

T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

SİLDENAFİL SİTRAT VE ERİTROPOETİN'İN
SİNİR REJENERASYONU ÜZERİNE
ETKİLERİ

Dr. Tanju Mustafa AKAN

Plastik, Rekonstruktif ve Estetik Cerrahi
Anabilim Dalı
TIPTA UZMANLIK TEZİ

ESKİŞEHİR
2009

T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

SİLDENAFİL SİTRAT VE ERİTROPOETİN'İN
SİNİR REJENERASYONU ÜZERİNE
ETKİLERİ

Dr. Tanju Mustafa AKAN

Plastik, Rekonstruktif ve Estetik Cerrahi

Anabilim Dalı

TIPTA UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŐMANI

Doç.Dr. Yakup KARABAĞLI

ESKİŞEHİR

2009

TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI

T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA,

Dr. Tanju Mustafa AKAN'a ait "Sildenafil sitrat ve Eritropoetin'in sinir rejenerasyonu üzerine etkileri" adlı çalışma jürimiz tarafından Plastik, Rekonstruktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı'nda Tıpta Uzmanlık Tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Tarih: ... / ... /

Jüri Başkanı	Prof. Dr. Cengiz ÇETİN Plastik, Rek. ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı	İmza
Üye	Doç. Dr. Aydan KÖSE Plastik, Rek. ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı	İmza
Üye	Doç. Dr. Yakup KARABAĞLI Plastik, Rek. ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı	İmza

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Yönetim Kurulu'nun ... / ... /
Tarih ve .../.....Sayılı Kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Zübeyir KILIÇ
Dekan

TEŞEKKÜR

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Plastik, Rekonstruktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı'nda yapmış olduğum uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve deneyimleriyle yol gösteren sayın hocalarım Prof. Dr. Cengiz ÇETİN, Doç. Dr. Aydan KÖSE ve Doç. Dr. Yakup KARABAĞLI'ya; birlikte çalışma onuruna eriştiğim meslektaşlarım Op. Dr. Metin ARICI, Op. Dr. Emre KOÇMAN, Op. Dr. İdris ELMAS, Op. Dr. Ceyla ÖZBAYOĞLU, Dr. Tamer ŞAKRAK, Dr. Özgen KIVANÇ, Dr. Aydın TEKGÖZ, Dr. Ahmet KÖRMUTLU, Dr. Sezi MANGIR ve Dr. Özlem CEMBOLUK'a herşey için sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Akan, T.M. Sildenafil sitrat ve Eritropoetin'in sinir rejenerasyonu üzerine etkileri. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Plastik, Rekonstruktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı Tıpta Uzmanlık Tezi, Eskişehir, 2009. Periferik sinir sisteminde aksonal rejenerasyon kapasitesi bulunmasına rağmen, periferik sinir onarımını takiben tam fonksiyonel iyileşme nadir görülmektedir. Günümüzde, uygulanan mikrocerrahi tekniğin bir platoya ulaştığını kabul edebiliriz. Sinir onarımını takiben pekçok farmakolojik ajan denenmiştir. Ancak hiçbiri klinik uygulama aşamasına erişememiştir. Biz, bu çalışmamızda, ratlarda kesilme tipi siyatik sinir yaralanmalarını epinöral koaptasyonla onardıktan sonra, 30 gün boyunca, intraperitoneal yolla sildenafil sitrat ve eritropoetin uygulayarak, elde edilen yanıtı fonksiyonel ve histolojik açıdan değerlendirdik. Sonuçta, sildenafil sitrat'ın sinir rejenerasyonuna etkisinin, kontrol ve eritropoetin grubuna göre, istatistiksel olarak üstün olduğu görülmüştür. Sildenafil sitrat tedavisinin, sinir onarımı yapılan hastaların postop döneminde başarıyla uygulanabileceği düşünülmüştür.

Anahtar Kelimeler: periferik sinir yaralanması, eritropoetin, sildenafil sitrat, aksonal rejenerasyon, cGMP

ABSTRACT

Akan, T.M. Effects of Sildenafil Citrate and Erythropoietin on nerve regeneration. Eskişehir Osmangazi University Faculty of Medicine, Medical Speciality Thesis in Department of Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgery, Eskişehir, 2009. Despite the fact that peripheral nervous system has the capacity for axonal regeneration, full functional recovery is seldom seen after peripheral nerve repair. Currently, we can assume that, the applied microsurgical neurorrhaphy technique has reached its plateau. Several agents have been studied as an adjuvant to nerve repair but none has reached a clinical application stage. We, in this study, evaluated the response to sildenafil citrate and erythropoietin given intraperitoneally for 30 days after nerve repair in rats with lacerating type nerve injury, from functional and histological perspective. As a result, it has been seen that, the effect of sildenafil citrate on regeneration is statistically better than the control and erythropoietin groups. It is concluded that, sildenafil citrate therapy can be applied with success to patients who have undergone surgical nerve repair in the postoperative period.

Key Words: peripheral nerve surgery, erythropoietin, sildenafil citrate, axonal regeneration, cGMP

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
TABLOLAR DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Periferik Sinirlerin Anatomisi	3
2.2. Periferik Sinirlerin Kanlanması	4
2.3. Periferik Sinirlerin Fizyolojisi	5
2.3.1. Periferik Sinirlerde Bariyer sistemi	5
2.3.2. Akzoplazmik Taşıma	5
2.4. Periferik Sinir Yaralanmalarının Sınıflandırılması	6
2.5. Sinir Yaralanmasının Patofizyolojisi	7
2.5.1. Sinir Hücresi Gövdesi	7
2.5.2. Proksimal Segment	9
2.5.3. Distal Güdük	10
2.5.4. Schwann Hücre Proliferasyonu	11
2.5.5. Miyelinasyon	12
2.5.6. Rejenerasyonla İlişkili Moleküller	13
2.5.7. Aksonların Hedefi Bulması	14
2.5.8. Distal Reseptörler	15
2.5.9. Motor Son Plaklar ve Kas Lifleri	16
2.5.10. Duysal Reseptörler	16
2.5.11. Kortikal Reorganizasyon	17
2.6. Sinir Yaralanmalarında Cerrahi Tedavi Prensipleri	17
2.7. Sinir Onarımlarında Prognozu Etkileyen Faktörler	19
2.7.1. Yaş	19

2.7.2. Lezyonun seviyesi	19
2.7.3. Yaralanmanın tipi	19
2.7.4. Onarımın tipi	19
2.7.5. Zamanlama	19
2.7.6. Tecrübe	19
2.8. Sildenafil Sitratın Sinir İyileşmesinde Rolü	20
2.9. Eritropoetinin Sinir İyileşmesinde Rolü	22
3. GEREÇ VE YÖNTEM	27
4. BULGULAR	33
5. TARTIŞMA	40
6. SONUÇ	44
KAYNAKLAR	45

SİMGELER VE KISALTMALAR

Akt	protein kinaz B
ATP	adenozin trifosfat
ATPaz	adenozin trifosfataz
BDNF	beyin kökenli nörotrofik faktör
BrdU	bromodeoksiuridin
cAMP	siklik adenozin monofosfat
cGMP	siklik guanozin monofosfat
CGRP	kalsitonin genle ilişkili peptid
DRG	dorsal kök ganglionu
EGF	endotelyal büyüme faktörü
EMG	elektromiyografi
Epo	eritropoetin
Epo-R	eritropoetin reseptörü
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GAP	büyümeyle ilgili protein
GC	guanilil siklaz
GDNF	glial hücre kökenli nörotrofik faktör
GFR- α 1	glial kökenli nörotrofik faktör reseptörü
GSK-3	glikojen sentaz kinaz-3
GTP	guanozin trifosfat
IGF-1	insülin benzeri büyüme faktörü-1
Jak	janus tirozin kinaz
JNK	<i>Jun N-terminal kinase</i>
LPS	lipopolisakkarid
MAG	miyelinle ilişkili protein
MAPK	mitojen ilişkili protein kinaz
MEK	<i>Mitogen associated protein (MAP) kinase kinase</i>
MMP	matriks metallo proteinaz
mRNA	haberci ribonükleik asit
N-CAM	nöronal hücre adezyon molekülü

NMDA	N-metil-D-aspartat
NGF	sinir büyüme faktörü
NPY	nöropeptid Y
NO	nitrik oksit
NOS	nitrik oksit sentetaz
PDE	fosfodiesteraz
PKA	protein kinaz A
PKG	protein kinaz G
P0	protein sıfır
PI-3-K	fosfatidil inositol-3-kinaz
p75NTR	<i>common NeuroTrophin Receptor, 75 kDa</i>
STAT-5	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
SVZ	subventriküler zon
TIMP	dokudaki metalloproteinaz inhibitörü
Trk	tirozin kinaz
TuJ1	β -III-tubulin
VIP	vazoaktif intestinal peptid

ŞEKİLLER

	Sayfa
2.1. Duysal ve motor nöronların şematik görünümü.	4
2.2. Sinir yaralanmalarının sınıflandırılması	8
3.1. Ratın sağ uyluğunun cerrahi için hazırlanması.	28
3.2. Sağ uyluk posteriorundan yapılan insizyon.	28
3.3. Siyatik sinirin diseksiyonu	29
3.4. Siyatik sinirin kesilme tipi yaralanması.	29
3.5. Siyatik sinirin epinöral onarımı.	30
3.6. Çalışmada kullanılan yürüyüş yolu.	30
3.7. Geri çekme refleksinde kullanılan düzeneç	31
3.8. Yürüyüş yolu analizinde kullanılan değerler	31
4.1. Kontrol grubunda küçük büyütmede histolojik görüntü	35
4.2. Kontrol grubunda büyük büyütmede histolojik görüntü.	35
4.3. Kontrol grubunda uzunlamasına kesitin histolojik görünümü	36
4.4. Eritropoetin grubunda uzunlamasına kesitin histolojik görünümü.	36
4.5. Eritropoetin grubunda miyelin kılıfta görülen dejenerasyon	37
4.6. Eritropoetin grubunda küçük büyütmede histolojik görüntü.	37
4.7. Sildenafil sitrat grubunda histolojik görüntü.	38
4.8. Sildenafil sitrat grubunda uzunlamasına kesitin histolojik görüntüsü	38

TABLÖLAR

	Sayfa
4.1. Geri Çekme Refleksi Sonuçları	32
4.2. Yürüyüş Yolu Testi Sonuçları	32
4.3. Histolojik Değerlendirme	39

1. GİRİŞ

Periferik sinirler, aksonlarını rejenere etme ve distal hedef organları reinerve etme kapasitesine sahiptirler. Bu potansiyele rağmen, periferik sinir onarımlarını takiben olumsuz sonuçlar alınması, hayal kırıklıklarına neden olan bir problem olarak karşımızda durmaktadır. Sinir iyileşmesinin hücrel ve moleküler temeli ile ilgili ulaşılan bilgilere ve mikrocerrahi teknikteki gelişmelere rağmen, sinir yaralanmasını takiben tam bir fonksiyonel iyileşme nadir görülen bir durumdur. (1,2,3,9,11,16)

Periferik sinir yaralanması, başarılı bir rejenerasyon ve fonksiyonun geri kazanımını amaçlayan bir dizi moleküler ve hücrel yanıtı yol açar. Yaralı nöronda, hücrel travmayı ve stresi haber veren sinyalleri takiben, aksonal elongasyon için gerekli olan transkripsiyon faktörleri, adezyon molekülleri, büyüme ile ilişkili proteinler ve yapısal komponentlerin indüksiyonu gerçekleşir. Yaralı aksonun proksimal ucunda büyüme konileri belirir, hücrel metabolizma ve protein sentezi artışına bağlı olarak nöronal hücre gövdesi şişer, granüllü endoplazmik retikulum veya nissl sürüleri artıp bölgesel olarak sitoplazmada dağılırlar. Bu nöronal yanıtı, büyüme faktörleri, sitokinler, nöropeptidler ve nöron gövdesine ve akson boyunca periferik sinire komşu olan hücrelerde aktivasyonu sağlaması muhtemel olan hücrelerarası iletişimde görevli salgısal moleküllerdeki aktivasyon eşlik eder. (2,3,6,9,53)

Periferik sinirlerin başlıca yaralanma mekanizmaları gerilme, laserasyon ve kompresyondur. Bunların içinde en sık görüleni ise gerilme tipi yaralanmalardır. Periferik sinirlerin kollajen endonöryum tabakaları sayesinde gerilmeye, belli bir dereceye kadar dayanma kapasiteleri vardır. Bu kapasiteyi aşan traksiyon güçleri sinirde hasara yol açar. Genelde sinirin devamlılığının korunduğu hasar dereceleri görülürken, brakial pleksus avulsiyonu gibi tamamen devamlılığın bozulması da görülebilir. (1,2,7) Laserasyonlar; bıçak, cam ve benzeri kesici aletlerle oluşan yaralanmalardır. Ciddi sinir yaralanması vakalarının %30'unu oluştururlar. (1,10,13)

Kompresyon tipi yaralanmalarda, nöronal elemanlar yırtılmamıştır. Kompresyon tipi yaralanmalar iki temel patolojik mekanizmayla total motor ve duyu kaybına yol açabilir. Bu iki temel patolojik mekanizma şunlardır: 1) Mekanik

kompresyon 2) İskemi. Kalın miyelinli lifler, ince miyelinsiz liflere göre iskemiye daha duyarlıdır. (1,3,16)

Sildenafil sitrat, erektil disfonksiyonun oral tedavisinde kullanılan bir fosfodiesteraz 5 inhibitörüdür(18). Eritropoetin, hipoksiye yanıt olarak eritrositer seri hücrelerinde artışa yol açan glikoprotein yapıda bir hormondur (21). Her iki ilaç da klinikte ilk kullanılmaya başladıkları endikasyonlar dışında çeşitli farklı endikasyonlarda da ümit veren sonuçlar elde edilmiş olan pleiotropik (çok yönlü etkili) ajanlardır. Literatürde, her iki ajan için de, sinir dokusuna yönelik olumlu etkiler gösterdikleri yönünde yayınlar bulunmaktadır. Biz de, bu deneysel çalışmamızda 21 adet ratta kesilme tipi siyatik sinir yaralanması oluşturarak, ucuca sinir onarımı sonrası intraperitoneal yolla verilen Sildenafil sitrat ve Eritropoetin'in periferik sinir iyileşmesine etkilerini araştırdık.

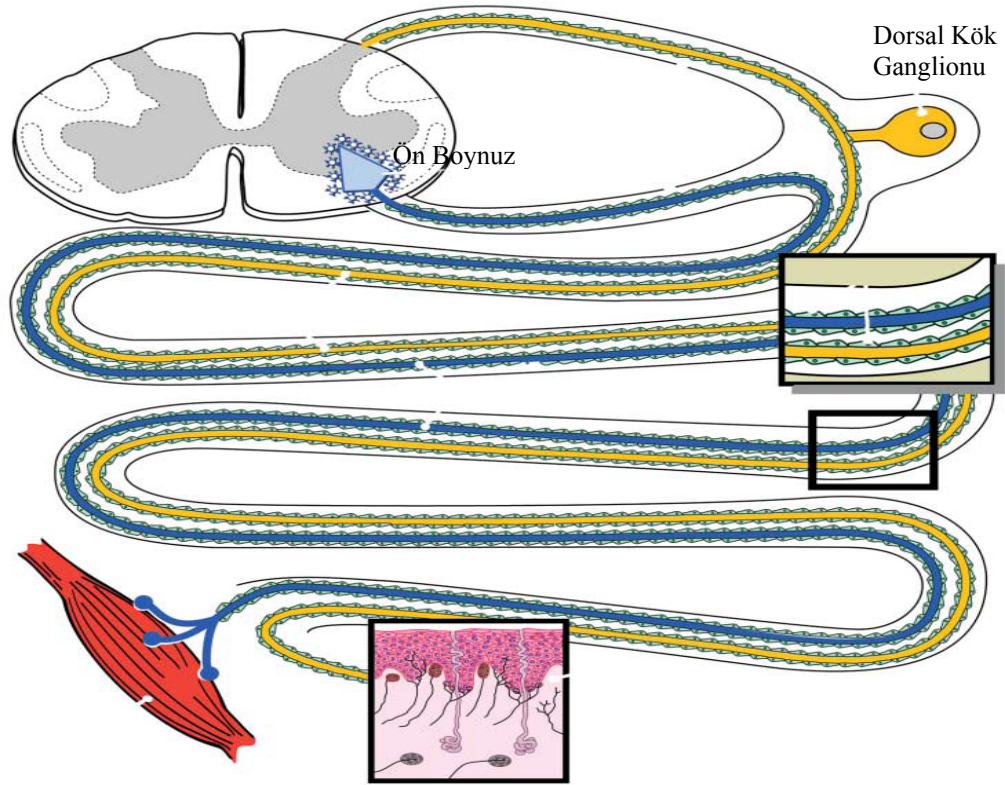
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Periferik Sinirlerin Anatomisi

Periferik Sinirlerin 4 temel komponenti mevcuttur. Bunlar; nöronlar, Schwann hücreleri, bağ dokusu ve son organlardır. Periferik sinirlerin primer fonksiyonel birimleri, nöronlardır. Nöronlar, hücre gövdeleri ve aksonlardan oluşur. Aşağı motor nöron hücre gövdeleri ve presinaptik sempatik ganglionlar, medulla spinalisin ön boynuzunda yerleşiktir. Aşağı motor nöron gövdesinden çıkan aksonlar, ön spinal köklerde spinal sinirlerle birleşip vertebral foramenden çıkarlar. Motor sinir lifleri, kaslardaki sinir-kas bileşkelerinde sonlanırlar. Presinaptik sempatik liflerin aksonları, sempatik ganglionlara gider. Postsinaptik sempatik nöronların aksonları, perifere giderek kan damarları, deri ve kıl foliküllerini innerve eder. Duysal hücre gövdeleri arka kök ganglionlarında yerleşiktir ve aksonları spinal sinirlerle kaynaşip sonuçta duysal son organlarla birleşirler. (3,12)

Motor ve duysal sinirlerdeki sinir lifleri 4:1 oranında miyelinsiz ve miyelinli liflerden oluşurlar. Miyelinsiz liflerde, çok sayıda aksonu tek bir Schwann hücresi sarmalar. Miyelinli liflerde ise, her lif tek tek bir Schwann hücresi tarafından sarılıdır. Miyelinsiz aksonlar, elektriksel uyarıları saniyede 2-2.5 metre hızla iletirler. Miyelinli liflerde bu ileti saniyede 3-150 metredir. Bu hız, saltator iletimle sağlanır. Bir Ranvier düğümündeki depolarizasyon, takip eden düğümde ikinci bir depolarizasyonu gerçekleştirir. (3,12,15)

Miyelinli ve miyelinsiz aksonlar birleşerek, fasikül adı verilen demetleri oluştururlar. Her fasikül içinde, endonöryum diye bilinen, gevşek kollajen içeren bağ doku matriksi bulunur. Her bir fasikülü perinöryum olarak bilinen bir bağ doku tabaka çevreler.(3,12,13) Perinöryum fasikülü saran yassı perinöryum hücreleri ve longitudinal kollajen liflerinden oluşan sağlam bir bağ dokusudur. Merkezi sinir sistemi zarlarından araknoid ile ilişkilidir.(9) Sinir fasikülünü mekanik travmalara karşı korur. Sinir fasikülü içinde sabit bir basınç sağlayarak, optimum çevre şartlarını oluşturur. Perinöryum bütünlüğünü kaybettiğinde sinir fasikülleri dışarı doğru fıtıklaşırlar. Proteinler gibi maddelere karşı spesifik difüzyon bariyeri olarak fonksiyon görür. Siniri, toksik ve enfeksiyöz faktörlerden koruyan tabaka, perinöryumdur.(6,9)



Şekil 2.1. Duysal ve motor nöronların şematik görünümü.

Fasiküller arasında, internal epinöryum adı verilen bir bağ doku tabaka mevcuttur. Tüm siniri çevreleyen epinöryuma, eksternal epinöryum denilir. Eksternal epinöryum, sinirin çevresinde kuvvetli, gevşekçe organize olmuş, siniri anatomik olarak tanımlayan bir kılıf olarak görülür ve sinir onarımını kolaylaştırır. (3)

Mezonöryum, epinöryum ile çevre doku arasındaki, gevşek areolar dokudur. Sinirlere, segmental kan akımı, mezonöryum aracılığıyla gelir.

2.2. Periferik Sinirlerin kanlanması

Periferik sinirler segmental, eksternal kanlanma ve intrinsik, longitudinal kan desteklerine sahiptirler. Periferik sinir kanlanması 3 paternden birine ait olacak şekilde sınıflandırılır: 1) Dominant bir pedikülü olmayan segmental kanlanma, 2) sinirle birlikte longitudinal devam eden tek bir dominant pedikül , 3) sinirin seyri boyunca multiple dominant pediküller. Bu damarlardan vasa nervorum'a akan kan, mezonöryumdan sinire girer ve epinöral boşluğa ulaşır. Bu noktadan itibaren, pleksuslar oluşur. Epinöryum ve perinöryumda, longitudinal olarak *nutrient*

damarlar seyredir. Endonöryum seviyesinde ise, sadece ince kapiller ağ mevcuttur. Venöz drenaj, arterioler desteğe paralel olarak seyredir. (3)

Sinirlerde, belirgin intrinsik kan akımı vardır. İntrinsik kan akımının, bir siniri, oldukça uzun mesafeler boyunca besleyebileceği gösterilmiştir. Bu özellik sinirlerin ekstensif mobilizasyonuna izin verir. (3)

2.3. Periferik Sinirlerin Fizyolojisi

2.3.1. Periferik Sinirlerde Bariyer Sistemi

Periferik sinirler çevrelerinden, kan-beyin bariyerinin benzeri olan bariyerlerle korunurlar. Bu bariyerler şunlardır:

- 1) perinöral difüzyon bariyeri (perinöral hücreler arasındaki sıkı bağlantılar)
- 2) kan-sinir bariyeri (endotelyal hücreler arası sıkı bağlantılar)
- 3) paranodal bariyer (miyelin lupları ve paranodal akzolemma arasındaki sıkı bağlantılar).

Perinöryumun iç ve endonöryumun endotelyal hücre tabakaları kan-sinir bariyerinin iç ve dış yüzünü oluştururlar. Bu özelleşmiş endotelyal hücreler, periferik sinir liflerinin iç ortamını sürdüren sıkı bileşkeler içerirler. Kan- sinir bariyeri, endonöral ortama, bir dereceye kadar immünolojik kalkan görevi görür. Endonöral ve perinöral boşlukta lenf damarları yoktur ve bir enfeksiyon durumunda, perinöryum invazyona karşı kuvvetli bir bariyer görevi görür. Travma sonucu bu bariyerin bozulması, daha önceden korunulmuş olan antijenlere karşı bir enflamatuvar yanıtın tetiğini çekerek lenfositler, makrofajlar ve fibroblastların perinöral boşluğu doldurmasına neden olur, ardından enflamasyon ilerler ve sonuçta skar oluşur. (3,11)

2.3.2. Akzoplazmik Taşıma

Akson içinde antegrad yönde hem hızlı, hem yavaş taşıma sistemleri, retrograd yönde ise sadece hızlı taşıma sistemi mevcuttur. (3,6,11)

Yavaş antegrad taşıma sistemiyle tubulin, aktin gibi major yapısal proteinler ve mikrotübül, nörofilament ve mikrofilament komponentleri taşınır. Bunlar, aksunun büyüme ve devamlılığını sağlamanın yanı sıra, rejenerasyon için gereklidirler. Yavaş antegrad transport hızı hemen hemen, rejenerasyon hızına eşittir. Yavaş taşıma, ATPaz'dan bağımsız olarak çalışır ve günde 1-6 mm hızla işler. (3,6,11)

Hızlı antegrad taşıma ise, günde 50-500 mm hıza ulaşır ve ATPaz'a bağımlıdır. Hızlı antegrad sistemle taşınan maddeler: düz endoplazmik retikulum, glikoproteinler, fosfolipidler, nörotransmitterler, nöropeptidler, sinaptik veziküller ve sinaptik veziküllerin yenilenmesi için gerekli enzimlerdir.(3,6,11)

Mitokondri orta hızda antegrad yönde taşınır, aksona ATP sağlar ve aksoniçi kalsiyum düzeyini düzenler.(11)

Günde 240 mm hıza ulaşan hızlı retrograd taşıma da ATPaz'a bağımlıdır.. Hızlı retrograd taşınmada internal membran sisteminin hareketi gözlenir. Multiveziküler cisimler gibi lizozomal sistem vezikülleri bu yolla taşınır. Veziküller, sinir ucunda oluşan artık maddeleri tekrar işlenmek üzere hücre gövdesine taşınır. Distal sinir-kas bileşkelerinden ve Schwann hücrelerinden salınan nörotrofik faktörler de hızlı retrograd yolla taşınır.(3,6,11,44,99)

Normal şartlarda düşük düzeyde sentezlenen proteinlerin, aksonların büyüme ve rejenerasyon dönemlerinde, gen regülasyonu sonucu, büyük miktarlarda sentezlendiği gösterilmiştir. Bu proteinler, aksonal uçlara aksonal taşıma ile iletilir ve membranın yapısına katılırlar. Bu proteinlere büyüme ile ilişkili proteinler (GAP) adı verilmiştir. Molekül ağırlıklarına göre GAP-24, -33, -43 ve -50 olarak adlandırılırlar. GAP -24, -43 ve -50 membran proteinleridir ve hızlı aksonal akımla taşınırlar. Özellikle GAP-43, aksonların büyümesiyle ilgili bir proteindir. Sinir büyüme konisinin ana yapısal proteini olup, gelişme ve rejenerasyon dönemlerinde düzeyi değişir. (9,38)

2.4. Periferik Sinir Yaralanmalarının Sınıflandırılması

Periferik sinir yaralanmaları, etkiledikleri komponentlere göre Seddon ve Sunderland tarafından sınıflandırılmışlardır. Bu sınıflamalar, tedavi yaklaşımı ve prognozu belirlemede faydalı oldukları için, günümüze kadar geçerliliklerini sürdürebilmişlerdir.(1,4,9,13,15,62,92)

Seddon, periferik sinir yaralanmalarını nörapraksi, aksonotimezis ve nörotimezis olarak üçe ayırmıştır:

1) Nörapraksi : Sinirin anatomik bütünlüğü korunmuştur. Fonksiyonunda geçici bir bozukluk olmuştur. Wallerian dejenerasyon oluşmaz ve fonksiyon tamamen geri döner.

2) Aksonotimezis : Sinirin devamlılığı vardır, ancak akson ve miyelin kılıfı kesintiye uğramıştır. Wallerian dejenerasyon gelişir, ancak endonöral tüp sağlam olduğu için spontan rejenerasyon olur.

3) Nörotimezis : Sinirin bütünlüğü tamamen bozulmuştur. Wallerian dejenerasyon olur. Spontan rejenerasyon beklenmez. Cerrahi olarak tedavisi şarttır.

Sunderland sınıflandırmasına göre sinir yaralanmaları beş dereceye ayrılmıştır. 1. derece Seddon'un nörapraksisine uyar, tamamen reverzibildir. 2. derece yaralanma aksonotimezis'e uyar. 3. derecede akson ve endonöryum, 4. derecede akson, endonöryum ve perinöryum hasarlıdır. Epinöryum sağlamdır. 5. derecede ise tüm komponentler hasarlıdır ve Seddon'un nörotmezisine uyar.

Sunderland sınıflandırmasına, Mackinnon tarafından bir ilave yapılmış ve sinirin seyri boyunca, birden fazla yerinde, farklı dereceli yaralanmalar olması 6. derece olarak isimlendirilmiştir. (5-10,13-15,17) (Şekil 2.1)

2.5. Sinir Yaralanmasının Patofizyolojisi

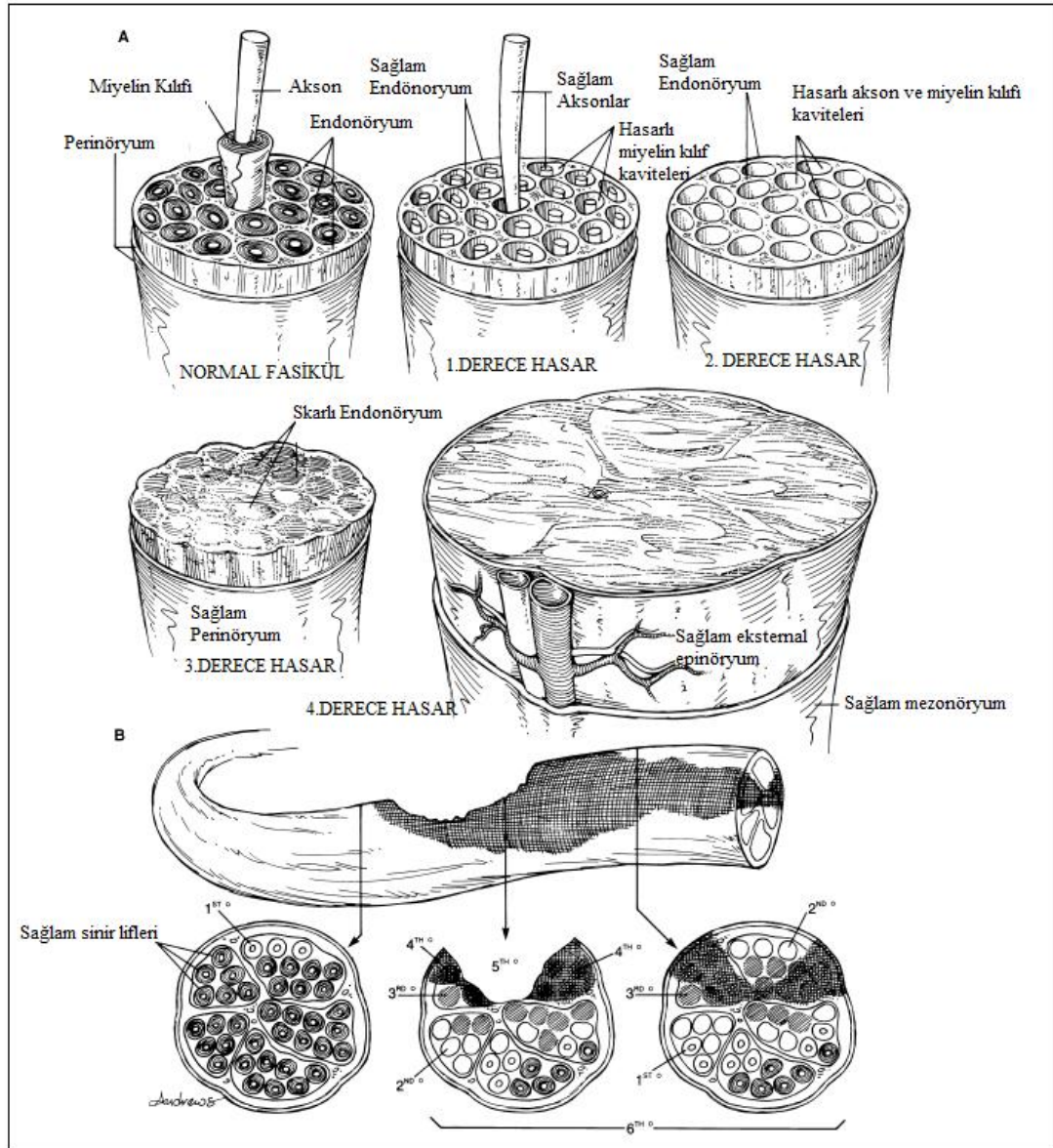
Periferik sinirler, rejenere olma ve distal hedeflerini reinnerve etme yeteneğine sahiptirler. Bununla beraber sinir rejenerasyonunu anlama ve mikrocerrahi tekniklerdeki gelişmelere karşın, tam bir fonksiyonel iyileşmeye nadiren erişilebilmektedir. Sinir rejenerasyonu süreci çok kompleks bir süreçtir ve pek çok faktörden etkilenmektedir. Periferik sinir kesildiğinde, sinir hücresi gövdesinde, kesinin proksimali ve distalinde ve son organlarda kompleks değişiklikler oluşur. Öncelikle, hücre gövdesi, bu yaralanmayı atlattıktan sonra rejenerasyonu başlatabilmelidir. İkinci olarak, yaralanmanın distalindeki güdük, rejenerasyonu destekleyen bir büyüme ortamı sağlamalıdır. Üçüncü olarak rejenere aksonlar uygun distal hedefi reinnerve etmelidirler. Son olarak distaldeki hedef denervasyondan kendini kurtarabilmelidir. (3,4,11,55,59,95)

2.5.1. Sinir Hücresi Gövdesi

Sinir yaralanmasını takiben, sinir hücresi gövdesi ya yaralanmaya bağlı hücre ölümüne uğrar ya da normalde nörotransmitter üretim ve geridönüşümünü gerçekleştiren bir hücre iken, onarım işine odaklanmış bir hücreye dönüşür.

Bir periferik sinirin kesilmesi, bu sinirin hücre gövdesinde apoptoz sonucu hücre ölümüne yol açabilir. Yaralanma sonrası nöronun sağkalımını etkileyen

faktörler; yaş, nöronun tipi ve lezyonun gövdeye uzaklığıdır. Olgun erişkin nöronlar, immatür gelişmekte olan nöronlara göre; spinal motor nöronlar, kranyal motor nöronlara göre; distalden yaralanan nöronlar, proksimalden yararlananlara göre daha yüksek sağkalım kapasitesine sahiptirler. Motor nöronlar duysal nöronlara göre daha dirençlidir. (11-17)



Şekil 2.2. Sinir yaralanmalarının sınıflandırılması (15)

Apoptozun en önemli nedeni, nörotrofik faktörlerden yoksun kalmaktır. Bu nörotrofik faktörler; glial hücreler, fibroblastlar, makrofajlar, hedef dokular ve yaralanmış sinirin distal güdüğü tarafından salınmaktadır. Nörotrofik faktör

tedavisinin apopitozu engellediği gösterilmiştir. Nörotrofik faktörlerin çoğu, ortak yollarını kullanarak etki eder. Nörotrofinler için, p75 ve Trk reseptörleri arasında, bir çapraz etkileşim olduğu gösterilmiştir. Nörotrofinler antiapopitotik etkilerini, Trk reseptörlerini uyararak gösterirler. Trk sağkalımı en az iki yolla artırır. 1- Ras / PI-3K / Akt aracılığıyla apopitozu baskılar, 2- MEK / MAPK aracılığıyla antiapopitotik proteinleri aktive eder. p75 reseptörü ise JNK-p53-bax veya NRIF içeren hücre ölümü yollarını aktive ederek apopitozu uyarır. Bu yolda, p53 ve bax, apopitozu indükleyen kaspaz proteinlerini aktive eder. Çeşitli kaspaz tipleri arasında, hücre ölümü ile en çok ilgisi olanlar, kaspaz-3 ve kaspaz-9 dur. (3,4,11,16,17,44,99)

Hayatta kalan nöronlar, hücrenin onarım moduna geçtiğini gösteren, belirgin morfolojik ve kromatolitik değişikliklere uğrarlar. Nöron çekirdeği lokalizasyonu değişerek periferik yerleşir. Nükleolus büyür. Nissl cisimcikleri erir. Hücrenin metabolik aktivitesi hücre iskeleti proteinlerini sentezlemeye yönelerek, nörotransmitterlerin çoğunun üretimi azalır, bazı nörotransmitterlerin üretimi ise artar. Bunların aksotomize nöronların hayatta kalmasına ve rejenerasyon olmasına katkıda bulunduğu gösterilmiştir. Aksotomize nöronlardaki bu dönüşümün nedeni bilinmemekle birlikte, nörotrofik faktörlerdeki azalmanın bu dönüşümde rol oynadığı düşünülmektedir. (3,4,11,16,17)

2.5.2. Proksimal Segment

Distal güdükte oluşan tam dejenerasyonla kıyaslandığında proksimalde daha sınırlı bir segmentte dejenerasyon olur. Eğer, hücre gövdesi yaşamını sürdürürse, proksimal akson, genellikle ilk ranvier düğümüne kadar, dejenerasyon olur. Yenidoğan travması ve proksimal sinir yaralanması gibi ciddi durumlarda, daha proksimal dejenerasyon görülebilir. (3,4,12,97)

Yaralanmadan sonra saatler içinde GAP-43 ve tubulin gibi büyüme ile ilişkili moleküllerde üretim artışı olur. Substans P, VIP, galanin, NPY ve CGRP gibi peptidlerin düzenlenmesi artar. 24 saat içinde, yaralanmanın proksimalindeki ilk Ranvier düğümünden, rejenerasyon tomucuklanmaları oluşur.(39,49) Bu tomucukların ucunda, Schwann hücre bazal laminası için afinitesi olan büyüme konileri oluşur. Distal ortam uygun değilse, bu tomucuklanmalardan oluşan dallar büyümeye devam eder ve birbiri etrafına spiral gibi sarılıp nöroma oluşumuna yol açar. (3,4)

Destekleyici distal çevre varlığında, aksonal tomurcuklar daha distale ilerler ve bir rejenerasyon birimi oluşturur. Büyüme konisinden, aksonal rejenerasyon hızı günde 1-3 mm.ye ulaşır. Sinir rejenerasyonunda hız kısıtlayıcı komponent; aktin, tubulin ve nörofilamentlerin aksonal taşınmasıdır. (3,4,11-14,54)

Büyüme konileri oluştuğunda, rejenere olan aksonlar, bazal lamina boyunca proksimal güdükte uzarlar ve lezyon bölgesini döşeyen fibrotik skara ulaşırlar. Bu olay travma sonrası ilk 24 saatte gerçekleşir. Elongasyon başlangıçta yavaştır. Üçüncü günün sonunda elongasyon hızı artar. Aynı bazal lamina tüpünün içine birkaç tane akson birden rejenere olabilir. Lezyonu döşeyen fibrotik skarın penetrasyonu aksotomiyi izleyen 2-3 gün içinde gerçekleşebilir. (11,12)

Büyüme konileri, hücre dışı matriksin içinde uzamak için proteazları kullanır. Bazal lamina tüpleri akson büyümesini destekleme kapasitesine sahiptir. Rejenere aksonlar, Schwann hücre yokluğunda bile boş bazal lamina tüpleri içine büyür. Ancak daha yavaş ve daha kısa mesafelerde bunu gerçekleştirebilirler. Rejenere olan akson, bazal lamina tüpüne ulaştığında, büyümenin sürmesi, Schwann hücresi ve destekleyici hücre dışı matriksi içeren tüplerde daha kolay olacaktır. (11,12,17)

2.5.3. Distal Güdük

Distal güdükte, yaralanmayı takiben, aksonal rejenerasyonu desteklemek üzere kompleks değişiklikler oluşur. Bu değişiklikler, Wallerian dejenerasyon, Schwann hücre proliferasyonu ve değişimi ve rejenerasyonla ilişkili moleküllerin *upregülasyonu*dur. (1-17,45)

Periferik sinir rejenerasyonunun başarısı distal güdükteki büyüme ortamına bağlıdır. Aksotomi sonucu nükleusla ve diğer esansiyel hücresel sentez altbirimleriyle bağlantısı kesilen distal segmentte Wallerian dejenerasyon ortaya çıkar.(1-17)

Schwann hücreleri sinir kesisini takiben, bir hücre içi değişim geçirir ve proliferasyon, mRNA sentezi ve morfolojik değişimleri içeren bir reaktif evreye girer. Bazal lamina tüpleri içindeki miyelin, yıkıma uğrar ve bir iki hafta içinde fagosite edilir. Akson artıkları ve miyelin kılıf artıkları, proksimal güdükten aksonal büyümeyi fiziksel ve direk olarak inhibe ettikleri için ortadan kaldırılmaları önemlidir. Henüz makrofaj invazyonunun minimal olduğu ilk iki gün boyunca fagositozu Schwann hücreleri başlatır. Bu süreci takiben, bozulmuş kan-sinir

bariyerinden makrofajlar sahaya göç eder. Bu yıkımı başlıca yürüten hücre, sahayı 2-3 gün sonra infiltre eden makrofajlardır. Schwann hücreleri ve fibroblastlar da bu sürece katkıda bulunur. (3) Geride kalan boş bazal lamina tüpleri Schwann hücrelerinin proliferasyonu ve aksonların rejenerasyonu için yol göstericidir. Distal güdükteki Schwann hücreleri, sitoplazmik uzantılar oluşturarak, tüplerin içini döşer. Bu yapıya Büngrer bantları (Schwann hücre kolonları) adı verilir. Bunlar, aksonların büyümesi için gereklidir.(1-17)

Schwann hücreleri, nörotrofik faktörler için reseptörler (p75 ve GFR α -1 gibi) içerirler. Bu bakımdan nörotrofik faktör tedavileri, Schwann hücrelerinin rejenerasyonu uyarma kapasitelerini etkileyebilirler. Schwann hücreleri hem büyüyen aksonları hem de komşu Schwann hücrelerini etkileyen nörotrofik faktörler üretirler ve salgırlar. Zaman geçtikçe bu sentez yeteneği azalır. Bu yüzden Schwann hücrelerinin aksonal rejenerasyonu uyarma kapasiteleri, zaman içinde azalır.(1-17,31,32,44,48)

2.5.4. Schwann Hücre Proliferasyonu

Travma öncesi mitotik olarak sessiz olan Schwann hücreleri, çeşitli faktörlerin etkisi altında çoğalmaya başlarlar. Schwann hücre proliferasyonu yaralanmadan 3 gün sonra pik yapar ve başlıca yaralanmanın distalinde gerçekleşir. Ancak proksimal güdükte de bir miktar Schwann hücre proliferasyonu olur. Proksimal güdükteki Schwann hücreleri, rejenere olan aksonla beraber distale göç ederler. Makrofajlarca salınan büyüme faktörleri ve sitokinler, Schwann hücreleri ve fibroblastların proliferasyonunu uyarır. Aynı zamanda, aksonal temasın olmaması da proliferasyonu uyaran bir faktördür. Ayrıca Schwann hücreleri fenotip değişikliğine uğrayıp nonmiyelinizan hale dönerler. Bu nonmiyelinizan Schwann hücrelerinin varlığı distal güdükte aksonal büyümenin sağlanabilmesi için şarttır. (3,4,11,48,60)

Schwann hücreleri sinir büyüme faktörü (NGF), nörotrofin 4/5, beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF), epidermal büyüme faktörü (EGF), insülin benzeri büyüme faktörü I ve II (IGF-1 ve 2) ve glial kaynaklı nörotrofik faktör (GDNF) gibi çeşitli büyüme faktörleri ve çeşitli nörotrofin reseptörleri de üretmeye başlarlar. Schwann hücre sütunları hem temas rehberliği, hem de büyüme faktörleri salınımı aracılığıyla proksimaldeki sinir büyüme konisini distale çekerler. Sinirin büyümesi, ancak Schwann hücre migrasyonu tamamlandıktan sonra mümkün

olabilir. Schwann hücreleri, hücre adezyon molekülleri ve bazal membran komponentlerinin *upregulasyonunu* da sağlar ve aksonal büyüme konilerinin temas rehberliğine yardımcı olurlar. (1,3,4,11,48)

2.5.5. Miyelinasyon

Rejenerasyon sürecinde bir diğer kritik basamak, rejenere olan aksonların Schwann hücreleri tarafından miyelinasyonudur. Aksonlar, distal güdüğe doğru ilerleyince, miyelinasyona uğrar. Miyelinasyonu başlatan olay aksolemma ile Schwann hücreleri arasındaki temastır. Bununla beraber, bu remiyelinasyona rağmen, iletim hızı hala yavaştır. Bu yavaşlık, Schwann hücre sayısında artma sonucu miyelin kılıfları arasındaki internodal mesafelerin kısalmasıyla açıklanmaktadır. Schwann hücreleri başlangıçta pek çok aksonu sarar. Daha sonra, şayet akson miyelinlenecekse, bire bir sarmalamaya geçerler. Bazal lamina tüpleri bu süreçte zamanla yıkıma uğrar ve Schwann hücreleri kendi bazal laminalarını oluşturmaya başlar (11).Miyelin, rejenere olan aksone, uygun iletim için gerekli yalıtımı sağlar. Miyelinlenememek, ya da yetersiz miyelin kalınlığı, iletkenlikte düşük seviyeye yol açar. Böylece fonksiyonel iyileşmenin yetersiz kalmasına neden olur. Miyelinasyonla ilgili moleküller, örneğin miyelin ilişkili glikoprotein (MAG) ve P0, miyelinasyon üzerine *upregüle* olurlar ve başlangıçtaki rejenerasyon aşamasında daha küçük bir rol oynarlar. Bununla beraber, miyelinle ilişkili proteinler, özellikle MAG, periferik sinirde aksonal rejenerasyon üzerine inhibitör etki gösterir. Miyelinasyon yapan Schwann hücreleri, proliferasyondaki piklerine, miyelinasyon yapmayan Schwann hücrelerinden bir gün sonra ulaşırlar. Daha sonra aksonlar distal güdükte proliferasyon olurken, ikinci bir proliferasyon fazı gerçekleşir. Rejenere aksone, normale oranla daha fazla sayıda Schwann hücresi ve internodlar arasında normale göre daha kısa mesafeler ortaya çıkar. Bu da iletim hızını yavaşlatan bir durumdur. Zamanla *remodeling* oluşur, internodal mesafeler artar, miyelin kalınlaşır ve iletim hızı artar. (3,4,11) Ratlarda sinirde ezik sonrası yaralanmadan 2 hafta sonra, yeni oluşmuş miyelin saptanabilir. Aksonların, Schwann hücrelerince, her Schwann hücresi tek bir aksonu miyeline edecek şekilde yönlendirilmeleri iki farklı hücre tipi arasında iki taraflı iletişimi gerekli kılar. Bu yüzden, hedeften köken alan maddeler, rejenerasyon sonrası miyelinasyon oranını etkileyebilirler. Başta GDNF ve NGF olmak üzere, değişik büyüme faktörleri'nin

miyelinasyon oranını etkilediği gösterilmiştir. Aksonlarla Schwann hücreleri arasında, nörogulinler ve nörotrofik faktörler salgılanmasıyla hızlı bir iletişim kurulduğu gösterilmiştir. Bu iletişim, rejenerasyon esnasında nöron ve glia arasında büyük bir öneme sahip yeni bir etkileşim olasılığını ortaya çıkartmaktadır. (11,44,99)

2.5.6. Rejenerasyonla İlişkili Moleküller

Pekçok molekül, direk olarak veya nonnöronal hücelere etki ile dolaylı olarak aksonal rejenerasyona katkıda bulunur. Bu maddeler, nörotrofik ve nörotropik faktörleri, hücre adezyon moleküllerini ve ekstraselüler matriks proteinlerini içerir.

Nörotrofizm ; yeni veya rejenere olmakta olan nöronun ve aksonal uzantısının rejenere aksonun maturasyonu ve nutrisyonunu sağlayacak faktörlerce desteklenmesi fenomenidir. Nörotrofinler; NGF, beyin kökenli nörotrofik faktör (BDNF), nörotrofin 3 ve nörotrofin 4/5 'i içerir. Bu faktörler, yüksek afiniteli tirozin kinaz reseptörlerine ve düşük afiniteli bir NGF reseptörü olan p75'e bağlanırlar. Nöronal rejenerasyondaki rolleri, muhtemelen Schwann hücrelerinin migrasyon ve aksonal projeksiyonlara adezyonunu uyarmak şeklindeki dolaylı bir etkidir. Bunlar dışında, insülin benzeri büyüme faktörü I ve II, fibroblast büyüme faktörleri, trombosit kökenli büyüme faktörü ve glial kökenli büyüme faktörü gibi diğer pek çok büyüme faktörü de araştırılmıştır. Bu faktörlerin direk olarak nöronal aktiviteyi etkilemekten ziyade, büyüme ortamını etkileyerek aksonal rejenerasyonu arttırdığı yönünde kanıtlara ulaşılmıştır. (3,4,37,44,96,99)

Nörotropizm ise; bunlarla ilişkili bir kavram olup, rejenere olan aksonların diffüze olan veya sabit faktörler tarafından, hedefe yönlendirilmeleri fenomenine verilen isimdir. Mackinnon ve Dvali (3) 'nin belirttiğine göre ilk kez 1898'de Forssman kemotaksi yoluyla böyle bir yönlendirilme konseptini öne sürmüştür. Bu teoriye destek, yaralanmış aksonların proksimal uçlarından aksonların kıvrılan rotalar izleyerek distal sinir uçlarına doğru ilerlediğini gösteren Ramon y Cajal'dan gelmiştir. (3,4,35)

Akson büyümesini hızlandıran mekanizmalar çok yönlü ve karmaşıktır. Pekçok yol gösterici molekül de bu mekanizmalara katkıda bulunur.(49,51,57,93) Aksonları çeken veya iten, büyüme substratı olarak görev yapan veya bir şekilde büyüme konisinin navigasyonunu etkileyen maddelerin sayısı sürekli artmaktadır. Aksonlar ile farklı rehberlik molekülleri arasındaki etkileşim çok

karmaşıktır.(61,63,91) Temel olarak aksonların büyümesi, yapıştıkları substratlar ve yüzeylerinde bağlayabildikleri moleküllerce belirlenir. Akson büyümesini destekleme kapasitesine sahip olan bazal lamina tüpleri, başlıca laminin, kollajen IV ve nidogen içerirler. Primer olarak, aksonla bazal lamina temasını sağlayan aracı olay laminin-integrin bağlanmasıdır. Lezyon aralığında büyümekte olan aksonun ucu farklı proteoglikanlar, kollajenler, fibronektin, lamininler ve tenaskinler gibi, ya inhibe edici, ya da uyarıcı, rehberlik fonksiyonu gösteren hücre dışı matriks molekülleri ile karşılaşır. Stimülasyon veya inhibisyonun hücre dışı sinyallerine aracılık eden RhoGTPazlar dahil pekçok sinyal ileti basamağı mevcuttur. (3,4,11,31,32,40,98)

Elongasyon, ekstraselüler matriks ve Schwann hücre içeren endonöral tüpler boyunca gerçekleşir. İmmünglobulin süper ailesi (N-CAM, L1, P0), nörogulinler ve kadherin süper ailesi (N-Kadherin, E-Kadherin) gibi çeşitli farklı moleküller, Schwann hücreleri ile aksonlar arası temasa aracılık eder. Distal güdük gibi bir yol gösterici yapı yoksa nöroma oluşur. Akson, distal güdükte Schwann hücre kolonları ve bazal lamina tüpleri boyunca ilerler. Aksonlar, bazal lamina tüpleri dışında hücre dışı matrikste uzun mesafeler katedemezler. Bunun nedeni yoğun hücre dışı matriksi penetre edememeleri veya bir büyüme substratına bağlanamamalarıdır.(11,46)

2.5.7. Aksonların Hedefi Bulması

Rejenere olan aksonların hedeflerini ne dereceye kadar başarı ile reinnerve ettiği net değildir. Rejenerasyon başarılı olsa da aksonların hatalı yönlendirmeleri ve hiperinnervasyon görülebilir. Bu durum periferik sinir yaralanması sonrası fonksiyonel iyileşmenin tam olmamasında önemli pay sahibidir. (31,32,54)

Aksonun, hedefe nasıl yönlendiği konusunda günümüzde ortak bir görüş yoktur. Bazı araştırmacılar, rastgele bir yönlendirmeden söz ederken, bazı araştırmacılar da tercih edilen bir hedefe yönlendirmeden söz eder. Motor ve duysal aksonlar, farklı distal güdükler arasında bir dereceye kadar ayırım yapabilirler. Böylece motor aksonlar tercihen kas sinir liflerinde rejenere olurken, duysal aksonlar kutanöz sinir dallarında rejenere olurlar. Motor nöronların, tercihen kasları hedef aldığı da bildirilmiştir. Bazı araştırmacılar ise, hedefi tutturamayanların budanarak feda edilmesi sonucu doğru reinnervasyonun yapıldığını önermektedirler. Yanlış yönlendirilmiş kollateral akson dallarının varlığı bu görüşü desteklemektedir. (11,31,32)

Lokal kas düzeyinde motor aksonlar, tercihen eski sinaps yerlerini reinnerve ederler. Bunu sağlayan, Schwann hücreleri ve fibroblastların eski sinaps bölgelerinde çekici rehberlik molekülleri oluşturmalarıdır. Ek olarak, aksonlar, spesifik sinaptik bazal laminayı cazip büyüme substratı olarak tanırken, ekstrasinaptik membran cazip gelmemektedir. Eski sinaps bölgesine ulaşım engellenirse, yeni ektopik sinapslar oluşur. (3,4,11)

Proteazlar aksonlara ekstraselüler matriks içinde büyüme olanağı sağlar. Rejenerasyonun sağlığı için, proteazlar ve inhibitörleri arasındaki düzenleme önemlidir. Bu sisteme, sinir rejenerasyonunu uyaracak şekilde müdahale etmek sinir yaralanması tedavisinde yeni bir yaklaşımdır. Bazı proteazlar TNF- α aktivasyonunda görevlidirler ve inhibe edilmeleri, nöropatik ağrının olası tedavisi olarak önerilmiştir. (9-12)

Sinir sisteminde önemli proteazlar arasında matriks metalloproteinaz-2 (MMP-2) ve MMP-9 vardır. Periferik sinir yaralanmasından sonra her ikisi de *upregüle* olur. MMP-2 aktivitesi yavaşça (iki haftada) artar, distal güdükte lezyon bölgesinden distale doğru, büyüme ile birlikte ilerler ve reinnervasyon gerçekleşikten sonra *downregüle* olur. Distal sinirin kollajenden zengin ekstraselüler matriksi içinde, büyümekte olan aksonlar için kanallar açtığı öne sürülmektedir. MMP-9 aktivitesi ise daha hızlı (12-72 saat) başlar ve lezyon bölgesi ile sınırlıdır, distale ilerlemez. MMP'lerin aktivitesi TIMP'ler (metalloproteinazların dokudaki inhibitörleri) tarafından inhibe edilir. (9-12)

2.5.8. Distal Reseptörler

Gecikmiş sinir onarımından sonra, yetersiz fonksiyonel iyileşme, pek çok faktöre bağlıdır. Distal sinir güdüğünün kendisinin uzun süreli denervasyonu, distal segmentte, aksonların rejenerasyonunda yetersizliğe yol açabilir. Bunun nedeni tam anlaşılamamıştır. Ancak muhtemelen Schwann hücre atrofisine, bazal laminanın harabiyetine ve progresif fibrozise sekonder olduğu düşünülmektedir. Motor son plaklarda ve kas reseptörlerinde ise uzamış denervasyon sonucu fonksiyonel iyileşmeyi sınırlayan geri dönüşsüz değişiklikler görülür. (3,4)

2.5.9. Motor Son Plaklar ve Kas Lifleri

Aksotomi sonrası denerve olan kas yoğun değişimler geçirir. Kas lifleri, gerçek lif sayısı değişmeden belirgin atrofiye uğrar. Başlangıçta, sinir-kas bileşkesinin yapısında büyük bir değişiklik olmaz, sinaptik katlantılar bir yıldan daha uzun süre yapısını devam ettirir. (3,4)

Asetilkolin reseptörlerinin dağılımında belirgin değişiklik olur. Asetilkolin reseptörleri normalde kas lifinin orta kısmında yerleşiktirler. Denerve olan kasta ise, kasın boyu boyunca, diffüz olarak bulunurlar ve böylece asetilkoline karşı süpersensitivite geliştirirler. Bu bulgu, EMG'de kendisini fibrilasyonların varlığı ile gösterir. Reinnervasyon gerçekleştiğinde, tomurcuklanan aksonlar orijinal sinir-kas bileşkelerini oluşturmak üzere kendi orijinal yollarını takip ederler. (3,4)

Yaralanma sonrası 3 ay içinde denerve kaslarda epimizyum boyunca bağ doku depolanmaları olan belirgin fibrozis görülür. Bu fibrozis ilerlemeye devam eder ve 11 ayda ileri seviyelere ulaşır. Kasın reinnervasyon sonrası anlamlı bir fonksiyonel iyileşme gerçekleştirebilmek için 12-18 ay içinde reinnerve olması gerekir. (3,4)

Motor son plaklar erişkinde, 15-18 ay sonra reinnervasyona dirençli hale gelmektedir. Aksonlar günde 1,0-1,5 mm ilerleyebildiği için motor fonksiyonu kazandırma amaçlı sinir onarımlarında veya sinir transferlerinde 18'ler kuralı diye adlandırılabilen bir kural öngörülmüştür. 18'ler kuralına göre primer sinir rekonstruksiyonu yapabilmek için, sinir yaralanma bölgesi ile sinirin innerve ettiği kasın arasındaki mesafenin inç cinsinden değeri ile yaralanmanın üzerinden geçen zamanın ay cinsinden değerinin toplamı 18'den küçük olmalıdır. Örneğin, önkolda tenar kaslara 6 inç mesafede bir median sinir kesisinin üzerinden 6 ay geçmişse, toplam değer 12 olur . Bu hastada başarı beklenecek rekonstruksiyon yapılabilir (3,4,16).

2.5.10. Duysal Reseptörler

Duysal son-organlar, deri ve yumuşak dokuda bulunan Meissner ve Pacini korpuskülleri, Merkel hücreleri, Ruffini sonlanmaları ve serbest sinir uçlarıdır. Pacini ve Meissner hareketli temas ve vibrasyon duyusunu alan, hızlı adapte olan reseptörlerdir. Vibrasyon frekanslarına duyarlılıkları açısından, birbirlerinden

ayrılırlar. Merkel hücre-nörit kompleksi sabit temas ve basınç duyusunu alan, yavaş adapte olan lif reseptördür. Ruffini sonlanmaları, derin duyu ve vibrasyon duyusunu iletir. Serbest sinir uçları, ağrı, ısı ve temasa duyarlı miyelinsiz aksonlardır. (4)

Pacini korpuskülleri, sadece tek bir akson terminali alırlar ve reinnerve olmazlar. Diğer tüm duysal reseptörler reinnerve olabilirler. Duysal reinnervasyonda motor reinnervasyonda olduğu kadar sıkı bir zaman kısıtlaması yoktur ve denervasyondan yıllar sonra da gerçekleşebilir. Bununla beraber zamanla duysal organlarda reinnervasyonun kalitesini etkileyebilecek değişimler olabilir. Bu yüzden daha hızlı bir reinnervasyonla, reinnervasyonun kalitesi ve duysal iyileşme artırılabilir. Çok uzun süre sonra bile koruyucu duyu tekrar kazanılabilir. (4)

2.5.11. Kortikal Reorganizasyon

Rejenere olan aksonlar, sıklıkla yanlış yola saparlar. Sonuçta hedef alanlar kendi orijinal aksonlarıyla reinnerve olmamış olur. Örneğin, motor aksonlar sıklıkla derideki hedeflere, duysal aksonlar da kas hedeflerine doğru büyür. Sonuçta, hedef alanların daha önce temsil edildiği kortikal bölgelerde, belirgin reorganizasyonel değişiklikler ortaya çıkar. Fonksiyonlarına kavuşmuş olan bölgeleri temsil eden kortikal alanlarda anormallikler görüldüğü, fakat aynı zamanda çok uzun süreler boyunca sürekli değişimler geçirdikleri gösterilmiştir. (11,35)

Kortikal temsilin, uygun olarak yeniden şekillenmesini uyarmak için eğitim şarttır. Örneğin, insanlarda duysal defisitler, gözler açık ve kapalı olarak nesnelere dokunma eğitimleri ile düzeltilebilir. İlave bir duyunun, bu örnekte görmenin, yeniden öğrenme sürecine yardımcı olacağı, bildirilmiştir. Bu tip bir tekrar öğrenmenin, postoperatif parestezileri de azaltacağı gösterilmiştir. Çocuklar periferik yaralanması sonrası, erişkinlere oranla daha yüksek iyileşme kapasitesine sahiptirler. Bunun nedeninin çocuklardaki beyin şekillenme potansiyelinin yüksekliği olduğu öne sürülmüştür.(11,94)

2.6. Sinir Yaralanmalarında Cerrahi Tedavi Prensipleri

Periferik sinir yaralanmalarında temiz, keskin mekanizmalı yaralanmalarda, gap izin veriyorsa, uçuca sinir onarımı altın standarttır. Gapın uzunluğu gerginliksiz onarıma izin vermiyor ise interpozisyonel otojen sinir grefti ile onarım altın standarttır. (12-17)

Periferik sinir cerrahisinde, sinir ucu ile greft arasında, veya sinirin proksimal ve distal güdükları arasındaki koaptasyon, gergin olmamalıdır. Şayet, onarım hattında gerginlik olursa, fibrotik reaksiyon artışı sonucu, rejenerasyon engellenecektir. Gerginlik, hem direkt mekanik hasar oluşturarak, hem de sekonder iskemi etkisiyle, onarım hattına zarar verir. %8 elongasyon sinirin kan akımını azaltır, %15 elongasyonda ise, sinirin kan dolaşımı tamamen durur. 8 saati geçen total iskemi zamanı ise, akson kaybına ve nekroza yolaçar. (12-17)

Koaptasyon, uçuca, 8/0-10/0 monoflaman naylon sütünle, epinöral veya fasiküler yöntemle yapılmalıdır. Birch (13), el bileği 30 dereceden daha az fleksiyonda iken, 7/0 naylon sütün güdükları bir arada tutmuyorsa, uçuca primer onarım yerine, sinir grefti uygulamak gerektiğini bildirmiştir. Myckatyn ve Mackinnon'a (15) göre ise, 9/0 naylon sütün onarımı yerinde tutmuyorsa, veya sinir onarım hattının ayrılmaması için ele postural pozisyon vermek gerekiyor ise, sinir grefti kullanmak gereklidir. Nörorafiye alternatif olarak, lazerle sinir onarımı veya fibrin doku yapıştırıcıyla koaptasyon yapılabilir. Bu tip onarımların, tensil kuvvetlerinin düşük olması bir dezavantaj, onarım hattında yabancı cisim (sütün) bırakmamaları da bir avantajdır. (12-14,47) Ayrıca uç-yan nörorafi, vaskülarize sinir grefti, allogreft, entübülasyon ve nöroliz gibi cerrahi yöntemler de mevcuttur. (12,50)

Sinir onarımı, ilk 24 saatte yapılırsa primer onarım, 1 hafta içinde yapılırsa geç primer onarım, 1 haftadan daha geç yapılırsa sekonder onarım diye adlandırılır (14) . Birch ise, ilk 5 gün içinde yapılan onarımı primer sütün, 3 haftaya kadar yapılan onarımı geç primer sütün, 3 haftayı geçen onarımları ise sekonder sütün olarak isimlendirmiştir. (13) Şayet sinir kesisine eşlik eden kemik kırığı var ise, kemik kısaltılarak uçuca gergin olmayan sinir onarımı yapılabilir. (10)

Sinir onarımında prensipler şu şekilde sıralanabilir:

Mikrocerrahi teknik, mikrocerrahi aletler ve mikroskop kullanılmalı,

Dokulara saygılı yaklaşılmalı,

Sinirin proksimal ve distalinde sınırlı devaskülarizasyon yapılmalı,

Sinir uçları dikkatli olarak karşılıklı getirilmeli,

Onarım hattında kesinlikle gerginliğe izin verilmemeli,

Gerginlik varsa interpozisyonel sinir greftleri tercih edilmeli,

Gerginliği azaltmak için naturel pozisyon dışında postür manevraları yapılmamalı,

İlk ameliyatta, sinirin proksimal ve distalde nereye kadar hasarlandığı anlaşılamiyor ise onarım sekonder olarak ileri bir tarihte yapılmalı, Sonuçları maksimize etmek için postoperatif dönemde duysal ve motor eğitim verilmelidir. (12-15)

2.7. Sinir Onarımlarında Prognozu Etkileyen Faktörler

2.7.1. Yaş

Hastanın yaşı ne kadar küçükse, sonuçlar o kadar yüzgüldürücü olmaktadır. Fakat, büyüme çağında gecikmiş rejenerasyon veya şiddetli ve proksimal yaralanmalar, ekstremitede düzeltilmemiş musküler dengesizlik nedeni ile, ilerleyici deformitelere yol açabilir. (13)

2.7.2. Lezyonun seviyesi

Özellikle uzun seyirli sinirlerde, yaralanma ne kadar distalde ise, rejenerasyon ve reinnervasyon şansı o kadar yüksektir. (13-15)

2.7.3. Yaralanmanın tipi

Temiz ve düzgün tipte bir periferik sinir kesisinin onarımı ile elde edilecek olan fonksiyonel düzelme, ezikli bir kesinin onarımında elde edilenden daha iyi olacaktır.(13-15)

2.7.4. Onarımın tipi

Uçuca ve gergin olmayan onarımlar, greft kullanılan vakalara göre daha iyi sonuç verir. Greft kullanılan vakalar da, uçuca gergin onarımlara göre üstündür. (13, 15)

2.7.5. Zamanlama

Erken dönemde yapılan onarımlar, geç onarımlara göre daha iyi sonuç verir. (12-15)

2.7.6. Tecrübe

Cerrahın, periferik sinir onarımı ve mikrocerrahide tecrübesiz olması prognozu olumsuz etkiler. (13,14,16)

2.8. Sildenafil Sitrat'ın Sinir İyileşmesinde Rolü

Sildenafil sitrat, kimyasal olarak bir pirazolopirimidin türevidir, biyokimyasal olarak fosfodiesteraz 5 (PDE5) inhibitörüdür. Sildenafil sitrat, erektil disfonksiyonun tedavisinde, FDA'nın onay verdiği ilk oral ilaçtır. Önce hipertansiyon ve angina pectoris tedavisine yönelik olarak denenmiş ancak faz 1 klinik denemelerde, belirgin bir antihipertansif ve antianginal etki göstermediği görülmüştür. Fakat, bu hastalarda belirgin penil erektil disfonksiyon düzelmesi görülmüştür. Bu, beklenmeyen farmakolojik etki sonrası, Pfizer şirketi tarafından 1996'da lisansı alınmış, 1998'de FDA tarafından erektil disfonksiyon tedavisi için kabul edilmiştir. 2005 yılında primer pulmoner hipertansiyon endikasyonu için de FDA tarafından onay verilmiştir.(18,33)

Siklik nükleotidler, cAMP ve cGMP, çeşitli biyolojik sistemlerde sinyal iletimini düzenleyen ikinci habercilerdir. Nörotransmitterler, hormonlar, ışık ve koku gibi dış sinyallere yanıt verirler ve iyon kanalları, kinazlar ve transkripsiyon faktörleri gibi hücre içi hedefleri aktive edip, alınan mesaja uygun hücre sel yanıtın tetiğini çekerler. cGMP, guanilil siklaz etkisi ile GTP den oluşturulur ve fosfodiesteraz5 yolu ile inaktif formu olan GMP ye yıkılır. (20)

PDE5, önemli bir protein ailesinin bir üyesidir ve cGMP'nin hücre içi düzeyini düzenler. Tüm vücutta yayılmış olan, 11 farklı tip PDE vardır. PDE'ler siklik nükleotidleri hidrolize ederler ve ikinci haberci sinyal yolağında rolleri vardır. PDE5, selektif olarak cGMP'yi hidrolize eden bir enzimdir. Sildenafil, yapısal olarak cGMP'nin guanozin bazına benzer ve enzimin aktif bölgesinde, riboz içeren bir bölgeyi doldurur. Sildenafil, cGMP miktarını arttırarak, bazı organlarda faydalı etkiler ortaya çıkartır. Son kanıtlar, sildenafilin, yaşa bağlı hafıza bozukluğu, ağrı, pulmoner hipertansiyon ve multipl sklerozda faydalı etkileri olduğunu göstermiştir. (18)

Sildenafil sitrat hayvanlarda oluşturulan ağrı modellerinde, antinosiseptif etki göstermiştir. Sildenafil sitrat'ın antinosiseptif etkisinden, periferde cGMP birikiminin sorumlu olduğu düşünülmüştür. Sildenafil sitrat, spinal PDE5'i inhibe edip cGMP birikimine yol açar ve cGMP intratekal antinosiseptif etki oluşturur. (18)

Multipl skleroz (MS), santral sinir sisteminin, beyin, medulla spinalis ve optik sinirde demiyelinasyonla ve aksonal hasarla karakterli, enflamatuvar bir

hastalığıdır. Uthayathas ve arkadaşlarının (18) belirttiğine göre Manson ve arkadaşları, sildenafil sitrat'ın, MS'li hastaları, beyinde gri cevher perfüzyonunu arttırarak, nörodejenerasyona karşı koruduğunu bildirmişlerdir. Zhang ve arkadaşları (14) sildenafil sitrat'ın, ratlarda, strok sonrası fonksiyonel iyileşme ve nörojenezi arttırdığını göstermişlerdir. Uthayathas ve arkadaşlarının (18) belirttiğine göre Firestein ve Bredt sildenafil sitrat'ın, ratlarda strok sonrası, beyin cGMP düzeyini arttırdığını, nörojenezi indüklediğini ve nörolojik defisitleri azalttığını göstermişlerdir.

Wang ve arkadaşları (34) sildenafil sitrat'ın, erişkin rat beyni subventriküler zonundan(SVZ) izole edilen nörosferlerde, hücre proliferasyonunu uyardığını göstermişlerdir. Nörosferlerde PDE5 mevcuttur. Sildenafil sitrat'ın, nörosferlerde cGMP düzeyini ve nörojenezi belirgin olarak artırdığı gösterilmiştir. Sildenafil sitrat'ın, aynı zamanda, nörosferlerde protein kinaz B yi (Akt) belirgin olarak fosforile ettiği gösterilmiştir. Fosforile Akt, glikojen sentaz kinaz -3 ün (GSK-3) fosforilasyonunu arttırmaktadır. Buna göre, sildenafil sitrat, nörojenezi PI3-K/Akt/GSK-3 yolağını aktive ederek uyarmaktadır. Uthayathas ve arkadaşlarının (18) belirttiğine göre Suzuki ve ark. glutamatın, insan nöral progenitor hücrelerinin proliferasyonunu arttırdığını göstermişlerdir. Bu da, sildenafil sitrat aracılı nörojenizde, glutamat-NO-cGMP yolağının rol aldığını göstermektedir.

Klinik denemeler ve deneysel çalışmalar, sildenafil sitratın, sinir sisteminde çok sayıda farmakolojik etkisinin olduğunu düşündürmektedir. Nörojeniz, belleği güçlendirme, nöroprotektif etki ve antinosiseptif etki yönlerinden ümit verici görülmektedir. (18)

Zhang ve arkadaşları (19), ratlarda fokal serebral iskemi tedavisinde, sildenafil sitrat'ın etkilerini araştırmışlardır. Bromodeoksiüridin (BrdU) kullanarak proliferasyon alan hücreleri, β -III-tubulin (TuJ1) kullanarak immatür nöronları hesapladıkları çalışmada, kontrol grubuna göre, sildenafil sitrat'ın hem BrdU+, hem de TuJ1+ nöron sayısında artışa neden olduğunu göstermişlerdir. Serebral lokal kan akımında, sildenafil sitrat'ı takiben geçici (70 dakika) bir artış olmuş, ancak iskemik alanın büyüklüğünün aynı kalmış olması, serebral kan akımına etkisinin nöroprotektif olmadığına kanıtını sağlamıştır. Sildenafil sitrat'ın, serebral cGMP'yi

arttırdığı ve cGMP'nin nörogenezi düzenlediği kanısına varılmıştır. Artmış nörogenezin de, fonksiyonel iyileşmeyi ortaya çıkardığını öne sürmüşlerdir. (19)

Zhang ve arkadaşlarının (19) belirttiğine göre Hindley ve ark, Moluha ve ark. nöronlardaki cGMP seviyesinin, dendritik ve aksonal yönlenmenin modülasyonunda da rolü olduğunu göstermişlerdir. cGMP'nin, hipokampal nöron hücre kültüründe ve PC12 hücrelerde nörit büyümesini artırdığını göstermişlerdir.

Nitrik oksit (NO) oluşumunu katalizleyen enzim NO sentaz (NOS) enzimidir. NOS'ın farklı varyantları bulunur: 1) Ca^{+2} bağımlı esas form (c-NOS). Bunun endotelial form (eNOS) veya tip III ve nöronal form (n-NOS) veya tip I diye iki formu vardır. Endotel, glia hücreleri ve nöronlarda bulunur. 2) Ca^{+2} bağımsız indüklenebilir form (i-NOS) veya tip II ise makrofajlar, hepatositler, düz kas, glia ve endotelde bulunur. Tip I ve III fizyolojik şartlarda NO üretir. Tip II (i-NOS) ise immunolojik bir uyarıyı takiben (İnterferon- γ , TNF- α ve LPS gibi) NO üretir. (20)

NO'nin biyolojik reseptörü, guanilil siklaz (GC) dır. GC, aktive olunca, cGMP oluşumunu katalizler. Oluşan cGMP'nin, cGMP-bağımlı kanallar, PKG ve PDE gibi çeşitli hedefleri vardır. PKG I α ve β alt birimlerinden oluşan, tüm vücutta yaygın bulunan bir enzimidir PKG II ise monomeriktir ve akciğer böbrek testis ve beyin gibi dokularda bulunur. (20) Puzzo ve arkadaşlarının (20) belirttiğine göre Tsukada ve arkadaşları cGMP'nin, cAMP bağlayıcı bölgeye ve PKA'ya etki ederek, cAMP yolağını da etkileyebildiğini göstermişlerdir.

Puzzo ve arkadaşlarının (20) belirttiğine göre Basun ve ark. Andreasen ve ark., Price ve ark, Smith ve ark. gibi araştırmacılar sildenafil sitrat'ın, Alzheimer hastalığında, NO/cGMP/PKG yolağını aktive edip, β -amiloidin, beyinde ve damarlarda depolanmasını engelleyebileceği ve hem bellek kusurunu, hem de hipertansiyonu engelleyebileceğini öne sürmüşlerdir.

Puzzo ve arkadaşlarının (20) belirttiğine göre Jain ve ark. sildenafil sitrat'ın kronik nöropatik ağrıda, periferde, antinosiseptif etkiye sahip cGMP birikimine yol açarak, faydalı olabileceğini bildirmişlerdir.

2.9. Eritropoetin Sinir İyileşmesinde Rolü

Eritropoetin (Epo) böbrekte üretilen, glikoprotein yapıda bir hormondur. Primer etkisi, hemotopoitik dokularda eritrositik progenitor hücrelerin sağkalımı, proliferasyonu ve diferansiyasyonunu uyarmaktır. Bu etkisini, apoptozu engelleyerek

yapar.(75-90,100-103) Eritropoetin'in reseptörüyle etkileşimi sonucu : 1) Antiapoptotik protein bcl-x_L artar. 2) Mitojen-aktif protein kinaz (MAPK) ve fosfatidil inozitol 3-kinaz (PI-3K/Akt) aktive olur. 3) transkripsiyon sinyal iletici ve aktivatörü-5 (STAT5) homodimerizasyona uğrar. Bu etkilerin birlikte çalışmasıyla, eritrositik progenitor hücreler apoptozdan korunur, çoğalır ve diferansiye olur. (21)

Eritropoetin'in tek etkisinin, eritropoez üzerine olduğu sanılıyordu. Ancak, analitik tekniklerdeki gelişmeler, pekçok farklı dokunun Epo-R mRNA, Epo-R proteini, Epo-Epo-R bağlanmaları ve hücre içi sinyaller düzenlediğini göstermiştir. Bu nonhemotopoeitik dokular ve organlar arasında beyin, kardiovasküler doku (endotel, vasküler düz kas, kardiomyositler), karaciğer, gastrointestinal dokular, pankreas adacıkları, böbrek, testis ve dişi üreme organları vardır. Bu, Eritropoetin'in sadece eritropoetik değil, pleiotropik bir sağkalım ve büyüme faktörü olduğunu, nörotrofik ve nöroprotektif, vasküler ve kardioprotektif etkileri olduğunu göstermiştir. (21)

Campana ve Myers, immünohistokimyasal çalışmalarla, ratlarda periferik sinirlerin Eritropoetin ve eritropoetin reseptörleri içerdiğini belirlemişlerdir. Çeşitli hücre kültürü çalışmalarında, bu histolojik olarak teyit edilmiştir. Nöronal hücreler, astrositler, mikroglialar ve beyin türevli kapiller endotelyal hücrelere ait primer kültürler ve hücre serilerinde Epo-R varlığı gösterilmiştir. (22)

Jelkmann ve Wagner'in (21) belirttiğine göre Konishi ve ark. eritropoetin'in kortikal ve kolinerjik nöron kültürlerinde trofik etkileri olduğunu göstermişlerdir. Jelkmann ve Wagner'in (21) belirttiğine göre Shingo ve ark. eritropoetin'in aynı zamanda, nöronal kök hücre ve progenitor hücre proliferasyonu ve diferansiasyonunu da uyardığını bildirmişlerdir.

Glutamat, hipoksiye bağlı nöron ölümünün ana mediatörlerinden biri kabul edilir. Hipoksik nöronlar, hem iyonotropik reseptörleri, hem metabotropik reseptörleri etkileyebilen, bol miktarda glutamat salarlar. Jelkmann ve Wagner'in (21) belirttiğine göre Morishita ve ark. rat hipokampal ve serebral kortikal hücrelerinin, primer kültürde eritropoetin ile ön koşullanmasının, glutamat toksisitesini azalttığını göstermişlerdir. Gerçekten de, eritropoetin ile önkoşullama, nöronları hem NMDA – ilişkili, hem de NO ilişkili apoptozdan korumaktadır. Fakat, akut eklendiğinde, Epo, rat hipokampal ve serebral kortikal nöronlarında NO - ilişkili

ölümü engelleyememektedir. Jelkmann ve Wagner'in (21) belirttiğine göre Chong ve arkadaşlarının çalışmalarında, PI-3K/Akt yolağının, Eritropoetin'in nöroprotektif etkisinde, anoksik hipokampal nöronal hücre kültürlerinde, mitokondrial membran potansiyelini koruyarak, primer öneme sahip olduğu gösterilmiştir. Chong ve arkadaşlarına göre mitokondrial membran potansiyelinin destabilizasyonu, sitokromC nin salınımına, takiben kaspaz-8, -1 ve -3 ün aktivasyonuna ve DNA fragmentasyonuna yol açar.

Hipoksi gibi ön koşullayıcı stres durumları, dokuları, daha sonra oluşan stres durumlarına karşı, daha dirençli hale getirir.(56) Jelkmann ve Wagner'in (21) belirttiğine göre Simon ark. kısa süreli subletal serebral iskemi periyotlarının, maruz bırakılan ratları daha sonra orta serebral arter tıkanmasıyla oluşacak stroktan koruduğunu bildirmişlerdir. Hipoksik ön koşullamanın faydalı etkisinin nedeni, kısmen, hipoksik beyinde üretimi artan Eritropoetin'dir. Jelkmann ve Wagner'in (21) belirttiğine göre Prass ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, serebral ventrikül içine Epo-R infüzyonu ile lokal Eritropoetin etkisi bloke edildiğinde, hipoksik ön koşullamanın koruyucu etkisinin belirgin olarak azaldığı gösterilmiştir.

Campana ve Myers (22), Epo/Epo-R sisteminin periferik sinirlerde bir rolleri olduğunu öne sürmüşlerdir. Ratlarda siyatik sinirlerin gövdelerinde, aksonlarında ve Schwann hücrelerinde Epo-R immunreaktivitesi saptamışlardır. Eritropoetin'in nöronal hücreler için antiapoptotik ve mitojenik bir faktör olduğunu düşündüren kanıtlar vardır. Deney hayvanlarında, lokal veya sistemik verilen Eritropoetin'in, serebral iskemi, subaraknoid kanama, kafa travması ve deneysel otoimmün ensefalomiyelitte nöroprotektif etkisi olduğu gösterilmiştir. (22)

Toth ve arkadaşları (23), bir siyatik sinir ezilme tipi yaralanma modelinde, 14 gün boyunca lezyon yakınına lokal Eritropoetin verdiklerinde, aksonların rejenerasyonunun hızlandığını göstermişlerdir. Sinir yakınına Eritropoetin verilen ratlarda, termal duyarlılık daha erken geri dönmüştür. Siyatik sinir yaralanması yapılan tarafta, Eritropoetin verilsin veya verilmesin, tüm gruplarda, DRG nöronlarda Epo-R miktarı belirgin olarak artmıştır. Yaralanmanın proksimal ve distalindeki periferik sinir zonlarında, Epo-R proteini *upregülasyonu* ortaya çıkmıştır. (23)

P8 ratlardan hazırlanan organotipik spinal kord eksplantları, motor nöron aksonları çıkıntıları ile medulla spinalisin topografik organizasyonu modelini oluştururlar. Kültürde uzun süre yaşarlar. Herhangi bir eksojen büyüme faktörü yoksa, bu aksonlar, dejenere beyaz cevheri geçerek, eksplantın dışına uzanamazlar. Eritropoetin varlığında aksonların, normalde aksonal büyüme için inhibitör olan beyaz cevher traktlarını geçip, eksplantın dışına çıktığı, gösterilmiştir. Diğer nörotrofik faktörlerin etkisine benzer şekilde, Eritropoetin'in etkisinin de, çan şeklinde bir eğri izlediği ve yüksek dozlarda bu akson büyümesini destekleyici etkisinin kaybolduğu görülmüştür. (23)

Keswani ve ark. (26) periferik sinir sistemindeki endojen Eritropoetin'in çoğunun, Schwann hücrelerince üretildiğini göstermişlerdir. Yaralanmadan 8 gün sonra nöronal Eritropoetin düzeyi düşmektedir ve nöroprotektif etki için yetersiz seviyeye gerilemektedir. Toth ve arkadaşlarının (23) belirttiğine göre Gorio ve ark. iyileşmesi için 1 haftadan fazla süre gereken yaralanma modellerinde eksojen Eritropoetin'in, nörorejeneratif ve nöroprotektif etkisi olduğunu göstermişlerdir.

Siyatik sinir ezilme bölgesine, lokal Eritropoetin uygulanması, periferik sinir morfolojisinde korunma ile ilişkilidir. Distale miyelinli akson rejenerasyonunu artırmıştır ve sinir lifleri yoğunluklarında artmaya yol açmıştır. Toth ve arkadaşları (23), DRG apoptozunu engellemeye yönelik bir bulguya rastlamamışlardır. Grasso ve arkadaşları (24), sistemik eritropoetin veya uzun etkili türevi olan darbepoetin kullanarak, nörolojik ve elektrofizyolojik sonuçlarda düzelme elde edildiğini göstermişlerdir.

Lokal Eritropoetin kullanımı, CGRP gibi peptidlerin ekspresyonunu modifiye eder. Periferik sinir rejenerasyonu ile ilgili bir peptid olan CGRP'nin, lokal eritropoetine yanıt olarak arttığı gösterilmiştir. Toth ve arkadaşlarının (23) belirttiğine göre Russo ve Durham lokal eritropoetini takiben CGRP artışının, hücre spesifik MAPK-yanıtlı artışa bağlı olabileceğini önermişlerdir. Artan CGRP, muhtemelen, mitojenik faktörleri regüle ederek Schwann hücre proliferasyonunu uyarmaktadır.

Eritropoetin'in sinir sistemindeki etki mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Önerilen mekanizmalar şunlardır: 1) Kalsiyum kanal aktivasyonu 2) Antioksidan yolların uyarılması 3) Anjiyogenezin uyarılması 4) Apoptozun

inhibisyonu. Nöroprotektif etki JAK-2 ve NFκB sinyal yollarının aktivasyonuna bağlı olabilir. (23,25,34)

Toth ve arkadaşlarının (23) belirttiğine göre Wen ve ark, Kretz ve ark. bir Bcl-2 homoloğu olan Bcl-X_L'in nöron rejenerasyonunu ve akson büyümesini uyardığını, Bcl-X_L'in de, lokal eritropoetin verilmesini takiben, *upregüle* olduğunu göstermişlerdir. Lokal eritropoetin uygulaması, STAT3 proteini toplam düzeyini etkilememiş, fakat STAT3 fosforilasyonunu arttırmıştır. STAT3, antiapoptotik Bcl-X_L indüksiyonu için gereklidir. Toth ve arkadaşlarının (23) belirttiğine göre Schweizer ve ark. erişkin motor nöronlarında, sağkalım için STAT3 bağımlı Bcl-X_L ekspresyonunun şart olduğunu göstermişlerdir. Lokal Epo dual etkiye sahip olup, hem akson sağkalımını, hem de intrinsik aksonal rejenerasyonu arttırmaktadır ve bu faydalı etkilerinin Akt/PI3K ve Jak2/STAT3 aktivasyonuna bağlı olabileceği düşünülmektedir. (23)

Campana ve Myers (22) ve Keswani (26) eritropoetin'in ve eritropoetin reseptörlerinin, periferik sinir sisteminde nöroprotektif rolü olduğunu göstermişlerdir. Subkutan veya in vitro eksojen eritropoetin verilmesi, DRG duysal nöronlarda ve Schwann hücrelerinde apoptozu engellemektedir. Aksonun kesilmesi, hem perinöral Schwann hücrelerde eritropoetin üretimini artırır, hem de nöronlarda eritropoetin reseptörleri miktarını artırır. (22,26)

Lykissas ve ark. (27), siyatik sinir dalı kesilmesini takiben, sistemik eritropoetin verdikleri ratlarda ilk 3 hafta fonksiyonel fayda izlemişler, fakat daha sonra, 150 güne kadar takip ettikleri ratlarda, eritropoetin kesildikten sonra, fonksiyonel gerileme olduğunu gözlemlemişlerdir. Sonuç olarak, eritropoetin etkisinin sadece ilk dört hafta tatminkar olduğunu öne sürmüşlerdir. (27) Uzun dönemli iyileşme için, belki de, eritropoetin kesintisiz verilmeli veya eritropoetin erken dönem faydaları geçici olup, belki de zamanla etkisi tersine dönmektedir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Hayvan Deneyleeri Yerel Etik Kurulundan alınan 18.02.2009 tarihli 101 karar numaralı izine dayanılarak, toplam 21 adet 250-300 gram ağırlığında Sprague-Dawley cinsi ratda, Sildenafil sitrat ve Eritropoetin'in periferik sinir rejenerasyonuna etkilerini araştıran çalışma yapıldı.

Ratlar, 1. grup kontrol, 2. grup Eritropoetin, 3. grup Sildenafil grubu olmak üzere 7'şer ratdan oluşan 3 gruba ayrıldı.

Ratların, işlem öncesi 80 mg/kg dozunda ketamin ile anestezipleri sağlanıp, sağ uyluk posteriorunda, tüy dökücü krem ile, planlanan cerrahi sahanın tüylerden arınması sağlandıktan sonra (Şekil 3.1), ratlar tesbit tahtasına yüzüstü yatırıldı. Cilt ve ciltaltı geçilip kaslar split edilerek (Şekil 3.2) siyatik sinire ulaşıp siyatik sinir diseke edildi (Şekil 3.3).

Tüm gruplarda siyatik sinir kesilerek (Şekil 3.4) kesilme tipi periferik sinir yaralanması modeli oluşturulmasını takiben mikrocerrahi yöntemle, 10/0 prolent suture materyali ile epinöro-epinöral uçca onarım uygulandı (Şekil 3.5). Cilt kapatıldıktan sonra, 1.grup olan kontrol grubundaki 7 deneye ilave bir tedavi uygulanmadı. 2. grup olan Eritropoetin grubundaki 7 deneye 30 gün boyunca günde 150 ünite/kg dozda intraperitoneal Eritropoetin tedavisi uygulandı. İlk doz erken postop dönemde uygulandı. 3.grup olan Sildenafil sitrat grubundaki 7 deneye ise 30 gün boyunca, günde 10 mg/kg dozda Sildenafil sitrat intraperitoneal olarak uygulandı.

30 gün boyunca, denekler, ayrı kabinlerde muhafaza edildiler. Günlük standart yem ve serbest su ile beslendiler. Normal oda ısısında ve normal gece gündüz siklusuna tabi olarak, deneyin sonuna kadar izlendiler.

Ayrıca, her üç gruptaki deneklerin yaraları ve sağ ayakları, otokanibalizasyonu engellemek amacı ile, günlük olarak oksijenli su ile temizlendi.

30. günün sonunda, denekler fonksiyonel olarak geri çekme refleksi zamanı ölçümü ve yürüyüş yolu analizi yapılarak değerlendirildiler (Şekil 3.6).

Bain ve arkadaşlarının (29) Siyatik Fonksiyon İndeksi (SFİ) hesaplaması için geliştirdikleri formül aşağıda formül 3.1'de verilmiştir.

$$SFİ = -38.3 \frac{(EPL-NPL)}{NPL} + 109.5 \frac{(ETS-NTS)}{NTS} + 13.3 \frac{(EIT-NIT)}{NIT} - 8.8 \quad (3.1.)$$



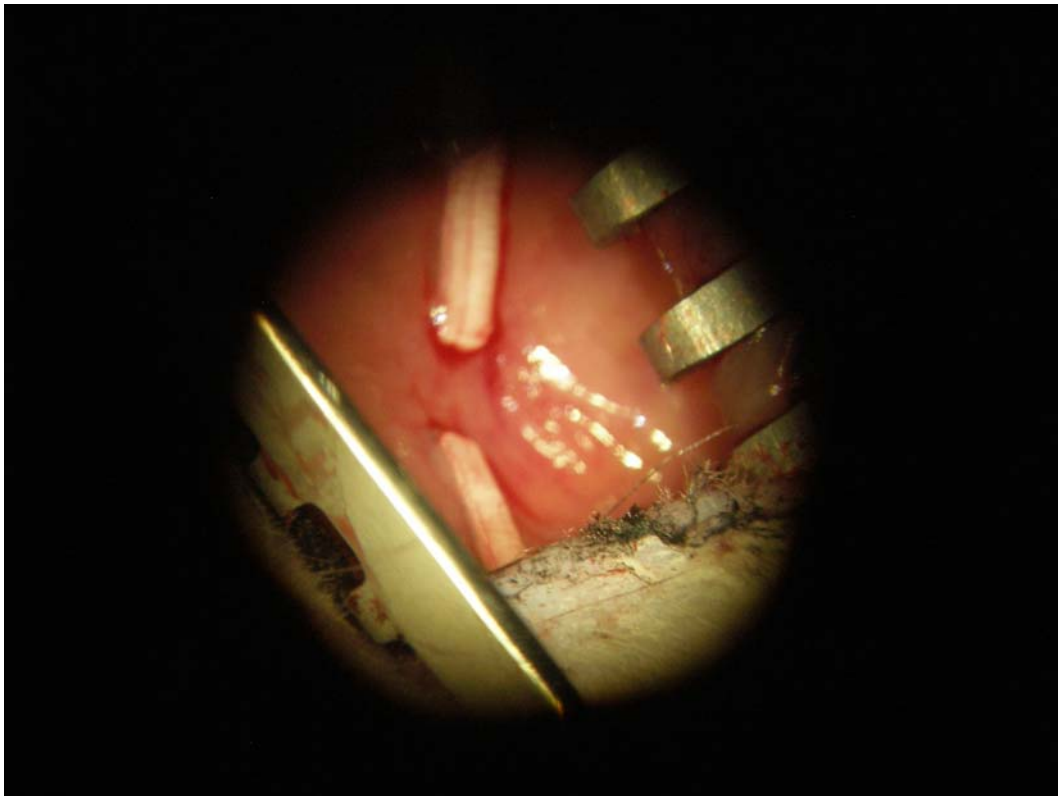
Şekil 3.1. Ratın sağ uyluğunun cerrahi için hazırlanması.



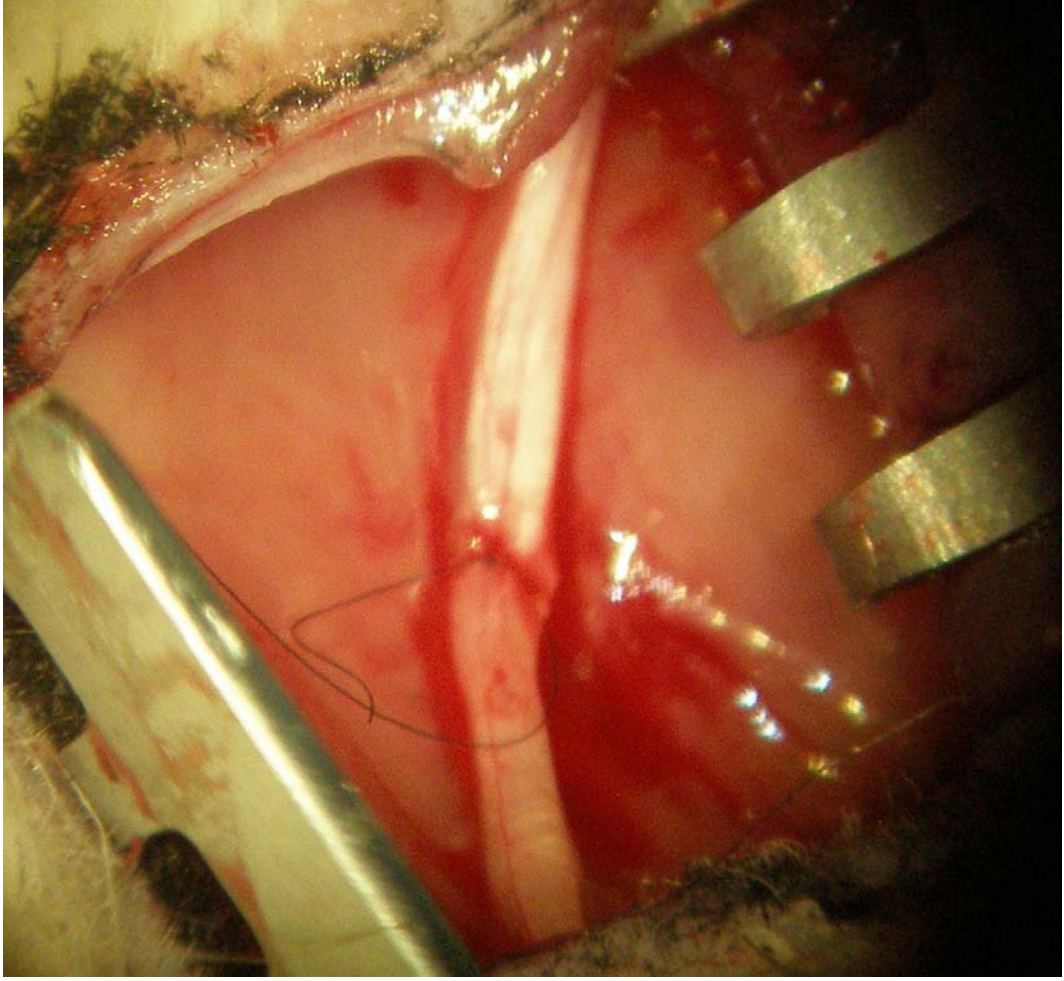
Şekil 3.2. Sağ uyluk posteriorundan yapılan insizyon.



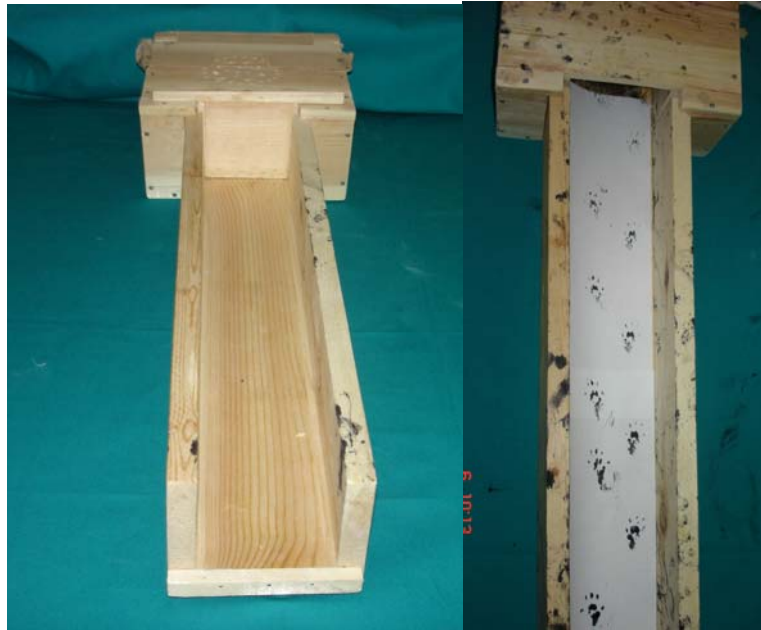
Şekil 3.3. Siyatik sinirin diseksiyonu



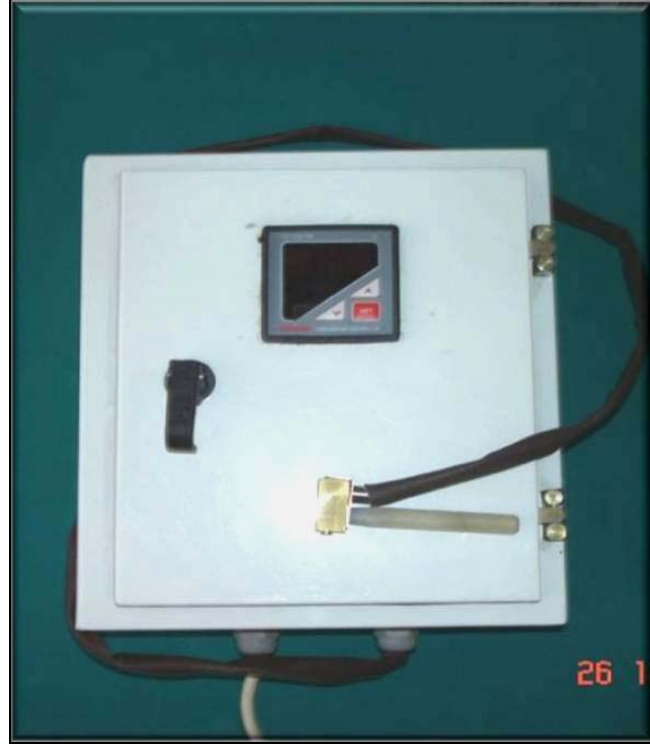
Şekil 3.4. Siyatik sinirin kesilme tipi yaralanması.



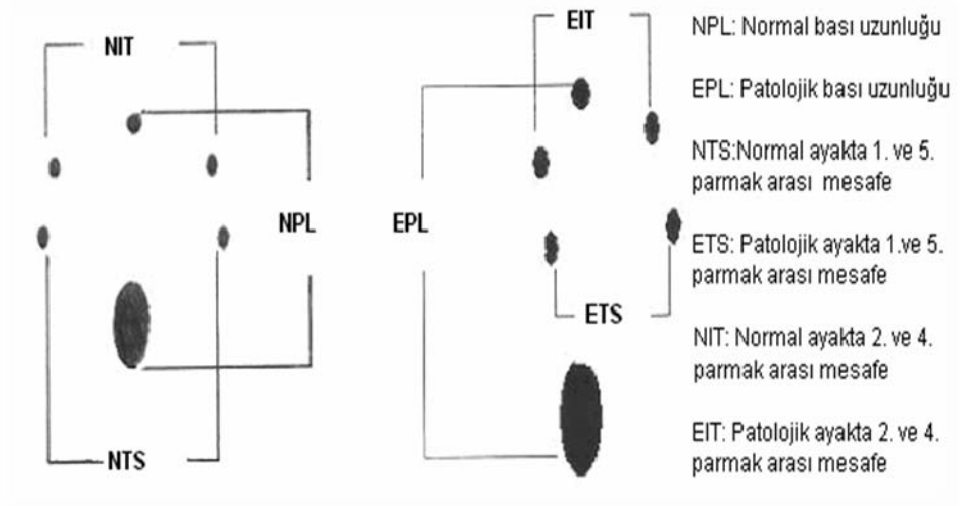
Şekil 3.5. Siyatik sinirin epinöral onarımı.



Şekil 3.6. Çalışmada kullanılan yürüyüş yolu.



Şekil 3.7. Geri çekme refleksinde kullanılan düzenek



Şekil 3.8. Yürüyüş yolu analizinde kullanılan değerler

Yürüyüş yolu analiziyle motor fonksiyondaki geri dönüş, geri çekme refleksi ölçümüyle duyu fonksiyonundaki geri dönüş ölçülmüştür. Geri çekme refleksinde Masters ve ark.'nın tanımladığı şekilde 56 dereceye ısıtılmış plakaya arka ayakların temas ettirilmesi işlemi yapılmıştır. Temasla ayak geri çekmesi arasındaki süre

kronometreyle ölçülmüştür. Cilt hasarını engellemek için maksimum 12 saniye süreyle sıcaklık uygulanıp cevap alınamayanlar için değer 12 olarak kabul edilmiştir.

Ardından, yine ketamin anestezisi altında, sinir onarımı bölgesine ulaşıp, histolojik inceleme için onarım hattının 1 cm proksimal ve distalini içerecek şekilde, örnek alınıp ratlar servikal dislokasyon yöntemiyle sakrifiye edildiler.

Deney süresi sona erdiğinde sinir dokusu hızlı bir şekilde çıkarılarak bir kısmı histologlar tarafından derhal nötral formalin içeren fiksatiflere konulmuştur. Fiksasyondan sonra histolojik değerlendirme için dokuların doku takip cihazı ile rutin takipleri yapılmıştır. Parafin blokları hazırlanan dokuların her birinden yaklaşık 4 mikron kalınlığında kesitler alınmıştır. Kesitler H&E ile boyanmış ve genel histopatolojik değerlendirme yapılmıştır. Sinir dokusunun diğer kısmı ise gluteraldehitde fikse edilip rutin elektron mikroskop takibinden sonra araldit bloklara gömülmüştür. Ultramikrotom ile yarı ince kesitler alınıp sinir hücreleri değerlendirilmiştir. Histopatolojik olarak sinir kesitlerinde ödem, lif dejenerasyonu ve miyelin hasarı parametreleri değerlendirilmiştir. Ödem; Mitsui ve ark. na göre 0=ödem yok, 1=hafif ödem, 2=orta ödem, 3=şiddetli ödem olarak değerlendirilmiştir (106). Lif dejenerasyonu; Nagamatsu ve ark.' na göre 0=<%2, 1=%3-25, 2=%26-50, 3= %51-75, 4=>%75 olarak değerlendirilmiştir (104). Miyelin hasarı ise 0=hasar yok, 1=hafif hasar, 2=orta hasar, 3= şiddetli hasar olarak değerlendirilmiştir.

4. BULGULAR

Üç deney grubundaki ratlar, fonksiyonel ve histolojik olarak iyileşme açısından değerlendirilmişlerdir.

Fonksiyonel iyileşmenin değerlendirilmesi için geri çekme refleksi süresi ölçümü ve yürüyüş yolu analizi yöntemleri kullanılmıştır (Şekil 3.6). Değerlendirme sonunda, kontrol ve Eritropoetin grubundaki ratlar karşılaştırıldığında, her iki grubun arasında anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür. Sildenafil sitrat verilen grupta ise, hem Eritropoetin verilen grupta, hem de kontrol grubuyla kıyaslandığında, Sildenafil sitrat lehine istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu saptanmıştır. (Tablo 4.1, Tablo 4.2)

Tablo 4.1. Geri Çekme Refleksi Sonuçları

Sham	Kontrol	EPO	Sildenafil Sitrat
3	11	12	8
2,5	11	12	5,5
3	12	10	4,5
5,5	12	8,5	5,5
5	10	12	6,5
3,5	9	12	6
3,5	10	12	7

Tablo 4.2. Yürüyüş Yolu Testi Sonuçları

Sham	Kontrol	EPO	Sildenafil Sitrat
-8.87	-55,54	-68,46	-3,76
-8.96	-59,35	-71,17	-21,42
-11.85	-63,15	-64,9	-38,64
-10.56	-91,89	-61,38	-13,14
-8.87	-37,33	-79,09	-53,79
-9.87	-67,89	-57,68	-43,31
-10.28	-43,11	-60,93	-48,78

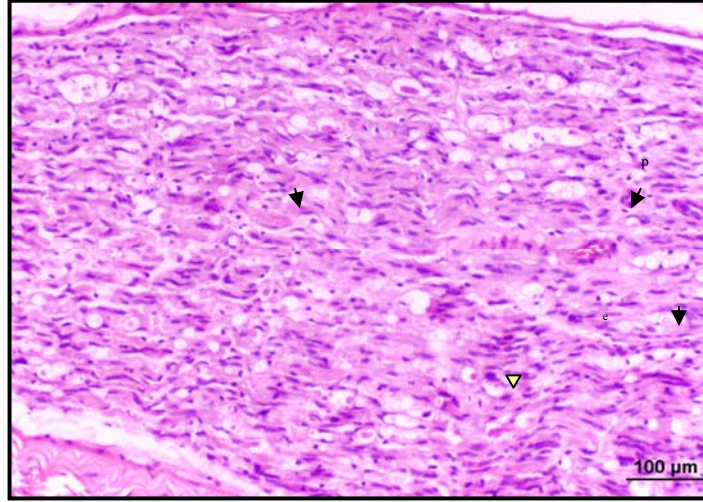
Üç grup arasında geri çekme refleksi bakımından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur($p<0,001$). Bu fark ise sildenafil sitrat grubu ile eritropoetin grubu arasında ($p<0,05$) ve sildenafil sitrat grubu ile kontrol grubu arasında ($p<0,05$) mevcut olan farktan kaynaklanmaktadır. Eritropoetin grubu ile kontrol grubu arasında fark bulunmamaktadır.

Üç grup arasında yürüyüş yolu analizi bakımından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır. ($F=9,52$; $p=0,002$) Bu fark sildenafil sitrat grubu ile eritropoetin grubu arasında ($p< 0,001$) ve sildenafil sitrat grubu ile kontrol grubu arasında ($p<0,01$) mevcut olan farktan kaynaklanmaktadır. Kontrol grubu ile eritropoetin grubu arasında fark bulunmamıştır ($p> 0,05$).

Veriler istatistiksel olarak Sigmatat 3.1 programında analiz edilmiştir. Veriler mean+/_ SD ya da median (interquartile range) olarak özetlenmiştir. Normal dağılım gösteren değişkenlere ANOVA testi uygulanmış ve POST HOC test olarak Fisher LSD testi kullanılmıştır. Normal dağılım göstermeyen değişkenlere ise Kruskal Wallis testi uygulanmış ve POST HOC test olarak da Tukey testi kullanılmıştır. Çapraz tabloların analizinde ki-kare (exact pearson ki-kare) testi kullanılmıştır. $P<0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

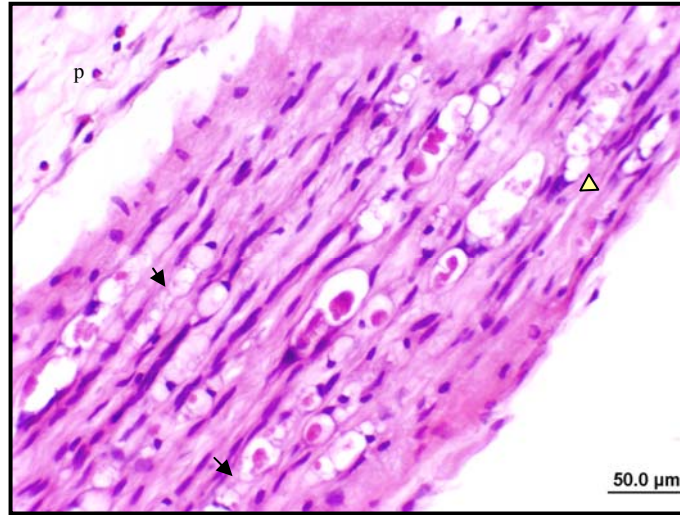
Üç grubun , histolojik olarak da, karşılaştırılması yapılmıştır. Kontrol grubu ve eritropoetin verilen gruptaki ratların sinir kesitlerinin histolojik incelenmesinde, aksonlar ve aksonu saran miyelin kılıflarında yoğun dejenerasyon bulguları saptanmıştır. (Şekil 4.1 – 4.6)

Sildenafil grubundaki ratların sinir kesitlerinin histolojik incelenmesinde ise, akson, akson etrafını saran miyelin kılıf ve perinöriumun yapısının normale yakın olduğu görülmüştür. Histolojik görüntü olarak da, sildenafilin, eritropoetin ve kontrol grubuna kıyaslandığında, sinir rejenerasyonunu daha olumlu etkilediği sonucu çıkartılmıştır. (Şekil 4.7 , Şekil 4.8)



Şekil 4.1. Kontrol grubunda küçük büyütmede histolojik görüntü.

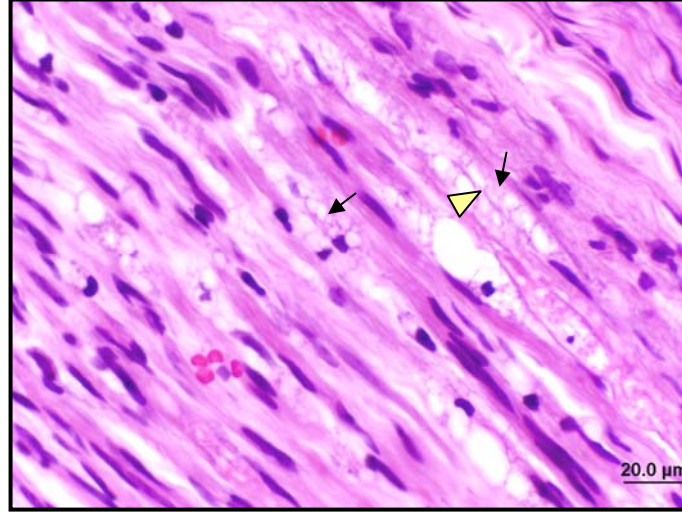
Şekil 4.1’de kontrol grubuna ait küçük büyütmede uzunlamasına kesiti görülen periferik sinirde, akson yapıları (ok başı) ve aksonların etrafını saran miyelin kılıf yapılarında dejenerasyon gözlenmektedir (ok). Ayrıca, sinir fasiküllerini saran kılıf perinöryum (p) ve tek tek sinir liflerini saran endonöryum (e) kılıfları da, dikkat çekmektedir.



Şekil 4.2. Kontrol grubunda büyük büyütmede histolojik görüntü.

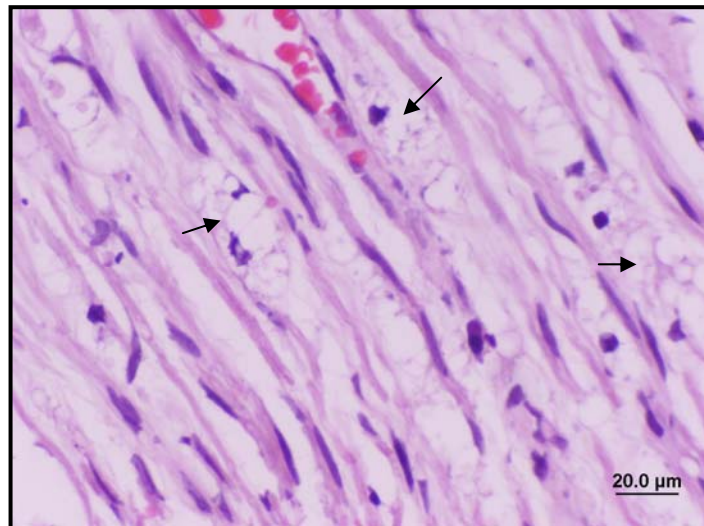
Şekil 4.2’de kontrol grubuna ait daha büyük büyütmedeki resimde, uzunlamasına kesiti görülen periferik sinirde, miyelin kılıflarıyla sarılı akson yapısı (ok başı) ve aksonun etrafını saran miyelin kılıfta, oldukça fazla dejenerasyon olduğu

gözlenmektedir (ok). Ayrıca fasikülün etrafını saran perinöryum kılıfı da gözlenmektedir (p).



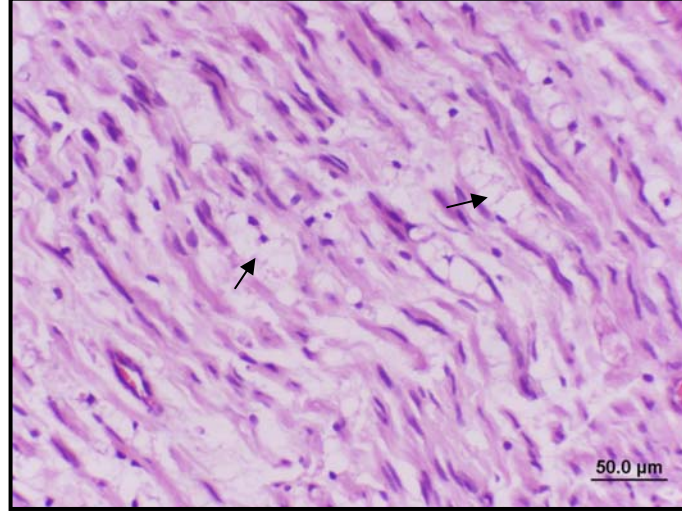
Şekil 4.3. Kontrol grubunda uzunlamasına kesitin histolojik görünümü.

Şekil 4.3’de, uzunlamasına kesiti görülen kontrol grubuna ait periferik sinirde, bir sinir lifini oluşturan tüm yapılar görülmektedir. Bunlardan, akson (ok başı) ve aksonu saran miyelin kılıflarında (ok) oldukça yoğun dejenerasyon izlenmektedir.

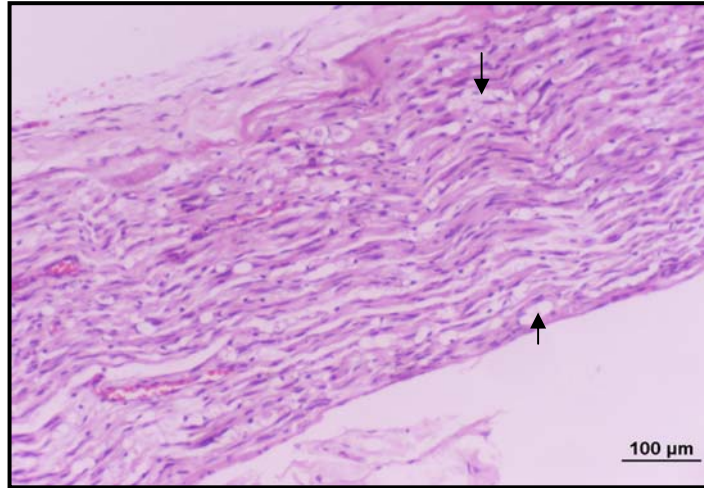


Şekil 4.4. Eritropoetin grubunda uzunlamasına kesitin histolojik görünümü.

Şekil 4.4’de Eritropoetin grubuna ait periferik sinirin uzunlamasına kesitinde, aksonu saran miyelin kılıfta bir çok alanda yoğun dejenerasyon izlenmektedir (oklarla işaretlenmiştir)

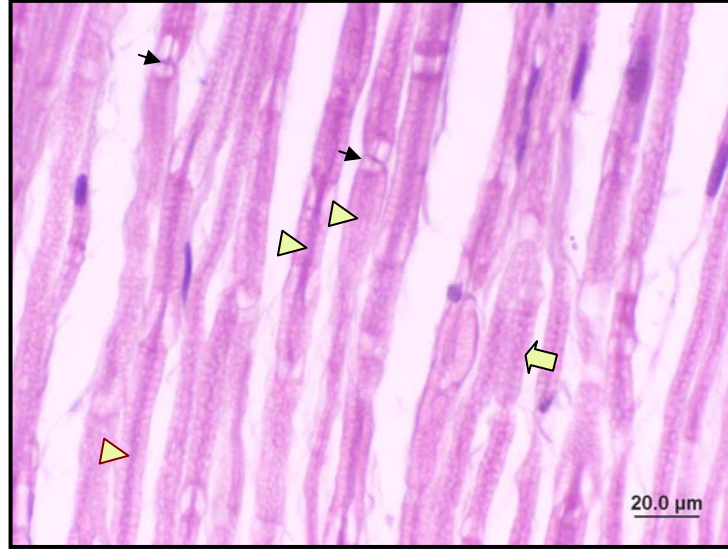


Şekil 4.5. Eritropoetin grubunda miyelin kılıfta görülen dejenerasyon.



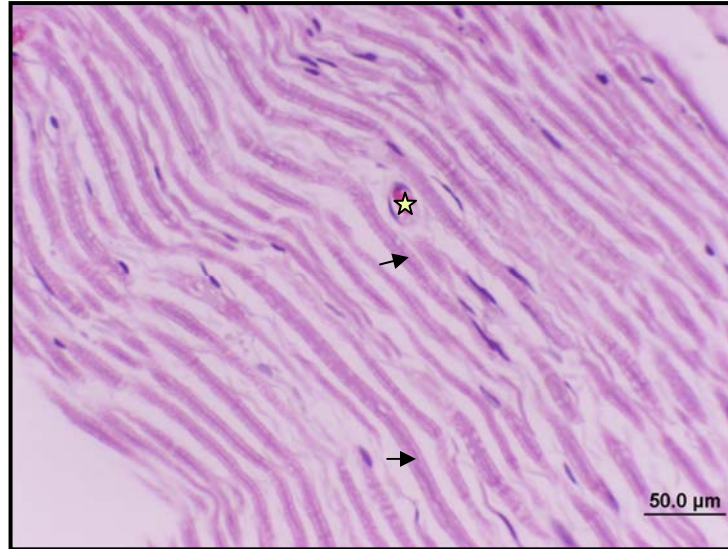
Şekil 4.6. Eritropoetin grubunda küçük büyütmede histolojik görüntü.

Şekil 4.5’de ve şekil 4.6’da uzunlamasına kesitleri görülen Eritropoetin grubuna ait periferik sinir yapısında, aksonu saran miyelin kılıfta yoğun dejenerasyon izlenmektedir (ok).



Şekil 4.7. Sildenafil sitrat grubunda histolojik görüntü.

Şekil 4.7’de, uzunlamasına kesitleri görülen Sildenafil sitrat grubuna ait periferik sinir yapısında, akson yapısı (ok başı), aksonu saran miyelin kılıf yapısı (kalın ok) ve ranvier boğum yapısı (ince ok) normale yakın olarak izlenmektedir. Bu bulgular Sildenafil sitrat grubunda iyileşmenin belirtisi olarak yorumlanabilir.



Şekil 4.8. Sildenafil sitrat grubunda uzunlamasına kesitin histolojik görüntüsü.

Şekil 4.8’de uzunlamasına kesitleri görülen Sildenafil sitrat grubuna ait periferik sinir yapısında, akson yapısı (ok), aksonu saran miyelin kılıf yapısı (ok başı) ve sinir liflerinin etraflarını saran perinöryumdaki (bağ dokusu kılıfı) bir kan damar yapısı (*) normale yakın olarak görülmektedir.

Tablo 4.3. Histolojik Değerlendirme

Parametreler	Normal (Sham)	Kontrol Grubu	1. Deney Grubu (Epo)	2. Deney Grubu (Sil)
Lif dejenerasyonu	0	12	6	3
Myelin kılıf hasarı	0	11	12	6
Ödem	0	12	10	4

Histopatolojik parametreler istatistiksel olarak incelendiğinde (ki-kare=1,907, sd=4 , p=0,767, p>0,05) istatistiksel olarak fark bulunmamıştır.

5. TARTIŞMA

Sinir iyileşmesi, çok farklı yönleri olan, karmaşık bir süreçtir. Periferik sinirler, santral sinir sisteminden farklı olarak, rejenerasyon ve distal hedefleri reinnerve etme kapasitesine sahiptirler. Ancak başarılı bir rejenerasyon için, pekçok değişkenin birlikte, uyum içinde işlem görmesi gereklidir. Başarılı bir sinir iyileşmesi ve fonksiyonun geri kazanılması için gerekli koşullar: 1) Distalde Wallerian dejenerasyon, 2) Dejenere akson ve miyelin artıklarının makrofajlar ve Schwann hücrelerince ortadan kaldırılması, 3) Çeşitli nörotrofik faktörlerin, sitokinlerin ve transkripsiyon faktörlerinin salınımı, 4) Sinir gövdesinin yaşaması ve iletimde görevli bir hücre modundan rejenerasyon için gerekli enzimleri sentezleyen bir hücreye dönüşümü, 5) Schwann hücrelerinin proliferasyonu ve demiyelinan forma dönüşümü, 6) Schwann hücreleri ve bazal lamina tarafından Büngner bantlarının oluşturulması, 7) Proksimalden akson tomurcuklanmaları ve büyüme konileri oluşumu, 8) Aksonal elongasyon ve akson ucundan proteazların salınımı , 9) Rejenere olan aksonların distaldeki hedeflere doğru olarak yönlendirilmesi, 10) Hedef organlarda geri dönüşsüz değişiklikler oluşmadan reinnervasyonun tamamlanması, 11) Rejenere olan aksonların remiyelinasyonu, 11) Miyelin tabakasının oluştuktan sonra olgunlaşıp kalınlaşmasıdır.

Mikrocerrahi tekniklerdeki gelişmeler, sinir iyileşmesine müdahale etmenin cerrahi olarak daha ileri gitmesi fazla mümkün görünmeyen bir platoya ulaştığını düşündürmektedir. Bu yüzden, ilave tedavi yöntemleri arayışı sürmektedir. Valproik asit (30), FK506 (31), rolipram (32), elektriksel uyarı, nörotrofik faktörler gibi tedaviler denenmiştir. Ancak, toksisiteleri nedeniyle klinik uygulama aşamasına ulaşamamışlardır.

Biz, erektil disfonksiyon tedavisinde kullanılan Sildenafil sitrat'ın ve böbrekte üretilen bir glikoprotein hormon olan Eritropoetinin sinir rejenerasyonuna etkilerini araştırdık. Bu iki maddenin ortak özelliği, her ikisinin de pleiotropik, yani çok yönlü etkiye sahip olan moleküller olmalarıdır.

Eritropoetin sadece bir eritropoez uyarıcı değil, genel bir doku koruyucu ve çok yönlü büyüme faktörü etkisine sahip bir sitokindir. Antiapoptotik etkileri olduğu, nöroprotektif etkiye sahip olduğu gösterilmiştir.(41-43) Periferik sinirlerde ve Schwann hücrelerinde eritropoetin ve eritropoetin reseptörleri bulunduğu

kanıtlanmıştır.(22,27) Aksonotimezis sonrası aksonoprotektif olduğu ve akson rejenerasyonunu uyardığı yönünde yayınlar vardır (27). Nöronal hücreleri, hipoksiye ve glutamat toksisitesine bağlı ölümden koruduğu, nöronların sağkalımını artırdığı bildirilmiştir.(24)

Sildenafil sitrat, 1998 yılında erektil disfonksiyon ve 2005 yılında primer pulmoner hipertansiyon endikasyonları için FDA tarafından onay verilmiş olan, 10 yılı aşkın süredir, tüm dünyada yaygın olarak kullanılan bir ilaçtır.(33) Fosfodiesteraz5'i inhibe ederek, cGMP'yi artırıp etkisini gösterir. Hayvan deneylerinde, multipl sklerozda nörodejenerasyonu engellediği, ağrı modellerinde antinosiseptif etkiye sahip olduğu , strok sonrası nörojenezi uyardığı bildirilmiştir.(18,19) Rat beyni subventriküler zonundan izole edilen nörosferlerde, protein kinaz B'yi aktive ederek PI3K/Akt/GSK-3 yolağını aktive edip nörojenezi uyardığı bildirilmiştir.(20) Alzheimer olgularında ve yaşa bağlı bellek defektlerinde , bellek fonksiyonlarını artırdığı da bildirilmiştir.(18)

Laserasyon tipi periferik sinir yaralanması oluşturduğumuz ratlarda, nörorafi sonrası 30 gün süreyle intraperitoneal yolla Sildenafil sitrat ve Eritropoetin vererek yaptığımız çalışmada, Sildenafil sitrat'ın fonksiyonel olarak , Eritropoetin verilen gruba ve kontrol grubuna göre, istatistiksel olarak da anlamlı, daha başarılı bir iyileşme sağladığı gösterilmiştir. Histolojik sonuçların analizinde ise 3 grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır.

Literatür bilgileri ışığında, fayda beklediğimiz eritropoetinden, sinir iyileşmesine katkı bağlamında, olumlu bir etki gözlenmemiştir. Bir sitokin olan Eritropoetinin, diğer tüm sitokinler gibi, çan eğrisi şeklinde bir doz-yanıt eğrisine sahip olduğu bildirilmektedir. Bizim çalışmamızda, sinir rejenerasyonuna olumlu bir etkisini görememiş olmamızın nedeni, uygun dozda (yani çan eğrisinin altına düşecek dozda) eritropoetin vermemiş olmamız olabilir. Literatürde, periferik sinir onarımlarında, lokal olarak onarım hattına eritropoetin verilerek olumlu sonuçlar alındığına dair yayınlar vardır. (23) Bizim çalışmamızda sistemik yolla (intraperitoneal) verilen eritropoetin, onarım bölgesine yeterli miktarda ulaşmamış olabilir. Aynı bir çalışma yapılarak, eritropoetin lokal olarak verildiğinde oluşan etkiler araştırılabilir.

Eritropoetin'in yaralanma öncesi verildiğinde önkoşullama benzeri bir fayda sağlayarak nöroprotektif etki sağladığını bildiren yayınlar vardır. Bizim yaptığımız çalışmada yaralanma sonrası sistemik verilen eritropoetine yanıt alamamamızın olası nedenlerinden biri de bu olabilir.

Sildenafil sitrat'ın, ratlarda laserasyon tipi periferik sinir yaralanmalarında sinir iyileşmesine olumlu katkı sağladığını gözlemledik. Sildenafil sitrat bu olumlu katkıyı, olası birkaç mekanizmadan biri veya birkaçını kullanarak yapmış olabilir. Bunlar: 1) Sildenafil sitrat'ın, lokal vazodilatasyon yapıcı etkisiyle, yaralanma bölgesinde iskeminin olumsuz etkilerini gidererek ve makrofaj infiltrasyonunu artırarak dejenerasyon sürecinden geriye kalan artıkların daha efektif temizlenmesini sağlayıp, rejenerasyon için optimum çevre sağlayan distal tüp oluşumunu gerçekleştirerek etkili olduğu düşünülmektedir.(105) 2) cAMP'nin, özellikle rejenerasyonun ilk döneminde, elongasyonun senkronize olarak onarım hattındaki aralığı geçmesinde, etkin olduğu gösterilmiştir.(36) PDE4 inhibitörü olan rolipram, cAMP'yi artırarak rejenerasyonun gap bölgesini daha hızlı ve senkronize geçmesini sağlamaktadır.(52,58) Aynı şekilde, onarım sonrası kısa süreli elektriksel uyarı verilmesi de, cAMP'yi artırarak gapın hızlı ve senkronize geçilmesini sağlamaktadır. Sildenafil sitrat, her ne kadar bir PDE5 inhibitörü olarak cGMP'yi artırmaktaysa da, cAMP ve PKA yolağını da uyardığına dair yayınlar vardır. Puzzo ve arkadaşlarının (20) belirttiğine göre Tsukada ve arkadaşları cGMP'nin, cAMP bağlayıcı bölgeye ve PKA'ya etki ederek, cAMP yolağını da etkileyebildiğini göstermişlerdir. Ayrıca sildenafil sitrat tarafından hücresel düzeyi artırılan cGMP, cAMP'yi yıkan PDE3'ü inhibe ederek cAMP düzeyini de artırabilmektedir. Sildenafil sitrat, çalışmamızda gözlemlediğimiz olumlu etkisini, cAMP aracılığıyla da yapmış olabilir. 3) Koriyama ve arkadaşları (28), altın balığında, NO-cGMP yolağının optik sinir rejenerasyonunu artırdığını göstermişlerdir. Çalışmalarında, bir cGMP analogu olan dbcGMP'yi kullanmışlar ve doza bağlı olarak nörit büyümesinde artma saptamışlardır. Nitrik oksit'in mi, yoksa cGMP'nin mi bu etkiden sorumlu olduğunu anlamak için sGC'yi (*soluble* guanilil siklaz) selektif olarak inhibe eden ODQ maddesini vermişler ve nörit büyümesinin inhibe olduğunu görmüşlerdir. ODQ ve dbcGMP'yi birlikte verdiklerinde, nöritlerdeki inhibisyonun ortadan kalktığını ve kültürde nörit büyümeleri görüldüğünü bildirmişlerdir. Ayrıca, intraoküler dbcGMP vererek,

ganglion hücrelerini reinnerve eden optik sinir liflerini saymışlar ve intakt retinal ganglion hücrelerinin %70'inin işaretlenmiş olduğunu görmüşlerdir. Bu da, dbcGMP'nin , *in vivo* olarak da, optik sinirde rejenerasyonu artırdığını göstermiştir. Bir PDE5 inhibitörü olarak, cGMP miktarını artırdığı bilinen sildenafil sitratın da, NO-cGMP-PKG yolağıyla sinir rejenerasyonunu artırdığı düşünülmektedir.(64-74)

6. SONUÇ

Periferik sinir yaralanmalarının cerrahi tedavisi, her zaman yüz güldürücü sonuçlar vermemektedir. Onarım ne kadar optimum yapılmış olursa olsun, denetlenemeyen değişkenler fonksiyonel iyileşmeyi engelleyebilmektedir. Özellikle proksimal seviyedeki periferik sinir kesilerinde fonksiyonel iyileşmeyi sağlayabilmek için cerrahi tedaviyle birlikte uygulanacak, farmakolojik ajanlara veya ilave tedavi yöntemlerine ihtiyaç vardır.

Çalışmamızda, ratlarda kesilme tipi sinir yaralanması tedavisinde günde 150 ü/kg dozda intraperitoneal yolla verilen Eritropoetin'in, sinir rejenerasyonuna olumlu katkısı olmadığı görülmüştür. Bu sonuç, Eritropoetin'in periferik sinir rejenerasyonuna olumlu etkileri olduğunu bildiren literatürle çelişen bir sonuçtur. Bunun nedeni eritropoetin dozunun uygun olmaması, önkoşullama yapmamış olmamız, lokal değil sistemik yolla eritropoetini uygulamış olmamız gibi olasılıklardan biri olabileceği gibi, kullanılan yöntemle de ilgili olabilir.

Çalışmamızda, ratlarda kesilme tipi periferik sinir yaralanmaları tedavisinde günde 10 mg/kg dozda 30 gün süreyle verilen Sildenafil sitratın sinir iyileşmesine olumlu etkisi olduğu, fonksiyonel ve histolojik olarak gösterilmiştir. Sildenafil sitratın merkezi sinir sistemine etkisi ile ilgili yayınlar mevcuttur, ancak periferik sinir rejenerasyonuna etkisini araştıran herhangi bir yayına ulaşamamıştır. Sildenafil sitrat, FDA'dan iki endikasyon (erektile disfonksiyon ve primer pulmoner hipertansiyon) için onay almış, yaygın olarak kullanımda olan ve düşük yan etki profiline sahip, güvenilir bir ajandır. Sildenafil sitratın, sinir rejenerasyonuna olan etkisi daha geniş çaplı çalışmalarla ortaya konulduktan sonra, bu endikasyonla da klinik uygulamaya sokulabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Burnett M.G. & Zager E.L. Pathophysiology of peripheral nerve injury: a brief review. *Neurosurg Focus*. 2004; 16: 1–7.
2. Makwana M. & Raivich G. Molecular mechanisms in successful peripheral regeneration. *FEBS Journal*. 2005; 272: 2628 – 2638
3. Mackinnon S.E. & Dvali L.T. Basic pathology of the hand, wrist and forearm: Nerve. In: Berger R.A. and Weiss A-P.C., editors. *Hand Surgery*. Lippincott Williams and Wilkins; 2004: 35-48.
4. Weber R.A. & Dellon A.L. Nerve lacerations: repair of acute injuries. In: Berger R.A. and Weiss A-P.C., editors. *Hand Surgery*. Lippincott Williams and Wilkins; 2004: 819-842.
5. Grant A. G. & Kliot M. General principles in evaluating and treating peripheral nerve injuries. In: Winn H.R., editor. *Youmans Neurological Surgery*, 5th edition. Saunders; 2004: 3795-3797.
6. Kinney A.K. Physiology of the peripheral nerve. In: Winn H.R., editor. *Youmans Neurological Surgery*, 5th edition. Saunders; 2004: 3809-3817.
7. Midha R. Peripheral nerve: Approach to the patient. In: Winn H.R., editor. *Youmans Neurological Surgery*, 5th edition. Saunders; 2004: 3819-3829.
8. Lee J-C. Diagnostic biopsy of peripheral nerves and muscle. In: Winn H.R., editor. *Youmans Neurological Surgery*, 5th edition. Saunders; 2004: 3958-3964.
9. Hirasawa Y. Basic research on peripheral nerve injury and regeneration. In: Hirasawa Y., editor. *Treatment of Nerve Injury and Entrapment Neuropathy* . Springer-Verlag Tokyo ; 2005: 1-11.
10. Hirasawa Y. Treatment of peripheral nerve injury and entrapment neuropathy. In: Hirasawa Y., editor. *Treatment of Nerve Injury and Entrapment Neuropathy*. Springer-Verlag Tokyo; 2005: 33-46.

11. Abrams M. & Widenfalk J. Emerging strategies to promote improved functional outcome after peripheral nerve injury. *Restorative Neurology and Neuroscience* 23 (2005): 367-382.
12. Sihenaq SM & Kim JYS. Repair and Grafting of Peripheral Nerve. In: Mathes SJ, editor. *Plastic Surgery*, 2nd ed. Saunders; 2006: 719-740.
13. Birch R., Nerve Repair. In: Green DP, Hotchkiss RN, Pederson WC, Wolfe SW, editors. *Green's Operative Hand Surgery* 5th ed. Elsevier; 2005: 1075 – 1110.
14. Maser BM. & Vedder N. Nerve Repair and Nerve Grafting. In: Russell RC, editor. *Plastic Surgery. Indications, Operations, and Outcomes. Volume Four (Hand Surgery)* Mosby; 2000: 2103-2119.
15. Myckatyn TM & Mackinnon SE. Microsurgical repair of peripheral nerves and nerve grafts. In: Thorne CH, editor. *Grabb and Smith's Plastic Surgery*. 6th ed. Lippincott Williams and Wilkins; 2007: 73-81.
16. Campbell W.W. Evaluation and management of peripheral nerve injury. *Clinical Neurophysiology*. 2008; 119(9): 1951-1965.
17. Hall S. Mechanisms of repair after traumatic injury. In: Dyck P.J. and Thomas P.K., editors. *Peripheral Neuropathy*, 4th edition. Elsevier-Saunders; 2005: 1403-1433.
18. Uthayathas S, Karuppagounder S.S, Thrash B.M., Parameshwaran K., Suppiramaniam V. & Dhanasekaran M. Versatile effects of sildenafil: recent pharmacological applications, *Pharmacological Reports*. 2007; 59(2): 150–163.
19. Zhang R., Wang Y., Zhang L., Zhang Z., Tsang W., Lu M., Zhang L & Chopp M. Sildenafil (Viagra) induces neurogenesis and promotes functional recovery after stroke in rats. *Stroke*. 2002; 33 (11): 2675–2680.
20. Puzzo D, Sapienza S, Arancio O, Palmeri A. Role of Phosphodiesterase 5 in Synaptic Plasticity And Memory. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*. 2008; 4(2): 371-387.

21. Jelkmann W. & Wagner K. Beneficial and ominous aspects of the pleiotropic action of erythropoietin. *Ann Hematol.* 2004; 83 (11): 673–686.
22. Campana W.M, Myers R.R. Exogenous erythropoietin protects against dorsal root ganglion apoptosis and pain following peripheral nerve injury. *Eur J Neurosci.* 2003; 18: 1497–1506.
23. Toth C. , Martinez J.A., Liu W. Q. , Diggle J., Guo G. F., Ramji N., Hoke A. & Zochodne D. W. Local erythropoietin signaling enhances regeneration in peripheral axons. *Neuroscience.* 2008; 154: 767–783.
24. Grasso G, Meli F, Fodale V, Calapai G, Buemi M, Iacopino DG. Neuroprotective potential of erythropoietin and darbepoetin alfa in an experimental model of sciatic nerve injury. *J Neurosurg Spine.* 2007; 7(6): 645–651.
25. Digicaylioglu M. & Lipton S.A. Erythropoietin-mediated neuroprotection involves cross-talk between Jak2 and NF-kappaB signalling cascades. *Nature.* 2001; 412: 641–647.
26. Keswani SC, Buldanlioglu U, Fischer A, Reed N, Polley M, Liang H. A novel endogenous erythropoietin mediated pathway prevents axonal degeneration. *Ann Neurol.* 2004; 56: 815–826.
27. 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; 164(1): 107–115.
28. Koriyama Y, Yasuda R, Homma K, Mawatari K, Nagashima M, Sugitani K, Matsukawa T & Kato S. Nitric oxide-cGMP signaling regulates axonal elongation during optic nerve regeneration in the goldfish *in vitro* and *in vivo*. *J. Neurochem.* 2009; 110: 890-901.
29. 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(1): 129–38.

30. Cui S.S. , Yang C.P. , Bowen R.C. , Bai O. , Lee X.M. , Jiang W. , Zhang X. Valproic acid enhances axonal regeneration and recovery of motor function after sciatic nerve axotomy in adult rats. *Brain Research*. 2003; 975: 229-236.
31. Gordon T, Sulaiman O & Boyd J.G. Experimental strategies to promote functional recovery after peripheral nerve injuries. *Journal of the Peripheral Nervous System*. 2003; 8: 236–250.
32. Carlstedt T. Approaches permitting and enhancing motoneuron regeneration after spinal cord, ventral root, plexus and peripheral nerve injuries. *Current Opinion in Neurology*. 2000; 13: 683-686.
33. Ravipati G, McClung J.A, Aronow W.S. , Peterson S.J. & Frishman W.H. Type 5 Phosphodiesterase Inhibitors in the Treatment of Erectile Dysfunction and Cardiovascular Disease. *Cardiology in Review*. 2007; 15(2): 76-86.
34. Wang L., Zhang Z., Wang Y., Zhang R., Chopp M. Treatment of Stroke With Erythropoietin Enhances Neurogenesis and Angiogenesis and Improves Neurological Function in Rats. *Stroke*. 2004; 35: 1732-1737.
35. de Ruitter GC, Malessy MJ, Alaid AO, Spinner RJ, Engelstad JK, Sorenson EJ, Kaufman KR, Dyck PJ, Windebank AJ. Misdirection of regenerating motor axons after nerve injury and repair in the rat sciatic nerve model. *Exp Neurol*. 2008; 211: 339–350.
36. Qiu J, Cai D, Dai H, McAtee M, Hoffman PN, Bregman BS, Filbin MT. Spinal axon regeneration induced by elevation of cyclic AMP. *Neuron*. 2002; 34: 895–903.
37. Murakami T, Fujimoto Y, Yasunaga Y, Ishida O, Tanaka N, Ikuta Y, Ochi M. Transplanted neuronal progenitor cells in a peripheral nerve gap promote nerve repair. *Brain Res*. 2003; 974: 17–24.
38. Verma P, Chierzi S, Codd AM, Campbell DS, Meyer RL, Holt CE, Fawcett JW. Axonal protein synthesis and degradation are necessary for efficient growth cone regeneration. *J Neurosci*. 2005; 25: 331–342.
39. Arévalo JC, Chao MV. Axonal growth: Where neurotrophins meet Wnts. *Curr Opin Cell Biol*. 2005; 17: 112–115.

40. Dickson BJ. Rho GTPases in growth cone guidance. *Curr Opin Neurobiol.* 2001; 11: 103–110.
41. Leist M, Ghezzi P, Grasso G, Bianchi R, Villa P, Fratelli M, Savino C, Bianchi M, Nielsen J, Gerwien J, Kallunki P, Larsen AK, Helboe L, Christensen S, Pedersen LO, Nielsen M, Torup L, Sager T, Sfacteria A, Erbayraktar S, Erbayraktar Z, Gokmen N, Yilmaz O, Cerami-Hand C, Xie QW, Coleman T, Cerami A, Brines M. Derivatives of erythropoietin that are tissue protective but not erythropoietic. *Science.* 2004; 305: 239–242.
42. Gorio A, Gokmen N, Erbayraktar S, Yilmaz O, Madaschi L, Cichetti C, Di Giulio AM, Vardar E, Cerami A, Brines M. Recombinant human erythropoietin counteracts secondary injury and markedly enhances neurological recovery from experimental spinal cord trauma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002; 99: 9450–9455.
43. Erbayraktar S, Grasso G, Sfacteria A, Xie QW, Coleman T, Kreilgaard M, Torup L, Sager T, Erbayraktar Z, Gokmen N, Yilmaz O, Ghezzi P, Villa P, Fratelli M, Casagrande S, Leist M, Helboe L, Gerwein J, Christensen S, Geist MA, Pedersen LØ, Cerami-Hand C, Wuerth JP, Cerami A, Brines M. Asialoerythropoietin is a nonerythropoietic cytokine with broad neuroprotective activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003; 100: 6741–6746.
44. Terenghi G. Peripheral nerve regeneration and neurotrophic factors. *J Anat.* 1999; 194: 1–14.
45. Stoll G, Jander S, Myers RR. Degeneration and regeneration of the peripheral nervous system: from Augustus Waller's observations to neuroinflammation. *J Peripher Nerv Syst.* 2002; 7: 13–27.
46. Gordon T, Chan KM, Sulaiman OAR, Udina E, Amirjani N, Brushart TM. Accelerating axon growth to overcome limitations in functional recovery after peripheral nerve injury. *Neurosurgery.* 2009; 65: A132–A144.
47. Menovsky T & Beek J.F. 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: 694–699.

48. Sulaiman OA & Gordon T. Role of chronic Schwann cell denervation in poor functional recovery after peripheral nerve injuries and strategies to combat it. *Neurosurgery*. 2009; 65 (4): A105–A114.
49. Bontioti EN, Kanje M, Dahlin LB. Regeneration and functional recovery in the upper extremity of rats after various types of nerve injuries. *J Periph Nerv Syst*. 2003; 8: 159–168.
50. de Ruitter GC, Spinner RJ, Malessy M J.A., Moore MJ. , Sorenson EJ. , Currier BL. , Yaszemski MJ. , Windebank AJ. Accuracy of motor axon regeneration across autograft, single-lumen, and multichannel poly (lactic-co-glycolic acid) nerve tubes. *Neurosurgery*. 2008; 63:144–155.
51. Pan YA, Misgeld T, Lichtman JW, et al. Effects of neurotoxic and neuroprotective agents on peripheral nerve regeneration assayed by time-lapse imaging in vivo. *J Neurosci*. 2003; 23: 11479–88.
52. Chierzi S., Ratto G. M., Verma P. & Fawcett J. W. The ability of axons to regenerate their growth cones depends on axonal type and age, and is regulated by calcium, cAMP and ERK. *Eur J. Neurosci*. 2005; 21: 2051–2062.
53. Kitab SA., Miele VJ., Lavelle WF. , Benzel EC. Pathoanatomic basis for stretch-induced lumbar nerve root injury with a review of the literature. *Neurosurgery*. 2009; 65: 161–168.
54. Chen ZL, Yu WM, Strickland S. Peripheral regeneration. *Annu Rev Neurosci*. 2007; 30: 209–233.
55. Höke A. Neuroprotection in the Peripheral Nervous System: Rationale for More Effective Therapies .*Arch Neurol*. 2006; 63: 1681-1685.
56. Andoh T. Chock PB. and Chueh C.C. Preconditioning-Mediated Neuroprotection : Role of Nitric Oxide, cGMP, and New Protein Expression. *Ann. N. Y. Acad. Sci*. 2002; 962: 1-7.
57. Simova O, Irintchev A, Mehanna A, Liu J, Dihné M, Bächle D, Sewald N, Loers G, Schachner M. Carbohydrate mimics promote functional recovery after peripheral nerve repair. *Ann Neurol*.2006; 60: 430–437.

58. Qi Cui & Kwok-Fai So . Involvement of cAMP in neuronal survival and axonal regeneration. *Anatomical Science International*. 2004; 79: 209–212.
59. Hiraga A, Kuwabara S, Doya H, Kanai K, Fujitani M, Taniguchi J, Arai K, Mori M, Hattori T & Yamashita T. Rho-kinase inhibition enhances axonal regeneration after peripheral nerve injury. *Journal of the Peripheral Nervous System*. 2006; 11: 217–224.
60. Shen A, Gao S , Ben Z , Wang H , Jia J , Tao T ,Niu S , Li X , Cheng C. Identification and potential role of PSD-95 in Schwann cells. *Neurol Sci*. 2008; 29: 321–330.
61. Hanz, S., Perlson, E., Willis, D., Zheng, J.Q., Massarwa, R., Huerta, J.J., Koltzenburg, M., Kohler, M., van-Minnen, J., Twiss, J.L. & Fainzilber, M. Axoplasmic importins enable retrograde injury signaling in lesioned nerve. *Neuron*. 2003; 40: 1095–1104.
62. Landers M & Altenburger P. Peripheral Nerve Injury. *Advances in Physiotherapy*. 2003; 5: 67–82.
63. Loers G & Schachner M. Recognition molecules and neural repair. *Journal of Neurochemistry*. 2007; 101: 865–882
64. Baltrons MA , Bora'n MS , Pifarre' P , Garcí'a A. Regulation and Function of Cyclic GMP-Mediated Pathways in Glial Cells. *Neurochem Res*. 2008; 33: 2427–2435.
65. Patil CS, Singh VP & Kulkarni SK. Peripheral and central activation of nitric oxide–cyclic GMP pathway by sildenafil. *Inflammopharmacology*. 2005; 13 (5–6): 467–478.
66. Guo D , Zhang JJ , Huang X-Y. A new Rac/PAK/GC/cGMP signaling pathway. *Mol Cell Biochem* DOI 10.1007/s11010-009-0327-7 Received: 31 March 2009 / Accepted: 4 November 2009
67. Madhusoodanan K. S, Murad F. NO-cGMP Signaling and Regenerative Medicine Involving Stem Cells. *Neurochem Res*. 2007; 32: 681–694.

68. Benjamins JA , Nedelkoska L. Cyclic GMP-Dependent Pathways Protect Differentiated Oligodendrocytes from Multiple Types of Injury. *Neurochem Res.* 2007; 32: 321–329.
69. Domek-Lopacinska K, Strosznajder JB. cGMP metabolism and its role in brain physiology. *J Physiol Pharmacol.* 2005; 56 (2): 15–34.
70. Pepicelli O, Raiteri M, Fedele E. The NOS/sGC pathway in the rat central nervous system: a microdialysis overview. *Neurochemistry International.* 2004; 45: 787–797.
71. Zhang RL, Zhang Z, Zhang L, et al. Delayed treatment with sildenafil enhances neurogenesis and improves functional recovery in aged rats after focal cerebral ischemia. *J Neurosci Res.* 2006; 83: 1213–19.
72. Farooq MU, Naravetla B, Moore P W., Majid A, Gupta R & Kassab M Y. Role of Sildenafil in Neurological Disorders. *Clin Neuropharmacol.* 2008; 31: 353-362.
73. Bender AT, Beavo JA. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use. *Pharmacol Rev.* 2006; 58: 488–520.
74. Patil CS, Singh VP, Singh S, Kulkarni SK. Modulatory effect of the PDE-5 inhibitor sildenafil in diabetic neuropathy. *Pharmacology.* 2004; 72: 190–195.
75. Höke A. & Keswani S.C. Neuroprotection in the PNS: Erythropoietin and Immunophilin Ligands. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2005; 1053: 491–501.
76. Campana WM, Li X, Shubayev VI, Angert M, Cai K, Myers RR. Erythropoietin reduces Schwann cell TNF-alpha, Wallerian degeneration and pain-related behaviors after peripheral nerve injury. *Eur J Neurosci.* 2006; 23: 617–626.
77. Campana, W.M. & Myers, R.R. Erythropoietin and erythropoietin receptors in the peripheral nervous system: changes after nerve injury. *FASEB J.*, 10.1096/fj.00–0857fje published online June 8, 2001.
78. Baptiste D C. & Fehlings M G. Pharmacological Approaches To Repair the Injured Spinal Cord. *Journal Of Neurotrauma.* 2006; 23(3/4): 318–334.

79. 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.
80. Noguchi C T, Asavaritikrai P , Teng R & Jia Y . Role of erythropoietin in the brain. *Critical Reviews in Oncology / Hematology*. 2007; 64(2): 159-171 .
81. Carmichael S. T . Cellular and Molecular Mechanisms of Neural Repair after Stroke: Making Waves. *Ann Neurol*. 2006; 59: 735–742.
82. Jong Yoon Yoo, You Jin Won, Jong Hwan Lee, Jong Uk Kim, In Young Sung, Seung Jun Hwang, Mi Jung Kim & Hea Nam Hong. Neuroprotective Effects of Erythropoietin Posttreatment Against Kainate-Induced Excitotoxicity in Mixed Spinal Cultures. *Journal of Neuroscience Research*. 2009; 87: 150–163.
83. Giovanni Grasso, Francesca Graziano, Alessandra Sfacteria, Fabio Carletti, Francesco Meli, Rosario Maugeri, Marcello Passalacqua, Francesco Certo, Marco Fazio, Michele Buemi, Domenico Gerardo Iacopino. Neuroprotective effect of erythropoietin and darbepoetin alfa after experimental intracerebral hemorrhage. *Neurosurgery*. 2009; 65: 763–770.
84. Gonzalez F F., McQuillen P , Mu D, Chang Y, M Wendland, Z Vexler, D M. Ferriero. Erythropoietin Enhances Long-Term Neuroprotection and Neurogenesis in Neonatal Stroke. *Dev Neurosci*. 2007; 29: 321–330.
85. Kumral A, Baskin H, Yesilirmak DC, Ergur BU, Aykan S, Genc S, Genc K, Yilmaz O, Tugyan K, Giray O, Duman N, Ozkan H. Erythropoietin Attenuates Lipopolysaccharide-Induced White Matter Injury in the Neonatal Rat Brain. *Neonatology*. 2007; 92: 269–278.
86. Taoufik E, Petit E, Divoux D, Tseveleki V, Mengozzi M, Roberts M.L., Valable S, Ghezzi P, Quackenbush J, Brines M, Cerami A & Probert L. TNF receptor I sensitizes neurons to erythropoietin and VEGF-mediated neuroprotection after ischemic and excitotoxic injury. *PNAS*. 2008; 105 (16): 6185–6190.
87. Wang L, Chopp M, Gregg SR, Zhang RL, Teng H, Jiang A, Feng Y & Zhang ZG. Neural progenitor cells treated with EPO induce angiogenesis through the

- production of VEGF. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2008; 28: 1361–1368.
88. Genc S, Koroglu TF, Genc K: Erythropoietin and the nervous system. *Brain Res*. 2004; 1000: 19–31.
 89. Maiese K, Li F, Chog ZZ: New avenues of exploration for erythropoietin. *JAMA*. 2005; 293: 90–95.
 90. Ghezzi P & Brines M. Erythropoietin as an antiapoptotic, tissue-protective cytokine. *Cell Death and Differentiation*. 2004; 11: S37–S44.
 91. Song JW, Yang LJ, Russell SM. Peripheral Nerve: What's New in Basic Science Laboratories. *Neurosurg Clin N Am*. 2009; 20: 121–131.
 92. Robinson L.R. Traumatic injury to peripheral nerves. *Muscle Nerve*. 2000; 23: 863–873.
 93. Tepper OM & Mehrara BJ. Gene Therapy in Plastic Surgery. *Plast. Reconstr. Surg*. 2002; 109: 716.
 94. Lundborg G . Nerve injury and repair - a challenge to the plastic brain . *Journal of the Peripheral Nervous System*. 2003; 8: 209–226.
 95. Ahmed MR, Basha SH, Gopinath D, Muthusamy R & Jayakumar R. Initial upregulation of growth factors and inflammatory mediators during nerve regeneration in the presence of cell adhesive peptide-incorporated collagen tubes. *Journal of the Peripheral Nervous System*. 2005; 10: 17–30.
 96. Walsh S & Midha R. Use Of Stem Cells to augment Nerve Injury Repair. *Neurosurgery*. 2009; 65: A80–A86.
 97. Richardson PM, Miao T, Wu D, Zhang Y, Yeh J, Bo X. Responses of The Nerve Cell Body to Axotomy. *Neurosurgery*. 2009; 65: A74–A79.
 98. McQuarrie IG & Lund LM. Intra-Axonal Myosin and Actin in Nerve Regeneration. *Neurosurgery*. 2009; 65:A93–A96.
 99. Tessa Gordon. The role of neurotrophic factors in nerve regeneration. *Journal of Neurosurgery*. 2009; 26 (2) : 1-6.

100. King CE , Rodger J, Bartlett C , Esmaili T , Dunlop SA , Beazley LD. Erythropoietin is both neuroprotective and neuroregenerative following optic nerve transection. *Experimental Neurology*. 2007; 205: 48–55.
101. Kwon, BK, Fisher, CG, Dvorak, M F, Tetzlaff W . Strategies to Promote Neural Repair and Regeneration After Spinal Cord Injury. *Spine*. 2005; 30(17S): S3-S13.
102. Sola A, Penga H, Rogidoa M and Wena T-C. Animal models of neonatal stroke and response to erythropoietin and cardiotrophin-1. *International Journal of Developmental Neuroscience*. 2008; 26(1): 27-35.
103. Kumral A, Tugyan K, Gonenc S, Genc K, Genc S, Sonmez U, Yilmaz O, Duman N, Uysal N and Ozkan H. Protective effects of erythropoietin against ethanol-induced apoptotic neurodegeneration and oxidative stress in the developing C57BL/6 mouse brain. *Developmental Brain Research*. 2005; 160(2) : 146-156.
104. Nagamatsu M, Schmelzer J D., Zollman P J., Smithson I L., Nickander K K., & Low P A. Ischemic reperfusion causes lipid peroxidation and fiber degeneration. *MUSCLE & NERVE*. 1996; 19: 37-47.
105. Iida H, Schmelzer JD, Schmeichel AM, Wang Y, & Low PA. Peripheral nerve ischemia: reperfusion injury and fiber regeneration . *Experimental Neurology*. 2003; 184 : 997– 1002.
106. Mitsui Y, Schmelzer JD, Zollman PJ , Mitsui M , Tritschler HJ & Low PA. Alpha-lipoic acid provides neuroprotection from ischemia-reperfusion injury of peripheral nerve. *Journal of the Neurological Sciences*.1999; 163 : 11–16.

