.

Öte yandan Keswani ve arkş. yaptığı çalışmalar gibi moleküler düzeyde in vivo ve in vitro çalışmalarda Epo ve farklı formlarının farklılıklarının rejenerasyon üzerindeki etkisini ve etkiledikleri bir çok faktörleri, bunların birbirleri ile olan etkileşimlerinin sonuçlandıracağı deneysel çalışmalara ihtiyaç duyulduğunu gördük ve periferik sinir rejenerasyonu üzerine olan etkilerin klinik uygulamalara uyarlanabilmesi, bu amaçla yapılacak ek klinik çalışmaları da gerektirdiğini düşünmekteyiz.

ÖZET

Deneysel Periferik Sinir Hasarında Farklı Formüllerdeki Eritropoetin Karşılaştırılması.

Dr. Gülay Boztosun

Periferik sinir yaralanmalarından sonra sinir hücresinde gözlenen değişiklikleri, inceleyen ve rejenerasyonun geliştirilmesi için yeni yöntemler tanımlamayı amaçlayan çok sayıda deneysel çalışma olmasına rağmen, sinir yaralanmaları önemli bir sorun olmaya devam etmektedir. Bu çalışmada, pek çok büyüme faktörünün öncülü olan Epo'nun, periferik sinir iyileşmesinde formları arasındaki etkinlik farkını araştırmak amaçlanmıştır.

Cerrahi işlemler için 31 adet Wistar tipi dişi sıçan kullanıldı. Ketamin anestezisi kullanılarak, sağ arka ekstremitede çalışıldı. Grup I'de siyatik sinir çevre dokulardan serbestleştirildi. Diğer gruplarda sinir bifurkasyonunun proksimalinden bir mikromakas ile kesildi. Grup II epinöral onarım, Grup III epinöral onarım+Ep- α , Grup IV epinöral onarım+Ep- β ve Grup V epinöral onarım+Dp- α

Postoperatif onikinci hafta sonunda deneklere SFI ve EMG yapıldı. Denekler sakrifiye edilerek ıslak kas ağırlığı, kas ve sinir histomorfometrik analizleri yapıldı. Veriler Kruskal-Wallis yöntemi kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirildi. Kontrol grubu ve Dp- α kullanılan Grup 5 arasında siyatik fonksiyon indeksi, EMG değerleri yakındı ve istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ($p>0,05$). Dp- α uygulanan grupta sinir akım hızının diğer cerrahi gruplarından daha iyi olduğu bulundu ($p>0,05$) ve histolojide daha kalın miyelin tabakası içerdiği bulundu. SFI sonuçlarına göre kontrol grubu ile Grup 2,3,4 arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0,01$). OMSLÇ, OAÇ ve MK değerlendirmesi açısından sonuçlar Grup 5'de Grup 2,3, 4'e göre daha iyiydi, ancak gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı iyileşme farkı saptanmadı ($p>0,05$).

Sonuç olarak; Dp- α 'nın diğer Epo formlarına nazaran avantajlı olduğunu ve sinir rejenerasyonunu artırmak amacıyla kullanılabilir bir ajan olduğunu düşündürmektedir. Epo'nun farklı formlarının farklılıklarının sinir rejenerasyonu üzerindeki etkisini ortaya koyan daha detaylı çalışmalara ihtiyaç duyulduğunu gördük.

SUMMARY

In Experimental Study to Investigation of Effectiveness Differences about Peripheral Nerve Healing in Between Forms of Erythropoietin.

Dr. Gülay Boztosun

Nerve injuries still represent a major problem, although a substantial amount of experimental work concerning basic behavior of the neuron after injury and new ways to improve regeneration have been described. We aimed to study the effect of difference between Epo (Erythropoietin) form's that leadership very much growth factors, in peripheral nerve healing.

Thirtyone Wistar type female rats were used for surgical procedures. We studied on the right hind-limbs of the animals under ketamine anesthesia. Group I the right sciatic nerve was only dissected. In all other surgical groups, the nerve was transected at proximal to the bifurcation with pair of microscissors. Performed as follows: GroupII Epineural repair, GroupIII Epineural repair+Ep- α , Group IV Epineural repair+Ep- β and Group V Epineural repair+Dp- α .

SFI and EMG studies were performed to after 12th weeks postoperatively. Thereafter, animals were sacrificed and histomorphometric analyses of the muscle and nerve tissue were done. Kruskal-Wallis test was used for the statistical analysis. The same results of sciatic function indices and EMG demonstrated statistically no significant difference between control group and group therapy use of Dp- α ($p>0.05$). The group that were exposed to Dp- α have shorter latency time in electromyography than the other surgical groups ($p>0.05$), and thicker myelin layer in histological evaluation. The results of sciatic function indices revealed statistically significant difference between the control group and Group 2, 3, 4 ($p<0.01$). Group 5 were favorable than Group 2, 3 and 4 when evaluated for OMSLÇ, OAÇ and MK histomorphometric analysis of nerve, but the differences between the groups were not significant ($p>0.05$).

In conclusion, Dp- α were favorable than other Epo forms and Dp- α could be advised improve nevre healing. The results presented were generated in animal experiments to the effect detail with further study should be clarified the relative advantages different forms of Epo on peripheral nerve regeneration.

KAYNAKLAR

1. Mackinnon SE, Surgical management of the peripheral nerve gap. Clin Plast Surg 1989; 16: 587-603.
2. Mackinnon SE, Dellon AL, Hudson AR, Hunter DA, Nerve regeneration through a pseudosynovial sheath in a primate model. Plast Reconstr Surg 1985; 75: 833-841.
3. Brushart TM, Tarlov EC, Mesulam MM. Specificity of muscle reinnervation after epineural and individual fascicular suture of the rat sciatic nerve. J Hand Surg 1983; 8: 248-253.
4. Kayıkcıoğlu A, Karamursel S, Demirci M, Erdem S, Kecik A, A new epineural nerve repair technique with external metallic circle. Surg Neurol 2004; 62: 387-92.
5. Levinthal R, Brown WJ, Rand RW. Comparison of fascicular, interfascicular and epineural suture techniques in the repair of simple nerve lacerations. J Neurosurg 1977; 47: 744-50.
6. Lolley RD, Bose WJ, Bastian F, Bassam B, Meyer FN, Anderson LD, Vein, silastic and polyglycolic acid fine mesh, a comparative study in peripheral nerve repair. Ann Plast Surg 1995; 35: 266-71.
7. Cham RB, Peimer CA, Howard CS, Walsh WP, Eckert BS, Absorbable versus nonabsorbable suture for microneurolysis. J Hand Surg (Am) 1984; 9: 434-40.
8. Giddins GE, Wade PJ, Amis AA, Primary nerve repair, strength of repair with different gauges of nylon suture material. J Hand Surg (Br) 1989; 14: 301-2.
9. Cordeiro PG, Seckel BR, Miller CD, Gross PT, Wise RE, Effect of a high-intensity static magnetic field on sciatic nerve regeneration in the rat. Plast Reconstr Surg 1989; 83: 301-8.

-
10. Zienowicz RJ, Thomas BA, Kurtz WH, Orgel MG, A multivariate approach to the treatment of peripheral nerve transection injury, the role of electromagnetic field therapy. *Plast Reconstr Surg* 1991; 87: 122-9.
 11. Menovsky T, Beek JF, Carbon dioxide laser-assisted nerve repair, effect of solder and suture material on nerve regeneration in rat sciatic nerve. *Microsurgery* 2003; 23: 109-16.
 12. Gorgulu A, Uzal C, Doganay L, Imer M, Eliuz K, Cobanoglu S, The effect of low-dose external beam radiation on extraneural scarring after peripheral nerve surgery in rats. *Neurosurgery* 2003; 53: 1389-95.
 13. Haapaniemi T, Nylander G, Kanje M, Dahlin L, Hyperbaric oxygen treatment enhances regeneration of the rat sciatic nerve. *Exp Neurol* 1998; 149: 433-8.
 14. Islamov RR, Hendricks WA, Jones RJ, Lyall GJ, Spanier NS, Murashov AK, 17 Beta-estradiol stimulates regeneration of sciatic nerve in female mice. *Brain Res* 2002; 943: 283-6.
 15. Hart AM, Terenghi G, Kellerth JO, Wiberg M, Sensory neuroprotection, mitochondrial preservation, and therapeutic potential of N-acetyl-cysteine after nerve injury. *Neuroscience* 2004; 125: 91-101.
 16. Mattsson P, Aldskogius H, Svensson M, Nimodipine-induced improved survival rate of facial motor neurons following intracranial transection of the facial nerve in the adult rat. *J Neurosurg* 1999; 90: 760-5.
 17. Ayhan S, Yavuzer R, Latifoglu O, , Use of the turnover epineurial sheath tube for repair of peripheral nerve gaps. *J Reconstr Microsurg* 2000; 16: 371-7.
 18. Yavuzer R, Ayhan S, Latifoglu O, Atabay K, Turnover epineurial sheath tube for primary repair of peripheral nerves. *Ann Plast Surg* 2000; 48: 392-400.

-
19. Wilgis EFS, Brushart TM. Nerve repair, *Operative Hand Surgery*. 3rd edition. editors: Green DP. New York. Churchill Livingstone; 1993: 1315-40.
 20. Ludberg G, Hasson HA. Nerve regeneration through performed pseudosynovial tubes. A preliminary report of a new experimental model for studying the regeneration and reorganization capacity of peripheral nerve tissue. *J Hand Surg* 1980; 5: 35-8.
 21. Lee S, De Macedo AR, Chan E, Wolf P, Han K, Li SJ, Efficacy of polyglycolic acid microsutures in peripheral nerve anastomoses in the rat, 1. Epineural suture. *Microsurgery* 1983; 4: 120-3.
 22. Castaneda F, Kinne RK, Omental graft improves functional recovery of transected peripheral nerve. *Muscle Nerve* 2002; 26: 527-32.
 23. Thomas PK, Berthold CH, Ochoa J. Microscopic anatomy of the peripheral nervous system. *Peripheral Neuropathy*. 3rd edition. editor: Dyck P. Philadelphia; WB Saunders 1993: 28-80.
 24. Mackinnon SE, Dellon AL, Clinical nerve reconstruction with a bioabsorbable polyglycolic acid tube. *Plast Reconstr Surg* 1990; 85: 419-24.
 25. Terzis JK, Smith KL, Repair and grafting of the peripheral nerve. *Plastic Surgery*. editor: Mc Charty JG. Philadelphia; WB Saunders 1990: 630-81.
 26. Madison R, Da Saliva CF, Dikkes P, Chiu TH, Sidman RL, Peripheral nerve regeneration with entubulation repair, comparison of biodegradable nerve vs. polyethylene tubes and effects of a laminin-containing gel. *Exp Neurol* 1987; 95: 378-90.
 27. Buehler MJ, Seaber AV, Urbaniak JR. The relationship of functional return to varying methods of nerve repair. *J Reconstr Microsurg* 1990; 6: 61-69.

-
28. Gibson KL, Daniloff DVM, Daniloff JK, Comparison of sciatic nerve regeneration through silicone tubes and allografts. *Microsurgery* 1989; 10: 126-9.
 29. Voinesco F, Glauser L, Kraftsik R, Barakat-Walter I, Local administration of thyroid hormones in silicone chamber increases regeneration of rat transected sciatic nerve. *Exp Neurol* 1998; 150: 69-81.
 30. 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.
 31. Ozgenel GY, Effects of hyaluronic acid on peripheral nerve scarring and regeneration in rats. *Microsurgery* 2003; 23: 575-81.
 32. Wang KK, Nemeth IR, Seckel BR, Chakalis-Haley DP, Swann DA, Kuo JW, Bryan DJ, Hyaluronic acid enhances peripheral nerve regeneration in vivo. *Microsurgery* 1998; 18: 270-5.
 33. Gorgulu A, Imer M, Simsek O, Sencer A, Kutlu K, Cobanoglu S, The effect of aprotinin on extraneural scarring in peripheral nerve surgery, an experimental study. *Acta Neurochir* 1998; 140: 1303-7.
 34. Sarigüney Y. Periferik sinir yaralanmalarının onarımında trombosit zengin plazma'nın sinir rejenerasyonu üzerine etkisi. *Uzmanlık Tezi. Gazi Üniv* 2006.
 35. Ilbay K, Etus V, Yildiz K, Ilbay G, Ceylan S, Topical application of mitomycin C prevents epineural scar formation in rats. *Neurosurg Rev* 2005; 28:148-53.
 36. Lykissas MG, Korompilias AV, Vekris MD, Mitsionis GI, Sakellariou E, Beris AE, The role of erythropoietin in central and peripheral nerve injury. *Clin Neurol Neurosurg* 2007;109: 639-644.

-
37. Lykissas MG, Sakellariou E, Vekris MD, Kontogeorgakos VA, Batistatou AK, Mitsionis GI, Beris AE, Axonal regeneration stimulated by erythropoietin: an experimental study in rats. *J Neurosci Methods* 2007; Aug 15: 107-115.
 38. Keswani SC, Buldanlioğlu U, Fischer A, Reed N, Polley M, Liang H, Zhou C, et.al. A Novel Endogenous Erythropoietin Mediated Pathway Prevents Axonal Degeneration. *Ann Neurol* 2004; 56: 815–826.
 39. Fumagalli F, Madaschi L, Brenna P, Caffino L, Marfia G, Giulio AM, Racagni G. et.al. Single exposure to erythropoietin modulates Nerve Growth Factor expression in the spinal cord following traumatic injury: Comparison with methylprednisolone. *Eur J Pharmacol* 2008; 578: 19-27.
 40. Campana WM, Myers RR, Exogenous erythropoietin protects against dorsal root ganglion apoptosis and pain following peripheral nerve injury. *Eur J Neurosci* 2003; 18: 1497–506.
 41. Campana WM, Myers RR, Erythropoietin and erythropoietin receptors in the peripheral nervous system: changes after nerve injury. *FASEB J* 2001; 15: 1804–6.
 42. Tsai PT, Ohab JJ, Kertesz N, Groszer M, Matter C, A critical role of erythropoietin receptor in neurogenesis and poststroke recovery. *J Neurosci* 2006; 26: 1269–74.
 43. Li X, Gonias SL, Campana WM, Schwann cells express erythropoietin receptor and represent a major target for Epo in peripheral nerve injury. *Glia* 2005; 51:254–65.
 44. Lohmeyer JA, Essmann E, Richerson SJ, Hagel C, Egana JT, Condurache A, Ganske P, Schulz K, Use of erythropoietin as adjuvant therapy in nerve reconstruction. *Langenbecks Ann Surg* 2008; 393: 317-323.

-
45. Frostick SP, Yin Q, Kemp GJ, Schwann cells, neurotrophic factors, and peripheral nerve regeneration. *Microsurgery* 1998; 18: 397-405.
 46. Gordon T, Sulaiman O, Boyd JG, Experimental strategies to promote functional recovery after peripheral nerve injuries. *J Peripher Nerv Syst* 2003; 8: 236-50.
 47. Morhishita E, Masuda M, Nagao M, Yasuda Y, Sasaki R, Erythropoietin receptor is expressed in rat hippocampal and cerebral cortical neurons and erythropoietin prevents in vitro glutamate-induced neuronal death. *Neuroscience* 1997; 76:105-16.
 48. Sadamoto Y, Igase K, Sakanaka M, Sato K, Otsuka H, Sakaki K, Masuda S, Erythropoietin prevents place navigation disability and cortical infarction in rats with permanent occlusion of the middle cerebral artery. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1998; 253: 26-32.
 49. Zaman K, Ryu H, Hall D, O'Donovan K, Lin KI, Miller MP, Marquis JC, Protection from oxidative stress-induced apoptosis in cortical neuronal cultures by iron chelators is associated with enhanced DNA binding of hypoxia-inducible factor-1 and ATF-1/CREB and increased expression of glycolytic enzymes, p21 waf1/cip1 and erythropoietin. *J. Neurosci* 1999; 19: 9821-9830.
 50. Lipsic E, van der Meer P, Voors AA, Westenbrink BD, van den Heuvel AF, de Boer HC, van Zonneveld AJ, Schoemaker RG, van Gilst WH, Zijlstra F, van Veldhuisen DJ. A single bolus of a long-acting erythropoietin analogue darbepoetin alfa in patients with acute myocardial infarction: a randomized feasibility and safety study. *Cardiovasc Drugs Ther* 2006; 20:135-41.
 51. Snell RS, *Clinical Neuroanatomy for Medical Students*. Second edition. Little Brown and Company. Boston. 1990: 47-75.

-
52. Waxman SG, Sinir Dokusu: Korrelatif Nöroanatomi. 24. Baskıdan çeviri. Yıldırım M (Ed) Nobel Tıp Kitapevleri Ltd Sti. İstanbul 2002: 8-19.
53. Dahlin LB, The biology of nerve injury and repair. J Am Soc Surg Hand 2004; 4: 143- 155.
54. Garbay B, Heape AM, Sargueil F, Myelin synthesis in peripheral nervous system. Prog Neurobiol 2000; 61: 267-304.
55. Lawrence HB, Cells and Tissue. Gray's Anatomy. 38th edition. editor: Williams PL. Edinburgh. Churchill Livingstone. 1995: 17-90.
56. Lundborg G, The nerve trunk, Nerve injury and repair. New York. Churchill Livingstone. 1988: 32-63.
57. Özmen S, Uç-yan sinir anastomozunda alıcı sinir distal ucunda epinörium rezeksiyonunun rejenerasyona etkisi. Uzmanlık Tezi. Gazi Üniv Tıp Faklt. 2002.
58. Hansson HA, Insulin-like growth factors and nerve regeneration. Ann N Y Acad Sci 1993; 692: 161-71.
59. Brandt KE, Mackinnon SE, Microsurgical repair of peripheral nerves and nevre grafts. Grabb and Smith's Plastic Surgery. 5th edition, editors: Aston SJ, Beasley RW, Thorne CHM Lippincott-Raven. Philadelphia. 1997: 79.
60. Lundborg G, Dahlin LB, Structure and function of peripheral nevre. Operative Nevre Repair and Reconstruction. editors: Gelberman RH. JB Lippincott. Philadelphia. 1991: 3-15.
61. Myers RR, Morphology of the peripheral nervous system and its relationship to neuropathic pain. Anesthesia. Biologic Foundations. editors: Yaksh TL. Lynch III C. Zapol WM. Maze M. Lippincott Raven. Philadelphia. 1998: 483-514.

-
62. Seckle B Enhancement of the peripheral nerve regeneration. *Muscle Nerve* 1990; 13: 785-800.
63. Mackinnon SE, New directions in peripheral nerve surgery. *Ann Plast Surg* 1989; 22: 257-58.
64. Saleh MS, John YS, Repair and grafting of the peripheral nerve. *Plastic Surgery*. 2th edition. ed: Stephen J. Mathes. Saunders. Philadelphia. 2000: 719-739.
65. Molander H, Engkvist O, Hugglund J, Nerve repair using a polyglactin tube and nerve graft, an experimental study in the rabbit. *Biomaterials* 1983; 4: 276-80.
66. Bora FW, Peripheral nerve repair in cats. The fascicular stitch. *J Bone joint Surg*. 1967; 49: 659-60.
67. Bayramiçli M. Sinirde mikrocerrahi çalışması, Deneysel Mikrocerrahi Temel Araştırma Doku ve Organ Nakli Modelleri. *Argos*. İstanbul, 2005: 339-364.
68. Millesi H, Microsurgical repair of peripheral nerves. *Plastic Surgery*. 4th edition. editors: Smith JW. Aston SJ. Little Brown. Boston 1991: 1053-74.
69. Wilgis EFS, Nerve repair and grafting. *Operative Hand Surgery*. editor: Green DP. Churchill Livingstone. New York. 1982: 915-38.
70. Lundborg G, Nerve regeneration and repair. A review. *Acta Orthop Scand* 1987; 58: 145-169.
71. Vural M, Arslantaş A, Periferik Sinir Cerrahisi Teknikleri: Temel Nörosirurji. 1.Baskı. Aksoy K. (Editor) Türk Nörosirurji Derneği Yayınları 2005: 1262-1271.

-
72. Diao E, Peimer CA, Suturless methods of nerve repair. *Operative Nerve Repair and Reconstruction*. editors:Gelberman RH, JB Lippincott. Philph. 1991: 305-311.
73. Smahel J, Meyer VE, Bachem U, Glueing of peripheral nerves with fibrin, experimental studies. *J Reconstr Microsurg* 1987; 3: 211-20.
74. Menovsky T, Beek JF, Laser, fibrin glue, or suture repair of peripheral nerves, a comparative functional, histological and morphometric study in the rat sciatic nerve. *J Neurosurg* 2001; 95: 694-9.
75. Hare GMT, Evans PJ, Mackinnon SE, Best TJ, Bain JR, Sazalai JP, Hunter DA, Walking tract analysis, a long term assesment of peripheral nerve recovery. *Plast Reconstr Surg* 1992; 89: 251-8.
76. Lundborg G, *Nerve Injury and Repair*. Churchill Livingstone. New York. 1988: 149-195.
77. Bixby JL, Zhang R, Purified N-cadherin is a potent substrate for the rapid induction of neurite outgrowth. *J Cell Biol* 1990; 110: 1253-60.
78. Maggi SP, Lowe JB, Mackinnon SE. Pathophysiology of the nerve injury. *Clin Plast Surg* 2003; 30: 109-26.
79. Yin Q, Kemp GJ, Frostick S, Neurotrophins, neurones and peripheral nevre regeneration. *J Hand Surg [Br]* 1998; 23: 433-7.
80. Chen YS, Wang-Bennett LT, Coker NJ, Facial nerve regeneration in the silicone chamber, the influence of nerve growth factor. *Exp Neurol* 1989; 103: 52-60.

-
81. Santos X, Rodrigo J, Hontanilla B, Bilbao G, Local administration of neurotrophic growth factor in subcutaneous silicon chambers enhances the regeneration of the sensory component of the rat sciatic nerve. *Microsurgery* 1999; 19: 275-80.
 82. He CL, Chen ZW, Chen ZR, Enhancement of motor regeneration by nerve growth factor. *Microsurgery* 1998; 13: 151-4.
 83. Whitworth IH, Brown RA, Dore CJ, Anand P, Green CJ, Terenghi G, Nerve growth factor enhances nerve regeneration through fibronectin grafts. *J Hand Surg Br* 1996; 21: 514-22.
 84. Utley DS, Lewin SL, Cheng ET, Verity AN, Sierra D, Terris DJ, Brain-derived neurotrophic factor and collagen tubulization enhance functional recovery after peripheral nerve transection and repair. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1996; 122: 407-13.
 85. Braun S, Croizat B, Lagrange MC, Warter JM, Poindron P, Neurotrophins increase motoneurons' ability to innervate skeletal muscle fibers in rat spinal cord-human muscle cocultures. *J Neurol Sci* 1996; 136: 17-23.
 86. Schnell L, Schneider R, Kolbeck R, Barde YA, Schwab ME, Neurotrophin-3 enhances sprouting of corticospinal tract during development and after adult spinal cord lesion. *Nature* 1994; 367: 170-3.
 87. Laird JM, Mason GS, Thomas KA, Hargreaves RJ, Hill RG, Acidic fibroblast growth factor stimulates motor and sensory axon regeneration after sciatic nerve crush in the rat. *Neuroscience* 1995; 65: 209-16.
 88. Midha R, Munro CA, Dalton PD, Tator CH, Shoichet MS, Growth factor enhancement of peripheral nerve regeneration through a novel synthetic hydrogel tube. *J Neurosurg* 2003; 99: 555-65.

-
89. Davis JB, Stroobant P, Platelet-derived growth factors and fibroblast growth factors are mitogens for rat Schwann cells. *J Cell Biol* 1990; 110: 1353-60.
 90. Danielsen N, Pettmann B, Vahlsing HL, Manthorpe M, Varon S, Fibroblast growth factor effects on peripheral nerve regeneration in a silicone chamber model. *J Neurosci Res* 1988; 20: 320-30.
 91. Near SL, Whalen LR, Miller JA, Ishii DN, Insulin-like growth factor II stimulates motor nerve regeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 11716-20.
 92. Kanje M, Skottner A, Lundborg G, Sjoberg J, Does insulin-like growth factor I (IGF-I) trigger the cell body reaction in the rat sciatic nerve. *Brain Res* 1991; 563: 285-7.
 93. Kanje M, Skottner A, Sjoberg J, Lundborg G, Insulin-like growth factor I (IGF-I) stimulates regeneration of the rat sciatic nerve. *Brain Res* 1989; 486: 396-8.
 94. Tiangco DA, Papakonstantineu KC, Mullinax KA, Terzis JK, IGF-I and end-to-side nerve repair, a dose-response study. *J Recstr Microsurg* 2001; 17: 247-56.
 95. Ishii DN, Glazner GW, Whalen LR, Regulation of peripheral nerve regeneration by insulin-like growth factors. *Ann N Y Acad Sci* 1993; 692: 172-82.
 96. Oudega M, Xu XM, Guenard V, Kleitman N, Bunge MB, A combination of insulin-like growth factor-I and platelet-derived growth factor enhances myelination but diminishes axonal regeneration into Schwann cell grafts in the adult rat spinal cord. *Glia* 1997; 19: 247-58.
 97. Ridley AJ, Davis JB, Stroobant P, Land H, Transforming growth factors-beta 1 and beta 2 are mitogens for rat Schwann cells. *J Cell Biol* 1989; 109: 3419-24.

-
98. Sulaiman OA, Gordon T, Transforming growth factor-beta and forskolin attenuate the adverse effects of long-term Schwann cell denervation on peripheral nerve regeneration in vivo. *Glia* 2002; 37: 206-18.
99. Lin G, Chen KC, Hsieh PS, Yeh CH, Lue TF, Lin CS, Neurotrophic effects of vascular endothelial growth factor and neurotrophins on cultured major pelvic ganglia. *BJU Int* 2003; 92: 631-5.
100. Sondell M, Lundborg G, Kanje M, Vascular endothelial growth factor has neurotrophic activity and stimulates axonal outgrowth, enhancing cell survival and Schwann cell proliferation in the peripheral nervous system. *J Neurosci* 1999; 19: 5731-40.
101. Oya T, Zhao YL, Takagawa K, Kawaguchi M, Shirakawa K, Yamauchi T, Sasahara M, Platelet-derived growth factor-b expression induced after rat peripheral nerve injuries. *Glia* 2002; 38: 303-12.
102. Wells MR, Kraus K, Batter DK, Blunt DG, Weremowitz J, Lynch SE, Antoniadis HN, Hansson HA, Gel matrix vehicles for growth factor application in nerve gap injuries repaired with tubes, a comparison of biomatrix, collagen, and methylcellulose. *Exp Neurol* 1997; 146:395-402.
103. Dubuisson AS, Beuermann RW, Kline DG, Sciatic nerve regeneration across gaps within collagen chambers, the influence of epidermal growth factor. *J Reconstr Microsurg* 1993; 9: 341-6.
104. Woodman DD, Erythropoietin. *Comparative Haematology International*. 1992: 1-7.
105. Dordal MS, Wang FF, Goldwasser E. The role of carbohydrate in erythropoietin action. *Endocrinology* 1985;116: 2293.

-
106. Miyake T, Kung CKH, and Goldwasser E, Purification of human erythropoietin. *J Biol Chem* 1977; 252: 5558-5564.
 107. Wang FF Kung CKH, Golwasser E, Some chemical properties of human erythropoietin. *Endocrinology* 1985;1116: 2286.
 108. Fisher JW, Erythropoietin. In Massry SG. Glasscock RJ. *Textbook of Nephrology*. 3rd Edition. Williams & Wilkins. Baltimore. USA. 1995: 91-197.
 109. Annable L, Cotes PM, Mussett MV, The second international reference preparation of erythropoietin, human, urinary, for bioassay. *Bull Org Mond Sante* 1972; 47:99-112.
 110. Fried W, Barone-Varelas J, Morley C, Factors that regulate extrarenal erythropoietin production. *Blood Cells* 1984; 10: 287.
 111. Krantz SB. Erythropoietin. *Blood* 1991; 77: 419-434.
 112. Naughton BA, Birnbach DL, Liu P, et al. Erythropoietin production and kupffer cell alterations following nephrectomy, hypoxia or combined nephrectomy and hypoxia. *Proc Soc Exp Biol Med* 1979; 160:170-174.
 113. Caro J, Erslev AJ, Silver R, Miller O, Birgegard G, Erythropoietin production in response to anemia or hypoxia in the newborn rat. *Blood* 1982; 60:984-988.
 114. Giger U, Erythropoietin and its clinical use. *Comp. Continuing Education Article* 1992; 14: 25-34.
 115. Beru N, McDonald J, Lacombe C, Goldwasser E, Expression at the erythropoietin gene. *Mol Cell Biol* 1986; 6: 2571.

-
116. Schuster SJ, Wilson JH, Erslev AJ, Caro J, Physiologic regulation and tissue localization of renal erythropoietin messengerRNA. *Blood* 1987; 70: 316-318.
117. Koury ST, Koury MJ, Bondurant MC, The biogenesis of erythropoietin in vivo, in Erslev AJ. Adamson JW. Eschbach JW. Winearls CG. (eds): *Erythropoietin*. MD. Johns Hopkins University. Baltimore. 1990.
118. Spivak JL, Recombinant human erythropoietin and the anemia of cancer. *Blood* 1994; 84: 997-1004.
119. Lacombe C, Da Silva JL, Bruneval P, Fournier JG, Wendling F, Casedevall N, Camilleri JP, Bariety J, Peritubular cells are the site of erythropoietin synthesis in the murine hypoxic kidney. *J Clin Invest* 1988; 81: 620-623.
120. Rodgers GM, Fisher JM, George WJ, The role of renal adenosine 3', 5'-Monophosphate in the control of erythropoietin production. *Am J Med* 1975; 58: 31-38.
121. Cotes PM, *Erythropoietin hormones in blood*. 3rd Ed. Vol.4. Academic Press Inc. London. 1983: 195-211.
122. Spivak JL, and Watson AJ, *Hematopoiesis and the Kidney The Kidney. Physiology and Pathophysiology*. Second Ed. Raven Press Ltd. New York. 1992; 42: 1553-1593.
123. Browne JK, Cohen AM, Egrie JC, Lai PH, Lin FK, Strickland T, Watson E, Stebbing N. Erythropoietin, gene cloning protein structure and biological properties. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 1986; 51: 693-702.
124. Rich IN, Hert W, Kubanek B, Extrarenal erythropoietin production by macrophages. *Blood* 1982; 60:1007.

-
125. Haga KK, Gregory LJ, Hicks CA, et al. The neuronal nitric oxide synthase inhibitor, TRIM, as a neuroprotective agent: effects in models of cerebral ischaemia using histological and magnetic resonance imaging techniques. *Brain Res* 2003; 993: 42–53.
126. Keilhoff G, Fansa H, Wolf G. Differences in peripheral nerve degeneration/regeneration between wild-type and neuronal nitric oxide synthase knockout mice. *J Neurosci Res* 2002; 68: 432–441.
127. Juel C, Thomsen JJ, Rentsch RL, Lundby C.; Effects of prolonged recombinant human erythropoietin administration on muscle membrane transport systems and metabolic marker enzymes. *Eur J Appl Physiol* 2007; 102: 41-4.
128. Dilek İ, Uysal V.A, Üstün C, Rekombinant Human Eritropoietin ve klinik uygulamaları. *Türk Hematoloji-Onkoloji Dergisi*. 1997; 7:1-7.
129. Fu SY, Gordon T (1995a), Contributing factors to poor functional recovery after delayed nerve repair: prolonged axotomy. *J Neurosci* 1995; 15: 3876–3885.
130. Jacobson LO, Goldwasser E, Fried W, Plzak L, Role of the kidney in erythropoiesis. *Nature* 1957; 179: 633.
131. Goldwasser E, et al. The effect of interleukin-3 on hemopoietic precursor cells. In: *Normal and neoplastic hematopoiesis*. Alan R. Liss. NY.1983: 301-309.
132. Sawyer S, Krantz SB, Sawada K, Receptors for erythropoietin in mouse and human erythroid cells and placenta. *Blood* 1989; 74:103-109.
133. Sawyer ST, Receptors for erythropoietin. Distribution, structure and role in receptor-mediated endocytosis in erythroid cells. In Harris JR (ed): *Blood Cell*.

-
134. Sawada K, Krantz SB, Dai CH, Koury ST, Horn S, Glick AD, Civin C, Purification of human blood burst-forming units-erythroid and demonstration of the evolution of erythropoietin receptors. *J. Cell Physiol* 1990; 142:219.
135. Juul SE., Yachnis AT, Rojiani AM, Christensen RD, Immunohistochemical localization of erythropoietin and its receptor in the developing human brain. *Pediatric and Developmental Pathology* 1999; 2: 148-158.
136. Anagnostou A, Liu Z, Steiner M, Chin K, Lee ES, Kessimian N, Noguchi CT, Erythropoietin receptor mRNA expression in human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci* 1994; 91: 3974-3978.
137. Anagnostou A, Lee ES, Kessimian N, Levinson R, Steiner M, Erythropoietin has a mitogenic and positive chemotactic effect on erythro-endothelial cells. *Proc. Natl Acad Sci* 1990; 87: 5978-5982.
138. Chin K, Yu X, Cokic BB, Liu C, Shen K, Mohrenweiser HW, Noguchi CT, Production and processing of erythropoietin receptor transcripts in brain. *Molecular Brain Research* 2000; 81: 29-42.
139. Morishita E, Masuda M, Nagao M, Yasuda Y, Sasaki R, Erythropoietin receptor is expressed in rat hippocampal and cerebral cortical neurons and erythropoietin prevents in vitro glutamate-induced neuronal death.. *Neuroscience* 1997; 76: 105-116.
140. Sadamoto Y, Igase K, Sakanaka M, Sato K, Otsuka H, Sakaki K, Masuda S, Sasaki M, Erythropoietin prevents place navigation disability and cortical infarction in rats with permanent occlusion of the middle cerebral artery. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1998; 253: 26-32.
141. Lipsic E, van der Meer P, Voors AA, Westenbrink BD, van den Heuvel AF, de Boer HC, van Zonneveld AJ, Schoemaker RG, van Gilst WH, Zijlstra F, van

-
- Veldhuisen DJ. A single bolus of a long-acting erythropoietin analogue darbepoetin alfa in patients with acute myocardial infarction: a randomized feasibility and safety study. *Cardiovasc Drugs Ther* 2006; 20: 135-41.
142. Spivak JL, Hogans BB, The in vivo metabolism of recombinant human erythropoietin in the rat. *Blood* 1989; 73: 90-99.
143. Naets JP, Wittek M, A role of the kidney in the catabolism of erythropoietin in the rat. *JLab Clin Med* 1974; 84: 99-106.
144. Fu JS, Leria J, Rice JC, Fisher JW, Pharmacokinetics of erythropoietin in intact and anephric dogs. *JLab Clin Med* 1983; 111: 669-676.
145. Piroso E, Erslev AJ, Flaharty KK, et al. Erythropoietin life span in rats with hypoplastic and hypoplastic bone marrows. *Am J Hemtol* 1991; 36: 105-110.
146. Fisher JW, Erythropoietin. Physiology and pharmacology update. *Exp Biol Med* 2003; 228: 1-14.
147. Lohmeyer JA, Essmann E, Richerson SJ, Hagel C, Egana JT, Condurache A, Ganske P, Schulz K, Mailnder P, Machens HG, Use of erythropoietin as adjuvant therapy in nevre reconstruction. *Langenbecks Ann Surg* 2008; 393: 317-323.
148. Macdougall IC, Optimizing the use of erythropoietic agents-pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations. *Nephrol Dial Transplant* 2002; 17: 66-70.
149. Johnson CA, Wakeen M, Taylor CA, Zimmerman SW, Burkart J, Bhattacharya A, Kosorok MR, Comparison of intraperitoneal and subcutaneous epoetin alfa in peritoneal dialysis patients. *Perit Dialys Int* 1999; 19: 578-582.
150. Gorio A, Gokmen N, Erbayraktar S, Yilmaz O, Madaschi L, Cichetti C, et al. Recombinant human erythropoietin counteracts secondary injury and markedly

-
- enhances neurological recovery from experimental spinal cord trauma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 9450–5.
151. Allaf ME, Hoke A, Burnett AL. Erythropoietin promotes the recovery of erectile function following cavernous nerve injury. *J Urol* 2005; 174: 2060-4
152. Tsai PT, Ohab JJ, Kertesz N, Groszer M, Matter C, Gao J, et al. A critical role of erythropoietin receptor in neurogenesis and post-stroke recovery. *J Neurosci* 2006; 26:1269–74.
153. Bernaudin M, Marti HH, Roussel S, Divoux D, Nouvelout A, MacKenzie ET, Petit E A potential role for erythropoietin in focal permanent ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 1999; 19: 643-651.
154. Buemi M, Cavallaro E, Floccari F, Sturiale A, Aloisi C, Trimarchi M, et al. The pleiotropic effects of erythropoietin in the central nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol* 2003; 62: 228–36.
155. Morishita E, Masuda S, Nagao M, Yasuda Y, Sasaki R. Erythropoietin receptor is expressed in rat hippocampal and cerebral cortical neurons, and erythropoietin prevents in vitro glutamate-induced neuronal death. *Neuroscience* 1997; 76: 105–16.
156. Gordon T, Sulaiman O, Boyd JG. Experimental strategies to promote functional recovery after peripheral nerve injuries. *J Per Nerv Syst* 2003; 8: 236-50.
157. Brown CJ, Mackinnon SE, Evans PJ, Bain JR, Makino AP, Hunter DA, Hare GMT. Self evaluation of walking tract measurement using a sciatic function index. *Microsurgery* 1989; 10: 226-35.
158. Ozmen S, Ayhan S, Latifoglu O, Siemionow M, Stamp and paper method, a superior technique for the walking track analysis. *Plas Rec Sur* 2002; 109:1760-61.

-
159. Bain JR, Mackinnon SE, Hunter DA, Functional evaluation of complete sciatic peroneal and posterior tibial nerve lesions in the rat. *Plast Reconstr Surg* 1989; 83: 129-38.
160. Hall SM, The response to injury in the peripheral nervous system. *J Bone Joint Surg* 2005; 87: 1309-1319.
161. Fu SY, Gordon T, The cellular and molecular basis of peripheral nerve regeneration. *Mol Neurobiol* 1997; 14: 67-116.
162. Fuminori K, John CF, Warren CB, Sciatic function index, nerve conduction tests, muscle contraction, and axon morphometry as indicators of regeneration. *Plast Reconstr Surg* 1996; 98: 1264-1271.
163. Lundborg G, 25 th Anniversary Presentation. A 25-Year perspective of peripheral nerve surgery: evolving neuroscientific concepts and clinical significance. *J Hand Surg* 2000; 25: 391-414.
164. Urabe T, Zhao Q, Lundborg G, et al. Effects of delayed nerve repair on regeneration of rat sciatic nerve. *Restor Neurol and Neurosci* 1995; 9:1-5.
165. Terzis JK, Faibisoff B, Williams HB. The nerve gap: Suture under tension vs. graft. *Plast Reconstr Surg* 1975; 56: 166-170.
166. Sunderland RP, Brenner MJ, Singham J, Effect of tension on nerve regeneration in rat sciatic nerve transection model. *Ann Plast Surg* 2004; 53: 382-87
167. Nachemson AK, Lundborg G, Myrhage R, Kank F. Nerve regeneration and pharmacological suppression of the scar reaction at the suture site. *Scand J Plast Reconstr Surg* 1985; 19: 255-260.
168. Kurtz A, Erythropoietin. Structure, function, origin, *Adv in nep* 1987;16: 371-8.

-
169. Koury MJ, Bondurant MC, Erythropoietin retards DNA breakdown and prevents programmed death in erythroid progenitor cells. *Science* 1990; 248: 378-81.
170. Jelkman W, Erythropoietin. Structure, control of production, and function. *Physiol Rev* 1992; 72: 449-89.
171. Erslev AJ, Erythropoietin. *N Eng J Med* 1991; 324:1339-1344.
172. K Maiese, F Li and Z Z Chong, Erythropoietin in the brain: can the promise to protect be fulfilled? *Trends Pharmacol Sci* 2004; 25: 577-83.
173. Kumral A, Tugyan K, Gonenc S, Genc K, Genc S, Sonmez U et al. Protective effects of erythropoietin against ethanol-induced apoptotic neurodegeneration and oxidative stress in the developing C57BL/6 mouse brain. *Brain Res Dev Brain Res* 2005; 160: 146-56.
174. Sakanaka M, Wen TC, Matsuda S, Masuda S, Morishita E, Nagao M, Sasaki R. In vivo evidence that erythropoietin protects neurons from ischemic damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 4635-40.
175. de Medinaceli L, Freed W, Wyatt R, An index of the functional condition of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks. *Exp Ner* 1982; 77: 634-43.
176. Bronzino JD, *The biomedical engineering handbook*. Second edition. CRC Florida 2000: 141-50.
177. Baykal S, Boz C, Cakır E, Baytan SH, Karakus M, Kuzeyli K, The effects of pentoxifylline in experimental nerve injury. *Turk J Med Sci* 2002; 32: 207-10.