



T.C.

GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

PLASTİK, REKONSTRÜKTİF VE ESTETİK CERRAHİ ANABİLİM DALI

**ERİTROPOİETİN VE FİBRİN YAPIŞTIRICI
KARIŞIMININ PERİFERİK SİNİR ONARIMINDA
KULLANIMI**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Ayhan Işık ERDAL

TEZ DANIŞMANI

Doç. Dr. Kemal FINDIKÇIOĞLU

ANKARA

2019

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
PLASTİK, REKONSTRÜKTİF VE ESTETİK CERRAHİ ANABİLİM DALI

ERİTROPOİETİN VE FİBRİN YAPIŞTIRICI
KARIŞIMININ PERİFERİK SİNİR ONARIMINDA
KULLANIMI

UZMANLIK TEZİ
Dr. Ayhan Işık ERDAL

TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Kemal FINDIKÇIOĞLU

Bu tez Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 01/2018-31
proje numarası ile desteklenmiştir.

ANKARA
2019



**Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tez Sınav Tutanağı**

Adı ve Soyadı	Ayhan Işık ERDAL
Baba Adı	Hacı Emin
Doğum Yeri / Tarihi	Akpınar 06/06/1989
Diploma Tarihi / Diploma No	17/07/2013 / 13/392/080 166522
Mezun Olduğu Fakülte	Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi
İhtisas Yaptığı Anabilim Dalı / Bilim Dalı	Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı
İhtisas Süresi	Yıl: 5 Ay:
Sınav Yapılmasını İsteyen Makam	Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı

UZMANLIK TEZİNİN ADI: Eritropoietin ve Fibrin Yapıştırıcı Karışımının Periferik Sinir Onarımında Kullanımı

JÜRİ KARARI: JÜRİ TEZİ ONAYLAMIŞTIR.

JÜRİ ÜYELERİ

BAŞKAN

Prof. Dr. Seyhan ÇENETOĞLU
Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi
Anabilim Dalı Başkanı

ÜYE

Doç. Dr. Kemal FINDIKÇIOĞLU
Plastik, Rekonstrüktif ve
Estetik Cerrahi Anabilim Dalı
Tez Danışmanı

ÜYE

Doç. Dr. Burak KAYA
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Plastik Rekonstrüktif ve
Estetik Cerrahi Anabilim Dalı

1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Eritropoietin	4
2.1.1. Eritropoietinin tarihi	4
2.1.2. Eritropoietinin yapısı, etki mekanizması ve metabolizması	6
2.1.3. Eritropoietinin farklı dokulara etkisi	8
2.1.4. Eritropoietinin merkezi sinir sistemi üzerine etkisi	10
2.1.5. Eritropoietinin periferik sinir sistemi üzerine etkisi	13
2.2. Fibrin Yapıştırıcı	18
2.2.1. Fibrin yapıştırıcının tarihi	18
2.2.2. Fibrin yapıştırıcının yapısı, etki mekanizması ve metabolizması	18
2.2.3. Fibrin yapıştırıcının kullanım alanları	21
2.2.4. Fibrin yapıştırıcının sinir onarımında kullanımı	22
2.2.5. Fibrin yapıştırıcının taşıyıcı olarak kullanımı	24
2.3. Periferik Sinir Anatomisi	25
2.4. Periferik Sinir Hasarı ve Onarımı	27
2.5. Periferik Sinir İyileşmesi	30
2.6. Eritropoietinin Sinir Onarımında Kullanımı	32
2.7. Fibrin Yapıştırıcıya Eklenen Faktörler İle İyileşmenin Desteklenmesi	34
3. GEREÇ VE YÖNTEM	36
3.1. Gruplar ve Açıklamaları	36
3.2. Eritropoietin İçeren Fibrin Yapıştırıcının Hazırlanması	37
3.3. Cerrahi Prosedür	47
3.4. Yürüme Analizi	53
3.5. Pin-Prick Test	58
3.6. Toe-Spread Test	58
3.7. Histolojik Değerlendirme	59
3.8. İstatistiksel Analiz	60
4. BULGULAR	61
4.1. Makroskobik ve Morfolojik Bulgular	61
4.2. Yürüme Analizi Sonuçları	63
4.3. Pin-Prick Test Sonuçları	66
4.4. Toe-Spread Test Sonuçları	67
4.5. Histolojik Bulgular	68
5. TARTIŞMA	77
6. SONUÇ	84
7. ÖZET	85
8. SUMMARY	87
9. KAYNAKLAR	89
10. ÖZGEÇMİŞ	102

ŞEKİLLER

Şekil 1: Eritropoietin reseptörü ve JAK-STAT transdüksiyon mekanizması (Nelson DL, Lehninger AL, Cox MM. Lehninger principles of biochemistry: Macmillan; 2008. 433 p)	7
Şekil 2: Eritropoietin ve anti-apoptotik etki yolları (Morishita E, Masuda S, Nagao M, Yasuda Y, Sasaki R. Erythropoietin receptor is expressed in rat hippocampal and cerebral cortical neurons, and erythropoietin prevents in vitro glutamate-induced neuronal death. Neuroscience. 1997;76(1):105-16.)	13
Şekil 3: Fibrin yapıştırıcı bileşenlerinin etki mekanizması	19
Şekil 4: Sinirin yapısı (Gartner LP. Textbook of Histology, International Edition: Elsevier Health Sciences; 2015)	26
Şekil 5: A) Sinir kesisi B) Epinöral onarım C) Perinöral onarım (Gurtner GC, Neligan PC, Liu DZ. Plastic Surgery: Volume 1 Principles. London: Elsevier Health Sciences; 2018.)	29
Şekil 6: Rekombinant insan eritropoietini preparatı Eprex® 2000 (epoetin alfa / epoetina alfa) (Janssen-Cilag Ltd., Beerse, Belgium)	38
Şekil 7: Tisseel Lyo kutusu ve Eprex 2000 şırıngası	42
Şekil 8: Tisseel Lyo kutusu içeriği, sol üstte 4 flakon ilacı içeren kutu, sol altta Duploject enjeksiyon sistemi içeren kutu	42
Şekil 9: Tisseel Lyo kutusu içeriği, sağ üstte 4 flakon ilaç, sağ altta Duploject enjeksiyon sistemi	43
Şekil 10: Soldan sağa sırayla fibrinojen (sealer protein), aprotinin, kalsiyum, trombin (arka planda hangi flakonun hangisine aktarılacağı gösterilmektedir)	43
Şekil 11: Mavi ile kodlanmış flakonlar (fibrinojen ve aprotinin) ile siyah ile kodlanmış flakonların (kalsiyum ve trombin) yine aynı renkler ile kodlanmış şırıngalar ile gruplanması	44
Şekil 12: Solda aprotininin fibrinojene, sağda kalsiyumun trombine aktarılacak üzere aynı renkler ile kodlanmış şırıngalara çekilmesi	44
Şekil 13: Solda aprotininin fibrinojene, sağda kalsiyumun trombine aktarılması	45
Şekil 14: hem fibrinojen hem de trombin bileşenine eşit miktarda eritropoietin eklenmesi	45
Şekil 15: Isıtıcı ve karıştırıcı Fibrinotherm sistem ile bileşenlerin aktivasyonu	46
Şekil 16: Kullanıma hazır Duploject enjeksiyon sistemine aktarılmış fibrin yapıştırıcı ve yedek uç	46
Şekil 17: Pozisyon verilmesi ve insizyonun cerrahi öncesi işaretlenmesi	48
Şekil 18: Cerrahi alanın steril örtünmesi ve insizyon alanının dominant olmayan elin yardımı ile gerilmesi	48
Şekil 19: İnsizyonun 15 numara bistüri ile yapılması	49
Şekil 20: Tenotomi makası ile kas planının geçilerek siyatik sinirin görülmesi	49
Şekil 21: Siyatik sinirin mobilize edilerek insizyondan dışarı alınması	50

Şekil 22: 8 mm genişliğinde yapışmaz kırmızı renkli fonun sinirin arkasına yerleştirilmesi (solda düşük büyütme, sağda yüksek büyütme ile).....	50
Şekil 23: 2 adet epinöral dikiş ile onarım (solda düşük büyütme, sağda yüksek büyütme ile)	51
Şekil 24: Onarım hattına fibrin yapıştırıcı uygulanması	51
Şekil 25: Fibrin yapıştırıcının onarım hattınca organize olmuş görünümü	52
Şekil 26: İnsizyonun kapatılması sonrası görünüm	52
Şekil 27: Ayak izinde ölçülen mesafelerin ayaktaki karşılığı. A – Print Length (PL) (Ayak izinin boyu, ön-arka mesafesi) B – Toe Spread (TS) (Birinci ve beşinci parmakların uçları arasındaki mesafe) C – Intermediary Toe Spread (IT) (İkinci ve dördüncü parmakların uçları arasındaki mesafe) (Brown CJ, Mackinnon SE, Evans PJ, Bain JR, Makino AP, Hunter DA, et al. Self-evaluation of walking-track measurement using a Sciatic Function Index. Microsurgery. 1989;10(3):226-35)	54
Şekil 28: Üç farklı çalışmada tanımlanan siyatik fonksiyonel indeks formülleri. E ile başlayan kısaltmalar Experimental (deneysel) tarafı göstermektedir. N ile başlayan kısaltmalar Normal tarafı göstermektedir. Bu çalışmada C. satırında yer alan Bein ve ark. tanımladığı formül kullanılmıştır. (Brown CJ, Mackinnon SE, Evans PJ, Bain JR, Makino AP, Hunter DA, et al. Self-evaluation of walking-track measurement using a Sciatic Function Index. Microsurgery. 1989;10(3):226-35)	55
Şekil 29: Normal, posterior tibial sinir hasarlı, penoneal sinir hasarlı ve siyatik sinir hasarlı ratlarda ayak bileği, ayak, ayak parmakları morfolojik değişimleri. Siyatik siniri kesilen tarafta ayak ön-arka mesafesinin (print length) arttığı, ayak bileği dorsifleksiyonunun azaldığı, birinci-beşinci parmak ucu mesafesinin (toe spread) azaldığı görülmektedir. (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.).....	56
Şekil 30: Ayak izi örneği.....	57
Şekil 31: Solda Grup 4'ten bir örnek, sağda Grup 5'ten bir örnek görülüyor. Sadece morfolojik yorum ile solda iyileşmenin iyi olduğu, sağda kötü olduğu söylenebilir (kırmızı oklar deney tarafı olan ekstremitayı işaret etmektedir).....	62
Şekil 32: Grup 5'ten bir hayvana ait örnekte ayak morfolojik değişimleri belirgin olarak görülüyor (kırmızı oklar deney tarafı olan ekstremitayı işaret etmektedir).	62
Şekil 33: 21. günde gruplara göre siyatik fonksiyon indeks değerleri	65
Şekil 34: 42. günde gruplara göre siyatik fonksiyon indeks değerleri	65
Şekil 35: 63. günde gruplara göre siyatik fonksiyon indeks değerleri	66
Şekil 36: Schwann hücre artış skorunu gösteren grafik (Ortalama $\pm$ SS).....	70
Şekil 37: Endonöral kollajen artış skorunu gösteren grafik (Ortalama $\pm$ SS). ..	71
Şekil 38: Fibriller yapıda bozulma skorunu gösteren grafik (Ortalama $\pm$ SS).....	72
Şekil 39: Grup 1'e ilişkin örnek resimler (Masson'un üçlü boyası, 400x büyütme). A: Proksimal uçta sinir fibrilleri kırmızı renkte izlenirken, Schwann hücrelerinin çekirdekleri siyah olarak izlenmektedir. B: Yara	

- bölgesinde epinöryumda fibrin yapıştırıcı kalıntısı (ok), fibrin yapıştırıcı etrafında inflamatuvar hücre infiltrasyonu izlenmektedir(kesik çizgi). Kollajen liflerin (mavi) düzenlenimi fibrin yapıştırıcıyı çevreleyecek şekildedir. C: Distal uçta kollajen liflerde artış izlenmektedir. Kollajen liflerdeki artışa Schwann hücrelerinde artış eşlik etmektedir. Perinöral damar yapıları çevrelerindeki kollajen liflerle izlenmektedir (yıldız). D: Distal uçta fibriler yapıda belirgin bozulma, endonöral kollajen miktarında artış görülmektedir. Vasküler yapılar okla gösterilmektedir. 73
- Şekil 40: Grup 2'ye ilişkin örnek resimler (Masson'un üçlü boyası, 400x büyütme). A: Proksimal uçta sinir fibrilleri endonöryum ve Schwann hücreleri doğal yapısında izlenmektedir. B: Distal uçta Schwann hücrelerinde yoğun artışa eşlik eden endonöral kollajen miktarında minimal artış, fibriller yapıda bozulma görülmektedir. 74**
- Şekil 41: Grup 3'e ilişkin örnek resimler (Masson'un üçlü boyası, 400x büyütme). A: Proksimal uçta korunmuş sinir yapısı. B: Distal uçta Schwann hücre yoğunluğunda artışa karşın korunmuş fibril yapısı. C: Distal uçta kollajen miktarında yoğun artış. 74**
- Şekil 42: Grup 4'e ilişkin örnek resimler (Masson'un üçlü boyası, 400x büyütme). A: Proksimal uçta korunmuş sinir fibril yapısı. B: Epinöryumda, dikiş materyali kalıntısı ve etrafındaki granülasyon dokusu (kesik çizgi) dışında kalan alanda selülarite artışı ve fibroblastların paralel düzenleniminde bozulmalar izlenmektedir. C: Distal uçta fibril yapısında bozulma, kollajen miktarında orta derecede artış ve Schwann hücrelerinde yoğun artış izlenmektedir. D: Distal uçta üstte epinöryum izlenmekte (kesik çizgi), fibrosit çekirdekleri siyah, kollajen lifleri paralel düzenlenmiş olarak izleniyor. Endonöral kollajen miktarı orta derecede artmış..... 75**
- Şekil 43: Grup 5'e ait örnek resimler (Masson'un üçlü boyası, 400x büyütme). A: Proksimal uçta sinir fibrilleri korunmuş ve eşlik eden Schwann hücrelerinin çekirdekleri, endonöral kollajen lifler izlenmektedir. B: Distal uçta dejenerasyona bağlı fibrillerde azalma, endonöral kollajen artışı, Schwann hücrelerinde artış görülmektedir. 75**
- Şekil 44: Grup 6'ya ilişkin örnek resimler (Masson'un üçlü boyası, 400x büyütme). A: Proksimal uçta korunmuş sinir fibrilleri. B: Sol tarafta epinöryum, sağ üstte sinir fibrilleri izlenmekte. Dikiş materyalini içeren granülasyon dokusu kesik çizgiyle çevrelenmiştir. C: Distal uçta endonöral kollajen miktarında minimal artış görülmekte ancak fibril yapısı korunmuş ve Schwann hücrelerinde artış izlenmemektedir..... 76**
- Şekil 45: Kontrol grubuna ilişkin örnek resimler (Masson'un üçlü boyası, 400x büyütme). A, B, C: Farklı bölgelerden alınmış fotoğraflarda sinir fibrillerinin düzenlenimi, Schwann hücre yoğunluğu, endonöral kollajen miktarı benzer olarak izlenmektedir..... 76**

TABLÖLAR

Tablo 1: Tisseel® (Baxter AG, Vienna, Austria) içeriği	20
Tablo 2: Piyasada bulunan fibrin yapıştırıcılar	21
Tablo 3: Periferik sinirlerin iletim hızına göre sınıflandırması (Gartner LP. Textbook of Histology, International Edition: Elsevier Health Sciences; 2015)	27
Tablo 4: Sinir hasarı sınıflandırması (Gurtner GC, Neligan PC, Liu DZ. Plastic Surgery: Volume 1 Principles. London: Elsevier Health Sciences; 2018.) .	28
Tablo 5: Deney grupları	37
Tablo 6: Pin-prick test skorları.....	58
Tablo 7: Toe-spread test skorları	59
Tablo 8: 21., 42. ve 63. günlerdeki siyatik fonksiyonel indeks sonuçları	64
Tablo 9: 21., 42. ve 63. günlerdeki pin-prick test sonuçları	67
Tablo 10: 21., 42. ve 63. günlerdeki toe-spread test sonuçları	68
Tablo 11: Schwann hücrelerinde artış, endonöral kollajen artışı, fibriller yapıda bozulma skorlarında gruplara ait ortalama ve standart sapma değerleri. 	69

KISALTMALAR

Epo - Eritropoietin

JAK – Janus Kinase

STAT – Signal Transducers and Activators of Transcription

Grb2 – Growth factor receptor – bound protein 2

MAPK – Mitogen – Activated Protein Kinases

CFU - Es – Eritroid Koloni Oluşturan Üniteler (Colony Forming Unit-Erythroid)

NMDA – N-methyl-D-aspartate

iNOS – indüklenabilir Nitrik Oksit Sentetaz

IGF-1 – insülin benzeri büyüme faktörü (insulin-like growth factor)

NGF – sinir büyüme faktörü (Nerve Growth Factor)

PLGA – poli(laktik asit-ko-glikolik asit)

HIV – insan immün yetmezlik virüsü (human immunodeficiency virus)

HCV – hepatit C virüsü

HBV – hepatit B virüsü

ABD – Amerika Birleşik Devletleri

Ca²⁺ – kalsiyum iyonu

Faktör 13 – Fibrin stabilize edici faktör

FGF – fibroblast büyüme faktörü

GÜDAM – Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezi

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Sinir sisteminde yara iyileşmesi mevcut sınırlılıkları nedeniyle araştırmaların hep ilgi odağı olmuştur. Periferik sinir sisteminde görülen yaralanmaların mikrocerrahi tekniklerle onarımı plastik cerrahide rutin gerçekleştirilen işlemlerdendir. Bu tür onarımlar sonrası elde edilen iyileşme başarısının kısmi olması bu alanda birçok klinik ve deneysel çalışmanın yürütülmesine neden olmuştur. Literatürde sinir onarımlarında kullanılabilecek farklı cerrahi teknik ve aygıtlar tanımlanmış, birçok maddenin sinir iyileşmesinde etkisi çalışılmıştır. Günümüzde de tatmin edici iyileşme sonuçlarına ulaşma amacıyla çalışmalar devam etmektedir.

Eritropoietin, eritropoezde rol alan bir hormondur. Bu hormonun rekombinant formu bazı anemi formlarının tedavisinde kullanılmak üzere piyasada bulunmaktadır. Zaman içinde eritropoietinin merkezi ve sinir sisteminde farklı etkileri görülmüştür. Bazı hastalıklarda sinir iyileşmesi üzerinde olumlu etkisi olabileceği hipotezine dayanan çalışmalar artmıştır. Farklı deneysel modellerde sistemik veya lokal eritropoietin uygulamasının sinir iyileşmesine etkilerini inceleyen çalışmalar mevcuttur. Bunların çoğunda eritropoietin uygulamasının sinir iyileşmesini olumlu yönde etkilediğine dair bulgular raporlanmıştır.

Fibrin yapıştırıcılar ilk olarak hemostaz amaçlı kullanıma sürülmüş, fibrinojen ve trombin olmak üzere iki bileşenden oluşan, bu iki bileşenin birleşmesi ile aktive olarak yapıştırıcı fonksiyonu gören ürünlerdir. Cerrahide ilk olarak kardiyak damar anastomozlarında hemostaz amacıyla kullanılmış, zamanla farklı cerrahi amaçlarda kullanımı yaygınlaşmıştır. Periferik sinir kesilerinin tamirinde de

kullanılmaktadırlar. Literatürde periferik sinir kesilerinin tamirinde altın standart bir yöntem olmasa da kesilmiş sinir uçlarının mikrocerrahi dikiş ile bir arada tutulması en çok kabul gören ve uygulanan tekniktir. Kesilmiş sinir uçlarını bir arada tutmada fibrin yapıştırıcılar da sık olarak kullanılmaktadır. Dikiş, fibrin yapıştırıcı, tüp kullanımı gibi tekniklerin izole olarak yada kombine kullanıldığı çalışmalar mevcuttur ve sonuçları çeşitlilik göstermektedir. Hangi tekniğin üstün olduğuna dair net veri yoktur. Dikiş ve fibrin yapıştırıcının kombine kullanımı da sık tercih edilen bir yöntemdir.

Fibrin yapıştırıcıların oluşturduğu çökeltinin vücutta yavaş gerçekleşen bir yıkıma uğraması nedeniyle bazı ilaçların vücutta kontrollü salınımını sağlayan bir vektör olarak kullanılabileceklerine dair çalışmalar yapılmıştır. Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (United States Food and Drug Administration - FDA) fibrin yapıştırıcı kullanımını onaylamıştır, bu haliyle yavaş salınımda kullanılan diğer farklı bileşimlere üstündür. Literatürde lokal ve kontrollü eritropoietin salınımı amacıyla fibrin yapıştırıcı kullanılan bir çalışma mevcuttur ve bu taşıma etkin olarak raporlanmıştır (1).

Literatürde fibrin yapıştırıcının sinir kesilerinin onarımında kullanımına dair fazlaca çalışma bulunmaktadır (2). Fakat bu çalışmaların hiçbirinde sinir kesisi onarımında eritropoietin ve fibrin yapıştırıcı karışımı kullanılmamıştır.

Hipotez: Bahsedilen literatür verilerinden yola çıkılarak, eritropoietin içeren fibrin yapıştırıcının periferik sinir kesisi onarımında kullanımının sinir iyileşmesini olumlu etkileyeceği hipotezi ortaya konulmuştur.

Amaç: Periferik sinir yaralanmaları özellikle el yaralanmalarında çoğunlukla sinir kesisi olarak sıklıkla görülmektedir. Mikrocerrahi ekipman ve tekniğin gelişmesi ve yaygınlaşması ile sinir onarım ameliyatlarının sayısı giderek artmaktadır. Fakat sinir iyileşmesi mekanizmasındaki zorluklar nedeniyle bazı olgularda fonksiyonel iyileşme ve kazanım kısıtlı olmakta yada olmamaktadır. Eritropoietinin fonksiyonel sinir iyileşmesini artırdığı literatürdeki bazı çalışmalarda gösterilmiştir. Bu çalışmada rutinde kullanılmakta olan onarım yöntemlerine ek olarak eritropoietin eklenerek iyileşmede artış sağlamak amaçlanmıştır. Eğer çalışmanın sonuçları bunu destekler ise eritropoietinin bu şekilde kullanımının klinik kullanıma girme olasılığının doğacağı düşünülmüştür. Fibrin yapıştırıcı içindeki eritropoietinin sinir iyileşmesine olumlu bir etkisinin olup olmadığı sorusuna cevap verme ve literatürdeki bu açığın kapatılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Eritropoietin

2.1.1. Eritropoietinin tarihi

İlk kez 1863 yılında Jourdanet yüksek rakımlarda yaşayan insanların daha visköz kana sahip oldukları gözlemini yaparak dolaylı da olsa eritropoietinin keşfinde ilk adımı atmıştır (3). 1891’de Viault Peru’da rakım olarak daha yüksek bölgeye göç edenlerde kırmızı hücre sayımının arttığını gözlemlemiştir (4). 1906’da Carnot ve Deflandre tavşanları kanatarak anemik hale getirmiş, anemik tavşanlardan elde ettiği serumu anemik olmayan tavşanlara aktarmış ve onlarda kırmızı hücre sayımının arttığını göstermiştir. Carnot ve Deflandre buna dayanarak kanda ‘hemopoietin’ diye tanımladıkları bir madde olduğu ve bu maddenin kan üretimini gerektiğinde artırdığı çıkarımını yapmışlardır (5). Ardından çeşitli yollar ile anemik ya da hipoksik hale getirilen rat ya da tavşanlar ile birçok çalışma yapılmıştır (6). 1948’de Bonsdorff ve Jalavisto daha önce ‘hemopoietin’ diye tanımlanan hormonal faktörü ‘eritropoietin’ olarak tanımlamışlardır (7). 1955’te Plazak ilk kantitatif eritropoietin testini geliştirmiştir (8). 1957’de Jacobson bu maddenin nerede üretildiğini bulmak amacıyla kanatılarak anemik hale getirilen ratlarda çeşitli organları çıkararak çalışmış ve bilateral böbreği çıkarılan ratlarda anemiye cevap olarak plazmada beklenen eritropoietin artışının olmadığını gözlemlemiştir (9). Bu eritropoietinin primer üretim yerinin böbrek olduğunu gösteren güçlü bir bulgudur. 1960’da White tarafından saf eritropoietin elde edilemediğinden kolbalt ile stimulusa bağlı ünite birimi tanımlanmıştır (10). 1966’da anemik koyun kanından elde edilen eritropoietinin ünitelendirilmesi amacıyla birinci Eritropoietin

Uluslararası Referans Standartını geliştirmişlerdir (11). 1972’de insan idrarından elde edilen eritropoietinin ünitelendirilmesi amacıyla da ikinci Eritropoietin Uluslararası Referans Standartını geliştirmişlerdir (12). Zaman içinde daha hassas saflaştırma ve ölçüm yöntemleri geliştirilmiştir (13). 1977’de Miyake insan idarından eritropoietini başarıyla saflaştırılmasını yedi basamaklı olarak sistematik şekilde yayınlamıştır ve Zanjani fetüste eritropoietin üretiminin primer yerinin karaciğer olduğunu göstermiştir (14, 15). 1985’te Lin eritropoietin genini, ekspresyonunu ve klonlamasını yayınlamıştır (16). Böylece ilk rekombinant insan eritropoietini 1985 yılında yapılabilmektedir. 1986’da Winearls rekombinant insan eritropoietininin kronik hemodiyaliz hastalarının anemi tedavisinde etkili olduğunu göstermiştir (17). 1989’da Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (United States Food and Drug Administration - FDA) rekombinant insan eritropoietininin (rHuEPO - epoetin alfa - Epogen®) kronik böbrek yetmezliği ile ilişkili aneminin tedavisinde kullanılmasını onaylamıştır (18). 1990’da D’Andrea ve Zon eritropoietin reseptörü yapısını ve aktivasyon mekanizmasına yönelik bulgular yayınlamışlardır (19). Yine 1992’de saf rekombinant insan eritropoietini için birinci Uluslararası Standart yayınlanmıştır (20). 2003’te saf yine rekombinant insan eritropoietini için ikinci Uluslararası Standart yayınlanmıştır (21).

Doksanlı yıllardan başlayarak eritropoietinin eritropoez dışında farklı etkileri olduğu gözlenmiştir. Örnek verilecek olursa 1998’de Sakanaka eritropoietinin nöronları iskemik hasardan koruduğunu ortaya koymuştur (22). 2003’te Calvillo rekombinant insan eritropoietininin miyokardiyumu iskemi-reperfüzyon hasarından koruduğunu ortaya koymuştur (23). Eritropoietinin farklı dokular üzerindeki çeşitli etkilerinden ilerde daha detaylı bahsedilecektir.

2.1.2. Eritropoietinin yapısı, etki mekanizması ve metabolizması

Eritropoietin bir glikoproteindir. Molekül ağırlığı 30.400 daltondur. ağırlığındadır. Primer olarak böbrekte, fetüste primer olarak karaciğerde üretilir. Ağırlığının yarısına yakını şeker (glikozil) yapısı oluşturur ve bu kısım sayesinde yıkılmaktan korunur. Dolaşımda bulunan matür protein 165 aminoasit içerir (24). Rekombinant insan eritropoietini ile endojen eritropoietin arasında şeker grupları ufak farklılıklar gösterebilir, fakat aminoasit dizilimleri aynıdır (25).

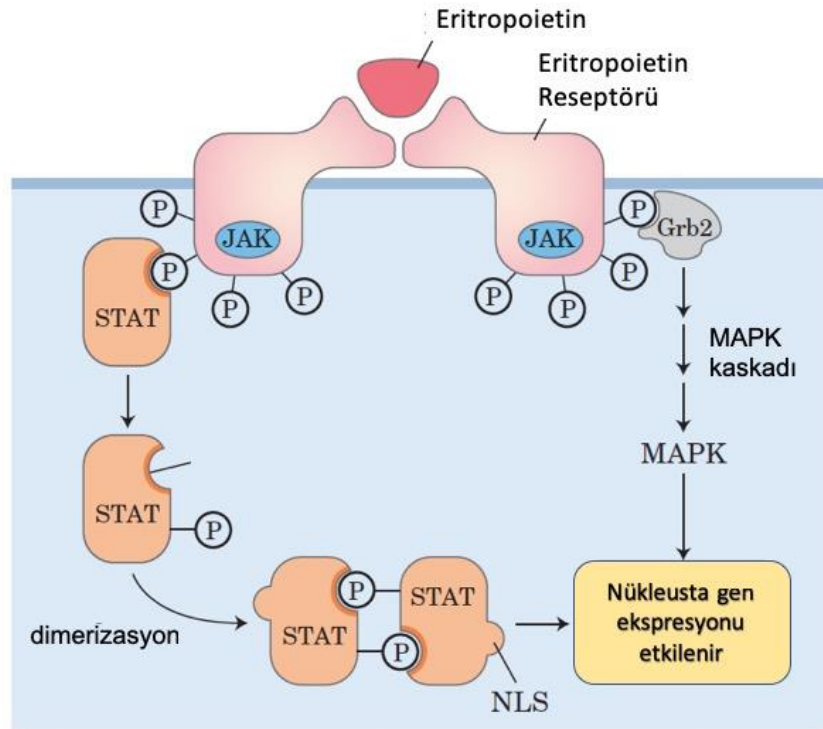
Eritropoietin primer olarak renal korteksteki peritübüler fibroblastlarda üretilir. Görevi hemoglobini stabil tutmak, kan kaybı durumlarında ise iyileşmeyi hızlandırmaktır. Sağlıklı insanda dolaşımda eritropoietin sürekli vardır. Böbrekteki eritropoietin sentezi transkripsiyon seviyesinde regüle edilir. Hipoksi ile üretimi uyarılır. Eritropoietin mRNA'sı beyin, karaciğer, dalak, akciğer, testis gibi böbrek dışı odaklarda da tespit edilmiştir. Fakat kronik böbrek yetmezliğinde bu alanlar böbrek üretimine alternatif olamamaktadır (26).

Üretilip dolaşıma salınan eritropoietin, kemik iliğinde eritrositik serinin progenitör hücrelerinde, özellikle eritroid koloni oluşturan ünitelerde (colony-forming units -erythroid, CFU-Es) proliferasyon ve farklılaşmayı uyarır.

Eritropoietin, hücre yüzeyindeki eritropoietin reseptörüne bağlanarak etki gösterir. Eritropoietin reseptörü 60.000 dalton ağırlığındadır. Bağlanma sonrası reseptör konformasyonel değişikliğe girer, reseptörde dimerizasyon olur, bunun sonunca reseptör solübl Janus Kinase'i (JAK) bağlar, JAK ise eritropoietin reseptörünün sitoplazmik domainindeki bazı tirozin rezidülerini fosforile eder. Bu fosforilasyon işlemi sonrası ana olarak Signal Transducers and Activators of

Transcription (STAT) aktive olur. Özetle JAK2/STAT-5 intraselüler sinyal yolağı aktive olur (27). Ayrıca growth factor receptor-bound protein 2 (Grb2) ve mitogen-activated protein kinases (MAPK) kaskadı da aktive olur. Tüm bu transkripsiyon faktörleri nükleusta gen ekspresyonunu düzenler ve etkileri ortaya çıkarır (Şekil 1) (28).

Eritropoietinin metabolizması uzun süre araştırılmıştır. Öne çıkan güncel görüş bağlandığı reseptörü ile birlikte hücre içine alınıp lizozomal olarak yıkıldığıdır (29). Eritropoietinin glikozil komponentindeki ufak farklılıklarının potensi ve yarı-ömrü etkilediği düşünülmektedir (26).



Şekil 1: Eritropoietin reseptörü ve JAK-STAT transdüksiyon mekanizması (Nelson DL, Lehninger AL, Cox MM. Lehninger principles of biochemistry: Macmillan; 2008. 433 p)

2.1.3. Eritropoietinin farklı dokulara etkisi

Doksanlı yıllarda eritropoietinin böbrek haricinde de sentezlendiği, eritropoez dışındaki hücrelerde de reseptörü ve dolayısıyla etkileri olduğu keşfedildikten sonra farklı doku ve organlardaki bu etkileri araştırmaya yönelik çalışmalar sıklaşmıştır. Bu alanlar arasında endotel hücreleri, santral ve periferik sinir sistemi, erkek ve kadın üreme organları, gastrointestinal sistem, kalp öne çıkmaktadır. Fakat bunlara ek olarak çok çeşitli etki alanları gösterilmiştir. Bu farklı etkiler otokrin, parakrin ya da endokrin mekanizma ile ortaya çıkabilmektedir (13).

Literatürde eritropoietinin koruyucu, rejeneratif, anjiojenik, trofik, anti-apoptotik etkilerini araştıran birçok çalışma vardır (30).

Daha önce de belirtildiği gibi 2003'te Calvillo ve ark. rekombinant insan eritropoietinin miyokardiyumu iskemi-reperfüzyon hasarından koruduğunu ortaya koymuştur (23). Yine 2003'te Sterin-Borda ve ark. uzamış hipoksi ile kardiyak kontraktiliteyi baskılamış, eritropoietin verilmesi sonrası bu baskılanmanın düzeldiğini, monoklonal anti-eritropoietin antikorunun verilmesi ile de baskılanmanın tekrar ettiğini göstermiştir (31).

2000'de Ledbetter ve ark. düşük doğum ağırlıklı doğan ve anemi nedeniyle rekombinant insan eritropoietini ile tedavi edilen yenidoğanlarda nekrotizan enterokolitin daha az olduğunu göstermiştir (32). 2001'de Jull ve ark. eritropoietinin yenidoğan rat bağırsağına trofik faktör olarak etti ettiğini göstermiştir (33).

1998'de Yasuda ve ark. uterustan östrojen bağımlı eritropoietin üretiminin olduğunu ve bunun uterin anjiogenezde rol oynayabileceğini göstermiştir (34). Dişi

üreme sisteminde eritropoietin üretimi uterus dışında over, fallop tüpü, endometrium, servikste de gösterilmiştir (35, 36). Plasentada da trofoblastlarda gösterilmiştir (37).

Erkek üreme sisteminde ilk olarak Sertoli hücrelerinde eritropoietin üretimi gösterilmiştir (38). Daha sonra penis, prostat ve periprostatik nörovasküler yapılarda da gösterilmiştir (39). Özellikle prostatektomi sonrası gelişen erektil disfonksiyonun tedavisinde kullanımı araştırılmıştır (40).

Eritropoietinin rejeneratif etkisiyle kemik iyileşmesini hızlandığı da raporlanmıştır (41-43). Mihmanli ve ark. mandibulada distraksiyon osteogenezi uygulanan tavşanlarda eritropoietinin kemik konsolidasyonunun hızını ve kalitesini artırdığını göstermiştir (44).

Hamed ve ark. eritropoietinin yağ grefti tutulunumu artırdığını göstermişlerdir (45).

Hong ve ark. rekombinant insan epidermal büyüme faktörü ve eritropoietin kombinasyonunun diyabetik ratlarda tam kalınlıkta yara iyileşmesini hızlandığını göstermişlerdir (46). Eritropoietinin diyabetiklerde yara iyileşmesine etkisini araştıran birçok çalışma mevcuttur (47).

Fenjves ve ark. tarafından pankreatik ada hücrelerinde eritropoietin reseptörü varlığı ve bu hücreler üzerinde eritropoietinin anti-apoptotik etkisi gösterilmiştir (48).

Özetle eritropoietin sentezi ve reseptörünün varlığı gösterilen birçok doku ve organ vardır.

2.1.4. Eritropoietinin merkezi sinir sistemi üzerine etkisi

İlk kez 1992’de Tan ve ark. tarafından hipoksi uyarısı sonrası beyin, testis ve dalakta eritropoietin mRNA miktarında artış gösterilmiştir (49). Bu keşif üzerine beyin hangi bölgelerinde eritropoietin ve reseptörünün bulunduğunu araştıran çalışmalar sıklaşmıştır (50). Digicaylioglu ve ark. radyoaktif iyot ile işaretlenmiş eritropoietin kullanarak ratlarda hipokampus, kapsula intern, korteks ve orta-beyin bölgesinin eritropoietin bağladığını göstermiştir (51). Jull ve ark. gelişen insan beyinde eritropoietin ve reseptörünün varlığını ve yoğunluğunu 5 haftalık embriyodan başlayarak yetişkin beyine kadar incelemiş ve farklı gelişmişlik dönemlerinde farklı alan ve hücrelerde yoğunlaştığını göstermiştir. Bu bulgudan yola çıkarak eritropoietinin beyin gelişiminde rol oynadığı yorumunu yapmıştır (52). Siren ve ark. normal ve iskemik-hipoksik insan beyinde eritropoietin ve reseptörünü araştırmışlardır. Normal beyinde nöronlarda, taze enfarklarda vasküler endotel ve mikrodamarlarda, eski enfarklarda ise reaktif astrositlerde eritropoietin ve reseptörünün yoğunlaştığını göstermişlerdir. Bulgulara dayanarak eritropoietinin endojen nöroprotektif sistem olarak rol oynadığı yorumunu yapmışlardır (53). Yu ve ark. eritropoietin reseptörü olmayan farelerde embriyonik beyinde ileri derece apoptozis gerçekleştiğini göstermişlerdir (54). Sugawa ve ark. eritropoietinin oligodendrosit ve astrosit maturasyonunda rol oynadığını göstermiştir (55).

Zaman içinde eritropoietinin nöroprotektif ajan olduğunu gösteren çalışmalar artmıştır (13, 56). Morishita ve ark. ratlarda glutamat aracılı nörotoksisite modelinde eritropoietinin nöroprotektif etki gösterdiğini raporlamıştır (57). Dayicioglu ve ark. eritropoietinin nöroprotektif etkisinin JAK2 ile NF-kappaB sinyal yolları

arasındaki bağlantı ile açıklamıştır (58). Ruscher ve ark. oksijen ve glukoz kısıtlama modelinde eritropoietinin parakrin nöroprotektif ajan olduğunu göstermiştir (59). Weber ve ark. eritropoietinin iskemi sonrası sinaptik transmisyonu artırdığını göstermiştir (60). Sadamoto ve ark. orta serebral arteri tıkanarak iskemik hasar yaratılan ratlara eritropoietin verilmesinin yön bulma yetisini kaybetmeyi engellediğini göstermiştir (61). Sakanaka ve ark. karotid tıkanarak iskemik hasar yaratılan ratlara eritropoietin verilmesinin öğrenme yetisini kaybetmeyi engellediğini göstermiştir. Bunu N-methyl-D-aspartate (NMDA) reseptörü aracılı glutamat toksisitesi ile ilişkili kalsiyum artışı ve nitrik oksit aracılı serbest radikal oluşumunu engelleyerek yaptığı yorumunu yapmışlardır (22). Brines ve ark. rekombinant insan eritropoietinin iskemik ratlarda kan-beyin bariyerini geçerek nöroprotektif ajan olarak davrandığını göstermişlerdir (62).

Eritropoietinin nöroprotektif etkileri optik sinir ve retinada da gösterilmiştir. Junk ve ark. iskemi reperfüzyon hasarı modelinde eritropoietinin antiapoptotik etki ile retinal nöronları koruduğunu göstermiştir (63). Sühs ve ark. ve Diem ve ark. tarafından optik nörit hastalarında standart tedavi olan metiprednisolona ek olarak verilen yüksek doz eritropoietinin olumlu etkileri gösterilmiştir (64) (65). King ve ark. eritropoietinin ratlarda optik sinir kesisinde nöroprotektif ve nörorejeneratif etkisi olduğunu göstermişlerdir (66). Metanol aracılı toksik optik nöropatide kullanımını raporlayan çalışmalar da mevcuttur (67, 68).

Spinal kord hasarlarında da eritropoietinin nöroprotektif etkisi gösterilmiştir. Gorio ve ark. spinal kord ezilme ve kontüzyon yaralanması modelinde eritropoietinin

inflamasyonu ve kavitasyonu azalttığı, iyileşmeyi hızlandırdığını göstermişlerdir (69).

Klinikte eritropoietinin serebrovasküler olay geçiren hastalarda kullanımı mevcuttur (70). 2002’de Ehrenreich ve ark. 13 iskemik inme hastasına üç gün boyunca intravenöz yüksek doz rekombinant insan eritropoietini vermişler ve olumlu etkisini göstermişlerdir (71).

Eritropoietinin nöroprotektif etkisinden faydalanma amacıyla tasarlanan bazı klinik çalışmalarda ise olumlu etki görülmemiştir. Ehrenreich ve ark. 522 inme hastasında eritropoietinin uygulamasının anlamlı kazanım sağlamadığını göstermişlerdir (72). Lv ve ark. hipoksik-iskemik ensefalopati tanılı 21 yenidoğana uygulanan eritropoietinin uzun dönem takipte olumlu etkisinin olmadığını göstermişlerdir (73). Acar ve ark. geç evre optik nöropatide intravitreal eritropoietin enjeksiyonu uygulamasının etkili olmadığını raporlamışlardır (74).

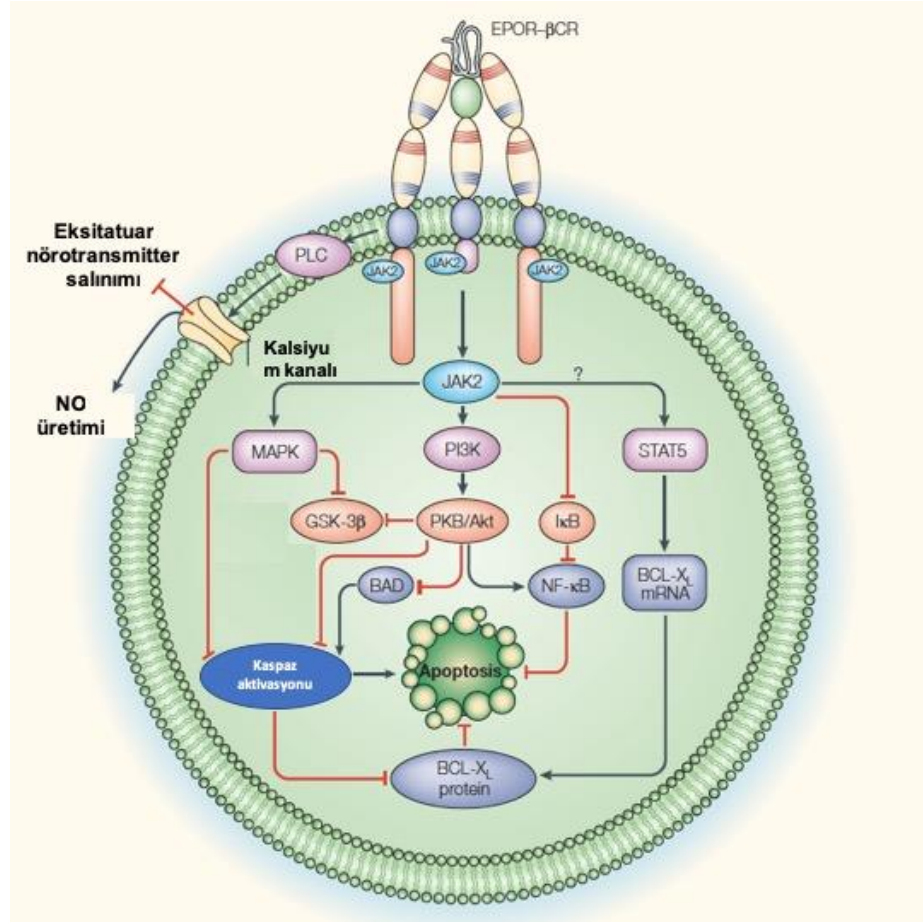
Psikiyatrik hastalıklarda da eritropoietinin etkileri araştırılmıştır. Ehrenreich ve ark. şizofreni ile eritropoietinin olası ilişkilerini raporlamıştır (75, 76). Ma ve ark. depresyon ile eritropoietinin olası ilişkilerini raporlamıştır (77).

Pang ve ark. karbonmonoksit zehirlenmesi tedavisinde nöroprotektif olarak kullanımının olumlu etkilerini raporlamıştır (78).

Naldi ve ark. yaşa bağlı duyma kaybı yaşa bağlı işitme kaybı (presbiakuzi) modelinde eritropoietinin nöroprotektif etkisini göstermiştir (79).

Bahsedilen çalışmalar dışında yayınlanan ve devam eden birçok çalışma mevcuttur. Çalışmaların çoğunluğunda eritropoietinin olumlu etkileri gösterilmiştir. Fakat olumlu etkisinin olmadığını gösteren çalışmalar da tabi ki mevcuttur.

Şekil 2’de eritropoietinin doku koruyucu, anti-apoptotik etkilerini hangi yollar ve mekanizmalar aracılığı ile ortaya çıkardığı özetlenmiştir (56).



Şekil 2: Eritropoietin ve anti-apoptotik etki yolları (Morishita E, Masuda S, Nagao M, Yasuda Y, Sasaki R. Erythropoietin receptor is expressed in rat hippocampal and cerebral cortical neurons, and erythropoietin prevents in vitro glutamate-induced neuronal death. Neuroscience. 1997;76(1):105-16.)

2.1.5. Eritropoietinin periferik sinir sistemi üzerine etkisi

Eritropoietinin periferik sinir sistemi üzerindeki nöroprotektif ve rejeneratif etkileri mevcuttur. Hem deneysel hem klinik çalışmalarla periferik sinir sistemindeki etkileri tespit edilmiştir.

Literatürde eritropoietinin periferik sinir sistemi üzerindeki etkilerini araştıran deneysel sinir hasarı modellerinden en sık olarak ratlarda siyatik sinir modellerinin kullanıldığı görülür. Alternatif olarak spinal sinir, fasyal sinir modellerinin de kullanıldığı çalışmalar mevcuttur. Sinir hasarı tipi ezilme, avulsiyon, kesilme, toksik ya da bunların kombinasyonu olarak değişebilmektedir. Çalışmalarda rekombinant insan eritropoietini sistemik ve lokal olarak uygulanmıştır.

Campana ve ark. yaptığı çalışmada eritropoietin reseptörü aksonlarda, Schwann hücrelerinde, dorsal kök ganglion hücre gövdelerinde ve perinöral vasküler yapıların endotelinde gösterilmiştir. Siyatik sinirde kronik konstriksiyon hasarı yaratılan ratların Schwann hücrelerinde eritropoietin üretiminin arttığı, reseptörünün yoğunluğunun ise değişmediği gösterilmiştir (80). Li ve ark. rat siyatik sinir kronik konstriksiyon hasarı modelinde çalışarak periferik sinir sistemindeki nöroprotektif etkisinin Schwann hücrelerindeki eritropoietin reseptörleri üzerinden gerçekleştiğini raporlamıştır (81).

Lykissas ve ark. rat siyatik sinir kesisi ve uç-uca sinir onarımı modelinde onarım sonrası her 24 saatte bir uygulama olacak şekilde 20 gün boyunca sistemik 2680 ünite/kg eritropoietin vermişler ve bunun sinir iyileşmesini olumlu etkilediğini raporlamışlardır (82).

Zhang ve ark. rat fasyal sinir ezilme (crush) yaralanması modelinde her 24 saatte bir uygulama olacak şekilde 14 gün boyunca farklı gruplara sistemik 1000, 5000 ve 10000 ünite/kg eritropoietin vermişler ve 5000 ve 10000 ünite/kg dozda uygulanan gruplarda sinir iyileşmesinin olumlu etkilendiğini göstermişlerdir (83).

Geary ve ark. fare siyatik sinir ezilme yaralanması modelinde hafif, orta, ağır olacak şekilde farklı üç şiddette hasar yaratmışlar ve bir kez sistemik 5000 ünite/kg eritropoietin vermişler, orta şiddette hasar grubunda olumlu etkisinin olduğunu raporlamışlardır (84).

Allaf ve ark. ratlarda kavernöz sinir kesisi ile ilişkili erektil fonksiyon modelinde sistemik 5000 ünite/kg eritropoietin verilen grupta erektil fonksiyon kazanım süresinin azaldığını göstermişlerdir (40).

Zhang ve ark. ratlarda fasiyal sinir kesisi modelinde sakrifikasyona kadar haftada iki kez sistemik 5000 ünite/kg eritropoietin verilen gruplarda sinir iyileşmesinin hızlandığını göstermişlerdir. Bunu etkiyi eritropoietinin fasiyal sinir nükleusunda indüklenebilir Nitrik Oksit Sentetaz (iNOS) ekspresyonunu azaltarak yaptığı yorumunu yapmışlardır (85). Wang ve ark. ise bu etkiyi insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1) üretimini artırarak yaptığını raporlamıştır (86).

Bernstein ve ark. total kalça ya da diz artroplastisi ameliyatı geçiren ve periferik sinir hasarı gelişen hastalarda eritropoietin ve steroid kombinasyonunun fonksiyonel sinir iyileşmesini artırdığını raporlamışlardır (87).

Yin ve ark. rat siyatik sinir defektinin silikon tüp ile onarımı modelinde her 24 saatte bir uygulama olacak şekilde 14 gün boyunca 5000 ünite/kg eritropoietin vermişler ve iyileşmenin olumlu etkilendiğini raporlamışlardır (88).

Sarica ve ark. rat siyatik sinir ezilme ya da kesi grupları olan çalışmalarında sadece işlem sırasında bir defa sistemik ya da lokal olacak şekilde 5000 ünite/kg eritropoietin vermişler ve bunun sinir iyileşmesini olumlu etkilediğini raporlamışlardır (89).

Rotter ve ark. ratlarda kombine sinir ve kas hasarı modelinde işlem sırasında bir defa sistemik 5000 ünite/kg eritropoietin uygulamasının iyileşmeyi olumlu etkilediğini göstermişlerdir (90).

Elfar ve ark. fare siyatik sinir ezilme ya da kesi grupları olan çalışmalarında cerrahiden 24 saat önce, cerrahi sırasında, cerrahiden 24 saat sonra ve cerrahiden 1 hafta sonra olacak şekilde sistemik 5000 ünite/kg eritropoietin vermişler ve bunun sinir iyileşmesini olumlu etkilediğini raporlamışlardır (91).

Sundem ve ark. yaptığı fare siyatik sinir ezilme modelinde bazı gruplara cerrahi sırasında bir defa sistemik 5000 ünite/kg eritropoietin, bazı gruplara ise cerrahi sırasında lokal olarak fibrin yapıştırıcı içinde eritropoietin verilmiştir. Eritropoietin alan gruplarda sinir iyileşmesinin daha hızlı olduğu raporlanmıştır. Fibrin yapıştırıcı yardımı ile lokal olarak eritropoietin uygulaması sistemik uygulama kadar etkin olduğu raporlanmıştır. Eritropoietinin, Schwann hücreleri üzerinden miyelin durumunu etkileyerek bu etkiyi ortaya çıkardığı yorumunu yapmışlardır. Literatürdeki eritropoietin ile fibrin yapıştırıcının kombine edilerek kullanıldığı tek çalışma budur (1).

Zhang ve ark. rat siyatik sinir defekti modelinde ayrı ya da kombine olarak eritropoietin ve sinir büyüme faktörünü (NGF) poli(laktik asit-ko-glikolik asit) (PLGA) bazlı partiküllere yüklenmiş ve lokal olarak uygulamışlardır. Sundem ve ark. yaptığı fibrin yapıştırıcı kullanımı gibi burada da PLGA kullanımını lokal olarak kontrollü eritropoietin salınım mekanizması olması amacıyla tercih edilmiştir (92). Zhang ve ark. yaptığı başka bir çalışmada eritropoietin yüklenmiş PLGA partiküllerinin en az 14. güne kadar kontrollü salınım yaptığı gösterilmiştir (93).

Yine Zhang ve ark. yaptığı başka bir çalışmada lokal olarak kontrollü salınım eritropoietin kitosan sinir kondüitine yüklenerek uygulanmıştır (94).

Noguchi ve ark. ratlarda C6 sinir kökü avulsiyon yaralanması modelinde başlangıç zamanlar grupları arasında farklı olacak şekilde her 24 saatte bir ve üç gün boyunca sistemik 2680 ünite/kg eritropoietin vermişler ve hasar sonrası 96 saat içinde başlayan eritropoietin uygulamasının iyileşmesini olumlu etkilediğini raporlamışlardır (95).

Danigo ve ark. ratlarda resiniferatoxin ile oluşturulan küçük fiber nöropatisi modelinde hasardan bir gün önce başlanarak bir hafta boyunca günlük sistemik 3000 ünite/kg eritropoietin verilmesinin nöropatiden koruduğunu raporlamışlardır (96).

Periferik sinir hasarında eritropoietin kullanımına dair çalışmaların çoğunluğunda eritropoietinin olumlu etkileri gösterilmiştir. Fakat olumlu etkisinin olmadığını gösteren sayıca az olmakla birlikte tabii ki mevcuttur. Lohmeyer ve ark. rat siyatik sinir defektinin tüp ya da greft ile onarımı modelinde her 24 saatte bir uygulama olacak şekilde 14 gün boyunca 1000 ünite/kg eritropoietin vermişler ve akson sayısı ve çapı gibi önemli iyileşme parametrelerinin farklı olmadığını raporlamışlardır (97).

Çalışmalarda sistemik eritropoietin çoğunlukla subkutan nadir olarak da intraperitoneal olarak uygulanmıştır. Subkutan uygulamalarda yarı ömür diğer yollara göre daha uzundur ve yaklaşık 24 saattir (98). Rutin klinik uygulamalarda da rekombinant insan eritropoietini subkutan uygulanmaktadır.

2.2. Fibrin Yapıştırıcı

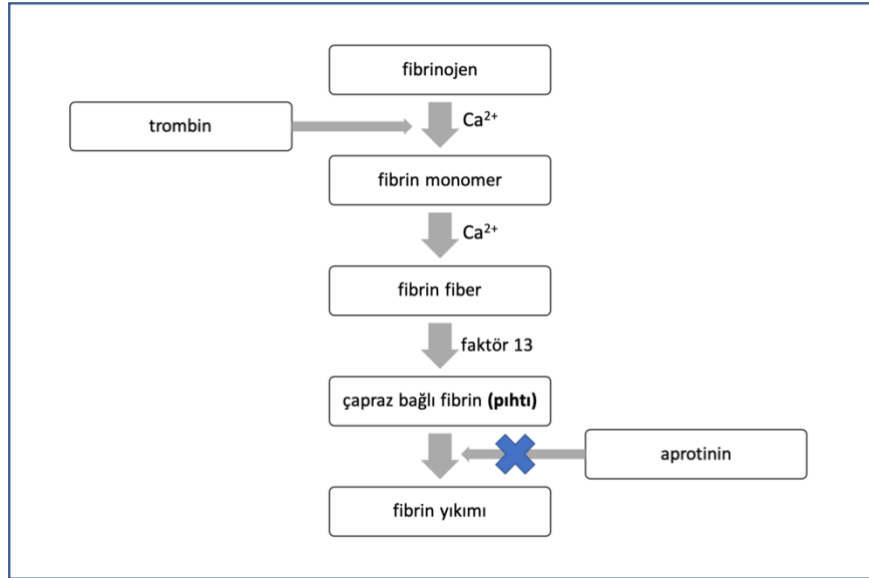
2.2.1. Fibrin yapıştırıcının tarihi

Fibrin yapıştırıcıların (fibrin glue, fibrin sealant, fibrin adhesive) cerrahide kullanımı fikri ilk olarak 1909'da Bergel tarafından ileri sürülmüştür (99). 1940'da Young ve ark. fibrin yapıştırıcının periferik sinir onarımında kullanımını raporlamıştır (100). 1944'te Cronkite ve ark. deri greftlenmesinde fibrin yapıştırıcı kullanımını raporlamışlardır (101). Teknik imkanların gelişmesi ile kandaki koagulasyon mekanizması bileşenlerini konsantre etme kolaylaşmış ve 1972'de Avrupa'da havuzlanmış insan plazmasından elde edilen fibrin yapıştırıcılar ilaç piyasasına sürülmüştür (102). 1998 yılında Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (United States Food and Drug Administration - FDA) tarafından onaylanınca Amerika Birleşik Devletleri (ABD) piyasasına da gecikmeli olsa da fabrikasyon fibrin yapıştırıcılar girebilmiştir. Bu gecikmiş onayın en önemli nedeni insan immün yetmezlik virüsü (HIV), hepatit C virüsü (HVC), hepatit B virüsü (HBV) gibi kan yolu ile bulaşan virüslerden korkulmasıdır (103). FDA onayı öncesi ABD'de kişinin kendi kanının elde edilen otolog fibrin yapıştırıcılar kullanılmıştır (104, 105). Havuzlanmış insan plazmasından elde edilen fabrikasyon fibrin yapıştırıcılar günümüzde birçok farklı endikasyon ile kullanılmaktadır.

2.2.2. Fibrin yapıştırıcının yapısı, etki mekanizması ve metabolizması

Fibrinojen ve trombin olarak ana iki bileşenden oluşan, insan plazmasından elde edilen fibrin yapıştırıcılar fizyolojik koagulasyon kaskadının son basamaklarını ortaya koyarak stabil fibrin pıhtı oluşturma amacıyla kullanılırlar (106). Karmaşık

koagulasyon kaskadında kan ve doku kaynaklı 50 üzerinde faktör rol oynar (107). Fakat son basamakları özetlemek gerekirse; trombin fibrinojenden fibrin oluşumunu sağlar, bu dönüşümde kalsiyum iyonu (Ca^{2+}) kofaktör olarak görev yapar, fibrinler birleşerek pıhtıyı oluşturur, oluşan fibrin pıhtıyı da faktör 13 stabil hale getirir. Aprotinin ise bir proteaz inhibitörüdür ve fibrin pıhtının erken yıkımını engeller (Şekil 3)(106).



Şekil 3: Fibrin yapıştırıcı bileşenlerinin etki mekanizması

Trombin, fibrinojen, kalsiyum, faktör 13 (fibrin stabilize edici faktör) ve aprotinin fibrin yapıştırıcılardaki aktif ana bileşenlerdir. Bu ana bileşenler dışında farklı markada ürünlerde değişiklik gösterebilen yardımcı bileşenler de vardır, örnek olarak Tablo 1’de Tisseel® (Baxter AG, Vienna, Austria) bileşenleri verilmiştir. Tisseel® yapıştırıcı protein solüsyonu (sealer protein) ve trombin solüsyonu olmak üzere iki bileşenlidir. Trombin ve fibrinojen insan kaynaklı, aprotinin ise bovin ya da sentetik olabilmektedir.

Tablo 1: Tisseel® (Baxter AG, Vienna, Austria) içeriği

	Yapıştırıcı Protein Solüsyonu	Trombin Solüsyonu
Aktif Bileşenler	• Fibrinojen (insan) • Aprotinin (sentetik) • Faktör 13	• Trombin (insan) • Kalsiyum Klorid
Yardımcı Bileşenler	• Albumin (insan) • Histidin • Nikotinamid • Polisorbat 80 • Sodyum sitrat • Su (enjeksiyon için)	• Albumin (insan) • Sodyum klorid • Su (enjeksiyon için)

Tisseel® ürününün kullanıma hazırlanması ve enjeksiyon sistemine aktarımı

‘3. Gereç ve Yöntem’ bölümünde detaylı anlatılacaktır.

Farklı üreticilerin fibrin yapıştırıcıları içerik olarak değişiklik gösterebilmektedir. Tablo 2’de ilaç piyasasında bulunan fibrin yapıştırıcı alternatiflerinin özellikleri özetlenmiştir.

Tablo 2: Piyasada bulunan fibrin yapıştırıcılar

Ürün Markası	Üretici	Aktif Bileşenler	Doz Çeşitliliği
Tisseel	Baxter AG (Viyana, Avusturya)	Trombin, fibrinojen, aprotinin (sentetik), faktör 13	2, 4 ve 10 ml
Evicel	Ethicon (Ohio, ABD)	Trombin ve fibrinojen	2, 4 ve 10 ml
Thrombin-JMI (bovin orijin)	King Pharmaceuticals (Tennessee, ABD)	Trombin (bovin)	5 ve 20 ml
Quixil	OMRIX Biopharmaceuticals (New Jersey, ABD)	Trombin ve pıhtılaşma faktörleri	1, 2 ve 5 ml
Tissucol (bovin bileşen)	Baxter AG (Viyana, Avusturya)	Trombin, fibrinojen, aprotinin (bovin), faktör 13, fibronektin, plazminojen	1, 2, 4 ve 10 ml
Beriplast (bovin bileşen)	CSL Behring (Pensilvanya, ABD)	Fibrinojen, aprotinin (bovin), faktör 13	0.5, 1 ve 3 ml

Oluşan fibrin pıhtı, fibrin yapıştırıcı içindeki anti-fibrinolitik bileşen sayesinde gecikmeli olarak, yaklaşık birkaç hafta içerisinde, fibrinoliz mekanizması ile yıkılmaktadır (108).

2.2.3. Fibrin yapıştırıcının kullanım alanları

Fibrin yapıştırıcılar birçok farklı amaçla kullanılmıştır fakat bu kullanım alanları üç ana gruba indirgenebilir. Birincisi *hemostat* amacıyla kullanım, ikincisi *yapıştırıcı ya da tıkaçıcı ya da bariyer (sealing agent)* amacıyla kullanım, üçüncüsü ise ilaç ya da diğer biyoaktif maddeler için *taşıyıcı* amacıyla kullanım.

Hemostat olarak fibrin yapıştırıcı kullanımı ilk olarak kardiyovasküler cerrahide anastomoz hattı çevresinde ya da diğer bölgelerde, abdominal cerrahide karaciğer, dalak yaralanmalarında kanamayı engellemek amacıyla tercih edilmiştir (109-113).

Yapıştırıcı olarak fibrin yapıştırıcı sinir onarımında, deri greftlerinin immobilizasyonunda, ölü boşlukların kapatılmasında kullanılmıştır (2, 114-117).

Tıkayıcı olarak fistül onarımında, defekt doldurmada kullanılmıştır (118-120). Bariyer olarak dura onarımlarında kullanılmıştır (121, 122).

Taşıyıcı olarak fibrin yapıştırıcı kullanımı da birçok farklı ilaç, hücre ya da madde için denenmiştir.

Bu çalışmada fibrin yapıştırıcının yapıştırıcı ve taşıyıcı fonksiyonları kullanılmıştır. Bu amaçlarla kullanımından ‘2.2.5. Fibrin yapıştırıcının taşıyıcı olarak kullanımı’ alt başlığında daha detaylı bahsedilecektir.

2.2.4. Fibrin yapıştırıcının sinir onarımında kullanımı

Fibrin yapıştırıcının deneysel sinir onarımında ilk kullanımı 1940’da Young ve ark. tarafından raporlanmıştır (100). Buna rağmen fabrikasyon fibrin yapıştırıcılar ilaç piyasasına girene kadar bu konuda klinik uygulama olmamıştır.

1983’te Egloff ve ark. fibrin yapıştırıcı kullanarak sinir onarımı gerçekleştirdikleri 56 olguluk serilerini ve sonucun klasik onarıma eşit olduğunu raporlamışlardır (123).

1986’da Cruz ve ark. rat siyatik sinir onarım modelinde dikiş ile fibrin yapıştırıcının ayrı ya da kombine olarak kullanımına dair sonuçlarını raporlamışlardır. Sonuçlarında yalnızca fibrin yapıştırıcı kullanılan onarımlarda dehisans görüldüğünü ve başarısız olduğunu ortaya çıkarmıştır (124). Sames ve ark. da tavşan siyatik sinir modelinde yalnızca fibrin yapıştırıcı kullanılan onarımların başarısız olduğunu raporlamışlardır (125). Bu gibi çalışmaların sonuçlarına bakılarak mikrocerrahi teknikle yapılan dikiş ile onarım öne çıkmaktadır. Dikiş ile onarımın gücünün, fibrin yapıştırıcı ile onarıma kıyasla daha iyi olduğuna yönelik bulgular

birçok çalışmada vurgulanmıştır (126).

Fakat dikiş materyaline bağlı yabancı cisim reaksiyonu ya da olası başka bir inflamatuvar mekanizma ile dikiş ile yapılan onarım hatlarında fibrozisin daha fazla olduğuna, bunun da iyileşmeyi olumsuz etkilediğine dair çalışmalar mevcuttur. Literatürde fibrin yapıştırıcı ile onarım sonuçlarının daha başarılı olduğuna yönelik bulgular birçok çalışmada gösterilmiştir. Martins ve ark. rat siyatik sinir onarım modelinde fibrin yapıştırıcı ile onarımın daha başarılı olduğunu raporlamışlardır (127). Boedts ve Narakas da yine fibrin yapıştırıcı lehine bulgular yayınlamışlardır (128, 129). Inalöz ve ark. rat siyatik sinir onarım modelinde fibrin yapıştırıcı kullanılan grupta granümatöz inflamasyonun daha az olduğunu, sonuçların dikiş ile onarıma göre daha iyi olduğunu raporlamıştır (130).

Sameem ve ark. yaptığı çalışmada sinir onarımında fibrin yapıştırıcı ile dikiş tekniğinin etkinliğini araştıran 16 adet çalışma (12 rat siyatik sinir modeli, bir rat median sinir modeli, bir tavşan siyatik sinir modeli, bir kadavra tibial ve derin peroneal siniri, bir farklı sinirlerden oluşan klinik 56 olgudan oluşan seri) incelenmiş ve sonuçlar raporlanmıştır. Çalışmaların sonuçları değişiklik göstermekle birlikte ortaya koyulabilecek çıkarımlar mevcuttur. En önemli çıkarım olarak fibrin yapıştırıcı ve dikiş ile onarımların iyileşme sonuçları benzer olarak yorumlanmıştır. Dikiş ile onarım gruplarında dejeneratif sinir demetleri ve onarım hattında belirgin yabancı cisim granülomları fibrin yapıştırıcı kullanılan gruplara göre daha fazla bulunmuştur. Onarım sonrası ilk 1-2 haftadaki gerim kuvveti dikiş ile onarımda belirgin olarak daha yüksek, sonraki dönemde benzer bulunmuştur (2).

2.2.5. Fibrin yapıştırıcının taşıyıcı olarak kullanımı

Fibrin yapıştırıcıların içine farklı ilaç, hücre ya da madde karıştırarak taşıyıcı olarak kullanılması 80'li yıllarda başlamıştır. İçeriğe eklenen maddelerin, oluşan fibrin pıhtının haftalar içinde yıkılması sırasında yavaş olarak açığa çıkarak kontrollü salınımın gerçekleşmesi prensibine dayanır. Kolay ulaşılabilir, hazırlanabilir ve uygulanabilir olması en önemli avantajıdır. 1986'da Zilch ve ark. osteomyelit hastalarında sefotaksim içeren fibrin yapıştırıcının kontrollü salınım amacıyla kullanımının etkili olduğunu raporlamışlardır (131). Zamanla çeşitli ilaç, hücre, hormon, büyüme faktörü taşıyıcısı olarak kullanıldığı ve fibrin yapıştırıcının bu maddeler ile kimyasal ilişkisini inceleyen çalışmalar raporlanmıştır (132, 133).

Kitajiri ve ark. lidokain içeren fibrin yapıştırıcının tonsillektomi sonrası ağrı tedavisinde etkili olduğunu raporlamışlardır (134). Fu ve ark. ropivakain içeren fibrin yapıştırıcının laparoskopik kolesistektomi sonrası ağrı tedavisinde etkili olduğunu raporlamışlardır (135). Lendeckel ve ark. adipoz doku kaynaklı kök hücre içeren fibrin yapıştırıcının travmatik kalvaryal defekt tedavisinde kullanılabileceğini raporlamıştır (136). Stendel ve ark. taurolidin içeren fibrin yapıştırıcıların beyin tümörü rezeksiyonu sonrası lokal kemoterapi amacıyla kullanılabileceğini raporlamışlardır (137). Opitz ve ark. sisplatin içeren fibrin yapıştırıcıların malign plevral mezotelyoma nedeniyle yapılan pnömonektomi sonrası intrakaviter lokal kemoterapi amacıyla kullanılabileceğini raporlamışlardır (138). Hafeli ve ark. Renyum-188 içeren fibrin yapıştırıcıların beyin tümörü rezeksiyonu sonrası brakiterapi amacıyla kullanılabileceğini raporlamışlardır (139). Qi ve ark. papaverin içeren fibrin yapıştırıcının arter greftinde vasospazmın engellenmesi amacıyla

kullanılabileceğini raporlamışlardır (140). Schillinger ve ark. fibrin yapıştırıcının nükleik asit vektörleri taşıyıcısı olarak kullanılabileceğini raporlamışlardır (141). Nie ve ark. köpek akut enfarktüs modelinde fibroblast büyüme faktörü (FGF) içeren fibrin yapıştırıcının miyokard perfüzyonunu ve kardiyak fonksiyonu artırdığını raporlamışlardır (142). Singh ve ark. ratlarda ksifoid kırıkta defekti modelinde, fibrin yapıştırıcının kondrosit taşıyıcısı olarak etkili olduğunu raporlamışlardır (143).

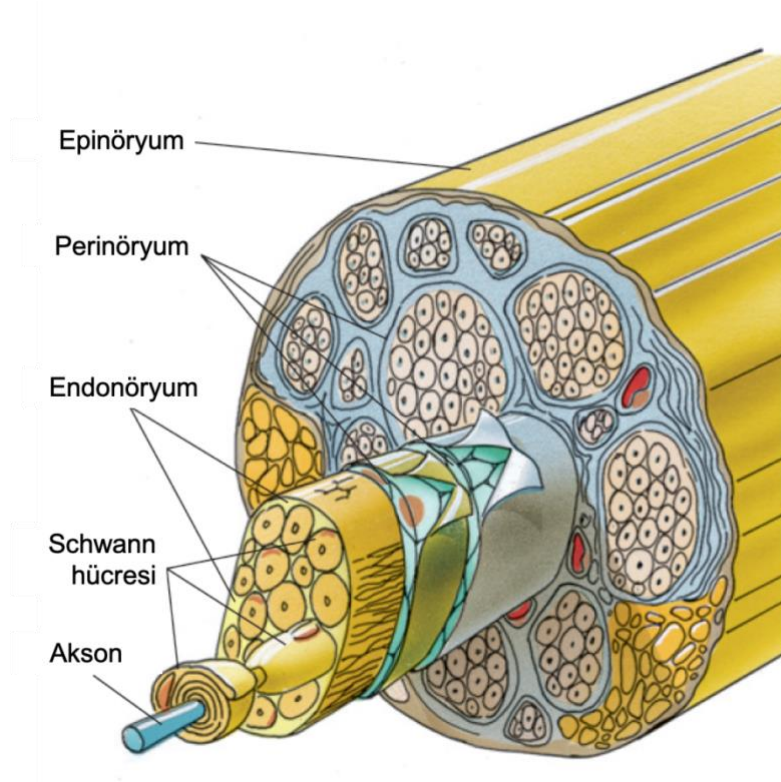
Ozaki ve ark. vankomisin içeren fibrin yapıştırıcının metisilin dirençli staphylococcus aureus enfeksiyonuna karşı kullanılabileceğini raporlamışlardır (144). Cashman ve ark. sefazolin, fusidik asit, 5-florourasil içeren fibrin yapıştırıcıların titanyum implant enfeksiyonuna karşı kullanılabileceğini raporlamışlardır (145). Farklı antibiyotikler ile fibrin yapıştırıcı kombinasyonlarındaki salınım zamanı farklılıklarını araştıran çalışmalar mevcuttur (146, 147). Fujioka-Kobayashi ve ark. güçlü bir osteojenik indüktör olan rekombinant insan kemik morfogenetik proteini-9 içeren fibrin yapıştırıcının kemik rejenerasyonunda kullanılabileceğini raporlamışlardır (148).

2.3. Periferik Sinir Anatomisi

Periferik sinir sisteminde aksonlar miyelinli ve miyelinsiz olabilirler. Miyelinsiz aksonların Schwann hücresinden kaynaklanan tek bir basal membranı vardır, miyelinli aksonların ise çok katlı, lamininden zengin miyelin ile sarılıdır. Bu miyelini akson boyunca yığınlar oluşturan Schwann hücreleri oluşturur.

Sinir fiberleri ince kollajen yapı olan endonörium ile sarılıdır. Belli bir anatomik bölgeye giden fiberler beraberce fasikülleri oluştururlar ve perinörium ile

sarıldırlar. Periferik siniri en dıştan saran bağ dokusu ise epinöryumdur. Epinöryumu çevre yapılara bağlayan ince gevşek areolar doku ise mezonöryumdur. Mezonöryum ekstremitte hareketi sırasında sinirlerin hareketine izin verir (Şekil 4).



Şekil 4: Sinirin yapısı (Gartner LP. Textbook of Histology, International Edition: Elsevier Health Sciences; 2015)

Bölgesel arter ve venler vasa nervorum aracılığı ile siniri besler. Epinöryumda longitudinal seyreden damarlar, perinöryum ve endonöryum içinde bağlantılar kurarlar. Sinir dokusunun intrinsik kan akımı çok iyidir, bu yüzden çevre dokulardan güvenle mobilize edilebilir. Bipediküllü olarak uzunluk:genişlik oranı 64:1 olsa bile beslenebilir (149, 150).

Fonksiyonel olarak periferik sinirler duyu ve motor sinir olarak ikiye ayrılırlar. Motor sinirler somatik ve otonom olarak ikiye ayrılırlar.

Periferik sinirler iletim hızına göre A, B ve C olarak üç gruba ayrılırlar (Tablo 3) (150).

Tablo 3: Periferik sinirlerin iletim hızına göre sınıflandırması (Gartner LP. Textbook of Histology, International Edition: Elsevier Health Sciences; 2015)

Grup	Çap (µm)	İletim Hızı (m/sn)	Fonksiyon
Tip A fiber – ağır miyelinli	1 - 20	15 - 120	Yüksek hızlı fiberler: akut ağrı, sıcaklık, dokunma, basınç, propriosepsiyon, somatik efferent
Tip B fiber – daha az miyelinli	1 - 3	3 - 15	Orta hızlı fiberler: viseral aferent, preganglionik otonom
Tip C fiber - miyelinsiz	0.5 – 1.5	0.5 - 2	Düşük hızlı fiberler: postganglionik otonom, kronik ağrı

2.4. Periferik Sinir Hasarı ve Onarımı

Periferik sinir hasarları çeşitli mekanizmalarla ve farklı derecelerde oluşmaktadır. Bu sebeple sinir hasarının sınıflandırmaları mevcuttur.

1943'te Seddon histolojik olarak nöropraksi, aksonotmezis, nörotmezis olmak üzere üç tip sinir hasarı tanımlamıştır. Nöropraksiste sinirin seyrinde belli bir alanda iletim bloğu olur. Aksonotmezis direk olarak aksonal hasarı tanımlar. Nörotmezis ise sinirin transeksiyonunu tanımlar. Nöropraksiste Wallerian dejenerasyonu olmaz ve fonksiyonel tam iyileşme beklenir. Aksonotmezis ve nörotmeziste yaralanmanın distalinde Wallerian dejenerasyonu olur. Aksonotmeziste iyileşme mümkündür fakat skar oluşumu görülür ve nöropraksisteki kadar mükemmel bir iyileşme olmaz. Nörotmeziste ise iyileşme olmaz (151).

Wallerian dejenerasyonu hasar distalinde aksonda, Schwann hücrelerinde, makrofajlarda meydana gelen tipik morfolojik ve histolojik değişimleri tanımlar. Bu değişimler aksonal rejenerasyona uygun mikro-çevreyi sağlar (152). Özetlemek

gerekirse hasar distalinde akson ve miyelin ayrışması olur, makrofajlar yıkım ürünlerini temizler, Schwann hücreleri çoğalır, sonrasında yeni oluşan aksonu yeni miyelin kılıf sarar (153).

Seddon'ın bu sınıflandırmasını Sunderland genişletmiştir ve beş farklı derecede hasar tanımlamıştır (154). Mackinnon ise altı farklı dereceye çıkarmıştır (155, 156). Hasarın derecesini anlamak iyileşmeyi de tahmin edebilmeyi sağlar. Tablo 4'te Seddon sınıflandırması, Sunderland sınıflandırması, Mackinnon'un tanımadığı altıncı derece hasar ve iyileşme beklentileri verilmiştir. Birinci derece nöropraksik hasarda iyileşme tamdır. İkinci derece aksonotmetik hasarda 1 – 1,5 mm/gün hızı ile tam iyileşme beklenir (157). Dördüncü aksonotmetik ve beşinci derece nörotmetik hasarda tedavisiz iyileşme beklenmez. Üçüncü derece aksonotmetik ve altıncı derece (çok seviyeli) hasarlarda kısmi iyileşme beklenir (158).

Tablo 4: Sinir hasarı sınıflandırması (Gurtner GC, Neligan PC, Liu DZ. Plastic Surgery: Volume 1 Principles. London: Elsevier Health Sciences; 2018.)

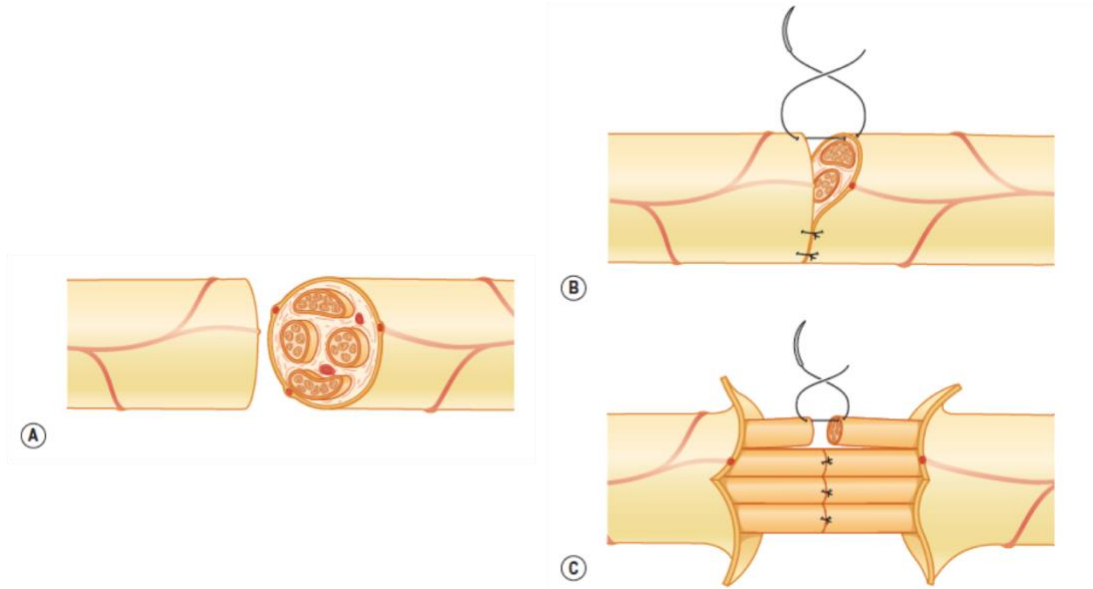
Seddon	Sunderland	Hasar	İyileşme
Nöropraksi	1. derece	İletim bloğu (spontan düzelir)	Hızlı / Mükemmel
Aksonotmezis	2. derece	Basal lamina tüpleri hasarlanmadan aksonal rüptür	Yavaş / Mükemmel
	3. derece	Hem basal lamina tüplerinin hem aksonların rüptürü	Yavaş / İnkomplet
	4. derece	Komplet skar bloğu	Yok
Nörotmezis	5. derece	Komplet transeksiyon	Yok
	6. Derece (Mackinnon)	1-4. derece hasarların kombinasyonu ± normal fasiküller	Değişken

Seddon, Sunderland ve Mackinnon'un bu öncü çalışmaları ile sinir hasarı ve iyileşmesine yönelik temel bilgiler sağlamıştır. Sonrasında özellikle dördüncü ve beşinci derece hasarlarda sinir onarım tekniklerine ve sonuçlarına yönelik çok sayıda çalışma yapılmıştır.

Kesilmiş sinirlerde en sık uygulanan yöntem sinir uçlarının bir araya getirilmesidir, primer nörorafı olarak tanımlanır. Nörorafı en sık kullanılan teknik olan dikiş ile yapılabileceği gibi, yapıştırıcılar (fibrin ya da sentetik yapıştırıcılar), kondüit denen tüp yapıları ile de yapılabilir. Sinir uçlarının arasında boşluk (gap) olması durumunda primer onarım mümkün olmaz ve sinir greftleri, damar greftleri, kondüitler gibi yapılar ile aradaki boşluk giderilerek onarım yapılır (159).

Onarımın optimum zamanlaması için ilk 72 saat önerilmektedir (160).

Dikiş ile primer nörorafı yapılır iken dikişlerin yerleştirildiği yerlere göre epinöral, perinöral onarım olarak değişiklik gösterebilir. Şekil 5'te epinöral ve perinöral onarım görülmektedir.



Şekil 5: A) Sinir kesisi B) Epinöral onarım C) Perinöral onarım (Gurtner GC, Neligan PC, Liu DZ. Plastic Surgery: Volume 1 Principles. London: Elsevier Health Sciences; 2018.)

Bu onarımlar mikroskop ya da büyütmeli ameliyat gözlüğü (surgical loupes)

yardımı ile gerçekleştirilir. Sıklıkla 8-0 – 10-0 nylon ya da polipropilen dikişler kullanılır. Sinir uçlarını uygun hizalama, atravmatik yaklaşım, gerginlik olmadan onarım, uygun sayıda dikiş yerleştirilmesi, avasküler dokuların temizlenmesi, skar dokularının çıkarılması gibi onarım prensiplerine uyum onarımın başarısını artırır. Sayılan bu onarıma bağlı faktörlerin yanı sıra hastaya bağlı faktörler ve hasara bağlı faktörler de prognozu etkiler (158).

2.5. Periferik Sinir İyileşmesi

Periferik sinir yaralanması sonrası gerçekleşen iyileşme sinir gövdesi, akson, Schwann hücresi, makrofajlar, sinir çevresine yer alan stroma ve diğer hücrelerin karşılıklı etkileşimi ile gerçekleşir. Bu kompleks patofizyolojik süreçte morfolojik ve metabolik değişimler olur. Bu değişimler sinir gövdesinde, yaralanma proksimalinde, yaralanma distalinde, kas-sinir kavşağında gerçekleşir. Bu değişimler hasarın gerçekleşmesi ile hemen başlar.

Akson kesisi ile aksoplazmanın büyük kısmı kaybolmuş olur ve bu bazen hücre ölümüne neden olabilir (161). Sinir gövdesinde kromatoliz olarak tanımlanan morfolojik değişim gözlenir (büyümüş nükleus, nükleer eksantrisite). Bu dönemde hücre tamir için gerekli yapıtaşlarını sentezler. Görülen değişimler sinyal üreten durumdan büyüyen moda geçişi yansıtır (162).

Hasar proksimalinde aksonlar dejenere olarak hasar bölgesinden bir miktar geri çekilir, geride Schwann hüclerlerinin basal laminalarından oluşan içi boş endonöral tüp kalır. Bu retrograd dejenerasyon hasarın derecesine göre değişen mesafede olabilir. Hasar sonrası saatler içerisinde proksimalde kalan aksonların uçlarından terminal ve kollateral dallar (sprout) oluşturmaya başlarlar ve bunlar

Schwann hücresi içinde distale doğru büyür (163). Bu yeni oluşan aksonlardan bazıları distale ulaşır ve yeniden inervasyon sağlanmış olur. Schwann hücreleri bu yeni oluşan aksonlara yol gösterici, yönetici olur, bu yüzden gerçekleşen aksonal rejenerasyonun hız kısıtlayıcı basamağı aksonal büyüme değil Schwann hücresinin fonksiyonu olduğu düşünülmektedir (164, 165). Bu rejenere olan kısımlar hasara uğramış mevcut sinir miyelinli olsa bile başlangıçta miyelinsizdir, zamanla miyelin oluşumu tamamlanır (166).

Hasar distalinde akson Wallerian dejenerasyonu adıyla tanımlanan yavaş dejenerasyon sürecine girer. Bu süreç hasarın gerçekleşmesi ile hemen başlar. Nörofilament ve mikrotübül ayrışması, miyelin yıkımı ve Schwann hücresi çoğalması ile karakterizedir. Hasar alanına gelen makrofajlar tüm miyelin ve hücrel debrisini temizler. Schwann hücreleri ürettiği çeşitli nörotrofik faktörlerin sentezini artırır. Sütunlar halinde organize olan Schwann hücreleri yeni oluşan aksonları yönlendirirler.

Rejenerasyonun devam eden aylarında yeni oluşan aksonlar sinir içerisinde küçük kompartmanlara ayrılarak yeniden organize olur, yeni perinörium ile sarılır. Bu düzenlenme kompartmantasyon olarak isimlendirilir (167).

Aksonal rejenerasyonun hızı hasarın tipine göre değişiklik gösterebilmektedir. Rat ve tavşan modellerinde kesi sonrası 2,0 – 3,5 mm/gün hızında iyileşme olabilir iken ezilme yaralanması sonrası 3,0 – 4,4 mm/gün hızında iyileşme olduğu raporlanmıştır (168).

Özetlenen bu rejenerasyon sürecinde birçok kimyasal ve hücrel etkileşim

rol oynamaktadır ve günümüzde de çok sayıda çalışmanın ilgi odağı olmaya devam etmektedir.

2.6. Eritropoietinin Sinir Onarımında Kullanımı

Eritropoietinin periferik sinir sistemi üzerindeki etkilerine Bölüm 2.1.5.'te ayrıntılı yer verilmiştir. Bu bölümde yalnızca sinir kesisi sonrası onarım yapılan deneysel modellerden bahsedilecektir.

Eritropoietinin periferik sinir üzerine etkisi direkt olarak ya da Schwann hücreleri başta olmak üzere komşu hücreler üzerinden indirekt olarak gerçekleşir (81).

Lykissas ve ark. rat siyatik sinir kesisi ve uç uca sinir onarımı modelinde onarım sonrası her 24 saatte bir uygulama olacak şekilde 20 gün boyunca sistemik 2680 ünite/kg eritropoietin vermişler ve bunun sinir iyileşmesini olumlu etkilediğini raporlamışlardır (82).

Yin ve ark. rat siyatik sinir defektinin silikon tüp ile onarımı modelinde her 24 saatte bir uygulama olacak şekilde 14 gün boyunca 5000 ünite/kg eritropoietin vermişler ve iyileşmenin olumlu etkilendiğini raporlamışlardır (88).

Sarica ve ark. rat siyatik sinir ezilme ya da kesi grupları olan çalışmalarında sadece işlem sırasında bir defa sistemik ya da lokal olacak şekilde 5000 ünite/kg eritropoietin vermişler ve bunun sinir iyileşmesini olumlu etkilediğini raporlamışlardır (89).

Elfar ve ark. fare siyatik sinir ezilme ya da kesi grupları olan çalışmalarında

cerrahiden 24 saat önce, cerrahi sırasında, cerrahiden 24 saat sonra ve cerrahiden bir hafta sonra olacak şekilde sistemik 5000 ünite/kg eritropoietin vermişler ve bunun sinir iyileşmesini olumlu etkilediğini raporlamışlardır (91).

Lohmeyer ve ark. rat siyatik sinir defektinin tüp ya da greft ile onarımı modelinde her 24 saatte bir uygulama olacak şekilde 14 gün boyunca 1000 ünite/kg eritropoietin vermişler ve sonuçlarını raporlamışlardır (97).

Zhang ve ark. rat siyatik sinir defekti modelinde eritropoietini poli(laktik asit-ko-glikolik asit) (PLGA) bazlı partiküllere yükleyerek, başka bir çalışmalarında ise kitosan kondüite yükleyerek lokal olarak kullanmışlardır (92, 94).

Literatürde daha önce yapılan sinir onarımında eritropoietin kullanımı çalışmalarında görüldüğü gibi eritropoietin çoğunlukla sistemik, nadir olarak da lokal olarak uygulanmıştır. Bu sinir onarımı çalışmalarının tamamı rat ya da fare modelleridir, insan çalışması bulunmamaktadır.

Literatürde mevcut çalışmalar incelendiğinde, sistemik uygulamalarda eritropoietin dozunun 1000 ünite/kg ile 5000 ünite/kg arasında değiştiği fakat en sık olarak 5000 ünite/kg dozun tercih edildiği görülmektedir. Sistemik uygulama subkutan ya da intraperitoneal olarak yapılmıştır. Cerrahiden önce veya cerrahi ile eş zamanlı veya cerrahi sonrasında veya bunların kombinasyonu şeklinde eritropoietin uygulaması yapılmıştır.

Sinir onarımı yapılan mevcut çalışmaların hiçbirinde fibrin yapıştırıcı ve eritropoietin karışımı kullanılmamıştır.

2.7. Fibrin Yapıştırıcıya Eklenen Faktörler İle İyileşmenin Desteklenmesi

Fibrin yapıştırıcının hem periferik sinir kesisi onarımında kullanılabilmesi hem de kontrollü salınım vektörü olarak kullanılabilmesi nedeniyle içeriğine sinir üzerine etki edebilecek ilaç, biyoaktif molekül ya da hücre ekleme fikrini doğurmuştur. Böylece sistemik uygulamanın yan etkilerinden kaçınılabilecek ve lokal uygulama ile sinir daha yakından, daha yüksek konsantrasyonda ve daha uzun süre ilaç etkisine maruz bırakılabilecektir.

Literatürde fibrin yapıştırıcının taşıyıcı olarak kullanılmasına yönelik fazlaca çalışma vardır. Fakat içine eklenen madde ile sinir iyileşmesine yönelik kullanılmasına yönelik birkaç çalışma mevcuttur.

Gao ve ark. rat siyatik sinir kesi modelinde tüm gruplara dikiş ile onarım gerçekleştirmiş, sonrasında onarım hattına birinci grupta sinir büyüme faktörü (NGF) ve fibrin yapıştırıcı kombinasyonu, ikinci grupta NGF, üçüncü grupta fibrin yapıştırıcı, dördüncü grupta salin uygulamıştır. İyileşmenin birinci grupta daha iyi olduğunu raporlamıştır (169).

Reichenberger ve ark. rat siyatik sinir kesi modelinde tüm gruplara dikiş ile onarım gerçekleştirmiş, sonrasında onarım hattına deney grubunda yağ dokusu kaynaklı kök hücre içeren fibrin yapıştırıcı, kontrol grubunda ise yalnız fibrin yapıştırıcı uygulamış, 7, 21, 35 ve 63. günlerde histolojik inceleme yapmıştır. Deney grubunda bazı histolojik parametrelere göre iyileşmenin daha iyi olduğunu raporlamışlardır (170).

Sundem ve ark. fare siyatik sinir ezilme modelinde bazı gruplara sistemik eritropoietin, bazı gruplara ise cerrahi sırasında eritropoietin içeren fibrin yapıştırıcı verilmiştir. Fibrin yapıştırıcı yardımı ile lokal olarak eritropoietin uygulamasının sistemik uygulama kadar etkin olduğu raporlanmıştır (1). Literatürdeki eritropoietin ile fibrin yapıştırıcının kombine edilerek kullanıldığı tek çalışma budur.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Gazi Üniversitesi Rektörlüğü Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından 06.04.2018 tarihli toplantıda **G.Ü.ET-18.030** kod numarası ile etik kurul onayı almış olup, Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezinde (GÜDAM) gerçekleştirildi. Çalışmada toplam ağırlıkları 225 (+25) gram olan Long Evans türü dişi sıçanlar kullanıldı. Deneyde 6 ana grup ve her grupta 6 adet olmak üzere toplam 36 adet deney hayvanı kullanıldı.

3.1. Gruplar ve Açıklamaları

Tüm deney gruplarında sol taraf siyatik siniri kesildi ve dikiş ya da fibrin yapıştırıcı ya da bunların kombinasyonu ile onarıldı. Sağ taraf siyatik siniri kontrol tarafı olarak korundu.

Grup 1’de sinir kesisi salin içeren fibrin yapıştırıcı ile onarıldı.

Grup 2’de sinir kesisi rekombinant insan eritropoietini içeren fibrin yapıştırıcı ile onarıldı.

Grup 3’te sinir kesisi 2 adet epinöral dikiş ile kombine olarak salin içeren fibrin yapıştırıcı ile onarıldı.

Grup 4’te sinir kesisi 2 adet epinöral dikiş ile kombine olarak eritropoietin içeren fibrin yapıştırıcı ile onarıldı.

Grup 5’te sinir kesisi 2 adet epinöral dikiş ile onarıldı.

Grup 6’da sinir kesisi 4 adet epinöral dikiş ile onarıldı.

Tablo 5’te gruplara uygulanan işlemler özetlenmiştir.

Tablo 5: Deney grupları

	Hayvan sayısı	Dikiş kullanımı ve sayısı	Fibrin yapıştırıcı (FY) kullanımı
Grup 1	6	-	FY + Salin
Grup 2	6	-	FY + Epo
Grup 3	6	2 adet	FY + Salin
Grup 4	6	2 adet	FY + Epo
Grup 5	6	2 adet	-
Grup 6	6	4 adet	-

Ratlar 12 saat aydınlık, 12 saat karanlıkta olacak ve her kafeste bir rat olacak şekilde yem ve su verilerek barındırıldı.

Tüm gruplara 21, 42 ve 63. günlerde yürüme analizi, pin-prick test ve toe-spread test uygulandı.

Tüm gruplar 63. günde intrakardiyak ilaç doz aşımı ile kurban edildikten sonra çıkarılan deney tarafı olan sol ve kontrol tarafı olan sağ siyatik sinir örneklerinin histolojik incelemesi yapıldı.

3.2. Eritropoietin İçeren Fibrin Yapıştırıcının Hazırlanması

Çalışmada rekombinant insan eritropoietini olarak piyasada enjeksiyona hazır şırınga halinde bulunan 2000 IU/0.5 ml Eporex® 2000 (epoetin alfa / epoetina alfa) (Janssen-Cilag Ltd., Beerse, Belgium) preparatı kullanılmıştır (Şekil 6). Enjeksiyona hazır şırınganın yay ve kilit mekanizması çıkarılarak daha kontrollü bir enjeksiyon sistemi elde edilmiştir.



Şekil 6: Rekombinant insan eritropoietini preparatı Eprex® 2000 (epoetin alfa / epoetina alfa) (Janssen-Cilag Ltd., Beerse, Belgium)

Çalışmada fibrin yapıştırıcı olarak 4 ml Tisseel Lyo® (Baxter AG, Vienna, Austria) kullanılmıştır. Fibrin yapıştırıcının uygulama bölgesine verilmesini sağlayan enjeksiyon sistemi olarak da paket içinden çıkan 2ml/4ml Duploject® sistem (Baxter AG, Vienna, Austria) kullanılmıştır.

4 ml Tisseel Lyo, 2 ml trombin çözeltisi ve 2 ml fibrinojen çözeltisi olarak iki bileşenlidir. Bir şırıngasında 2000 IU eritropoietin olan Eprex preparat yarı yarıya bölünerek fibrin yapıştırıcının her iki bileşenine de 1000 IU olacak şekilde eklenmiştir. Toplamda 4 ml fibrin yapıştırıcı içinde 2000 IU eritropoietin olduğundan, 1 ml fibrin yapıştırıcı içinde de 500 IU eritropoietin olmuştur.

Eritropoietin ya da salin içeren fibrin yapıştırıcı kullanılan gruplarda (Grup 1, 2, 3 ve 4) her bir onarım için fibrin yapıştırıcı 0,1 ml hacminde kullanılmıştır. Özetle eritropoietin içeren fibrin yapıştırıcı kullanılan gruplarda (Grup 2 ve 4) bir hayvan için 0,1 ml fibrin yapıştırıcı içinde 50 IU eritropoietin bulunmaktadır.

Literatürde eritropoietin ve fibrin yapıştırıcı karışımının kullanıldığı tek çalışma olan Sundem ve ark. yaptığı rat siyatik sinir ezilme hasarı modeli çalışmada

fibrin yapıştırıcı içine eklenecek eritropoietin dozu daha önceki çalışmalarda sistemik olarak verilen 5000 IU/kg/hafta klinik dozdan yola çıkılarak ve vücut ağırlığının siyatik sinir ağırlığına oranı kullanılarak hesaplanmıştır. Yaptıkları hesaplama ile ortaya çıkan eritropoietin dozu 0,5 IU/ml olmuştur. Her bir ezilme hasarı olan sinir için 0.5 IU/ml dozunda eritropoietin içeren 0,01 ml fibrin yapıştırıcı kullanmışlardır (1).

Zhang ve ark. yaptığı eritropoietin yüklü kitosan kondüit kullanılan çalışmada kondüit üretim aşamasında 1000 IU eritropoietin kullanılmıştır (94). Yine Zhang ve ark. yaptığı Zhang eritropoietin yüklü poli(laktik asit-ko-glikolik asit) (PLGA) bazlı partikül çalışmasında sinir çevresine lokal uygulanan eritropoietin dozu 5000 IU/kg olarak hesaplanmıştır, 200 – 230 gram ağırlığında ratların kullanıldığı hesaba katılır ise bir uygulama için eritropoietin miktarı 1000 IU – 1150 IU olarak hesaplanır (93).

Sarica ve ark. rat siyatik sinir ezilme ya da kesi modeli çalışmada sistemik ya da lokal uygulanan eritropoietin dozu 5000 IU/kg olarak hesaplanmıştır, 200 – 250 gram ağırlığında ratların kullanıldığı hesaba katılır ise bir uygulama için eritropoietin miktarı 1000 IU – 1250 IU olarak hesaplanır (89).

Özetle, lokal uygulanan eritropoietinin sinir iyileşmesine etkisi araştıran literatürde mevcut çalışmalara bakıldığında bir uygulama için 0,005 IU ile 1250 IU arasında değişen kullanımlar mevcuttur.

Ortalama 225 gram ratların kullanıldığı bu çalışmada kullanılacak eritropoietin dozuna karar verir iken sık kullanılan sistemik uygulama dozları olan 1000 - 5000 IU/kg'dan yola çıkılır ise 225 - 1125 IU olarak hesaplanır. Fakat lokal

uygulamada ilaç hedef dokuya vücuda dağılmadan direkt olarak ulaşabildiğinden dolayı bu dozların daha düşük olması gerektiği düşünüldü. Sundem ve ark. yaptığı vücut ağırlığının siyatik sinir ağırlığına oranının kullanılarak hesaplamada ise dozun fazla düşük çıktığı düşünüldü (1). Bu düşüncelerden yola çıkılarak 50 IU dozunda karar kılındı.

Fibrin yapıştırıcının kutusundan enjeksiyon sistemi ile birlikte çıkarılması, aktive edilmesi, eritropoietinin fibrin yapıştırıcı içine eklenmesi ve enjeksiyon sistemine çekilmesi sırasıyla Şekil 7’den Şekil 16’ya kadar verilmiştir.

Şekil 7’de Tisseel Lyo kutusu ve yaylı kilitli enjeksiyon sisteminden soyulmuş Eprex şırıngası görülmektedir.

Şekil 8’de Tisseel Lyo kutusu içinden çıkan iki farklı kutucuk görülmektedir, bunlardan biri 4 flakon ilacı diğeri ise Duploject enjeksiyon sistemini içermektedir.

Şekil 9’da iki kutucuğun içeriği görülmektedir.

Şekil 10’da mavi renk ile kodlanmış fibrinojen ve aprotinin, siyah renk ile kodlanmış kalsiyum ve trombin görülmektedir.

Şekil 11’de mavi ile kodlanmış flakonlar (fibrinojen ve aprotinin) ile siyah ile kodlanmış flakonların (kalsiyum ve trombin) yine aynı renkler ile kodlanmış şırıngalar ile gruplandığı görülmektedir. Aprotinin mavi kodlu şırınga ile çekilerek fibrinojene, kalsiyum ise siyah renkli şırınga ile çekilerek trombine aktarılmalıdır. Ardından 37 °C sıcaklıkta aktive edilmelidir.

Şekil 12’de aprotininin fibrinojene, kalsiyumun trombine aktarılmak üzere

uygun renkli şırıngalara çekilmesi görülmektedir.

Şekil 13’de aprotininin fibrinojene, sağda kalsiyumun trombine aktarılması görülmektedir.

Şekil 14’te fibrinojene 0,25 ml (1000 IU), trombine 0,25 ml (1000 IU) eritropoietin eklenmesi görülmektedir (Grup 2 ve 4). Eritropoietin eklenmeyen gruplar (Grup 1 ve 3) için Tisseel hazırlığında bu basamakta her bir flakona 0,25 ml salin eklenmiştir.

Şekil 15’te fibrinojen ve trombinin ısıtıcı ve karıştırıcı Fibrinotherm® sistemi (Baxter AG, Vienna, Austria) ile aktivasyonu görülmektedir.

Şekil 16’da hazır hale getirilmiş fibrinojen ve trombin bileşenlerinin uygun renkte şırıngalara çekilerek Duploject enjeksiyon sistemine aktarılmış hali görülmektedir.



Şekil 7: Tisseel Lyo kutusu ve Eprex 2000 şiringası



Şekil 8: Tisseel Lyo kutusu içeriği, sol üstte 4 flakon ilacı içeren kutu, sol altta Duploject enjeksiyon sistemi içeren kutu



Şekil 9: Tisseel Lyo kutusu içeriği, sağ üstte 4 flakon ilaç, sağ altta Duploject enjeksiyon sistemi



Şekil 10: Soldan sağa sırayla fibrinojen (sealer protein), aprotinin, kalsiyum, trombin (arka planda hangi flakonun hangisine aktarılacağı gösterilmektedir)



Şekil 11: Mavi ile kodlanmış flakonlar (fibrinojen ve aprotinin) ile siyah ile kodlanmış flakonların (kalsiyum ve trombin) yine aynı renklerle kodlanmış şırıngalar ile gruplanması



Şekil 12: Solda aprotininin fibrinojene, sağda kalsiyumun trombine aktarılmak üzere aynı renklerle kodlanmış şırıngalara çekilmesi



Şekil 13: Solda aprotininin fibrinojene, sağda kalsiyumun trombine aktarılması



Şekil 14: hem fibrinojen hem de trombin bileşenine eşit miktarda eritropoietin eklenmesi



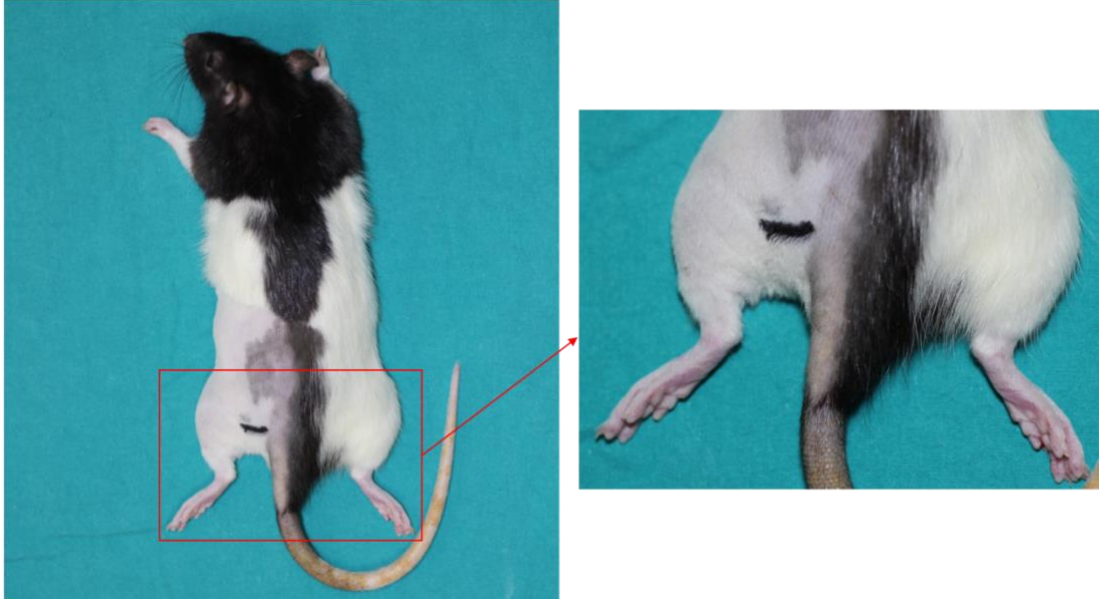
Şekil 15: Isıtıcı ve karıştırıcı Fibrinotherm sistem ile bileşenlerin aktivasyonu



Şekil 16: Kullanıma hazır Duploject enjeksiyon sistemine aktarılmış fibrin yapıştırıcı ve yedek uç

3.3. Cerrahi Prosedür

Ratlara uygulanan anestezi (intraperitoneal 60 mg/kg ketamin + 5 mg/kg xylazin enjeksiyonu) yeterli etkinliğe ulaşınca sol arka ekstremitte çalışma tarafı olarak tıraş edildi, yıkandı ve povidin iyot ile antisepsi uygulandı. Sağ arka ekstremitte kontrol tarafı olarak korundu. Gerekli durumlarda anestezi ilaç ek doz olarak verildi. Pozisyon verildi ve insizyon kalem ile işaretlendi (Şekil 17). Cerrahi alana steril örtüler uygulandı (Şekil 18). İşlem Carl Zeiss marka OPMI 9-FC model mikroskop altında ile gerçekleştirildi. Siyatik sinir izolasyonu için femur proksimalinde başlayan 1 – 1,5 cm cilt insizyonu 15 numara bistüri ile yapılarak, iliotibial bant üzerinden direk lateral yaklaşım uygulandı, kas planları künt diseksiyon ile geçildi, femur posteriorunda sinir izole edildi (Şekil 19 ve 20). Siyatik sinir izole edildi, sinir arkasına 8 mm genişliğinde kırmızı renkli elastik yapışmaz fon yerleştirildi ve kesildi (Şekil 21 ve 22). Ardından grupların onarım şekline uygun olarak 2/4 adet epinöral 10-0 nylon dikiş (10-0 Ethilon®, Ethicon US, Ohio, USA) ile ya da eritropoietin/salin içeren 0,1 ml fibrin yapıştırıcı ile ya da bunların kombinasyonu kullanılarak onarıldı (Şekil 23 ve 24). Yapışmaz fon kullanımı fibrin yapıştırıcı kullanılan gruplarda yapıştırıcının çevre dokulardan izolasyonu amacıyla ve mikroskopta daha net görüntü sağlaması amacıyla kullanışlı oldu (Şekil 25). Sinir onarımları tamamlanması sonrası cilt eriyebilen 5-0 poliglekapron dikiş (5-0 Monocryl®, Ethicon US, Ohio, USA) ile basit devamlı teknik kullanılarak kapatıldı (Şekil 26). Tekrar povidin iyot ile antisepsi uygulandı. Operasyon sonrası analjezi ihtiyacı veteriner hekimlerce değerlendirildi.



Şekil 17: Pozisyon verilmesi ve insizyonun cerrahi öncesi işaretlenmesi



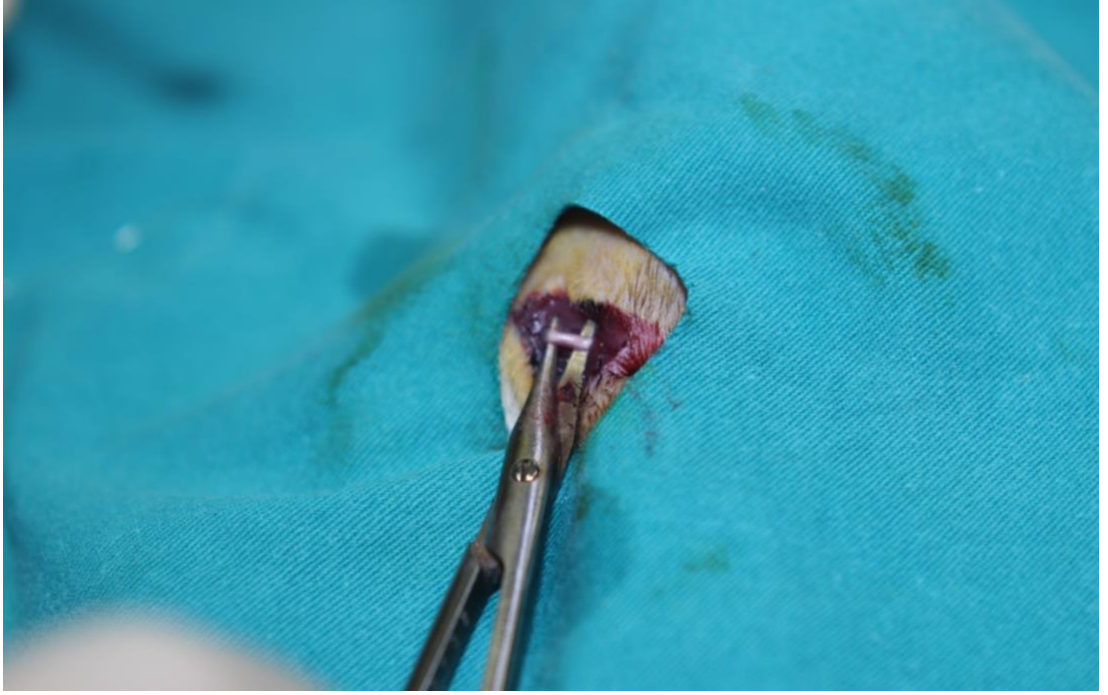
Şekil 18: Cerrahi alanın steril örtünmesi ve insizyon alanının dominant olmayan elin yardımı ile gerilmesi



Şekil 19: İnsizyonun 15 numara bistüri ile yapılması



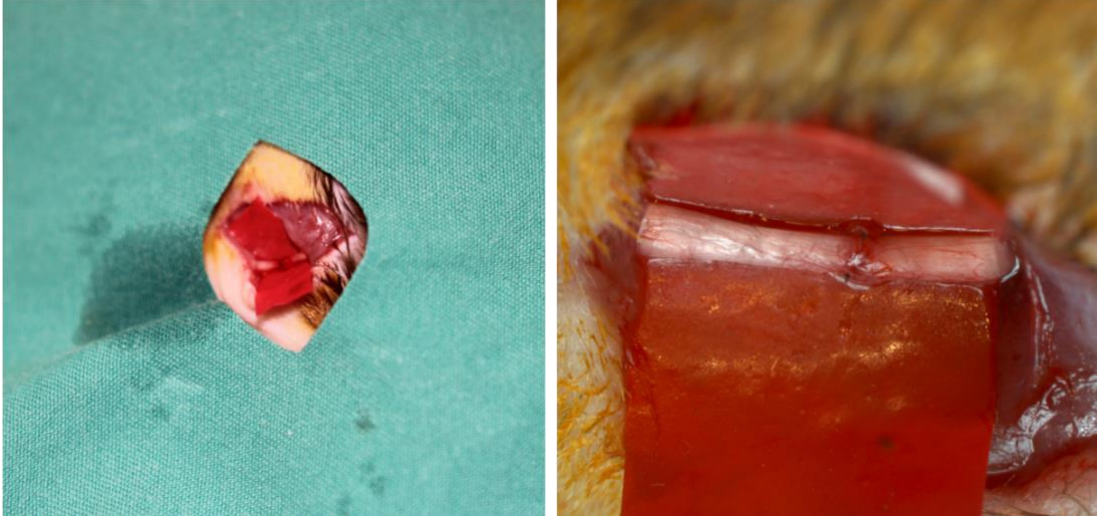
Şekil 20: Tenotomi makası ile kas planının geçilerek siyatik sinirin görülmesi



Şekil 21: Siyatik sinirin mobilize edilerek insizyondan dışarı alınması



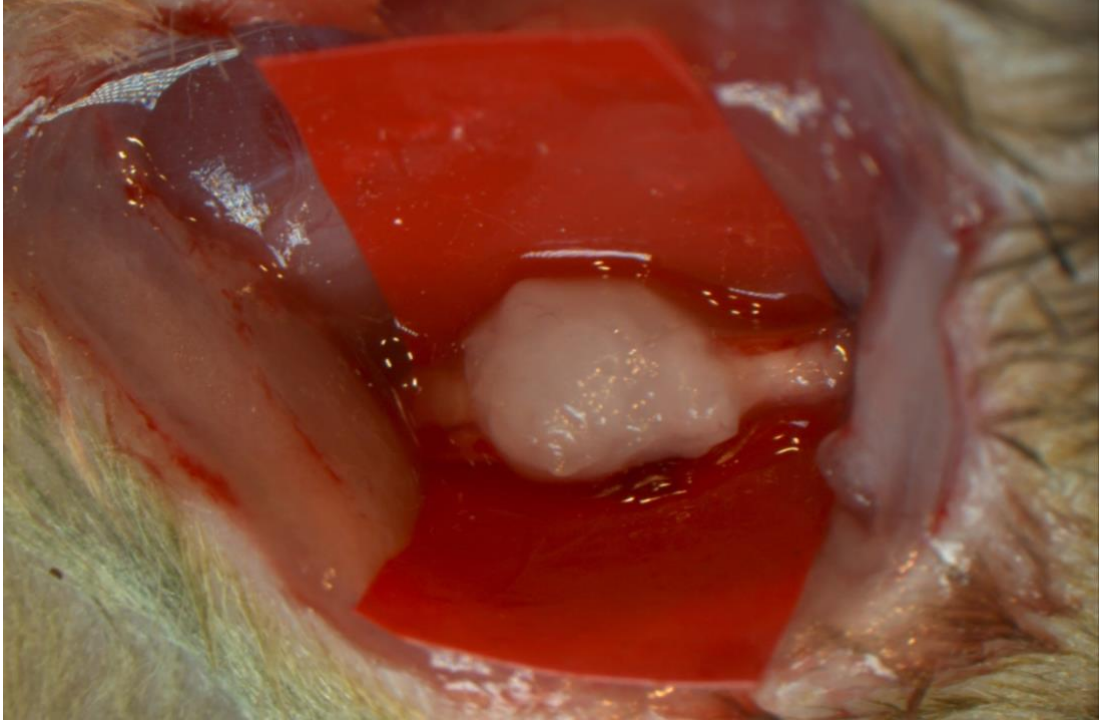
Şekil 22: 8 mm genişliğinde yapışmaz kırmızı renkli fonun sinirin arkasına yerleştirilmesi (solda düşük büyütme, sağda yüksek büyütme ile)



Şekil 23: 2 adet epinöral dikiş ile onarım (solda düşük büyütme, sağda yüksek büyütme ile)



Şekil 24: Onarım hattına fibrin yapıştırıcı uygulanması



Şekil 25: Fibrin yapıştırıcının onarım hattınca organize olmuş görünümü



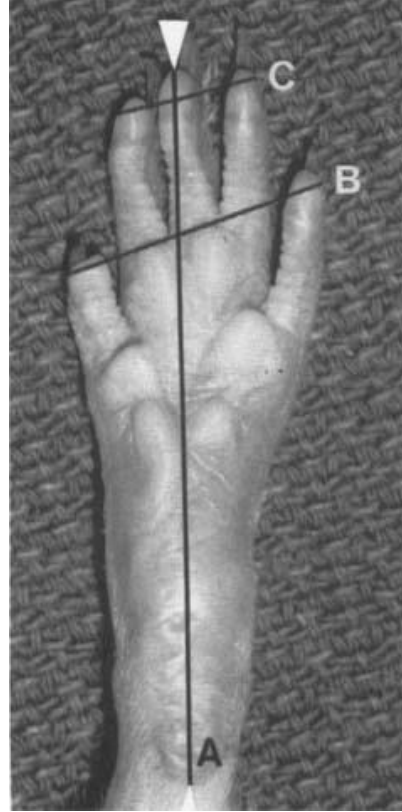
Şekil 26: İnsizyonun kapatılması sonrası görünüm

3.4. Yürüme Analizi

Tüm hayvanlara yürüme koridoru analizi ile 21, 42 ve 63. günlerde siyatik fonksiyonel indeks hesaplaması ile fonksiyonel iyileşme değerlendirilmesi yapıldı. Yürüme sırasında alınan ayak izlerindeki belirli mesafelerin ölçümlerine dayanan siyatik fonksiyonel indeks hesaplaması literatürde ilk defa 1982’de De Medinaceli ve ark. tarafından tanımlanmış ve ortaya bir formül konulmuştur (171). 1986’da Carlton ve Goldberg tarafından formül modifiye edilmiştir (172). 1989’da Bain ve ark. tarafından literatüre kazandırılan farklı bir formül günümüzde en sık kullanılan ve bu çalışmada tercih edilen formüldür (173). Şekil 27’de ayak izlerinde ölçülen mesafeler, Şekil 28’de ise bahsedilen 3 farklı formül görülmektedir (174). Yürüme koridoru daha önce tanımlanmış modellere uygun olarak yapıldı. Ratlar sol arkada ekstremitesi deney tarafı olarak siyah, sağ arka ekstremitesi normal taraf olarak mavi mürekkep ile boyandı. 8,2 cm x 42 cm beyaz kağıt döşeli bir ucu karanlık oda şeklinde olan yürüme koridoru üzerinde rat yürütülecek ve ayak izleri alındı (173). Gerektiğinde ayak izleri anlaşılır olana kadar tekrarlama yapıldı. İki adet çalışmaya kör gözlemci kağıt üzerindeki ayak izlerinde tanımlanmış uzunlukları kaliper ile ölçerek siyatik fonksiyonel indeks hesaplandı. Bain ve ark. tarafından tanımlanan formül ile yapılan hesaplamada siyatik fonksiyonel indeks 0 ile -100 arasında bir değer olarak çıkmaktadır. 0 değeri normal fonksiyonu, -100 değeri ise tam fonksiyon kaybını göstermektedir. Şekil 29’da farklı seviyelerden sinir kesilerinin ayakta ve yürüme analizinde yarattı değişiklikler görülmektedir (173).

Şekil 30’da çalışmada 21. gün yürüme testinde elde edilen örnek ayak izleri görülmektedir. Siyatik siniri kesilen deney tarafında (soldaki siyah ile boyanan izler)

ayak ön-arka mesafesinin (Print Length - PL) arttığı, ayak bileği dorsifleksiyonunun azaldığı, birinci-beşinci parmak ucu mesafesinin (Toe Spread - TS) azaldığı görülmektedir. Normal taraf ile deney tarafı arasındaki bu mesafelerin farkı arttıkça siyatik fonksiyonel indeks -100'e yaklaşmaktadır, azaldıkça da 0'a yaklaşmaktadır.



Şekil 27: Ayak izinde ölçülen mesafelerin ayaktaki karşılığı.

A – Print Length (PL) (Ayak izinin boyu, ön-arka mesafesi)

B – Toe Spread (TS) (Birinci ve beşinci parmakların uçları arasındaki mesafe)

C – Intermediary Toe Spread (IT) (İkinci ve dördüncü parmakların uçları arasındaki mesafe)

(Brown CJ, Mackinnon SE, Evans PJ, Bain JR, Makino AP, Hunter DA, et al. Self-evaluation of walking-track measurement using a Sciatic Function Index. Microsurgery. 1989;10(3):226-35)

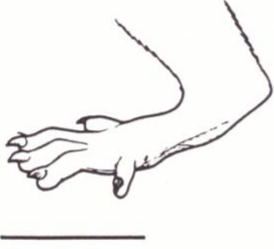
$SFI = \frac{ETOF-NTOF}{NTOF} + \frac{NPL-EPL}{EPL} + \frac{ETS-NTS}{NTS} + \frac{EIT-NIT}{NIT} \times \frac{220}{4}$	A. De Medinaceli
$SFI = \left(\frac{NPL-EPL}{EPL} + \frac{ETS-NTS}{NTS} + \frac{EIT-NIT}{NIT} \right) \times 73$	B. Carlton + Goldberg
$SFI = -38.3 \left(\frac{EPL-NPL}{NPL} \right) + 109.5 \left(\frac{ETS-NTS}{NTS} \right) + 13.3 \left(\frac{EIT-NIT}{NIT} \right) - 8.8$	C. Bain et al

Şekil 28: Üç farklı çalışmada tanımlanan siyatik fonksiyonel indeks formülleri.

E ile başlayan kısaltmalar Experimental (deneysel) tarafı göstermektedir. N ile başlayan kısaltmalar Normal tarafı göstermektedir.

Bu çalışmada C. satırında yer alan Bein ve ark. tanımladığı formül kullanılmıştır.

(Brown CJ, Mackinnon SE, Evans PJ, Bain JR, Makino AP, Hunter DA, et al. Self-evaluation of walking-track measurement using a Sciatic Function Index. Microsurgery. 1989;10(3):226-35)

Nerve Lesion	Print Length	Ankle Dorsiflexion	Toe Spread	Gait Abnormality
Normal				None
Posterior Tibial				† Print Length † Toe Spread † Ankle Dorsiflexion
Peroneal				† Print Length † Toe Spread † Ankle Dorsiflexion
Sciatic				† Print Length † Toe Spread † Ankle Dorsiflexion

Şekil 29: Normal, posterior tibial sinir hasarlı, peroneal sinir hasarlı ve siyatik sinir hasarlı ratlarda ayak bileği, ayak, ayak parmakları morfolojik değişimleri.

Siyatik siniri kesilen tarafta ayak ön-arka mesafesinin (print length) arttığı, ayak bileği dorsifleksiyonunun azaldığı, birinci-beşinci parmak ucu mesafesinin (toe spread) azaldığı görülmektedir.

(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.)



Şekil 30: Ayak izi örneği

3.5. Pin-Prick Test

Tüm hayvanlara 21., 42. ve 63. günlerde pin-prick testi ile duyuşsal iyileşme değerdendirilmesi yapıldı. Deney tarafı olan sol arka ekstremiteye en distalden başlayarak dişli forseps ile cilt sıkılarak ağırlı uyaran (pinching stimulus) verildi, geri çekme cevabı alınana kadar proksimale ilerlendi. Geri çekme cevabı alınan segment ayak bileğı distalinde ise 3 puan, ayak bileğı ile diz arasında ise 2 puan, diz üstünde ise 1 puan, cevap yok ise 0 puan verilerek cevaplar skorlandı. 3 puan mükemmel, 2 puan iyi, 1 puan orta, 0 puan ise kötü duyuşsal iyileşme olarak yorumlandı (Tablo 6).

Tablo 6: Pin-prick test skorları

Skor	Ağırlı uyarıya geri çekme cevabı alınan segment
0 (kötü)	Duyu (cevap) yok
1 (orta)	Diz üzeri
2 (iyi)	Ayak bileğı ile diz arası
3 (mükemmel)	Ayak bileğı distali

3.6. Toe-Spread Test

Tüm hayvanlara 21., 42. ve 63. günlerde toe-spread testi ile motor iyileşme değerdendirilmesi yapıldı. Hayvan kuyruğundan tutularak kaldırıldı ve deney tarafı olan sol arka ekstremite parmaklarının hareketler gözlemlendi. Normal yanıt olan tam ayak parmağı ekstansiyonu ve abdüksiyonu varsa 3 puan, yalnızca abdüksiyon varsa 2 puan, herhangi bir hareket belirtisi varsa 1 puan, hareket yoksa 0 puan verilerek cevaplar skorlandı. 3 puan mükemmel, 2 puan iyi, 1 puan orta, 0 puan ise kötü motor iyileşme olarak yorumlandı (Tablo 7).

Tablo 7: Toe-spread test skorları

Skor	Kuyruktan tutularak kaldırılmaya deney tarafı ayak parmaklarının cevabı
0 (kötü)	Hareket yok
1 (orta)	Herhangi bir hareket belirtisi
2 (iyi)	Abdüksiyon
3 (mükemmel)	Ekstansiyon + Abdüksiyon

3.7. Histolojik Değerlendirme

Histolojik incelemeler için dokular % 4 nötral paraformaldehit ile fikse edildi. Akarsu ile paraformaldehit uzaklaştırıldıktan sonra alkol serisi ile dehidratasyon gerçekleştirildi. Ksilol ile şeffaflaştırılan sinirler parafine gömüldü. Parafin bloklardan 4 µm kalınlığında kesitler alındı. 56°C etüvde 2 saat deparafinize edilen kesitler azalan alkol serisinde rehidrate edilerek Masson'un üçlü boyaması yapıldı. Weigert demirli hematoksilin ile 10 dakika boyandı. Distile suyla yıkandıktan sonra asit fuksin ile 15 dakika boyandı. Distile suyla yıkanıp sonra 10 dakika fosfomolibdik - fosfotungstik asit solüsyonunda bekletildi. Yıkanmadan anilin mavisiyle 5 dakika boyandı. Alkol serisinde dehidrate edilen kesitler ksilole alındı. Entellan ile kapatıldı. Örnekler Leica DM 4000 Görüntülü Analiz Sistemi (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) ile değerlendirildi. Örneklerde hasarın distalinde kalan bölgede Schwann hücrelerinde artış, endonöral kollajen artışı ve fibriller yapıda bozulma değerlendirildi (1: yok, 2: hafif, 3: orta, 4: şiddetli).

3.8. İstatistiksel Analiz

Araştırma verilerinin istatistiksel analizleri için Statistical Package for Social Sciences (SPSS), Windows için sürüm 22.0 (SPSS Inc. Chicago, USA) bilgisayar paket programı kullanılmıştır. Öncelikle, veri setindeki grupların normal dağılım gösterip göstermedikleri Shapiro-Wilk testi ile incelenmiştir. Sonuçlara göre grupların normal dağılım göstermediği belirlenmiştir ($p < 0,05$). Veri setindeki grupların denek sayısının az olması ve normallik varsayımının sağlanmamasından dolayı Kruskal Wallis testi uygulanarak gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olup olmadığı araştırılmıştır. Hangi gruplar arasında fark olduğunu belirlemek için Bonferroni düzeltmeli Mann-Whitney U testi kullanılarak gruplar ikişerli olarak karşılaştırılmıştır. $p < 0,05$ olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

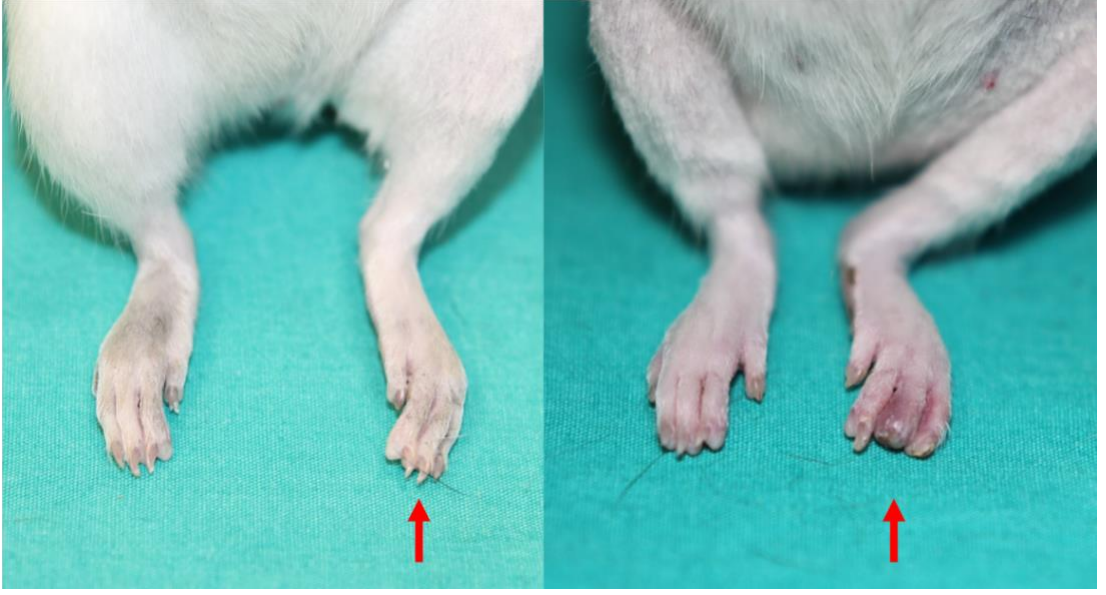
4.1. Makroskobik ve Morfolojik Bulgular

Cerrahi sonrası zaman içinde gelişen ayaklarındaki morfolojik değişimler tespit edildi ve fotoğraflandı. Yürüme analizi sonuçlarına dayanılarak daha iyi iyileşme gözlemlendiği söylenebilecek gruplarda morfolojik olarak da ayakların ve ayak parmaklarının iyi durumda olduğu gözlemlendi.

Şekil 31’de 63. günde fotoğraflanmış solda Grup 4’ten bir hayvana ait ayak morfolojisi, sağda ise Grup 5’ten bir hayvana ait ayak morfolojisi görülüyor. Solda görülen örnekte deney tarafı ile sağlam taraf arasındaki ayak morfolojisi farkının az olduğu görülüyor, bu da yürüme analizi sonrası hesaplanan skora olumlu yansıyor daha iyi iyileşmeye bulgusu olarak karşımıza çıkıyor. Sağda ise deney tarafı ile sağlam taraf arasındaki ayak morfolojisi farkının fazla olduğu görülüyor, bu da yürüme analizine yansıyor kötü iyileşme bulgusu olarak karşımıza çıkıyor.

Şekil 32’de Grup 5’ten başka bir hayvana ait ayak tabanı değişimleri örnek olarak verilmiştir.

Daha önceki bölümde Şekil 29’da siyatik sinir kesisi sonrası beklenen değişimler özetlenmişti.



Şekil 31: Solda Grup 4'ten bir örnek, sağda Grup 5'ten bir örnek görülüyor. Sadece morfolojik yorum ile solda iyileşmenin iyi olduğu, sağda kötü olduğu söylenebilir (kırmızı oklar deney tarafı olan ekstremitayı işaret etmektedir).



Şekil 32: Grup 5'ten bir hayvana ait örnekte ayak morfolojik değişimleri belirgin olarak görülüyor (kırmızı oklar deney tarafı olan ekstremitayı işaret etmektedir).

İnsizyon alanlarının minimal skar ile iyileştiği tespit edildi. Sakrifikasyon sırasında yapılan yeniden insizyon ile siyatik sinire ulaşmak kolay oldu. Siyatik sinirlerin makroskopik olarak normal yapısını yeniden aldığı ve iyileşmenin makroskopik olarak iyi olduğu tespit edildi. Bazı hayvanlarda iyileşme hattındaki dikişler görüldü.

4.2. Yürüme Analizi Sonuçları

Yürüme analizi sonrası hesaplanan siyatik fonksiyonel indeks veri setindeki grupların normal dağılım gösterip göstermedikleri Shapiro-Wilk testi ile incelenmiştir. Sonuçlara göre grupların normal dağılım göstermediği belirlenmiştir ($p < 0,05$). Veri setindeki grupların denek sayısının az olması ve normallik varsayımının sağlanmamasından dolayı Kruskal Wallis testi uygulanarak gün (21., 42. ve 63. günler) bazında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olup olmadığı araştırılmıştır.

21. gün sonuçları incelediğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ($p=0,441$).

42. gün sonuçları incelediğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p=0,002$). Yapılan ikili karşılaştırmalar sonucunda 42. günde alınan ölçüm değerleri için Grup 1 ile Grup 4 arasında ($p=0,027$) ve Grup 4 ile Grup 5 ($p=0,006$) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır.

63. gün sonuçları incelediğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p=0,001$). Yapılan ikili karşılaştırmalar sonucunda 63. günde alınan ölçüm değerleri için Grup 1 ile Grup 4 ($p=0,003$), Grup 3 ile Grup 5

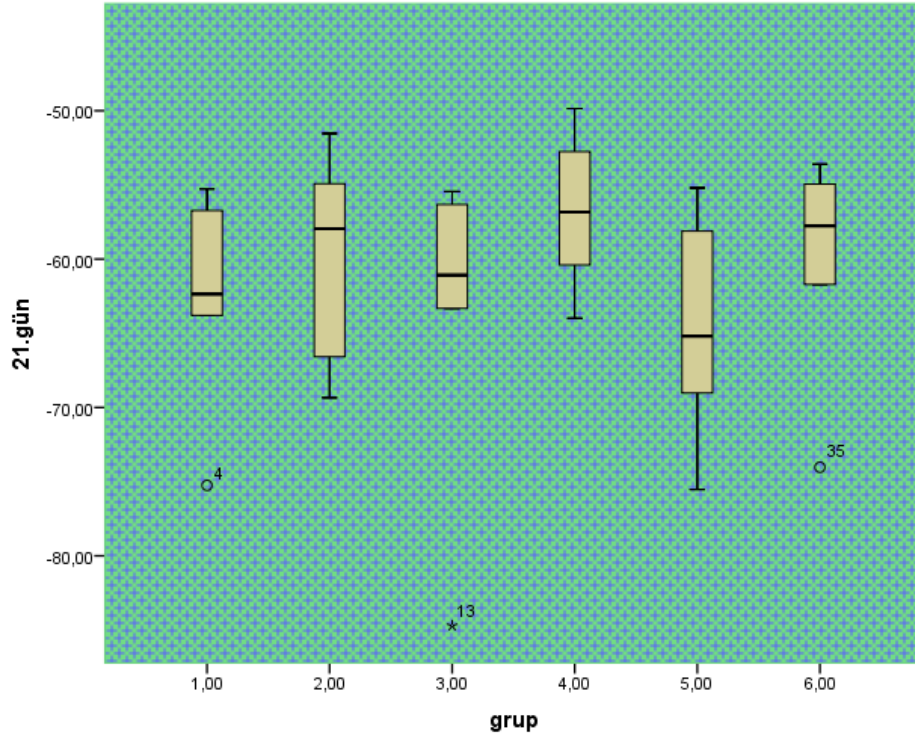
(p=0,033), Grup 4 ile Grup 5 (p=0,001), Grup 5 ile Grup 6 (p=0,020) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır.

Yürüme analizinin sonuçları Tablo 8’de özetlenmiştir.

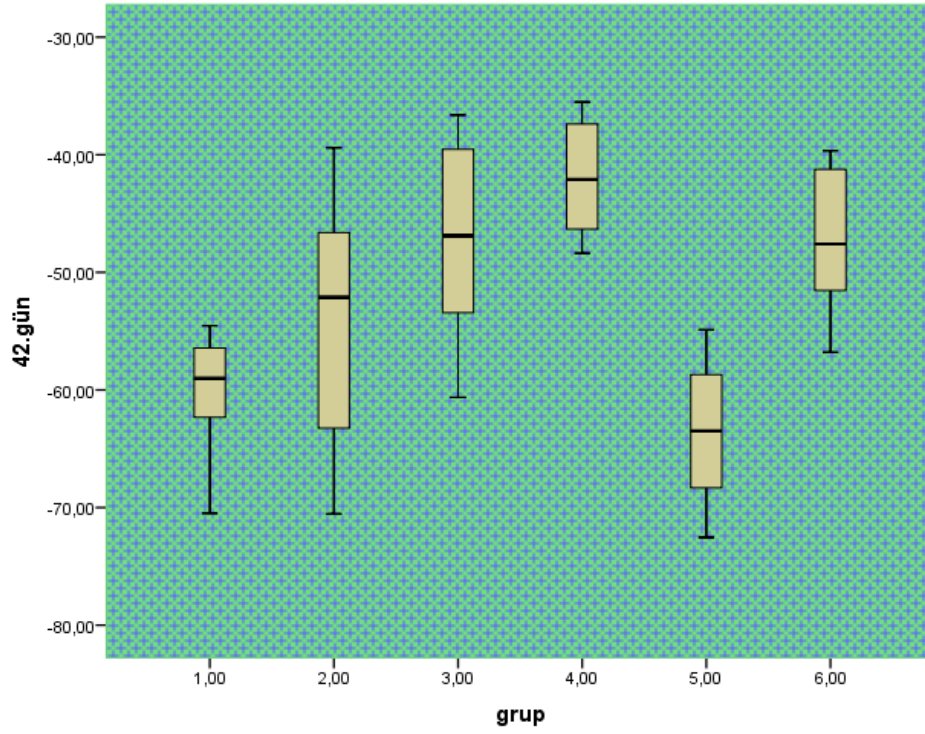
Tablo 8: 21., 42. ve 63. günlerdeki siyatik fonksiyonel indeks sonuçları

GRUP	21. gün		42. gün		63. gün	
	Median (Min, Maks)	Ortalama $\pm$ SD	Median (Min, Maks)	Ortalama $\pm$ SD	Median (Min, Maks)	Ortalama $\pm$ SD
Grup 1	-62,36 (-75,25, -55,28)	-62,63 $\pm$ 7,09	-59,02 (-70,48, -54,54)	-60,30 $\pm$ 5,65	-57,04 (-72,70, -50,37)	-58,97 $\pm$ 7,67
Grup 2	-57,95 (-69,35, -51,53)	-59,71 $\pm$ 6,88	-52,12 (-70,53, -39,41)	-54,01 $\pm$ 11,49	-48,25 (-64,63, -32,20)	-48,97 $\pm$ 12,23
Grup 3	-61,08 (-84,71, -55,44)	-63,66 $\pm$ 10,75	-46,89 (-60,62, -36,63)	-47,34 $\pm$ 9,13	-35,53 (-45,66, -24,69)	-35,44 $\pm$ 7,97
Grup 4	-56,83 (-63,99, -49,86)	-56,78 $\pm$ 5,13	-42,10 (-48,37, -35,52)	-41,97 $\pm$ 5,20	-14,94 (-22,55, -9,97)	-15,52 $\pm$ 4,80
Grup 5	-65,19 (-75,53, -55,20)	-64,71 $\pm$ 7,40	-63,49 (-72,54, -54,87)	-63,57 $\pm$ 6,46	-63,89 (-79,32, -52,66)	-64,13 $\pm$ 9,69
Grup 6	-57,76 (-74,03, -53,60)	-59,97 $\pm$ 7,56	-47,59 (-72,54, -35,52)	-47,40 $\pm$ 6,48	-34,43 (-43,64, -3,55)	-28,53 $\pm$ 17,25
p-value	0,441		0,002		0,001	

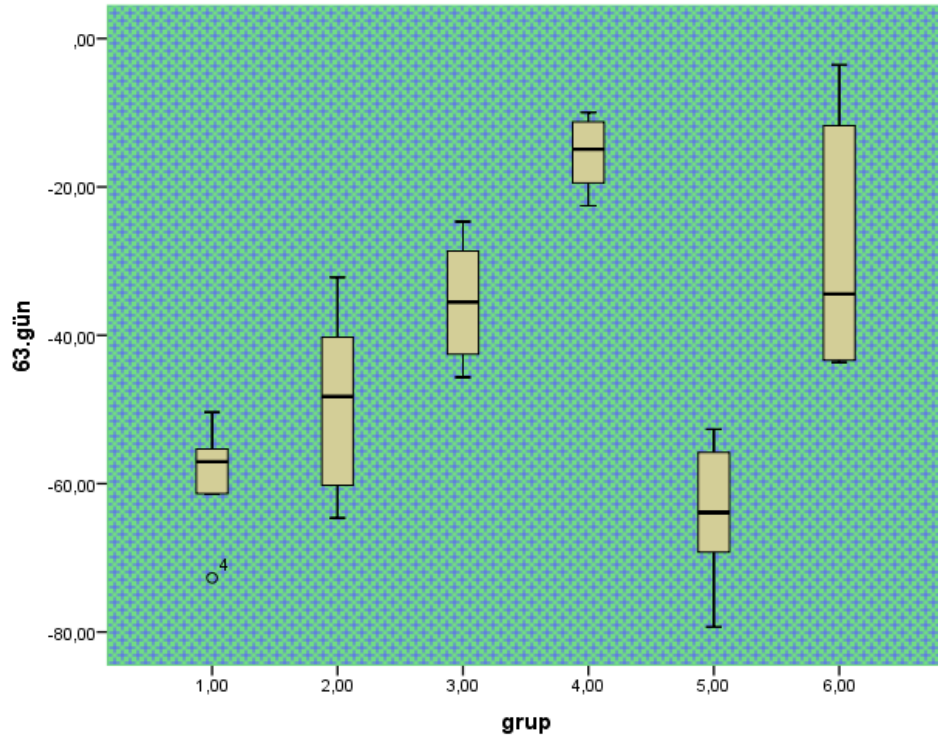
Şekil 33’te 21. güne, Şekil 34’te 42. güne ve Şekil 35’te 63. güne ait grupların tanımlayıcı istatistikleri (median, min-maks, outlier, quartile) Box-plot grafikleri kullanılarak gösterilmiştir. Tüm günlerde median değeri en yüksek olan Grup 4’tür (Her kutucuğun içindeki yatay çizgi o gruba ait medyan değerini ifade eder).



Şekil 33: 21. günde gruplara göre siyatik fonksiyon indeks değerleri



Şekil 34: 42. günde gruplara göre siyatik fonksiyon indeks değerleri



Şekil 35: 63. günde gruplara göre siyatik fonksiyon indeks değerleri

4.3. Pin-Prick Test Sonuçları

Gruplar arasında 21. günde ve 42. günde istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır ($p=0,797$ ve $p=0,308$).

63. günde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır ($p=0,015$). En yüksek skor Grup 4'te görülmüştür. Grup 1 ile Grup 4 ($p=0,014$), Grup 4 ile Grup 6 ($p=0,007$), Grup 3 ile Grup 4 ($p=0,014$), Grup 4 ile 5 ($p=0,007$) ve Grup 2 ile Grup 5 ($p=0,037$) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu bulunmuştur.

Pin-prick test sonuçları Tablo 9'da özetlenmiştir.

Tablo 9: 21., 42. ve 63. günlerdeki pin-prick test sonuçları

GRUP	21. gün	42. gün	63. gün
	<i>Median (Min, Maks)</i>	<i>Median (Min, Maks)</i>	<i>Median (Min, Maks)</i>
Grup 1	1 (0, 2)	1 (1, 2)	2 (1, 2)
Grup 2	1 (0, 1)	1,5 (1, 2)	2,5 (1, 3)
Grup 3	1 (0, 1)	1 (1, 2)	2 (1, 2)
Grup 4	1 (0, 2)	1,5 (1, 3)	3 (2, 3)
Grup 5	1 (0, 1)	1 (1, 1)	1 (0, 2)
Grup 6	1 (0, 1)	1,5 (1, 2)	2 (1, 3)
p-value	0,797	0,308	0,015

4.4. Toe-Spread Test Sonuçları

Gruplar arasında 21. günde ve 42. günde istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır ($p=0,699$ ve $p=0,331$).

63. günde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır ($p=0,032$). Bu karşılaştırma sonucunda Grup 1 ile Grup 4 ($p=0,014$), Grup 3 ile Grup 4 ($p=0,014$) ve Grup 4 ile Grup 5 ($p=0,014$) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur.

Toe-spread test sonuçları Tablo 10’da özetlenmiştir.

Tablo 10: 21., 42. ve 63. günlerdeki toe-spread test sonuçları

GRUP	21. gün	42. gün	63. gün
	<i>Median (Min, Maks)</i>	<i>Median (Min, Maks)</i>	<i>Median (Min, Maks)</i>
Grup 1	1 (0, 2)	1 (0, 2)	1 (1, 2)
Grup 2	1 (0, 1)	1 (1, 2)	2 (1, 3)
Grup 3	1 (0, 2)	1 (1, 2)	1 (1, 2)
Grup 4	1 (1, 2)	2 (1, 2)	2 (2, 3)
Grup 5	1 (0, 2)	1 (1, 2)	1 (1, 3)
Grup 6	1 (0, 1)	1 (1, 2)	2 (1, 3)
p-value	0,699	0,331	0,032

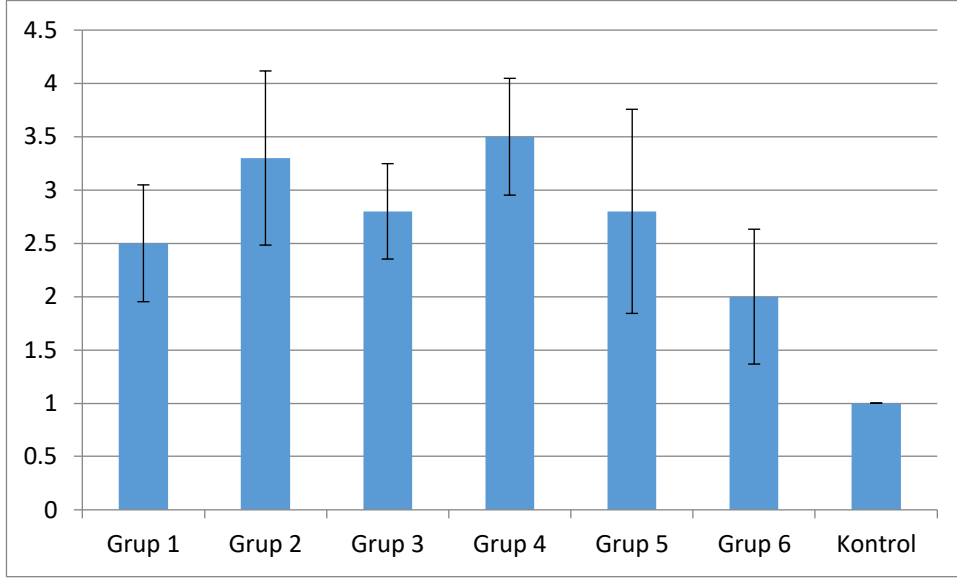
4.5. Histolojik Bulgular

Yapılan histolojik incelemelerde uzunlamasına sinir kesitlerinde proksimal ve distal uçların yanı sıra hasar bölgeleri analiz edildi. Onarım için kullanılan dikiş materyali ve minimal fibrin yapıştırıcı kalıntıları izlendi. Dikiş kalıntılarının etrafında kendini sınırlayan granülasyon dokuları izlendi. Hasarın distalinde kalan bölgelerde, Schwann hücrelerinde artış, sinir fibrillerinin yapısında bozulmalar ve endonöryumda kollajen lif artışı tespit edildi. Örneklerde mevcut bu parametreler semikantitatif olarak skorlandı (1: yok, 2: hafif, 3: orta, 4: şiddetli). Yapılan istatistiksel analiz sonucunda ortaya çıkan gruplara ait ortalama skorlar ve standart sapma değerleri Tablo 11’de verilmiştir.

Tablo 11: Schwann hücrelerinde artış, endonöral kollajen artışı, fibriller yapıda bozulma skorlarında gruplara ait ortalama ve standart sapma değerleri.

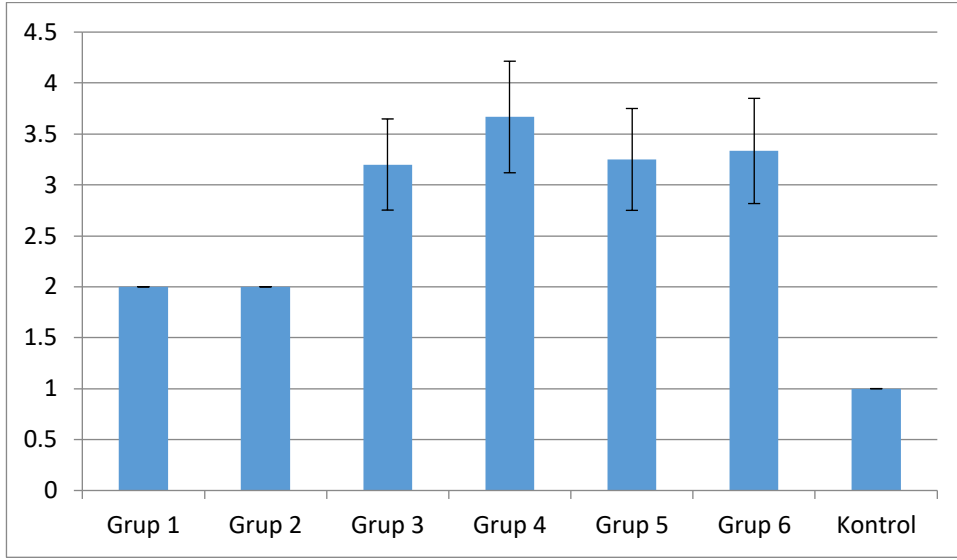
GRUP	Schwann Hücrelerinde Artış		Endonöral Kollajen Artışı		Fibriller Yapıda Bozulma	
	Ortalama	Standart sapma	Ortalama	Standart sapma	Ortalama	Standart sapma
Grup 1	2,5	,54772	2	0	1,8333	,40825
Grup 2	3,3	,81650	2	0	2	0
Grup 3	2,8	,44721	3,2000	,44721	2,6000	,54772
Grup 4	3,5	,54772	3,6667	,54772	2,1667	,40825
Grup 5	2,8	,95743	3,2500	,50000	2,5000	,57735
Grup 6	2,0	,63246	3,3333	,51640	2,0000	,63246
Kontrol	1	0	1	0	1	0

Schwann hücrelerinde artış: Wallerian dejenerasyon nedeniyle hasarın distalinde görülen Schwann hücre artışı en fazla olarak Grup 2 ve Grup 4’te bulunmuştur. Artışın en düşük olduğu deney grubu, Grup 6 olarak bulunmuştur. Grup 6 ve kontrol grubu olan sağ taraf sağlam sinirler arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0,162$). Grup 2 ve Grup 6 arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,013$). Grup 4 ve Grup 6 arasındaki fark da istatistiksel olarak anlamlıdır ($p=0,003$). Grup 6 dışındaki tüm gruplardaki Schwann hücre artışı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). Şekil 36’da gruplara ait Schwann hücrelerinde artış grafiği gösterilmiştir.



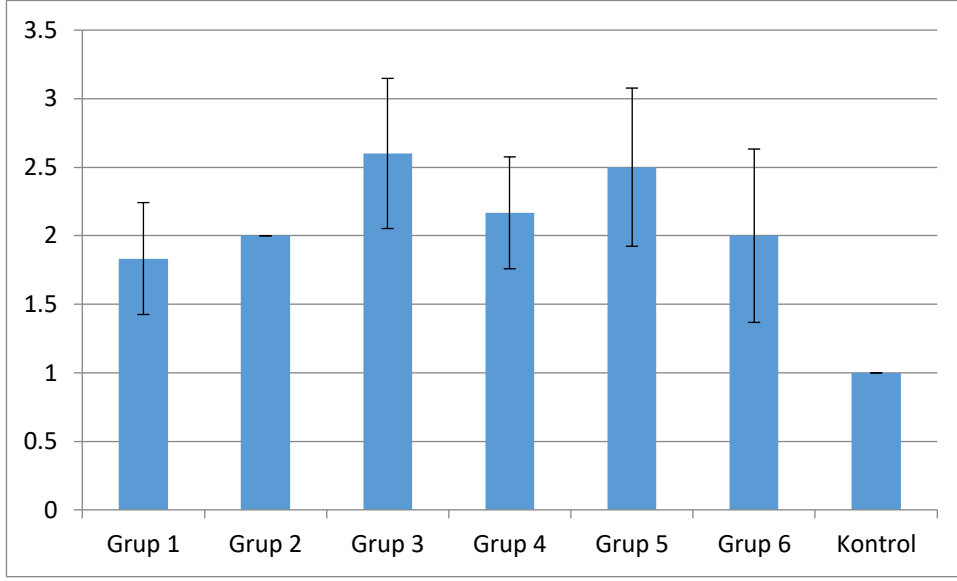
Şekil 36: Schwann hücre artış skorunu gösteren grafik (Ortalama ± SS).

Endonöral Kollajen Artışı: Bütün gruplarda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı kollajen artışı görülmüştür ($p < 0,05$). Grup 3, Grup 4, Grup 5 ve Grup 6'daki artışlar Grup 1 ve Grup 2'ye göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,01$). Şekil 37'de endonöral kollajen artışı gösterilmiştir.



Şekil 37: Endonöral kollajen artış skorunu gösteren grafik (Ortalama ± SS).

Fibriller Yapıda Bozulma: Tüm gruplarda fibriller yapıdaki bozulma kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$). Ancak bozulma şiddetli olmadığı için gruplar arasında anlamlı fark yoktur ($p > 0,05$). Şekil 38’de gruplara ait skorlar gösterilmiştir.



Şekil 38: Fibriller yapıda bozulma skorunu gösteren grafik (Ortalama ± SS).

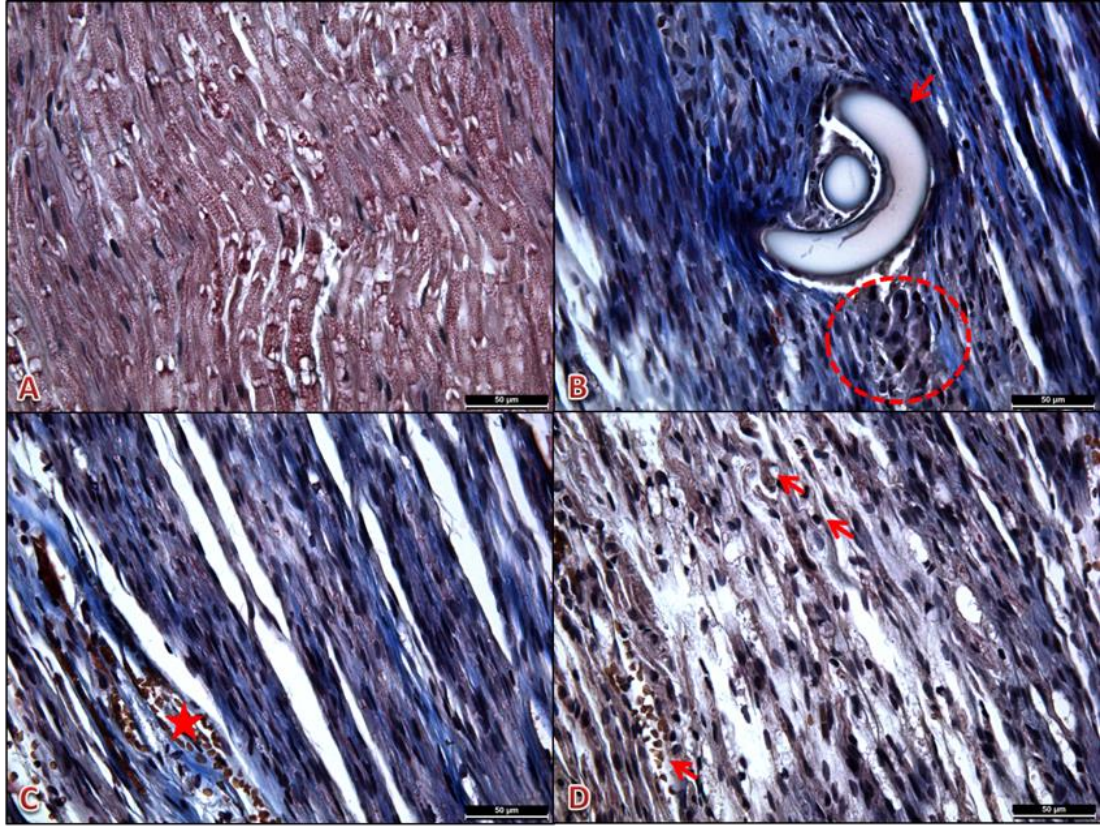
Özetle;

* Schwann hücrelerinde artış skorunda Grup 2 ve Grup 4'te,

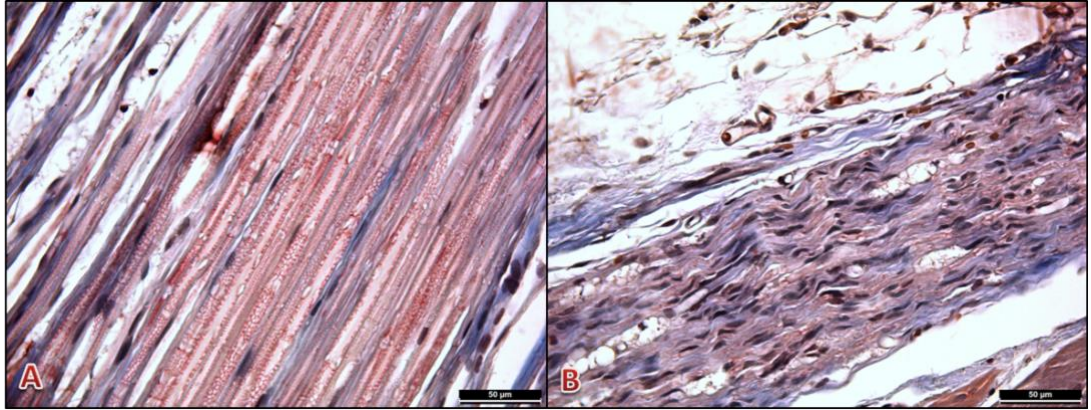
* endonöral kollajen artışı skorunda Grup 3, Grup 4, Grup 5 ve Grup 6'da diğer gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı yükseklik bulunmuştur ($p < 0,05$).

* Fibriller yapıda bozulma skorunda ise gruplar arası anlamlı fark yoktur ($p > 0,05$).

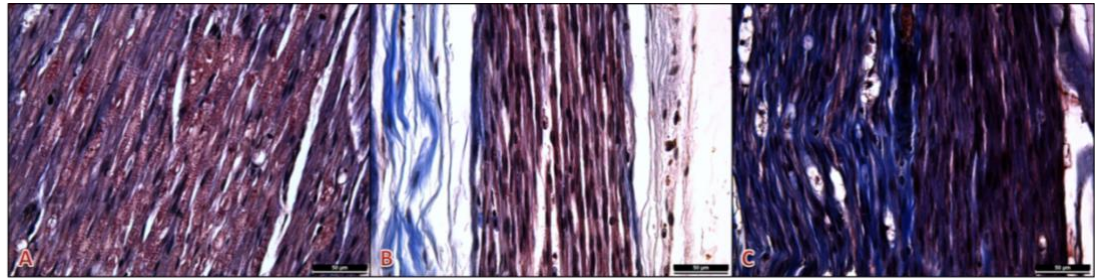
Sırasıyla Grup 1'den Grup 6'ya histolojik kesitlerinden örnekler Şekil 39 ile Şekil 44 arasında verilmiştir. Kontrol grubu olan sağ taraf sağlam siyatik sinire ait örnek Şekil 45'te verilmiştir. Öne çıkan diğer histolojik özelliklerden şekil açıklamalarında bahsedilmiştir.



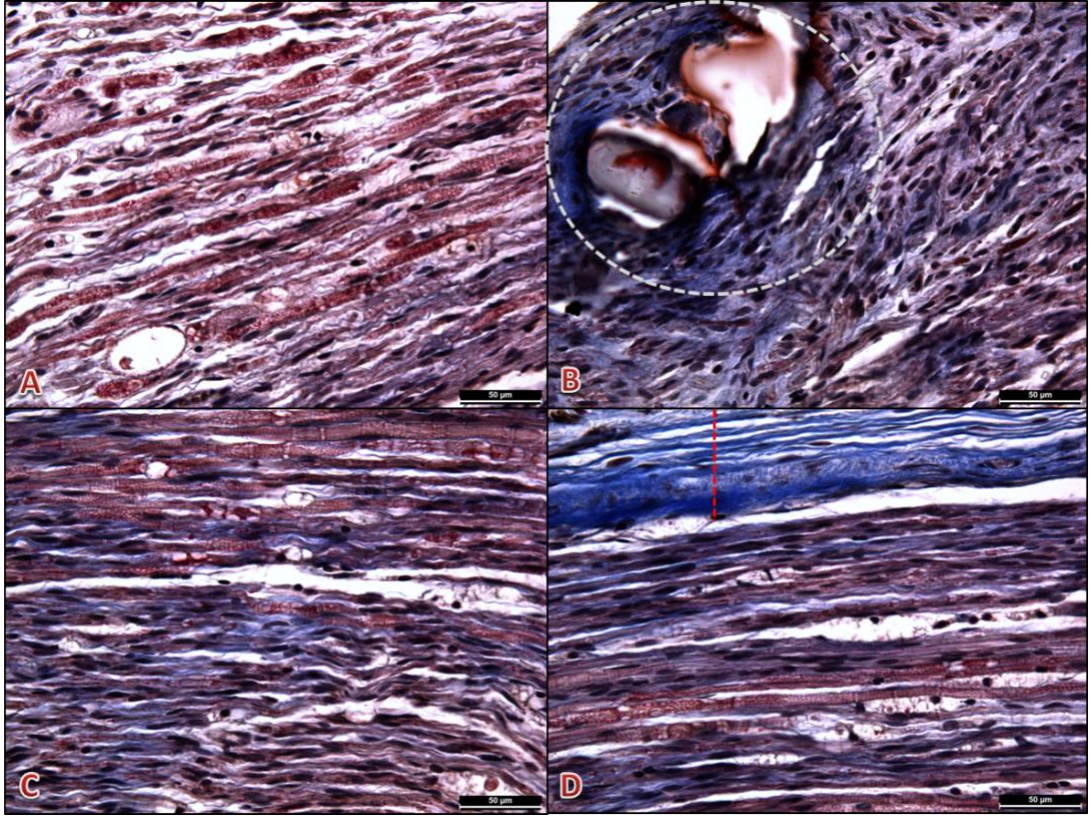
Şekil 39: Grup 1'e ilişkin örnek resimler (Masson'un üçlü boyası, 400x büyütme). **A:** Proksimal uçta sinir fibrilleri kırmızı renkte izlenirken, Schwann hücrelerinin çekirdekleri siyah olarak izlenmektedir. **B:** Yara bölgesinde epinöryumda fibrin yapıştırıcı kalıntısı (ok), fibrin yapıştırıcı etrafında inflamatuvar hücre infiltrasyonu izlenmektedir(kesik çizgi). Kollajen liflerin (mavi) düzenlenimi fibrin yapıştırıcıyı çevreleyecek şekildedir. **C:** Distal uçta kollajen liflerde artış izlenmektedir. Kollajen liflerdeki artışa Schwann hücrelerinde artış eşlik etmektedir. Perinöral damar yapıları çevrelerindeki kollajen liflerle izlenmektedir (yıldız). **D:** Distal uçta fibriller yapıda belirgin bozulma, endonöral kollajen miktarında artış görülmektedir. Vasküler yapılar okla gösterilmektedir.



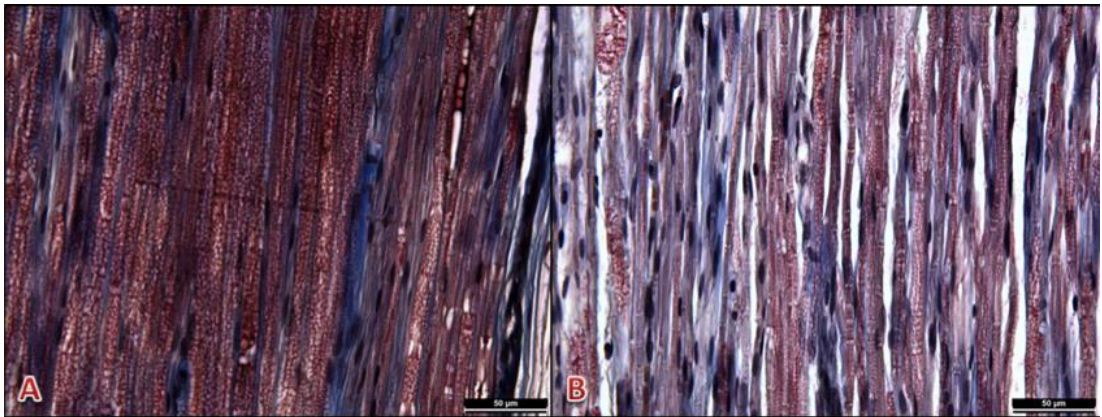
Şekil 40: Grup 2'ye ilişkin örnek resimler (Masson'un üçlü boyası, 400x büyütme). A: Proksimal uçta sinir fibrilleri endonöryum ve Schwann hücreleri doğal yapısında izlenmektedir. B: Distal uçta Schwann hücrelerinde yoğun artışa eşlik eden endonöral kollajen miktarında minimal artış, fibriller yapıda bozulma görülmektedir.



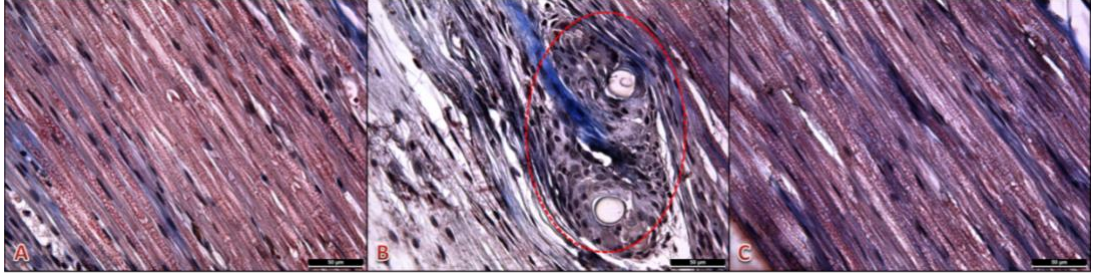
Şekil 41: Grup 3'e ilişkin örnek resimler (Masson'un üçlü boyası, 400x büyütme). A: Proksimal uçta korunmuş sinir yapısı. B: Distal uçta Schwann hücre yoğunluğunda artışa karşın korunmuş fibril yapısı. C: Distal uçta kollajen miktarında yoğun artış.



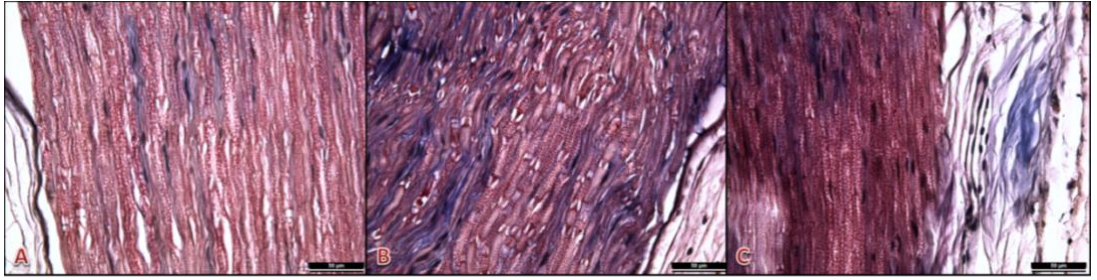
Şekil 42: Grup 4'e ilişkin örnek resimler (Masson'un üçlü boyası, 400x büyütme). A: Proksimal uçta korunmuş sinir fibril yapısı. B: Epinöryumda, dikiş materyali kalıntısı ve etrafındaki granülasyon dokusu (kesik çizgi) dışında kalan alanda selülarite artışı ve fibroblastların paralel düzenleniminde bozulmalar izlenmektedir. C: Distal uçta fibril yapısında bozulma, kollajen miktarında orta derecede artış ve Schwann hücrelerinde yoğun artış izlenmektedir. D: Distal uçta üstte epinöryum izlenmekte (kesik çizgi), fibrosit çekirdekleri siyah, kollajen lifleri paralel düzenlenmiş olarak izleniyor. Endonöral kollajen miktarı orta derecede artmış.



Şekil 43: Grup 5'e ait örnek resimler (Masson'un üçlü boyası, 400x büyütme). A: Proksimal uçta sinir fibrilleri korunmuş ve eşlik eden Schwann hücrelerinin çekirdekleri, endonöral kollajen lifler izlenmektedir. B: Distal uçta dejenerasyona bağlı fibrillerde azalma, endonöral kollajen artışı, Schwann hücrelerinde artış görülmektedir.



Şekil 44: Grup 6'ya ilişkin örnek resimler (Masson'un üçlü boyası, 400x büyütme). A: Proksimal uçta korunmuş sinir fibrilleri. B: Sol tarafta epinöryum, sağ üstte sinir fibrilleri izlenmekte. Dikiş materyalini içeren granülasyon dokusu kesik çizgiyle çevrelenmiştir. C: Distal uçta endonöral kollajen miktarında minimal artış görülmekte ancak fibril yapısı korunmuş ve Schwann hücrelerinde artış izlenmemektedir.



Şekil 45: Kontrol grubuna ilişkin örnek resimler (Masson'un üçlü boyası, 400x büyütme). A, B, C: Farklı bölgelerden alınmış fotoğraflarda sinir fibrillerinin düzenlenimi, Schwann hücre yoğunluğu, endonöral kollajen miktarı benzer olarak izlenmektedir.

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada eritropoietin içeren fibrin yapıştırıcının periferik sinir kesileri onarımında kullanımının sinir iyileşmesini olumlu etkileyeceği hipotezi ortaya konulmuştur.

Fonksiyonel siyatik sinir iyileşmesinin en önemli göstergelerinden yürüme analizi sonrası hesaplanan siyatik fonksiyonel indekslerin istatistiksel analizi sonrası 21. günde gruplar arasında anlamlı fark yoktur. Pin-prick ve toe-spread testlerinde de 21. günde gruplar arasında anlamlı farklılık yoktur. 21 günün sinir ezilme yaralanmaları sonrası iyileşme bulgularının görülmesi için yeterli süre olsa da kesi onarımı iyileşme bulgularının görülmesi için yeterli olmadığı düşünülmüştür.

42. günde de pin-prick ve toe-spread testlerinde gruplar arasında anlamlı farklılık yoktur. Fakat yürüme analizinde Grup 4 en yüksek skoru vermekte, Grup 4 ile Grup 1 ve 5 arasında anlamlı farklılık bulunmaktadır. Bu sonuca dayanılarak 42. günde en iyi iyileşmenin hipotezi destekler şekilde eritropoietin içeren fibrin yapıştırıcı ve iki dikiş kullanılan Grup 4'te görüldüğü söylenebilir.

42. günde en düşük siyatik fonksiyonel indeks ise Grup 1 ve Grup 5'te görülmüştür ve Grup 4'e göre anlamlı olarak farklıdır. Sadece salin içeren fibrin yapıştırıcı kullanılan Grup 1'de iyileşmenin göreceli olarak kötü olmasının nedeni yalnızca fibrin yapıştırıcı ile yapılan onarımların gerim kuvveti (tensile strength) açısından dikiş ile yapılan onarımlara göre geride kaldığını raporlayan çalışmaların bulgularını akla getirmektedir. Cruz ve ark. yalnızca fibrin yapıştırıcı kullanılan onarımların gerim kuvveti açısından yetersiz olduğunu raporlamışlardır (124). Fakat yalnızca fibrin yapıştırıcı ile onarımın, dikiş ile onarıma eşit sonuçlar verdiğini

gösteren çalışmalar da mevcuttur (127, 175, 176). Fakat Grup 2'deki iyileşmenin istatistiksel olarak anlamlı olmasa da Grup 1'e göre daha iyi olması, Grup 2'de eritropoietinin gerim kuvveti dışındaki başka bir mekanizma üzerinden iyileşme üzerindeki olası olumlu etkisine bağlanabilir. Isaacs ve ark. yaptığı çalışmada iki adet epinöral dikişe ek olarak fibrin yapıştırıcı ile yapılan onarımlarda boşluk (gap) formasyonunun azaldığı göstermiştir (177).

42. gün yürüme analizi sonuçlarında Grup 5'te iyileşmenin göreceli olarak kötü olmasının nedeni yalnızca iki adet epinöral dikişin yeterli gerim kuvveti sağlayamama ihtimalini akla getirmektedir. Grup 6'da iyileşmenin istatistiksel olarak anlamlı olmasa da Grup 5'e göre daha iyi olması, dört adet epinöral dikiş ile onarımın iki adet epinöral dikiş ile onarıma kıyasla daha iyi fonksiyonel iyileşme sağladığı söylenebilir. 63. gün yürüme analizi sonuçlarında ise Grup 5 ile Grup 6 arasındaki bu fark istatistiksel olarak anlamlı olmuştur. Goldberg ve ark. kadavra dijital sinir üzerinde yaptıkları çalışmada dikiş sayısı, dikiş kalınlığı, dikiş geçme mesafesi değişkenleri uygulamışlar ve onarım dayanıklılığında en önemli belirleyicinin dikiş sayısı olduğunu göstermişlerdir (178). Artan dikiş sayısının histolojik sonuçları ileride tartışılmıştır.

Nihai sonuç sayılabilecek 63. gün yürüme analizi, pin-prick test ve toe-spread test sonuçlarında en iyi iyileşme yine Grup 4'te bulundu. 63. gün yürüme analizi, pin-prick test ve toe-spread test sonuçları genel olarak birbirine uyumlu bulunmuştur. Bu bulguya dayanılarak yürüme analizinin diğer iki teste oranla erken dönemde (42. günde) gruplar arasında fark verebilen, daha küçük fonksiyonel bulguları yakalayabilen bir test olduğu söylenebilir. Monte-Raso ve ark. yaptığı çalışmada

siyatik fonksiyonel indeks hesaplamasının yaralanma sonrası 3. haftada güvenilir sonuç vermeye başladığını raporlamışlardır (179).

63. gün yürüme analizi, pin-prick test ve toe-spread test sonuçlarında en kötü iyileşme yine Grup 1 ve Grup 5'te bulundu. Bu bulgudan yola çıkılarak sadece fibrin yapıştırıcı ya da sadece iki epinöral dikiş ile yapılan onarımların göreceli olarak daha kötü iyileşme verdiği, bunun da muhtemel nedeninin gerim kuvveti yetersizliği olduğu söylenebilir. Daha önce de bahsedildiği gibi, Grup 2'de Grup 1 ve Grup 5'e göre istatistiksel olarak anlamlı olmasa da daha iyi iyileşme olması eritropoietinin iyileşme üzerindeki olumlu etkisine bağlanabilir.

Eritropoietinin, fibrin yapıştırıcının, dikiş materyalinin sinir iyileşme mekanizması üzerine etkilerinden önceki bölümlerde detaylı bahsedilmiştir. Bu etki mekanizmaları literatürde fazlaca çeşitlilik göstermektedir (80, 82, 88, 91, 92, 94). Eritropoietin sinir iyileşmesi üzerindeki etki mekanizması için öne çıkan yol Schwann hücresi üzerinden gerçekleşen mekanizmadır (80, 81, 91). Schwann hücrelerinin fonksiyonu Wallerian dejenerasyonda, sinir iyileşmesi sırasında yeni oluşan aksonların distale ilerlemesinde, miyelin oluşumunda yönetici olur (152). Bu nedenle Schwann hücrelerine etki etmek sinir iyileşmesine etki etmektir denebilir. Histolojik incelemede Schwann hücrelerinde artış skorları eritropoietin kullanılan gruplar olan Grup 2 ve Grup 4'te, eritropoietin kullanılmayan gruplara oranla anlamlı olarak fazladır. Bu bulgudan yola çıkılarak eritropoietinin Schwann hücrelerine etki ettiği ve proliferasyonu uyardığını söylenebilir. Bu bulgu Li ve ark. tarafından yapılan, eritropoietinin Schwann hücresinde proliferasyonu uyardığı gösterilen çalışma ile uyumludur (81).

Sinir onarımında kullanılan teknikler olan epinöral dikiş ile fibrin yapıştırıcıyı karşılaştıran literatürde mevcut çalışmalar dikiş ile onarım yapılan gruplarda dikiş materyaline yabancı cisim granülomunun ve fibriller yapıda bozulmanın, adezyon ve fibrozisin fibrin yapıştırıcı ile onarım yapılan gruplara kıyasla fazla olabileceğini göstermişlerdir (130, 180). Bu parametrelerdeki farkların anlamlı olmadığı yönünde bulgular olan çalışmalar da mevcuttur (2). Histolojik incelemede endonöral kollajen artışı skorları dikiş kullanılan gruplar olan Grup 3, Grup 4, Grup 5 ve Grup 6'da, dikiş kullanılmayan gruplara oranla istatistiksel anlamlı olarak fazladır. Fakat fibriller yapıda bozulma skorları incelendiğinde gruplar arasında istatistiksel anlamlı farklılık yoktur. Dikiş materyali çevrelerinde yabancı cisim granülomu oluşumu gözlenmiştir. Dikiş kullanılan gruplarda anlamlı olarak endonöral kollajen artışının olması bulgusundan yola çıkılarak, dikiş materyalinin yabancı cisim reaksiyonuna neden olduğu, granülom oluşumunu, kollajen üretimini ve dolaylı olarak fibrozisi uyardığı söylenebilir. Ornelas ve ark. dikiş ile onarımın fibrin yapıştırıcı ile onarıma göre daha fazla fibrozise neden olduğunu raporlamıştır (176). Bu bulgular literatürdeki diğer bazı çalışmalar ile de uyumludur (125, 130, 180). Grup 4'te endonöral kollajen artışı en fazla olmasına rağmen siyatik fonksiyonel indeks, pin-prick ve toe-spread testlerinde en iyi sonuçları vermesine dayanılarak iyileşen sinirde kollajen artışı ya da dolaylı fibrozis artışının fonksiyonel sonucu doğrudan etkilemediği söylenebilir.

İki adet epinöral dikiş ile onarım yapılan Grup 5 ile dört adet epinöral dikiş ile onarım yapılan Grup 6 kendi aralarında endonöral kollajen artış skorları açısından kıyaslandığında gruplar arasında istatistiksel anlamlı farklılık yoktur. Bu bulgudan yola çıkılarak kullanılan dikiş sayısının iki ya da dört olmasının endonöral kollajen

artışını ve dolaylı olarak fibrozisin etkilemediği söylenebilir. Mevcut yabancı cisim yoğunluğunun ortaya çıkacak reaksiyonun yoğunluğunu etkileyeceği göz önünde bulundurulduğunda bu sonuç beklenenin aksi yönde bir bulgudur. Eğer çalışmada kullanılan epinöral dikiş sayısının beş ve daha fazla olduğu bir grup var olsaydı, artan dikiş sayısının bu parametrede istatistiksel fark yaratabileceği düşünülmüştür.

Sadece fibrin yapıştırıcı içinde eritropoietinin olup olmamasının değişkenlik gösterdiği Grup 1 ile Grup 2 kendi aralarında ve Grup 3 ile Grup 4 kendi aralarında endonöral kollajen artış skorları açısından kıyaslandığında gruplar arasında istatistiksel anlamlı farklılık yoktur. Bu bulgudan yola çıkılarak, eritropoietinin kollajen üretimini ve fibrozis üzerinde etkisi olmadığı söylenebilir.

Onarımda eritropoietinin yer alıp almamasının sonuca etkisine odaklanacak olursak Grup 1 ile Grup 2'nin kendi aralarında ve Grup 3 ile Grup 4'ün kendi aralarında ikişerli olarak karşılaştırma analizine bakmak gerekir.

Grup 1 ile Grup 2 arasında siyatik fonksiyonel indeks, pin-prick test ve toe-spread test skorları, endonöral kollajen artışı ve fibriller yapıda bozulma parametrelerinde istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktur. Yalnızca Schwann hücrelerinde artış skoru Grup 2'de Grup 1'e göre istatistiksel anlamlı olarak fazladır. Bu etkide de Schwann hücresi proliferasyonunun eritropoietin tarafından uyarılmasına bağlanmıştır.

Grup 3 ile Grup 4 arasında siyatik fonksiyonel indeks, endonöral kollajen artışı, fibriller yapıda bozulma parametrelerinde istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktur. Grup 4'te 63. gün pin-prick test ve toe-spread test sonuçları Grup 3'e oranla daha yüksektir, yani daha iyi iyileşmeyi işaret etmektedir. Schwann hücrelerinde

artış skoru Grup 4'te Grup 3'e göre istatistiksel anlamlı olarak fazladır. Bu etkide de Schwann hücresi proliferasyonunun eritropoietin tarafından uyarılmasına bağlanmıştır.

Genel olarak bakıldığında eritropoietin kullanımı tüm testlerde ve tüm parametrelerde istatistiksel olarak anlamlı farklılık yaratmasa da pin-prick ve toe-spread testlerinde iyileşmeyi olumlu yönde etkilediğine dair bulgu vermiştir.

Onarımda fibrin yapıştırıcının yer alıp almamasının sonuca etkisine odaklanacak olursak Grup 3 ile Grup 5'i kendi aralarında karşılaştırma analizine bakmak gerekir. 63. günde siyatik fonksiyonel indeks Grup 3'te Grup 5'e göre daha yüksektir, yani daha iyi iyileşmeyi işaret etmektedir. Bu bulguya dayanarak iki dikiş ile yapılan onarımlara fibrin yapıştırıcı eklenmesinin iyileşmeyi olumlu etkilemede etkin olduğu söylenebilir. Bu Isaacs ve ark. yaptığı çalışma ile uyumludur (177). Çalışmada dört dikiş kullanılan Grup 6'yı kıyaslayacak, dört dikiş ve fibrin yapıştırıcının beraber kullanıldığı bir grup olmadığı için bu çıkarımı tüm dikiş sayıları için genellemek doğru olmaz. Diğer parametrelerde Grup 3 ile Grup 5 arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur.

Onarımda epinöral dikiş sayısının sonuca etkisine odaklanacak olursak Grup 5 ile Grup 6'yı kendi aralarında karşılaştırma analizine bakmak gerekir. 63. günde siyatik fonksiyonel indeks Grup 6'da Grup 5'e göre daha yüksektir, yani daha iyi iyileşmeyi işaret etmektedir. Bu bulguya dayanarak dört dikiş ile yapılan onarımların iki dikişle yapılanlara göre fonksiyonel iyileşmede daha etkin olduğu söylenebilir. Diğer parametrelerde Grup 3 ile Grup 5 arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur.

Tüm gruplar incelendiğinde fibrin yapıştırıcı ve iki epinöral dikişin kombine kullanımı (Grup 3 ve 4) istatistiksel anlamlı olarak birçok parametrede öne çıkmaktadır. Bu kombine kullanıma eritropoietin eklenmesi ile her parametrede istatistiksel olarak anlamlı olmasa da, daha başarılı iyileşme sonuçları elde edilmiştir (Grup 4).

6. SONUÇ

63. gün siyatik fonksiyonel indeks, pin-prick test ve toe-spread test sonuçlarına göre en iyi iyileşme Grup 4'te, en kötü iyileşme Grup 5'te izlendi.

Eritropoietin kullanılan gruplarda (Grup 2 ve 4) Schwann hücrelerinde artış skoru en yüksek izlendi.

Epinöral dikiş kullanılan gruplarda (Grup 3, 4, 5 ve 6) endonöral kollajen miktarında artış skoru yüksek izlendi.

Fibrin yapıştırıcı ve iki epinöral dikişin kombine kullanımı istatistiksel anlamlı olarak daha iyi iyileşme göstermektedir. Bu kombine kullanıma eritropoietin eklenmesi ile daha da başarılı iyileşme sonuçları elde edilmiştir.

Eritropoietin içeren fibrin yapıştırıcının sinir kesisi onarımında izole ya da epinöral dikişler ile kombine olarak kullanıldığı literatürdeki bu ilk çalışma göstermiştir ki fibrin yapıştırıcı içindeki eritropoietin lokal olarak Schwann hücresi ve sinir üzerine etki ederek daha başarılı iyileşme sonuçları sağlamaktadır.

7. ÖZET

Eritropoietin Ve Fibrin Yapıştırıcı Karışımının Periferik Sinir Onarımında Kullanımı

Sinir kesileri günlük pratikte sık karşılaşılan acil servis olguları arasındadır. Sinir iyileşmesindeki kısıtlılıklar ve sorunlar birçok çalışmanın yapılmasına neden olmaktadır. Nörotrofik faktör uygulamalarıyla ya da farklı onarım teknikleri kullanımıyla daha iyi iyileşme hedefleyen çalışmalar mevcuttur. Son yıllarda eritropoietinin sinir iyileşmesine olumlu katkıda bulunduğunu raporlayan çok sayıda çalışma mevcuttur. Sinir kesisi onarım yöntemi olarak da fibrin yapıştırıcı kullanımının etkili ve önemli avantajlara sahip olduğunu raporlayan çalışmalar da mevcuttur. Bu çalışmada eritropoietin içeren fibrin yapıştırıcının sinir onarımında kullanımının sinir iyileşmesini olumlu etkileyeceği hipotezinden yola çıkılarak bunların ayrı ayrı ve kombine kullanımının etkileri araştırılmıştır.

Çalışmada 36 adet dişi Long Evans türü rat kullanıldı. Ratlar her bir grupta 6 adet olacak şekilde 6 gruba ayrıldı. Sol taraf siyatik siniri kesildi ve dikiş ya da fibrin yapıştırıcı ya da bunların kombinasyonu ile onarıldı. Sağ taraf siyatik siniri kontrol tarafı olarak korundu. Sinir kesileri Grup 1’de salin içeren fibrin yapıştırıcı ile, Grup 2’de eritropoietin içeren fibrin yapıştırıcı ile, Grup 3’te 2 adet epinöral dikiş ile kombine olarak salin içeren fibrin yapıştırıcı ile, Grup 4’te 2 adet epinöral dikiş ile kombine olarak eritropoietin içeren fibrin yapıştırıcı ile, Grup 5’te 2 adet epinöral dikiş ile, Grup 6’da 4 adet epinöral dikiş ile onarıldı. Tüm gruplara 21, 42 ve 63. günlerde yürüme analizi, pin-prick test ve toe-spread test uygulandı. Tüm gruplar 63. günde sakrifiye edildi. Çıkarılan siyatik sinirler histolojik olarak incelendi.

63. gün siyatik fonksiyonel indeks, pin-prick test ve toe-spread test sonuçlarına göre en iyi iyileşme Grup 4'te, en kötü iyileşme Grup 5'te izlendi. Eritropoietin kullanılan gruplarda (Grup 2 ve 4) Schwann hücrelerinde artış skoru en yüksek izlendi. Epinöral dikiş kullanılan gruplarda (Grup 3, 4, 5 ve 6) endonöral kollajen miktarında artış skoru yüksek izlendi.

Fibrin yapıştırıcı ve iki epinöral dikişin kombine kullanımı istatistiksel anlamlı olarak daha iyi iyileşme göstermektedir. Bu kombine kullanıma eritropoietin eklenmesi ile daha da başarılı iyileşme sonuçları elde edilmiştir.

Sinir onarımında fibrin yapıştırıcı içine eritropoietin eklenmesi ucuz, kolay ve klinik pratikte uygulanabilir bir yöntemdir.

Anahtar Kelimeler: eritropoietin, fibrin yapıştırıcı, sinir onarımı.

8. SUMMARY

Use of Erythropoietin and Fibrin Glue Mixture for Peripheral Nerve Repair

In routine practice, nerve transections are common emergency room cases. Limitations and problems in nerve regeneration encourage many researches. There are researches aiming for better regeneration with neurotrophic factor applications or the use of different repair techniques. There have been many studies reporting that erythropoietin has contributed positively to nerve healing in recent years. There are also studies reporting that the use of fibrin glue in nerve repair is an effective and advantageous. In this study, based on the hypothesis that the use of erythropoietin-containing fibrin glue in nerve repair would affect the healing positively, we investigated the effects of separate and combined use of erythropoietin-containing fibrin glue on nerve regeneration.

36 female Long Evans rats were used. The animals were divided into 6 groups of 6 animals each. Left sciatic nerves were isolated, transected and repaired with suture or fibrin glue or combination of those. Right sciatic nerves were kept as control. Nerves were repaired with saline-containing fibrin glue in Group 1, erythropoietin-containing fibrin glue in Group 2, saline-containing fibrin glue and two sutures in Group 3, erythropoietin-containing fibrin glue and two sutures in Group 4, two sutures in Group 5, four sutures in Group 6. Walking track analysis, pin-prick test and toe-spread test were performed on days 21, 42 and 63. All animals were sacrificed on day 63. Sciatic nerves were analyzed histologically.

Sciatic function index, pin-prick test index, toe-spread test index were that

was best in Group 4, worst in Group 5. Erythropoietin-treated rats (Group 2 and 4) showed superior Schwann cell proliferation. In groups those had epineural repair with sutures (Group 3, 4, 5 and 6) superior endoneural collagen synthesis scores were seen.

The combined use of fibrin glue and two epineural sutures showed significantly better recovery. Further successful recovery results were obtained by addition of erythropoietin to that combination.

The addition of erythropoietin into fibrin glue is cheap, easy and applicable in clinical practice of nerve repair.

Keywords: erythropoietin, fibrin glue, nerve repair.

9. KAYNAKLAR

1. Sundem L, Chris Tseng KC, Li H, Ketz J, Noble M, Elfar J. Erythropoietin Enhanced Recovery After Traumatic Nerve Injury: Myelination and Localized Effects. *The Journal of hand surgery*. 2016;41(10):999-1010.
2. Sameem M, Wood TJ, Bain JR. A systematic review on the use of fibrin glue for peripheral nerve repair. *Plast Reconstr Surg*. 2011;127(6):2381-90.
3. Jourdanet D. De l'anemie des altitudes et de l'anemie in general dans ses rapports avec la pression dell' atmosphere. *Balliere (Paris)*. 1863:44.
4. Viault F. Sur la quantite d'oxygene continue dans le sang des animaux des hauts plateaux l'Amerique du Sud. *CR Acad Sci (Paris)*. 1891;112:295.
5. Carnot P, DeFlandre C. Sur l'activite hematopoietique de serum au cours de la regeneration di sang. *CR Acad Sci (Paris)*. 1906;143:384-6.
6. Fisher JW. Landmark advances in the development of erythropoietin. *Experimental biology and medicine (Maywood, NJ)*. 2010;235(12):1398-411.
7. Bonsdorff E, Jalavisto E. A humoral mechanism in anoxic erythrocytosis. *Acta Physiol Scand*. 1948;16.
8. Plzak LF, Fried W, Jacobson LO, Bethard WF. Demonstration of stimulation of erythropoiesis by plasma from anemic rats using Fe59. *The Journal of laboratory and clinical medicine*. 1955;46(5):671-8.
9. Jacobson LO, Goldwasser E, Fried W, Plzak L. Role of the kidney in erythropoiesis. *Nature*. 1957;179(4560):633-4.
10. White WF, Gurney CW, Goldwasser E, Jacobson LO. Studies on erythropoietin. *Recent progress in hormone research*. 1960;16:219-62.
11. Cotes PM, Bangham DR. The international reference preparation of erythropoietin. *Bulletin of the World Health Organization*. 1966;35(5):751-60.
12. Annable L, Cotes PM, Mussett MV. The second international reference preparation of erythropoietin, human, urinary, for bioassay. *Bulletin of the World Health Organization*. 1972;47(1):99-112.
13. Sytkowski AJ. *Erythropoietin: blood, brain and beyond*: John Wiley & Sons; 2006.
14. Miyake T, Kung CK, Goldwasser E. Purification of human erythropoietin. *The Journal of biological chemistry*. 1977;252(15):5558-64.
15. Zanjani ED, Poster J, Burlington H, Mann LI, Wasserman LR. Liver as the primary site of erythropoietin formation in the fetus. *The Journal of laboratory and clinical medicine*. 1977;89(3):640-4.
16. Lin FK, Suggs S, Lin CH, Browne JK, Smalling R, Egrie JC, et al. Cloning and expression of the human erythropoietin gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1985;82(22):7580-4.

17. Winearls CG, Oliver DO, Pippard MJ, Reid C, Downing MR, Cotes PM. Effect of human erythropoietin derived from recombinant DNA on the anaemia of patients maintained by chronic haemodialysis. *Lancet* (London, England). 1986;2(8517):1175-8.
18. Kalantar-Zadeh K, Ajon. History of erythropoiesis-stimulating agents, the development of biosimilars, and the future of anemia treatment in nephrology. 2017;45(3):235-47.
19. D'Andrea AD, Zon LI. Erythropoietin receptor. Subunit structure and activation. *The Journal of clinical investigation*. 1990;86(3):681-7.
20. Storrer PL, Gaines Das RE. The International Standard for Recombinant DNA-derived Erythropoietin: collaborative study of four recombinant DNA-derived erythropoietins and two highly purified human urinary erythropoietins. *The Journal of endocrinology*. 1992;134(3):459-84.
21. WHO Expert Committee on Biological Standardization. World Health Organization technical report series. 2003;910:1-104, back cover.
22. Sakanaka M, Wen TC, Matsuda S, Masuda S, Morishita E, Nagao M, et al. In vivo evidence that erythropoietin protects neurons from ischemic damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998;95(8):4635-40.
23. Calvillo L, Latini R, Kajstura J, Leri A, Anversa P, Ghezzi P, et al. Recombinant human erythropoietin protects the myocardium from ischemia-reperfusion injury and promotes beneficial remodeling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(8):4802-6.
24. Lai PH, Everett R, Wang FF, Arakawa T, Goldwasser E. Structural characterization of human erythropoietin. *The Journal of biological chemistry*. 1986;261(7):3116-21.
25. Skibeli V, Nissen-Lie G, Torjesen P. Sugar profiling proves that human serum erythropoietin differs from recombinant human erythropoietin. *Blood*. 2001;98(13):3626-34.
26. Jelkmann W. Regulation of erythropoietin production. *The Journal of physiology*. 2011;589(Pt 6):1251-8.
27. Rossert J, Eckardt KU. Erythropoietin receptors: their role beyond erythropoiesis. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 2005;20(6):1025-8.
28. Nelson DL, Lehninger AL, Cox MM. *Lehninger principles of biochemistry*: Macmillan; 2008. 433 p.
29. Gross AW, Lodish HF. Cellular trafficking and degradation of erythropoietin and novel erythropoiesis stimulating protein (NESP). *The Journal of biological chemistry*. 2006;281(4):2024-32.
30. Ghezzi P, Bernaudin M, Bianchi R, Blomgren K, Brines M, Campana W, et al. Erythropoietin: not just about erythropoiesis. *Lancet* (London, England). 2010;375(9732):2142.

31. Sterin-Borda L, Barcelo AC, Bozzini CE. Erythropoietin improves cardiac contractility in post-hypoxic mice. *Br J Haematol.* 2003;121(1):180-6.
32. Ledbetter DJ, Juul SE. Necrotizing enterocolitis and hematopoietic cytokines. *Clin Perinatol.* 2000;27(3):697-716.
33. Juul SE, Ledbetter DJ, Joyce AE, Dame C, Christensen RD, Zhao Y, et al. Erythropoietin acts as a trophic factor in neonatal rat intestine. *Gut.* 2001;49(2):182-9.
34. Yasuda Y, Masuda S, Chikuma M, Inoue K, Nagao M, Sasaki R. Estrogen-dependent production of erythropoietin in uterus and its implication in uterine angiogenesis. *The Journal of biological chemistry.* 1998;273(39):25381-7.
35. Masuda S, Kobayashi T, Chikuma M, Nagao M, Sasaki R. The oviduct produces erythropoietin in an estrogen- and oxygen-dependent manner. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2000;278(6):E1038-44.
36. Yasuda Y, Fujita Y, Musha T, Tanaka H, Shiokawa S, Nakamatsu K, et al. Expression of erythropoietin in human female reproductive organs. *Ital J Anat Embryol.* 2001;106(2 Suppl 2):215-22.
37. Fairchild Benyo D, Conrad KP. Expression of the erythropoietin receptor by trophoblast cells in the human placenta. *Biology of reproduction.* 1999;60(4):861-70.
38. Magnanti M, Gandini O, Giuliani L, Gazzaniga P, Marti HH, Gradilone A, et al. Erythropoietin expression in primary rat Sertoli and peritubular myoid cells. *Blood.* 2001;98(9):2872-4.
39. Liu T, Allaf ME, Lagoda G, Burnett AL. Erythropoietin receptor expression in the human urogenital tract: immunolocalization in the prostate, neurovascular bundle and penis. *BJU Int.* 2007;100(5):1103-6.
40. Allaf ME, Hoke A, Burnett AL. Erythropoietin promotes the recovery of erectile function following cavernous nerve injury. *J Urol.* 2005;174(5):2060-4.
41. Garcia P, Speidel V, Scheuer C, Laschke MW, Holstein JH, Histing T, et al. Low dose erythropoietin stimulates bone healing in mice. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society.* 2011;29(2):165-72.
42. Betsch M, Thelen S, Santak L, Herten M, Jungbluth P, Miersch D, et al. The role of erythropoietin and bone marrow concentrate in the treatment of osteochondral defects in mini-pigs. *PloS one.* 2014;9(3):e92766.
43. Li D, Deng L, Xie X, Yang Z, Kang P. Evaluation of the osteogenesis and angiogenesis effects of erythropoietin and the efficacy of deproteinized bovine bone/recombinant human erythropoietin scaffold on bone defect repair. *J Mater Sci Mater Med.* 2016;27(6):101.
44. Mihmanli A, Dolanmaz D, Avunduk MC, Erdemli E. Effects of recombinant human erythropoietin on mandibular distraction osteogenesis. *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons.* 2009;67(11):2337-43.

45. Hamed S, Egozi D, Kruchevsky D, Teot L, Gilhar A, Ullmann Y. Erythropoietin improves the survival of fat tissue after its transplantation in nude mice. *PloS one*. 2010;5(11):e13986.
46. Hong JP, Park SW. The combined effect of recombinant human epidermal growth factor and erythropoietin on full-thickness wound healing in diabetic rat model. *International wound journal*. 2014;11(4):373-8.
47. Hamed S, Bennett CL, Demiot C, Ullmann Y, Teot L, Desmouliere A. Erythropoietin, a novel repurposed drug: an innovative treatment for wound healing in patients with diabetes mellitus. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*. 2014;22(1):23-33.
48. Fenjves ES, Ochoa MS, Cabrera O, Mendez AJ, Kenyon NS, Inverardi L, et al. Human, nonhuman primate, and rat pancreatic islets express erythropoietin receptors. *Transplantation*. 2003;75(8):1356-60.
49. Tan CC, Eckardt KU, Firth JD, Ratcliffe PJ. Feedback modulation of renal and hepatic erythropoietin mRNA in response to graded anemia and hypoxia. *Am J Physiol*. 1992;263(3 Pt 2):F474-81.
50. Noguchi CT, Asavaritikrai P, Teng R, Jia Y. Role of erythropoietin in the brain. *Critical reviews in oncology/hematology*. 2007;64(2):159-71.
51. Digicaylioglu M, Bichet S, Marti HH, Wenger RH, Rivas LA, Bauer C, et al. Localization of specific erythropoietin binding sites in defined areas of the mouse brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1995;92(9):3717-20.
52. Juul SE, Yachnis AT, Rojiani AM, Christensen RD. Immunohistochemical localization of erythropoietin and its receptor in the developing human brain. *Pediatr Dev Pathol*. 1999;2(2):148-58.
53. Siren AL, Knerlich F, Poser W, Gleiter CH, Bruck W, Ehrenreich H. Erythropoietin and erythropoietin receptor in human ischemic/hypoxic brain. *Acta Neuropathol*. 2001;101(3):271-6.
54. Yu X, Shacka JJ, Eells JB, Suarez-Quian C, Przygodzki RM, Beleslin-Cokic B, et al. Erythropoietin receptor signalling is required for normal brain development. *Development (Cambridge, England)*. 2002;129(2):505-16.
55. Sugawa M, Sakurai Y, Ishikawa-Ieda Y, Suzuki H, Asou H. Effects of erythropoietin on glial cell development; oligodendrocyte maturation and astrocyte proliferation. *Neurosci Res*. 2002;44(4):391-403.
56. Brines M, Cerami A. Emerging biological roles for erythropoietin in the nervous system. *Nature reviews Neuroscience*. 2005;6(6):484-94.
57. Morishita E, Masuda S, Nagao M, Yasuda Y, Sasaki R. Erythropoietin receptor is expressed in rat hippocampal and cerebral cortical neurons, and erythropoietin prevents in vitro glutamate-induced neuronal death. *Neuroscience*. 1997;76(1):105-16.
58. Digicaylioglu M, Lipton SA. Erythropoietin-mediated neuroprotection involves cross-talk between Jak2 and NF-kappaB signalling cascades. *Nature*. 2001;412(6847):641-7.

59. Ruscher K, Freyer D, Karsch M, Isaev N, Megow D, Sawitzki B, et al. Erythropoietin is a paracrine mediator of ischemic tolerance in the brain: evidence from an in vitro model. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2002;22(23):10291-301.
60. Weber A, Maier RF, Hoffmann U, Grips M, Hoppenz M, Aktas AG, et al. Erythropoietin improves synaptic transmission during and following ischemia in rat hippocampal slice cultures. *Brain research*. 2002;958(2):305-11.
61. Sadamoto Y, Igase K, Sakanaka M, Sato K, Otsuka H, Sakaki S, et al. Erythropoietin prevents place navigation disability and cortical infarction in rats with permanent occlusion of the middle cerebral artery. *Biochemical and biophysical research communications*. 1998;253(1):26-32.
62. Brines ML, Ghezzi P, Keenan S, Agnello D, de Lanerolle NC, Cerami C, et al. Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000;97(19):10526-31.
63. Junk AK, Mammis A, Savitz SI, Singh M, Roth S, Malhotra S, et al. Erythropoietin administration protects retinal neurons from acute ischemia-reperfusion injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002;99(16):10659-64.
64. Suhs KW, Hein K, Sattler MB, Gorlitz A, Ciupka C, Scholz K, et al. A randomized, double-blind, phase 2 study of erythropoietin in optic neuritis. *Ann Neurol*. 2012;72(2):199-210.
65. Diem R, Molnar F, Beisse F, Gross N, Druschler K, Heinrich SP, et al. Treatment of optic neuritis with erythropoietin (TONE): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial-study protocol. *BMJ Open*. 2016;6(3):e010956.
66. 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(1):48-55.
67. Pakravan M, Esfandiari H, Sanjari N, Ghahari E. Erythropoietin as an adjunctive treatment for methanol-induced toxic optic neuropathy. *Am J Drug Alcohol Abuse*. 2016;42(6):633-9.
68. Zamani N, Hassanian-Moghaddam H, Shojaei M, Rahimian S. Evaluation of the effect of erythropoietin + corticosteroid versus corticosteroid alone in methanol-induced optic nerve neuropathy. *Cutan Ocul Toxicol*. 2018;37(2):186-90.
69. Gorio A, Gokmen N, Erbayraktar S, Yilmaz O, Madaschi L, Cichetti C, et al. Recombinant human erythropoietin counteracts secondary injury and markedly enhances neurological recovery from experimental spinal cord trauma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002;99(14):9450-5.
70. Sargin D, Friedrichs H, El-Kordi A, Ehrenreich H. Erythropoietin as neuroprotective and neuroregenerative treatment strategy: comprehensive overview of 12 years of preclinical and clinical research. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol*. 2010;24(4):573-94.

71. Ehrenreich H, Hasselblatt M, Dembowski C, Cepek L, Lewczuk P, Stiefel M, et al. Erythropoietin therapy for acute stroke is both safe and beneficial. *Molecular medicine (Cambridge, Mass)*. 2002;8(8):495-505.
72. Ehrenreich H, Weissenborn K, Prange H, Schneider D, Weimar C, Wartenberg K, et al. Recombinant human erythropoietin in the treatment of acute ischemic stroke. *Stroke*. 2009;40(12):e647-56.
73. Lv HY, Wu SJ, Wang QL, Yang LH, Ren PS, Qiao BJ, et al. Effect of erythropoietin combined with hypothermia on serum tau protein levels and neurodevelopmental outcome in neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy. *Neural Regen Res*. 2017;12(10):1655-63.
74. Acar U, Kucuk B, Sevinc MK, Aykas S, Erdurmus M, Sobaci G. Intravitreal erythropoietin injection in late-stage optic neuropathy: a safety study on human. *Int Ophthalmol*. 2018;38(3):1021-5.
75. Ehrenreich H, Degner D, Meller J, Brines M, Behe M, Hasselblatt M, et al. Erythropoietin: a candidate compound for neuroprotection in schizophrenia. *Mol Psychiatry*. 2004;9(1):42-54.
76. Ehrenreich H, Hinze-Selch D, Stawicki S, Aust C, Knolle-Veentjer S, Wilms S, et al. Improvement of cognitive functions in chronic schizophrenic patients by recombinant human erythropoietin. *Mol Psychiatry*. 2007;12(2):206-20.
77. Ma C, Cheng F, Wang X, Zhai C, Yue W, Lian Y, et al. Erythropoietin Pathway: A Potential Target for the Treatment of Depression. *Int J Mol Sci*. 2016;17(5).
78. Pang L, Bian M, Zang XX, Wu Y, Xu DH, Dong N, et al. Neuroprotective effects of erythropoietin in patients with carbon monoxide poisoning. *J Biochem Mol Toxicol*. 2013;27(5):266-71.
79. Monge Naldi A, Belfrage C, Jain N, Wei ET, Canto Martorell B, Gassmann M, et al. Neuronal erythropoietin overexpression protects mice against age-related hearing loss (presbycusis). *Neurobiol Aging*. 2015;36(12):3278-87.
80. Campana WM, Myers RR. Erythropoietin and erythropoietin receptors in the peripheral nervous system: changes after nerve injury. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2001;15(10):1804-6.
81. 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(4):254-65.
82. Lykissas MG, Sakellariou E, Vekris MD, Kontogeorgakos VA, Batistatou AK, Mitsionis GI, et al. Axonal regeneration stimulated by erythropoietin: an experimental study in rats. *J Neurosci Methods*. 2007;164(1):107-15.
83. Zhang W, Sun B, Yu Z, An J, Liu Q, Ren T. High dose erythropoietin promotes functional recovery of rats following facial nerve crush. *J Clin Neurosci*. 2009;16(4):554-6.
84. Geary MB, Li H, Zingman A, Ketz J, Zuscik M, De Mesy Bentley KL, et al. Erythropoietin accelerates functional recovery after moderate sciatic nerve crush injury. *Muscle Nerve*. 2017;56(1):143-51.

85. Zhang W, Sun B, Wang X, Liu J, Zhang Z, Geng S. Erythropoietin enhances survival of facial motor neurons by inhibiting expression of inducible nitric oxide synthase after axotomy. *J Clin Neurosci*. 2010;17(3):368-71.
86. Wang W, Li D, Li Q, Wang L, Bai G, Yang T, et al. Erythropoietin promotes peripheral nerve regeneration in rats by upregulating expression of insulin-like growth factor-1. *Archives of medical science : AMS*. 2015;11(2):433-7.
87. Bernstein DT, Weiner BK, Tasciotti E, Mathis KB. Does the combination of erythropoietin and tapered oral corticosteroids improve recovery following iatrogenic nerve injury? *Injury*. 2016;47(8):1819-23.
88. Yin ZS, Zhang H, Bo W, Gao W. Erythropoietin promotes functional recovery and enhances nerve regeneration after peripheral nerve injury in rats. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2010;31(3):509-15.
89. Sarica S, Altun I. The effects on peripheral nerve damage of the application of local and systemic erythropoietin. *Bratisl Lek Listy*. 2018;119(9):602-7.
90. Rotter R, Kuhn C, Stratos I, Beck M, Mittlmeier T, Vollmar B. Erythropoietin enhances the regeneration of traumatized tissue after combined muscle-nerve injury. *J Trauma Acute Care Surg*. 2012;72(6):1567-75.
91. Elfar JC, Jacobson JA, Puzas JE, Rosier RN, Zuscik MJ. Erythropoietin accelerates functional recovery after peripheral nerve injury. *The Journal of bone and joint surgery American volume*. 2008;90(8):1644-53.
92. Zhang W, Zhou G, Gao Y, Zhou Y, Liu J, Zhang L, et al. A sequential delivery system employing the synergism of EPO and NGF promotes sciatic nerve repair. *Colloids and surfaces B, Biointerfaces*. 2017;159:327-36.
93. Zhang W, Gao Y, Zhou Y, Liu J, Zhang L, Long A, et al. Localized and sustained delivery of erythropoietin from PLGA microspheres promotes functional recovery and nerve regeneration in peripheral nerve injury. *Biomed Res Int*. 2015;2015:478103.
94. Zhang W, Zhang L, Liu J, Zhang L, Zhang J, Tang P. Repairing sciatic nerve injury with an EPO-loaded nerve conduit and sandwiched-in strategy of transplanting mesenchymal stem cells. *Biomaterials*. 2017;142:90-100.
95. Noguchi T, Ohta S, Kakinoki R, Ikeguchi R, Kaizawa Y, Oda H, et al. The neuroprotective effect of erythropoietin on spinal motor neurons after nerve root avulsion injury in rats. *Restor Neurol Neurosci*. 2015;33(4):461-70.
96. Danigo A, Magy L, Richard L, Desmouliere A, Bourthoumieu S, Funalot B, et al. Neuroprotective effect of erythropoietin against pressure ulcer in a mouse model of small fiber neuropathy. *PloS one*. 2014;9(11):e113454.

97. Lohmeyer JA, Essmann E, Richerson SJ, Hagel C, Egana JT, Condurache A, et al. Use of Erythropoietin as adjuvant therapy in nerve reconstruction. *Langenbecks Arch Surg.* 2008;393(3):317-23.
98. Macdougall IC, Roberts DE, Coles GA, Williams JD. Clinical pharmacokinetics of epoetin (recombinant human erythropoietin). *Clinical pharmacokinetics.* 1991;20(2):99-113.
99. Bergel S. Über wirkungen des fibrins. *Dtsch Med Wochenschr.* 1909;35:633.
100. Young JZ, Medawar PB. Fibrin suture of peripheral nerves. *Lancet.* 1940;275:126-32.
101. Cronkite EP, Lozner EL, Deaver JM. Use of thrombin and fibrinogen in skin grafting: Preliminary report. *Journal of the American Medical Association.* 1944;124(14):976-8.
102. Spotnitz WD. Fibrin sealant: past, present, and future: a brief review. *World J Surg.* 2010;34(4):632-4.
103. Mintz PD, Mayers L, Avery N, Flanagan HL, Burks SG, Spotnitz WD. Fibrin sealant: clinical use and the development of the University of Virginia Tissue Adhesive Center. *Annals of clinical and laboratory science.* 2001;31(1):108-18.
104. Park MS, Cha CI. Biochemical aspects of autologous fibrin glue derived from ammonium sulfate precipitation. *The Laryngoscope.* 1993;103(2):193-6.
105. Stechison MT. Rapid polymerizing fibrin glue from autologous or single-donor blood: preparation and indications. *Journal of neurosurgery.* 1992;76(4):626-8.
106. Mankad PS, Codispoti M. The role of fibrin sealants in hemostasis. *American journal of surgery.* 2001;182(2 Suppl):21s-8s.
107. Hall JE. Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology 13th Edition: Elsevier Health Sciences; 2016.
108. Pipan CM, Glasheen WP, Matthew TL, Gonias SL, Hwang LJ, Jane JA, et al. Effects of antifibrinolytic agents on the life span of fibrin sealant. *The Journal of surgical research.* 1992;53(4):402-7.
109. Matthew TL, Spotnitz WD, Kron IL, Daniel TM, Tribble CG, Nolan SP. Four years' experience with fibrin sealant in thoracic and cardiovascular surgery. *The Annals of thoracic surgery.* 1990;50(1):40-3; discussion 3-4.
110. McCarthy PM. Fibrin glue in cardiothoracic surgery. *Transfusion medicine reviews.* 1993;7(3):173-9.
111. Milne AA, Murphy WG, Reading SJ, Ruckley CV. Fibrin sealant reduces suture line bleeding during carotid endarterectomy: a randomised trial. *European journal of vascular and endovascular surgery : the official journal of the European Society for Vascular Surgery.* 1995;10(1):91-4.
112. Ishitani MB, McGahren ED, Sibley DA, Spotnitz WD, Rodgers BM. Laparoscopically applied fibrin glue in experimental liver trauma. *Journal of pediatric surgery.* 1989;24(9):867-71.
113. Detweiler MB, Detweiler JG, Fenton J. Sutureless and reduced suture anastomosis of hollow vessels with fibrin glue: a review. *Journal of*

- investigative surgery : the official journal of the Academy of Surgical Research. 1999;12(5):245-62.
114. Reddy KS, Chittoria RK, Babu P, Marimuthu SK, Kumar SH, Subbarayan EK, et al. Effectiveness of Fibrin Glue in Adherence of Skin Graft. *Journal of cutaneous and aesthetic surgery*. 2017;10(2):72-5.
 115. Hart AM, Duggal C, Pinell-White X, Losken A. A Prospective Randomized Trial of the Efficacy of Fibrin Glue, Triamcinolone Acetonide, and Quilting Sutures in Seroma Prevention after Latissimus Dorsi Breast Reconstruction. *Plast Reconstr Surg*. 2017;139(4):854e-63e.
 116. Kamer FM, Nguyen DB. Experience with fibrin glue in rhytidectomy. *Plast Reconstr Surg*. 2007;120(4):1045-51; discussion 52.
 117. Romano V, Cruciani M, Conti L, Fontana L. Fibrin glue versus sutures for conjunctival autografting in primary pterygium surgery. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2016;12:CD011308.
 118. Bayfield MS, Spotnitz WD. Fibrin sealant in thoracic surgery. Pulmonary applications, including management of bronchopleural fistula. *Chest surgery clinics of North America*. 1996;6(3):567-83.
 119. Matar AF, Hill JG, Duncan W, Orfanakis N, Law I. Use of biological glue to control pulmonary air leaks. *Thorax*. 1990;45(9):670-4.
 120. Tholpady SS, Schlosser R, Spotnitz W, Ogle RC, Lindsey WH. Repair of an osseous facial critical-size defect using augmented fibrin sealant. *The Laryngoscope*. 1999;109(10):1585-8.
 121. Shaffrey CI, Spotnitz WD, Shaffrey ME, Jane JA. Neurosurgical applications of fibrin glue: augmentation of dural closure in 134 patients. *Neurosurgery*. 1990;26(2):207-10.
 122. Toma AG, Fisher EW, Cheesman AD. Autologous fibrin glue in the repair of dural defects in craniofacial resections. *The Journal of laryngology and otology*. 1992;106(4):356-7.
 123. Egloff DV, Narakas A. Nerve anastomoses with human fibrin. Preliminary clinical report (56 cases). *Annales de chirurgie de la main : organe officiel des sociétés de chirurgie de la main*. 1983;2(2):101-15.
 124. Cruz NI, Debs N, Fiol RE. Evaluation of fibrin glue in rat sciatic nerve repairs. *Plast Reconstr Surg*. 1986;78(3):369-73.
 125. Sames M, Blahos J, Jr., Rokyta R, Benes V, Jr. Comparison of microsurgical suture with fibrin glue connection of the sciatic nerve in rabbits. *Physiological research*. 1997;46(4):303-6.
 126. Herter T. Problems of fibrin adhesion of the nerves. *Neurosurgical review*. 1988;11(3-4):249-58.
 127. Martins RS, Siqueira MG, Da Silva CF, Plese JP. Overall assessment of regeneration in peripheral nerve lesion repair using fibrin glue, suture, or a combination of the 2 techniques in a rat model. Which is the ideal choice? *Surgical neurology*. 2005;64 Suppl 1:S1:10-6; discussion S1:6.
 128. Boedts D. A comparative experimental study on nerve repair. *Archives of oto-rhino-laryngology*. 1987;244(1):1-6.

129. Narakas A. The use of fibrin glue in repair of peripheral nerves. *The Orthopedic clinics of North America*. 1988;19(1):187-99.
130. Inaloz SS, Ak HE, Vayla V, Akin M, Aslan A, Sari I, et al. Comparison of microsuturing to the use of tissue adhesives in anastomosing sciatic nerve cuts in rats. *Neurosurgical review*. 1997;20(4):250-8.
131. Zilch H, Lambiris E. The sustained release of cefotaxim from a fibrin-cefotaxim compound in treatment of osteitis. Pharmacokinetic study and clinical results. *Archives of orthopaedic and traumatic surgery Archiv fur orthopadische und Unfall-Chirurgie*. 1986;106(1):36-41.
132. Spicer PP, Mikos AG. Fibrin glue as a drug delivery system. *J Control Release*. 2010;148(1):49-55.
133. Ahmad E, Fatima MT, Hoque M, Owais M, Saleemuddin M. Fibrin matrices: The versatile therapeutic delivery systems. *Int J Biol Macromol*. 2015;81:121-36.
134. Kitajiri S, Tabuchi K, Hiraumi H, Kaetsu H. Relief of post-tonsillectomy pain by release of lidocaine from fibrin glue. *The Laryngoscope*. 2001;111(4 Pt 1):642-4.
135. Fu JZ, Li J, Yu ZL. Effect of implanting fibrin sealant with ropivacaine on pain after laparoscopic cholecystectomy. *World journal of gastroenterology*. 2009;15(46):5851-4.
136. Lendeckel S, Jodicke A, Christophis P, Heidinger K, Wolff J, Fraser JK, et al. Autologous stem cells (adipose) and fibrin glue used to treat widespread traumatic calvarial defects: case report. *J Craniomaxillofac Surg*. 2004;32(6):370-3.
137. Stendel R, Scheurer L, Schlatterer K, Gminski R, Mohler H. Taurolidine-Fibrin-Sealant-Matrix using spray application for local treatment of brain tumors. *Anticancer research*. 2004;24(2b):631-8.
138. Opitz I, Erne BV, Demirbas S, Jetter A, Seifert B, Stahel R, et al. Optimized intrapleural cisplatin chemotherapy with a fibrin carrier after extrapleural pneumonectomy: a preclinical study. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2011;141(1):65-71.
139. Hafeli UO, Pauer GJ, Unnithan J, Prayson RA. Fibrin glue system for adjuvant brachytherapy of brain tumors with ¹⁸⁸Re and ¹⁸⁶Re-labeled microspheres. *Eur J Pharm Biopharm*. 2007;65(3):282-8.
140. Qi XR, Yan Y, Ma XD, Li TY, Nie XY, Yang BB. Development of a local vasodilator delivery system using fibrin glue to prevent arterial graft from spasm. *Journal of biomedical materials research Part A*. 2007;82(1):139-44.
141. Schillinger U, Wexel G, Hacker C, Kullmer M, Koch C, Gerg M, et al. A fibrin glue composition as carrier for nucleic acid vectors. *Pharm Res*. 2008;25(12):2946-62.
142. Nie SP, Wang X, Qiao SB, Zeng QT, Jiang JQ, Liu XQ, et al. Improved myocardial perfusion and cardiac function by controlled-release basic fibroblast growth factor using fibrin glue in a canine infarct model. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2010;11(12):895-904.

143. Singh K, Moyer H, Williams JK, Schwartz Z, Boyan BD. Fibrin glue: a scaffold for cellular-based therapy in a critical-sized defect. *Ann Plast Surg.* 2011;66(3):301-5.
144. Ozaki S, Saito A, Nakaminami H, Ono M, Noguchi N, Motomura N. Comprehensive evaluation of fibrin glue as a local drug-delivery system-efficacy and safety of sustained release of vancomycin by fibrin glue against local methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *J Artif Organs.* 2014;17(1):42-9.
145. Cashman JD, Jackson JK, Mugabe C, Gilchrist S, Ball K, Tredwell S, et al. The use of tissue sealants to deliver antibiotics to an orthopaedic surgical site with a titanium implant. *J Orthop Sci.* 2013;18(1):165-74.
146. Greco F, de Palma L, Spagnolo N, Rossi A, Specchia N, Gigante A. Fibrin-antibiotic mixtures: an in vitro study assessing the possibility of using a biologic carrier for local drug delivery. *Journal of biomedical materials research.* 1991;25(1):39-51.
147. Bergeron MG, Robert J, Beauchamp D. Pharmacodynamics of antibiotics in fibrin clots. *The Journal of antimicrobial chemotherapy.* 1993;31 Suppl D:113-36.
148. Fujioka-Kobayashi M, Mottini M, Kobayashi E, Zhang Y, Schaller B, Miron RJ. An in vitro study of fibrin sealant as a carrier system for recombinant human bone morphogenetic protein (rhBMP)-9 for bone tissue engineering. *J Craniomaxillofac Surg.* 2017;45(1):27-32.
149. Thorne CH. *Grabb and Smith's Plastic Surgery*: Lippincott Williams & Wilkins; 2013.
150. Gartner LP. *Textbook of Histology, International Edition*: Elsevier Health Sciences; 2015.
151. Seddon HJ. Three types of nerve injury. *Brain.* 1943;66(4):237-88.
152. Carroll SL, Worley SH. *Wallerian Degeneration. Reference Module in Neuroscience and Biobehavioral Psychology*: Elsevier; 2017.
153. Geuna S, Raimondo S, Ronchi G, Di Scipio F, Tos P, Czaja K, et al. Chapter 3: Histology of the peripheral nerve and changes occurring during nerve regeneration. *International review of neurobiology.* 2009;87:27-46.
154. Sunderland S. *Nerves and Nerve Injuries*. 2nd ed. ed. Edinburgh: Churchill Livingstone; 1978.
155. Mackinnon SE. Double and multiple "crush" syndromes. Double and multiple entrapment neuropathies. *Hand Clin.* 1992;8(2):369-90.
156. Mackinnon SE. New directions in peripheral nerve surgery. *Ann Plast Surg.* 1989;22(3):257-73.
157. Seddon HJ, Medawar PB, Smith H. Rate of regeneration of peripheral nerves in man. *The Journal of physiology.* 1943;102(2):191-215.
158. Gurtner GC, Neligan PC, Liu DZ. *Plastic Surgery: Volume 1 Principles*. London: Elsevier Health Sciences; 2018.
159. Slutsky DJ. The management of digital nerve injuries. *The Journal of hand surgery.* 2014;39(6):1208-15.

160. Dahlin LB. Techniques of peripheral nerve repair. *Scandinavian journal of surgery : SJS : official organ for the Finnish Surgical Society and the Scandinavian Surgical Society*. 2008;97(4):310-6.
161. Purves D, Lichtman JW. Formation and maintenance of synaptic connections in autonomic ganglia. *Physiological reviews*. 1978;58(4):821-62.
162. Fu SY, Gordon T. The cellular and molecular basis of peripheral nerve regeneration. *Molecular neurobiology*. 1997;14(1-2):67-116.
163. Fawcett JW, Keynes RJ. Peripheral nerve regeneration. *Annual review of neuroscience*. 1990;13:43-60.
164. Son YJ, Thompson WJ. Schwann cell processes guide regeneration of peripheral axons. *Neuron*. 1995;14(1):125-32.
165. Kang H, Tian L, Thompson W. Terminal Schwann cells guide the reinnervation of muscle after nerve injury. *Journal of neurocytology*. 2003;32(5-8):975-85.
166. Flores AJ, Lavernia CJ, Owens PW. Anatomy and physiology of peripheral nerve injury and repair. *American journal of orthopedics (Belle Mead, NJ)*. 2000;29(3):167-73.
167. Morris JH, Hudson AR, Weddell G. A study of degeneration and regeneration in the divided rat sciatic nerve based on electron microscopy. II. The development of the "regenerating unit". *Zeitschrift fur Zellforschung und mikroskopische Anatomie (Vienna, Austria : 1948)*. 1972;124(1):103-30.
168. Lundborg G. *Nerve Injury and Repair*. Philadelphia, PA.: Elsevier; 2004.
169. Gao C, Ma S, Ji Y, Wang JE, Li J. Siatic nerve regeneration in rats stimulated by fibrin glue containing nerve growth factor: an experimental study. *Injury*. 2008;39(12):1414-20.
170. Reichenberger MA, Mueller W, Hartmann J, Diehm Y, Lass U, Koellensperger E, et al. ADSCs in a fibrin matrix enhance nerve regeneration after epineural suturing in a rat model. *Microsurgery*. 2016;36(6):491-500.
171. de Medinaceli L, Freed WJ, Wyatt RJ. An index of the functional condition of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks. *Experimental neurology*. 1982;77(3):634-43.
172. Carlton J, Goldberg N. Quantitating integrated muscle function following reinnervation. *Surg Forum*. 1986;37:611.
173. 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.
174. Brown CJ, Mackinnon SE, Evans PJ, Bain JR, Makino AP, Hunter DA, et al. Self-evaluation of walking-track measurement using a Sciatic Function Index. *Microsurgery*. 1989;10(3):226-35.
175. Ornelas L, Padilla L, Di Silvio M, Schalch P, Esperante S, Infante PL, et al. Fibrin glue: an alternative technique for nerve coaptation--Part I. Wave amplitude, conduction velocity, and plantar-length factors. *Journal of reconstructive microsurgery*. 2006;22(2):119-22.

176. Ornelas L, Padilla L, Di Silvio M, Schalch P, Esperante S, Infante RL, et al. Fibrin glue: an alternative technique for nerve coaptation--Part II. Nerve regeneration and histomorphometric assessment. *Journal of reconstructive microsurgery*. 2006;22(2):123-8.
177. Isaacs JE, McDaniel CO, Owen JR, Wayne JS. Comparative analysis of biomechanical performance of available "nerve glues". *The Journal of hand surgery*. 2008;33(6):893-9.
178. Goldberg SH, Jobin CM, Hayes AG, Gardner T, Rosenwasser MP, Strauch RJ. Biomechanics and histology of intact and repaired digital nerves: an in vitro study. *The Journal of hand surgery*. 2007;32(4):474-82.
179. Monte-Raso VV, Barbieri CH, Mazzer N, Yamasita AC, Barbieri G. Is the Sciatic Functional Index always reliable and reproducible? *J Neurosci Methods*. 2008;170(2):255-61.
180. Menovsky T, Beek JF. Laser, fibrin glue, or suture repair of peripheral nerves: a comparative functional, histological, and morphometric study in the rat sciatic nerve. *Journal of neurosurgery*. 2001;95(4):694-9.

10. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Ayhan Işık ERDAL

Doğum Tarihi: 06 Haziran 1989

Doğum Yeri: Kırşehir

Eğitim:

İlköğretim: Ankara Aydınlikevler İlköğretim Okulu (1995 – 2003)

Lise: Ankara Atatürk Lisesi (2003 – 2007)

Lisans: Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi (İngilizce Tıp) (2007 – 2013)

Tıpta Uzmanlık: Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Plastik Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı (2013 – 2019)

Yabancı Dil: İngilizce

Bilimsel Etkinlikler (aldığı burslar, ödüller, projeler, yayınlar):

- 1 Turhan O, Kibar E, Ekren E, Engin O, Ercan D, **Erdal AI**, ... & Bilir N (2014) Medication Adherence In Elderly: A University Hospital-Based And Descriptive Study. Nobel Medicus, 10(2), 31-38.
- 2 Sibar S, Findikcioglu K, **Erdal AI**, Barut I, Ozmen S (2016) Technical Aspects and Difficulties in the Management of Head and Neck Cutaneous Malignancies in Xeroderma Pigmentosum. Arch Plast Surg. 43(4):344-351.
- 3 Tatar S, Hurkal O, **Erdal A**, Findikcioglu K (2017) Clinical Analysis Of Facial Fractures: A Ten Years Study Of 300 Cases. Journal Of Experimental And Clinical Medicine, 33 (4)