

Venöz Mikroanastomoza Eritropoietinin Etkileri

The Effects of Erythropoietin on Venous Microanastomosis

Adem Özkan¹, Zekeriya Tosun², Mustafa Cihat Avunduk³, Nedim Savacı⁴

¹BSK Konya Hastanesi Plastik ve Rekonstrüktif Cerrahi Kliniği, ²Selçuk Üniversitesi Selçuklu Tıp Fakültesi Plastik ve Rekonstrüktif Cerrahi A.D., ³Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi, ⁴Patoloji A.D., ⁵Plastik ve Rekonstrüktif Cerrahi A.D., Konya

Özet

Mikrocerrahide hızlı ilerlemeler olmasına rağmen venöz mikroanastomoz alanındaki problemler hala devam etmektedir. Serbest doku transferleri ve replantasyon komplikasyonlarının major nedeni venöz mikroanastomoz trombozudur. Eritropoietin, eritroid progenitor ve endotelial hücrelerin proliferasyonu ve farklılaşmasından sorumlu en önemli hematopoietik düzenleyicidir. Bu çalışmanın amacı venöz mikroanastomoz alanındaki komplikasyonları gözlemlemek ve eritropoietinin buna karşı koruyucu etkisini araştırmaktır. Yetmiş sekiz adet Sprague- Dawley cinsi erkek rat kontrol ve eritropoietin olarak iki gruba ayrıldı; bu iki grup da 3., 5. ve 7. gün olmak üzere üç alt gruba ayrıldı. Çalışma modeli olarak rat dorsal penil veni kullanıldı. Tüm eritropoietin gruplarına anastomoz anında ve her 48 saatte bir 150 IU/kg dozda eritropoietin uygulandı. Venöz anastomoz sonrası 3., 5. ve 7. günlerde değerlendirilmek üzere penil ven anastomoz hattı ve kan örnekleri alındı. Her bir venöz segmentin morfometrik analizi aynı araştırmacı tarafından Clemex® analiz programı ile yapılarak neointima ve media alanları ölçüldü ve neointima/media oranları hesaplandı. 3., 5. ve 7. günlerde tüm ratların hematokrit değerleri ölçüldü. 3. ve 5. günlerde eritropoietin gruplarında kontrol gruplarına göre intima/media oranları anlamlı derecede daha düşük bulundu. 7. gün için kontrol ve eritropoietin grupları arasında anlamlı fark bulunmadı. Hematokrit değerleri için 3., 5. ve 7. günlerde kontrol ve eritropoietin grupları arasında fark bulunmadı. Çalışmamız rat dorsal penil veninde mikrovasküler anastomoz sonrası eritropoietin uygulamasının endotelial rejenerasyonu hızlandırarak intimal formasyonu ve trombüs riskini önemli derecede azalttığını göstermiştir.

Anahtar kelimeler: mikrovenöz anastomoz, eritropoietin, endotel iyileşme

Abstract

Although microsurgery has rapid advanced, problems at the site of venous microanastomosis still continue. Thrombosis of the venous microanastomosis is the major reason for free tissue transfer and replantation complications. Erythropoietin is a principal hematopoietic regulator responsible for the proliferation and differentiation of erythroid progenitor cells and endothelial cells. Aim of this study is to observe the complications of microvenous anastomosis line and to investigate the protective effects of erythropoietin. Seventy eight Sprague-Dawley rats were divided into two groups (Control and Erythropoietin), and the groups were subdivided into three groups (3rd, 5th and 7th days). Rat dorsal penil vein was the study model. One-hundred-fifty IU/kg Erythropoietin was administrated via subcutaneously instantly venous anastomosis and every 48 hours to all Erythropoietin groups. Penil vein anastomosis line samples and blood samples were taken for assesment at 3rd, 5th and 7th days, after venous anastomosis. Morphometric analysis of each venous segment was done with a Clemex analysis program by the same examiner. Neointimal and medial areas were measured in each section and the neointima/media ratio was calculated. Haematocrit values were measured in all rats for 3rd, 5th and 7th days. The ratio of intima to medial areas were significantly less in Erythropoietin groups for 3rd and 5th days compared to control groups for the same days. There were no significant difference for the ratio of intima to medial areas between the control and erythropoietin groups for 7th day. There were no significant difference for haematocrit levels between the control and erythropoietin groups at 3rd, 5th and 7th days. Our study has shown that erythropoietin administration markedly reduced intimal formation and risk of thrombosis with accelerated endothelial regeneration after microvascular anastomosis in rat dorsal penil vein.

Key words: microvenous anastomosis, erythropoietin, endothelial healing

GİRİŞ

Mikrovasküler anastomoz kaçınılmaz olarak damar duvarı endotel ve subendoteline zarar vermektedir. Subendotelin açığa çıkması kan akımı sırasında trombosit agregasyonuna neden olur (1). Perfüzyon sonrası ilk 30 dakika içerisinde anastomoz alanı trombojenitesinin maksimal olduğu bilinmektedir (2). Kan akımı sağlandıktan sonra ilk 5 dakika

içinde açığındaki subendotel sahasını fibrin ağı kaplamaya başlar, 3. veya 4. günde tamamlanır. 48. saatten sonra endotelial büyüme iğne deliklerinde görülmeye başlar, 72 saat sonra iğne deliklerinin yaklaşık % 47'sinde endotelial büyüme görülür (3). Defekt alanı kapatan yeni endotelial hücreler (EH) normal endotelden orijin almaktadır (4). Bu süreçteki endotel iyileşmesinin hızlandırılması trombozun

önlenmesinde, dolayısıyla replantasyon, revaskülarizasyon ve flep cerrahisi başarısında oldukça önemlidir.

Tromboz, mikrocerrahi operasyonlarından sonra anastomoz hattında görülebilecek en önemli komplikasyondur ve en sık venlerde görülmektedir. Serbest doku aktarımlarından sonra flep yetmezliklerinin major nedeni venlere ait komplikasyonlardır (5, 6, 7, 8). Klinik uygulamada sık karşılaşılan bir sorun olması sebebiyle çalışmada venöz anastomoz modeli kullanıldı.

Eritropoietin, primer olarak böbreklerden salgılanır. Dolaşımdaki eritropoietin kemik iliğinde eritrosit öncülü hücrelerin çoğalmasını ve eritroblastlara farklılaşmasını uyurarak eritrositlerin üretimini düzenler ve doku oksijenlenmesinin kontrolünde rol alır (9). Eritropoietik hücreler ve endotel hücreleri 'hemangioblast' adlı ortak ana hücreden köken aldıkları için (10) Eritropoietinin pozitif etkileri eritropoietik sisteme olduğu kadar EH üzerine de vardır (11, 12). Endotelyal hücreler bir eritropoietin reseptörüne sahiptir. Eritropoietin reseptörünün endotel hücrelerindeki varlığı hem in vitro hem de in vivo olarak gösterilmiştir (13). Eritropoietin hem matür EH'ni etkiler, hem de kemik iliğinden dolaşıma geçen EH öncüleri sayısını artırmaktadır (10, 14). Bu çalışma, Eritropoietinin venöz anastomoz üzerine olası pozitif etkilerinin araştırılması amacıyla planlandı.

GEREÇ ve YÖNTEM **Çalışma protokolü**

Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi (SÜDAM) hayvan etik kurulu'nun 15-12-2003 tarih ve 2003/60 no.lu izni ile çalışma planlandı. Çalışma, ağırlıkları 300- 380 g arasında olan yetmiş sekiz adet erkek Sprague-Dawley cinsi erkek rat üzerinde yapıldı. Deneysel hayvanlarının tamamı standart fiziki şartların sağlandığı odalarda 12 saat karanlık, 12 saat aydınlıkta ve 22±1 °C sıcaklıkta ayrı ayrı kafeslerde tutuldu ve standart rat diyeti ile beslendi. Ratlar kontrol ve eritropoietin olmak üzere iki gruba ayrıldı. Bu gruplar da 3., 5. ve 7. gün olmak üzere 3 alt gruba ayrıldı. Çalışma modeli olarak rat dorsal penil ven kullanıldı. Kontrol gruplarına hiçbir tedavi uygulanmadı. Tüm eritropoietin gruplarına anastomoz anında ve her 48 saatte bir 150 IU/kg dozda rekombinant insan eritropoietini (rHuEPO) (Eprex® flakon 2000 IU, Santa Farma) subkutan uygulandı. Anastomozdan sonra 3., 5. ve 7. günlerde penil ven anastomoz hattı ve kan örnekleri alındı. Her bir venöz segmentin morfometrik analizi aynı araştırıcı tarafından Clemex® analiz programı ile yapıldı. Bu programla her bir segmentin neointima ve media alanları ölçüldü ve neointima/media (İ/M) oranları hesaplandı. Ayrıca 3., 5. ve 7. günlerde tüm ratların hematokrit değerleri ölçüldü. Tüm cerrahi işlem ve anastomozlar aynı cerrah tarafından yapıldı.

Cerrahi teknik

Tüm deney hayvanlarında 35 mg/kg ketamin hidroklorür (Ketalar® 50 mg/ml flakon, Pfizer) ve 5 mg/kg xylazine (Ronpun® flk, Bayer) intramusküler uygulanarak anestezi sağlandı. Karın ve pubis bölgesi traş edilerek sırtüstü pozisyonda operasyon masasına tesbit edildiler. %10'luk betadine antiseptik solüsyon kullanılarak deri antisepsisi

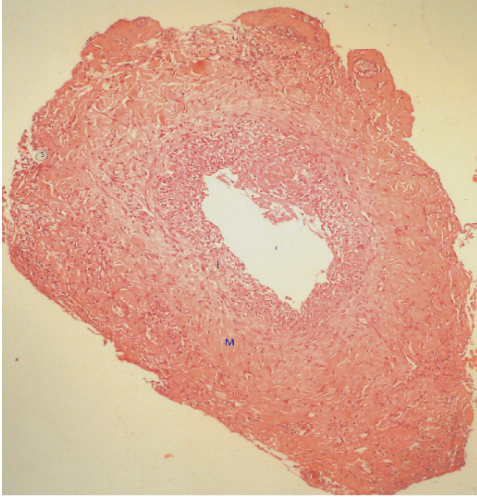
sağlandı. Tek parmakla penis dorsali üzerine hafifçe basınç uygulayarak dorsal penil ven topografik olarak tespit edildi. 15 numaralı bistüri ile pubis üzerinde yaklaşık 1,5 cm transvers insizyonla cilt ve cilt altı açıldı. Oluşan superior ve inferior cilt flepleri 5/0 ipek sütürla karın ve penil cilde tutturularak iyi bir çalışma alanı ve görünüm sağlandı. İnsizyon derinleştirilerek subcutis ve gevşek areolar doku geçildi. Operasyon mikroskobu (Carl Zeiss OPMI 9-FC, Germany) altında mikropenset (Medicon CN: 07.64.74, Germany) ve mikrodiseksiyon makasıyla (Medicon CN: 05.15.81, Germany) Buck's fasyası keskin diseksiyonla açılarak penil ven ekspoze edildi. Dorsal penil ven birlikte seyrettiği sinirlerle bulunduğu oluktan künt diseksiyonla ayrıldı. Sonra sinirler korunarak sinirlerden de künt diseksiyonla ayrılarak aproksimatör yerleştirilecek şekilde ortaya konuldu. Penil dorsal ven çerçeveli double Acland aproksimatörlü mikroklemple (S&T, ABB-1-00408V, Switzerland) ile klempe edildi. Ven damar aksına vertikal olarak kesilerek % 0,5 heparin (Nevparin® 5000 IU/ml flakon- Mustafa Nevzat) solüsyonu ile damar lümeni temizlendi. Damar spazmını ve kollapsını engellemek için % 25'lik bupivakaine (Markaine® flakon- AstraZeneca) ve trombüsü engellemek için % 0,5 heparin (Nevparin® 5000IU/ml flakon- Mustafa Nevzat) lokal olarak anastomoz hattına uygulandı. Mikrodiseksiyon makası ve mikro-penset kullanılarak anastomoz hattındaki adventisya uzaklaştırıldı. 10/0- 70µ yuvarlak iğneli polyamid monofilament (Dafilon®- Braun) sütün kullanılarak standart triangülasyon tekniğine uygun 6 veya 8 sütürla anastomoz tamamlandı. Aproksimatör eski pozisyonuna getirilerek mikroklempleri önce proksimal sonra distal olmak üzere açıldı. Minimal anastomoz kaçağı olduğu durumlarda izotonik ile ıslatılmış tampon uygulanarak hemostaz sağlandı. Anastomoz hattının hemen cilt altında kalmasını engellemek amacıyla gevşek areolar doku sütüre edilerek cilt 5/0 ipekle kapatıldı. Ortalama cerrahi süresi 20 dakika olarak tespit edildi (16-24 dk). Anastomozdan 25 dakika sonra sağma (patency) testi ile anastomoz açıklıkları değerlendirildi. Bu şekilde tam cerrahi süresi ortalama 50 dakika olarak değerlendirildi. Hiçbir reolojik ajan kullanılmadı. Anastomoz hattını içeren 2 mm. uzunluğunda penil ven örnekleri alındı. Örnekler alındıktan sonra ratların yaşamları sonlandırıldı. Cerrahi manipülasyon farklılıklarını ortadan kaldırmak için bütün anastomozlar ve numune alınma işlemleri aynı cerrah tarafından yapıldı.

Makroskopik Değerlendirme

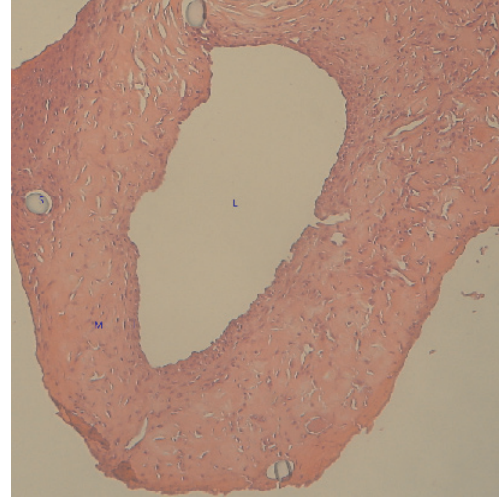
Ratlar 3., 5. ve 7. günlerde yaşamları sonlandırılmadan önce anastomoz alanları sağma testi ile açıklıkları ve tromboz yönünden değerlendirildi. Tromboze venler histolojik değerlendirmeye alınmadı ve yeni ratlar ilave edildi.

Histolojik Analiz

Alınan doku örnekleri % 10'luk formaldehid ile tesbit edildikten sonra ototeknikon cihazı ile doku takibine alındı. 24 saat sonra doku örnekleri vertikal olarak parafin bloklara gömüldü. Mikrotom ile 5µm kesitler alınarak önce Hematoksilin Eozin, daha sonra da Van Gieson's boyaları ile boyandı. Boyanan preparatlar Nikon Eclipse E400 ışık mikroskobu ile incelendi ve ışık mikroskobuna bağlı Nikon Coolpix5000 digital fotoğraf



Şekil 1. Kontrol grubu 7. güne ait histolojik görünüm. İleri derecede intima hiperplazisi olduğu görülmektedir. İ: intima, M: media, L: lümen, S: suture. HE, 40x

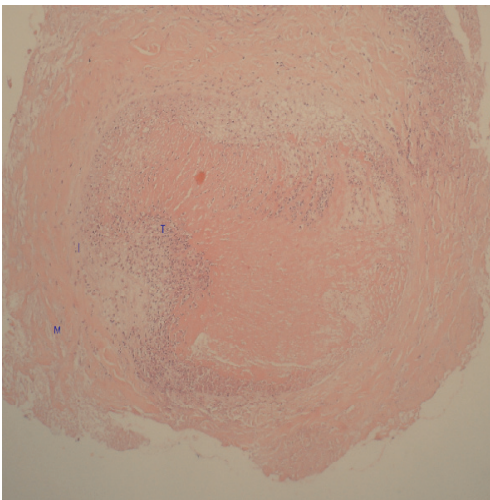


Şekil 2. Eritropoietin grubu 5. güne ait histolojik görünüm. İntima hiperplazinin baskılandığı media tabakasının daha baskın olduğu görülmektedir. İ: intima, M: media, L: lümen, S: suture. HE, 40x

makinesi ile aynı büyütme oranlarında görüntüleri. Tüm fotoğraflar bilgisayar ortamına aktarıldı (Şekil 1, 2, 3). Burada Clemex Vision Lite 3,5@ görüntü analizi sistemi ile intima ve media alanlarının birbirine oranları hesaplandı. Çalışmada her bir venöz segmentin morфометrik inceleme ve değerlendirmeleri aynı patolojik tarafından gerçekleştirildi.

İstatistiksel analiz

SPSS 12.0@ istatistik programında gruplar arası farklar Mann Whitney testi ile, grup içi farklar Wilcoxon Signed Ranks testi ile değerlendirildi. $P < 0,05$ değerleri anlamlı kabul edildi.



Şekil 3. Anastomoz hattında tromboz. Trombozun endotel bütünlüğünü bozduğuna dikkat ediniz. İ: intima, M: media, T: tromboz. HE, 40x

BULGULAR

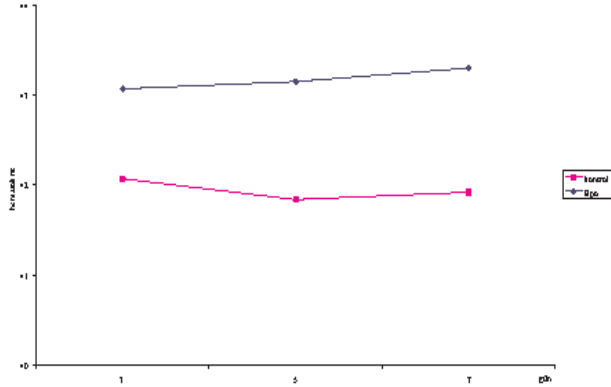
Eritropoietin alt gruplarında tromboz görülmezken, kontrol grubunda 2 adet tromboz gözlemlendi. Histolojik analizde, neointima ve media oranları 3. ve 5. günler için eritropoietin gruplarında kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında anlamlı derecede düşük bulundu ($p < 0.05$). 7. gün için her iki grup arasında fark bulunmadı ($p > 0.05$) (Şekil 4).

Kontrol ve eritropoietin grupları arasında tüm günler için hematokrit değerlerinde anlamlı fark bulunmadı ($p > 0.05$). Her iki grubun alt grupları arasında da anlamlı fark bulunmadı ($p > 0.05$) (Şekil 5).

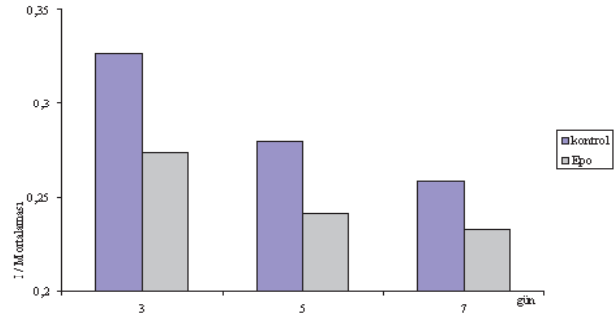
TARTIŞMA

Tromboz, mikrocerrahi operasyonlarından sonra anastomoz hattında görülebilecek en önemli komplikasyondur ve en sık olarak venlerde görülmektedir. Serbest doku aktarımlarından sonra flep yetmezliklerinin major nedeni venlere ait komplikasyonlardır (5, 6, 7, 8). Klinik uygulamada sık karşılaşılan bir sorun olması sebebiyle çalışmada venöz anastomoz modeli kullanıldı. Kas tabakasının az olması, venin kollabe olmasına yol açarak anastomoz sırasında teknik zorluğa ve sonrasında da tromboz oluşumuna neden olabilmektedir. 990 serbest doku aktarımını içeren bir çalışmada genel tromboz oranı % 5.1 olarak bulunmuş, bu trombozlardan % 54'ünün venöz tromboz olduğu görülmüştür (15). Bizim çalışmamızda kontrol grubunda görülen 2 tromboz (% 5) bu çalışmayla uyumludur. Eritropoietin grubunda tromboz görülmemesi, eritropoietinin iyileşmeye olan katkısıyla trombozu azalttığını düşündürmektedir.

Damar duvarının hasara primer cevabı ve iyileşme sürecinin bir parçası olan vasküler intima hiperplazisi küçük damarlarda tromboz ve restenoza neden olabilmektedir (16). 'Endotel iyileşmesinin hızlı olmasının intimal hiperplaziyle birlikte trombüs oluşumunu da azalttığına' dair birçok çalışma



Şekil 4. Hematokrit değerlerinin gruplara göre grafik dağılımı. Kontrol ve eritropoietin grupları arasında hematokrit değerleri arasında anlamlı fark bulunmadı ($p<0,05$).



Şekil 5. Endotelial iyileşmenin bir göstergesi olarak intima/media oranlarının gruplara göre grafik dağılımı. Kontrol ve eritropoietin grupları I/M değerlerinin karşılaştırılması. Kontrol ve eritropoietin grupları arasında 3. ve 5. günler arasında anlamlı fark bulundu ($p<0,05$). 7. günde anlamlı fark bulunamadı ($p>0,05$).

yapılmıştır (17, 18, 19). Sonuç reendotelizasyon ile intimal hiperplazi arasında ters bir orantının olduğunu göstermektedir. Yani reendotelizasyon ne kadar gecikirse inhibisyon olmadığı için intimal hiperplazi de o oranda fazla olmaktadır (17, 18). Bu bilgiden yola çıkılarak reendotelizasyon üzerine yapılan çoğu çalışmada intima ve media tabakalarının morfolojik olarak alan ölçümleri yapılarak intima/media (İ/M) oranı hesaplanmış ve bu oran reendotelizasyonun göstergesi olarak kabul edilmiştir (17, 18, 19, 20, 21). İ/M oranlarının düşük olması iyileşme lehine bulunmuştur (18). Bundan dolayı çalışmada reendotelizasyonun göstergesi olarak histomorfometrik intima/media alan oranlarının ölçülmesi yeterli bulundu.

Farmakokinetik çalışmalar subkutan enjeksiyondan sonra kan eritropoietin düzeyinin intravenöz uygulamadaki düzeyden rölatif olarak daha düşük olduğunu ve 48 saat boyunca düşük serum seviyesinin devam ettiğini göstermiştir. Bu etki eritropoietinin subkutan absorpsiyonunun yavaş olmasından dolayıdır (22). Subkutan enjeksiyondan sonra serum eritropoietin konsantrasyon değerlerinin uzun süreli stabil kalmasından dolayı enjeksiyonun her 48 saatte bir yapılması daha uygundur (22, 23). Bu nedenle çalışmada eritropoietin dozları 48 saat ara ile uygulandı. Standart 150 IU/kg dozunda yaklaşık 50 saat süreyle plazma eritropoietin değerleri 10 IU/L üzerinde bulunmuştur (24).

Ratlar üzerinde kısa süreli eritropoietin kullanımının hematokrit değerlerinde çalışma ve kontrol grupları arasında istatistiksel bir fark yapmadığı, uzun dönem eritropoietin kullanımında ise anlamlı fark olduğu gözlenmiştir (25). Aynı çalışmada 150 IU/kg doz uygulan grupta yine anlamlı fark bulunamamıştır. Biz de çalışmamızda eritropoietini düşük dozda 150 IU/kg subkutan uyguladık. Martino ve ark. haftada 3 kez 100 ile 300 IU/kg dozunda eritropoietin tedavisi alan 173 hasta üzerinde çalışmışlar ve eritropoietin tedavisi ile trombüs insidansında artma olmadığını göstermişlerdir (26). Çalışmamızda eritropoietin grubunda kontrole göre

hemoglobin değerlerinde artma gözlemledik ancak gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı.

Literatürde, vasküler hasar sonrası endotelizasyonun genellikle 7 ile 14 gün arasında tamamlandığı bildirilmektedir (27, 28, 29). Çalışmada 7. günde neointima ve media oranları arasında anlamlı farkın olmayışı, endotelizasyonun tamamlanmak üzere olduğunu bir göstergesidir. Eritropoietin böylece anastomoz alanının trombojenitesi için kritik dönem olan ilk 5 gün içinde endotelizasyonu artırarak mikrocerrahide serbest flep ya da replantın yaşayabilirliğini artırabilir.

Her ne kadar mikrovasküler cerrahide başarının temelinde en önemli rolü tekniğine uygun güvenli bir damar anastomozunun yapılması olsa da, anastomoz sonrası tıbbi destek de bu başarının devam ettirilmesinde önem arz etmektedir. Bu çalışmada eritropoietinin, anjiyogenik aktivitesinden kaynaklanan bu olumlu etkisi sayesinde serbest doku aktarımlarında anastomoz hattındaki reendotelizasyonu arttırabileceği ve olası trombotik komplikasyonları azaltabileceği gösterilmiştir.

KAYNAKLAR

- 1- Griffin JR, Thornton JF. Microsurgery: Free tissue transfer and replantation. Selected Readings in Plastic Surgery 2005;10:1-39.
- 2- Hjortdal VE, Sinclair T, Kerrigan CL, Solymoss S. Arterial ischemia in skin flaps: microcirculatory intravascular thrombosis. Plast Reconstr Surg 1994;93:375-85.
- 3- Gu YD, Li JF, Jiang JF, Zhong CS, Tang PZ. Scanning electron microscopic observations on the endothelial healing mechanism of vessels. J Reconstr Microsurg 1989;5:327-30.
- 4- Albanese V, Spadaro A, Tomasello F, Conforti P. Dynamics of endothelial repair in end-to-side microsurgical carotid anastomoses in rats: a scanning electron microscopic evaluation. Neurol Res 1981;3:267-87.
- 5- Muramatsu K, Shigetomi M, Ihara K, Kawai S, Doi K. Vascular complication in free tissue transfer to the leg. Microsurgery 2001;21:362-5.

- 6- Kroll SS, Schusterman MA, Reece GP, Miller MJ, Evans GR, Robb GL, Baldwin BJ. Timing of pedicle thrombosis and flap loss after free-tissue transfer. *Plast Reconstr Surg* 1996;98:1230-1233.
- 7- Bonde CT, Heslet L, Jansen E, Elberg JJ. Salvage of free flaps after venous thrombosis: case report. *Microsurgery* 2004;24:298-301.
- 8- Yajima H, Tamai S, Mizumoto S, Ono H, Fukui A. Vascular complications of vascularized composite tissue transfer: outcome and salvage techniques. *Microsurgery* 1993;14:473-8
- 9- Sasaki R, Masuda S, Nagao M. Erythropoietin: multiple physiological functions and regulation of biosynthesis. *Biosci Biotechnol Biochem* 2000;64:1775-93.
- 10- Heeschen C, Aicher A, Lehmann R, Fichtlscherer S, Vasa M, et al. Erythropoietin is a potent physiologic stimulus for endothelial progenitor cell mobilization *Blood* 2003;15:102:1340-6.
- 11- Kling PJ, Sullivan TM, Roberts RA, Philipps AF, Koldovsky O. Human milk as a potential enteral source of erythropoietin. *Pediatr Res* 1998;43:216-21.
- 12- Ribatti D, Presta M, Vacca A, Ria R, Giuliani R, Dell'Era P, Nico B, Roncali L, Dammacco F. Human erythropoietin induces a pro-angiogenic phenotype in cultured endothelial cells and stimulates neovascularization in vivo. *Blood* 1999;15: 2627-36.
- 13- Anagnostou A, Liu Z, Steiner M, Chin K, Lee ES, Kessimian N, Noguchi CT. Erythropoietin receptor mRNA expression in human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:3974-8.
- 14- Bahlmann FH, De Groot K, Spandau JM, Landry AL, Hertel B et al. Erythropoietin regulates endothelial progenitor cells. *Blood* 2004;103:921-6.
- 15- Kroll SS, Schusterman MA, Reece GP, Miller MJ, Evans GR, Robb GL, Baldwin BJ. Timing of pedicle thrombosis and flap loss after free-tissue transfer. *Plast Reconstr Surg* 1996;98:1230-3.
- 16- Borg ED, Werker PM, Franken RJ, Borst C, Kon M. Effect of vascular freezing on the histopathology of dissected small vessels in the rat: vascular freezing does induce intimal hyperplasia in arteries and veins. *Microsurgery* 2000;20:331-6
- 17- Walter DH, Rittig K, Bahlmann FH, Kirchmair R, Silver M, Murayama T et al. Statin therapy accelerates reendothelialization a novel effect involving mobilization and incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *Circulation* 2002;105:3017-24.
- 18- Six I, Van Belle E, Bordet R, et al. L- Arginine and L-Name have no effects on the reendothelialization process after arterial balloon injury. *Cardiovascular research* 1999;43:731-8.
- 19- Lee CW, Park SJ, Park SW, Kim JJ, Hong MK, Song JK. All-trans-retinoic acid attenuates neointima formation with acceleration of reendothelialization in balloon-injured rat aorta. *J Korean Med Sci* 2000; 15: 31-6
- 20- Gennaro G, Menard C, Michaud SE, Rivard A. Age-dependent impairment of reendothelialization after arterial injury: role of vascular endothelial growth factor. *Circulation* 2003;107:230-3
- 21- David H, Holly L, Alexander WC. Local plasminogen activator inhibitor type 1 over expression in rat carotid artery enhances thrombosis and endothelial regeneration while inhibiting intimal thickening. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:853-9.
- 22- McMahon FG, Vargas R, Ryan M, Jet al. Pharmacokinetics and effects of recombinant human erythropoietin after intravenous and subcutaneous injections in healthy volunteers. *Blood* 1990;76:1718-22.
- 23- Macdougall IC, Cavill I, Davies ME, Hutton RD, Coles GA, Williams JD. Subcutaneous recombinant erythropoietin in the treatment of renal anaemia in CAPD patients. *Contributions to Nephrology* 1989;76:219-26.
- 24- Ramakrishnan R, Cheung WK, Wacholtz MC, Minton N, Jusko WJ. Pharmacokinetic and pharmacodynamic modeling of recombinant human erythropoietin after single and multiple doses in healthy volunteers. *J Clin Pharmacol* 2004;44:991-1002
- 25- Saray A, Ozakpınar R, Koc C, Serel S, Sen Z, Can Z. Effect of chronic and short-term erythropoietin treatment on random flap survival in rats: an experimental study. *Laryngoscope* 2003;113 85-9.
- 26- Martino MA, Vogel KM, O'Brien SP, Kerstein MD. Erythropoietin therapy improves graft patency with no increased incidence of thromboses or thrombophlebitis. *J Am Coll Surg* 187: 616-619, 1998.
- 27- Harashina T, Fujino T, Watanabe S. The intimal healing of microvascular anastomoses. *Plast Reconstr Surg* 1976;58:608-13.
- 28- Zhang B, Wieslander JB. Healing of a severe microarterial trauma: an experimental study. *Microsurgery* 1994;15:130-40.
- 29- Walker LN, Ramsay MM, Bowyer DE. Endothelial healing following defined injury to rabbit aorta. Depth of injury and mode of repair. *Atherosclerosis* 1983;47:123-30