

**T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**



**SIÇANLARDA EPİNÖRAL YAPIŞIKLIĞIN
ÖNLENMESİNDE KAFEİK ASİT FENETİL ESTER
(CAPE)'İN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI
(DENEYSEL ÇALIŞMA)**

DR. NECDET SELİM KAYA

**BEYİN VE SİNİR CERRAHİSİ ANABİLİM DALI
UZMANLIK TEZİ**

2020

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ



SIÇANLARDA EPİNÖRAL YAPIŞIKLIĞIN
ÖNLENMESİNDE KAFEİK ASİT FENETİL ESTER
(CAPE)'İN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI
(DENEYSEL ÇALIŞMA)

DR. NECDET SELİM KAYA

TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. MAHMUT KONURALP İLBAY

ETİK KURUL ONAYI: KOÜ HADYEK 8/1-2019

**BEYİN VE SİNİR CERRAHİSİ ANABİLİM
DALI**

UZMANLIK TEZİ

2020

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	4
KISALTMALAR	6
TABLolar DİZİNİ	7
ŞEKİLLER DİZİNİ	8
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	9
2. GENEL BİLGİLER.....	11
2.1. TARİHÇE	11
2.2. PERİFERİK SİNİR SİSTEMİ MORFOLOJİSİ.....	12
2.3. PERİFERİK SİNİRLERİN ORGANİZASYONU	13
2.4. PATOLOJİ.....	17
2.5. KAFEİK ASİT FENETİL ESTER (CAPE)	21
2.6. HYALURONİK ASİT	23
3. GEREÇ VE YÖNTEM	24
3.1. HAZIRLIK.....	24
3.2. CERRAHİ TEKNİK	25
3.3. İNCELEME	26
3.3.1. POSTOPERATİF DEĞERLENDİRME	26
3.3.2. MAKROSKOPİK DEĞERLENDİRME	27
3.3.3. HİSTOPATOLOJİK İNCELEME.....	28
3.3.4. HOT PLATE TESTİ.....	29
3.3.5. İSTATİSTİKSEL İNCELEME	30
4. BULGULAR.....	31
4.1. KLİNİK BULGULAR	31
4.2. ANATOMİK BULGULAR	31
4.3. HİSTOPATOLOJİK BULGULAR.....	33

4.4. HOT PLATE BULGULARI.....	38
5. TARTIŞMA	39
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	44
7. ÖZET	45
8. ABSTRACT.....	47
9. EKLER.....	49
10. KAYNAKLAR.....	50



TEŞEKKÜR

Bolu'da başlayan zorlu Beyin ve Sinir Cerrahisi uzmanlık eğitimimin Kocaeli'de sonuna yaklaşmış olmanın gururunu yaşarken...

Bu zorlu asistanlık dönemimde yeri apayrı olan, özellikle spinal cerrahi alanında bana güvenerek mesleki bilgi ve becerilerimin gelişmesinde yoğun emek sarfeden, bu tezin oluşturulmasında bana yardımlarını esirgemeyen, eğitimim boyunca karşılaştığım her türlü zorlukta benim yanımda olan ve beni gözetten, tez danışmanım ve değerli hocam **Prof. Dr. M. Konuralp İLBAY'a**,

Uzun ve meşakkatli geçen uzmanlık eğitimim süresince hem mesleki bilgi ve tecrübesiyle hem de etik ve ahlaki değerler açısından örnek kişiliği ile insani ve mesleki gelişimimde emeği büyük olan, öğrencisi olmaktan mutluluk duyduğum anabilimdalı başkanımız, saygıdeğer hocam, **Prof. Dr. Savaş CEYLAN'a**

Pediyatrik nöroşirurji alanındaki bilgi ve tecrübesinin yanısıra cerrahi ekolüyle de eğitim ve becerilerime yoğun katkıları olan değerli hocam **Prof. Dr. Volkan ETUŞ'a**,

Asistanlık eğitimim boyunca özellikle kranial ve genel nöroşirurji alanında bilgi ve deneyimini paylaşan, eğitim sırasında asistanlarının fikirlerine de değer veren saygıdeğer hocam **Prof. Dr. İhsan ANIK'a**,

Kocaeli Üniversitesi'ndeki asistanlığım sürecinde birçok konuda elinden gelen yardımı yapan, uzmanlık eğitiminde sorumluluk bilinci kazanmamda önemli katkıları olan, bütün asistanların sıkıntılarını dinleyen değerli hocam **Doç. Dr. Burak ÇABUK'a**,

Spinal ve acil cerrahiler konusunda eğitimime ciddi katkıları olan, tezimin hazırlanmasında bana çok yardım eden, beni her konuda destekleyen ve asistanlığı döneminde de Beyin ve Sinir Cerrahisini seçmemde etkisi olan değerli hocam **Dr. Öğr. Üyesi M. Hamza GENÇ'e**,

Bu tezin hazırlık ve deney safhalarında bilgi ve tecrübesiyle bana yardım eden Fizyoloji Anabilidali öğretim üyesi **Doç. Dr. Gül İLBAY'a** ve histopatolojik preparatların hazırlanması ve değerlendirilmesinde önemli katkıları olan Histoloji Anabilim Dalı'ndan **Prof. Dr. Melda Yardımoğlu YILMAZ** ve Patoloji Anabilim Dalı'ndan **Dr. Öğr. Üyesi Büşra Yaprak PARLAK'a** ve TTU-2019-1571 numaralı projemizi destekleyen **Kocaeli Üniveritesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinatörlüğü'ne**

Eğitimimiz sırasında her türlü zorluğu birlikte göğüslediğimiz, alışkan ve özverili arkadaşlarım **Uzm. Dr. Melih AKLILI, Dr. Atakan EMENGEN, Dr. Caner POLAT, Dr. Harun Emre şEN, Dr. Anıl ERGEN, Dr. Eren YILMAZ, Dr. Bedrettin ÖZSOY, Dr. Ayşe UZUNER, Dr Ecem Cemre CEYLAN ve Dr. Sazak ATAYEV'e**

Nöroşirurji hemşireliği gibi zor bir mesleği hakkıyla yerine getiren başta ameliyathane hemşirelerimiz **lk KALAY TAş** ve **Zeynep YAMAN** olmak üzere, bütün servis hemşirelerimiz ve bize her zaman yardım eden görevli personellerimize

Bu günlere gelmemde, başta çocukları için kendi hayatından ödün veren annem **Gülsüm KAYA'** ya, beni her konuda destekleyen emeklerini asla ödeyemeyeceğim babam **Mustafa KAYA'**ya, her zaman sevgi ve saygıyla yanımda olan abim **Mehmet Akif'e**, kardeşlerim **Muhammet ve Kevser'e**

Bu zorlu sürecin başından sonuna her zaman yanımda olan, her türlü zorluğu birlikte aştığım ve en güzel günleri birlikte geçirdiğim, varlığıyla hayatıma anlam katan, biricik eşim ve hayat arkadaşım **Fulya Omak KAYA'**ya

Ve beni hayata bağlayarak sabır ve g veren canımdan çok sevdiğim ikizlerim **Burak ve mer'e** sonsuz teşekkür ederim.

Dr. Necdet Selim KAYA

KISALTMALAR

CAPE: Kafeik asit fenetil ester

ESM: Ekstraselüler matriks

NF- κ B: Nükleer faktör kapp B

TNF- α : Tümör nekroz faktör A

HA: Hyalüronik asit

H&E: Hematoksilen Eosin

IL: interlökin

COX: Siklooksijenaz

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1: Çalışmada kullanılan sıçanların gruplandırılması.....	25
Tablo 2: Petersen ve ark tarafından tanımlanan gross değerlendirme için sayısal gradeleme şeması. ⁸	27
Tablo 3: Fibroblast sayısının Masson Trikrom boyası altında incelenmesinde kullanılan skala. ¹¹	29
Tablo 4: Grupların adezyon yoğunluğu ve sinir ayrılabilirliği açısından One way ANOVA ile yapılmış istatistiksel karşılaştırması.....	33
Tablo 5: Skar doku oluşum indeksi.....	36
Tablo 6: Grupların skar doku oluşum indeksi açısından istatistiksel karşılaştırması.....	36
Tablo 7: Perinöral skar yoğunluğu skoru açısından gruplar arasındaki farklılıklar.....	37
Tablo 8: Perinöral skar yoğunluğunun One-way ANOVA post-hoc Tukey's testi ile karşılaştırma sonuçları.....	37
Tablo 9: Hot plate testi değerlendirme sonuçları.....	38

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: Periferik sinirin yapısı.....	14
Şekil 2: Yara iyileşmesi. ²⁴	17
Şekil 3: Fibrosit ve fibroblastın yapısı.....	20
Şekil 4: CAPE'nin kimyasal formülü	22
Şekil 5: Hot plate cihazı.	30
Şekil 6: Kontrol grubu.....	32
Şekil 7: HA grubu.....	32
Şekil 8: CAPE 1 grubu.....	32
Şekil 9: CAPE 2 grubu	32
Şekil 10: H&E ile boyanmış sıçanlardan siyatik sinir bölümlerinin fotomikroagrafları. (A) Kontrol grubu, (B) CAPE 1 grubu, (C) HA grubu, (D) CAPE 2 grubunun siyatik sinir ışık mikroskopik görüntüleri.	34
Şekil 11: Mason trikrom ile boyanmış sıçanlardan siyatik sinir bölümlerinin fotomikroagrafları. (A) Kontrol grubu, (B) CAPE 1 grubu, (C) HA grubu, (D) CAPE 2 grubunun siyatik sinir ışık mikroskopik görüntüleri.	35

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Periferik sinir cerrahisinde, cerrahi sonrası klinik sonuçlar ve cerrahi başarının değerlendirilmesinde epinöral fibrozis oluşumu önemli bir yer tutmaktadır. Periferik sinirlerin yapışıklığına sebep olan epinöral skar oluşumu özellikle ekstremitte hareketi sırasında sinir dokusunun mobilitesini azaltmaktadır. Uzun dönem ve ileri derece yapışıklıklar iskemi oluşumuna ve böylece sinir hasarına sebep olabilir, iskemi ve yapışıklıklar ağrıya sebep olduğu gibi sinirlerin sıkışması ve gerilmesi sonucu duysal ve motor kayıplara yol açabilir.^{1,2}

Epinöral skar oluşumuna engel olmak ve oluşumunu azaltmak amacıyla mikroşirurjikal, endoskopik yaklaşım, sinir transpozisyonu, kas flebi ve yağ greftleri gibi pek çok cerrahi teknik geliştirilmiştir. Ancak bu tekniklerin uygulanmasıyla da cerrahi sonrası epinöral skar oluşumunun önlenmesi yeterince sağlanamamıştır.³ Silikon membran benzeri bariyer oluşturucu maddeler sinir kılıfı etrafına yerleştirilebilir. Ancak emilebilir materyal olmadığından yabancı cisim reaksiyonu ya da cismin yer değiştirmesi gibi komplikasyonlar oluşturabilirler.¹ Bu yüzden biyoemilebilirliği olan maddelerin kullanılması söz konusu olabilir. Naturel polimer içerikli bioabsorbable adezyon bariyeri klinik kullanımı mümkün olan ve sinir cerrahisi sonrası skar oluşumunu engellediği pek çok klinik çalışmada tespit edilmiş ürünlerdir.⁴⁻⁸ Fakat bu maddelerin etkinliğiyle ilgili karşıt çalışmalarda mevcuttur.⁹ Epinöral skar oluşumunun önlenmesi veya azaltılması periferik sinir cerrahi başarısını artırdığı gibi komplikasyon oranlarını da azaltır ve daha sonra reoperasyon gerektiğinde uygulanacak cerrahi girişimi kolaylaştırır.²

Bu alışmada, Wistar Albino sıçanlarda siyatik sinir iki taraflı olarak ortaya konuldu ve steril teknik ile evre dokulardan diseksiyonu sağlandı. Peroneal ve tibial komponentler künt diseksiyon ile ayrıldı. Naylon fırça ile biceps femoris kas düzeyinde tekrarlayan hareketlerle abrazyon hasarı sağlandı. Cerrahiden 4 hafta sonra kr cerrahi diseksiyon ile deney kontrol ve karşılaştırma gruplarında nrolizis alanları makroskopik skalalarla gross anatomik olarak ve histopatolojik yöntemlerle kalitatif ve kantitatif olarak değerlendirildi.^{1,10,11} Cerrahi işlemler öncesinde Hot plate cihazı kullanılarak ağrı eşiği değerleri elde edildi.

Bu alışma ile sıçanlarda deneysel olarak epinöral skar oluşturulmasından sonra, topikal uygulanan kafeik asit fenetil ester (CAPE)'in postoperatif epinöral skar gelişimine ve ağrı eşiği üzerine etkilerinin araştırılması amaçlandı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. TARİHÇE

Tıp tarihine bakıldığında, sinir cerrahisi ile ilgili Galen (M.S. 2.YY) döneminde sinir iyileşmesinin mümkün olduğu düşünülmemekteydi. Sinir onarımı kavramı geliştikçe birçok cerrahi prosedür de bununla birlikte denenerek geliştirilmiştir. Bu tekniklerin bir kısmı; epinöral flep ile tamir, tamir öncesi tanjansiyel olarak ayrılması ve side-to-side sütürlemeydi. Sonraki dönemlerde ise 1795’da Haighton, 1842’da Muller, 1906’da Sherren ve 1917’da Mayo-Rabson periferik sinir cerrahisi alanında kıymetli araştırmalar yapmış ve yayınlamışlardır. Fakat sinir iyileşmesinde devamlı ve istikrarlı bir başarı olmaması 19. yüzyıl süresince bu alandaki ilginin pek fazla olmamasına sebep olmuştur. Silas Weir Mitchell, I. Dünya savaşı sırasında karşılaştığı sinir yaralanmalarını ve çalışmalarını “Injuries of Nerves” isimli kitabında derlemiştir. Tinel aynı dönemde, hasara uğrayan sinir boyunca yapılan perküsyonla beliren sinir yenilenmesinin işareti olduğunu düşündüğü “karıncalanma” belirtisini tariflemiştir. II. Dünya savaşı dönemindeyse Sir Herbert Seddon ve Barnes Woodhall primer sinir iyileşmesi, sekonder sinir iyileşmesi, sinir greftleme gibi birçok teknik üzerinde araştırmalar yapmışlardır. Sir Sydney Sunderland tarafından çeşitli periferik sinirlerin ayrıntılı iç yapısının gösterilmesi, sinir cerrahisi ile ilgilenen hekimler için önemli katkı sağlamıştır.¹²

Birçok dikiş materyalinin, özelleşmiş cihazların ve büyütme özellikli aletlerin geliştirilmesi sinir cerrahisinde önemli katkılar sağlamış olmasına karşın

periferik sinir cerrahisi sonrasında gelişen epinöral skar formasyonu gelişimi hala önemli bir sorundur.

2.2. PERİFERİK SİNİR SİSTEMİ MORFOLOJİSİ

Sinir sisteminin anatomik ve fonksiyonel ünitesini sinir hücresi (nöron) oluşturur. Sinir hücreleri arasında yer alan ve onlara desteklik yapan çeşitli tipteki hücreler ise nörogliaı oluşturur. Nöron, bir hücre soması (perikaryon), hücre somasından çıkan kısa uzantılı dentritler ve çoğunlukla tek bir uzantılı aksondan oluşur. Perikaryon genellikle üçgenimsi biçimdedir, sitoplazmasına nöroplazma adı verilir. Nöroplazmada Nissl cisimciği ve nörofibriller gibi özel yapılar bulunur. Nissl cisimciği, endoplazmik retikulum ve ribozom gruplarının oluşturduğu, büyüklük ve şekil bakımından düzensiz cisim ve kütleler şeklindedir. Dentrit içinde de görülmesine karşın akson çıkış yerinde ve aksonda bulunmaz. Nissl cisimciklerinin sayısı ve dağılımları çeşitli tip nöronlar için farklılık gösterir. Motor nöronda çok sayıda, büyük, kaba granüller şeklinde bulunur ve belirsizdir. Nöron yaralanmalarından sonra bu granüller parçalanarak tüm nöroplazmaya dağılır. Bu olaya kromatozis denir. Nörofibriller perikaryonda birbirlerinin çaprazlayarak değişik yönlerde seyreder ve uzantılara doğru yönelirler.^{13,14}

Sinir lifi nöronun tek ve uzun uzantısı olan aksondan oluşur. Akson önce bir miktar çıplak seyreder. Sonra nöron tipine ve bölgesine göre ayrımlı kılıflarla kuşatılır. Böylece kılıfları ile birlikte akson sinir lifini oluşturur. Akson kılıfları, myelin ve schwann kılıfıdır. Schwann, bütün periferik sinirlerin aksonlarını santral sinir sistemi organlarından çıktıkları yerden sonlanacakları yere kadar sarar. Schwann hücreleri periferik aksonların yaşam ve fonksiyonu için

gereklidir, ayrıca sinir lifinin rejenerasyonu sırasında da önemli rol oynar. Sinir lifinin kesilmesi durumunda akson, kesimin santral ucundan başlayarak rejenerasyon olup periferik doğru sonlanacağı yere schwann hücrelerinin oluşturduğu kanal içinde, bu hücrelerin kulavuzluğuyla ulaşabilir. Myelin kılıfı, santral sinir sistemindeki substantia albasındaki sinir liflerinde ve serebrospinal periferik sinir liflerinde bulunur.^{13,14}

Aksonlar kılıfla çevrili olarak, sinir liflerinin gruplaşmasıyla santral sinir sisteminde traktusları, traktuslar da periferik sinir sisteminde sinirleri oluştururlar.¹³

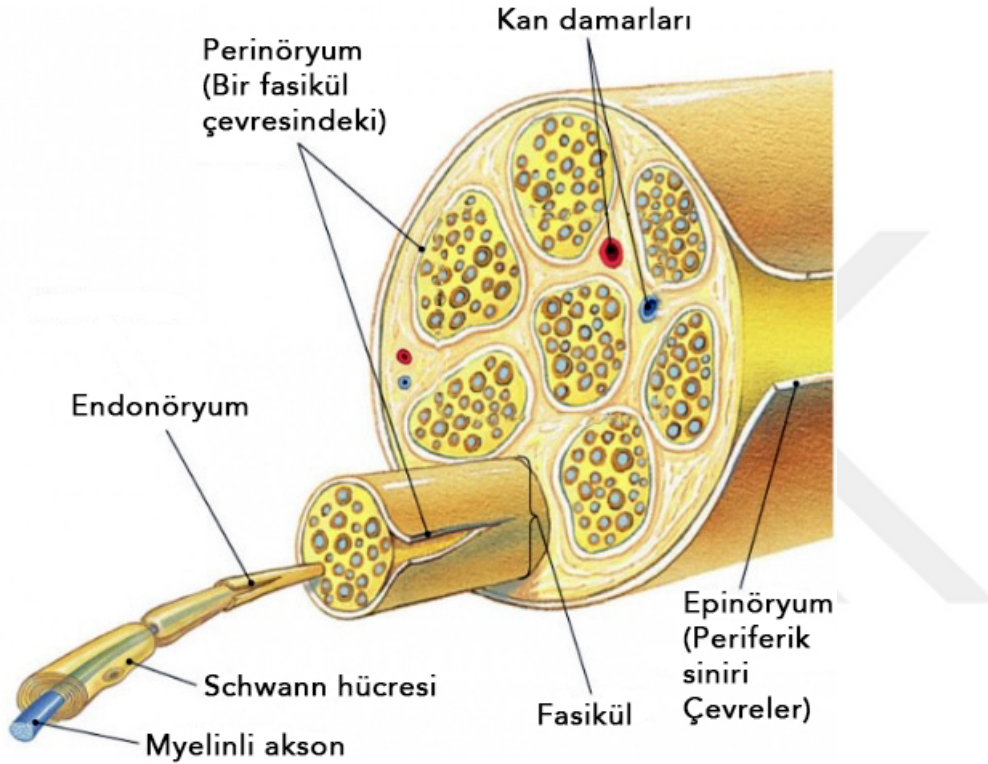
2.3. PERİFERİK SİNİRLERİN ORGANİZASYONU

Periferik sinirler bağ dokusunun desteğiyle toplanmış birçok sinir lifinden oluşur. Periferik sinirde fonksiyonel birim sinir demetidir. Periferik siniri oluşturan her bir sinir lifi demetinin nerede sonlanacağı ve işlevi bellidir.^{13,15}

Çoğu myelinli olan sinir lifleri santral sinir sisteminden çıktıktan sonra bağ dokusu kılıflarla kuşatılan, funikulus ve fasikulus adı verilen gruplar oluşturur. Birçok fasikulus bir araya gelerek sinir traktuslarını yapar. Bu bağ dokusu örtüleriyle sarılmış sinir lifleri periferik sinir demetleridir.^{13,15}

Periferik sinirdeki bağ dokusu örtülerinden, tüm siniri kuşatan en dıştaki bağ dokusu kılıfına epinöryum denir. Traktusları saran bu örtüde kollagen ve elastik lifler ile fibroblastlar ve damarlar bulunur. Bu bağ dokusu içinde, binlerce sinir lifinin bir araya gelmesiyle oluşan sinir lifleri demetlerinin ayrı ayrı sıkıca saran bağ dokusu örtüsüne perinöryum adı verilir. Perinöryum,

kompakt, düzensiz, ince bağ dokusudur ve sinir demetleri ile dış ortam arasında bir bariyer oluşturur. Tek bir sinir lifini saran bağ dokusu örtüsüne ise endonöryum denir (Şekil 1).



Şekil 1: Periferik sinirin yapısı

Bu örtü de kollagen ve retiküler lifler ile fibroblastlardan oluşur. Schwann hücrelerinden de bir bazal lamina ile ayrılır. Gevşek ve ince bağ dokusundan oluşan endonöryum mezoderm kökenlidir.^{13,14}

Periferik sinirler santral sinir sistemi ile duyu organları ve efektör organlar arasında iletişim kurar. Aynı zamanda hem afferent hemde efferent sinir liflerini bulundurur. Afferent lifler çevre ya da vücudun içinden elde edilen

bilgileri merkeze getirir. Efferent lifler ise santral sinir sisteminden gelen impulsları uygun ilgili organa taşır. Eğer periferik sinir sadece afferent lifleri bulunduruyorsa sensoriyal, yalnız hedef organlara impuls götüren liflerden oluşuyorsa motor sinir adını alır. Çoğu periferik sinir her iki tip lifi birlikte iletir, bu sinirlere mikst tip sinir denir.^{13,16}

Periferik sinirlerin liflerinin çoğu miyelinli ve miyelinsiz lifleri birlikte içerir. Myelinli sinirler liflerinin kalınlıkları farklılık göstermektedir. Uyarı iletim hızı lif kalınlığıyla ilişkilidir ve lif kalınlığı arttıkça uyarı hızı artar.¹³

Periferik sinirler hedef bölgelere yaklaştıkça dallanır ve incelirler. Dallanma ve fasikulusların yeniden bir araya gelmesiyle sinir pleksusları oluşur. Sinir liflerinin kılıfları hedef bölgeye yaklaştıkça ve dallandıkça azalarak kaybolur. Önce sinir demetleri ayrışarak birbirinden uzaklığı artar, sonra demetler daha küçük sinir demetlerine bölünür. En son kılıfları ve bir miktar bağ dokusuyla birlikte teker teker sinir lifleri kalır. Sinir lifi dallanmasını arka arkaya sürdürür ve en son myelin kılıfı da sonlanır. Schwann kılıfı efektör organa ya da bir başka nörona kadar.^{13,14}

Çeşitli kaslara ulaşan sinir lifleri segmenter uyum içerisindedir. Spinal sinirler, her bir segmentten ayrılan motor sinirler ile aynı segment spinal gangliyonundan ayrılan sinir liflerini içerir. Birçok spinal sinirin ön dallarından çıkan ve çok çeşitli yerlere dağılan periferik sinirlerlerde çeşitli segmentlere ait motor ve sensorial sinir lifler birlikte bulunur. Spinal sinirlerin ön dallarından çıkarak oluşan periferik sinirlerlerin multisegmental özellik taşıması, birçok segmental spinal spinal sinir liflerinin birbiriyle kaynaşması ile oluşur. Bu kaynaşma ve oluşan yeni düzenlemeyle oluşan sinir ağlarına pleksus adı verilir. Torakal segmentlerin spinal sinirleri dışındaki bütün spinal sinirlerin ön dalları

pleksus oluşturur. Pleksus içerisinde birçok segmente ait sinir lifleri ayrı ayrı demetler şeklinde yeniden bir araya gelerek afferent ve efferent lifler bulunduran periferik siniri oluşturmaktadırlar. Birkaç spinal sinirin lifleri pleksuslarda önce birbirine karışır, aynı segmental kaslara giden sinir lifleri ayrı demetlerde toplanır ve yeniden dağılmak üzere periferik sinirlere dağılır. Pleksuslarda, birçok segmente ait kaslara giden periferik spinal sinir liflerinin ayrışması ve toplanması birkaç kez tekrarlanır. Sinir liflerinin pleksuslarda uygun seviye ve uygun kas gruplarına göre bir araya gelmesiyle oluşan periferik sinirler, insan vücudunda olabilecek sinir sayısını azaltmıştır. Spinal sinirler pleksusa kadar tek segmente ait sinir lifi bulundururken, pleksuslardan çıkan sinirler ise multisegmental sinir liflerini taşımaktadır.

Periferik sinirler yaygın damarsal ağları sayesinde kanlanmaları çok iyidir.¹⁷ Beslenmeleri, anastomoz oluşturmuş subepinöral seviye ve longitudinal uzanımlı pleksus ile temin edilir.¹⁸ Periferik sinirlerin beslenmesi iki yoldan sağlanır; epinöral alandaki arteriol ve venüller ile oluşan ekstrinsik sistem ve endonöryumdaki kılcalların meydana getirdiği damar ağı ile oluşan intrinsik sistem. Ekstrinsik sistem kan akışı adrenerjik ileti, adrenalin ve lokal anestezi maddelerinin bölgesel kullanılması ile az oranda da arteriyel CO₂ ile değişir.¹⁹⁻

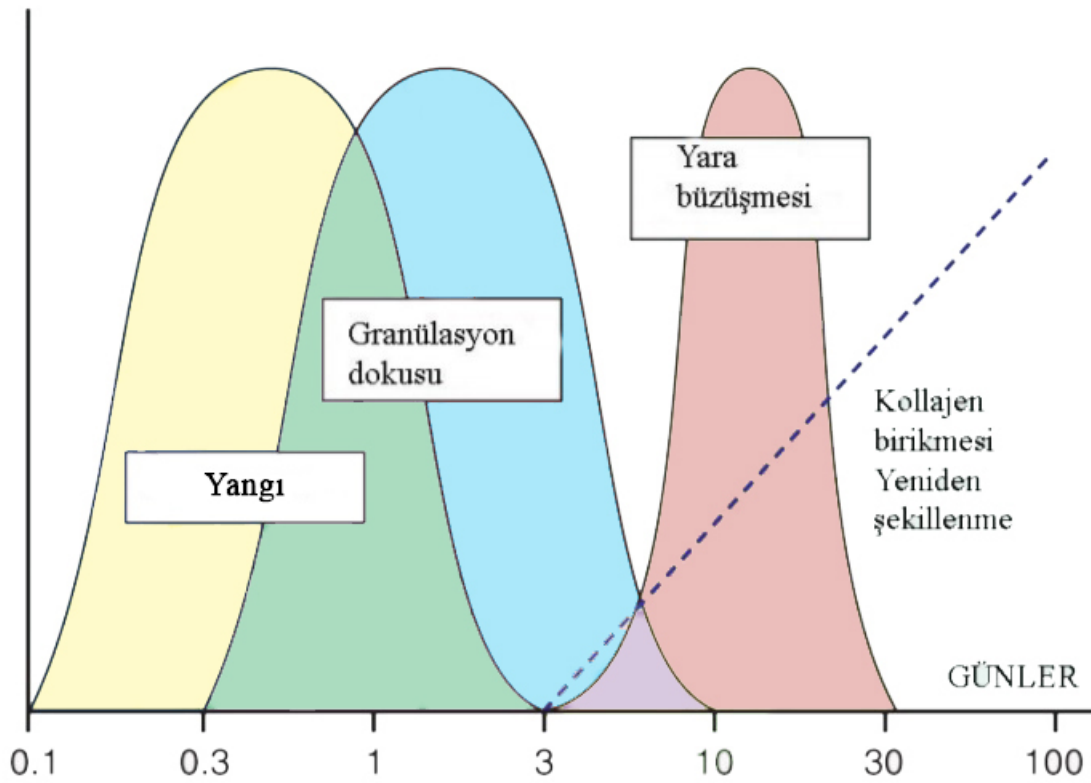
²¹ Fakat intrinsik sistem çevresel madde varyasyonlarından etkilenmemektedir. Bu iki damar sisteminin perinöryumu delerek yaptığı anastomozlar sayesinde sinir perfüzyonu bozulmaksızın sinir trasesi boyunca mobilize olabildiğini de mümkün olur.^{22,23}

2.4. PATOLOJİ

Doku hasarlarında bağ dokusuyla iyileşme skar formasyonu sonucunu doğurur ve dört aşamada gerçekleşir:

1. Fibroblast migrasyonu ve çoğalması
2. Ekstraselüler matriks birikimi
3. Yeniden vaskularizasyon (anjiogenezis)
4. Skar dokusunun yeniden yapılanması ve gelişmesi (matürasyon)

Hasarlanmadan bir süre sonra fibroblast ve endotel hücrelerinin sayısı artmaya başlayarak granülasyon adı verilen, histolojik yapısı vaskularizasyon ve fibroblast artışıyla ortaya çıkan doku oluşur (Şekil 2).



Şekil 2. Yara iyileşmesi.²⁴

Vücutta pek çok yaşamsal işlevi olan mezenkimden köken alan fibroblastlar, ekstraselüler matriks (ESM) üretiminin büyük kısmını yaparlar. Bu nedenle fibroblastlar zedelenme sonrası rejenerasyonda etkili bir faktör olurlar. Fibroblastlar birçok hastalığa doğrudan ya da farklı hücre zedelenmelerinde oluşan fibrozisle ilişkili olmak şeklinde etkide bulunurlar.^{13,24}

Kollajen: Vücutta değişik miktarda sağlamlık, elastikiyet ve gerim kuvvetine karşı yapı proteinlerinin bulunması gerekmektedir. Bunlardan olan kollajen kütleinin %30 kadarını oluşturur. Kollajenin pek çok tipi mevcuttur. Bunlardan en fazla bilinenleri;

Kollajen tip I: En fazla bulunan tiptir. Tendon, kemik, doku kapsülü ve dentin de bulunur.

Kollajen tip II: Genellikle haylin ve kıkırdak dokusunda bulunur. İnce fibriler yapı oluşturur.

Kollajen tip III: Sıklıkla tip I kollajen gibidir. Retüküler fibrillerin kollajen kısmıdır. Diğer kollajenlerle birlikte çoklu polimer yapısı oluştururlar.

Kollajen tip IV: Lif yapısı oluşturmaz ve bazal membranda yerleşir.

Kollajen tip IV: Vasküler yapılarda, embriyonik zarlarda ve az oranda diğer vücut yapılarında mevcuttur.^{13,15}

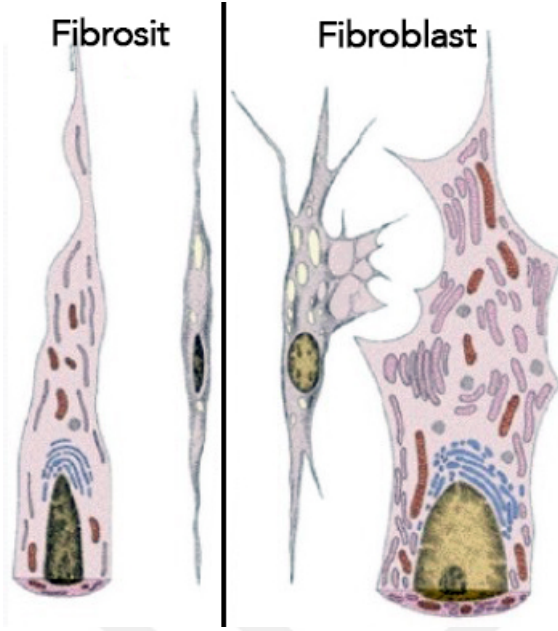
Birçok dokunun çoğunluğunu yapan, glikozaminoglikan, proteoglikanlar, fibröz yapılar ve adhezif glikoproteinler içeren jelatinöz yapıdaki ekstraselüler matriksi oluşturur. ESM komponentten oluşmaktadır.

Üçlü polipeptit alfa heliksinden oluşan kollajen, %33 glisin, %10 hidroksiprolin ve %12 prolin amino asitlerinden oluşmaktadır. Ekstraselüler kollajenler rejenerasyon dokusundan ve adezyonların çoğunluğundan sorumludur.

Adhesif glikoproteinler, genellikle bir taraftan interstisyel bölümünü tutan diğer kısımdan özel iç hücre zarı proteinlerini tutan iki farklı protein konfigrasyonu özelliği bulundurulur. Bu şekilde ESM kısımlarını birbirlerine ve hücre membranlarına birleştirir. Bu grup laminin, fibronektin ve diğerlerinden oluşurlar.

Proteoglikanlar, geçirgenlik dağılımı, bağ dokusu yapımı, boyut artışı ve morfogenez gibi özellikleriyle ESM'nin üçüncü kısmını yapan iç membran proteinleridir.^{16,25}

Fibroblast ve fibrosit: Fibroblastlar sıklıkla interstisyumda bulunur. Fibriler ve dağınık tipte hücre dışı madde üretimini yaparlar. Birkaç farklı yapı ve anatomide fibroblast vardır. Matriks içerisinde fazla miktarda madde sentezleyen aktif hücrelerle inaktif hücreler seçilebilirler. Olgunlaşmış hücrelere genelde fibrosit denir. Fibroblastın dağınık dallanmış sitoplazması, oval ve az boyanan çekirdeği ve yoğun kromatinli çekirdekçisi bulunur. Endoplazmik retikulumdan zengin ve gelişmiş golgi organelleri mevcuttur. Daha az aktif olan, iğsi şekilli ve daha küçük olan fibrosit ise daha koyu, uzun nukleuslu ve asidik stoplazmalıdır (Şekil 3).^{13,15}



Şekil 3: Fibrosit ve fibroblastın yapısı.

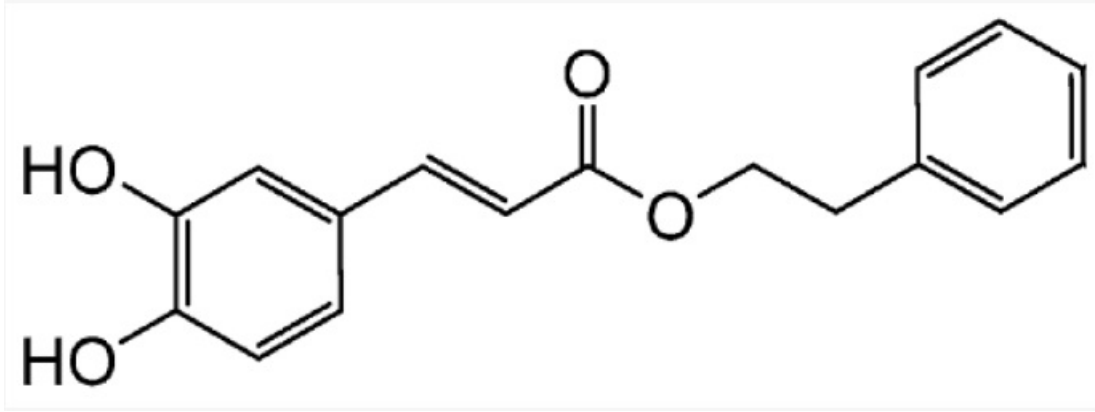
Fibrozis: Aşırı miktarda ESM kısımlarının birikmesiyle oluşan bulunduğu dokunun işlevini bozan bir prosesdir.¹ İnflamasyon yayılması, öncelikle fibroblastlar ile birlikte yüksek düzeyde matriks sentezleyen hücrelerin aktifliği ve artışıyla devam eder. Fetal yaralarada skarsız iyileşmenin temelinde fibroblastlardan organize şekilde matriks salgılanması yatarken, erişkin evrede organize olmayan kollajen sentezi gerçekleşmesi söz konusudur.²⁶

Kollajen artışı sadece üretimle birlikte gerçekleşmeyip eş zamanlı kollajen yıkımı ile birlikte gerçekleşen bir süreçtir. Bu yıkılım kolajenaz ve metalloproteinazlar tarafından yapılır. Kollajen yıkımı hasarlı bölge materyallerinin temizlenmesi ve rejenere olacak bölgede iyileşme ve tamir için yeni organizasyon sağlamada adına rol oynar. Cerrahi sonrası uygulanan dikişler sıklıkla ilk yedi günden sonrası çıkarıldığında yaranın gücü artmaya başlar, daha sonraki otuz gün boyunca artmaya devam eder ve 3. aydan sonra yaranın gücü sabitlenir. Bu güç artışının kollajenin tipiyle ilişkili olması

muhtemeldir. Erişkinde biriken tip I kolajen birikimi olsa da, inflamasyon sonrası sentezlenen fetüste olduğu gibi tip III dür. Fibrozis gelişirken bu biriken tip III kollajen yerini tip I kollajene bırakır.²⁴

2.5. KAFEİK ASİT FENETİL ESTER (CAPE)

Propolis, çeşitli kaynaklarda arıların toplayıp oluşturduğu, yapışkan yüksek viskoziteli maddedir.²⁷ Genellikle arılar tarafından hasarlı kovan tamiri ve hijyeni, geçitlerin korunması ve içeri giren yabancı organizma ve mikropların inaktif edilmesinde kullanılır.²⁸ İçeriğinde yüz civarında maddeden söz edilmekle birlikte, propolis içeriği arıların topladığı bileşenlere göre de değişebilmektedir. Biyolojik olarak aktif bileşenlerinden olan flavanoidlerin içeriğini çoğunlukla kafeik asit ve esterlenmiş formları oluşturur.²⁹ Propolisin tespit edilen antiinflamatuvar, antimikrobik ve iyileştirici etkinlikleriyle birlikte immün sistem düzenleme, antimutajenik, karsinostatik ve antioksidan etkinlikleri çeşitli araştırmalarla gösterilmiştir.³⁰⁻³⁶ Bunların önemli kısmında propolisin aktif bileşenlerinden olan kafeik asit fenetil ester (CAPE)'in etkili olduğu tespit edilmiştir.^{37,38} CAPE, arıların bal üretmek için getirdiği maddeler içeriğinde olan sert kovan propolisin aktif maddelerinden birisidir.³⁹ Nükleer faktör kapp B (NF-κB), lipid peroksidasyonu, lipooksijenaz, siklooksijenaz etkinlikleri, tirozin kinaz ve ornitin dekarboksilaz ile güçlü etki ve özel inhibisyon özelliklerinden dolayı CAPE'in antiviral, antiinflamatuvar, immünomodülatör ve antioksidan özellikleri vardır (Şekil 4).⁴⁰⁻⁴⁴



Şekil 4: CAPE'nin kimyasal formülü

Vücutta fizyolojik durumda ya da anormal bir durum sonrasında serbest radikaller ve bu radikallerden korunma mekanizması olan antioksidan sistemi bir denge içerisinde. Çalışmalarda CAPE'in insan nötrofillerinde ve ksantin/ksantin oksidaz sisteminde 10 µmol konsantrasyonunda reaktif oksijen radikali üretimini tam olarak bloke ederek antioksidan etki oluşturduğu gösterilmiştir.³⁹

Yapılan araştırmalarda CAPE'in antiinflamatuvar etkinliği Diklofenak ve Hidrokortizon a benzer tespit edilmiştir. CAPE, spesifik şekilde Nükleer faktör kapp B (NF-κB)'yi inhibe ederek ve serbest oksijen radikallerini engelleyerek başta Tümör nekroz faktör A (TNF-α) olmak üzere çok sayıda inflamatuvar ajanı engellemektedir. CAPE' in glukokortikoid reseptörleri dışında inflamatuvar hücrelerin apoptozisini engellediği tespit edilmiştir.⁴⁵

CAPE, kafeik asit ve fenetil alkol ile birlikte esterifikasyon ile üretilebilmektedir.⁴⁶ Molekül formülü C₁₇H₁₆O₄ olup molekül kütlesi 284,3 dalton olan ve iki halkasal yapısı bulunan CAPE'in neredeyse bütün kimyasal etkilerini gösterdiği iki adet "-OH" grubu mevcuttur. Bu gruplar elektron alıp

vererek reduktan ve oksidan özelliklerini göstermektedirler. Uzun karbon sahip olmasının yanında aromatik gruba da sahip olması ile lipofilik özellik gösterir ve hücre mebranından kolay geçer.⁴⁷

2.6. HYALURONİK ASİT

Hyaluronik asit, N asetil glukozamin disakkaritlerinin uzatılmış polimeridir. Hyaluronik asit ilk gözdeki vitröz kısımda, sonraları da eklemde sinovyal bölgede görülmüştür. Daha sonra deri ve çoğu vücut kısmında bulunduğu tespit edilmiştir. Birçok hücre belirli bölünme siklus dönemlerinde hyaluronik asit sentezleyebilmektedir. Bu yüzden temel biyolojik süreçlerde payı olduğu düşünülmektedir. Hyaluronik asitin kendine has viskoelastisite ve hidroskopik yapısından dolayı doku tamiriyle ilişkisi olduğu kabul edilmektedir. Yapılan çalışmalarda Hyaluronik asitin kısmen kollajen birikimini azalttığına görülmüş, bu şekilde yara iyileşmesinde skarlaşmanın da azaltılmasını sağlayacağı düşünülmüştür.⁴⁸⁻⁵³

Eksraselüler matriksin bileşenlerinden olan hyaluronik asit (HA) karışımları daha önceki çalışmalarda; ortopedik tendon cerrahisi sonrası yapışıklıkları önlemede, laparoskopik ve açık cerrahide başarıyla kullanılmıştır.⁵⁴⁻⁵⁷ Ayrıca düşük akışkanlığı olan hyaluronik asit çözeltisinin spinal cerrahide epidural fibrozisi önlediği tespit edilmiştir.⁵⁸

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. HAZIRLIK

Bu çalışma, Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 12/09/2019 tarihli, 2019/15 proje numarası ve KOU HADYEK 8/1-2019 kararlı izni ile Kocaeli Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Birimi Laboratuvarı (DETAB), Histoloji ve Patoloji Anabilim Dallarında gerçekleştirilmiştir. Çalışmamızda kullanılan sıçanlar, Kocaeli Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Birimi'nden elde edildi. Çalışma Kocaeli Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklendi. Bu çalışmada yirmi adet 200-280 gr ağırlığında genç erişkin Wistar albino erkek sıçanlar kullanıldı. Uygun oda sıcaklığında 12 şer saatlik aydınlık ve karanlık ve uygun nemdeki laboratuvarlarda standart sıçan yemi ve musluk suyu verilerek gözlemler yapıldı. Deneysel çalışmamızda, sıçanlar 5'er adetlik 4 gruba ayrılarak yürütüldü. Birinci grup kontrol grubu , ikinci grup CAPE 1, üçüncü grup CAPE 2 ve dördüncü grup HA uygulanmış tedavi grupları olarak değerlendirildi. Her dört gruptan da 5'er adet sıçandan olmak üzere 10'ar adet siyatik sinir örneği makroskopik ve histopatolojik inceleme için gruplandı (Tablo 1).

	Makroskopik inceleme	Mikroskopik inceleme
Grup 1: Kontrol (salin uygulanmış 5 sıçan)	5 sıçan (10 siyatik sinir)	5 sıçan (10 siyatik sinir)
Grup 2: CAPE 1 ((3 µg/ml) Kafeik asit fenetil ester uygulanmış 5 sıçan)	5 sıçan (10 siyatik sinir)	5 sıçan (10 siyatik sinir)
Grup 3: CAPE 2 ((30 µg/ml) Kafeik asit fenetil ester uygulanmış 5 sıçan)	5 sıçan (10 siyatik sinir)	5 sıçan (10 siyatik sinir)
Grup 4: HA (Hyaluronik asit uygulanmış 5 sıçan)	5 sıçan (10 siyatik sinir)	5 sıçan (10 siyatik sinir)

Tablo 1: Çalışmada kullanılan sıçanların gruplandırılması

3.2. CERRAHİ TEKNİK

Cerrahi işlemlerden önce sıçan gruplarının tamamı numaralandırılarak Hot Plate (AHP 0603 Commad Ltd, Ankara) analjezimetresi cihazı ile ağrı eşiği değerleri alındı. Daha sonra cerrahi prosedürlere geçildi.

Cerrahi işlem öncesinde tüm gruptaki hayvanlara genel anestezi maksadıyla intraperitoneal olarak 40 mg/kg dozunda Ketamin (Keta-control, Doğa, İstanbul) ve 10 mg/kg dozunda Xylazine (Control, Doğa, İstanbul) uygulandı.

Steril şartlarda bilateral olarak cilt ve fasya insizyonlarıyla siyatik sinirler çevre dokularda diseke edilerek ortaya konuldu. Peroneal ve tibial dallar künt diseksiyon ile ayrıldı. Naylon mikro fırça ile biceps femoris kas yüzeyinde tekrarlayan sürtme hareketi ile abrazyon hasarı sağlandı. Bu süreç içerisinde

sinirler dikkatli bir şekilde ekarte edildi. Kontrol grubundaki beş sıçanın her iki taraf siyatik sinirleri çevresinde salin emdirilmiş pediler 5 dk. süre tutuldu. CAPE gruplarında dimetil sülfoksit içerisinde çözülmüş Kafeik Asit Fenetil Ester çözeltileri CAPE 1 grubunda 3 µg/ml, CAPE 2 grubunda 30 µg/ml dozunda CAPE emdirilmiş 1x1cm pamuk pediler bilateral siyatik sinir etrafında 5 dk süre boyunca bekletildi. 4. Grup olan HA grubunda 1ml Hyalüronik asit jel bilateral siyatik sinirleri etrafında yine 5dk bekletilerek işleme son verildi. Sonrasında cilt 4/0 ipek ile suture edilerek kapatıldı.

4 hafta sonra her dört gruptaki sıçanlar, hot plate testi değerleri alındıktan sonra genel anestezi altında eski insizyon skarı üzerinden açılarak makroskopik incelemeler yapıldı. Daha sonra mikroskopik incelemeler yapılmak üzere bütün siyatik sinirler (toplam 40 siyatik sinir) çevre skar dokularıyla birlikte eksize edilerek %10 nötral formaldehit solüsyonuna alındı ve incelenmek üzere histoloji laboratuvarına iletildi.

3.3. İNCELEME

Değerlendirmeler makroskopik, histopatolojik ve hot plate cihazı değerleri alınması olmak üzere 3 şekilde yapılmıştır.

3.3.1. POSTOPERATİF DEĞERLENDİRME

Cerrahi işlemler sonrasında sıçanlar gün aşırı olmak üzere incelenmeye başlandı. Yara yeri iyileşme süreci, atılan sütürler, patolojik postür, ayak dorsileksiyonu ve plantar fleksiyonu gibi siyatik sinir fonksiyonları gözlemlendi.

3.3.2. MAKROSKOPİK DEĞERLENDİRME

Operasyondan 4 hafta sonra hot plate değerleri tekrar alınarak değerlendirildi. Daha sonra genel anestezi altında sıçanlara kör cerrahi diseksiyon ile grup 1 (kontrol grubu), grup 2 (CAPE 1 grubu), grup 3 (CAPE 2 grubu), grup 4 (HA grubu) sıçanların cilt-fasya ve siyatik sinir çevresi iyileşme ve adezyon dokuları incelendi. Diseksiyon sırasında Petersen ve arkadaşları tarafından tanımlanan sayısal gradeleme şemasına göre değerlendirmeler yapıldı (Tablo 2).

Doku	Grade	Tanımlama
Cilt ve kas fasya	1	Cilt veya kas fasya tamamen kapalı
	2	Cilt veya kas fasya kısmen açık
	3	Cilt veya kas fasya tamamen açık
Sinir adezyonu ve sinir ayrılabilirliği	1	Diseksiyon yok veya hafif künt diseksiyon
	2	Bir miktar künt diseksiyon
	3	Keskin diseksiyon gerekli

Tablo 2: Petersen ve ark tarafından tanımlanan gross değerlendirme için sayısal gradeleme şeması.⁸

3.3.3. HİSTOPATOLOJİK İNCELEME

Çevresel adezyon dokularıyla birlikte alınan sinir doku örnekleri 48 saat %10'luk nötral formalin çözeltisi içerisinde doku tespiti ve doku takipleri yapıldıktan sonra parafin bloklara gömüldü. Daha sonra tüm örneklerden 5 mikron kalınlığında seri kesitler alındı. Ardışık kesitlere rutin inceleme için Hematoksilen-Eosin (H&E) ve fibrozis değerlendirmek için Masson Trikrom boyama tekniği uygulandı.

3.3.3.1. HEMATOKSİLEN EOSİN BOYASI İLE İNCELEME

Deparafinize edilen parafin kesitler derecesi azalan alkol serisinden (100°, 96°, 90°, 70°) geçirildikten sonra saf suda hidrate edildi. Ardından Mayer's Hematoksilen'de 5 dakika boyandı, distile sudan geçirildi. Daha sonra kesitler 2-3 dakika Eozin ile boyandı. Boyanan kesitler, derecesi artan alkol serilerinden geçirildikten sonra ksilolde saydamlaştırıldı ve entellan ile kapatıldı. Tüm preparatlar, Olympus BX51 marka ışık mikroskobu ile bir patolog ve bir histolog tarafından incelendi ve fotomikrografları çekildi.

3.3.3.2. MASSON TRİKROM BOYASI İLE İNCELEME

Yine deparafinize edilen parafin kesitler, H&E boyama işleminde olduğu gibi alkol serilerinden geçirildikten sonra Mason trikrom boyama solusyonlarında boyandıktan sonra derecesi artan alkol serilerinden geçirildi ve ksilolde saydamlaştırılıp entellan ile kapatıldı. Kapatılan kesitler Olympus BX51 marka mikroskop ile bir patolog ve bir histolog tarafından değerlendirildi ve fotomikrografları çekildi.

Her sıçanın bilateral sinir kesitleri fibroblast sayısı ve fibrozis kalınlığının sinir çapına oranı açısından ayrı ayrı incelendi. Masson trikrom boyasındaki

kesitlerde Olympus BX51 marka mikroskopta 10X10 grid kullanılarak her büyük büyütme alanına düşen fibroblast ve fibrositler sayıldı. Her bir örnek daha önce literatürde bildirilen skala modifiye edilerek değerlendirildi ve perinöral skar yoğunluğu skoru oluşturuldu (Tablo 3).¹¹ Ayrıca oküler mikrometre ile fibrozis kalınlığı ve aynı alandaki sinir çapı ölçülerek birbirine oranlanarak skar doku oluşum indeksi hesaplandı.⁸

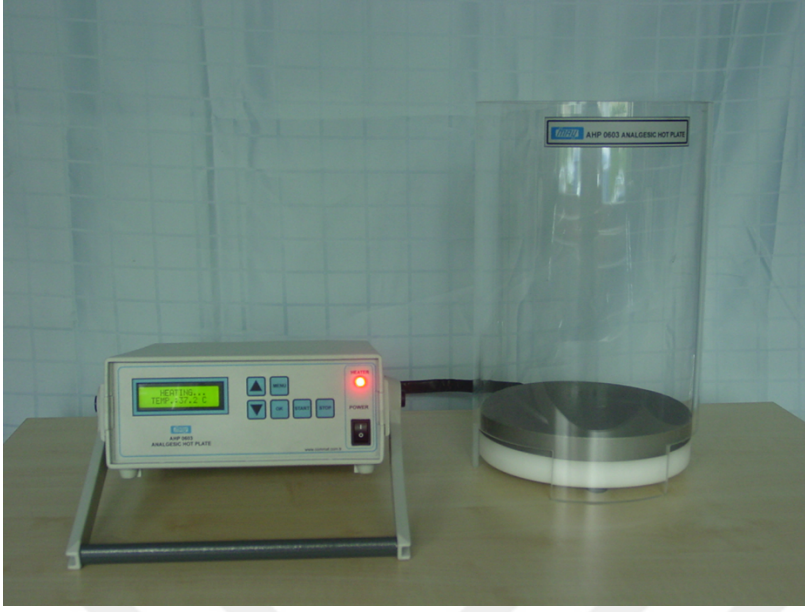
Grade 1	50'den az fibroblast/fibrosit
Grade 2	50 - 75 arası fibroblast/fibrosit
Grade 3	75'den fazla fibroblast/fibrosit

Tablo 3: Fibroblast sayısının Masson Trikrom boyası altında incelenmesinde kullanılan skala.¹¹

3.3.4. HOT PLATE TESTİ

Hot plate testi ağrı eşiğinin dolaylı yoldan değerlendirilebildiği bir termal ağrı modelidir. Sabit sıcaklıklı sıcak plaka üzerine konan sıçanların sıcaklık uyarısına verdiği yanıt verme süresi kullanılarak hesaplanır.

Bu çalışmada kullanılan Hot plate (May AHP 0603 Analgesic Hot Plate Commat, Ankara, Türkiye) cihazı sisteminde (Şekil 5) hayvanın deney ortamından uzaklaşmasına engel olan saydam bariyer oluşturan fanus kullanılmıştır.



Şekil 5: Hot plate cihazı.

Termal ağrı eşiği değerlendirmesi cerrahi işlemler öncesi işaretlenmiş sıçanları, $55\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 'ye ayarlanmış sabit sıcaklık altında ile ölçüldü. 4 hafta sonra deney sonlandırılmasından önce aynı işaretli sıçanlar aynı şartlarda tekrar değerlendirildi ve başlangıç bitiş değerleri karşılaştırıldı.

3.3.5. İSTATİSTİKSEL İNCELEME

Gruplar arasındaki farklılıklar için One way ANOVA post-hoc Tukey's test ve Mann Witney U test kullanıldı. $p < 0,05$ anlamlı kabul edildi. İstatistiksel hesaplamalar bilgisayar ile Windows 10 altında, GraphPad Prism 8.4.3 software kullanılarak yapılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. KLİNİK BULGULAR

Dört hafta boyunca düzenli bir şekilde yapılan kontrollerde deney ve kontrol grupları arasında yara bölgesi iyileşme dokusu sütürler ve nörolojik fonksiyon açısından anlamlı farklılık izlenmemiştir.

4.2. ANATOMİK BULGULAR

Dört haftanın sonunda eski insizyon skarı üzerinden işlem bölgesi tekrar açıldı ve incelemelerde bulunuldu. İnflamasyon ve enfeksiyon bulgusu izlenmedi. Hyaluronik asit ve artan dozda kafeik asit fenetil ester uygulanan deney gruplarında bulunan sinirlerin çevresinde adezyonlar kontrol grubuna göre anlamlı derecede azdı (Şekil 6-9).



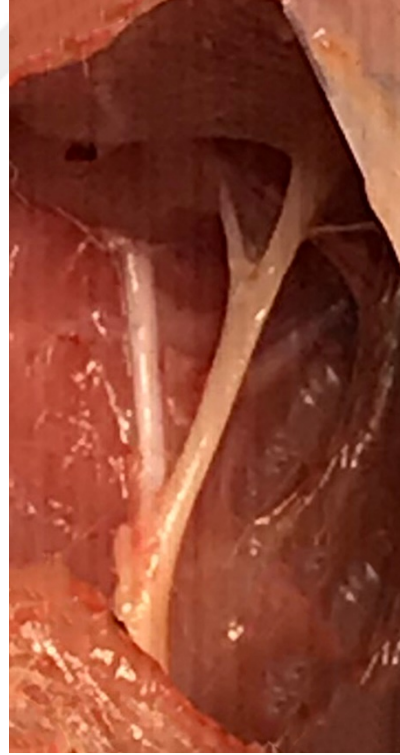
Şekil 6: Kontrol grubu



Şekil 7: HA grubu



Şekil 8: CAPE 1 grubu



Şekil 9: CAPE 2 grubu

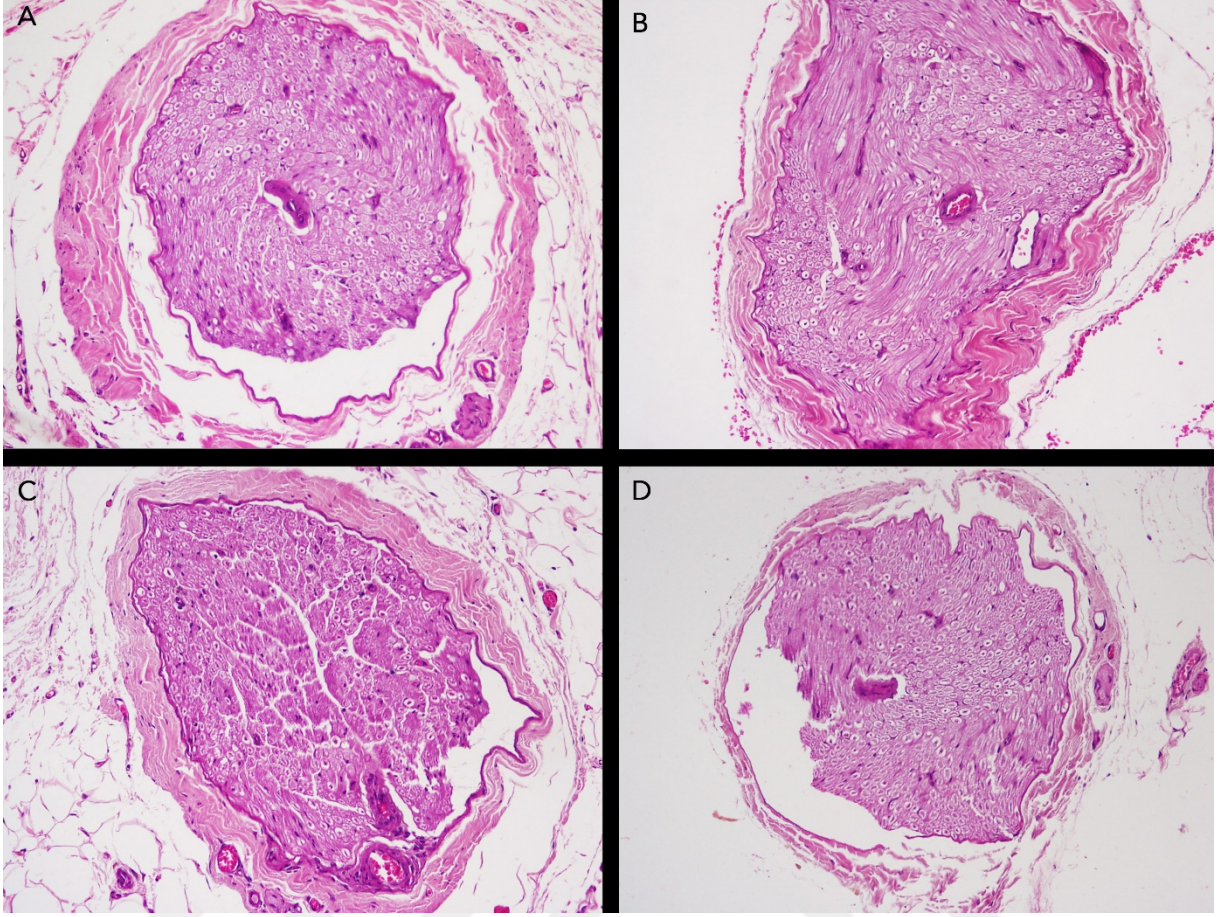
Petersen sayısal gradeleme şemasına göre yapılan değerlendirmelerde cilt, kas ve derin fasya kapanmasıyla ilgili gruplar arasında anlamlı farklılık saptanmamıştır ($p>0,05$). Deney gruplarının tamamında sinir ayrılabilirliği için diseksiyon gerekliliği ve adezyon miktarı kontrol grubuna göre anlamlı derecede azdı ($p<0,001$). CAPE 1 ve CAPE 2 grubunda sinir ayrımı için gerekli diseksiyon ve adezyon miktarı HA grubundan daha azdı. Her iki CAPE grubunda ise anlamlı farklılık saptanmadı (Tablo 4).

Tukey's test	P değeri
Kontrol vs CAPE 1	$>0,0001$
Kontrol vs CAPE 2	$>0,0001$
Kontrol vs HA	0,0096
HA vs CAPE 1	0,0278
HA vs CAPE 2	0,0278
CAPE 1 vs CAPE 2	$>0,999$

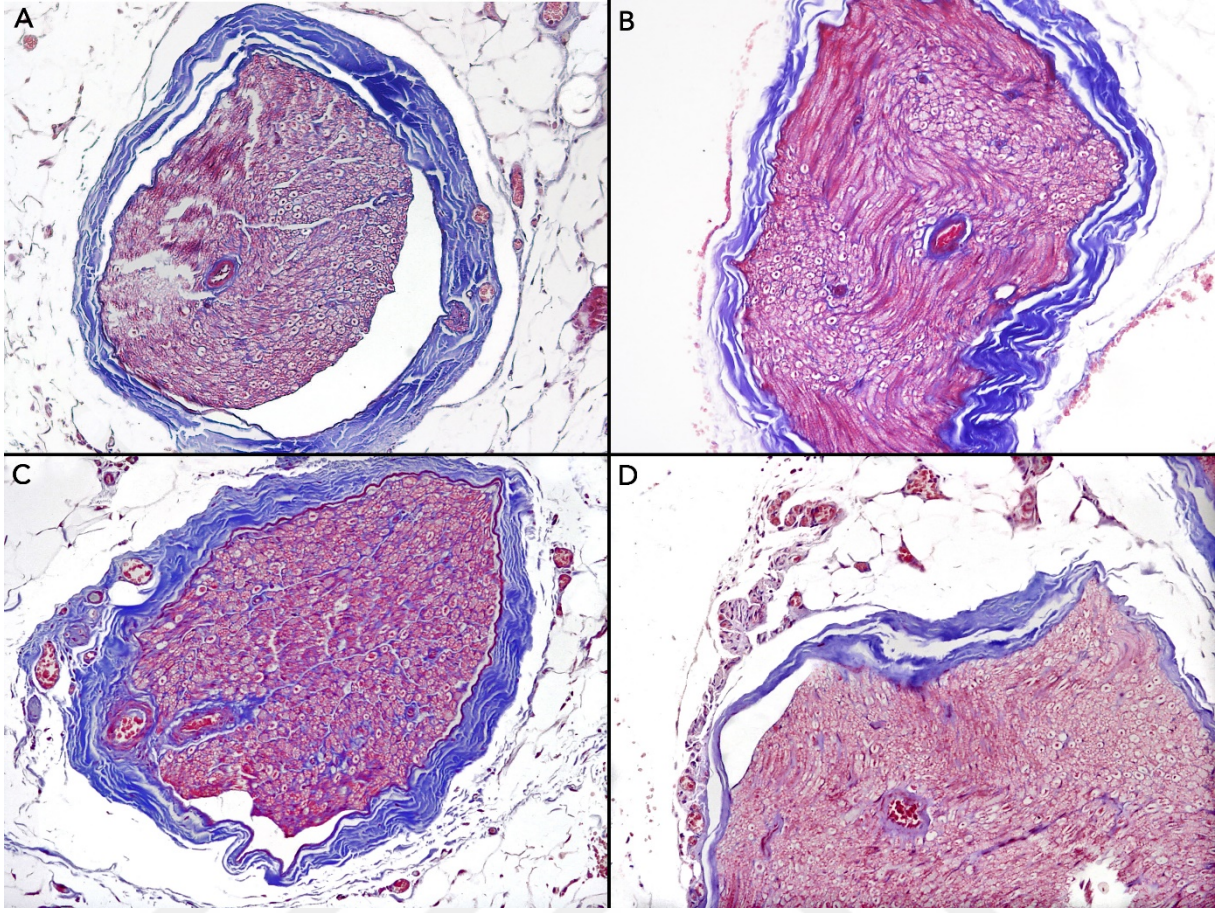
Tablo 4: Grupların adezyon yoğunluğu ve sinir ayrılabilirliği açısından One way ANOVA ile yapılmış istatistiksel karşılaştırması.

4.3. HİSTOPATOLOJİK BULGULAR

Kontrol grubunda daha kalın bant formunda perinöral bağ dokusu ile HA ve CAPE uygulanmış deney gruplarında sinir ve çevre dokular 100x 200x büyütme ile karşılaştırmalı olarak gösterildi (Şekil 10, 11).



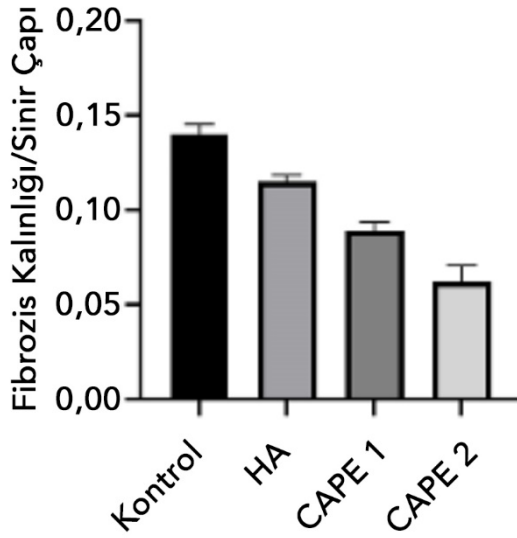
Şekil 10: H&E ile boyanmış sıçanlardan siyatik sinir bölümlerinin fotomikrografları. (A) Kontrol grubu, (B) CAPE 1 grubu, (C) HA grubu, (D) CAPE 2 grubunun siyatik sinir ışık mikroskopik görüntüleri.



Şekil 11: Mason trikrom ile boyanmış sıçanlardan siyatik sinir bölümlerinin fotomikrografları. (A) Kontrol grubu, (B) CAPE 1 grubu, (C) HA grubu, (D) CAPE 2 grubunun siyatik sinir ışık mikroskopik görüntüleri.

Sinirlerin çevresindeki bağ dokusu yoğunluk ölçümleri; Skar doku oluşum indeksi (granulasyon/sinir çapı oranı) ve Perinöral skar yoğunluğu (fibrosit/fibroblast sayıları derecelendirmesi) ölçümleri olmak üzere değerlendirildi.

Granulasyon/sinir çapı oranı değerlendirilerek oluşturulan Skar doku oluşum indeksi değerleri One-way ANOVA ile incelendi. Kontrol ve deney grupları arasında anlamlı farklılıklar bulundu (Tablo 5) ($p < 0,0001$). Ayrıca gruplar arası farklılıkların post-hoc Tukey's testi sonuçları tablo 6'da özetlenmiştir.



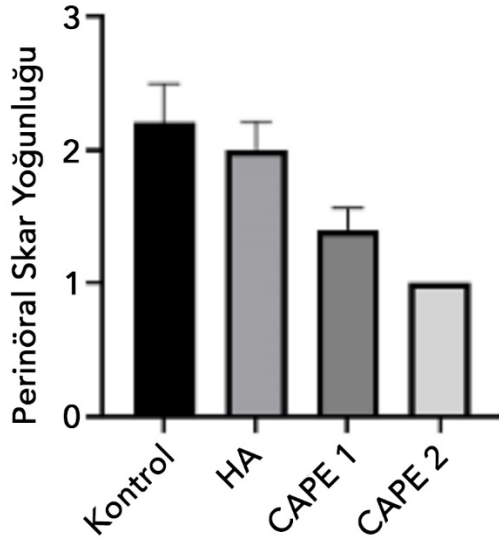
Tablo 5: Skar doku oluşum indeksi.

Tukey's test	P değeri
Kontrol vs HA	0,0156
Kontrol vs CAPE 1	<0,0001
Kontrol vs CAPE 2	<0,0001
HA vs CAPE 1	0,0096
HA vs CAPE 2	<0,0001
CAPE 1 vs CAPE 2	0,0087

Tablo 6: Grupların skar doku oluşum indeksi açısından istatistiksel karşılaştırması.

Perinöral skar yoğunluğu skoru: mikroskop altında sayılan fibroblast/fibrosit sayıları derecelendirilerek istatistiksel olarak incelendi. Kontrol grubuna karşı sadece CAPE gruplarında anlamlı farklılık bulunmasına karşın HA grubuna karşı

sadece CAPE 2 grubunda skar yoğunluğu anlamlı derecede azdı. Her iki CAPE grubu arasında anlamlı farklılık saptanamadı. Bu durum tablo 7 ve 8 de özetlenmiştir.



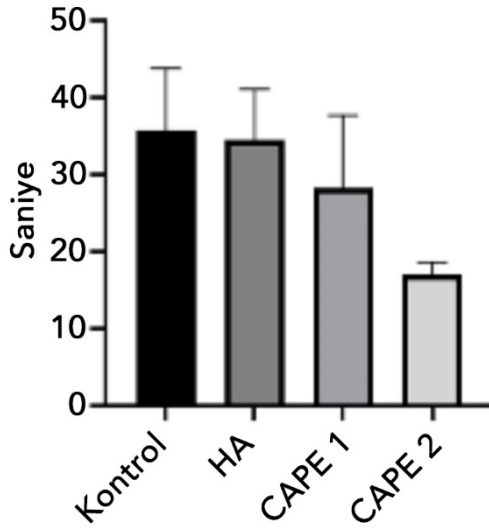
Tablo 7: Perinöral skar yoğunluğu skoru açısından gruplar arasındaki farklılıklar.

Tukey's test	P değeri
Kontrol vs HA	0,8896
Kontrol vs CAPE 1	0,0331
Kontrol vs CAPE 2	0,0007
HA vs CAPE 1	0,1566
HA vs CAPE 2	0,0052
CAPE 1 vs CAPE 2	0,4869

Tablo 8: Perinöral skar yoğunluğunun One-way ANOVA post-hoc Tukey's testi ile karşılaştırma sonuçları.

4.4. HOT PLATE BULGULARI

İşlemler sonrası ağrı eşiği değerlendirilmesi yapılan Hot plate testi için, bütün sıçanların dört hafta sonra anestezi öncesi alınan Hot plate değerleri Mann-Witney U test ile karşılaştırmalı olarak değerlendirildi. Sadece CAPE 2 grubunda ağrı eşiği değeri kontrol grubuna oranla anlamlı derece düşüktü ($p=0,0159$). Kontrol, HA ve CAPE 1 grupları arasında anlamlı farklılık saptanamamıştır (Tablo 9).



Tablo 9: Hot plate testi değerlendirme sonuçları.

5. TARTIŞMA

Adezyon dokuları, organ ve dokuların normal olmayan yapışıklıklarıdır. Cerrahi olmayan travmalar, cerrahi sonrası ve enfeksiyon gibi nedenler sonrası oluşan inflamatuvar süreçler sonrası meydana gelen fibroaktif bir yanıttır.⁵⁹⁻⁶² Normalde de yara iyileşmesi benzer süreçle gerçekleşmektedir.⁶³⁻⁶⁷ Bu yüzden, adezyonlarda asıl amaç hiç oluşmaması değildir. Çok yoğun ve diseksiyon zor adezyonlar gelişmesinden daha az miktarda, ince ve cerrahi diseksiyonu kolay olan kabul edilebilir düzeyde oluşması olmalıdır.

Periferik sinir operasyonu sonrasında oluşan yapışıklığı azaltmak için çeşitli teknikler denenmiştir. Bunların arasında mikrocerrahi yöntemler, sekonder nörolizis, endoskopik teknikler, dermofasial yağ greftleri, sinir transpozisyonu, ven paketlemesi ve kas flepleri gibi operatif teknikler bulunmaktadır.^{68,69} Ayrıca cis-hydroxyproline, hyaloid jel, aprotinin, ADCON, antitransforming growth factor- β antibody, amniotik sıvılar, düşük doz radyasyon ve mitomycin C gibi birçok madde de adezyonları engellemek için denenmiştir.^{10,70-73} Fakat tüm bu yöntemlerin yararlı olduğunu gösteren büyük klinik seriler yoktur.

Adezyon oluşumu, fibrin matriksinin oluşumu ile başlar, ardından fibroblastlar, makrofajlar ve dev hücreler içeren dokuların kademeli olarak düzenlenmesi izler. Fibroblastik proliferasyonun inhibisyonu, peritoneal adezyonların önlenmesinde bir kilit taşı olarak tanımlanmıştır. Doku oksijenasyonunda azalma ile iskemiye neden olan herhangi bir durum postoperatif adezyonlara yol açabilir. Özellikle iskeminin erken döneminde önemli miktarda serbest radikal üretilir. Bu maddeler oksijenle hızla reaksiyona girerek oksijen açığını artırarak iskemiye artırır. Süperoksitler,

peroksitler ve hidroksil radikalleri gibi yerel olarak üretilen serbest radikaller, çoklu doymamış yağ asitlerinin potansiyel oksitleyicileridir.^{74,75}

Vücutta fizyolojik durumda ya da patolojik durumlar sonrası gelişen serbest radikaller ve bu radikallerin önleyicisi olan antioksidan savunma mekanizması arasındaki dengenin, serbest radikaller tarafına kayması oksidatif stresi gösterir. Bazı çalışmalarda CAPE'nin insan nötrofillerinde ve ksantin-ksantin oksidaz mekanizmasında 10 µmol konsantrasyonunda serbest oksijen radikali oluşumunu total olarak bir şekilde inhibe ettiği ve bu şekilde antioksidan etki gösterdiği bildirilmiştir.³⁹

Raso ve ark.⁷⁶ çalışmalarında CAPE'in, normalde inflamasyon durumunda aktive edilen T lenfositlerde interlökin-2 (IL-2) geni inhibisyonu oluşturarak antiinflamatuvar etki gösterme potansiyeli olduğunu göstermişlerdir.

Abdel-Latif ve ark.⁷⁷ CAPE'nin antineoplastik ve antiinflamatuvar özelliklerini gastrik epitel hücre hattında göstermişler ve CAPE'nin tümör nekroz faktörü (TNF-a) ve IL-8 üretimini inhibe ettiğini; sonunda NF-κB, aktivatör protein (AP-1) ve siklooksijenaz 2 (COX-2) ekspresyonunu geciktirdiğini bildirmişlerdir. Burada, CAPE'in vücudun diğer dokularını etkilemediği ve bu nedenle bu doğal antikanser ajanının kullanımının, etkili kemopreventif özelliğe sahip yan etkilerden arındırıldığı belirtilmesi dikkat çekicidir.

CAPE, prostaglandin ve lökotrien üretimini düşürerek inflamasyon baskılayıcı özellikler gösterir. Bununla birlikte, hücre membranından araşidonik asit salınımını engellemektedir. Bunun sonucunda Siklooksijenaz-1 (COX-1) ve Siklooksijenaz-2 (COX-2) aktivitesi ile COX-2 gen ekspresyonu bloke edilerek baskılanır. CAPE, NF-κB'yi bloke ederek inflamasyonu düşürür ve adezyon molekülleri ve sitokinler gibi çeşitli mediatörleri etkiler.⁷⁸

Kumar ve ark.⁷⁹ çalışmasında CAPE'nin, streptozosin maddesinin intraventriküler alana enjeksiyonunun oluşturduğu oksidatif stres ve inflamasyon sonrası gelişen demansı azalttığı gösterilmiştir. Ayrıca farklı çalışmalarda CAPE'nin yenidoğanın hipoksik beyin hasarını önlediği ve deneysel parkinson modelinde dopaminerjik nöron kaybını azalttığı bildirilmiştir.^{80,81} Tüm bu sonuçlar CAPE'nin nöroprotektif etkisi olduğunu da göstermektedir.

Turgut ve ark.⁸² tarafından batın içi yapışıklık modeli ile Kafeik asit fenetil ester kullanılarak yapılan bir çalışmada, CAPE'nin sadece inflamasyonun şiddeti, yaygınlığını ve fibrozu azaltmadığını, aynı zamanda oksidanlara ikincil hasarı azaltan antioksidan kapasiteyi de artırdığı, başka bir deyişle CAPE tedavisi, bağırsak hasarının önemli nedenleri olan inflamasyon, lipid peroksidasyonu ve oksidatif stresi azaltabildiği bildirilmiştir.

Hyalüronik asit, önemli ekstraselüler matriks komponentlerinden olup yara iyileşmesinde önemli rolü vardır.⁸³ HA, IL-1' in endojen stimülatörü olup; IL-1 ise fibroblast proliferasyonu ve kollajenaz arasındaki regülasyonu sağlar.⁸⁴ Aynı zamanda lökosit hareketini, inflamatuvar hücrelerin adezyonlarını ve fagositozu düzenleyerek hasarlı dokuya infiltrasyonları engeller.⁸⁵ Bununla birlikte HA, sinir ve çevre dokular arasında fiziksel bariyer oluşturarak adezyonu azaltıcı etki göstermektedir.^{1,86,87} Literatürde Hyalüronik asitin, deney hayvanında oluşturulan siyatik sinir hasarı modelinde kullanımı yaygındır. Özgenel ve ark.¹⁰, Idea ve ark.⁸⁶, Li ve ark.⁸⁸, Park ve ark.⁸⁹ yaptıkları deneysel siyatik hasar modellerinde, HA kullanımı siyatik sinirde adezyonu azaltmış ve aynı zamanda antiinflamatuvar etkisi ile sinir iyileşmesini kontrol gruplarına göre anlamlı olarak artmıştır. Ayrıca HA, periferik sinir

çalışmalarının dışında örneğin; abdominal ve pelvik bölge cerrahilerinde de skar önleyici etkileri açısından çalışılmıştır.⁹⁰

Lenfosit göçünü, proliferasyonunu, kemotaksiyi ve granülosit fagositozunu inhibe ederek skar oluşumuna engel olduğu bilinen HA gibi polisakkarit jellerin, periferik sinir cerrahisi sonrası adezyonların önlenmesinde etkili olduğu gösterilmiş bir ajandır.^{44,91}

Petersen ve ark.⁸ tarafından yapılan çalışmada ADCON-T / N olarak bilinen HA jel türevi maddenin, periferik sinirlerin nörolizini içeren cerrahi prosedürlerden sonra skar ve adezyon oluşumunu azaltmada etkili olduğu gösterilmiştir.

Görgülü ve ark.⁹² yaptıkları çalışmada periferik sinir cerrahisi sonrası oluşan yapışıklığı azaltmada yüksek doz radyasyonun aksine; düşük doz radyasyonun (700 cGy) fibroblast/fibrosit sayısını azaltarak cilt ve kas/fasya iyileşmesini olumsuz etkilemeden periferik sinir çevresi adezyonları azalttığını tespit edilmiştir. Ancak insanlarda radyoterapi uygulanması karsinogenez olasılığı nedeniyle endişelere neden olabilir. Bununla birlikte böyle bir profilaktik tedavi çocuklar ve hamile kadınlar için uygun değildir.

Hot Plate testi, ağrı eşiği değerlendirme modelleri arasında termal uyarı kullanılan bir testtir. Reaksiyon süresi hesaplanarak yapılı ve bireysel farklılık göstermesi testin en büyük dezavantajıdır. Bu teste verilen cevaplar ağrının periferik ve merkezi mekanizmalarının bir birleşimidir.^{93,94}

Biz de kendi çalışmamızda daha önce birçok kez çeşitli ajanlar ve teknikler kullanılarak çalışılmış ancak klinikte etkin sonuçlar alınamamış olan periferik sinir cerrahisi sonrası gelişen fibrozis ve bunun neden olduğu motor ve sensorial kayıplar, kronik nöropatik ağrılar, ağrı eşiğindeki bozulmaları önlemeyi, rekurren cerrahilerdeki zorluklar ve tedavi maliyetlerini azaltmayı

amaçladık. Bunu gerçekleştirmek için propolis aktif bileşenlerinden Kafeik asit fenetil ester (CAPE)' i tercih ettik. Bu maddenin daha önce bu modelde topikal uygulaması bulunmamasından dolayı etkinlik ve toksik etkiler bakımından birden fazla dozaj uygulanması çalışmanın güçlü yanlarından. Bununla birlikte daha önce bu konuda etkinliği gösterilmiş bir madde olan Hyalüronik asit ile kıyasladık ve etkinlik açısından sadece salin uygulanan grup değil HA grubunu da karşılaştırma için kullandık. Ayrıca çalışma gruplarımızdaki bütün sıçanlara histopatolojik işlemler öncesi Hot plate testi uygulanarak ağrı eşiği ve nöropatik ağrılar açısından da değerlendirildi. 3 µg/ml CAPE uygulanan CAPE 1 grubunda sonuçlar HA ile kıyaslandığında CAPE 1 lehine benzer olsada dozun 30 µg/ml'e yükseltildiği CAPE 2 grubunda hem kontrol hem de HA grubuna karşı bütün değerlendirmelerde daha etkin sonuçlar elde ettik. Dolayısıyla yapışıklığa bağlı ağrı ve motor fonksiyon kısıtlılığının CAPE 2 grubunda diğer gruplara göre daha az olduğu sonucuna vardık.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Günümüzde perinöral skar, periferik sinir cerrahisi sonrası cerrahi klinik sonuçları çok fazla oranda etkileyen önemli bir unsurdur. Biz de çalışmamızda Kafeik asit fenetil ester'in, perinöral skar oluşumunu hyaluronik asitten daha etkili şekilde azalttığını ve ağrı eşliğini de etkilemediğini tespit ettik. Uygulama tekniği açısından ek cerrahi girişim ve uygulama tekrarı gerektirmemesi ayrıca düşük maliyetli olması uygulama avantajlarından. Antioksidan etkinliği de bildirilen CAPE'nin, perinöral skar ve topikal uygulama açısından ek dozaj ve toksikoloji çalışmaları sonrasında klinik deneylerde de kullanılmaya değer bir ajan olduğunu düşünüyoruz.



7. ÖZET

Giriş ve amaç: Periferik sinir cerrahisi sonrası en sık yaşanan problemlerden biri perinöral skar formasyonlarıdır. Bu durum cerrahi başarıyı etkileyerek uzun dönemde ciddi ağrı ve nörolojik sekellere neden olmaktadır. Bu çalışmada amaç perinöral skar oluşumunu azaltılmasında topikal CAPE kullanımının etkilerinin makroskopik, histopatolojik ve ağrı eşiği değerlendirilmesi yönlerinden incelenmesidir.

Gereç ve yöntem: Bu çalışma yirmi adet Wistar albino sıçanları ile üç deney ve bir kontrol grubu oluşturularak yapıldı. Her gruptaki sıçanların siyatik sinirleri iki taraflı olarak ortaya konuldu. Böylece her grup için on adet siyatik sinir elde edilmiş oldu. Siyatik sinirlere çevre kas dokularıyla birlikte tekrarlayan fırça hareketiyle abrazyon yaralanması oluşturuldu. Kontrol grubunda salin, bir deney grubunda HA ve kalan iki deney grubunda ise artan dozda CAPE 5 dk süre boyunca topikal olarak uygulandı. Cerrahi işlemlerden dört hafta sonra sıçanlara Hot plate testi yapıldı. Sonrasında sakrifiye edilen sıçanlarda makroskopik ve mikroskopik değerlendirmeler yapıldı.

Bulgular: Her dört grupta da cilt ve fasya kavitesinin kapanmasında anlamlı farklılık yoktu. Her dört grupta da nörolojik defisit ya da yan etki saptanmadı. Makroskopik ve mikroskopik değerlendirmelerde, perinöral skar dokusu CAPE gruplarında ve HA grubunda kontrol grubuna göre daha az olduğu saptandı. Ayrıca bütün parametrelerde CAPE 2 grubunda HA ve Kontrol gruplarına karşı anlamlı derecede daha az yapışıklık tespit edildi. Hot plate testi ile değerlendirmelerde ağrı eşiği CAPE 1 grubunda yalnızca kontrol grubuna karşı anlamlı düşük bulunmasına karşın, CAPE 2 grubunda ise hem kontrol hem de HA gruplarına karşı anlamlı derecede düşük bulundu.

Sonuç: Periferik sinir cerrahisi sonrası oluşan perinöral yapışıklıkları azaltmak amacıyla yapılan çalışmamız, topikal CAPE kullanımının HA kullanımına göre daha etkili olduğu sonucunu göstermiştir. CAPE, uygulama kolaylığı, fiyatı ve kolay elde edilebilirliği sayesinde klinik uygulamalarda kullanılabilir. Ancak, bu maddenin klinik kullanımı için, farklı dozlarla yapılacak ve doz-etki ilişkisini gösterecek yeni çalışmalar gereklidir.

Anahtar kelimeler: Epinöral adezyon, Hyaluronik asit, Kafeik asit fenetil ester, Siyatik sinir



8. ABSTRACT

Introduction and purpose: Perineural scar formations are one of the most common problems after peripheral nerve surgery. This situation affects surgical success and causes serious pain and neurological sequelae in the long term. The aim of this study is to examine the effects of topical CAPE use in reducing perineural scar formation in terms of macroscopic, histopathological and pain threshold evaluation.

Materials and methods: This study was carried out with twenty Wistar albino rats by forming three experimental and one control group. The sciatic nerves of the rats in each group were exposed bilaterally. Thus, ten sciatic nerves were obtained for each group. Abrasion injury was created with repetitive brush movement to the sciatic nerves with the surrounding muscle tissues. Saline in control group, HA in one experimental group and increasing dose of CAPE in the remaining two experimental groups were applied topically for 5 minutes. Hot plate test was applied to rats four weeks after the surgical procedures. Afterwards, macroscopic and microscopic evaluations were made on the rats that were sacrificed.


Results: There was no significant difference in closure of the skin and fascia cavity in all four groups. Neurological deficits or side effects were not found in all four groups. In macroscopic and microscopic evaluations, perineural scar tissue was found to be less in the CAPE groups and in the HA group compared to the control group. In addition, in all parameters, significantly less adhesion was detected in the CAPE 2 group against the HA and control groups. In the evaluations with the hot plate test, the pain threshold was found to be significantly lower in the CAPE 1 group compared to only the control group,

while it was significantly lower in the CAPE 2 group compared to both the control and HA groups.

Conclusion: Our study, which was carried out to reduce perineural adhesions after peripheral nerve surgery, showed that the use of topical CAPE is more effective than HA. CAPE can be used in clinical applications thanks to its ease of application, price and availability. However, for the clinical use of this substance, new studies with different doses are required to show the dose-effect relationship.


Keywords: Caffeic acid phenethyl ester, Epineural adhesion, Hyaluronic acid, Sciatic nerve

9. EKLER




**T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ**

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU



EUA
European University Association



BSEVATORY
HEALTH CARE & CONFIDENCE

PROJE NO: 2019/15	ARAŞTIRMANIN ADI	Siçanlarda epinöral yapışıklığın önlenmesinde Kafeik asit fenetil ester (CAPE)in etkilerinin araştırılması.
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI KURUMU	Prof.Dr.Mahmut Konuralp İLBAY / Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi, Beyin ve Sinir Cerrahisi Anabilim Dalı
	YARDIMCI ARAŞTIRMACILAR	Arş.Gör.Dr.Necdet Selim KAYA, Dr.Öğr.Üyesi Muhammet Hamza GENÇ, Doç.Dr.Gül İLBAY, Prof.Dr.Melda YARDIMOĞLU
BAŞVURU BİLGİLERİ		

DEĞERLENDİRİLEN BELGE	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ ve EKLERİ	x
------------------------------	--------------------------------------	---

KARAR BİLGİLERİ	Yukarıda başvuru bilgileri bulunan araştırma projesi Kocaeli Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesine dayanarak gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemler açısından incelenmiş olup, araştırmanın yürütülmesinin etik açıdan uygun olduğu kararına varılmıştır.	
	KARAR NO: KOU HADYEK 8/1-2019	KARAR TARİHİ: 12.09.2019

ETİK KURUL ÜYELERİ			
UNVANI/ADI SOYADI ETİK KURUL GÖREVİ	BİRİMİ	TOPLANTIYA KATILMA	KARARA KATILMA İMZA
Prof. Dr. Hüsnü EFENDİ Başkan	Kocaeli Üniversitesi (KOU) Tıp Fakültesi Nöroloji AD	<input type="checkbox"/> Katıldı <input checked="" type="checkbox"/> Katılmadı	Kongre izahı M.Şen
Doç. Dr. Mine ŞEHİRALTI Başkan Vekili	KOU Tıp Fakültesi Tıp Tarihi ve Deontoloji AD	<input checked="" type="checkbox"/> Katıldı <input type="checkbox"/> Katılmadı	M.Şen
Veteriner Hekim Cüneyt Özer Raportör	KOU Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Birimi	<input type="checkbox"/> Katıldı <input type="checkbox"/> Katılmadı	
Prof. Dr. Tijen UTKAN Üye	KOU Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Birimi Tıp Fakültesi Farmakoloji AD	<input type="checkbox"/> Katıldı <input type="checkbox"/> Katılmadı	
Dr.Öğr.Üyesi Sabri CORA Üye	KOU Dış Hekimliği Fakültesi Endodonti AD	<input type="checkbox"/> Katıldı <input type="checkbox"/> Katılmadı	
Dr.Öğr.Üyesi Fevzi UÇKAN Üye	KOU Fen-Edebiyat Fakültesi Genel Biyoloji AD	<input type="checkbox"/> Katıldı <input type="checkbox"/> Katılmadı	
Prof. Dr. Zafer CANTÜRK Üye	KOU Tıp Fakültesi Genel Cerrahi AD	<input type="checkbox"/> Katıldı <input type="checkbox"/> Katılmadı	
Prof. Dr. Melda YARDIMOĞLU YILMAZ Üye	KOU Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji AD	<input type="checkbox"/> Katıldı <input type="checkbox"/> Katılmadı	
Prof. Dr. Canan BAYDEMİR Üye	KOU Tıp Fakültesi Biyostatistik ve Tıbbi Bilişim AD	<input type="checkbox"/> Katıldı <input type="checkbox"/> Katılmadı	
Doç.Dr. Gürler AKPINAR Üye	KOU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji AD	<input type="checkbox"/> Katıldı <input type="checkbox"/> Katılmadı	
Av.Hakkı Çağdaş ERTURAN Üye	Kocaeli Barosu (STK) Üyesi	<input type="checkbox"/> Katıldı <input type="checkbox"/> Katılmadı	C.ERTURAN
Asiye ASLAN Üye	Emekli Öğretmen	<input type="checkbox"/> Katıldı <input type="checkbox"/> Katılmadı	

Kocaeli Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Sekreterliği, Umutepe Yerleşkesi, Eski İstanbul Yolu 10.km, 41380 Umutepe / İZMIT
Tel: 0 262 303 70 14; - Faks: 0 262 303 70 03

Ek 1: Etik kurul belgesi

10. KAYNAKLAR

1. Dam-Hieu P, Lacroix C, Said G, Devanz P, Liu S, Tadie M. Reduction of postoperative perineural adhesions by Hyaloglidge gel: an experimental study in the rat sciatic nerve. *Neurosurgery*. 2005; 56(2 Suppl): 425-433
2. Smit X, van Neck JW, Afoke A, Hovius SE. Reduction of neural adhesions by biodegradable autocrosslinked hyaluronic acid gel after injury of peripheral nerves: an experimental study. *J Neurosurg*. 2004; 101(4): 648-652.
3. Shaw Wilgis EF: Clinical aspect of nerve gliding in the upper extremity, in Hunter JM, Schneider LH, Mackin EJ (eds): *Tendon and Nerve Surgery in the Hand*. St. Louis, C.V. Mosby, Inc., 1997: 121–124.
4. de Tribolet N, Porchet F, Lutz TW, Gratzl O, Brotchi J, van Alphen HA, van Acker RE, Benini A, Strommer KN, Bernays RL, Goffin J, Beuls EA, Ross JS: Clinical assessment of a novel anti-adhesion barrier gel: Prospective, randomized, multicenter, clinical trial of Adcon-L to inhibit postoperative peridural fibrosis and related symptoms after lumbar discectomy. *Am J Orthop* 1998;27:111–120
5. Le AX, Rogers DE, Dawson EG, Kropf MA, De Grange DA, Delamarter RB: Unrecognized durotomy after lumbar discectomy: A report of four cases associated with the use of Adcon-L. *Spine* 2001;26:115–118
6. McCall TD, Grant GA, Britz GW, Goodkin R, Kliot M: Treatment of recurrent peripheral nerve entrapment problems: Role of scar formation and its possible treatment. *Neurosurg Clin N Am* 2001;12:329–339
7. Palatinsky EA, Maier KH, Touhalisky DK, Mock JL, Hingson MT, Coker GT: Adcon T/N reduces in vivo perineural adhesions in a rat sciatic nerve reoperation model. *J Hand Surg [Br]* 1997;22B:331–335.
8. Petersen J, Russell L, Andrus K, MacKinnon M, Silver J, Kliot M. Reduction of extraneural scarring by ADCON-T/N after surgical intervention. *Neurosurgery*. 1996; 38: 976–984.
9. Hieb LD, Stevens DL: Spontaneous postoperative cerebrospinal fluid leaks following application of anti-adhesion barrier gel. *Spine* 2001;26:748–751
10. Ozgenel GY, Filiz G Effects of human amniotic fluid on peripheral nerve scarring and regeneration in rats. *J Neurosurg* 2003; 98:371–317.
11. Ilbay K, Etus V, Yildiz K, Ilbay G, Ceylan S. Topical application of mitomycin C prevents epineural scar formation in rats. *Neurosurg Rev*. 2005; 28(2): 148-153.
12. Payne SH Jr. Nerve repair and grafting in the upper extremity. *Journal of the Southern Orthopaedic Association*. 2001 ;10(3):173-189.

13. Toprak M. Periferik Nöroanatomi Fonksiyonel Klinik. İÜ Basımevi ve Film Merkezi. İstanbul 1990.
14. Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO. Basic Histology. 6th Edition. Stamford, Conn: Appleton & Lange, 1998.
15. Kumar V, Conran S, ed. Uluoğlu Ö. Patoloji Robbins & Kumar. 4. Baskı. WB Saunders Company/ Güneş Kitabevi. 1990.
16. Chang HY, Chi JT, Dudoit S, Bondre C, van de Rijn M, Botstein D, Brown PO. Diversity, topographic differentiation, and positional memory in human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002; 99(20): 12877-12882.
17. Gu YD, Wu MM, Zheng YL: Arterialized venous free sural nerve grafting. *Ann Plast Surg* 1985; 15:332-339
18. Belzberg A, Campbell J: Neurosurgical operative atlas, in Rengachary SS, Wilkins RH(eds): Peripheral nerve repair. Williams and Wilkins 1993
19. Lundborg G: Ischemic nerve injury. *Scand J Plastic Reconstr surg* 1970;6: 30-38
20. Myers RR, Heckman HM: Effects of local anesthetics on nerve blood flow: Studies using lidocaine with and without epinephrine. *Anesthesiology* 1989; 71: 757-762
21. Selander D, Mansson LG, Karlsson L, Svanvik J: Adrenergic vasoconstriction in peripheral nerves of the rabbit. *Anesthesiology* 1985; 62:6-10
22. Brushart T: Central course of digital axons within the median nerve of macaca mulatto. *J Comp Neurol* 1991; 311: 197-209 35
23. Jabaley ME, Wallace WH, Heckler FR: Internal topography of major nerves of the forearm and hand :Acurrent view. *J Hand Surg* 1980; 5: 1-18
24. Vinay K, Ramzi C, Stanley R, Basic Pathology, Philadelphia: W.B. Saunders Company 1995
25. Majmudar PA, Forstot SL, Dennis RF, Nirankari VS, Damiano RE, Brenart R, Epstein RJ. Topical mitomycin-C for subepithelial fibrosis after refractive corneal surgery. *Ophthalmology*. 2000; 107: 89–94.
26. Sunderland S. The nerve lesion in the carpal tunnel syndrome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1976;39(7):615-626.

27. Ivanov DF, Tikonov AI, Krivenchuk PE, Liurskaia FV. Propolis and its clinical usage. *Oftolmol Zh* 1973; 28(2): 104-7.
28. Krol W, Scheller S, Shani J, Pietsz G, Czubaz. Synergistic effect of ethanolic extract of propolis and antibiotics on the growth of *Staphylococcus aureus*. *Arzneimittelforschung* 1993; 43(5): 607-9.
29. Pekmez H, Kuş İ, Çolakoğlu N, Zararsız İ, Ögetürk M, Sarsılmaz M. Sıçanlarda Sigara İnhalasyonu Sonucu Prefrontal Kortekste Oluşan Yapısal Değişiklikler Üzerine Kafeik Asit Fenetil Ester(Cape)' in Etkisi. *Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*. 2004;13:18-25.
30. Persano Oddo L, Piro R. Main European unifloral honeys: Descriptive sheets. *Apidologie* 2004; 35: 38– 81.
31. Conti ME. Lazio region (Central Italy) honeys: a survey of mineral content and typical quality parameters. *Food Control* 2000; 11: 459-63.
32. Iskander FY. Trace and minor elements in four commercial honey brands. *J Radioanalyt Nuclear Chem* 1995; 201: 401–8.
33. Rodriguez-Otero JL, Paseiro P, Simal J, Cepeda A. Mineral content of the honeys produced in Galicia (North-west Spain). *Food Chem* 1994; 49: 169-71.
34. Deutsche Gesellschaft für Ernährung. "Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr". Umschau/Braus. Frankfurt am Main. 2000.
35. Al-Mamary M, Al-Meerri A, Al-Habori M. Antioxidant activities and total phenolics of different types of honey. *Nutr Res* 2002; 22: 1041–47.
36. Yılmaz H, Yavuz O. Content of some trace metals in honey from South-Eastern Anatolia. *Food Chem* 1999; 65: 475-6.
37. Koltuksuz U, Irmak MK, Karaman A, et al. Testicular nitric oxide levels after unilateral testicular torsion/detorsion in rats pretreated with caffeic acid phenethyl ester. *Urol Res* 2000; 28: 360-3.
38. Irmak MK, Koltuksuz U, Kutlu NO, et al. The effects of caffeic acid phenethyl ester on ischemia-reperfusion injury in comparison with α -tocopherol in rat kidneys. *Urol Res* 2001; 29: 190-3.
39. Hepşen IF, Tilgen F, Er H. Propolis: Tıbbi özellikleri ve oftalmolojik kullanımı. *Turgut Özal Tıp Merkezi Dergisi* 1996; 3: 386-91.

40. Grunberger D, Banerjee R, Eisinger K, Oltz EM, Efras L, Coldwell M. Preferential cytotoxicity on tumor cells by caffeic acid phenethyl ester isolated from propolis. *Experientia* 1988; 44: 230-2.
41. Sud'ina GF, Mirzoeva OK, Pushkareva MA, Korshunova GA, Sumbatyan NV, Varfolomeev SD. Caffeic acid phenethyl ester as a lipoxygenase inhibitor with antioxidant properties. *FEBS Lett* 1993; 329: 21-4.
42. Michaluart P, Masferrer JL, Carothers AM, et al. *Cancer Res* 1999; 59, 2347-52.
43. Kimura Y, Okuda H, Okuda T, Hatano T, Agata I, Arichi S. Studies on the activities of tannins and related compounds from medicinal plants and drugs. VII. Effects of extracts of leaves of *Artemisia* species, and caffeic acid and chlorogenic acid on lipid metabolic injury in rats fed peroxidized oil. *Chem Pharm Bull* 1985; 33: 2028-34.
44. Lee SK, Song L, Mata-Greenwood E, Kelloff GJ, Steele VE, Pezzuto JM. Modulation of in vitro biomarkers of the carcinogenic process by chemopreventive agents. *Anticancer Res* 1999; 19: 35- 44
45. Russo A, Longo R, Vanella A. Antioxidant activity of propolis: role of caffeic acid phenethyl ester and galangin. *Fitoterapia*. 2002;73:21-29.
46. Koltuksuz U, Ozen S, Uz E, Aydinç M, Karaman A, Gültek A, Akyol O, Gürsoy MH, Aydin E. Caffeic acid phenethyl ester prevents intestinal reperfusion injury in rats. *J Pediatr Surg*. 1999;34:1458-1462.
47. S. Lieberman, Y.Y. Lin, Reflections on sterol sidechain cleavage process catalyzed by cytochrome P450(scc), *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 78 (2001) 1-14
48. Longaker M, Chiu ES, Harrison MR et al. Studies in fetal wound healing IV. Hyaluronic acid-stimulating activity distinguishes fetal wound fluid from adult wound fluid. *Ann Surg*. Nov 1989;210:5
49. Chen WYJ, Abatangelo G. Functions of hyaluronan in wound repair. *Wound Rep. Reg* 1999;7:79–89.
50. Jiang D, Liang J, Noble PW. Hyaluronan in Tissue Injury and Repair. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2007. 23:435–61
51. Toole BP. Hyaluronan: From Extracellular Glue to Pericellular Cue. *Nat Rev Cancer*. 2004 Jul;4(7):528-39
52. Almond A. Hyaluronan. *Cell Mol Life Sci.* 2007 Jul;64(13):1591-6
53. Girish KS, Kemparaju K. The magic glue hyaluronan and its eraser hyaluronidase: a biological overview. *Life Sci.* 2007 May 1;80(21):1921-43
54. Burns JW, Skinner K, Colt J, Burgess L, Rose R, Diamond MP: A hyaluronate based gel for the prevention of postsurgical adhesions: Evaluation in two animal species. *Fertil Steril* 66:814–821, 1996.
55. Burns JW, Skinner K, Colt J, Sheidlin A, Bronson R, Yaacobi Y, Goldberg EP: Prevention of tissue injury and postsurgical adhesions by precoating tissues with hyaluronic acid solutions. *J Surg Res* 59:644–652, 1995.

56. Hagberg L, Gerdin B: Sodium hyaluronate as an adjunct in adhesion prevention after flexor tendon surgery in rabbits. *J Hand Surg [Am]* 17A:935–941, 1992.
57. Isik S, Ozturk S, Gurses S, Yetmez M, Guler MM, Selmanpakoglu N, Gunhan O: Prevention of restrictive adhesions in primary tendon repair by HA membrane: Experimental research in chickens. *Br J Plast Surg* 52:373–379, 1999.
58. Songer MN, Ghosh L, Spencer DL: Effects of sodium hyaluronate on peridural fibrosis after lumbar laminotomy and discectomy. *Spine* 15:550–554, 1990.
59. Lucas PA. Stem cells for mesothelial repair: An understudied modality. *Int J Artif Organs* 2007; 30(6): 550-556.
60. Ito T, Yeo Y, Highley CB, Bellas E, Kohane DS. Dextran-based in situ cross-linked injectable hydrogels to prevent peritoneal adhesions. *Biomaterials* 2007; 28(23): 3418-3426.
61. Christen D, Buchmann P. Peritoneal adhesion after laparotomy: prophylactic measures. *Hepatogastroenterology* 1991; 38(4): 283-286.
62. Avşar FM, Şahin M, Aksoy F, Avşar AF, Akoz M, Hengirmen S. Effects of diphenhydramine HCL and methylprednisolone in the prevention of abdominal adhesions. *Am J surg* 2001; 181(6): 512-515.
63. Holmdahl L, Risberg B. Adhesions: prevention and complications in general surgery. *Eur J Surg* 1997; 163(3): 169-174.
64. Ellis H. The cause and prevention of postoperative intraperitoneal adhesions. *Surg Gynecol Obstet* 1971; 133(3): 497-511
65. Holmdahl L, Risberg B, Beck DE, Burns JW, Chegini N, diZerega GS. Adhesions: pathogenesis and prevention-panel discussion and summary. *Eur J Surg Suppl* 1997; 577: 56-62
66. Ellis H. The causes and prevention of intestinal adhesions. *Br J Surg* 1982; 69(5): 241-243
67. Holmdahl L, Marlier-Bannot S. The prevention of intestinal obstruction related to adhesions. *Ann Chir* 2006; 131(10): 647
68. Mastronardi L, Pappagallo M, Puzilli F, Tatta C. Efficacy of the morphineAdcon-L compound in the management of postoperative pain after lumbar microdiscectomy. *Neurosurgery*. 2002; 50(3): 518-525.
69. Turgut M, Uysal A, Pehlivan M, Oktem G, Yurtseven ME. Assessment of effects of pinealectomy and exogenous melatonin administration on rat sciatic nerve suture repair: an electrophysiological, electron microscopic, and immunohistochemical study. *Acta Neurochir(Wien)*. 2005; 147(1): 67-77.
70. Gorgulu A, Imer M, Simsek O, Sencer A, Kutlu K, Cobanoglu S. The effect of aprotinin on extraneural scarring in peripheral nerve surgery: an experimental study. *Acta Neurochir (Wien)* 1998; 140:1303–1307.
71. Gorgulu A, Uzal C, Doganay L, Imer M, Eliuz K, Cobanoglu S The effect of low-dose external beam radiation on extraneural scarring after peripheral nerve surgery in rats. *Neurosurgery* 2003;3:1389–1395.
72. Nachemson AK, Lundborg G, Myrhage R, Rank F Nevre regeneration and pharmacological suppression of the scar reaction at the suture site. An experimental study on the effect of estrogen–progesterone, methylprednisolone-acetate and cis-hydroxyproline in rat sciatic nerve. *Scand J Plast Reconstr Surg* 1985; 19:255–260.

73. Nath RK, Kwon B, Mackinnon SE, Jensen JN, Reznik S, Boutros S Antibody to transforming growth factor beta reduces collagen production in injured peripheral nerve. *Plast Reconstr Surg* 1998;102:1100–1106
74. Hatipoğlu A, Türkyılmaz Z, Mert S: The effects of melatonin on postoperative intraabdominal adhesion formation. *Yonsei Med J* 2007;48:659–664
75. Leach RE, Burns JW, Dawe EJ, Smith Barbour MD: Diamond MP: Reduction of postsurgical adhesion formation in the rabbit uterine horn model with use of hyaluronate/carboxymethylcellulose gel. *Fertil Steril* 1998;69:415–418.
76. Raso GM, Meli R, Di Carlo G, Pacilio M, Di Carlo R. Inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression by flavonoids in macrophage J774A.1. *Life Sci.* 2001;68(8):921-931.
77. Abdel-Latif MM, Windle HJ, Homasany BS, Sabra K, Kelleher D. Caffeic acid phenethyl ester modulates Helicobacter pylori-induced nuclear factor-kappa B and activator protein-1 expression in gastric epithelial cells. *Br J Pharmacol.* 2005;146(8):1139-1147.
78. Song, J. J., Lim, H. W., Kim, K., Kim, K. M., Cho, S., et al. 2012, Effect of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on H₂O₂ induced oxidative and inflammatory responses in human middle ear epithelial cells. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* 76, 675–679
79. Kumar M, Kaur D, Bansal N (2017). Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) prevents development of STZ-ICV induced dementia in rats. *Pharmacogn Mag*, 13(49): 10–5
80. Wei X, Ma Z, Fontanilla CV, Zhao L, Xu ZC, Tagliabracci V, et al. (2008). Caffeic acid phenethyl ester prevents cerebellar granule neurons (CGNs) against glutamate-induced neurotoxicity. *Neuroscience*, 155(4): 1098–105
81. Barros Silva R, Santos NA, Martins NM, Ferreira DA, Barbosa F Jr, Oliveira Souza VC, et al. (2013). Caffeic acid phenethyl ester protects against the dopaminergic neuronal loss induced by 6-hydroxydopamine in rats. *Neuroscience*, 233: 86–94.
82. Turgut A, Sak M.E., Turkcu G, Ozler A., Soydinc H.E, Evsen M.S, Evliyaoglu O, Akdemir F. *Gynecol Obstet Invest* 2013;75:281–288
83. Weigel PH, Fuller GM, LeBoeuf RD. A model for the role of hyaluronic acid and fibrin in the early events during the inflammatory response and wound healing. *Journal of theoretical biology.* 1986;119(2):219-34. 67
84. Hiro D, Ito A, Matsuta K, Mori Y. Hyaluronic acid is an endogenous inducer of interleukin-1 production by human monocytes and rabbit macrophages. *Biochemical and biophysical research communications.* 1986;140(2):715-22.
85. Goldberg RL, Toole BP. Hyaluronate inhibition of cell proliferation. *Arthritis and rheumatism.* 1987;30(7):769-78.
86. Ikeda K, Yamauchi D, Osamura N, Hagiwara N, Tomita K. Hyaluronic acid prevents peripheral nerve adhesion. *British journal of plastic surgery.* 2003;56(4):342-7.
87. Lew DH, Yoon JH, Hong JW, Tark KC. Efficacy of antiadhesion barrier solution on periimplant capsule formation in a white rat model. *Annals of plastic surgery.* 2010;65(2):254-8.

88. Li R, Liu H, Huang H, Bi W, Yan R, Tan X, et al. Chitosan conduit combined with hyaluronic acid prevent sciatic nerve scar in a rat model of peripheral nerve crush injury. *Molecular medicine reports*. 2018;17(3):4360-8.
89. Park JS, Lee JH, Han CS, Chung DW, Kim GY. Effect of hyaluronic acidcarboxymethylcellulose solution on perineural scar formation after sciatic nerve repair in rats. *Clinics in orthopedic surgery*. 2011;3(4):315-24.
90. Burns JW, Colt MJ, Burgees LS, Skinner KC. Preclinical evaluation of Seprafilm bioresorbable membrane. *The European journal of surgery Supplement : = Acta chirurgica Supplement*. 1997(577):40-8.
91. Burd DAR, Greco RM, Regaver S, Longaker MT, Siebert JW, Garg HG. Hyaluronan and wound healing: a new perspective. *Br J Plast Surg* 1991;4:579584.
92. Görgülü, A. Uzal, C., Doğanay, L., İmer, M., Eliuz, K., & Çobanoğlu, S. (2003). The Effect of Low-dose External Beam Radiation on Extraneural Scarring after Peripheral Nerve Surgery in Rats. *Neurosurgery*, 53(6), 1389–1396.
93. Schultes RE. Random thoughts and Queries on the Botany of Cannabis. In: Joyce CRB, Curry SH (ed). *The Botany and Chemistry of Cannabis*. London: J & A Churchill, 11-38, 1970.
94. Taşkale P, Topaloğlu İ. The Healing Effects of Vitamin E with Corticosteroid and Vitamin E Alone on Nerve Healing in Rats with Travmatic Facial Palsy *KBB Ihtis Derg* 20(5):255-259,2010

