

T. C.

163906

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ MERAM TIP FAKÜLTESİ

GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI

PROF. DR. ADİL KARTAL

ANABİLİM DALI BAŞKANI

**ERİTROPOETİNİN KEMOTERAPİ UYGULANAN
RATLARDA KOLON ANASTOMOZLARININ
İYİLEŞMESİNE ETKİSİ**

UZMANLIK TEZİ

DR. TEVFİK KÜÇÜKKARTALLAR

TEZ DANIŞMANI

PROF. DR. METİN BELVİRANLI

KONYA-2005

KISALTMALAR

GİS: Gastrointestinal sistem

DM: Diabetes mellitus

HT: Hipertansiyon

DNA: Deoksiribo nükleik asit

RNA: Ribo nükleik asit

EPO: Eritropoetin

TNF: Tümör nekroze edici faktör

FGF: Fibroblast büyüme faktörü

EGF: Epidermal büyüme faktörü

VEGF: Vasküler endodermal büyüme faktörü

TGF: Trombosit büyüme faktörü

PAF: Trombosit aktive edici faktör

PDGF: Trombosit derive edici faktör

IFN: İnterferon

IL: İnterlökin

GH: Büyüme hormonu

NSAİD: Nonsteroid antiinflamatuvar ilaçlar

EPO-R: Erythropoietin Receptor

rHuEpo: Recombinant Human Erythropoietin

HUVEC: Human Umbilical Vein Endothelial Cell

MMP: Matrix Metalloproteinase

JAK : Janus Kinase

CAM: Chorioallantoic Membran

ATP: Adenozin trifosfat

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ.....	4
2. GENEL BİLGİLER.....	9
2. 1. KOLON.....	9
2. 1. 1. Anatomi.....	9
2. 1. 2. Kolon Kanserleri.....	14
2. 2. 5- FLUOROURASİL.....	14
2. 3. NEOVASKÜLARİZASYON.....	15
2. 4. YARA İYİLEŞMESİ.....	17
2. 4. 1. Yara İyileşmesinin Prensipleri.....	17
2. 4. 2. Yara İyileşmesinde Sitokinler.....	21
2. 4. 3. Anastomoz Tekniği.....	23
2. 4. 4. Barsakta Anastomoz İyileşmesi.....	24
2. 4. 5. Anastomoz İyileşmesini Belirleyen Faktörler.....	28
2. 5. ERİTROPOETİN.....	31
2. 5. 1. Eritropoetinin Tarihçesi.....	31
2. 5. 2. Eritropoetinin Moleküler Yapısı.....	32
2. 5. 3. Eritropoetinin Sentezi.....	33
2. 5. 4. Eritropoetinin Etkileri.....	34
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	38
3. 1. CERRAHİ GİRİŞİMLER.....	38
3. 2. PATLAMA BASINCININ ÖLÇÜMÜ.....	41
3. 3. RATLARIN TARTILMASI.....	44
3. 4. RATLARDA HEMATOLOJİ ÖLÇÜMÜNÜN YAPILMASI.....	44

3. 5. ANASTOMOZ HATTINDA HİDROKSİPROLİN ÖLÇÜMÜ.....	44
3. 6. HİSTOPATOLOJİ DEĞERLENDİRMESİ.....	44
3. 7. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER.....	45
4. BULGULAR.....	46
5. TARTIŞMA	52
6. SONUÇ	56
7. KAYNAKLAR.....	60



1. GİRİŞ

Kolorektal hastalıklar günümüzde genel cerrahların çok sık karşılaştıkları hastalık gruplarındandır. Bazı durumlarda bu hastalıkların tedavisi esnasında rezektif işlemler ve anastomozlar uygulanır. Bu anastomozlar kolokolik olabileceği gibi ince barsakla kolon arasında da yapılabilir. Barsak anastomozu yapılmasına sebep olabilecek hastalıklar arasında alt gastrointestinal sistem kanamaları, her türlü travmaya bağlı olan intestinal yaralanmalar, mezenter iskemisine bağlı oluşan nekroz ve kolon tümörleri sayılabilir.

Kolon cerrahisi sonrası görülen problemlerin büyük bir çoğunluğunu anastomoz bölgesinde gelişen sorunlar oluşturmaktadır. Bu sorunların en önemlisi anastomozda kaçak oluşmasıdır. Ortaya çıkan sorunlar sıklıkla yara iyileşmesindeki yetersizlikten kaynaklanır. Gastrointestinal kanalda ve diğer dokulardaki yara iyileşmesi ile ilgili bilgilerin artmasına ve anastomozdaki iyileşmeyi etkileyen lokal ve sistemik faktörlerin daha iyi anlaşılabilir olmasına rağmen, morbidite ve mortalitesi yüksek olan anastomoz kaçağı halen sık görülen ciddi bir problemdir (1). Anastomoz bölgesinde yara iyileşmesinin komplikasyon oranı mide cerrahisinde % 2-5, kolon cerrahisinde % 10-30 olarak bildirilmiştir (2). Anastomoz kaçağına bağlı komplikasyonlar hastaların klinik muayeneyle % 2-8'inde görülürken, kontrast maddelerle yapılan radyolojik incelemelerde, hastaların % 50'sinde önemli klinik semptom ve bulgu vermeyen kaçakların görüldüğü tespit edilmiştir (3).

Yaralanma bir dizi nöropeptid cevabın oluşmasına neden olur. İlk olay vazomotor aktivite ve inflamasyonun başlamasıdır. Vazomotor tonüs dengeli bir şekilde kanlanma ve özellikle oksijen desteği sağlayarak enfeksiyonla mücadele, kollogenin depolanması ve angiogenesis gibi olayları düzenlemektedir. Araştırmalar doku hasarından sonra periferik sinir uçlarından salınan nöropeptidlerin sadece vazodilatasyonu ve inflamatuvar cevabı değil aynı

zamanda epitelyal, vasküler ve bağ dokusu hücrelerinin çoğalmasını uyarmak suretiyle de iyileşmeye katkıda bulunduğunu göstermektedir (4).

Yara iyileşmesinde doku-sinir sistemi etkileşiminde artma olduğu ve bu yolla tamir olayının düzenlenebildiği açıktır. Lokal kan akımı ve oksijenasyonu kontrol eden nörojenik mekanizmalar anjiogenezis, kollajen birikimi, bakteri temizliği ve epitelizeasyon gibi yollarla iyileşmenin hızını da kontrol etmektedir (4). Lokal olarak salınan nöropeptidlerin yara yerindeki periferel doku iskemisi ve nekrozuna karşı önemli rolleri olduğu bildirilmiştir (5) .

Yara iyileşmesi, doku rejenerasyonu ve inflamasyon, bir çok sitokinlerin rol oynadığı karmaşık olayları içermektedir. Hemostaz ile başlayıp, inflamatuvar cevapla devam eden, yaranın bir epitle örtülerek tekrar şekillendirildiği yara iyileşmesi olayı inflamasyon, fibroplazi ve olgunlaşma olmak üzere üç faza ayrılır (6) . Bu fazların her biri büyüme faktörleri ve nöropeptidler adı verilen ve biyolojik olarak aktif olan bu maddeler tarafından kontrol edilerek düzenlenir. Polipeptid yapısındaki bu büyüme faktörleri ve nöropeptidler, hücre yüzey reseptörlerine bağlanarak doku tamir olayını kontrol ederler. Yara iyileşmesi ya da doku tamir olayını kontrol edip düzenleyen bu büyüme faktörleri ve nöropeptidlerin etkinliği, miktarı, birbirleri ve hücrelerle olan ilişkileri oldukça çok sayıda ve farklı yollarla değiştirilebilmektedir. Bu sitokin paternine müdahale ile ideal düzeyde ve hızda bir yara iyileşmesi elde edilebilmesi için çalışılmaktadır.

GİS cerrahisinde yara iyileşmesinde suture materyalleri ve cerrahi metodların önemli bir rolü vardır. Ancak anastomoz iyileşmesinde bahsedilen faktörlerin yanında daha da önemli olarak lokal ve sistemik faktörlerin daha etkili olduğu bilinmektedir. Kolon cerrahisi sonrası görülen komplikasyonların bir çok nedeni vardır. Hastanın yaşı, operasyonun yeri ve tipi, ameliyatın acil veya elektif olduğu, profilaktik ve postoperatif antibiyotik kullanımı, ameliyat öncesi mekanik barsak temizliğinin yapılması, sistemik hastalıklar (DM, HT, böbrek yetmezliği, hiperkolesterolemi), hormonların ve büyüme faktörlerinin rolü,

immünomodülasyon gibi yöntemler, sigara kullanımı, beslenme bozuklukları, element eksiklikleri, infeksiyon, stres, ekibin ve ekipmanın yetersizliği ve yetersiz postoperatif bakım ünitelerini sayabiliriz.

Kolorektal kanserler rezeksiyon sonrası anastomozun uygulandığı hastalık gruplarından bir tanesidir. Bu kanserlerde cerrahi işlem sonrası yüksek rekürrens ve metastaz oranları görülmüştür. Bunun en önemli sebepleri rezeksiyondan sonra mikroskopik hastalık kalıntısının olması, operasyon sırasında dağılan tümör hücrelerinin olması veya fark edilmeyen metastatik hastalığın bulunmasıdır. Rezeksiyondan sonraki bu yüksek rekürrens oranları, dikkatleri cerrahiye yardımcı olarak ileri kemoterapi tekniklerini araştırmaya yöneltmiştir. Postoperatif kemoterapinin yaşayan kanser hücrelerine daha etkin olduğu, lokal rekürrensi azalttığı ve hastalıksız dönemi uzattığı bilinmektedir. Postoperatif kemoterapiyi erken cerrahi dönemde verdiğimizde etkinliği daha da artmaktadır. 5- Fluorourasil kolon kanserlerinin tedavisinde kullanılan en etkin ilaçtır (7). 5-Fluorourasil intravenöz, oral, lokal ve intraperitoneal olarak kullanılabilir. İntraperitoneal olarak verilen 5-Fluorourasil yüksek hepatik ve lokal konsantrasyonlara erişmektedir (8).

Çeşitli kemoterapi ajanlarının yara iyileşmesi üzerine olan olumsuz etkileri bilinmektedir (9,10). 5-Fluorurasil'in genel yan etkileri arasında GİS bozuklukları, kemik iliği depresyonu, anoreksi, bulantı, kusma, stomatit, özofajit, diyare, lökopeni, trombositopeni ve kollajen sentezini bozarak yara iyileşmesi üzerine negatif etki yapması sayılabilir. Ancak gastrointestinal sistemdeki yara iyileşmesi ile kutanöz yara iyileşmesi arasında farklılıklar mevcuttur. 5-Fluorourasil'in intraperitoneal kullanımının anastomoz iyileşmesi üzerine olan etkisini inceleyen çeşitli araştırmalar olmasına rağmen aralarında çelişkiler vardır (10, 11, 12). Genelde birçok çalışma sonrasında, kutanöz yara iyileşmesinde olduğu gibi, intraperitoneal 5-Fluorourasil'in kolon anastomozu iyileşmesinde de olumsuz etkileri olduğu sonucu ortaya

çıkıştır. Son zamanlarda adjuvan tedavide kullanılmaya başlanan intraperitoneal 5-Fluorourasil için daha çok klinik ve deneysel çalışmaya ihtiyaç vardır.

Eritropoetin genellikle kronik böbrek yetmezliği hastalarında eritropoezi artırıcı etkisi nedeni ile anemi tedavisinde kullanılmaktadır (188, 189, 190). Son zamanlarda eritropoetin eritropoezden başka multipotent olan stem hücrelerini de modüle ettiği ve anjiyogenezi artırdığı bulunmuştur (187, 188). Yapılan birçok çalışmada eritropoetin damar anastomozlarında anjiyogenezi ve reendotelizasyonu artırarak damar anastomozu ve greft güvenilirliğini artırdığı gösterilmiştir. Kalıcı veya reperfüze iskemik myokard dokusunda eritropoetin koruyucu etkisi yapılan birçok çalışmada ortaya çıkmıştır (193, 194). Ayrıca beyin ve sinir sisteminde, astrosit kültüründe düşük oksijen basıncında eritropoetin üretiminin arttığını gösteren birçok çalışma vardır (191, 192).

Eritropoetin farmakolojik özellikleri sayesinde, değişik mekanizmalarla yara iyileşmesini hızlandırdığını gösteren çalışmalar vardır. Biz bu deneysel çalışmada eritropoetin yara iyileşmesi üzerindeki olumlu etkisinin barsak anastomozlarının iyileşmesinde de görülüp görülmeyeceğini, ayrıca kolon anastomozları sonrası uygulanan kemoterapi ajanlarının anastomoz iyileşmesi üzerindeki etkilerinin eritropoetinden nasıl etkileneceğini ortaya koymayı amaçladık.

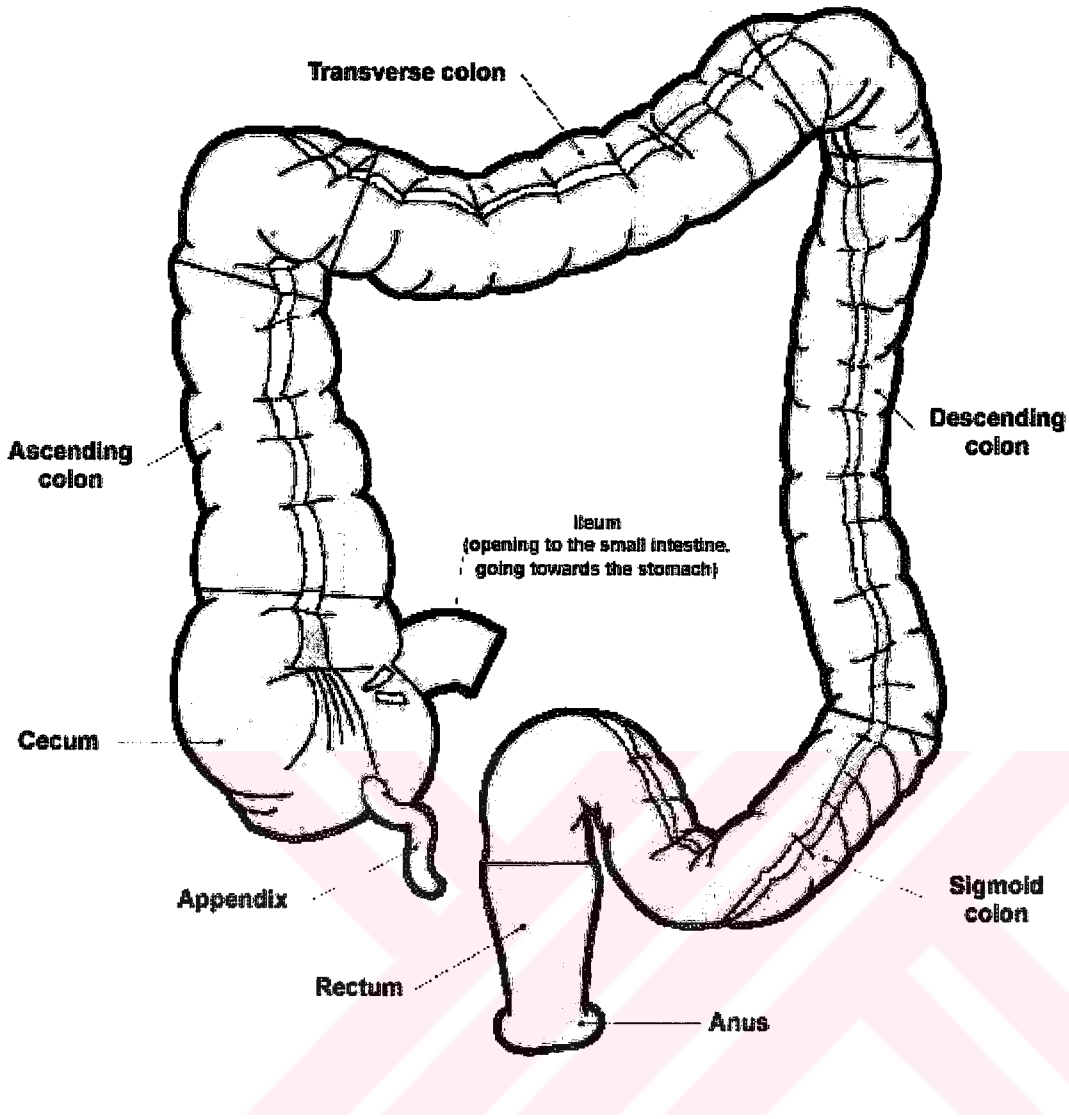
2. GENEL BİLGİLER

2. 1. KOLON

Kolon çekum, çıkan kolon (12-20 cm), hepatik fleksura, transvers kolon (45 cm), splenik fleksura, inen kolon (20-30 cm), sigmoid kolon (12-75 cm), rektum ve anal kanaldan oluşur. Kolonun uzunluğu bireyler arasında farklılık göstermekle birlikte ortalama 150 cm civarındadır. Kolonun temel işlevi suyun absorpsiyonu ve dışkının boşaltılmasıdır. Kolon vücutta en sık cerrahi müdahale gerektiren organlardan birisidir. Kolon hastalıklarının başarıyla tedavi edilebilmesi için anatomi, fizyoloji, histopatoloji ve mikrobiyolojisinin iyi bilinmesi gerekir (13).

2. 1. 1. ANATOMİ

Kalın barsak ileoçekal bileşkedен başlar ve at nalı şeklinde büyük bir kavis çizerek sol alt kadrana ulaşır ve pelvise girer. Kolon duvarı dört katmandan oluşur; mukoza, submukoza, muskularis ve serozadır. Muskuler tabaka içte sirküler, dışta longitudinal olarak uzanır. Longitudinal kas tabakası bir araya toplanarak taenia coli adı verilen şeritleri bir araya getirir. Bu yapılar apendiks radiksinden başlar ve rektosigmoid bölgeye kadar uzanır. Taeniaların kolonu kısaltması ile kese şeklinde oluşumlar olan haustralar meydana gelir. Bunlar longitudinal olarak hareket ederler (16). Kolonun kısımları çekum, çıkan kolon, hepatik fleksura, transvers kolon, splenik fleksura, inen kolon ve sigmoid kolondur (Şekil 1).



Şekil 1: Kolonun kısımları

Çekum: Kalın barsağın ilk parçasıdır ve sağ iliak fossada yer alır. Uzunluğu ortalama 6 cm, genişliği 7.5 cm'dir. Çekum tamamen periton ile örtülmüştür. Tenyalar çekumun arka yüzünün iç tarafında, apendiks vermiformisin yapıştığı yerden başlar. İleoçekal bileşke, çekumun posteromedialine açılan bir anatomik sfinkterdir. Üst ve alt iki dudaktan oluşan bu yapı çekumdan ileuma doğru sıvı materyal geçişine engel olur (17, 18, 19).

Çıkan Kolon ve Hepatik Fleksura: Çekumdan karaciğerin sağ lobunun alt yüzüne kadar uzanır. Burada birden sola ve biraz öne doğru bükülerek hepatic fleksurayı yapar.

Duodenum sağ böbrek ve sağ üreterle yakın komşuluğu vardır. Su absorpsiyonunun önemli bir bölümü burada gerçekleşir. Ön ve yan yüzleri periton ile örtülüdür (17, 18, 19).

Transvers Kolon: Hepatik fleksuradan başlar splenik fleksuraya kadar uzanır. 30-35 cm uzunluğundadır. Pankreas başından splenik fleksuraya kadar tamamen peritonla örtülmüştür. Transvers mezokolon ile karın arka duvarına tutunmuştur. Omentum majus transvers mezokolonla kaynaşarak kolonu önden örter (17, 18, 19).

Splenik Fleksura: Distal transvers kolon ile inen kolon arasındadır. Hepatik fleksuraya göre daha dar açılı ve daha superiordadır. Dalak ile komşudur. Frenokolik ve splenokolik ligamanlarla fiksedir.

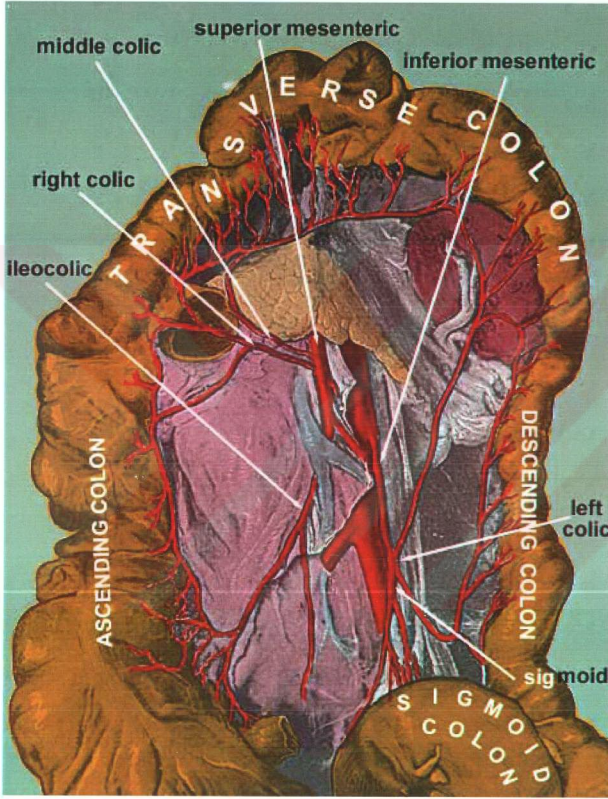
İnen Kolon: Splenik fleksuradan sol iliak fossaya kadar uzanır. Ortalama 25 cm uzunluğundadır. Sol üreterle yakın komşuluğu vardır. Yan ve ön yüzü peritonla örtülüdür. Arka yüzü gevşek bağ dokusuyla karın arka duvarına yapışıktır (17, 18, 19).

Sigmoid Kolon: Psoas majör kasının iç kenarından minör pelvis girişinde başlar, S çizerek üçüncü sakral vertebra hizasında rektumla uzanır. Ortalama 10-80 cm uzunluğundadır. Uzunluğu değişebilen bir mezo ile karın arka duvarına tutunmuştur. Sigmoid kolonun aşağı kısımlarında tenyalar incelmeye başlar ve rektuma yakın kısımda tamamen kaybolarak rektumu saran longitudinal kas tabakası ile uzanır (17, 18, 19).

Damarları: A. Mezenterika Superior ve A. Mezenterika Inferior besler (Şekil 2).

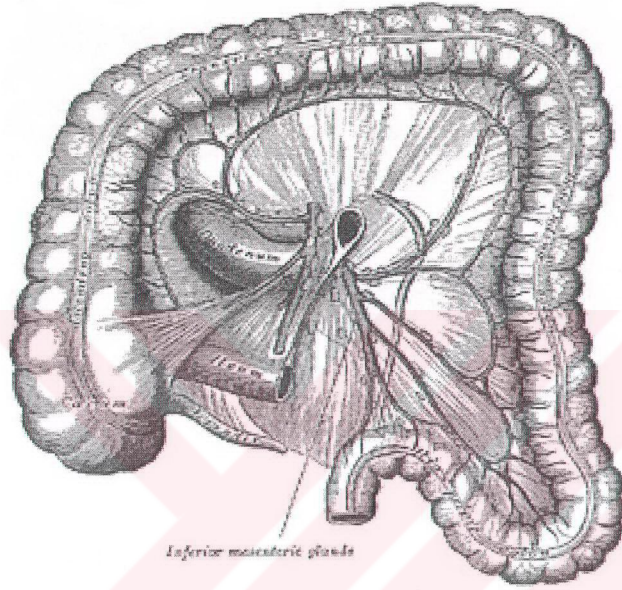
Kalın barsağın splenik fleksuraya kadar olan kısmını arteria mezenterika superior besler. Çekuma ileoçekal arterin çekal dalından, apendikse ramus apendiksten, çıkan kolona arteria kolika dekstradan, transvers kolonun 2/3 sağ tarafına arteria kolika mediadan gelir. Splenik fleksuradan sonraki kısmı ise arteria mezenterika inferiorun dalları besler. Splenik fleksura ve inen kolona arteria kolika sinistra, sigmoid kolona sigmoid arter, rektuma da superior rektal arter dallar verir. Rektum ve anal kanalı ayrıca arteria iliaka internanın dalı arteria rektalis media, arteria pudentalis internanın dalı arteria rektalis inferior ve abdominal

aortanın bifurkasyonundan çıkan arteria sakralis media besler. Kalın barsağın venleri genellikle arterlere komşu seyrederek ve aynı adla anılırlar. V. Mezenterika Superior ve V. Mezenterika Inferior'a dökülürler (18, 19, 20).



Şekil 2: Kalın barsağın kanlanması

Lenfatikleri: Kolonik lenf nodları arterlerin çevresinde ilerleyerek kolon duvarı dışındaki epikolik lenf nodlarına ulaşır. Lenfatik akım buradan kolon mezenteri radikisine doğru sırasıyla parakolik, ara lenf nodları ve ana lenf nodlarına doğru akar (Şekil 3) (17, 20).



Şekil 3: Kolon lenfatikleri

Sinirleri: Çekum, apendiks, çıkan kolon ve transvers kolonun 2/3 sağ tarafı sempatiklerini çöliak ve superior mezenterik pleksustan, parasempatiklerini N. Vagus'tan alır. Transvers kolonun 1/3 sol kısmı, inen kolon, sigmoid kolon, rektum ve anal kanalın üst kısımları sempatik sinirlerini sempatik trunkus lomber kısmından ve superior hipogastrik pleksustan, parasempatiklerini pelvik splanknik sinirlerden inferior hipogastrik pleksus vasıtasıyla alır (16, 20).

2. 1. 2. KOLON KANSERLERİ

Kolorektal kanserler batı dünyasında tüm kanserler içerisinde ikinci sıklıkta rastlanan kanserlerdir. Bu ülkelerde kanserden ölümlerin % 14'ü kolorektal kanserlerden oluşmaktadır (21,22). Kolorektal kanserlerin seyrinde cerrahideki ve teknik alandaki ilerlemelere ek olarak uygulanan etkili adjuvan tedavileri geliştirmek gereklidir (23). Kolorektal kanserlerin rekürrensının en sık olduğu yer karın boşluğudur (21). Bugün kolorektal kanserlerin tedavisinde kullanılan başlıca yöntemler cerrahi, kemoterapi, radyoterapi ve immunoterapidir (24, 25).

Kolorektal kanserli hastaların yarısı primer tümörün cerrahi rezeksiyonuyla iyileştirilebilir, geri kalan yarısı ise uzak metastazdan ölür (26, 27). Bu veriler kolorektal kanserlerin sistemik bir hastalık olduğunu gösterir (28). Cerrahi tekniklerdeki bütün gelişmelere rağmen kolon kanserli hastaların prognozunu düzeltmek için araştırmacılar çeşitli klinik durumlarda kemoterapinin yararları üzerine çalışmaktadır.

Kolorektal kanserlerde peritoneal yüzey ve kavite önemli bir nüks yeridir. İntraperitoneal nüksü önlemek için en iyi adjuvan tedavi intraperitoneal kemoterapi olacaktır (29). İntraperitoneal tedavide amaç sistemik dolaşımdaki ilaç dozunu toksik olmayan düzeyde tutarken periton boşluğundaki organ ve yüzeylerde kanserli bölgede direnç gelişmesini önleyecek kadar yüksek doza erişebilmektir (30).

2. 2. 5-FLUOROURASİL

Florlanmış bir pirimidin analogudur. Bazı tümörlerde hücrelerin, normal pirimidin bazı olan urasili normal vücut hücrelerine göre daha fazla kullanıldığının gözlenmesi üzerine sentez edilmiş bir ilaçtır. Vücutta aktif metaboliti olan fluorodezoksiridilata dönüştükten

sonra etkinlik kazanır ve timidilat sentetaz enzimini inhibe eder. Timidilat sentetaz azalınca, hücrede timin sentezi bozulmuş olur ve DNA sentezi duraklar. İkincil bir etki ile sitotoksik bir etki yapar (31, 32). Mide-barsak kanalından iyi absorbe edilir. Oral yolla kullanılabilir, ancak genelde intravenöz olarak kullanılır. Fluorourasil solid tümörlerin tedavisinde endikedir. Kolorektal, meme ve mide kanserlerinin tedavisinde kullanılır. Ayrıca diğer birçok malignitede de kullanım alanı vardır (31).

5-Fluorourasil'in başlıca yan etkileri gastrointestinal bozukluklar ve kemik iliği depresyonudur. Anoreksi, bulantı ve kusma en sık görülenlerdir. Stomatit, özofagofarenjit ve diyare doz kısıtlayıcı yan etkilerdir. Belirgin lökopeni yapabilir. Trombositopeni genellikle belirgin olmaz. Ayrıca kollajen sentezini bozarak yara iyileşmesi üzerine negatif etki yapar (32).

2. 3. NEOVASKÜLARİZASYON: Anjiogenez ve Vaskülojenez

Anjiogenez, yeni kan damarlarının önceden var olan kapiller damarlardan çoğalarak meydana gelmesi şeklinde tanımlanmıştır (33, 34, 35). Bu tanım ilk kez 1935 yılında Hertig tarafından yapılmıştır. Fizyolojik ve patolojik anjiogenezis hakkında ciddi çalışmalar ve tartışmalar 1970'li yıllarda, özellikle Folkman ve arkadaşlarının çalışmalarıyla hız kazanmıştır. Anjiogenezis oluşumunda önemli rolleri olan büyüme faktörlerinden aFGF, bFGF ve VEGF 1980'li yıllarda izole edilmiştir (36).

Vaskülojenez ise temel olarak embriyonal yaşamla sınırlandırılmıştır ve endotel hücrelerinin öncü hücreleri olan anjioblastların kan adacıklarına dönüşmesi ile vasküler yatağın oluşması anlamına gelir (37, 38). Vaskülojenezisin her ne kadar embriyonal yaşam evresinde meydana geldiği belirtilmiş olsa da son yıllarda yapılan çalışmalar postnatal

dönemde de gerek fizyolojik gerekse patolojik şartlarda bunun devam ettiğini göstermiştir (39). Postnatal yaşam sırasında vaskülojenenezisin oluşumunda rol alan dolaşımdaki endotel hücreleri kemik iliğinde bulunan ve kan dolaşımına giren endotel ana hücrelerinden oluşmaktadır. Bu endotel ana hücrelerinin vaskülojenenezis oluşumuna katıldıkları son yıllarda yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Bundan dolayı postnatal yaşamda yeni kan damarının sadece anjiogenezis ile değil aynı zamanda vaskülojenenezis ile de oluştuğu bildirilmiştir (39).

Anjiyojenenez oluşumu şu şekilde olmaktadır. İlk olarak anjiyojenenezise neden olan hipoksi ya da iskemi gibi bir stimulus oluşmakta daha sonra da bu etkenden dolayı anjiyogenik bir faktörün salınması ve ilgili faktör ya da faktörlerin matriks metalloproteinaz enzimi aracılığı ile bazal membranın parçalanmasına, endotel hücrelerinin aktivasyonuna, adezyonuna, migrasyonuna, proliferasyonuna, tüp oluşumuna neden olması ve sonuçta yeni kan damarının varolandan çoğalması şeklinde gerçekleşmektedir (40).

Anjiyojenenez son derece regüle, kısa peryotlarla seyreden, stimüle ve inhibe edilebilen bir işlevdir (41). Kapiller kan damarları endotel hücresi ve perisitten ibarettir. Bu iki hücre tipinin tüp formu bütün kapiller ağın tamamına ait genetik bilgileri taşırlar. Anjiyojenenezis olayında kapiller tüpün iç kısmını örten endotel hücreleri göçe uygun fenotipik özellik kazanarak etrafındaki dokuya yayılır, orada çoğalır, yeni tübüler yapı oluşturur ve böylece mevcut kapiller yatağı artırır (33, 37). Spesifik anjiyogenik moleküller bu sürece ön ayak olabilirler. Spesifik inhibitör moleküller de bu süreci durdurabilirler. Bu iki molekül birlikte fonksiyonların devamlı olarak ortaya çıkmasına engel olurlar. Birlikte hareket ederek neovasküler endotelial dönüşümün sürmesini sağlarlar (43, 44).

Anjiyojenenez stimüle eden birçok hormon ve büyüme faktörleri mevcuttur. Büyüme faktörlerinden vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) endotel hücreleri üzerinde güçlü mitojenik etkisi olan ve anjiyojenenez stimüle eden faktörlerin en başında yer almakta ve hipoksik ya da iskemik koşullardaki hücrelerden salınarak anjiyojenenezisi stimüle

edebilmektedir (37, 45, 46, 47). Endotel hücreleri için mitojenik olan diğer anjiyojenik faktörler arasında fibroblast büyüme faktörü (FGF) ve trombosit derive edici büyüme faktörü (PDGF) sayılabilir (48).

2. 4. YARA İYİLEŞMESİ

Doku bütünlüğünün bir travma sonucu bozulması, travma tipine bağlı olmaksızın, yara bölgesinin morfolojik ve fonksiyonel özelliklerinin yeniden kazanılmasını sağlayacak bir seri fizyolojik olayı başlatır (49). Travma, yara iyileşmesi ile sonuçlanacak birbiri ile organize, kompleks oluşturmuş bir çok hücresel ve biyokimyasal olayı tetikler. Dokularda meydana gelen yaraların iyileşme mekanizmaları bazı farklılıklar göstermesine rağmen, hepsinde ortak olan ve bilinen bazı özellikler mevcuttur. Yara iyileşmesi kavramı genellikle, vücudun bozulan bütünlüğünü kollajenden yapılmış bir nedbe yardımıyla yeniden sağladığı bir olay olarak kabul edilmektedir.

2. 4. 1. YARA İYİLEŞMESİNİN PRENSİPLERİ

Travmanın tetiklediği bir dizi hücresel ve biyokimyasal olay gerçekleşerek yara iyileşmesi tamamlanır. Yara iyileşmesi, birbirinden farklı fakat birbiriyle sıkı ilişkili üç ayrı faza ayrılır;

- A. Hemostaz ve İnflamasyon fazı
- B. Proliferasyon (fibroplazi) fazı
- C. Olgunlaşma ve Yeniden yapılanma fazı

Bu aşamalardan herhangi birinin bozulması veya uzaması yara iyileşmesinde gecikme veya yarada kapanmamaya neden olur.

A. HEMOSTAZ VE İNFLAMASYON:

Travma ve yabancı cisimlerle doku harabiyetine karşı bağışıklık yanıtı ile meydana gelen bir cevaptır. İnflamasyon harap olmuş dokunun yapısal ve fonksiyonel bütünlüğünün tamir ve yeniden kurulması için esastır. Travma ile birlikte damarlardaki endotel

bütünlüğünün bozulması, kan elemanlarının doku aralığına çıkmasına ve plateletlerin subendotelial kollajenle temasına neden olur. Buradaki Tip IV ve Tip V kollajen, trombositlerin agrege olmasına neden olur ve pıhtılaşma zincirinin intrinsek yolu aktive edilir. Trombositlerin kollajenle teması ve aynı zamanda trombin, fibronektin ve bunların ürünlerinin varlığı, trombositlerin α -granüllerinden, platelet-derived growth factor (PDGF), transforming growth factor- β (TGF- β), platelet activating factor (PAF), fibronektin ve serotonin gibi maddelerin salınmasına neden olur (49, 50). Faktör XII (fibrin stabilize eden faktör) eksikliği gibi yetersiz pıhtı oluşumunun meydana geldiği durumlarda, inflamatuvar alana yetersiz hücre adezyonu ve kemotaksizi olduğu ve buna sekonder doku iyileşmesinde problem olduğu gözlenmiştir (51). Platelet, pıhtılaşma faktörü 5 ve 10 arasındaki karşılıklı etkileşim protrombinazı aktive eder. Trombin sentezi ve bununla birlikte fibrinojenden fibrin yapımı başlar. Fibrin ağı ve plasmaya geçirgen olmayan bir pıhtı meydana getirir. Platelet agregasyonu ve pıhtılaşma esnasında açığa çıkan mediyatörler bir taraftan çevre kapillerlerin permeabilitesini etkilerken, diğer taraftan lökositleri aktive eder. Nötrofiller inflamasyon bölgesine gelir (49). Lokal olarak oluşan pıhtı; nötrofil, fibroblast, lenfositler ve endotel hücrelerinin bu bölgeye yerleşmesini sağlar (6).

Nötrofiller yara bölgesine ulaşan ilk hücrelerdir. İnflamasyon nedeniyle artan permeabilite ve prostaglandinlere ek olarak kompleman faktörleri, interlökin-1, tümör nekroz faktör- α (TNF- α), TGF- β , platelet faktör 4 ve bazı bakteri ürünleri gibi kemotaktik faktörler nötrofil göçünü uyarırlar (52, 53).

Hücreler yara bölgesine göç ettikten sonra burada aktive olurlar. Aktive olan hücreler yeni hücre yüzey antijeni kazanır, sitotoksiteleri artar, sitokin yapım ve salınımını artırır ya da diğer fenotipik değişikliklere uğrar. Yara iyileşmesine katkıda bulunan tüm hücreler aktive olur. İyileşmenin inflamasyon fazında nötrofil, makrofaj ve lenfositler hakimdir. Ancak iyileşmeye olan katkıları farklıdır. Bu hücreler içinde en kritik olanları makrofajlar ve lenfositlerdir (54, 55). Makrofajların aktivasyonu debridman, matriks sentezi ve anjiogenez gibi yara iyileşmesinin temel öğelerini yerine getirir .

Trombositlerden salınan faktörler makrofaj aktivasyonu için ilk ve güçlü bir uyarım sağlar. Fibronektin ve kollajen gibi bazı hücrel debrislerin fagositozu da makrofajların aktivasyonunu şiddetlendirir (55). Makrofajların yara iyileşmesindeki önemi, makrofaj sayısının arttırıldığı ya da azaltıldığı yara iyileşmesi modellerinde anlaşılmış ve bu hücrelerin yara iyileşmesinde mutlaka gerekli olduğu gösterilmiştir. Makrofajların aktivasyonu anjiogenez ve fibroplaziyi düzenleyen sitokinlerin salınmasını sağlar (56, 57, 58).

Makrofajların aktivasyonu ile antimikrobik özellik gibi, yara iyileşmesinin erken dönemlerinde olumlu bir çok etkileri bulunan nitrik oksit sentezlenerek salınır. Yara iyileşmesine katkıda bulunan endotel hücreleri, fibroblast, monosit ve lenfosit gibi bir çok hücre nitrik oksit üretebilmektedir. Yara iyileşmesi sürecinin erken dönemlerinde makrofaj aktivasyonu ile nitrik oksit sentezinin meydana geldiği, özellikle hipoksik durumlarda nitrik oksit sentezinin arttığı gösterilmiştir (59, 60).

Aktive olan makrofajlar sitokinler aracılığı ile başta lenfositler olmak üzere diğer hücreleri uyarır. Lenfositler de interferon (IFN) ve IL benzeri lenfokinler salgılar. Salınan IFN- γ makrofaj ve monositleri uyararak TNF- α ve IL-1 gibi bazı sitokinlerin salınmasını sağlar. Böylece devamlı ve karmaşık bir etkileşim zinciri başlar (6).

Yara iyileşmesi sırasında aktive olan hücrelerde belirgin fenotipik değişiklikler meydana gelir. Bu konuda üzerinde en çok çalışılan hücrelerden biri olan fibroblastlarda normalden daha fazla kollajen sentezi ve kontraksiyon izlenirken, proliferasyonun azaldığı tespit edilmiş ve bu özellikleri nedeniyle “yara fibroblastları” olarak isimlendirilmiştir (61).

Fibroblastlarda fenotipik değişikliklerin başlatılması büyük oranda makrofaj kaynaklı sitokinler aracılığıyla gerçekleşmektedir (62). Bu görüş TGF- β 1’in miyofibroblastik fenotipi güçlü bir şekilde uyardığını gösteren çalışmalarda açıkça ortaya konmuştur (63).

Sonuç olarak, yara iyileşmesinde immün sistemin belki de en çok rol oynadığı dönem olan inflamatuvar fazda; başta makrofaj, nötrofil ve lenfositler olmak üzere bir çok hücre hem sitokinler (TGF- β), hem de sitokin dışındaki yollarla yara iyileşmesini modüle etmektedir.

B. PROLİFERATİF FAZ:

Bu dönemde esas olarak çoğalan hücreler fibroblast ve endotel hücrelerdir. Travmayı takiben aktif platelet ve makrofajların salgıladıkları mediatörlerin etkisi ile çevre dokudan fibroblastların yara bölgesine gelmesi sağlanır (49). Fibroblastlar çevre dokulardan yara bölgesine göçerken, endotel hücreleri yaraya komşu venüllerden çoğalarak anjiogenez yolu ile yeni kapiller yapımını sağlar. Bu iki hücre tipinin çoğalmasından sorumlu olan büyüme faktörleri ve sitokinler büyük oranda plateletlerden ve aktive olmuş makrofajlardan sağlanır. Başlangıçta çevre dokularda bulunan fibroblastlar stabil ve nonreplikatif bir durumdadır. PDGF ve EGF gibi büyüme faktörleri fibroblast proliferasyonu, kemotaksisi ve aynı zamanda replikasyonu için güçlü uyarıcılardır (49) (Tablo 1).

Tablo 1: Plasma fibroblast mitojen ve gelişme faktörleri

Mitojen faktörler;

- Platelet kaynaklı büyüme faktörü (PDGF)
- Fibroblast büyüme faktörü (FGF)
- Kalsiyum fosfat

Gelişme faktörleri;

- Somatomedin
- Epidermal gelişme faktörü
- Diğer plasma faktörleri

C. OLGUNLAŞMA VE YENİDEN YAPILANMA FAZİ:

Bu fazın en önemli özelliği yarada kollajenin depolanmasıdır. Matriks birikiminin miktarı, hızı ve kalitesi oluşacak skarın dayanıklılığını belirlediğinden, klinik açıdan yara iyileşmesinin en önemli fazı olarak kabul edilmektedir. Klinik olarak bir çok iyileşme sorunları, altta yatan sebepler farklı olsa da, sonuçta yetersiz kollajen birikimi nedeniyle ortaya çıkmaktadır.

Fibroblastlar tarafından salgılanan kollajen heliks yapıda bir molekül olup, bir kısmının gen lokusları bilinen 13 tipi bulunur (49). İntestinal duvarda tip I, III ve IV bulunur. Kollajenin fizyolojik fonksiyonu, moleküllerin fibroblastlardan salgılandıktan sonra ekstrasellüler olarak bir araya gelebilmesi ve bu kollajen topluluklarının ortak yapısal özelliklerinin fonksiyonla doğru orantılı olması ile başılır. Askorbik asit, prolil ve lizil hidroksilazlar için zorunlu kofaktör olmakla beraber kollajen biyosentezini uyarır ve prokollajen mRNA'ların düzeyini artırır. Aynı şekilde TGF- β , insülin benzeri büyüme faktörü ve IL-1 kollajen sentezini artırırken TNF- α , interferon-gama ve steroidler kollajen sentezini inhibe ederler. Kollajenin sentez ve birikimi yanında skarın yapısal ve fonksiyonel olarak uygun şekli almasında rol oynayan önemli bir faktör de spesifik kollajenazlardır. Cerrahi insizyondan sonra kollajen sentez ve birikimine rağmen skar kollajen miktarının sabit olması, aynı anda süratli bir kollajen yıkımının bulunduğunu göstermektedir (49).

Fibroblastlar içerisinde kollajen, kollajenöz ve nonkollajenöz retikülün, elastin gibi intrasitoplazmik flamanlar halinde sentezlenir. İntrasellüler bölgeye salgılanan diğer maddeler genel olarak proteoglikanlar veya glikozaminoglikanlar olarak adlandırılan, hyalunorik asit,

kondroitin, heparan dermatan ve keratan sülfattan meydana gelen mukopolisakkaritler, proteinin polisakkaritler ve glikoproteinlerdir. Bu hücreler arası madde, bir veya daha fazla kovalen bağlanmış polisakkarit ihtiva eden proteinlerdir (49). Yaradaki matriks içeriği zaman içinde belli bir değişiklik gösterir. Başlangıçta, hemostaz sonucu oluşan ve makrofajlar tarafından yapılan fibrin ve fibronektinden zenginken (64), daha sonra glikozaminoglikan, proteoglikan yapısındaki diğer proteinler birikmeye başlar. Sonuçta kollajen, skardaki hakim protein olur. Kollajen yıkımı iyileşmenin erken dönemlerinde başlar ve özellikle inflamasyon fazında iyice hızlanır. Yaradaki kollajenaz kaynakları; inflamatuvar hücreler, endotel hücreleri, fibroblastlar ve keratinositlerdir (6). Kollajen, hücre dışında ve spesifik kollajenazlar tarafından parçalanır ve böylece diğer proteazlara molekülü daha duyarlı hale getirirler (65). Hücre yüzeyi proteoglikanları, hücre-matriks etkileşiminde önemlidir. Ekstrasellüler proteoglikanlar ise bazal membranın permeabilitesi ve dokunun dayanıklılığında rol oynar. Mukopolisakkaritler kollajen fibrillerin agregasyonu sürecinde çapını etkilerken, protein polisakkaritler ise elektrostatik bağlarla kollajen fibrilleri stabilize ederek kollajenin fiziksel özelliklerini etkileyip büyüklüğünü ayarlar (49).

Kollajenaz aktivitesi sitokinlerin sıkı kontrolü altındadır. TGF- β 1 gibi bir çok sitokin yaradaki matriks metabolizmasına sadece gen transkripsiyonu sağlayarak değil, aynı zamanda kollajenaz aktivitesini azaltarak da etki gösterir (66, 67). Yaradaki matriks birikimi, yeni yapım ile yıkım arasındaki denge ile belirlenir. Bu dengeyi sağlayan ana faktör hücrelerin bizzat kendisidir. Ayrıca matriks ile hücreler arasındaki ilişkiler de bu dengeye katkıda bulunurlar. Hücre ve matriks arasındaki ilişki kısmen integrinler aracılığıyla yürütülür. Integrin moleküllerinin kontrolü ise yarada bulunan TGF- β , PDGF ve TNF- α gibi bazı sitokinlerin denetimi altındadır (68, 69).

2. 4. 2. YARA İYİLEŞMESİNDE SİTOKİNLER

Büyüme faktörleri yara iyileşmesinin her 3 fazında da, hücrelerin büyüme, farklılaşma ve metabolizmasını kontrol eden polipeptid moleküllerdir. Yara sıvısında bir çok büyüme hormonu tespit edilmiştir (Tablo 2).

Tablo 2: Yara iyileşmesindeki büyüme faktörleri

Büyüme faktörü	Biyolojik etki
Platelet-derived growth faktör	Proliferasyonun uyarılması, kemotaksi, matriks sentezi
Epidermal growth faktör	Epitelizasyonun uyarılması, proliferasyon
Transforming growth faktör- α	Anjiogenezin uyarılması, epitelizasyon
Transforming growth faktör- β	Matriks sentezi, proliferasyon
Fibroblast growth faktör	Proliferasyonun uyarılması, anjiogenezis

Büyüme faktörleri çok düşük miktarlarda bulunmalarına rağmen yara iyileşmesinde güçlü bir lokal etki yaparlar (70). Hücre yüzeyindeki spesifik reseptörlere bağlanarak, hedef hücrede reseptör aracılı sinyal geçişi yapmak suretiyle özel bir görevin yerine getirilmesini sağlarlar (71). Büyüme faktörleri hücreyel çoğalma, kemotaksis, anjiogenez, protein yapımı ve enzim üretimi gibi bir çok olayı kontrol eder. Bu etkileri endokrin, parakrin ya da otokrin yollarla gerçekleştirirler (72).

Yaralanma sürecinin erken dönemlerinde proinflamatuvar sitokinler IL-1 ve TNF- α görülür. IL-1'in, α ve β olmak üzere iki formu bulunur ve aynı reseptöre bağlanıp aynı hücreyel cevabı uyarırlar. IL-1 fibroblastlardan kollajen sentezini artırır. Aynı zamanda, prostaglandin E2 gibi iyileşme sürecinin hemostaz ve angiogenezis süreçlerini etkileyen vazodilatör faktörlerin endotelial hücrelerden salınımını artırır.

TNF- α aktivitesi iyileşme sürecinin inflamasyon fazında ortaya çıkmakta ve üçüncü günde en yüksek değere ulaşmaktadır (73). Ana kaynakları makrofaj ve monositlerdir. TNF- α 'nın fibroblast kollajen sentezinde tek yönlü fonksiyonu yoktur. Fibroblastlardan kollajen sentezinde hem artırıcı hem azaltıcı etkisi mevcuttur (74). TNF- α , kollajenaz aktivitesini düşürürken, fibroblast proliferasyonu ve anjiogenezisi arttırmaktadır. Ancak daha önemli olanı TNF- α 'nın kollajen sentezinde antagonistik etki yapan hücreyel mediatörlerin salınımından sorumlu olmasıdır (75, 76).

Yara iyileşmesi sürecinin erken dönemlerinde, yara sıvısında yüksek düzeyde PDGF tespit edilir (77). PDGF, fibroblast ve epitelial hücreler de proliferasyon, kemotaksi ve matriks sentezinin artırılması gibi hücreyel fonksiyonlarda otokrin veya parakrin rol oynar.

Fibroblast büyüme faktörü (FGF), fibroblast, endotelial hücreler, düz kas hücreleri ve keratinositler üzerinde kemotaktik, mitojen, anjiyojen ve matriks sentezinin uyarılması gibi görevleri vardır (78). Platelet ve mezenkimal hücreler fibroblast büyüme faktörü için önemli kaynaklardır.

Epidermal büyüme faktörü (EGF), fibroblast replikasyonu, kollajen formasyonu ve re-epitelizasyonu artırır. Steroidler tarafından bozulmuş deneysel yara modellerinde ciddi olumlu etkileri tespit edilmiştir (79).

2. 4. 3. ANASTOMOZ TEKNİĞİ

Cerrahi operasyonların başarısında rol oynayan en önemli faktör uygun ve yeterli cerrahi tekniktir. İyi bir cerrahi teknik dokuları nazikçe kavrayabilmek, iyi ve keskin diseksiyon ve fazla doku nekrozuna izin vermeden yeterli hemostazı sağlamakla mümkündür.

Anastomoz için kullanılan sütürlerin çok sık ve sıkı olması sızıntıyı önleyebilir. Ancak bu dikişler yaranın biyolojik iyileşmesini ve kan akımını, doku beslenme ve oksijenasyonunu ters yönde etkileyeceğinden doku nekrozuna ve anastomozun açılmasına neden olur. Bu yüzden sütürler marjinden belli uzaklık ve aralıklarla geçilmeli ve invert edilen dokuyu strangüle etmeden güvenlice bağlanmalıdır (80).

Anastomozun mekanik etkenlere dayanıklılığı, ilk 4 gün için, konan dikişlerle sağlanır. Bu süre içinde anastomoz dudaklarında iltihap ve ödem görülür. Takip eden 4-14. günlerde iltihap azalır ve invert edilen dokular nekroze olur. Bu dönemde kas hücrelerinin ve fibroblastların proliferasyonu ve kollajen gittikçe artarak mekanik etkenlere karşı direnen dikişlerin yükünü üzerlerine alırlar (80).

Tek sıra ve çift sıra anastomozlar halen cerrahlar arasında bir anlaşmazlık konusudur. Ancak bu cerrahın tecrübesine ve tercihine bırakılmalıdır. Tek sıra Gambee dikişleri ile yapılan anastomozlarda anastomoz hattında oluşan hidroksiprolin, aynı zaman içinde çift sıra dikişle yapılan anastomolara göre anlamlı derecede fazla çıkmıştır. Uç uca anastomozlar tercih edilmelidir. Zira yan-yan ve uç-yan yapılan anastomozlarda oluşturulan kör looplar bakteri lokalizasyonuna yol açar, rezorpsiyon bozukluklarına neden olur.

2. 4. 4. BARSAKTA ANASTOMOZ İYİLEŞMESİ

Gastrointestinal sistem, günümüzde cerrahi müdahalelerin sıklıkla uygulandığı bölgelerdendir. Anastomotik iyileşmeyi etkileyen lokal ve sistemik faktörler ile ilgili bilgilerimiz, gastrointestinal sisteme yönelik bilgilerimizin zamanla artmasıyla beraber artmış ve daha iyi anlaşılabilir olmuştur. Buna rağmen, yetersiz iyileşmeye bağlı anastomoz kaçağı ve fistüller ya da iyileşmenin aşırı gitmesi sonucu darlık ve intestinal obstrüksiyon gibi sık karşılaşılan sorunlar halen yüksek morbidite ve mortalite ile beraberdir.

Barsak epitelini başta kolumnar hücreler (enterosit ve kolonositler) olmak üzere, goblet hücreleri, daha az oranda entero-endokrin ve Paneth hücreleri ve diğer küçük hücre grupları gibi değişik epitelyal hücre topluluklarından oluşur. Barsak mukozal yüzeyi, yaşam boyu devam eden hızlı bir döngüye sahiptir. Vücudun en hızlı hücre döngüsü, ince ve kalın barsak epitel yüzeyinde her 24-96 saatte bir gerçekleşir. Bir yandan epitel hücre yüzeyinin yapısal ve işlevsel bütünlüğü korunurken, diğer yandan da proliferasyon ve hücre kaybı arasında çok hassas bir dengenin oluşturulması gerekmektedir.

Gastrointestinal kanal histolojik olarak mukoza, submukoza, muskularis propria ve serozadan oluşan ve her biri farklı işlevleri olan hücre tiplerinin oluşturduğu 4 tabakadan oluşur. Submukoza tabakası, düzensiz, kaba ve birbirine gevşek bağlarla bağlı olan kollajen ve elastik liflerle beraber, submukozal sinir plexusu, kan ve lenfatik damarları içerir. En fazla bu tabakada kollajen bulunur ve barsağın yapısal bütünlüğünü sağlayan yerdir. Burada Tip I kollajen (% 68), Tip III kollajen (% 20) ve Tip V kollajen (% 12) bulunur ki bu içerik cilt kollajen içeriğinden oldukça farklıdır (81). Submukoza, gastrointestinal kanalın bütünlüğü ve gerilim kuvvetinin büyük bölümünden sorumlu olan, anastomozlarda barsak uçlarının bir araya gelmesini sağlayan sütürlerin dayanak noktasını oluşturan bir tabakadır. Bu gerçeğin öğrenilmesi, GİS cerrahisinde önemli gelişmelere neden olmuş ve günümüzde kullanılan değişik sütür ve stapler tekniklerinin temelini oluşturmuştur.

Gastrointestinal anastomozların mukozal komponenti, en az üç gün içinde, yaradaki granülasyon dokusunu çevreleyen epitelyal hücrelerin migrasyonu ve hiperplazi ile sağlanır. Böylece defekt kapatılarak luminal içerik ve defekt arasında bariyer oluşur. Mukozal inversiyon ve eversiyon bu oluşumu geciktirir (82).

Seroza tabakası, muskularis eksternayı çevreleyen ince bir konnektif doku içerir. Dış yüzeyi peritoneal kavitenin mezotelyal bir kılıfı ile çevrilidir. Düzgün bir seroza tabakası

anastomozdaki kaçağın minimize edilmesi için gereklidir ve bu da en iyi invert edici sütür tekniği kullanılarak başarılabilir (6). Özofagus ve alt 1/3 rektumda olduğu gibi, serozal yüzeyi bulunmayan GİS'in ekstrapéritoneal segmentlerinde, komplikasyon açısından daha yüksek risk vardır (83).

Barsak duvarının kesilmesi, başlangıçta vazokonstrüksiyona daha sonra sekonder vazodilatasyona ve başlıca kininlerin aracılığıyla damar geçirgenliğinde artmaya sebep olur. Bu olay ödem ve doku uçlarının şişmesiyle sonuçlanır. Bu nedenle sütürlerin şişen dokuyu strangüle etmesi sonucu iskemik doku nekrozu gelişebileceği düğüm atılırken akılda tutulmalıdır.

Anastomoz bölgesinde granülasyon dokusunun görülmesi yara iyileşmesi sürecinin proliferasyon fazında görülür. Bu aşamada intrapéritoneal anastomozlarda büyük omentum sütür hatlarını çevreleyerek ve ek granülasyon dokusu üreterek kritik bir rol oynar (84).

Üç-dört gün sonra yara bölgesinde kollajen yapımı ve birikimi belirginleşmeye başlar. Kollajen miktarındaki artışla birlikte anastomoz kuvvetinde de artış meydana gelir. Ancak uzun süre geçmesine rağmen anastomotik dayanıklılık, sağlam barsaktaki düzeye ulaşmaz.

Yakın zamanda yapılan çalışmalar, barsak epitelinin yeniden yapılanması ya da bütünlüğünün korunmasında rol oynayan bir çok mekanizmaların daha iyi anlaşılmasını sağlamıştır. Bu mekanizma ya da faktörler şunlardır:

1. Mukozada bulunan bir çok büyüme faktörleri, barsak epitel hücre proliferasyonunu modüle eder (85, 86).
2. Epitel ve lamina propria hücreleri tarafından üretilen bazal membran, lamina propria, matriks molekülleri barsak epitel hücre büyümesini düzenler (87).
3. Goblet hücreleri tarafından üretilen ve barsak lümenine salgılanan peptitlerin de epitel bütünlüğünün sağlanmasında önemli olduğu gösterilmiştir (88).

Peptid yapısındaki büyüme faktörlerinden TGF- α ve TGF- β 'nın, barsak epitel hücresinde bulunduğu ve epitel hücre büyümesinde önemli modülatörler olduğu gösterilmiştir. TGF- α barsak epitel hücre proliferasyonunu hızlandırırken, TGF- β inhibe eder. Ancak TGF- β yeniden yapılanmanın ilk basamağı olan epitel hücre göçünü hızlandırır. Barsak mukozasında bulunan diğer bir çok peptid ve sitokinler de epitel hücre göçünü düzenler. TGF- α dışında, EGF, IL-1 β ve IFN- γ 'nın epitelin yeniden yapılanmasını 2-5 kat hızlandığı ve hasarlanmış epitelden biyoaktif TGF- β 1 salınımını arttırdığı; oysa IL-6, TNF- α , PGDF ve endotoksin lipopolisakkaridin hücre migrasyonunda belirgin bir etkisi olmadığı gösterilmiştir. Ayrıca TGF- β monoklonal antikorlarla bloke edildiğinde TGF- α , EGF, IL-1 β

ve IFN- γ 'nın yeniden yapılanmayı hızlandırma özelliklerini tamamen kaybetmeleri, bu etkilerinin TGF- β üzerinden gerçekleştirdiklerini göstermiştir (86).

Barsakta hücre dışı matriks yapımından birincil olarak sorumlu olan hücre düz kas hücresidir ve işlevi, sitokin ya da büyüme faktörleri tarafından düzenlenmektedir. IL- β barsak düz kas hücre çoğalmasını uyarır ve bir taraftan kollajen sentezini artırırken diğer yandan kollajenaz yapımını artırır. TGF- β ise seçici olarak barsak düz kas hücrelerinden kollajen yapımını artırırken, çoğalmayı uyarmaz (89). Bu etkinin, barsak iyileşmesinde önemli katkısı olduğu kabul edilmektedir. Proinflamatuvar bir sitokin olan IL-1'in, tamir olayının erken dönemlerinde ortaya çıkarak; bir yandan düz kas hücre çoğalmasını uyarırken, diğer yandan kollajen yapımını arttırması ve aynı zamanda kollajenaz aktivitesini arttırması, muhtemelen yara bölgesine hücre göçünü kolaylaştırmaktadır (90, 91). Daha sonra TGF- β ortaya çıkarak, kollajen yapımı ve barsak bütünlüğünün sağlanması için, bölgeye göçen hücreleri seçici olarak uyarır (92, 93, 94).

İyileşme sürecinin bir çok komponenti, tüm doku tiplerinde aynı olmasına rağmen, genel olarak iyileşme sürecinde dokular arasında farklılık mevcuttur. Travmadan hemen sonraki başlangıç inflamatuvar cevabı, yeni kollajen birikimi ve skarın olgunlaşması gibi iyileşme olayının bir çok komponenti tüm dokularda ortak olarak meydana gelmektedir. Ancak, dokular arasında iyileşme olayının hızını ve sonucunu değiştirebilen birçok farklar da vardır (6). Bunlar;

1. Normal şartlarda gerilme kuvveti, cilt yaralarına göre barsakta çok daha hızlı kazanılmaktadır (95).
2. Gastrointestinal sistem yaralarında fibroblastlara ek olarak düz kas hücreleri de kollajen sentezlerken, bu durum ciltte görülmez (96).
3. Cilt ve barsak yarasındaki fibroblastlardan kollajen sentezi farklı mekanizmalarla düzenlenir (97).
4. Gastrointestinal kanalı diğer dokulardan yara iyileşmesi yönünden ayıran diğer faktörler barsağın çok katlı yapısı, lümenin aşırı mikroorganizma içermesi, sütür hattının örtülmesini sağlayan serozanın özelliği ve hipovolemik şokta perfüzyonunu kendiliğinden azaltan gastrointestinal kanala özel damarsal yapıdır.
5. Barsaktaki iyileşmeye mukoza, submukoza ve serozal katmanların katkısı da farklıdır (1).

Tablo 3'de yara iyileşmesinde etkili olan komponentler bakımından gastrointestinal kanal ile deri arasındaki farklar bildirilmiştir.

Tablo 3: İyileşme olayının komponentleri: Barsak ve derinin karşılaştırılması (1)

ara ortamı	Gastrointestinal kanal	Deri
H	Lokal ekzokrin salgılara bağlı olarak tüm GI kanalında farklıdır	Sepsis ya da lokal infeksiyon dışında çoğu zaman sabittir.
likro-rganizmalar	Özellikle kolon ve rektumda olmak üzere aerobik ve anaerobik. Peritoneal boşluğun kontaminasyon olasılığı mevcuttur.	Cilt kommensalları nadiren sorun oluştururlar. Enfeksiyon kontaminasyon ya da kan yoluyla olur.
erilme	Lümen içeriğinin geçişi ve peristaltizm anastomoz üzerinde ayrılma etkisi meydana getirir.	İskelet hareketleri sütür hattında strese neden olabilir, ağrı aşırı hareketleri engelleyen koruyucu bir mekanizmadır.
okuksijenasyonu	Sağlam damarlara ve yeni kapiller oluşumuna bağlıdır.	Oksijenin dolaşım ile taşınması ve diffüzyon ile olur.
Kollajen sentezi		
ücre Tipi	Fibroblast ve düz kas hücresi	Fibroblast
atirojenler	D-penisillaminin kollajen çapraz bağlantıları üzerine etkisi yoktur.	Çapraz bağlantıları belirgin bir şekilde engelleyerek yara gerilim gücünü azaltır.
teroidler	GI iyileşmeyi azaltır, anastomoz hattında abselere neden olabilir.	Kollajen akümüülasyonunda azalmaya neden olur.
ollajenazktivitesi	Rezeksiyon ve anastomozdan sonra tüm barsak kanalında artmaya başlar. Sepsis sırasında enzim aşırı artışı, dokunun sütür tutma kapasitesinin azalmasına ve sonuçta kaçaklara neden olur.	Cilt yaralarında çok önemli rolü yoktur.
ara Gerilim Gücü	Hızlı	GI dokuya göre daha yavaş

İyileşen sütür hattının gerilim kuvveti, nitelik ve niceliksel olarak tamir olayının düzeyini yansıtır. Postoperatif ilk günler boyunca anastomoz bölgesindeki kollajen miktarında belirgin bir azalma meydana gelir ve anastomozdaki gerilim kuvveti düşüktür (98). Erken dönemdeki bu kollajen azalmasından, tüm gastrointestinal sistem submukozasında bulunan kollajenaz enzimi sorumlu tutulur. Yine, yara bölgesine geçici olarak gelen nütrofillerden salınan proteazlar ve serbest oksijen radikallerinin, hücre dışı matriksinde değişiklik meydana getirerek gerilim kuvvetinde azalmaya neden olduğu ileri sürülmüştür (99).

Erken dönemde gerçekleşen bu kollajen degradasyonunu belirgin bir kollajen sentezi izler. Yeni oluşan kollajenin orijinal barsak duvarı sağlamlılığına ulaşabilmesi için aralarında köprüler oluşturması gereklidir. Matür kollajen, tek tek kollajen moleküllerinin intermoleküler lizin çapraz bağları ve disülfid bağlarını içeren kovalent bağlarla stabilizasyonu sonucu oluşmuş bir agregattır.

Kollajen sentezinin gerçekleşmesinin iyileşme olayları esnasında çok kritik bir rolü vardır. Bu sentezlenme işleminin regülasyonunda meydana gelecek bir bozukluk direkt olarak anastomoz kuvvetinde azalmaya ve sonuçta anastomozda ayrılmaya neden olabilir.

2. 4. 5. ANASTOMOZ İYİLEŞMESİNİ BELİRLEYEN FAKTÖRLER

Barsaktaki anastomoz iyileşmesini iyi ya da kötü yönde etkileyen bir çok lokal ve sistemik faktörler vardır (Tablo 4). Bu değişkenlerin sabit tutulamaması nedeniyle, barsaktaki iyileşme mekanizmaları ile ilgili bilgiler klinik çalışmalar yerine daha çok deneysel çalışmalarla elde edilmiştir.

Anastomoz bölgesindeki kan akımı iyileşme sürecinde kritik öneme sahip bir faktördür. Barsağın uygun cerrahi mobilizasyonu anastomozun perfüzyonu için çok büyük bir öneme sahiptir. Çünkü kaba veya fazla yapılan mobilizasyonla kritik damarların zedelenme ihtimali yüksektir (100). Bunun aksine yetersiz yapılacak mobilizasyon, anastomoz gerilimini arttırarak yetersiz perfüzyona ve ek olarak fazla inflamatuvar hücre infiltrasyonuna neden olacaktır (101). Hipovolemi gibi efektif sirkülatuvar volümün düştüğü durumlarda, vital organlara daha fazla perfüzyon amacı ile gastrointestinal sistemden çekilen volüm de anastomotik perfüzyonu belirgin bir şekilde düşürecek ve anastomozu tehlikeye sokacaktır. Kan hacmindeki % 10'luk bir azalma mezenterik kan akımında % 30 azalmaya neden olur

(102, 103). Kollajen sentezi sürecinde lizin ve prolinin hidroksilasyonu için yeterli ve uygun dağılmış oksijenizasyon gereklidir (104).

Tablo 4: Barsakta anastomoz iyileşmesini etkileyen lokal ve sistemik faktörler (105)

Lokal	Sistemik
Yeterli kan akımı	Beslenme durumu
Anastomozda gerginlik	Sepsis
Yara uçlarının sağlıklı olması	Hipovolemi
Cerrahi teknik	İlaçlar (steroid, NSAİİ, 5-FU gibi)
Bakteriyal kontaminasyon	İmmün supresyon
Distalde obstrüksiyon	Kan transfüzyonu
Radyasyon hasarı	Üremi
Barsak hazırlığı (temizliği)	Sarılık
Hipertermi, Dren	

Kan transfüzyonu sonrası immün cevapta baskılanma, tümör gelişiminde ve rekürens oranında artma olduğu tespit edilmiştir (106, 107). Kan transfüzyonlarının kolon iyileşmesini bozduğu ve intraperitoneal sepsis insidansını arttırdığı tespit edilmiştir (108, 109, 110). Cilt yaralarının iyileşmesinde lenfositlerin önemli düzenleyici rolleri mevcuttur. Kan transfüzyonlarının, lenfosit blastogenezini ve diğer immün hücrelerle olan ilişkisini bozduğu tespit edilmiştir (111).

Deneyimli cerrahlar tarafından yapılan operasyonlarda, öğrenme sürecinde olan cerrahlara oranla daha az yara komplikasyonu olduğu bilinmektedir. Everte edici anastomoz tekniğinin, invert ediciye oranla daha fazla kaçağa ve adezyon oluşumuna neden olduğu, stenoz ihtimalinin ise daha az olduğu tespit edilmiştir (112).

Gastrointestinal sistem ve jinekolojik malign tümörler için radyoterapinin kullanım sıklığındaki artış, doku viabilitesi ve iyileşme kapasitesinde bozukluk gibi istenmeyen etkileri beraberinde arttırmıştır. Tümör hücrelerinde obliterasyon yapmakla beraber, komşu dokularda istenmeyen akut ve kronik etkileri mevcuttur. Radyoterapinin barsak anastomozu iyileşmesi sürecinde ciddi problemler yarattığı ve spontan perforasyon riskinde artış meydana getirdiği bilinmektedir. Gastrointestinal sistem üzerinde uzun süreli etkileri; fibrozis, striktür oluşumu ve endarteritis obliterasyonuna ikincil iskemidir (113, 114).

Erken postoperatif dönemde gastrointestinal anastomozlarda, anastomoz hattında sütür kaldırma kuvvetinin belirgin bir şekilde azaldığı tespit edilmiştir. Bu kayıp iyileşme sürecinin ilk üç gününde kollajen sentezi ve yıkımı arasındaki dengeyi yansıtmaktadır (115, 116). Kollajen yıkım aktivitesinden primer olarak granülositler sorumludur ve kontaminasyon, fekal sızdırma ve doku nekrozu sayılarında belirgin yükselme olduğu tespit edilmiştir. İyileşme sürecinin ilk 24 saatinde kolona oranla ileumda daha az kollajenoliz görülür ve preoperatif kollajen düzeyi ileumda daha hızlı restore edilir. Bu nedenle ileumdaki anastomozda ayrılma ihtimali diğerlerine oranla daha düşüktür (117).

Klinik ve deneysel çalışmalarda, fekal yüklenmenin intestinal anastomoz bütünlüğü ve iyileşmesini bozduğu gösterilmiştir (118). Bu etkinin muhtemelen fekal kitlesinin, anastomozu gererek iyileşmenin erken safhasında zayıflamış yara kenar dokusundaki sütürü koparması nedeniyle olduğu düşünülmektedir. Yeterli kolon temizliğinin yapıldığı anastomozlarda, yetersiz kolon temizliği yapılan anastomozlara oranla anastomozda daha az ayrılmanın olduğunu bildiren bir çok yayın mevcuttur (6).

Deneysel modellerde, kortikosteroidlerin, özellikle inflamatuvar yanıtı etkileyerek, yara iyileşme sürecine olumsuz etki yaptığı gösterilmiştir (119). Klinik çalışmalarda tedavi dozlarındaki kortikosteroidlerin intestinal anastomozlar üzerindeki olumsuz etkisi gösterilmemiştir (120). Nonsteroid antiinflamatuvar ilaçların (NSAİD), kollajen üretimini artırarak anastomoz iyileşmesine olumlu etkisi bildirilmiştir (121). Sentetik prostoglandin E, analogu olan misoprostol'un anastomozun kollajen içeriğini arttırdığı gösterilmiştir (122). Benzalkonium chloride solüsyonunun lokal olarak barsak serozal yüzeyine tatbiki sonrası, myenterik plexus nöron sayısında belirgin azalma ile beraber intrinsek denervasyon meydana gelir ve epitelyal hücre proliferasyonunun bozulması ile beraber anastomoz iyileşmesi belirgin bir şekilde bozulur (123).

TGF- β trombosit alfa granüllerinin fizyolojik bir komponentidir ve iyileşme sürecinin erken dönemlerinde salgılanır (101). Fibroblast ve makrofajlar için kemotaktik etkisi ile beraber, fibroblast ve intestinal düz kaslardan kollajen sentezini artırır (123, 124). Deneysel hayvan modellerinde topikal uygulamanın intestinal anastomoz iyileşmesi üzerinde olumlu etkisi görülmüş ve steroid kullanımı ile ortaya çıkan olumsuz etkileri ortadan kaldırdığı tespit edilmiştir (125, 126).

Rekombinant growth hormonun (GH) intestinal yara iyileşmesi üzerinde olumlu etkisi tespit edilmiştir. GH ince barsakların temel yakıtı olan glutamin başta olmak üzere ileum ve

jejunumdan amino asit transportunu artırır. GH'nun ek olarak protein sentezini artırıcı etkisi vardır (127).

Hem lokal hem sistemik n trisy nun intestinal yara iyileşmesi üzerine etkileri vardır. Kısa zincirli yağ asitleri, kolonun doğal bakteriyel florası tarafından diyetteki liflerin fermentasyonu ile oluşturulur. Kolonda doğal bakteriyel flora asetat, propiyonat ve bütirat oluşturur. Kısa zincirli yağ asitleri epitelyal hücre proliferasyonunu uyarmakta ve bu hücrelere enerji kaynağı olmaktadır (128). Bu nedenle doğal bakteriyel floranı bozacak bir işlem mukozal iyileşmeyi bozmaktadır. Kısa zincirli yağ asitlerinin direkt intraluminal infüzyonu intestinal anastomoz iyileşmesini olumlu yönde etkilemektedir (129). N trisy nel durum ile yara iyileşmesi arasındaki ilişki, hem klinik hem deneysel hayvan modellerinde tespit edilmektedir. Uzun veya kısa süreli maln trisy n durumlarında anastomoz iyileşmesinin bozulduğu bilinmektedir (130). Maln trisy nda anastomoz iyile mesindeki bozukluk kollajen sentezi için yetersiz amino asit alımı ve immün durumun bozulmasına bağlanmaktadır.

Askorbik asitin intestinal düz kaslardan prokollajen üretmesi nedeni ile gastrointestinal yara iyileşmesinde önemli rolü vardır. Eksikliğinde, ekstraselüler alana prokollajen sekresyonunda ciddi problemler tespit edilmektedir (49, 131).

Anastomoz komplikasyonları ya la birlikte artmaktadır (5). Bu olumsuz etki ya la beraber sıklığı artan kardiovasküler, respiratuar yetmezlik, maln trisy n ve malignensi nedeniyle ortaya çıkmaktadır.

Intrabdominal sepsis varlığında fibrinop r lan eksudanın anastomoz alanını doldurduğu, burada fibroplazi ve anjiogenezi önlediği gösterilmiştir (132). Deneysel modellerde, intrabdominal sepsis varlığında, ilk 24 saat içinde kolonun yapısal proteinlerinde azalma olduğu, kollajenolizin arttığı bildirilmiştir (133). Sepsiste aynı zamanda anastomoz bölgesinde kollajen sentez kapasitesi belirgin bir şekilde d  m  t r (134).

2. 5. ER TROPOET N

2. 5. 1. ER TROPOET N N TAR H ES 

Eritropoetin hormonal rolünün anlaşılması 19. yüzyılın ikinci yarısında Güney Amerika'yı ziyaret eden Fransız bilim adamlarının başarılı çalışmalarına dayanır. Paul Bert ve arkadaşı Denis Jourdanet gazların fizyolojik etkilerinin, bunların kısmi basıncına bağlı

olduğunu ve bunların eritrosit üretimiyle doku hipoksisi arasında bağlantı kurduğunu göstermişlerdir (135, 136). And dağlarındaki dağcılarda görülen dağ hastalığının ve Jourdanet'in Paris'teki hastalarının acı çektiği aneminin semptomlarının her ikisinin de hipoksemiye bağlanabileceğini fark etmişlerdir. 1890'da Peru'ya yapılan bir ziyarette, Viault Lima'da deniz seviyesindeyken kendisinden kan örnekleri almış ve 1500 feet yükseklikteki Morococha'ya tırmandıktan sonra, eritrositlerin sayısında muazzam bir artış görmüştür (137). Yüzyıl önce, 1774'te Joseph Priestley kendisinin ünlü "çan şeklindeki kavanozda fare ve mum" deneyinde yaşam ve yanıp ışımayı desteklemek için oksijene ihtiyaç duyulduğunu göstermiştir. Daha sonra, 19. yüzyılın sonuna doğru, Louis Pasteur düşük oksijen basıncındaki karbonhidrat tüketiminde bir artış olduğunu göstermiştir. Bu geçmişe ve hormonların etkilerine gösterilen bu ilgiye karşın, Carnot ve Deflandre yayılan bir faktör olan hematopoetinin eritrositlerin üretiminden sorumlu olduklarını ve bunun kandaki konsantrasyonunun anemi ya da yüksek irtifada arttığını 1906'da varsaymışlardır (138). Hematopoetini akla getiren isim eritropoetin ismiyle 1948'de değiştirilmiştir (139).

2. 5. 2. ERİTROPOETİNİN MOLEKÜLER YAPISI

Eritropoetin 30.4 kilodaltonluk moleküler ağırlığa sahip bir glikoproteindir. Bu kitlenin % 39'u karbonhidratlardan oluşmaktadır. EPO geni 193 aminoasitten oluşan bir öncü proteindir. 27 aminoasitlik bir dizinin bölünmesi 24, 38, ve 83 aminoasit pozisyonunda bulunan üç aspargin artık maddesindeki N-bağlantılı glikolizasyona, ve 126 aminoasit pozisyonu olan serin artık maddedeki O-bağlantılı glikolizasyona maruz kalan olgun bir proteine yol açmaktadır (140, 141). 165 aminoasitin yayılan formunu oluşturmak için, muhtemelen hücre içi karboksipeptidaz tarafından, C-terminal arginin çıkarılmaktadır (142). EPO'nun üçüncü yapısı birbirine dokunan spiralleri olan dört antiparalel α -helikslerle tanımlanmaktadır. Bozulmamış tek moleküller hedef hücrelerin zarları üzerindeki iki EPO-

R'u birbirine bağlamakta ve hücre canlılığı, proliferasyon, ve farklılaşmayı düzenleyen hücre içi kaskadı ateşlemektedir (143).

2. 5. 3. ERİTROPOETİNİN SENTEZİ

EPO hipoksiye tepki olarak yetişkin böbreğinde ve cenin karaciğerinde üretilir. Jacobson ve arkadaşları bilateral nefrektomi sonrası hayvanlarda hipoksiye karşı EPO cevabının oluşmadığını göstermişlerdir (144). İzole perfüzyonla böbreklerde protein sentez inhibitörü olan puromisin ile EPO üretiminin durdurulması böbreğin EPO sentez alanı olduğunun kesin göstergesidir (145). EPO'nun hücrel üretim alanının identifikasyonunun ispatı oldukça tartışmalıdır. İn situ hibridizasyon kullanılarak EPO mRNA peritübüler endotelial kapiller hücrelerde bulunmuştur (146). Bu bulgular ışığında iki yıl sonra yapılan çalışmalar EPO'nun tübüler hücrelerden kaynaklandığını göstermiştir (147, 148). Yetişkinlerde dolaşımdaki EPO'nun yaklaşık %10'u karaciğerde üretilir ve karaciğerdeki EPO üretimi hepatositlerde sınırlıdır (149, 150). Karaciğerdeki EPO üretimi özellikle fetal büyümede büyük öneme sahiptir (151). EPO üretiminin karaciğerden böbreğe yönelmesi 30. gestasyon haftası civarında olmaktadır (152). İnsanlarda EPO geni 7. kromozomda lokalizedir (153). EPO tüm memelilerde yüksek oranda benzerlik gösterir (154). EPO üretimi DNA bağımlı mRNA sentezi ile oluşur. EPO üretimini kontrol eden oksijen düzey sistemi venözden çok arteriyel oksijen basıncındaki değişikliklerdir (145, 155). Böbrek EPO üretimi için mükemmel bir alandır. Çünkü glomeruler filtratta sodyum rezorpsiyonu oksijen tüketir ve direk olarak kan akımıyla ilişkilidir (156).

Piko molar konsantrasyonlardaki plazmada tek başına bulunan EPO her saniye için yaklaşık olarak 2.3 milyon hücre üretimini düzenlemektedir. EPO'yu izole etme işlemi 1977'de Chicago üniversitesindeki Goldwasser'in grubu tarafından gerçekleştirilmiştir (157). Bu önemli başarı EPO eksikliğinin yol açtığı anemisi olan hastaların tedavisi için rHuEpo

üretimini ve EPO geninin klonlanmasına giden yolu açmıştır (158, 159). Bu araştırma aynı zamanda EPO molekül yapısının ve bunun fonksiyon oranlarının keşfi için gerekli araçları sağlamıştır.

2. 5. 4. ERİTROPOETİNİN ETKİLERİ

İlk kez hematopoetik büyüme faktörü olarak tanımlanan eritropoetin eritroid prekürsör hücrelerinin proliferasyon ve diferansiyasyonunu regüle eden bir hematopoetik hormon olarak bilinmekteydi (160). Dolaşımdaki eritropoetin, eritrositlerin üretimini düzenleyerek doku oksijenizasyonunun kontrolünde rol aldığı ve kemik iliğinde eritrosit öncülü hücrelerin çoğalmasını ve eritroblastlara farklılaşmasını uyarmaktadır (161, 162).

Eritroid progenitör hücreler hem düşük hem de yüksek afiniteli EPO reseptörlerine sahiptir (163). Her hücrede yaklaşık 1200 EPO-R olduğu bildirilmiştir (164). Son yapılan araştırmalar EPO'nun eritroid kısımla sınırlı olmadığını göstermiştir. Son on yılda sayısız non-eritroid hücre üzerindeki EPO-R'lerin belirlenmesi EPO'nun biyolojik rolünde önemli bir revizyona yol açmıştır. EPO/EPO-R etkileşimlerinin bir dizi hücresel tepkiyi (mitojenler, kemotaksis, anjiyojen, hücre içi kalsiyumun mobilizasyonu, apoptozisin durdurulması da dahil) harekete geçirdiği belirtilmiştir (165).

Renal anemisi olan hastalarda EPO tedavisinin başlıca yan etkisi kan basıncındaki artıştır. Hipertansiyondan sorumlu mekanizma endotelial hücreler üzerindeki EPO'nun etkileri test edilerek incelenmiştir. Anagnostou ve arkadaşları göbek bağı endotelial hücrelerinde düşük çekiciliğe sahip (nM dizisindeki K_d) 27 000 EPO reseptörü bulmuşlardır (167). Tüpteki EPO hücre proliferasyonunu artırmakta, lipopolisakkarit ortamı apoptozu korumakta ve hücre taşınmasını çoğaltmaktadır (167, 168, 169). Aynı zamanda, EPO hücre içi Ca^{++} mobilizasyonunu, akciğer aort hücrelerindeki vasküler endotelial büyüme faktör reseptörlerinin düzenlenmesiyle ilişkili bir etkiyi ve fare mezenkimal hücrelerindeki

kasılmayı artırmaktadır. Ca^{++} mobilizasyonundaki bu artış JAK2/STAT5 yolunun önleyici maddesi olan genistein tarafından önlenmiştir (169, 170, 171).

EPO aynı zamanda kopyalama sayesinde endotelin1 üretimini güçlendirmekte ve indüksiyon trombin ve angiotensin gibi ET-1 üretiminin iki potansiyel uyarıcısı tarafından çoğaltılmaktadır (167, 172, 173). Fare aort halkalarını kullanarak, EPO'nun endotelini de kapsayan bir mekanizma tarafından anjiyojenleri harekete geçirdiği bulunmuştur (174).

Hematopoetik ve endotel hücreleri ortak hemanjiyoblast progenitör hücrelerden ortaya çıkmaktadır (175). Bu hipotez her iki hücre soyunun da CD 31 ve CD 34 benzeri yüzey antijenleri salgılamasına dayanmaktadır (175). Hematopoetik ve endotel hücrelerinin ortak hemanjiyoblast progenitörden meydana geldiği hipotezi VEGF olmayan farelerde hem hematopoetik hem de endotel hücrelerinde defekt olduğunun gösterilmesi ile desteklenmiştir (176, 177). Endotel ve hematopoetik hücrelerin ortak onkogenden olduğu hipotezini destekleyen bir çalışmada da hematopoetik faktör EPO'nun kültüre immortalize HUVECs'in proliferasyon ve migrasyonunu stimüle ettiği gösterilmiştir (178). EPO'nun anjiyojenik aktivitesi hem in vivo hem de in vitro rat aort modelinde gösterilmiştir (168). Hematopoetik endotelial hücreler aynı ortak atayı paylaştığı için, sitokinlerin ve genellikle hematopoezisle ilişkili büyüme faktörlerinin anjiyojenlerde de bir rolü olabileceğini beklemek mantıklıdır. Ribatti ve arkadaşları hematopoetik sistem için spesifik olduğu daha önceden düşünülen sitokinlerin endotelial hücrelerdeki, anjiyojenler de dahil, birkaç fonksiyonu etkilediğini göstermişlerdir. Bu çalışmada, eritroid hücrelerin canlı kalmasını, farklılaşmasını ve proliferasyonunu düzenleyen ana hormon olan eritropoetinin anjiyojen potansiyeli araştırılmıştır. Western blot analizi tarafından EPO reseptörlerinin insandaki EA hy926 endotelial hücre hattında bulunduğu tespit edilmiştir. Aynı zamanda, rHuEpo EA hy926'daki matriks metalloproteinaz-2 üretimi, hücre proliferasyonu, ve Janus Kinase-2 fosforilasyonunu harekete geçirmekte ve Matrigel'de tohumlandığında vasküler yapılara yönelik farklılığı

güçlendirmektedir. Canlı vücudunda, civciv embriyosunun koryoallantoyik zarında, rHuEpo tarafından etkili bir anjiyojenik yanıt başlatılmaktadır. Böylece, CAM vaskülatörün endotelial hücreleri, bir anti-EPOR antikoruna sahip EPOR'lar ortaya koymaktadır. CAM kan damarlarının rHuEpo'ya verdiği anjiyojenik tepki temel fibroblast büyüme faktörü olan prototipik anjiyojen sitokin tarafından ortaya çıkarılanla kıyaslanabilir durumda olduğu saptanmıştır. Bu, önemli bir mononükleer hücre infiltrasyonunun yokluğunda oluşmuştur ve ET-1 tedavisiyle benzerlik göstermiştir.

Bu veriler birlikte ele alındığında, tüp içinde ve canlı vücudunda anjiyojenik bir tepki oluşturma ve endotelial hücrelerle doğrudan etkileşime girme ve böylece gerçek bir direkt anjiyojenik faktör olarak hareket edebilme konusunda EPO'nun yeteneği görülmektedir (178).

Eritropoetin insan sütünde bulunmaktadır. Ancak eritropoetinin barsak gelişimindeki fizyolojisi bilinmemektedir (179, 180). Fetal hayat boyunca enterositler yutulan amniyotik sıvının içerdiği eritropoetine maruz kalır ve doğumdan sonra anne sütüyle beslenen bebekler anne sütündeki eritropoetini almaya devam eder (179, 180, 181, 182). Büyüme dönemindeki insan ve ratların intestinal villuslarında EPO reseptörlerinin (EPO-R) mevcut olduğu bilinmektedir (183, 184). Gelişmekte olan barsakta EPO'nun rolü, sistemik eritropoetik etki ve lokal etki olmak üzere iki şekilde olur. Yapılan iki çalışma EPO'nun sistemik uygulanmasının barsak üzerinde önemli etkiye sahip olduğu hipotezini desteklemektedir. Cerrahi anastomoz öncesi parenteral rEPO uygulanan ratlarda artmış yara iyileşmesi ve artmış anastomoz sağlamlığı görülür. Prematüre anemisi için rEPO verilmiş 1250 gr'ın altındaki yeni doğanlara yönelik yapılan retrospektif çalışmayla nekrotizan enterokolit insidansının daha düşük olduğu saptanmıştır (185). Yapılan bu çalışmalarla şu sonuçlara varılmıştır: 1. Enteral olarak verilen EPO neonatal ratların barsakları tarafından, ELISA testi ile tespit edilen bir formda, absorbe edilir. 2. Gelişmekte olan ince barsakta EPO'nun lokal etkisi rol oynar. 3. EPO'nun lokal etkisi uygulanış yoluna bağlı değildir.

rEPO'nun enteral verildiğinde ince barsak uzunluğundaki yaptığı etki parenteral verildiğindeki etkisinden daha fazladır. Her iki şekilde de verildiğinde barsak uzunluğunu ve villus yüzey alanını artırır. Bu etki en çok ileumda görülür (186). EPO'nun barsaklar üzerine olan bu etkisinin mekanizması tam bilinmemekle birlikte artmış hücre turnoveriyle ilgili olduğu düşünülmektedir (184).



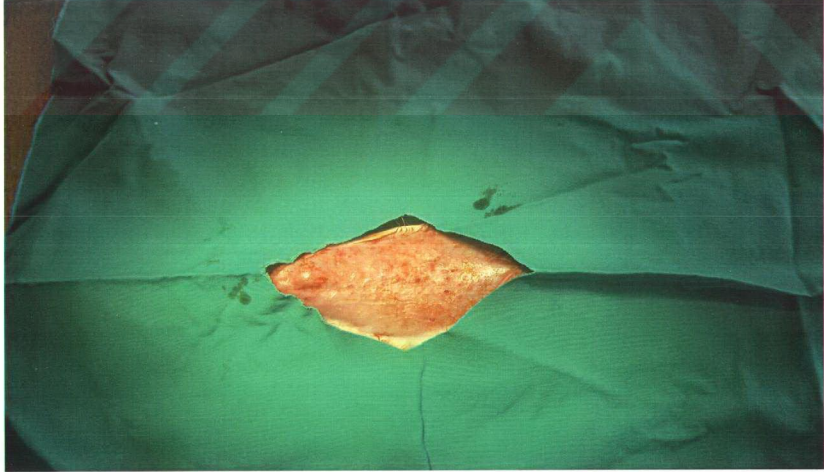
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışma Selçuk Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezi (SÜDAM) Etik Kurulu tarafından onaylanmış (2005/06) olup Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Biokimya ve Hematoloji Anabilim Dalı ve Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nın işbirliğiyle SÜDAM'da gerçekleştirildi.

Selçuk Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezi'nden temin edilen toplam 40 adet, ortalama 200-250 gr ağırlığında, 6-8 haftalık, sağlıklı Wistar tipi erkek rat ile çalışıldı. Ratlar + 25 °C'de ve 12 saat gündüz, 12 saat gece periyotlarıyla, standart rat yemi ve normal içme suları ile 15 gün beslendi ve tüm ratlar cerrahi girişimden 12 saat önce aç bırakıldı.

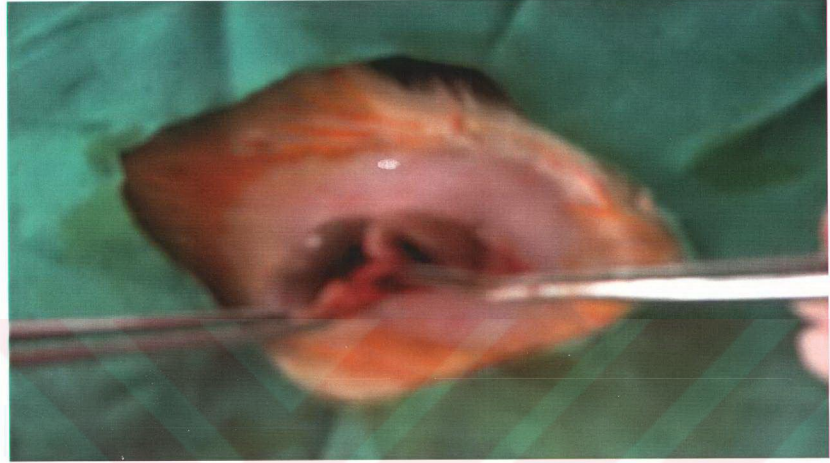
3. 1. CERRAHİ GİRİŞİMLER

Ratlardan operasyon öncesi hemoglobin, hemotokrit ve lökosit değerlerine bakılmak üzere inguinal bölgeden 2 cc kan alındı. Daha sonra ratlar tartılarak, intramüsküler 10 mg/kg ketamin hidroklorid (Ketalar flk 50 mg@Eczacıbaşı) ile anestezi uygulandı ve karın tüyleri tıraşlandıktan sonra supine pozisyonunda ameliyat masasına tespit edildi (Resim 1).



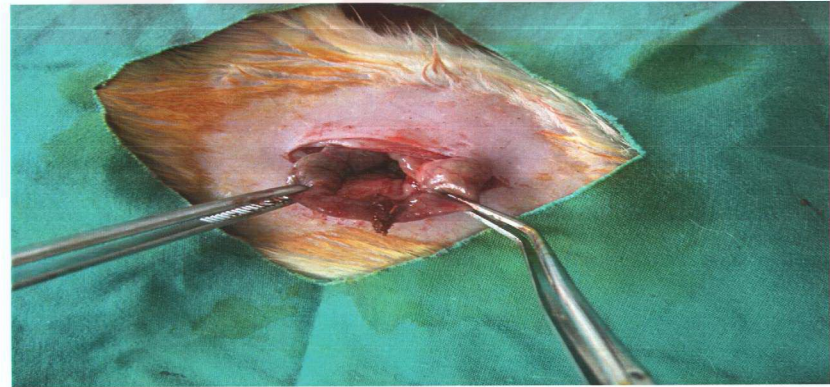
Resim 1: Ratların masaya tespit edilmesi

Cilt % 10'luk povidon-iodin solüsyonu ile temizlenerek tamamen steril koşullar altında ve orta hat kesisi ile laparotomi yapıldı. Sigmoid kolon anısı kanlanması bozulmaksızın kolon eksenine dik olacak şekilde tam kat kesildi (Resim 2).



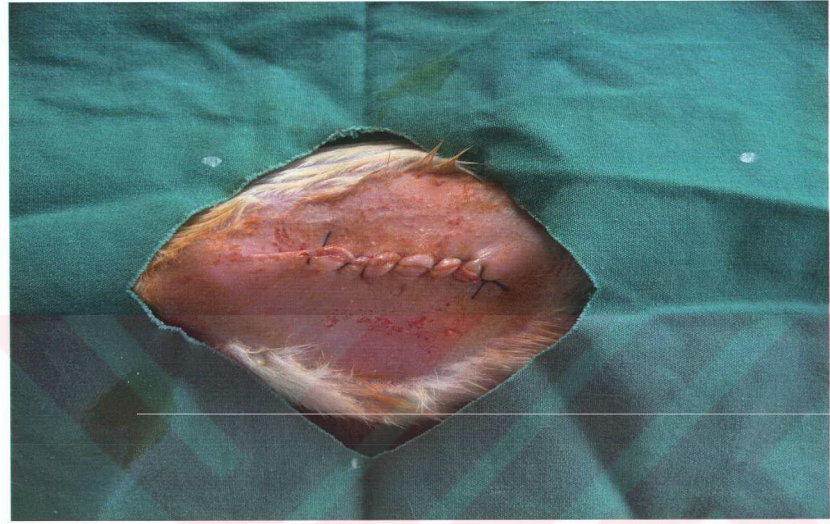
Resim 2: Kolonda anastomoz yapılacak uçlar

Daha sonra 6/0 prolene (Ethicon, UK.) ile, tek tabaka ve tek tek sütürlerle, uç uca kolokolik anastomoz uygulandı (Resim 3).



Resim 3: Uç uca kolokolik anastomoz

Tüm anastomozlar tek cerrah tarafından yapıldı, her anastomoza 8 sütür kondu. Fasya ve cilt 2/0 devamlı prolene sütür (Ethicon, UK) ile kapatıldı (Resim 4).



Resim 4: Ratların işlem sonrası görünümü

Ratlar bu işlemten sonra, her grupta 10 tane olmak üzere, 4 gruba ayrıldı. I. grup deneklere kolon anastomozu yapıldıktan sonra standart besleme dışında bir işlem yapılmadı. II. gruba kolon anastomozu sonrası, 7 gün boyunca, günlük 500 IU/kg subcutan eritropoetin (Eprex iğne 10.000 IU®Santa Farma-Gürel İlaç) enjeksiyonu yapıldı. III. gruba kolon anastomozu yapıldıktan sonra 5 gün boyunca 20 mg/kg intraperitoneal 5-fluorourasil (5-Fluorourasil 1000 mg flk®Biosin-ORNA) enjekte edildi. IV. gruba kolon anastomozu sonrası 5 gün boyunca 20 mg/kg intraperitoneal 5-fluorourasil (5-Fluorourasil 1000 mg flk®Biosin-ORNA) ve 7 gün boyunca, günlük 500 IU/kg subcutan eritropoetin (Eprex iğne 10.000 IU®Santa Farma-Gürel İlaç) enjeksiyonu yapıldı (Tablo 5).

Tablo 5: Deney grupları

I. Grup (kontrol grubu)	Kolon anastomozu
II. Grup (eritropoetin grubu)	Kolon anastomozu + Eritropoetin injeksiyonu
III. Grup (5-fluorourasil grubu)	Kolon anastomozu + 5-Fluorourasil injeksiyonu
IV. Grup (5-fluorourasil+eritropoetin grubu)	Kolon anastomozu + 5-Fluorourasil injeksiyonu + Eritropoetin injeksiyonu

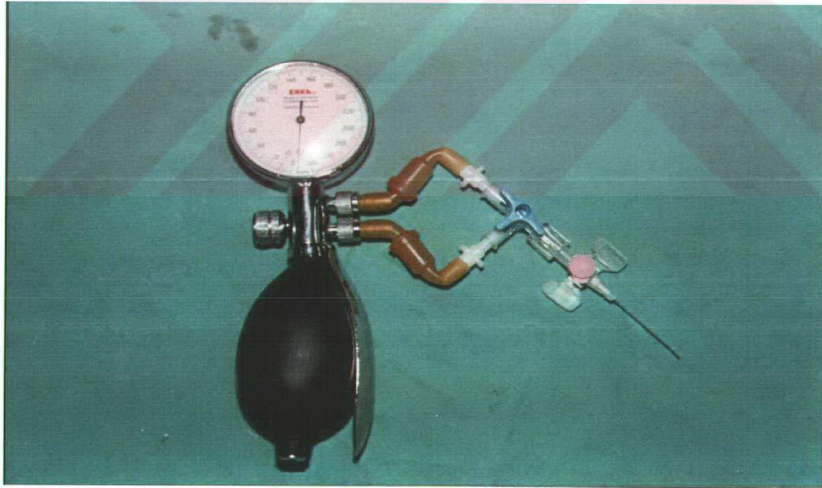
Postoperatif dönemde 12 saat sonra, standard yiyecek ve suları verilen ratlardan II. gruptakilere belirtilen dozlarda 7 gün boyunca, günlük subkutan eritropoetin, III. gruptakilere 5 gün boyunca, günlük intraperitoneal 5-fluorourasil ve IV. grup deneklere de ikisi birden injekte edildi. Anastomozdan sonraki 7. günde ratlar tartıldı, hemoglobin, hemotokrit ve lökosit değerlerine bakmak için 2 cc kan alındı ve aynı doz ketamin hidroklorid anestezisi ile relaparotomi yapıldı (Resim 5).

3. 2. PATLAMA BASINCININ ÖLÇÜMÜ

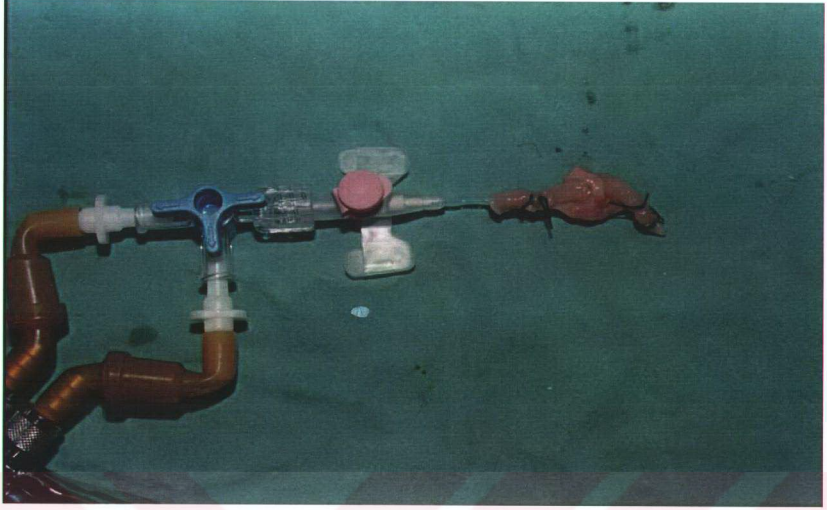
Karın ve anastomoz eksplere edildi, yapışıklıklara müdahale edilmeden anastomoz proksimal ve distalinden dörder cm mesafeden rezeke edildi. Patlama basıncı manuel sfingomanometri ile mmHg cinsinden ölçüldü (Resim 6). Lümen içerisine kateter yerleştirildikten sonra her iki uç 3/0 ipek (Ethicon, UK.) sütür ile bağlanarak oblitere edildi ve barsak lümenine metilen mavisi verildi. Anastomozda kaçak olup olmadığı tespit edildi. Basınç ölçümü için manuel olarak çalışan bir sfingomanometri katetere bağlandı (Resim 7). İçi sıvı dolu kapta intraluminal basınç hava ile artırıldı. Patlama basıncı, anastomozda kaçakla beraber hava kabarcığının ve metilen mavisinin anastomoz hattında görüldüğü andaki değer mmHg cinsinden kaydedildi (Resim 8). Bütün gruplardaki patlama basınç ölçüm sonuçları toplanarak standart sapmaları bulundu (Tablo 6). Anastomoz patlama basınçlarının ölçümü sonrası anastomoz hattının distal ve proksimalinden toplam 0,5 cm'lik bir parça çıkarıldı ve hidroksiprolin çalışılması amacı ile alüminyum folyolara sarılarak sıvı azot içerisinde donduruldu ve -70 °C'de derin dondurucuda saklandı. Yine anastomoz hattından 0.5 cm'lik doku alındı, kollajen ve anjiyogenezin histopatolojik olarak değerlendirilmesi için, tüplere konularak % 10 formaldehit içerisinde buzdolabının kapağında + 4 °C'de saklamaya alındı. Bütün işlemler tamamlanınca ratlar servikal dislokasyonla sakrifiye edildi.



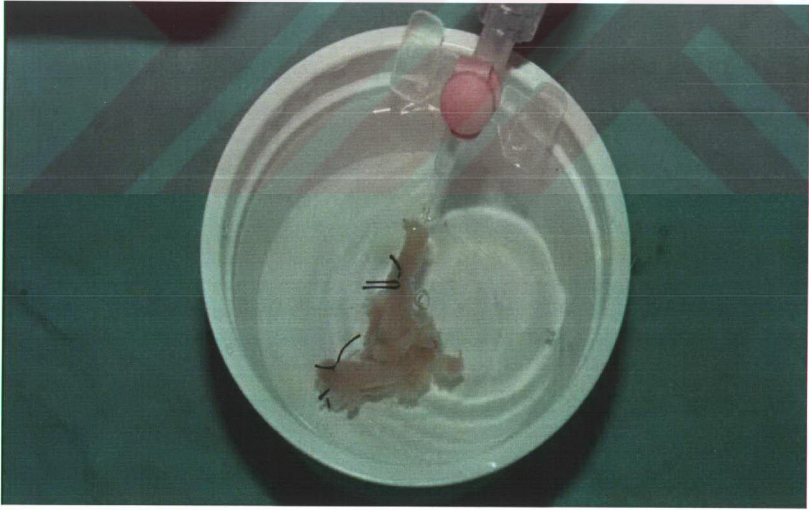
Resim 5: Ratlara relaparotomi yapılması



Resim 6: Patlama basıncı ölçümü için kullanılan manuel sfingomanometri



Resim 7: Basınç ölçümü için rezeksiyon sonrası lümen içi kateterizasyon



Resim 8: Patlama basıncı ölçümü

3. 3. RATLARIN TARTILMASI

Ratlar işlem öncesi ve postoperatif 7. günde grama duyarlı hassas terazi ile tartıldı. Bütün ratların ağırlıkları gram cinsinden değerlendirildi.

3. 4. RATLARDA HEMATOLOJİ ÖLÇÜMÜNÜN YAPILMASI

Ratlardan işlem öncesi ve postoperatif 7. gün alınan 2 cc kan örnekleri Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Anabilim Dalı'nda çalışıldı.

3. 5. ANASTOMOZ HATTINDA HİDROKSİPROLİN ÖLÇÜMÜ

Anastomoz hattını içeren dokularda biyokimyasal olarak ölçülen hidroksiprolin düzeyi, Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'nda çalışıldı. Daha önce -70 °C derin dondurucuda saklanmış olan ince barsak parçalarından kollajen miktar göstergesi olan hidroksiprolin, Jamall IS' nin tarif etmiş olduğu yöntemle ölçüldü (131). Derin dondurucu da saklanan dokular filtre kağıdı ile nemi alındıktan sonra hassas terazide tartıldı, 0.2 gram barsak dokusu örneği alındı. Bu doku örneği, pyrex tüplere aktarıldı ve üzerlerine 6 N Hidroklorik asit (HCl) ilave edilip 105 °C'de 18 saat boyunca hidrolize edildi. Hidrolizatlardan 25 µL alınan örnekler liyofilize edilip 1.2 ml % 50'lik (v/v) izopropil alkolde çözündürüldü. Bu örneklerle Kloramin T solüsyonu eklenip 10 dakika beklenildi. Takiben birer ml Erlich reaktifi eklenip 50 °C'de 90 dakika inkübe edildi. Oluşan renk 560 nm dalga boyunda spektrofotometrede okundu. Aynı şartlar altında 0.4, 0.6, 0.8, 1.2 ve 1.6 µg hidroksiprolin standartları da çalışıldı. Standart eğriden numune konsantrasyonları hesaplandı. Sonuçlar µg hidroksiprolin/mg doku olarak verildi (131).

3. 6. HİSTOPATOLOJİ DEĞERLENDİRMESİ

Histopatolojik inceleme Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda yapıldı. Patoloji örnekleri; formolinle fikse edilerek parafin bloklara gömüldü. Parafin bloklardan 5 µ'luk kesitler elde edildi. Kesitler Hemotoksilen-Eozin boyası ile boyandı. Histopatolojik incelemede kriter olarak fibroblast ve kollajenden zengin bağ dokusunun varlığı, anjiyogenezdeki artış, inflamasyon yoğunluğu ve nekroz varlığı değerlendirildi.

3. 7. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER

Tüm istatistiksel hesaplamalar, Konya Numune Hastanesi İstatistik Birimi tarafından yapıldı. Anastomoz iyileşmesinin 7. gününe ait parametrik sonuçlar Kruskal-Wallis H Testi (Varyans Analizi) ve Bonferroni Düzeltmeli Mann-Whitney U Testi ile yapıldı. Tüm karşılaştırmalarda $P<0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

Çalışma esnasında kontrol grubunda ve eritropoetin + 5-fluorourasil grubunda bir, 5-fluorourasil grubunda iki rat sakrifikasyondan önce anastomoz kaçağı nedeniyle öldü. Eritropoetin grubunda bütün ratlar yaşadı. Ölen ratlarda çalışma yapılmadığı için çalışma dışında bırakıldı. Takip eden günlerde aynı koşullarda yeni çalışmalar yapıldı ve çalışılan rat sayısı her grupta 10'a çıkarıldı.

Deneklerin patlama basınçları Tablo 6'da gösterilmiştir. Anastomoz patlama basınçları aritmetik ortalaması ($AO \pm SD$); grup I'de 195.5 ± 15.3 mmHg, grup II'de 270 ± 29.8 mmHg, grup III'de 186.6 ± 17.4 mmHg ve grup IV'de 214 ± 16.46 mmHg şeklinde idi.

Anastomoz sonrası eritropoetin uygulanan II. grupta ortalama anastomoz patlama basıncı 270 ± 29.8 mmHg olarak bulunmuş olup kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksekti. Kontrol grubu ve eritropoetin grubu arasındaki bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0.05$).

Anastomoz sonrası 5-fluorourasil grubunda anastomoz patlama basınçları 186.6 ± 17.4 mmHg, 5-fluorourasil + eritropoetin uygulanan IV. grupta ortalama anastomoz patlama basınçları 214 ± 16.46 mmHg olarak bulundu. Kontrol grubu ve bu iki grubunun patlama basınçları arasında anlamlı bir farklılık bulunmadı ($p = 0.055$). 5-fluorourasil + eritropoetin uygulanan grupla 5-Fluorourasil uygulanan grup arasındaki anastomoz patlama basınçları arasındaki fark anlamlıydı ($p < 0.04$). Eritropoetin ve diğer gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0.05$) (Tablo 7).

Tablo 6: Anastomoz patlama basınçları ölçüm sonuçları

PATLAMA BASINCI (mmHg)											Ort. Basınc $\pm$ Std. Deviasyon
RAT	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
I	210	180	220	170	205	190	200	180	205	195	$195,5 \pm 15,3$ mmHg
II	310	230	240	300	310	250	280	250	280	250	$270 \pm 29,8$ mmHg
III	203	174	211	162	197	177	187	169	196	190	$186.6 \pm 17,4$ mmHg
IV	240	190	210	220	210	220	200	240	210	200	$214 \pm 16,46$ mmHg

Tablo 7: Gruplar arası anastomoz patlama basınçlarının karşılaştırılması

Gruplar	Ortalama farklılık	P değeri
Kontrol / Eritropoetin	74,5	0,000
Kontrol / 5-fluorourasil	18,5	0,055
Kontrol / 5-fluorourasil + Eritropoetin	32,5	0,064
5-fluorourasil / 5-fluorourasil + Eritropoetin	56	0,000



Şekil 6: Anastomoz hattı patlama basınçları (mmHg)

Anastomoz hattında biyokimyasal olarak tayin edilen hidroksiprolin seviyeleri Tablo 8'de gösterilmiştir. Anastomoz hattında tayin edilen hidroksiprolin seviyeleri; grup I'de 10.96 ± 5.94 μg hidroksiprolin/mg doku, grup II'de 18.2 ± 4.95 μg hidroksiprolin / mg doku, grup III'de 9.79 ± 6.03 μg hidroksiprolin / mg doku ve grup IV'de 11.08 ± 5.08 μg hidroksiprolin / mg doku olarak tespit edildi.

Eritropoetin uygulanan II. grupta anastomoz hattında ortalama hidroksiprolin seviyesi 18.2 μg hidroksiprolin/mg doku olarak bulundu, kontrol grubuna göre belirgin bir yükselme tespit edildi. Eritropoetin grubunda kontrol grubuna oranla % 60.21 daha yüksek hidroksiprolin seviyesi tespit edildi. Kontrol grubu ve Eritropoetin grubu arasındaki bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0.026$).

5-fluorourasil + eritropoetin uygulanan grupta ortalama anastomoz hattı hidroksiprolin seviyesi 11.08 μg hidroksiprolin/mg doku olarak bulundu. Anastomoz hattı hidroksiprolin seviyesi kontrol grubuna oranla % 1 oranında bir fazlalık tespit edildi, fakat kontrol grubu ile hidroksiprolin düzeyleri arasında anlamlı bir farklılık bulunmadı ($p>0,05$).

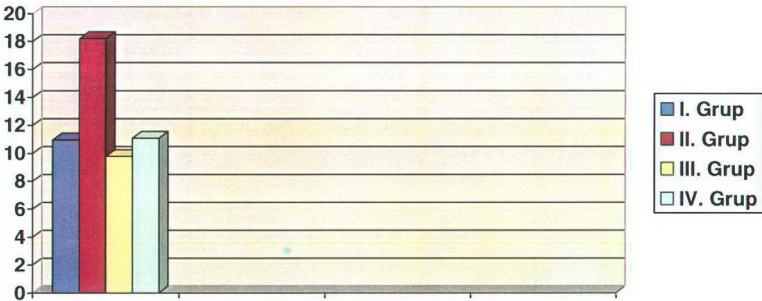
Eritropetin grubunda IV. gruba oranla anastomoz hattı hidroksiprolin seviyesinde % 60,8 oranında artma tespit edildi. Eritropetin ve IV. grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.05$). (Tablo 9).

Tablo 8: Anastomoz hattı hidroksiprolin seviyeleri

	I. grup	II. grup	III. grup	IV. grup
1	4.4	28.5	3.7	17.1
2	7.0	12.8	6.8	15.3
3	22.8	15.3	17.6	7.8
4	2.8	15.1	2.1	2.3
5	14.4	17.3	13.6	13.9
6	14.4	18.4	12.2	6.2
7	9.4	20.2	9.0	11.6
8	12.3	24.6	11.9	8.4
9	14.6	15.3	14.2	10.0
10	7.5	14.5	6.8	18.2
Ort±Std. Deviasyon	10.96±5.94 µg/mg	18.2±4.95 µg/mg	9.79±6.03 µg/mg	11.08±5.08 µg/mg

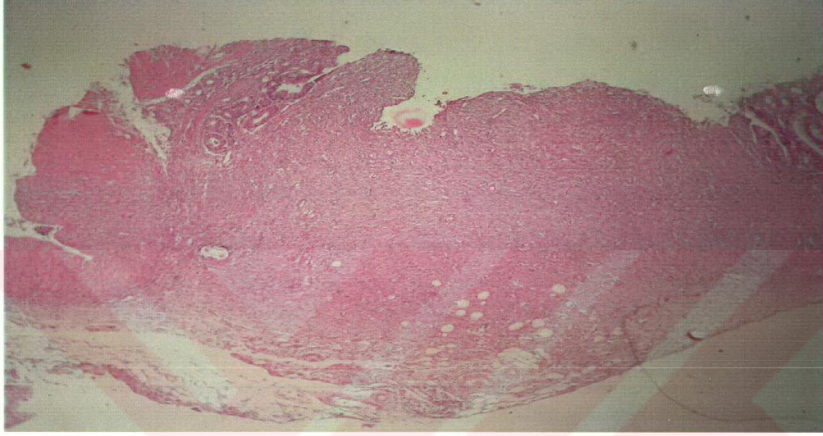
Tablo 9: Gruplar arası hidroksiprolin seviyelerinin karşılaştırılması

Gruplar	Ortalama farklılık	P değeri
Kontrol / Eritropetin	7,24	0,026
Kontrol / 5-Fluorourasil + Eritropetin	0,12	1,00
Kontrol / 5-Fluorourasil	0,09	1,02
5-Fluorourasil + Eritropetin / 5-Fluorourasil	7,12	0,016

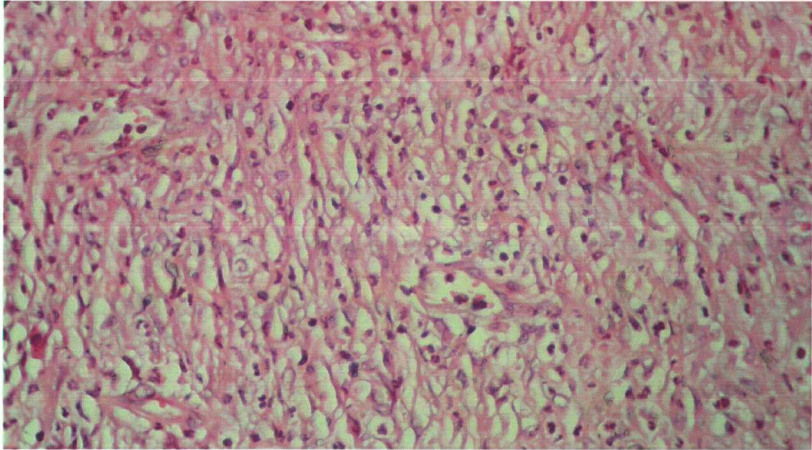


Şekil 7: Anastomoz hattı doku hidroksiprolin seviyeleri (µg/mg doku)

Histopatolojik incelemede kriter olarak kollajen ve fibroblastdan zengin bağ dokusu oluşumu, anjiyonezdeki artış, inflamasyondaki yoğunluk ve nekroz varlığı değerlendirildi. Grup I'de fibroblast ve bağ dokusu varlığı az olmakla birlikte mevcuttu ve anjiyonezde belirgin bir artma yoktu (Resim 9). Yoğun olmamakla birlikte anlamlı derecede inflamasyonun bir göstergesi olan nötrofil tespit edildi (Resim 10).

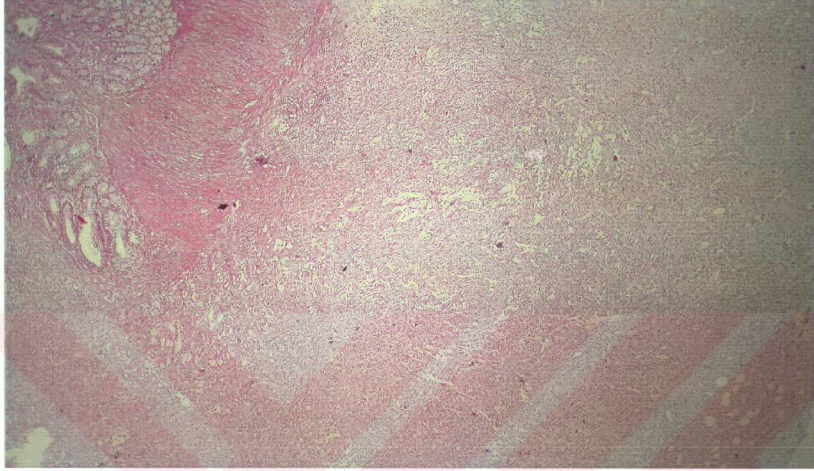


Resim 9: Kontrol grubunda; yetersiz bağ dokusu ve anjiyonez varlığı, belirgin nötrofil içeren iltihabi hücre içeren doku ve nekrozsuz anastomoz alanı (H-E x 4)

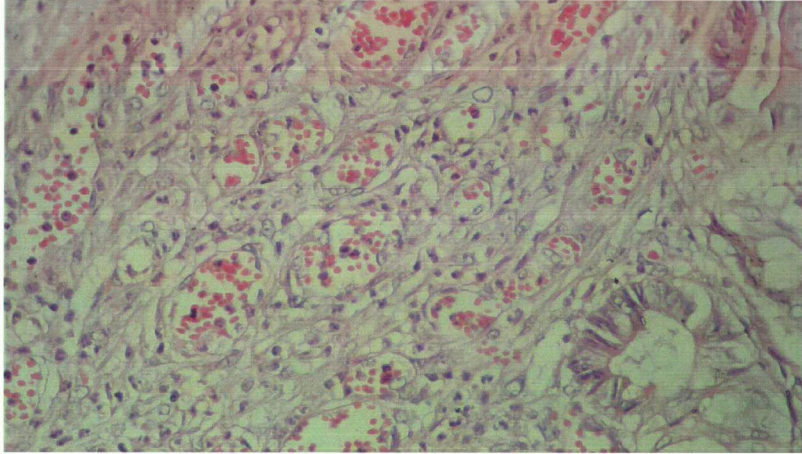


Resim 10: Kontrol grubunda; belirgin nötrofil bulunan inflamasyonlu anastomoz hattı (H-E x 40)

Grup II'de iltihabi hücre infiltrasyonu ve nötrofiller yok denecek derecede azdı ve fibroblast ve zengin kollajenden oluşan bağ dokusu vardı (Resim 11). Yine yoğun kan damarları ve ayrıca belirgin eozinofil tespit edildi (Resim 12).

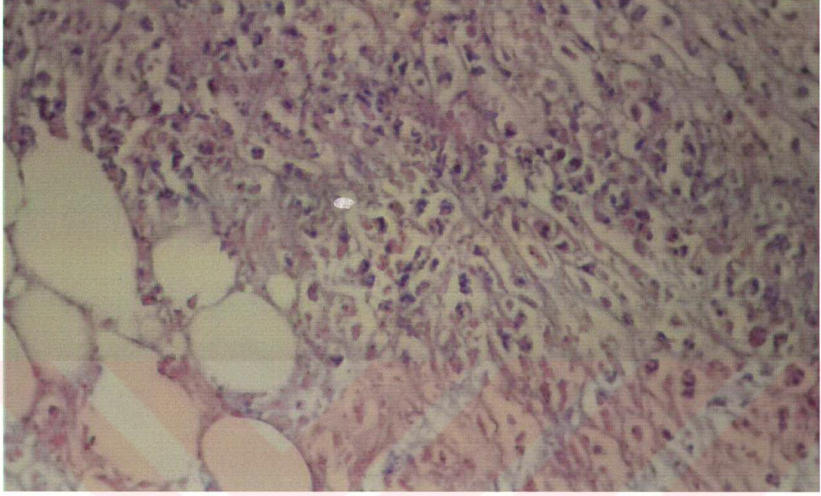


Resim 11: Eritropoetin grubunda; bağ dokusundaki belirgin artış (H-E x 4)



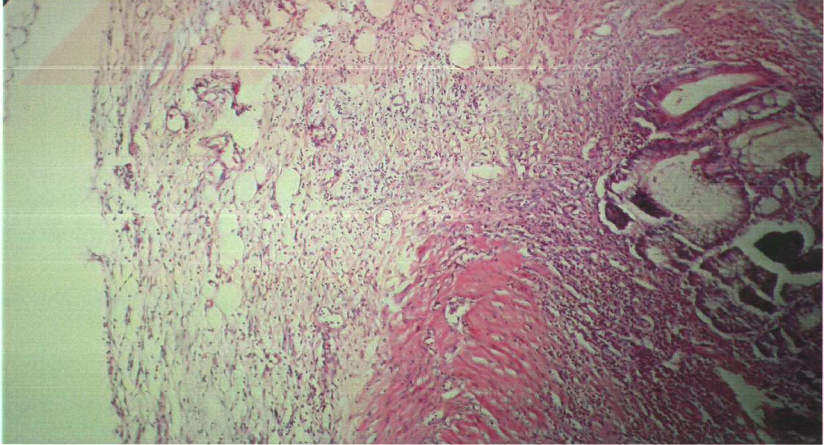
Resim 12: Eritropoetin grubunda; belirgin anjiyojenez ve eozinofili varlığı (H-E x 40)

Grup III'de fibroblast, kan damarları ve kollajenden oldukça fakir anastomoz görünümü ve belirgin nekroz varlığı mevcuttu. Ayrıca yoğun nötrofil içeren belirgin inflamasyon izlendi (Resim13).



Resim 13: 5-fluorourasil grubunda; bağ dokusu ve anjiyogenezdeki yetersizlik ve belirgin nekroz ve inflamasyon varlığı (H-E x 40)

Grup IV'de fibroblast, kollajen, anjiyogenez ve iltihabi hücre infiltrasyonunda belirgin olmayan artış ve belirgin eozinofili saptandı (Resim 14).



Resim 14: Eritropoetin + 5-fluorourasil grubunda; bağ dokusu ve anjiyogenezdeki minimal artış ve belirgin eozinofili (H-E x 40)

5. TARTIŞMA

Kolon cerrahisi halen genel cerrahların çalışmalarının büyük bir kısmını oluşturmaktadır. Ancak yüksek bakteriyel içeriği nedeniyle kolon anastomozlarında ayrılma riski gastrointestinal sistemin diğer lokalizasyonlarına oranla daha yüksektir (195, 196). Çeşitli yayınlara göre kolon anastomozlarını takiben hastaların yaklaşık % 4.5-50'sinde klinik olarak belirgin kaçak ve ayrılma oluşur. Koloni anastomozu kaçığı meydana geldiğinde postoperatif hastanede kalış süresi iki, mortalite oranı ise üç kat artmaktadır (195). Biz de eritropoetinin anastomoz iyileşmesi üzerine etkisini araştırmak amacıyla kolo-kolik anastomozu kullandık.

İyi bir anastomoz için sağlıklı barsak, anastomoz hattında gerginlik olmaması, yeterli kan akımının olması ve sıvı giriş çıkışını önleyecek sütürlerin konması gibi teknik ayrıntılara dikkat edilmelidir. Anastomozdaki açılma barsağın mekanik durumu, fekal bulaşın olması ve operasyonda peritoneal sepsisin varlığı ile direkt korelasyon gösterir. Gambee anastomoz hattı kaçaklarına gerilim, obstrüksiyon, nekroz ve en sık olarak da enfeksiyonun neden olduğunu gözlemiştir (197). Biz çalışmamızda sağlıklı barsak anastomoz hattında gerginlik olmaması, yeterli kan akımı ve yeterli sütür ile kolokolik anastomoz yaparak homojen grupların oluşmasını sağladık.

Anastomoz iyileşmesinin niceliksel derecesini tayin etmek amacıyla histolojik, mekanik ve biyokimyasal parametreler kullanılmakla beraber her birinin değerlilik sınırları belirlidir. Histolojik çalışmalar, doku düzeyinde iyileşme sürecinin tanımlanmasında oldukça faydalı bir çalışma olmasına rağmen farklı deneysel anastomoz serilerinin niceliksel karşılaştırılmasında primer bir araç olarak değerlendirilememiştir. (119, 198).

Mekanik parametreler anastomoz iyileşmesini en güvenilir bir şekilde yansıtan araçlardır (119). Bu amaçla, patlama basıncı ve gerilme kuvveti sıklıkla uygulanmaktadır.

Gerilme kuvveti anastomoz yapılan barsak segmentinin zıt uçlarından çekilirken, anastomoz ayrılması için gerekli kuvvettir. Patlama basıncı, artan intraluminal basınca kolon duvarının direncidir ve barsağın fizyolojik gerginliğini daha doğru yansıttığı için en güvenilir ölçümdür. Bu nedenle daha yaygın kullanılır (199, 200).

Anastomozda iyileşmenin monitorizasyonu için anastomoz patlama basıncı, özellikle anastomoz ayrılmasının en fazla gerçekleştiği postoperatif erken dönemlerde (3-7. gün) en değerli parametredir (119). Çalışmamızda anastomoz iyileşmesini değerlendirmek için mekanik parametrelerden patlama basıncı ölçümünü kullandık. Bu ölçümü de postoperatif 7. günde, yani anastomoz kaçağının en sık olduğu dönem içinde yaptık.

Anastomoz iyileşmesinin biyokimyasal tayini kollajen içeriği ile sınırlıdır ve sadece kollajende bulunan hidroksiprolin içeriği ile temsil edilir (119). Kollajen konsantrasyonuna dayanan sonuçlar nonkollajenaz substratlardaki değişikliklerden etkilenebileceğinden, kollajen düzeyinin ölçülmesi, anastomoz kollajen içeriğini daha iyi yansıtmaktadır (119, 198). Bu nedenle çalışmamızda anastomoz hattında doku hidroksiprolin seviyesi ölçülmüştür.

Hidroksiprolin düzeyindeki değişiklikler, kollajen degradasyonu ve sentezi arasındaki dengeyi yansıtır. Bu parametre, intestinal duvarın diğer içeriklerinin değişimlerinden bağımsızdır. Yeni sentezlenen kollajenin gösterilmesindeki problem nedeni ile radioaktif işaretli prolin injeksiyonu gibi yeni kollajen sentezini direkt yansıtan yöntemler tarif edilmiş olsa da pahalı olması kullanımını kısıtlamaktadır (203). Biz doku hidroksiprolin düzeylerini Jamall IS'nin tarif ettiği yöntemini kullanarak tespit ettik.

Genel olarak, düşük hidroksiprolin düzeyi veya yetersiz sentezinin kötü yara iyileşmesi ile sonuçlanacağına inanılır. Fakat, iyileşme düzeyinin belirlenmesi için hidroksiprolin düzeyi tek başına bir parametre olarak kullanılması bazen hatalı sonuçlar verebilmektedir (119, 198). İntestinal anastomozun gücünü belirleyen ana eleman, kollajen kütlesinin yanı sıra kollajen fibrillerinin kalitesidir (118). Kollajen fibrillerinin gerilim gücü ve

mekanik stabilitesini sağlayan en önemli unsur, intermoleküler çapraz bağların yapılanmasıdır. Bu oluşumu bozacak veya geciktirecek durumlarda anastomoz gerilim gücünde ciddi problemlerin meydana geleceği düşünölse de intestinal anastomoz kollajen çapraz bağlarının yapısal özellikleri ile ilgili çok az veri mevcuttur (49, 119). Anastomoz kollajen içeriği ve mekanik parametreler arasında çoğu zaman bir korelasyon olmadığı tespit edilmekte, bu durumun muhtemelen, araştırmaların kollajenin kalitesinden çok kollajenin kütlesi üzerinde odaklanmasından kaynaklandığı düşünölmektedir (119, 198).

Anastomozda iyileşme hemostaz ile başlar ve birincil inflamatuvar cevap lökositlerin migrasyonu ve kollajen yapımını artıran mediyatörlerin salınımı şeklindedir. Kısa zamanda mukozal reepitelizasyon gelişir (204).

Anastomoz iyileşmesinin en iyi göstergelerinden birisi de anyioyenezdeki artışın belirgin derecede olmasıdır. Kanlanmanın iyi olduğu bölgelerde yara iyileşmesi ve dolayısıyla anastomoz iyileşmesi istenilen düzeyde olacaktır.

Büyüme faktörleri, sitokinler ve eritropoetin fibroblast, düz kas hücresi proliferasyonu ve anjiyogenezi artırıcı etkileri bir çok çalışmada gösterilmiştir (4, 201, 202). İlk kez hematopoetik büyüme faktörü olarak tanımlanan eritropoetin eritroid prekürsör hücrelerinin proliferasyon ve diferansiyasyonunu regüle eden bir hematopoetik hormon olarak bilinmekteydi (160). Dolaşımdaki eritropoetin, eritrositlerin üretimini düzenleyerek doku oksijenizasyonunun kontrolünde rol aldığı ve kemik iliğinde eritrosit öncölü hücrelerin çoğalmasını ve eritroblastlara farklılaşmasını uyarmaktadır (161, 162). Her hücrede yaklaşık 1200 EPO-R olduğu bildirilmiştir (164). EPO/EPO-R etkileşimlerinin bir dizi hücresel tepkiyi (mitojenler, kemotaksi, anjiyojen, hücre içi kalsiyumun mobilizasyonu, apoptozin durdurulması da dahil) harekete geçirdiği belirtilmiştir (165). EPO'nun anjiyojen aktivitesi hem in vivo hem de in vitro rat aort modelinde gösterilmiştir (168).

Eritropoetin, barsaklarda submukozal kan akımının regülasyonundaki rolü ile mukozal bütünlüğün korunmasında önemlidir. Anjiyogenezi artırması, ihtiva ettiği büyüme faktörleri ve sitokinlerle eritropoetinin yara iyileşmesine olumlu katkıda bulunacağını düşündük. Bu amaçla anastomoz yapılan ratlarda eritropoetini uygulayarak doku maturasyonuna olumlu katkıda bulunarak iyileşmeyi hızlandırmasını ve sonuç olarak anastomoz güvenliğini artırmasını bekledik. Ayrıca eritropoetini, yara iyileşmesinin daha fazla bozulduğu, 5-fluorourasil uygulanan ratlarda da kullanarak maligniteler sonrası kemoterapinin zararlı etkilerinin önlenmesi için yeni bir ürün olarak etkisini görmeyi amaçladık. Ayrıca eritropoetinin anjiyogenez üzerine etkisini histolojik olarak gösterdik.

SONUÇ

Eritropoetin genellikle kronik böbrek yetmezliği hastalarında eritropoezisi artırıcı etkisi nedeni ile anemi tedavisinde kullanılmaktadır (188, 189, 190). Son zamanlarda eritropoetin eritropoezisten başka multipotent olan stem hücrelerini de modüle ettiği ve anjiyojenezisi artırdığı bulunmuştur (187, 188). Yapılan birçok çalışmada eritropoetin damar anastomozlarında anjiyojenezisi ve reendotelizasyonu artırarak damar anastomozu ve greft güvenilirliğini artırdığı gösterilmiştir. Kalıcı veya reperfüze iskemik myokard dokusunda eritropoetin koruyucu etkisi yapılan birçok çalışmada ortaya çıkmıştır (193, 194). Ayrıca beyin ve sinir sisteminde, astrosit kültüründe düşük oksijen basıncında eritropoetin üretiminin arttığını gösteren birçok çalışma vardır (191, 192).

Eritropoetin farmakolojik özellikleri sayesinde, değişik mekanizmalarla yara iyileşmesini hızlandırdığı konusundaki bilgilerin elde edilmesinden sonra, benzer etkinin barsak anastomozunda da görülüp görülmeyeceğini araştırmak ve kolon tümörlerinin cerrahisinde yapılan anastomozlardan sonra uygulanan kemoterapotiklerin anastomoz iyileşmesi üzerindeki olumsuz etkilerini ortadan kaldırabilmek amacıyla bu deneysel çalışmayı yaptık.

Çalışmamızda; ratlar işlem öncesi tartılarak, intramüsküler 10 mg/kg ketamin hidroklorid (Ketalar flk 50 mg®Eczacıbaşı) ile anestezi uygulandı ve karın tüyleri traşlandıktan sonra supine pozisyonunda ameliyat masasına tespit edildi. Cilt % 10'luk povidon-iodin solüsyonu ile temizlenerek tamamen steril koşullar altında ve orta hat kesisi ile laparotomi yapıldı. Sigmoid kolon anısı kanlanması bozulmaksızın kolon eksenine dik olacak şekilde tam kat kesildi. Daha sonra 6/0 prolene (Ethicon, UK.) ile, tek tabaka ve tek tek sütürlerle, uç uca kolokolik anastomoz uygulandı. Her anastomoza 8 sütür kondu. Fasya ve cilt 2/0 devamlı prolene sütür (Ethicon, UK) ile kapatıldı.

Ratlar bu işlemden sonra, her grupta 10 tane olmak üzere, 4 gruba ayrıldı. I. grup deneklere kolon anastomozu yapıldıktan sonra standart besleme dışında bir işlem yapılmadı. II. gruba kolon anastomozu sonrası, 7 gün boyunca, günlük 500 IU/kg subcutan eritropoetin (Eprex iğne 10.000 IU®Santa Farma-Gürel İlaç) enjeksiyonu yapıldı. III. gruba kolon anastomozu yapıldıktan sonra 5 gün boyunca 20 mg/kg intraperitoneal 5-fluorourasil (5-Fluorourasil 1000 mg flk®Biosin-ORNA) enjekte edildi. IV. gruba kolon anastomozu sonrası 5 gün boyunca 20 mg/kg intraperitoneal 5-fluorourasil (5-Fluorourasil 1000 mg flk®Biosin-ORNA) ve 7 gün boyunca, günlük 500 IU/kg subcutan eritropoetin (Eprex iğne 10.000 IU®Santa Farma-Gürel İlaç) enjeksiyonu yapıldı. Postoperatif dönemde 12 saat sonra, standard yiyecek ve suları verilen ratlardan II. gruptakilere belirtilen dozlarda 7 gün boyunca, günlük subcutan eritropoetin, III. gruptakilere 5 gün boyunca, günlük intraperitoneal 5-fluorourasil ve IV. grup deneklere de ikisi birden enjekte edildi.

Anastomozdan sonraki 7. günde ratlar tartıldı, hemoglobin, hemotokrit ve lökosit değerlerine bakmak için 2 cc kan alındı ve aynı doz ketamin hidroklorid anestezisi ile relaparotomi yapıldı. Anastomoz sonrası eritropoetin uygulanan II. grupta ortalama anastomoz patlama basıncı 270 ± 29.8 mmHg olarak bulunmuş olup kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksekti. Kontrol grubu ve eritropoetin grubu arasındaki bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0.05$). Anastomoz sonrası 5-fluorourasil grubunda anastomoz patlama basınçları 186.6 ± 17.4 mmHg, 5-fluorourasil + eritropoetin uygulanan IV. grupta ortalama anastomoz patlama basınçları 214 ± 16.46 mmHg olarak bulundu. Kontrol grubu ve bu iki grubunun patlama basınçları arasında anlamlı bir farklılık bulunmadı ($p = 0.055$). 5-fluorourasil + eritropoetin uygulanan grupla 5-fluorourasil uygulanan grup arasındaki anastomoz patlama basınçları arasındaki fark anlamlıydı ($p < 0.04$). Eritropoetin ve diğer gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0.05$).

Eritropoetin uygulanan II. grupta anastomoz hatında ortalama hidroksiprolin seviyesi 18.2 µg hidroksiprolin/mg doku olarak bulundu, kontrol grubuna göre belirgin bir yükselme tespit edildi. Eritropoetin grubunda kontrol grubuna oranla % 60.21 daha yüksek hidroksiprolin seviyesi tespit edildi. Kontrol grubu ve Eritropoetin grubu arasındaki bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0.026$). 5-fluorourasil + eritropoetin uygulanan grupta ortalama anastomoz hattı hidroksiprolin seviyesi 11.08 µg hidroksiprolin/mg doku olarak bulundu. Anastomoz hattı hidroksiprolin seviyesi kontrol grubuna oranla % 1 oranında bir fazlalık tespit edildi, fakat kontrol grubu ile hidroksiprolin düzeyleri arasında anlamlı bir farklılık bulunmadı ($p>0,05$). Eritropoetin grubunda IV. gruba oranla anastomoz hattı hidroksiprolin seviyesinde % 60,8 oranında artma tespit edildi. Eritropoetin ve IV. grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.05$).

Histopatolojik incelemede kriter olarak kollajen ve fibroblastdan zengin bağ dokusu oluşumu, anjiyojenezdeki artış, inflamasyondaki yoğunluk ve nekroz varlığı değerlendirildi. Grup I'de fibroblast ve bağ dokusu varlığı az olmakla birlikte mevcuttu ve anjiyojenezde belirgin bir artma yoktu. Yoğun olmamakla birlikte anlamlı derecede inflamasyonun bir göstergesi olan nötrofil tespit edildi. Grup II'de iltihabi hücre infiltrasyonu ve nötrofiller yok denecek derecede azdı ve fibroblast ve zengin kollajenden oluşan bağ dokusu vardı. Yine yoğun kan damarları ve ayrıca belirgin eozinofil tespit edildi. Grup III'de fibroblast, kan damarları ve kollajenden oldukça fakir anastomoz görünümü ve belirgin nekroz varlığı mevcuttu. Ayrıca yoğun nötrofil içeren belirgin inflamasyon izlendi. Grup IV'de fibroblast, kollajen, anjiyojenez ve iltihabi hücre infiltrasyonunda belirgin olmayan artış ve belirgin eozinofili saptandı.

Eritropoetin grubunda diğer gruplara oranla, anastomoz patlama-gerilme basınçlarının, doku hidroksiprolin-kollajen düzeylerinin birbirleriyle uyumlu bir şekilde istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttığını tespit ettik. Bu da anastomoz bölgesinde güçlü bir bağ dokusunun

varlığını ve dolayısıyla kaçakların daha az olmasını sağlamaktadır. Nitekim minimal derecelerde oluşan anastomoz kaçakları ve bunun patolojik göstergesi olan nötrofiller bu grupta gözlenmedi. Bunun yanında anjiyojenizdeki artışla bu grupta nekroz varlığı da görülmeydi. Beklendiği üzere, çalışmamızda kriter olarak değerlendirilmeyen, eozinofili tespit edildi. Yine 5-fluorourasil + eritropoetin grubunda da kontrol grubu ile karşılaştırıldığında bu parametrelerde anlamlı bir artış bulundu. Bu bulgular sadece 5-fluorourasil uygulanan ratlarda daha önce yapılan bir çok çalışmadan da bilindiği gibi olumsuz yöndeydi. Eritropoetin uygulaması bu olumsuzlukları istatistiksel olarak anlamlı oranda düzeltmekteydi.

Sonuç olarak kolokolik anastomoz yapılan ratlarda eritropoetin inflamasyon, proliferasyon ve yeniden yapılanma üzerine olan etkisiyle anjiyojenize olumlu etkiler yapmıştır. Aynı olumlu etkiler 5-fluorourasil kullanılan ratlarda da gözlenmiştir. Bu nedenle eritropoetin kolokolik anastomozlardan sonra ve özellikle kemoterapi gibi anastomoz iyileşmesini olumsuz etkileyen durumlarda anastomoz kaçağı riskini azaltacağı beklenebilir. Yapılacak klinik ve deneysel çalışmaların konuya daha fazla açıklık getireceği kanaatindeyiz.

7. KAYNAKLAR

1. Thornton FJ, Barbul A. Healing in the gastrointestinal tract. *Surg Clin North Am.* 1997 Jun; 77(3): 549-73.
2. Fielding LP, Stewart-Brown S, Blesovsky L, Kearney G. Anastomotic integrity after operations for large-bowel cancer: a multicentre study. *Br Med J.* 1980 Aug 9; 281(6237): 411-4.
3. Cohen IK, Diegelriann RF, Crossland MC. Wound care and wound healing: Principles of surgery. Sixth edition. Schwartz SI (editor-in-chief) New York 1994, P.279-303.
4. Schaffer M, Beiter T, Becker HD, Hunt TK. Neuropeptides: mediators of inflammation and tissue repair? *Arch Surg.* 1998 Oct; 133(10): 1107-16.
5. Kjartansson J, Lundeborg T, Samuelson UE, Dalsgaard CJ, Heden P. Calcitonin gene-related peptide (CGRP) and transcutaneous electrical nerve stimulation (TENS) increase cutaneous blood flow in a musculocutaneous flap in the rat. *Acta Physiol Scand Supp;* 134(1): 89-94, 1988.
6. Maria B, Barbul W, Barbul A. General principles of Wound healing. *Surg Clin North Am* June 77:509-527, 1997.
7. Lise M, Gerard A, Nitti D et al. Adjuvant therapy for colorectal cancer: EORTC experience and review of the literature. *Dis Colon Rectum* 1987; 30: 847-54.
8. Arbuck SG. Overview of clinical trials using 5-fluorouracil and leucovorin for the treatment of colorectal cancer. *Cancer* 1989; 63: 1036-44.
9. Staley CJ, Trippel OH, Preston FW. Influence of 5- fluorouracil on wound healing. *Surgery* 1961; 49: 450-3.
10. Morris T. Retardation of healing of large bowel anastomoses by 5-fluorouracil. *A J Surg* 1979; 49: 743-45.
11. Graf W, Weieber S, Glimelius B, et al. Influence of 5- fluorouracil and folinic acid on colonic healing: an experimental study in the rat. *Br. J. Surg.* 1992, Vol. 79, August, 825-828.
12. Fisher B, Gunduz N, Saffer EA. Influence of the interval between primary tumor removal and chemotherapy on kinetics and growth of metastases. *Cancer Res* 1983; 43: 1488-92.
13. Ellis H. Intraabdominal organs. In: Savalgi R, Ellis H. *Clinical Anatomy for Laparoscopic and Thoracoscopic Surgery.* Rdcliffe Medical Press, New York 1996: 24-29.
14. Romolo LJ. Embriyoloji and anatomy of the colon. In: George D. Zuidema, M. D. edit. *Shackelford's Surgery pf the Alimentary Tract.* 4th ed. Vol IV, W. Bsaunders Company, Philadelphia, 1996: 3-16.
15. Malazgirt Z. Kolon, Rektum ve Anüs. In: Özkan K, Özen N, Malazgirt Z. *Genel Cerrahi. Hacettepe TAŞ. Kitapçılık, Ankara, 1996: 327-329.*
16. Schrock TR. Colon. In: Lawrence W. Way, MD. *Curent Surgical Diagnosis and Treatment.* 7th ed. Vol II, LANGE Medical Publications/Los Altos, CALİFORNİA, 1985.
17. İlgi S. Gastrointestinal sistem anatomisi. In: Sayek İ. *Temel Cerrahi. Melisa matbaacılık, İstanbul 1996: 901-906.*
18. Ernest W. April. *Anatomy.* 2th ed. Williams and Wikins, America, 1990: 218-226.
19. Odar İ. V. *Anatomi. 2. cilt Salmanlar ofset, İstanbul, 1984: 95-115.*

20. Kodner IJ, Fry RD, Fleshman JW, Birnbaum EH. Colon, Rectum and Anus. Principle of surgery, Schwartz 6th ed. Vol II. McGraw-Hill America, 1994: 1191-1198.
21. Füzün M, Kınay M, Alakavuklar M, et al. Kırabilite potansiyeli olan kolorektal kanserlerde tedavi. Kolon Rektum Hast. Derg, 4: 181-188, 1992.
22. Taylor I, Rowling J. : Adjuvant cytotoxic liver perfusion for colorectal cancer. Br. J Surg, 66: 833-837, 1979.
23. Beart RW, Moertel CG, Wieand HS, et al. : Adjuvant therapy for resectable colorectal carcinoma with fluorouracil administered by portal vein infusion. Arch Surg, 125: 897-901, 1990.
24. Cohen AM, Shank B, Friedman MA. : Colorectal cancer. In: DeVita VT, Hellman S and Rosenberg SA, eds. Cancer principles and Practice of Oncology. J. B. Lippincott Company, Philadelphia 1989: 895-964.
25. Casillas S, Pelley R, Milsom J. Adjuvant therapy colorectal cancer. Present and future perspectives. Dis Col Rec. 40 (8): 977-992, Aug 1997.
26. Willet CG, Teper JE, Cohen AM, et. Al: Failure patterns following curative resection of colonic carcinoma. Ann Surg 200: 685, 1984.
27. August DA, Ottow RT, Sugarbaker PH: Clinical perspective of human colorectal cancer metastasis. Cancer Metastasis Rev 3: 311, 1984.
28. Enblad P, Adami H-O, Bergstrom R, et al: Improved survival of patients with cancers of the colon and rectum. JNCI 80: 586, 1988.
29. Cunliffe WC, Sugarbaker PH. : Gastrointestinal malignensi: rationale for adjuvant therapy using early postoperative intraperitoneal chemotherapy. Br. J Surg, 72: 359-363, 1989.
30. Savap B, Ersoy F. Kanser tedavisinde peritoneal tedavi modaliteleri. O. M. Ü Tıp Der. 14 (4): 300-304, 1997.
31. Kayaalp SO. Tıbbi Farmakoloji. Ulucan matbaası, Ankara 1984: (1) 926-927.
32. Johnson SW, Hamilton TC, et al. Pharmacology of cancer chemotherapy. In: DeVita VT, Hellman S and Rosenberg SA, eds. Cancer Principles and Practice of Oncology. J. B. Lippincott Company, Philadelphia 1997: 436-439.
33. Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. Nat Med 2000; 6: 389-95.
34. Lloyd PG, Yang HT, Terjung RL. Arteriogenesis and angiogenesis in rat ischemic hindlimb: Role of nitric oxide. Am J Physiol 2001; 281: H2528-38.
35. Deveci D, Marshall JM, Egginton S. Relationship between capillary angiogenesis, fiber type, and fiber size in chronic systemic hypoxia. Am J Physiol 2001 ; 281: H241-52.
36. Anjiyogenezis, arteriyogenezis ve vaskülogenezis terimlerinin anlamları ve hipoksik ve/veya iskemik koşullarda anjiyogenezis. Genel tıp derg 2003; 13: 141-151.
37. Risau W. Mechanisms of angiogenesis. Nature 1997;386:671-4.
38. Bussolino F, Mantovani A, Persico G. Molecular mechanisms of blood vessel formation. Trends Biochem Sci 1997;22:251-6.
39. Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, Silver M. et al. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. Circ Res 1999; 85: 221-8.
40. Dijke PT, Ivata KK. Growth factor for wound healing. Bio Technol 1989; 7: 793-98.
41. Hechman DH, Cybulsky MI, Fuchs HJ. Intravascular IL-8 inhibitor of polymorphonuclear leukocyte accumulation at sites of acute inflammation. J Immunol 1991; 147: 883-95.

42. Gimenez G, Coon G, Hatcher VB, Thomas KAA. Human brain derived acidic and basic fibroblast growth factors: Amino terminal sequences and specific mitogenic activities. *Biochem Biophys Res Commun* 1986; 135: 541-48-54.
43. Disler O, Neidhart M, Gay RE, Gay S. The molecular of angiogenesis. *Intern Rev Immunol* 2002; 21: 33-49-58.
44. Scholz D, Cai WJ, Schaper W. Arteriogenesis, a new concept of vascular adaptation in occlusive disease. *Angiogenesis* 2000; 4: 247-57.
45. Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* 1997; 18: 4-23.
46. Schweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 1992; 359: 843-5.
47. Folkman J, Klagsbrun M. Angiogenic factors. *Science* 1987; 235: 442-47.
49. Engin A. Genel cerrahi tanı ve tedavi ilkeleri, Ankara 2000, s:131-144.
50. Wahl LM, Wahl SM. Inflammation. in wound healing, biochemical and clinical aspect. Philadelphia, WB Saunders, 1992, p 40.
51. Fukai F, Suzuki H, Suzuki K, Tsugita A, Katayama T. Rat plasma fibronectin contains two distinct chemotactic domains for fibroblastic cells. *J Biol Chem*. 1991, May 15; 266(14): 8807-13.
52. Tonnesen MG, Smedly LA, Henson PM. Neutrophil-endothelial cell interactions. Modulation of neutrophil adhesiveness induced by complement fragments C5a and C5a des arg and formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine in vitro. *J Clin Invest*. 1984 Nov; 74(5): 1581-92.
53. Pohlman TH, Stanness KA, Beatty PG, Ochs HD, Harlan JM. An endothelial cell surface factors induced in vitro by lipopolysaccharide, interleukin 1, and tumor necrosis factor-alpha increases neutrophil adherence by a CDw18-dependent mechanism. *J Immunol*. 1986 Jun 15; 136(12): 4548-53.
54. Leibovich SJ, Ross R. The role of the macrophage in wound repair. A study with hydrocortisone and antimacrophage serum. *Am J Pathol*. 1975 Jan; 78(1): 71-100.
55. Beezhold DH, Personius C. Fibronectin fragments stimulate tumor necrosis factor secretion by human monocytes. *J Leukoc Biol*. 1992 Jan; 51(1): 59-64.
56. Browder W, Williams D, Lucore P, Pretus H, Jones E, McNamee R. Effect of enhanced macrophage function on early wound healing. *Surgery*. 1988 Aug; 104(2): 224-30.
57. Polverini PJ, Cotran PS, Gimbrone MA Jr, Unanue ER. Activated macrophages induce vascular proliferation. *Nature*. 1977 Oct; 269(5631): 804-6
58. Heppleston AG, Styles JA. Activity of a macrophage factor in collagen formation by silica. *Nature*. 1967 Apr 29; 214(87): 521-2.
59. Buchmuller-Rouiller Y, Mauel J. Macrophage activation for intracellular killing as induced by calcium ionophore. Correlation with biologic and biochemical events. *J Immunol*. 1991 Jan 1; 146(1): 217-23.
60. Albina JE, Henry WL Jr, Mastrofrancesco B, Martin BA, Reichner JS. Macrophage activation by culture in an anoxic environment. *J Immunol*. 1995 Nov 1; 155(9): 4391-6.
61. Regan MC, Kirk SJ, Wasserkrug HL, Barbul A. The wound environment as a regulator of fibroblast phenotype. *J Surg Res*. 1991 May; 50(5): 442-8.
62. Bulgrin JP, Shabani M, Chakravarthy D, et al: Nitric oxide synthesis is suppressed in steroid- impaired and diabetic wound healing. *Wounds* 7:48,1995

63. Desmouliere A, Geinoz A, Gabbiani F, Gabbiani G. Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *J Cell Biol.* 1993 Jul; 122(1):103-11.
64. Kurkinen M, Vaheri A, Roberts PJ, Stenman S. Sequential appearance of fibronectin and collagen in experimental granulation tissue. *Lab Invest.* 1980 Jul; 43(1): 47-51
65. Murphy G. Matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Acta Orthop Scand Suppl.* 1995 Oct; 266: 55-60
66. Ma C, Tarnuzzer RW, Chegini N. Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of matrix metalloproteinases in mesothelial cells and their regulation by transforming growth factor-beta1. *Wound Repair Regen.* 1999 Nov-Dec; 7(6): 477-85.
67. Varga J, Yufit T, Brown RR. Inhibition of collagenase and stromelysin gene expression by interferon-gamma in human dermal fibroblasts is mediated in part via induction of tryptophan degradation. *J Clin Invest.* 1995 Jul; 96(1): 475-81.
68. Clark RA. Regulation of fibroplasia in cutaneous wound repair. *Am J Med Sci.* 1993 Jul; 306(1): 42-8.
69. Ezoe K, Horikoshi T. Tumor necrosis factor-alpha increased the integrin alpha 2 beta 1 expression and cell attachment to type I collagen in human dermal fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun.* 1993 Apr 15; 192(1): 281-7
70. McGrath MH. Peptide growth factors and wound healing. *Clin Plast Surg.* 1990 Jul; 17(3): 421-32.
71. Bennett NT, Schultz GS. Growth factors and wound healing: biochemical properties of growth factors and their receptors. *Am J Surg.* 1993 Jun; 165(6): 728-37.
72. Steenfos HH. Growth factors and wound healing. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg.* 1994 Jun; 28(2): 95-105.
73. Ford HR, Hoffman RA, Wing EJ, Magee DM, McIntyre L, Simmons RL. Characterization of wound cytokines in the sponge matrix model. *Arch Surg.* 1989 Dec; 124(12): 1422-8.
74. Erlich HB, Krummel TM. Regulation of wound healing from a connective tissue perspective. *Wound repair and regeneration* 4: 203, 1996.
75. Diaz A, Munoz E, Jonston R, et al: regulation of human dermal fibroblasts $\alpha 1$ procollagen gene expression by TNF- α , IL-1 β , and prostaglandin E2. *J Biol Chem* 268: 10364, 1993.
76. Tang Y, Han C, Wang X. Role of nitric oxide and prostaglandins in the potentiating effects of calcitonin gene-related peptide on lipopolysaccharide-induced interleukin-6 release from mouse peritoneal macrophages. *Immunology.* 1999 Feb; 96(2): 171-5.
77. Dvornik VM, Murphey RJ, Matsuo J, Grotendorst GR. Changes in growth factor levels in human wound fluid. *Surgery.* 1992 Jul; 112(1): 18-23
78. Brew EC, Mitchell MB, Harken AH. Fibroblast growth factors in operative wound healing. *J Am Coll Surg.* 1995 Apr; 180(4): 499-504.
79. Laato M, Kahari VM, Niinikoski J, Vuorio E. Epidermal growth factor increases collagen production in granulation tissue by stimulation of fibroblast proliferation and not by activation of procollagen genes. *Biochem J.* 1987 Oct 15; 247(2): 385-8.
80. Thorton F, Barbul A. Healing in the gastrointestinal tract. *Surg Clin N Am*, 77 (3): 549-573, 1997.
81. Graham MF, Diegelmann RF, Elson CO, Lindblad WJ, Gotschalk N, Gay S, Gay R. Collagen content and types in the intestinal strictures of Crohn's disease. *Gastroenterology.* 1988 Feb; 94(2): 257-65.

82. Goligher JC, Lee PW, Simpkins KC, Lintott DJ. A controlled comparison one- and two-layer techniques of suture for high and low colorectal anastomoses. *Br J Surg*. 1977 Sep; 64(9): 609-14.
83. Goligher JC, Graham NG, De Dombal FT. Anastomotic dehiscence after anterior resection of rectum and sigmoid. *Br J Surg*. 1970 Feb; 57(2): 109-18.
84. Adams W, Ctercteko G, Bilous M. Effect of an omental wrap on the healing and vascularity of compromised intestinal anastomoses. *Dis Colon Rectum*. 1992 Aug; 35(8): 731-8.
85. Koyama SY, Podolsky DK. Differential expression of transforming growth factors alpha and beta in rat intestinal epithelial cells. *J Clin Invest*. 1989 May; 83(5): 1768-73.
86. Dignass AU, Podolsky DK. Cytokine modulation of intestinal epithelial cell restitution: central role of transforming growth factor beta. *Gastroenterology*. 1993 Nov; 105(5): 1323-32.
87. Goke M, Podolsky DK. Regulation of the mucosal epithelial barrier. *Baillieres Clin Gastroenterol*. 1996 Sep; 10(3): 393-405.
88. Dignass A, Lynch-Devaney K, Kindon H, Thim L, Podolsky DK. Trefoil peptides promote epithelial migration through a transforming growth factor beta-independent pathway. *J Clin Invest*. 1994 Jul; 94(1): 376-83.
89. Graham MF, Bryson GR, Diegelmann RF. Transforming growth factor beta 1 selectively augments collagen synthesis by human intestinal smooth muscle cells. *Gastroenterology*. 1990 Aug; 99(2): 447-53.
90. Barone EJ, Yager DR, Pozez AL, Olutoye OO, Crossland MC, Diegelmann RF, Cohen IK. Interleukin-1alpha and collagenase activity are elevated in chronic wounds. *Plast Reconstr Surg*. 1998 Sep; 102(4): 1023-7; discussion 1028-9.
91. Quatra F, Colonna MR, Catalano A. The role of interleukin-1alpha and collagenase in chronic wounds. *Plast Reconstr Surg*. 1999 Sep; 104(4): 1205-6.
92. Bettinger DA, Pellicane JV, Tarry WC, Yager DR, Diegelmann RF, Lee R, Cohen IK, DeMaria EJ. The role of inflammatory cytokines in wound healing: accelerated healing in endotoxin-resistant mice. *J Trauma*. 1994 Jun; 36(6): 810-3; discussion 813-4.
93. Graham MF, Willey A, Adams J, Yager D, Diegelmann RF. Interleukin 1 beta down-regulates collagen and augments collagenase expression in human intestinal smooth muscle cells. *Gastroenterology*. 1996 Feb; 110(2): 344-50.
94. West-Mays JA, Cook JR, Sadow PM, Mullady DK, Bargagna-Mohan P, Strissel KJ, Fini ME. Differential inhibition of collagenase and interleukin-1alpha gene expression in cultured corneal fibroblasts by TGF-beta, dexamethasone, and retinoic acid. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1999 Apr; 40(5): 887-96.
95. Cronin K, Jackson DS, Dunphy JE. Changing bursting strength and collagen content of the healing colon. *Surg Gynecol Obstet*. 1968 Apr; 126(4): 747-53.
96. Graham MF, Drucker DE, Diegelmann RF, Elson CO. Collagen synthesis by human intestinal smooth muscle cells in culture. *Gastroenterology*. 1987 Feb; 92(2): 400-5.
97. Martens MF, Huyben CM, Hendriks T. Collagen synthesis in fibroblasts from human colon: regulatory aspects and differences with skin fibroblasts. *Gut*. 1992 Dec; 33(12): 1664-70.
98. Martens MF, Hendriks T. Postoperative changes in collagen synthesis in intestinal anastomoses of the rat: differences between small and large bowel. *Gut*. 1991 Dec; 32(12): 1482-7.
99. Mast BA. Healing in other tissues. *Surg Clin North Am*. 1997 Jun; 77(3): 529-47.

100. Schrock T, Cerra F, Hawley PR, Hunt TK, Nichols RL, Samson RB. Wounds and wound healing. *Dis Colon Rectum*. 1982 Jan-Feb; 25(1): 1-15.
101. Hogstrom H, Haglund U, Zederfeldt B. Tension leads to increased neutrophil accumulation and decreased laparotomy wound strength. *Surgery*. 1990 Feb; 107(2): 215-9.
102. Foster ME, Laycock JR, Silver IA, Leaper DJ. Hypovolaemia and healing in colonic anastomoses. *Br J Surg*. 1985 Oct; 72(10): 831-4.
103. Yasue N, Guth PH. Role of exogenous acid and retransfusion in hemorrhagic shock-induced gastric lesions in the rat. *Gastroenterology*. 1988 May; 94(5 Pt 1): 1135-43.
104. Carrico TJ, Mehrhof AI Jr, Cohen IK. Biology of wound healing. *Surg Clin North Am*. 1984 Aug; 64(4): 721-33.
105. Oğuz M. Genel cerrahi tanı ve tedavi ilkeleri. Ankara 2000, s:131-144.
106. Foster RS Jr, Costanza MC, Foster JC, Wanner MC, Foster CB. Adverse relationship between blood transfusions and survival after colectomy for colon cancer. *Cancer*. 1985 Mar 15; 55(6): 1195-201.
107. Foster RS Jr. Blood transfusions for surgical cancer patients: more harm than good? *Eur J Cancer Clin Oncol*. 1987 Oct; 23(10): 1435-7.
108. Efron JE, Frankel HL, Lazarou SA, Wasserkrug HL, Barbul A. Wound healing and T-lymphocytes. *J Surg Res*. 1990 May; 48(5): 460-3.
109. Schrock TR, Deveney CW, Dunphy JE. Factor contributing to leakage of colonic anastomoses. *Ann Surg*. 1973 May; 177(5): 513-8.
110. Tadros T, Wobbes T, Hendriks T. Blood transfusion impairs the healing of experimental intestinal anastomoses. *Ann Surg*. 1992 Mar; 215(3): 276-81.
111. Kaplan J, Sarnaik S, Gitlin J, Lusher J. Diminished helper/suppressor lymphocyte ratios and natural killer activity in recipients of repeated blood transfusions. *Blood*. 1984 Jul; 64(1): 308-10.
112. Getzen LC. Clinical use of everted intestinal anastomoses. *Surg Gynecol Obstet*. 1966 Nov; 123(5): 1027-36.
113. Cummings BJ. Effect of preoperative irradiation on the healing of colorectal anastomoses. *Am J Surg*. 1985 May; 149(5): 695-7.
114. Morgenstern L, Sanders G, Wahlstrom E, Yadegar J, Amodeo P. Effect of preoperative irradiation on healing of low colorectal anastomoses. *Am J Surg*. 1984 Feb; 147(2): 246-9.
115. Christensen H, Oxlund H, Laurberg S. Postoperative biosynthetic human growth hormone increases the strength and collagen deposition of experimental colonic anastomoses. *Int J Colorectal Dis*. 1991 Aug; 6(3): 133-8.
116. Irvin TT, Hunt TK. Pathogenesis and prevention of disruption of colonic anastomoses in traumatized rats. *Br J Surg*. 1974 Jun; 61(6): 437-9.
117. Hesp FL, Hendriks T, Lubbers EJ, de Boer HH. Wound healing in the intestinal wall. Effects of infection on experimental ileal and colonic anastomoses. *Dis Colon Rectum*. 1984 Jul; 27(7): 462-7.
118. Goligher JC, Graham NG, De Dombal FT. Anastomotic dehiscence after anterior resection of rectum and sigmoid. *Br J Surg*. 1970 Feb; 57(2): 109-18.
119. Hendriks T, Walter J, Mastboom B. Healing of experimental intestinal anastomoses. Parameters for repair. *Dis Colon Rectum*. 1990 Oct; 33(10): 891-901.

120. Phillips JD, Kim CS, Fonkalsrud EW, Zeng H, Dindar H. Effects of chronic corticosteroids and vitamin A on the healing of intestinal anastomoses. *Am J Surg.* 1992 Jan; 163(1): 71-7.
121. Brennan SS, Foster ME, Morgan A, Leaper DJ. Prostaglandins in colonic anastomotic healing. *Dis Colon Rectum.* 1984 Nov; 27(11): 723-5
122. de Oliveira PG, Soares EG, Aprilli F. Influence of misoprostol, a synthetic prostaglandin E1 analog, on the healing of colonic anastomoses in rats. *Dis Colon Rectum.* 1994 Jul; 37(7): 660-3.
123. Graham MF, Diegelmann RF, Elson CO, Lindblad WJ, Gotschalk N, Gay S, Gay R. Collagen content and types in the intestinal strictures of Crohn's disease. *Gastroenterology.* 1988 Feb; 94(2): 257-65.
124. Wahl SM, Hunt DA, Wakefield LM, McCartney-Francis N, Wahl LM, Roberts AB, Sporn MB. Transforming growth factor type beta induces monocyte chemotaxis and growth factor production. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987 Aug; 84(16): 5788-92.
125. Mustoe TA, Landes A, Cromack DT, Mistry D, Griffin A, Deuel TF, Pierce GF. Differential acceleration of healing of surgical incisions in the rabbit gastrointestinal tract by platelet-derived growth factor and transforming growth factor, type beta. *Surgery.* 1990 Aug; 108(2): 324-9; discussion 329-30.
126. Slavin J, Nash JR, Kingsnorth AN. Effect of transforming growth factor beta and basic fibroblast growth factor on steroid-impaired healing intestinal wounds. *Br J Surg.* 1992 Jan; 79(1): 69-72.
127. Christensen H, Oxlund H. Growth hormone increases the collagen deposition rate and breaking strength of left colonic anastomoses in rats. *Surgery.* 1994 Sep; 116(3): 550-6.
128. Roediger WE. Role of anaerobic bacteria in the metabolic welfare of the colonic mucosa in man. *Gut.* 1980 Sep; 21(9): 793-8.
129. Aguilar-Nascimento JE, Mathie RT, Man WK, Williamson RC. Enhanced intra-anastomotic healing by operative lavage with nutrient solutions in experimental left-sided colonic obstruction. *Br J Surg.* 1995 Apr; 82(4): 461-4.
130. Ward MW, Danzi M, Lewin MR, Rennie MJ, Clark CG. The effects of subclinical malnutrition and refeeding on the healing of experimental colonic anastomoses. *Br J Surg.* 1982 Jun; 69(6): 308-10.
131. Graham MF, Willey A, Adams J, Yager D, Diegelmann RF. Role of ascorbic acid in procollagen expression and secretion by human intestinal smooth muscle cells. *J Cell Physiol.* 1995 Feb; 162(2): 225-33.
132. LeVeen HH, Wapnick S, Falk G, Olivas O, Bhat D, Gaudre M, Patel M. Effects of prophylactic antibiotics on colonic healing. *Am J Surg.* 1976 Jan; 131(1): 47-53.
133. Ahrendt GM, Gardner K, Barbul A. Loss of colonic structural collagen impairs healing during intra-abdominal sepsis. *Arch Surg.* 1994 Nov; 129(11): 1179-83.
134. Ahrendt GM, Tantry US, Barbul A. Intra-abdominal sepsis impairs colonic reparative collagen synthesis. *Am J Surg.* 1996 Jan; 171(1): 102-7; discussion 107-8.
135. 55. Bert P. La Pression Barometrique. *Recherches de Physiologie Experimentale.* Masson, Paris, 1878.
136. Erslev AJ. Blood and mountains. In: Wintrobe MM, ed. *Blood, Pure and Eloquent.* New York: McGraw Hill, 1980: 257-80.
137. Groopman JE, Itri LM. Chemotherapy-induced anemia in adults: incidence and treatment. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91: 1616-34.
138. Carnot P, Deflandre C. Sur l'activite hemopoietique du serum au cours de la regeneration du sang. *C R Acad Sci (Paris)* 1906; 143: 384-86.

139. Bonsdorff E, Jalavisto E. A humoral mechanism in anoxic erythrocytosis. *Acta Physiol Scand* 1948; 16: 150-70.
140. Lai PH, Everett R, Wang FF et al. Structural characterization of human erythropoietin. *J Biol Chem* 1986; 261: 3116-21.
141. Sasaki H, Bothner B, Dell A et al. Carbohydrate structure of erythropoietin expressed in Chinese hamster ovary cells by a human erythropoietin cDNA. *J Biol Chem* 1987; 262: 12059-76.
142. Recny MA, Scoble HA, Kim Y. Structural characterization of natural human urinary and recombinant DNA-derived erythropoietin. Identification of des-arginine 166 erythropoietin. *J Biol Chem* 1987; 262: 17156-63.
143. Terence r. Lappin,a a. Peter maxwell,b patrick g. Johnstone EPO's Alter Ego: Erythropoietin Has Multiple Actions *Stem Cells* 2002; 20: 485-92
144. 60. Jacobson L.O., Goldwasser E., Fried W. & Plzak L. Role of the kidney in erythropoiesis. *Nature* 1957; 633-634.
145. Erslev A.J. In vitro production of erythropoietin by kidneys perfused with a serum free solution. *Blood* 1974; 44: 77-85.
146. Lacombe. C., Dasilva J.L., Bruneval P., Fournier J.G., Wendling F., Casadevall N., Camilleri J.P., Bariety J., Varet B. & Tambourin P. Peritubular cells are the site of erythropoietin synthesis in the murine hypoxic kidney. *Journal of Clinical Investigation* 1988; 81: 620-23.
147. Macdougall I.C., Cavill I., Davies M.E., Hutton R.D., Coles G.A. & Williams J.D. Subcutaneous recombinant erythropoietin in the treatment of renal anaemia in CAPD patients. *Contributions to Nephrology* 1989; 76: 219-26.
148. Mujais S.K., Beru N., Pullman T.N. & Goldwasser E. Erythropoietin is produced by tubular cells of the rat kidney. *Cell Biochemistry and Biophysics* 1999; 30: 153-66.
149. Jacobson L.O., Marks E.K., Gaston E.O. & Goldwasser E. Studies on erythropoiesis XI. Reticulocyte response of transfusion induced polycythaemic mice to anemic plasma from nephrectomised mice and to plasma from nephrectomised rats exposed to low oxygen. *Blood* 1959; 14: 635-43.
150. Koury S.T., Bondurant M.C., Koury M.J. & Semenza G.L. Localization of cells producing erythropoietin in murine liver by in-situ hybridization. *Blood* 1991; 77: 2497-503.
151. Zanjani E.D., Peterson E.N., Gordon A.S. & Wasserman L.R. Erythropoietin production in the fetus: role of the kidney and maternal anaemia. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 1974; 83: 281-7.
152. Dame C., Fahrenstich H., Freitag P., Hofmann D., Abdul-Nour T., Bartmann P. & Fandrey J. Erythropoietin mRNA expression in human fetal and neonatal tissue. *Blood* 1998; 92: 3218-25.
153. Law M.L., Cai G., Lin F., Wei Q., Huang S., Hartz J.H., Morse H., Lin C., Jones C. & Kao F. Chromosomal assignment of the human erythropoietin gene and its DNA polymorphism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States* 1986.
154. Shoemaker C.B. & Mitsock L.D. Murine erythropoietin gene; Cloning, expression and human gene homology. *Molecular and Cellular Biology* 1986; 6: 849-58.
155. Schooley J.C. & Mahlmann L.J. Evidence for the de novo synthesis of erythropoietin in hypoxic rats. *Blood* 1972; 40: 662-70.
156. Erslev A.J. & Caro J. Physiologic and molecular biology of erythropoietin. *Medical Oncology and Tumour Pharmacotherapy* 1986; 3: 159-64.
157. Maxwell AP. Novel erythropoiesis stimulating protein in the management of the anemia of chronic renal failure. *Kidney Int* 2002; 62: 720-29.

158. Lin FK, Suggs S, Lin CH et al. Cloning and expression of the human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: 7580-84.
159. Jacobs K, Shoemaker C, Rudersdorf R et al. Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin. *Nature* 1985; 313: 806-10.
160. Clowes AW, Reidy MA, Clowes MM. Kinetics of cellular proliferation after arterial injury, smooth muscle growth in the absence of endothelium. *Lab Invest* 1983; 49: 327-33.
161. Haundenschild CC, Schwartz SM. Endothelial regeneration, II; restitution of endothelial continuity. *Lab Invest* 1979; 41: 407-18.
162. Meurice T, Bauters C, Auffray JL, Vallet B, Hamon M, Vaterno F, Belle EV, Lablanuette JM, Betrand ME. Basic fibroblast growth factor restores endothelium-dependent responses after balloon injury of rabbit arteries. *Circulation* 1996; 93: 18-22.
163. Gerber HP, McMurtry A, Kowalski J, et al. Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway: requirement for Flk-1/KDR activation. *J Biol Chem.* 1998; 273: 30336-43.
164. Morales-Ruiz M, Fulton D, Sowa G, et al. Vascular endothelial growth factor-stimulated actin reorganization and migration of endothelial cells is regulated via the serine/threonine kinase. *Act. Circ Res.* 2000; 86: 892-96.
165. Terence r. Lappin, a. a. Peter maxwell, b. patrick g. Johnstone EPO's Alter Ego: Erythropoietin Has Multiple Actions *Stem Cells* 2002; 20: 485-92
166. Anagnostou A, Lee ES, Kessimian N et al. Erythropoietin has a mitogenic and positive chemotactic effect on endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 5978-82.
167. Nagai T, Akizawa T, Nakashima Y et al. Effects of rHuEpo on cellular proliferation and endothelin-1 production in cultured endothelial cells. *Nephrol Dial Transplant* 1995; 10: 1814-19.
168. Carlini RG, Alonzo EJ, Dominguez J et al. Effect of recombinant human erythropoietin on endothelial cell apoptosis. *Kidney Int* 1999; 55: 546-53.
169. Alvarez Arroyo MV, Castilla MA, Gonzalez Pacheco FR et al. Role of vascular endothelial growth factor on erythropoietin-related endothelial cell proliferation. *J Am Soc Nephrol* 1998; 9: 1998-2004.
170. Vogel V, Kramer HJ, Backer A et al. Effects of erythropoietin on endothelin-1 synthesis and the cellular calcium messenger system in vascular endothelial cells. *Am J Hypertens* 1997; 10: 289-96.
171. Morakkabati N, Gollnick F, Meyer R et al. Erythropoietin induces Ca²⁺ mobilization and contraction in rat mesangial and aortic smooth muscle cultures. *Exp Hematol* 1996; 24: 392-97.
172. Liefelt L, Schmidt-Ott KM, Orzechowski HD et al. Transcriptional regulation of endothelin-1 by erythropoietin in endothelial cells. *J Cardiovasc Pharmacol* 1998; 31: 464-66.
173. Carlini RG, Dusso AS, Obialo CI et al. Recombinant human erythropoietin (rHuEPO) increases endothelin-1 release by endothelial cells. *Kidney Int* 1993; 43: 1010-14.
174. Carlini RG, Reyes AA, Rothstein M. Recombinant human erythropoietin stimulates angiogenesis in vitro. *Kidney Int* 1995; 47: 740-5.
175. Kai J, Korff K, Mona TK, Stefan G, Karl-HK. Erythropoietin and VEGF Exhibit Equal Angiogenic Potential *Microvascular Research* 2002; 64: 326-33.
176. Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu XF, Breitman ML, and Schuh AC. Failure of blood island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* 1995; 376: 62-6.

177. Sabin F. Studies on the origin of blood vessels and of red corpuscles as seen in the living blastoderms of chicks during the second day of incubation. *Contrib. Embryol. Carnege Inst. Washington* 1920; 9: 214.
178. Ribatti D, Presta M, Vacca A, Ria R, Giuliani R, Dell'Era P, Nico B, Roncali L, and Dammacco F. Human erythropoietin induces a pro-angiogenic phenotype in cultured endothelial cells and stimulates neovascularization in vivo. *Blood* 1999; 93: 2627-36.
179. Kling PJ, Sullivan TM, Roberts RA, et al. Human milks as a potential enteral source of erythropoietin. *Pediatr Res* 1998; 43: 216-21.
180. Juul SE, Zhao Y, Dame JB, et al. Origin and fate of erythropoietin in human milk. *Pediatr Res* 2000; 48: 660-7.
181. Carmichael RD, LoBue J, Gordon AS. Neonatal erythropoiesis. II. Bone marrow and splenic erythropoietic activity: Data suggest erythropoietin transfer via maternal milk. *Endocr Regul* 1992; 26: 143-9.
182. Carmichael RD, LoBue J, Gordon AS. Neonatal erythropoiesis. I. Peripheral blood erythropoietic parameters: Data suggest erythropoietin transfer via maternal milk. *Endocr Regul* 1992; 26: 83-8.
183. Juul SE, Yachnis AT, Christensen RD. Tissue distribution of erythropoietin receptor in the developing human fetus. *Early Hum Dev* 1998; 52: 235-49.
184. Juul SE, Joyce AE, Zhao Y, et al. Why is erythropoietin present in human milk? Studies of erythropoietin receptors on enterocytes of human and rat neonates. *Pediatr Res* 1999; 46: 263-8.
185. Ledbetter DJ, Juul SE. Erythropoietin and the incidence of necrotizing enterocolitis in infants with very low birth weight. *Pediatr Surg* 2000; 35: 178-82.
186. Juul SE, Ledbetter DJ, Joyce AE, Dame C, Christensen RD, Zhao Y and DeMarco V. Erythropoietin acts as a trophic factor in neonatal rat intestine. *Gut* 2001; 49: 182-189.
187. Jaquet K, Krause K, Tawakol-Khodai M, Geidel S, Kuck KH. Erythropoietin and VEGF exhibit equal angiogenic potential. *Microvasc Res.* 2002; 64: 326-33.
188. Aox34. Heesch C, Aicher A, Lehmann R, Fichtlscherer S, Vasa M, Urbich C, Mildner-Rihm C, Martin H, Zeiher AM, Dammeler S. Erythropoietin is a potent physiologic stimulus for endothelial progenitor cell mobilization. *Blood*. 2003; 102: 1340-6. Jelkman W. Biology of erythropoietin. *Clin invest* 1994; 72: 3-10.
189. Bauer C. Erythropoietin from gene structure to therapeutic applications. *J Perinat Med* 1995; 23: 77-81.
190. Sasaki R, Masuda S, Nagao M. Erythropoietin: multiple physiological functions and regulation of biosynthesis. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2000; 64: 1775-93.
191. Marti HH, Wenger RH, Rivas LA, Straumann U, Digicaylioglu M, Henn V, Yonekawa Y, Bauer C, Gassmann M. Erythropoietin gene expression in human, monkey and murine brain. *Eur J Neurosci.* 1996; 8: 666-76.
192. Bernaudin M, Marti HH, Roussel S, Divoux D, Nouvelot A, MacKenzie ET, Petit E. A potential role for erythropoietin in focal permanent cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1999; 19: 643-51.
193. Calvillo L, Latini R, Kajstura J, Leri A, Anversa P, Ghezzi P, Salio M, Cerami A, Brines M. Recombinant human erythropoietin protects the myocardium from ischemia-reperfusion injury and promotes beneficial remodeling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003; 100: 4802-6.
194. Moon C, Krawczyk M, Ahn D, Ahmet I, Paik D, Lakatta EG, Talan MI. Erythropoietin reduces myocardial infarction and left ventricular functional decline after coronary artery ligation in rats. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003; 100: 11612-7.
195. Rolandelli RH, Koruda MJ, Settle RG, Rombeau JL. Effects of intraluminal infusion of short-chain fatty acids on the healing of colonic anastomosis in the rat.

- Surgery. 1986 Aug; 100(2): 198-204.
196. Tekin F, Ersoy E, Kantarcı S. Hemostaz ve Kan Transfüzyonu. Ankara; 2000; 86-88.
197. Hirata K, Konishi T, Ueda Y, Kurosaki S, Tomisaki I, Nasu K, Mitsuhashi K, Miyauchi D, Yamaguchi M, Itoh H. Healing in the intestinal anastomosis--comparison of the Albert-Lembert and Gambee methods. J UOEH. 2000 Mar 1; 22(1): 1-6.
198. Bucknall TE. The effect of local infection upon wound healing: an experimental study. Br J Surg. 1980 Dec; 67(12): 851-5.
199. Schrock TR, Deveney CW, Dunphy JE. Factor contributing to leakage of colonic anastomoses. Ann Surg. 1973 May;177(5): 513-8.
200. Rousselot L, Slattey JR. Immediate complications of surgery of the large intestine. Surg Clin North Am. 1964 Apr; 44: 397-410.
201. Brain SD. Sensory neuropeptides: their role in inflammation and wound healing. Immunopharmacology. 1997 Oct; 37(2-3): 133-52.
202. Mitsuhashi M, Payan DG. The mitogenic effects of vasoactive neuropeptides on cultured smooth muscle cell lines. Life Sci. 1987 Mar 2; 40(9): 853-61.
203. Laato M. The effect of epidermal growth factor on granulation tissue formation in the rat. Acta Chir Scand Suppl. 1988; 546: 1-44.
204. Carrico TJ, Mehrhof AI Jr, Cohen IK. Biology of wound healing. Surg Clin North Am. 1984 Aug; 64(4): 721-33.