

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ



SIÇANLARDA POSTOPERATİF EPİNÖRAL YAPIŞIKLIĞIN
ÖNLENMESİNDE ETANERCEPT'İN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI
(DENEYSEL ÇALIŞMA)

DR. BEDRETTİN ÖZSOY

BEYİN VE SİNİR CERRAHİSİ ANABİLİM DALI UZMANLIK TEZİ

2023

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ



SIÇANLARDA POSTOPERATİF EPİNÖRAL YAPIŞIKLIĞIN
ÖNLENMESİNDE ETANERCEPT'İN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI
(DENEYSEL ÇALIŞMA)

DR. BEDRETTİN ÖZSOY

TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. MAHMUT KONURALP İLBAY

ETİK KURUL ONAYI: KOÜ HADYEK 2/3-2022

BEYİN VE SİNİR CERRAHİSİ ANABİLİM DALI UZMANLIK TEZİ

2023

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	4
KISALTMALAR	6
TABLolar DİZİNİ	7
ŞEKİLLER DİZİNİ	8
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	9
2. GENEL BİLGİLER.....	10
2.1. TARİHÇE	10
2.2. PERİFERİK SİNİR SİSTEMİ YAPISI.....	10
2.3. PERİFERİK SİNİRLERİN ANATOMİSİ VE FİZYOLOJİSİ.....	11
2.4. YARA İYİLEŞMESİ.....	13
2.5. İNFLAMATUAR YANITTA SİTOKİNLER.....	15
2.6. ETANERCEPT	16
3. GEREÇ VE YÖNTEM	18
3.1. HAZIRLIK.....	18
3.2. CERRAHİ TEKNİK	18
3.3. İNCELEME.....	19
3.3.1. POSTOPERATİF DEĞERLENDİRME	19
3.3.2. MAKROSKOPİK DEĞERLENDİRME	19

3.3.3. HİSTOPATOLOJİK İNCELEME.....	20
3.3.4. İMMUNOHİSTOKİMYASAL İNCELEME.....	21
3.3.5.SEM(SCANNING ELECTRON MICROSCOPE) İNCELEMESİ.....	23
3.3.6. TEM(TRANSMİSSİON ELECTRON MICROSCOPE) İNCELEMESİ.....	23
3.3.7. İSTATİSTİKSEL İNCELEME	24
4. BULGULAR.....	25
4.1. KLİNİK BULGULAR	25
4.2. ANATOMİK BULGULAR	25
4.3.HİSTOPATOLOJİK BULGULAR.....	27
4.4. İMMUNOHİSTOKİMYASAL BULGULAR.....	30
4.5. SEM(SCANNING ELECTRON MICROSCOPE) İNCELEMESİ.....	33
4.6. TEM(TRANSMİSSİON ELECTRON MICROSCOPE) İNCELEMESİ.....	34
5. TARTIŞMA	36
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	39
7. ÖZET	40
8. ABSTRACT.....	41
9. EKLER.....	42
10. KAYNAKLAR.....	43

TEŞEKKÜR

Bu zorlu asistanlık dönemimde yeri apayrı olan, özellikle spinal cerrahi alanında mesleki bilgi ve becerilerimin gelişmesinde emek sarf eden, hasta ve hastalıklara yaklaşım konusunda deneyimlerini bana öğreten, 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 anabilim dalı başkanımız, saygıdeğer hocam, **Prof. Dr. Savaş CEYLAN'a**

Pediyatrik nöroşirurji alanındaki bilgi ve tecrübesinin yanı sıra 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 saygı değer 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, değerli hocam **Dr. Öğr. Üyesi M. Hamza GENÇ'e**,

Asistanlığımın ilk senesinde tanıştığım başasistanım ve asistanlığımın son senesinde öğretim görevlisi olarak aramıza katılan değerli hocam **Dr. Öğr. Üyesi Melih Çaklılı'ya**

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. Süheyla GONCA ve Dr Sema KURNAZ** ve TTU-2022-3037 numaralı projemizi destekleyen **Kocaeli Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinatörlüğü'ne**

Eğitimimiz sırasında her türlü zorluğu birlikte göğüslediğimiz, alışkan ve özverili arkadaşlarım **Dr. Eren YILMAZ, Dr. Ayşe UZUNER, Dr Ecem Cemre CEYLAN, Dr. Sazak ATAYEV,Dr. Pınar YILDIRIM, Dr Fatih SHATRI, Dr Buşra GÜNDÜZ, Dr. Muharrem KARATAŐ ve Dr Barış KIZILAY'a**

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

Bu günlere gelmemde en büyük role sahip olan ve asistanlığımın başından sonuna her türlü desteği bana veren annem Saliha ÖZSOY ve babam Enver ÖZSOY'a ,her şeyimi paylaşarak bu günlere geldiğim ablam Didar zsoy'a

Asistanlığımın tam ortasında hayatıma giren ve sonuna kadar her zaman yanımda olan, her türlü zorluğu birlikte aştığım ve en güzel günleri birlikte geçirdiğim, biricik eşim ve hayat arkadaşım **Mualla zsoy'a**

Ve bana yaşam enerjisi veren, bir gülüşüyle dünyalara sahip olduğumu hatırlatan ilk göz ağrım, biricik kızım **şevval Nur'a** sonsuz teşekkür ederim.

Dr. Bedrettin ÖZSOY

KISALTMALAR

ESM: Ekstraselüler matrix

TNF- α : Tümör nekroz faktör alfa

COX: Siklooksijenaz

IL: İnterlökin

H&E: Hematoksilen Eosin

SEM: Scanning electrone microscope

TEM: Transmissiyon electrone microscope

G-CSF: Granülosit koloni stimülan faktör,

NOS: Nitrit oksit sentetaz

TABLULAR DİZİNİ

Tablo 1: Çalışmada kullanılan sıçanların gruplandırılması.....	18
Tablo 2: Petersen ve ark tarafından tanımlanan gross değerlendirme için sayısal gradeleme şeması.	20
Tablo 3: Grupların adezyon yoğunluğu ve sinir ayrılabilirliği açısından One way ANOVA ile yapılmış istatistiksel karşılaştırması.....	27
Tablo 4: Kontrol, Topikal ve Sistemik gruplarına ait TNF- α ve TGF- β 1 H-SCORE düzeylerinin karşılaştırılması. Gruplardaki değerler ortalama (X) \pm standart sapma (SD) olarak ifade edildi.....	32
Tablo 5: Kontrol, Topikal ve Sistemik gruplarında Anti-TNF- α H-SCORE düzeylerinin karşılaştırılması	32
Tablo 6: Kontrol, Topikal ve Sistemik gruplarında Anti- TGF- β 1 H-SCORE düzeylerinin karşılaştırılması	33

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: Sinir hücresi	11
Şekil 2: Periferik sinir anatomisi	12
Şekil 3: Yara iyileşmesi	13
Şekil 4: Fibrosit ve Fibroblast yapısı	14
Şekil 5: Etanercept'in etki mekanizması	17
Şekil 6: Kontrol grubu 1	26
Şekil 7: Kontrol grubu 2	26
Şekil 8: Sistemik grup	26
Şekil 9: Topikal grup	26
Şekil 10: H&E ile boyanmış sıçanlardan siyatik sinir bölümlerinin fotomikrografları. (A) Kontrol grubu, (B) Topikal grup, (C) Sistemik grubun siyatik sinir ışık mikroskopik görüntüleri.	28
Şekil 11: Mason trikrom ile boyanmış sıçanlardan siyatik sinir bölümlerinin fotomikrografları. (A) Kontrol grubu, (B) Topikal grup, (C) Sistemik grubun siyatik sinir ışık mikroskopik görüntüleri.....	29
Şekil 12: TNF- α ve TGF- β 1 ile boyanmış olan sıçanlardan siyatik sinir bölümlerinin fotomikrografları. (A) TNF- α kontrol grubu, (B) TGF- β 1 kontrol grubu, (C) TNF- α topikal grup, (D) TGF- β 1 topikal grup, (E) TNF- α sistemik grup, (F) TGF- β 1 sistemik grup.....	31
Şekil 13: Kontrol grup	34
Şekil 14: Sistemik grup	34
Şekil 15: Topikal grup	34
Şekil 16: Şekil 16: Etanercept uygulaması sonrası siyatik sinir görüntüleri.(A) Kontrol grubu; (B) Sistemik etanercept uygulanan grup; (C) Topikal etanercept uygulanan grup. Kalın myelin kılıf içeren sinir lifleri ve myelin kılıf içermeyen schwann hücreleri (Mavi daire içerisindekiler). A, aksoplazma; S, sitoplazma; N, nukleus; MK, myelin kılıf; KL, kollajen lifler; RB, ranvier boğumu.	35

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Periferik sinir cerrahisi sonrasında epinöral fibrozis oluşumu, klinik sonuçlar ve cerrahinin başarısının değerlendirilmesinde önemli rol oynamaktadır. Epinöral skar oluşumu periferik sinirlerde yapışıklık oluşturmakta ve ekstremiteler hareketi sırasında sinir mobilitesini azaltmaktadır. Cerrahi sonrasında uzun dönemde oluşan yapışıklar sinir dokusunda iskemi oluşturup sinirde hasara yol açmaktadır. Bu iskemi ve yapışıklıklar duysal ve motor kayıplara yol açabilmektedir. ^{1,2}

Epinöral skar oluşumunu engellemek amacıyla mikroskobik, endoskopik, kas flebi ve yağ greftleri gibi bir çok teknik geliştirilmiş ancak bu tekniklerde cerrahi sonrası epinöral skar oluşumu tam anlamıyla önlenememiştir. ³ Silikon membran benzeri maddeler sinir etrafına yerleştirilmiş ancak bu malzemeler emilmediği için yabancı cisim reaksiyonu ve sinirde enflamasyon gibi komplikasyonlara neden olduğu gözlemlenmiştir. ¹ Bu yüzden günümüzde emilebilirliği olan maddelerin kullanılması sürekli araştırma konusu olmuştur. Naturel polimer içerikli bioabsorble adezyon bariyerin sinir cerrahisi sonrasında epinöral skar oluşumunu engellediğine dair bir çok klinik çalışma mevcuttur. ⁴⁻⁸ Ancak bazı klinik çalışmalarda da bu maddelerin etkili olmadığı savunulmaktadır. ⁹ Epinöral fibrozisin engellenmesi ile hem cerrahinin başarısı artmakta olup hem de sonradan oluşabilecek komplikasyonların da önüne geçilmektedir. Ayrıca hastaya tekrar cerrahi girişim gerektiğinde yapılacak cerrahi işlemi daha da kolay hale getirmektedir. ²

Bu çalışmada, Wistar Albino sıçanlarda siyatik sinir iki taraflı olarak ortaya konuldu ve steril teknik ile çevre dokulardan diseksiyonu sağlandı. Peroneal ve tibial komponentler künt diseksiyon ile ayrıldı. Naylon fırça ile biceps femoris kasında abrazyon hasarı sağlandı. Cerrahiden 4 hafta sonra kör cerrahi diseksiyon ile deney kontrol ve karşılaştırma gruplarında nörolizis alanları makroskopik skalalarla gross anatomik olarak ve histopatolojik yöntemlerle kalitatif ve kantitatif olarak değerlendirildi. ^{1,10,11}

Bu çalışma ile sıçanlarda deneysel olarak epinöral skar oluşturulmasından sonra, topikal ve sistemik uygulanan etanercept'in postoperatif epinöral skar gelişimine etkilerinin araştırılması amaçlandı.

2.GENEL BİLGİLER

2.1 TARİHÇE

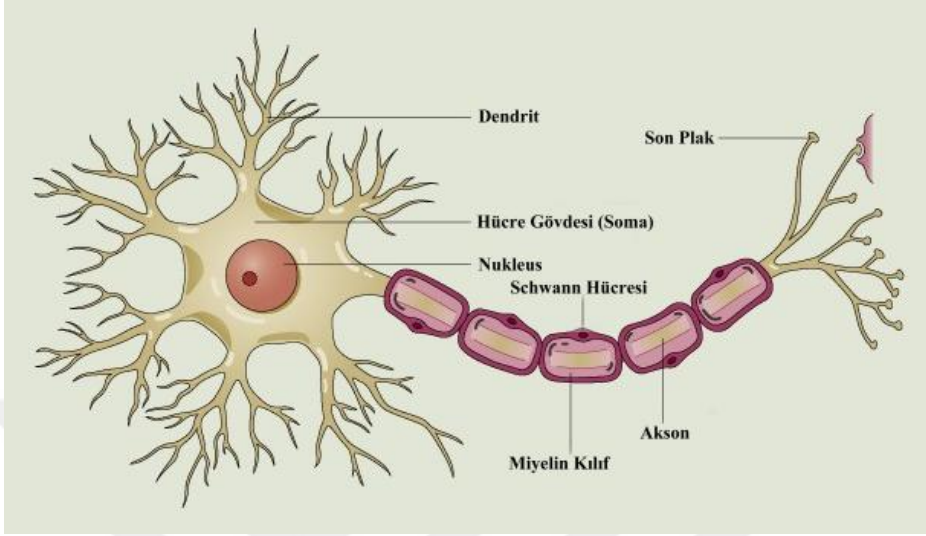
Tıp tarihi incelendiğinde, Galen (M.S. 2.YY) döneminde sinirlerde iyileşme olmadığını düşünülmemekteydi. Sinir onarımı kavramı ile birlikte bir çok cerrahi işlem de geliştirilmiştir. Bu tekniklerden bazıları; epinöral flep ile tamir ve side-to-side sütürlemeydi. Daha sonra ise 1795’da Haighton, 1842’da Muller, 1906’da Sherren ve 1917’da Mayo- Rabson periferik sinir cerrahisi alanında bir çok klinik araştırmalarda bulunmuşlardır. Ancak sinir iyileşmesinde beklenen türde bir iyileşme olmaması 19. Yüzyılda bilim insanların bu alanda çok fazla çalışma yapmamasına sebep olmuştur. Silas Weir Mitchell, “Injuries of Nerves” isimli kitabında I. Dünya savaşı sırasında gözlemlediği sinir yaralanmalarını, tecrübelerini ve araştırmalarını paylaşmıştır. Yine aynı dönemde Tinel sinirin yenilenmesinin göstergesi olarak “karıncalanma” bulgusunu tarif etmiştir. II. Dünya savaşı dönemine bakıldığında ise Sir Herbert Seddon ve Barnes Woodhall primer sinir iyileşmesi, sekonder sinir iyileşmesi, sinir greftleme gibi birçok alanda önemli araştırmalarda bulunmuşlardır. Sir Sydney Sunderland ise periferik sinirlerin anatomisini ayrıntılı göstererek gelecekteki sinir iyileşmesi ile ilgili çalışmalara bir çok katkı sağlamıştır.¹² Geçmişte yapılan onca çalışmalara araştırmalara ve günümüzde de geliştirilen bir çok tıbbi alet, materyallere rağmen epinöral fibrosiz oluşumu tam anlamıyla çözülebilmüş değildir.

2.2. PERİFERİK SİNİR SİSTEMİ YAPISI

Sinir hücresi sinir sisteminin anatomik ve fonksiyonel ünitesini oluştururlar. Sinir hücreleri arasında yer alan destek tipindeki hücreler nöroglıayı meydana getirirler. Nöronlar perikaryon, dentrit ve aksonlardan oluşmaktadır. Perikaryonun sitoplazmasına nöroplazma adı verilmektedir. Ve burada Nissl cisimcikleri ve nörofibriller bulunmaktadır. Nissl cisimciği dentritlerde de gözükmemesine rağmen aksonlarda gözükmemektedir. Nissl cisimcikleri motor nöronlarda bolca bulunmakla beraber nöron hasarında parçalara ayrılarak tüm nöroplazmaya dağılır. Bu olay kromatozis olarak adlandırılır.^{13,14}

Nöronların uzun uzantılarına akson denmektedir ve bu aksonlar sinir liflerini oluşturmaktadır. Aksonlar önce kılıfsız olarak seyrederek daha sonrasında bölgeye göre üzerlerine myelin ve schwann kılıf edinirler. Schwann periferik sinirleri sonlanacakları yere kadar saran kılıftır.

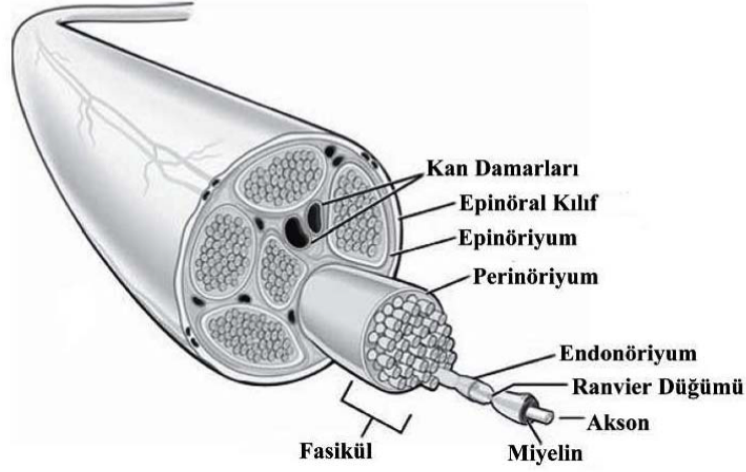
Schwann hücreleri bu akson kılıfının yaşamlarını idame ettirebilmeleri için gereklilikleri sağlarlar ve ayrıca sinir rejenerasyonunda görev yaparlar. Sinir lifinin kesilmesi durumunda akson santral uçtan başlayarak rejenere olur (Şekil 1).^{13,14}



Şekil 1: Sinir Hücresi (Soma, Perikaryon). (© 2000 John Wiley Sons, Inc.)

2.3. PERİFERİK SİNİR SİSTEMİ ANATOMİSİ VE FİZYOLOJİSİ

Periferik sinir kompleksinde üç tane örtü bulunur. Epinöryum, perinöryum ve endonöryum. Epinöryum, periferik sinirin tümünü kuşatan en dıştaki bağ dokusu kılıfıdır. Bu kılıfta elastik ve kollajen lifler, fibroblastlar, arter ve venler bulunur. Perinöryum, epinöryum içerisinde binlerce sinir lifinin bir araya gelerek oluşturduğu sinir liflerini saran bağ dokudur. Perinöryum, epinöryuma göre daha ince ve düzensiz bağ dokudur. Endonöryum ise en içte bulunan tek bir sinir lifini saran bağ dokudur. Endonöryumda ise retiküler lifler ve kollajen liflerle birlikte fibroblastlar bulunmaktadır.^{13,14}



Şekil 2: Periferik sinir anatomisi³²

Periferik sinirler epinöral alandaki arter ve venlerin oluşturduğu ekstrinsik sistem ve endonöryumdaki kılcallardan oluşan intrinsik sistem ile beslenmektedir. ¹⁹⁻²¹

İntrinsik sistem çevresel varyasyonlardan etkilenmemekte olup, ekstrinsik sistem adrenalın ve lokal anestezi maddelerinin de kullanılmasından etkilenir. ^{22,23}

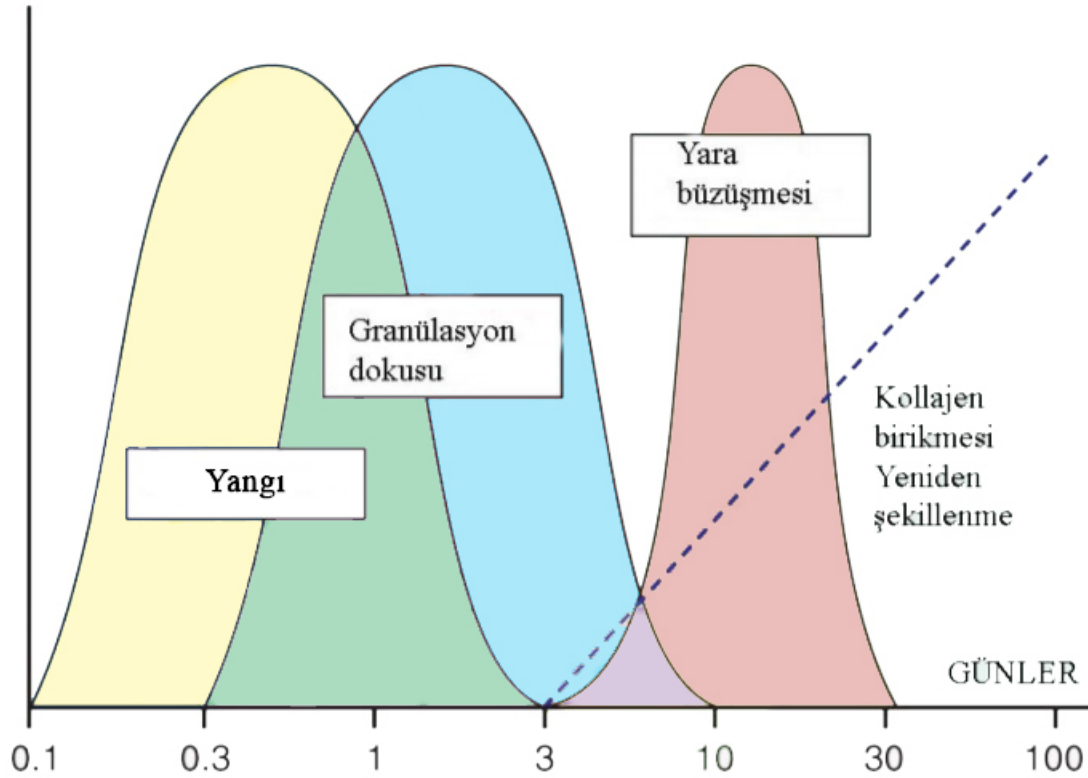
Periferik sinir sistemleri santral sinir sistemi ile efektör organ arasında iletişimi sorumludurlar. Afferent lifler çevreden aldıkları uyarılara santral sinir sistemine iletirken, efferent lifler ise santral sinir sisteminden aldıkları uyarıları efektör organlara taşır. ^{13,16}

Periferik sinir lifleri myelinli ve myelinsiz lifler içerir, Myelinli liflerin kalınlıkları farklılıklar göstermekle birlikte myelin lif kalınlığı arttıkça uyarının hızı da artış göstermektedir. ¹³

Periferik sinirler efektör organa yaklaştıkça önce dallanır ve inceliklenir sonrasında da sinir pleksusları oluşturur. Hedef bölgeye yaklaştıkça sinir lifleri birbirlerinden ayrılmaya başlarlar ve daha küçük liflere bölünürler ve giderek dallanarak en son myelin kılıfı da sonlanarak organa ulaşır. ¹³

2.4. YARA İYİLEŞMESİ

Bir doku hasarlandığında bağ dokusuyla iyileşme başlar ve sonuç olarak da skar oluşur. İlk önce fibroblastlar bölgeye göç eder ve orada çoğalmaya başlarlar. Ardından Ekstraselüler matrix birikimi olur. Sonrasında anjiogenezis olarak adlandırılan vaskularizasyon başlar. En son olarak da skar doku oluşturulup olgunlaşması tamamlanır. Hasarlanma oluştuktan sonra bölgede fibroblast ve endotel hücreleri bölgede yoğunlaşmaya başlar ve granülasyon dokusu oluşmaya başlar (Şekil 2).

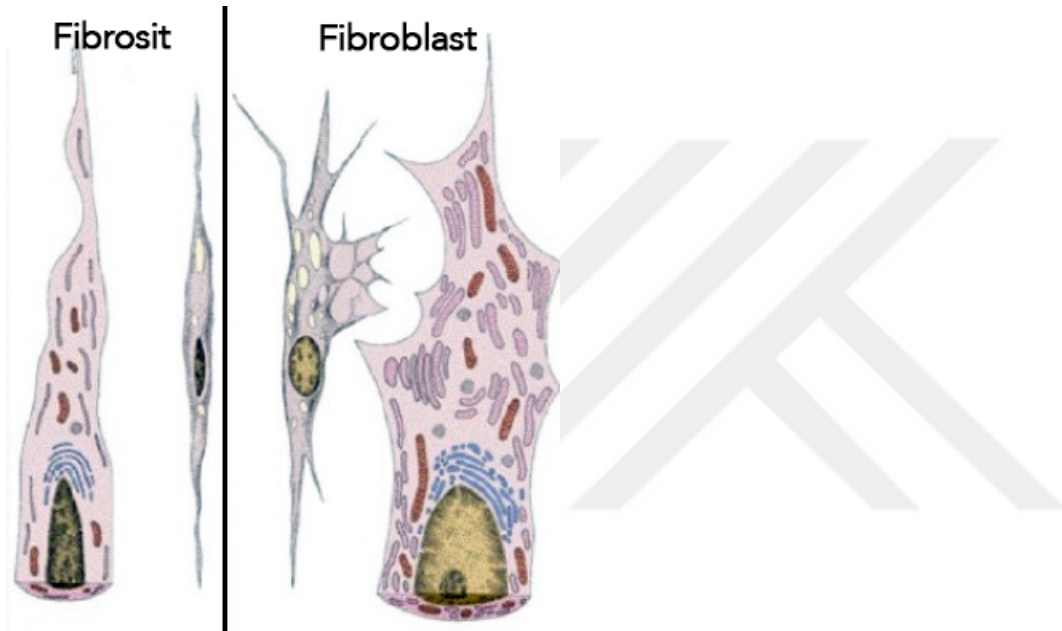


Şekil 3: Yara iyileşmesi.²⁴

Doku hasarının olduğu yere fibroblastların göçü bazı sitokinlerce sağlanır;platelet türevi büyüme faktörü(PTBF), fibroblast büyüme faktörü(FBF), TGF-beta,büyüme faktörleri gibi. Bu faktörler kollajen ve bağ dokusu yapımını tetikler. Fibroblastlar mezenkimal hücreler olup yara iyileşmesinde de etkili olan ekstraselüler matrix üretiminden sorumludurlar. Fibroblastar fibroze sebep olarak bir çok hastalıkta rol oynamaktadır. ¹³⁻³¹ Fibroblastların da devreye

girmesi ve kollajen oluşumuyla birlikte granülasyon dokusu oluşmaktadır. Granulasyon dokusu yoğun kollajen içeriklidir ve içerisinde fibroblastlar, elastik doku parçaları, ESM ve az sayıda damar içerir. Oluşan tüm bu kompleks yapıya da skar denmektedir. ^{13,24}

Fibroblast ve fibrosit: Fibroblastlar, interstisyumda bulunan ve ESM yapımını sağlayan olgunlaşınca da fibrosite dönüşen yapılardır. ESM yapımını çok yoğun yaptıklarından dolayı Endoplazmik retikulumdan ve golgi organelleri gelişmiştir. Fibrositler fibroblastlara göre daha koyu renkte, asidik sitoplazmalı ve uzun nükleusludur. (Şekil 4) ^{13,15}



Şekil 4: Fibrosit ve Fibroblast yapısı

Kollajen: Vücutta sağlamlık ve elastikiyet sağlayana proteinler bulunmakla birlikte bu proteinlerin %30 u kollajen oluşturur.

Kollajen liflerin en çok 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}

Ekstraselüler kollajenler adezyondan ve rejenerasyondan sorumludurlar. Adhesif glikoproteinler, ESM kısımlarını birbirlerine ve hücre membranlarına birleştiren yapı proteinleridir. Bu grubun başlıcaları Laminin ve fibronektindir. Proteoglikanlar, geçirgenlik dağılımı, bağ dokusu yapımı ve morfogenez gibi özellikleriyle ESM'nin üçüncü kısmını yapan iç membran proteinleridir.^{16,25}

Fibrozis: aşırı miktarda ESM birikmesiyle o dokunun işlevini bozan bir olaydır.¹

Fibroblastlar ve ESM sentezleyen hücreler aktifleştikçe ve arttıkça inflamasyon yayılmaya başlar. Fetal yaralarda skarsız iyileşmede organize matrix salgılanması rol oynarken erişkinde organize olmayan kollajen sentezi olur.²⁶

Cerrahi işlemde sonra insizyon yerindeki dikişler 7.günden sonra çıkarılırsa yaranın gücünün artmaya başlayıp 30 gün boyunca da artmaya devam edip 3.ayda da tamamlandığı görülmüştür. Kollajen tipinin farklı olması bu güç artışında farklılıklar oluşturmaktadır.²⁴

2.5. İNFLAMATUAR YANITTA SİTOKİNLER

İnflamasyon insanda çeşitli hastalıklar veya travmalar sonrasında dokudaki hasar sonucu oluşan mikroorganizmaları yok etmek için gerçekleşen olaydır. Ancak bu olay gerçekleşirken sağlıklı dokuda da hasar oluşabilmektedir. Bir çok hastalığın patogenezinde bu inflamasyon olayı yer almaktadır.³³

Bu inflamatuvar yanıtta en çok etkili olan yapılardan olan sitokinler;makrofaj ve intestinal sistem gibi hücrelerden salınan glikoproteinlerdir. Sitokinler 2 ye ayrılmaktadır.

Tip 1 Sitokinler: İnterlökin-2 (IL-2), İnterlökin-3 (IL-3), İnterlökin-4 (IL-4), İnterlökin-5 (IL-5), İnterlökin-6 (IL-6), İnterlökin-7 (IL-7) , İnterlökin-9 (IL-9), İnterlökin-11 (IL-11), İnterlökin-13 (IL-13), İnterlökin-15 (IL-15), granülosit koloni stimulan faktör (G-CSF)

Tip 2 Sitokinler: İnterferon (IFN)- α , IFN- β , IFN- γ ve İnterlökin-10'u (IL-10)

Tümör Nekroz Faktör(TNF): Retiküloendotelyal sistemde birçok hücre tarafından endotoksin, inflamatuvar mediatörler veya sitokinlerin uyarılması sonucu salınan bir polipeptittir. TNF- α ve TNF- β olmak üzere iki formu vardır. TNF- α kaşektin olarak da adlandırılır. Reseptörleri ve etki yolları aynıdır. Makrofajlar başta olmak üzere birçok hücreden salgılanırlar ve geniş biyolojik etkileri mevcuttur. Koagülasyon , septik şok, immun savunma, kaşekside önemli role sahiptir ³⁴

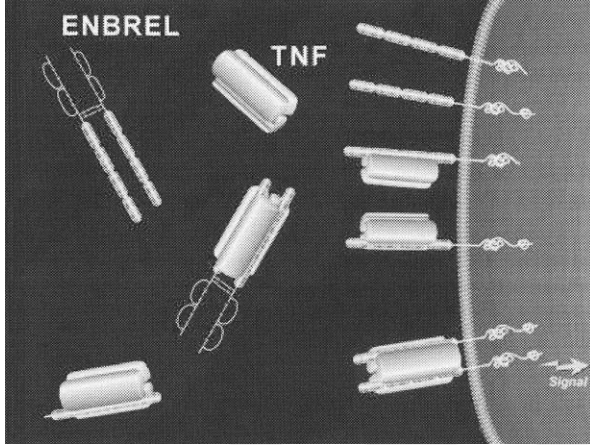
İnflamatuvar uyarı sonrasında TNF – alfanın etkisi 30 dakika içinde başlar ve 90-120 dakika içinde maksimuma ulaşır. Yaklaşık 4 saat sonra etkisi kaybolur. TNF aynı zamanda indüklenebilir Nitrik Oksit Sentetaz (NOS)'ın regülasyonunda rol oynar. TNF- α 'nın aktif hale gelmesi için trimerik yapı oluşturması gerekir. Yapılan çalışmalarda, membran TNF- α 'larında trimerik yapı oluşturduğu ve bu nedenle membrana bağlı TNF- α 'larda aktif formda oldukları gösterilmiştir. Sitokinlere bağlı otoimmün ve inflamatuvar hastalıkların patogenezinde hücre dışı boşlukta yer alan soluble sitokinden daha çok hücre-hücre arası iletişim ile aktivasyona sebep olan membran sitokinlerinin daha önemli olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle bir hastalığın anti-TNF ilaçlar ile etkin tedavisi için membran TNF- α aktivitesinde baskılanması gereklidir.³⁵

2.6. ETANERCEPT

Etanercept; psöriatik artrit tedavisinde FDA tarafından onaylanan ilk rekombinant insan proteinidir. Etanercept ayrıca romatoid artrit ve poliartriküler giden juvenil romatoid artrit tedavilerinde de endikedir. Etanercept proinflamatuvar bir sitokin olan tümör nekrozis faktör-alfa'nın yarışmalı inhibitörüdür. Doğuştan gelen ve sonradan kazanılan bağışıklığın aktifleştirilmesinde tnf-alfa kritik rol oynar. İmmun sistemin dirençli olması ve uygunsuz tnf-alfa üretimi kronik inflamasyona,doku hasarına ve aşırı keratinosit proliferasyonuna yol açmaktadır.

TNF-alfa aracılı olayların başlaması için, TNF-alfanın homotrimerlerinde hücre yüzey reseptörlerine yapışması reseptörlerinde multimerizasyonu ve hücre içi alanlar yoluyla sinyal iletiminin gerçekleşmesi gerekmektedir. TNF-alfa reseptörlerinin çözünür formlarının var olduğu ve TNF-alfa'nın hücre reseptörlerine bağlanması için yarışmalı inhibitörler olarak da görev yaptıkları gösterilmiştir.(Şekil 5) Buna rağmen doğal antagonist varlığı enflamatuvar hastalıklarda görülen artmış TNF-alfa protein aktivitesini antagonize etmeye yetmez.

Etanercept, TNF-alfa reseptörlerinin aktivitesini taklit ederek TNF-alfaları bağlar ve reseptörlerine bağlanmasını engeller³⁶.



Şekil 5: Etanercept'in etki mekanizması

Etanercept, TNF-alfa ile indüklenen biyolojik yanıtları kontrol eder. Bu nedenle etanercept ile TNF-alfa'nın inhibe edilmesi inflamasyonun azalmasını sağlayabilir. Gaspari ve ark.³⁷ tarafından etanercept ile tedavinin inflamasyon göstergelerini hatta biyopsi materyallerindeki infiltrate CD3 pozitif T hücrelerinin sayısını azalttığını gösteren verilerle desteklenmektedir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. HAZIRLIK

Bu çalışma, Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 31/03/2022 tarihli, 2022/04 proje numarası ve KOU HADYEK 2/3- 2022 kararlı izni ile Kocaeli Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Birimi Laboratuvarı (DETAB), Histoloji ve Patoloji Anabilim Dalları laboratuvarlarında 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 250-300 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 3 gruba ayrılarak yürütüldü. Birinci grup kontrol grubu 1, ikinci grup topikal etanercept ve üçüncügrup sistemik etanercept uygulanmış tedavi grupları olarak değerlendirildi. Her üç 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 2 (Salin uygulanmış 5 sıçan)	5 sıçan (10 siyatik sinir)	5 sıçan (10 siyatik sinir)
Grup 2 : Etanercept 1 ((300 µg/kg) topikal uygulanmış 5 sıçan)	5 sıçan (10 siyatik sinir)	5 sıçan (10 siyatik sinir)
Grup 3 : Etanercept 2 ((300 µg/kg) sistemik uygulanmış 5 sıçan)	5 sıçan (10 siyatik sinir)	5 sıçan (10 siyatik sinir)

Tablo 1: Çalışmada kullanılan sıçanların gruplandırılması

3.2. CERRAHİ İŞLEM

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 dokulardan diseke edilerek gösterildi. Peroneal ve tibial dallar künt diseksiyon ile ayrıldı. Naylon mikro fırça ile biceps femoris kas yüzeyinde abrazyon hasarı sağlandı. Ardından sinirler dikkatli bir şekilde diseke edildi. Kontrol 1 grubundaki beş sıçanın her iki taraf siyatik sinirleri çevresinde salin emdirilmiş pediler 5 dk. süre tutuldu. Etanercept 1 grubunda 300 µg/kg etanercept emdirilmiş pamuk pediler bilateral siyatik sinir etrafında 5 dk süre boyunca bekletildi. Etanercept 2 grubunda ise sıçanlara 300 µg/kg etanercept intraperitoneal olarak enjekte edildi. Sonrasında cilt 4/0 ipek ile suture edilerek kapatıldı.

4 hafta sonra her üç gruptaki sıçanlar, genel anestezi altında eski insizyonları üzerinden açılarak makroskopik incelemeler yapıldı. Daha sonra mikroskopik incelemeler yapılmak üzere siyatik sinirler (toplam 30 siyatik sinir) çevre skar dokularıyla birlikte eksize edilerek %10 nötral formaldehit solüsyonuna alındı ve incelenmek üzere histoloji laboratuvarına iletildi.

3.3. İNCELEME

Farelerden örnekler alındıktan sonra makroskopik, histopatolojik, immunohistokimyasal ve elektron mikroskopu olmak üzere 4 şekilde değerlendirilmiştir.

3.3.1. POSTOPERATİF DEĞERLENDİRME

Cerrahi girişim sonrasında sıçanlar günlük değerlendirilmeye başlandı. Yara iyileşmeleri, postür bozukluğu olup olmadığı ve siyatik sinir fonksiyon bozukluklarının olup olmadığı takip edildi.

3.3.2. MAKROSKOBİK DEĞERLENDİRME

Cerrahi girişimden 4 hafta sonra sıçanlar genel anestezi altında tekrar cerrahiye alındı. Cerrahi diseksiyon ile grup 1 (kontrol grubu), grup 2 (Topikal etanercept) ve grup 3 (Sistemik etanercept) sıçanların cilt-kas fasyası ve siyatik sinir çevresi yapışıklıklar, iyileşme ve adezyon dokuları incelendi. Değerlendirmeler Peterson ve arkadaşları⁸ tarafından tanımlanan sayısal gradeleme şemasına göre yapıldı. (Tablo 2)

DOKU	GRADE	TANIMLAMA
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 diskسیون
	3	Keskin diseksiyon gerekli

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

3.3.3. HİSTOPATOLOJİK İNCELEME

3.3.3.1. HEMATOKSİLEN EOSİN BOYASI İLE İNCELEME

Sıçanlardan alınan periferik sinir dokuları (her grupta 8 adet), tamponlanmış %10'luk formaldehit solüsyonuna alınarak 3 gün fikse edildi. Fiksasyon sonrasında periferik sinir dokuları kasetlere alınarak çeşme suyunda yıkandı ve artan dereceli etanol serilerinde (sırasıyla %70, %90, %96 ve %100) 24 saat tutularak dehidrate edildi. Daha sonra %100 etanolde 2 kez 30 dakika süreyle tutuldu ve toluol içerisinde 30 dakika süreyle şeffaflaştırma işlemi yapıldı. Bunu takiben 56 °C'deki etüvde ilk olarak yumuşak daha sonra sert sıvı parafin içerisinde 45'er dk bekletilen periferik sinir dokuları parafin bloklara gömüldü. Bu parafin bloklardan mikrotom aracılığıyla lamlara 4 µm kalınlığında seri kesitler alındı. Her bir periferik sinir dokusundan 10 kesit aralıklarla alınan 10'ar kesit üzerinde hematoksilin-eozin (H-E) boyaması yapılarak Olympus BH 50 ışık mikroskobu ile incelendi.

3.3.3.2. MASSON TRİKROM BOYASI İLE İNCELEME

Parafin kesitler 1 gece boyunca 56°C'lik etüvde bekletildi. Ertesi gün toluol (2 saat) yardımı ile kesitler üzerindeki parafin uzaklaştırıldı. Kesitler, azalan alkol serisinden (%100, %96, %90, %70) geçirildi ve saf suya alındı. Kesitler daha sonra Weigert A ve Weigert B hematoksileninden eşit hacimde alınarak hazırlanmış karışımda 5 dakika bekletildi. Çeşme suyunda 2 dakika yıkanan kesitler saf sudan geçirilerek asit fuksin solüsyonunda 15 dakika tutuldu ve ardından saf sudan geçirildi. Daha sonra fosfotungstik asit solüsyonunda kollajen liflerdeki kırmızı renk giderilene kadar 10-15 dakika bekletilen kesitler yıkama olmadan anilin mavisi solüsyonuna alındı ve bu solüsyonda 5 dakika bekletildi. Saf su ile yıkamanın ardından %1'lik asetik asit solüsyonunda 3-5 dakika bekletilen kesitler hızlıca iki kez %95 alkolden geçirilerek toluenle şeffaflaştırıldı ve entellan ile kapatıldı. Preparatlar Leica DM 1000 ışık mikroskobu ile incelendi. Her sıçanın bilateral sinir kesitleri fibroblast sayısı ve fibrozis kalınlığının sinir çapına oranı açısından ayrı ayrı incelendi.

3.3.4. İMMUNOHİSTOKİMYASAL İNCELEME

3.3.4.1. Anti-TNF- α İMMUNOHİSTOKİMYASI

Parafin bloklardan poly-L-lysine ile kaplı lamalar üzerine alınan 4 μ m kalınlığındaki kesitler, parafini gidermek amacıyla 1 gece boyunca 56 °C'lik etüvde bekletildi. Daha sonra toluolde 3 kez 5'er dakika bekletilerek parafinden iyice arındırıldı. Kesitler, azalan dereceli etanol serilerinden (sırasıyla %100, %96, %90, %70) geçirildi ve 2 kez 5'er dakika saf su içerisinde bekletildi. Deparafinizasyon ve rehidratasyon işlemlerinden sonra kesitler, membran permeabilizasyonu için PBS (Sigma, pH:7.4) ile hazırlanan % 0.3'lük Triton X100 ile 10 dakika inkübe edildi. Daha sonra 3 kez 5'er dakika PBS ile yıkanan kesitler, antijen iyileştirmesi için sitrat tamponu (Sigma, pH:6) içerisine alınarak mikrodalga fırında 700 Watt'ta 10 dakika kaynatıldı ve soğuması için oda ısısında 20 dakika bekletildi. Kesitler soğuduktan sonra 2 kez 5'er dakika PBS ile yıkandı ve lam üzerindeki doku kesitlerinin etrafı hidrofobik kalem (PAP-Pen) ile çevrilerek endojen peroksidaz aktivitesini bloklamak için metanolde hazırlanan %3'lük H₂O₂ (Hidrojen peroksit, abcam) solüsyonunda 10 dakika bekletildi. 2 kez 5'er dakika PBS ile yıkamanın ardından, özgül olmayan antikor bağlanmalarını bloklamak üzere 10 dakika protein bloklama solüsyonu (abcam) uygulandı. Ardından kesitlere 1/100 dilüsyon oranında hazırlanan

TNF- α primer antikoru (abcam [TNFA/1172] (ab220210) uygulandı ve +4 °C’de tüm gece inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında 3 kez 5’er dakika PBS ile yıkama sonrasında kesitler, 15 dakika biyotinlenmiş sekonder antikor solüsyonunda tutuldu ve tekrar 3 kez 5’er dakika PBS’de yıkandı. Daha sonra kesitlere 20 dakika streptavidin peroksidaz solüsyonu uygulandı. Son yıkama işlemi yapıldıktan sonra kesitlere 5 dakika kromojen olarak DAB (3,3'-Diaminobenzidine) (abcam) solüsyonu uygulandı ve renk oluşumu gözlemlendi. Kesitler distile suya alınarak reaksiyon durduruldu. Zıt boyama amacıyla kesitler 45 saniye Mayer's Hematoksilen solüsyonu (abcam) ile muamele edildi. Daha sonra kesitler akan çeşme suyu altında 3-4 dakika yıkandı. Artan derecelerdeki alkol serisinden geçirilerek (%70-%80-%90-%100), toluolde 20 dakika bekletildi. Kapatma işlemi için su bazlı şeffaflaştırıcı solüsyon (abcam) kullanıldı. Kesitler inceleninceye kadar +4 °C’de saklandı. Leica DM 1000 ışık mikroskopu ile tüm gruplara ait sıçanların periferik sinir dokusunda yer alan hücrelerde immünohistokimyasal olarak gözlenen Anti-TNF- α boyanmasının şiddeti 0’dan +3’e kadar semikantitatif olarak derecelendirildi ve H-skor yöntemi ile değerlendirilerek elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak karşılaştırıldı. H-skor hesaplamak için aşağıda yer alan formül kullanıldı. H-Skor= $\sum P_i(i+1)$. i: Boyanma yoğunluğunun derecesini (0,1,2 ya da 3), P_i ise her yoğunluk için boyanan hücre yüzdesini (%0-100) göstermektedir.

3.3.4.2. Anti-TGF- β 1 İMMUNOHİSTOKİMYASI

Parafin bloklardan poly-L-lysine ile kaplı lamalar üzerine alınan 4 μ m kalınlığındaki kesitler, parafini gidermek amacıyla 1 gece boyunca 56 °C’lik etüvde bekletildi. Daha sonra toluolde 3 kez 5’er dakika bekletilerek parafinden iyice arındırıldı. Kesitler, azalan dereceli etanol serilerinden (sırasıyla %100, %96, %90, %70) geçirildi ve 2 kez 5’er dakika saf su içerisinde bekletildi. Deparafinizasyon ve rehidratasyon işlemlerinden sonra kesitler, membran permeabilizasyonu için PBS (Sigma, pH:7.4) ile hazırlanan % 0.3’lük Triton X100 ile 10 dakika inkübe edildi. Daha sonra 3 kez 5’er dakika PBS ile yıkanan kesitler, antijen iyileştirmesi için sitrat tamponu (Sigma, pH:6) içerisine alınarak mikrodalga fırında 700 Watt’ta 10 dakika kaynatıldı ve soğuması için oda ısısında 20 dakika bekletildi. Kesitler soğuduktan sonra 2 kez 5’er dakika PBS ile yıkandı ve lam üzerindeki doku kesitlerinin etrafı hidrofobik kalem (PAP-Pen) ile çevrilerek endojen peroksidaz aktivitesini bloklamak için metanolde hazırlanan %3’lük H₂O₂ (Hidrojen peroksit, abcam) solüsyonunda 10 dakika bekletildi. 2 kez 5’er dakika PBS ile yıkamanın ardından, özgül olmayan antikor bağlanmalarını bloklamak üzere 10 dakika protein bloklama solüsyonu (abcam) uygulandı. Ardından kesitlere 1/250 dilüsyon oranında hazırlanan TGF- β 1 primer antikoru (santa cruz (3C11):sc-130348) uygulandı ve +4 °C’de tüm gece inkübe

edildi. İnkübasyon sonrasında 3 kez 5'er dakika PBS ile yıkama sonrasında kesitler, 15 dakika biyotinlenmiş sekonder antikor solüsyonunda tutuldu ve tekrar 3 kez 5'er dakika PBS'de yıkandı. Daha sonra kesitlere 20 dakika streptavidin peroksidaz solüsyonu uygulandı. Son yıkama işlemi yapıldıktan sonra kesitlere 5 dakika kromojen olarak DAB (3,3'-Diaminobenzidine) (abcam) solüsyonu uygulandı ve renk oluşumu gözlemlendi. Kesitler distile suya alınarak reaksiyon durduruldu. Zıt boyama amacıyla kesitler 45 saniye Mayer's Hematoksilen solüsyonu (abcam) ile muamele edildi. Daha sonra kesitler akan çeşme suyu altında 3-4 dakika yıkandı. Artan derecelerdeki alkol serisinden geçirilerek (%70-%80-%90-%100), toluolde 20 dakika bekletildi. Kapatma işlemi için su bazlı şeffaflaştırıcı solüsyon (abcam) kullanıldı. Kesitler inceleninceye kadar +4 °C'de saklandı. Leica DM 1000 ışık mikroskopu ile tüm gruplara ait sıçanların periferik sinir dokusunda yer alan hücrelerde immünohistokimyasal olarak gözlenen Anti- TGF-β1 boyanmasının şiddeti 0'dan +3'e kadar semikantitatif olarak derecelendirildi ve H-skor yöntemi ile değerlendirilerek elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak karşılaştırıldı. H-skor hesaplamak için aşağıda yer alan formül kullanıldı. H-Skor= $\sum P_i(i+1)$. i: Boyanma yoğunluğunun derecesini (0,1,2 ya da 3), P_i ise her yoğunluk için boyanan hücre yüzdesini (%0-100) göstermektedir.

3.3.5. SEM(SCANNING ELECTRONE MICROSCOPE) İNCELEMESİ

Alınan doku örneklerinin genel olarak morfolojik yüzey görüntülerinin elde edilebilmesi için SEM ile görüntüleme yapıldı. SEM ile inceleme için periferik sinir dokuları Millonig tamponlu %4'lük soğuk gluteraldehit solüsyonu içerisine konuldu ve +4 °C'de 2 gün tespit edildi. İki gün boyunca sertleşen dokular, steril bistüri ucu yardımı ile 1mm³'lük parçalar haline getirildi. Daha sonra dokular Millonig tamponu ile yıkanarak 1,5 saat aynı tampon ile hazırlanmış olan %1'lik Osmiyum tetraoksit (OsO₄) ile ikinci tespit yapıldı. 3 kez 15'er dakika. Millonig tamponu ile tekrar yıkanan dokular, dehidratasyon için 10'ar dakika. sırasıyla; %30, %50, %70, %80, %96'lük etanollerden ve 15 dakika. %100 etanolden geçirildi. Daha sonra doku yüzeyleri Sputter cihazı kullanılarak altın/paladyum (Au/Pd) iletken film ile kaplanarak yüzeylere iletkenlik kazandırıldı. İlgili doku numunelerinden 5 kV akım altında Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile görüntüleri alındı ve gruplar arası farklılıklar değerlendirildi.

3.3.6. TEM(TRANSMISSION ELECTRONE MICROSCOPE) İNCELEMESİ

TEM incelemeleri için sıçanlardan alınan periferik sinir dokuları Millonig tamponlu %4'lük soğuk gluteraldehit solüsyonu içerisine konuldu ve +4 °C'de 2 gün tespit edildi. İki gün boyunca sertleşen dokular, steril bistüri ucu yardımı ile 1mm³'lük parçalar haline getirildi. Daha sonra dokular Millonig tamponu ile yıkandı ve 1,5 saat aynı tampon ile hazırlanmış olan %1'lik Osmiyum tetraoksit (OsO₄) ile ikinci tespit yapıldı. 3 kez 15'er dk Millonig tamponu ile tekrar yıkanan dokular dehidratasyon için 10'ar dakika sırasıyla %30, %50, %70, %80, %96'lık etanollerden ve 15 dakika %100 etanolden geçirildi. Bir sonraki aşamada dokular 15 dakika propilen oksitte bekletildi. Bunun ardından sırasıyla 1:1 oranında propilen oksit-araldit karışımında 45 dakika, 1:3 oranında propilen oksit-araldit karışımında 45 dakika ve saf aralditte 1 gece bekletildikten sonra yuvarlak plastik kalıplara dökülmüş saf araldit içerisine gömüldü. Kalıplar 24 saat boyunca 45°C'lik etüvde ve 48 saat boyunca 60°C'lik etüvde bırakılarak blokların polimerizasyonu sağlandı. Araldit bloklardan, önce Reichert UM2 mikrotomla 0,5 µm. kalınlığında yarı ince kesitler alındı ve toluidin mavisi ile boyanarak istenilen bölgenin tespit edilmesi sağlandı. Reichert UM3 mikrotomu ile de 40-50 nm. kalınlığında ince kesitler alınarak bakır grid üzerine yapıştırıldı. Bakır gridlerdeki kesitler %70 etanol ile hazırlanmış olan doymuş uranil asetat solüsyonu ile 45 dakika, bunun ardından da Reynol'un kurşun sitratı ile 15 dakika boyandı. Jeol Jem-1011 model elektron mikroskobunda incelen kesitlerin fotoğrafları Olympus Veleta TEM CCD kamera ile çekildi. Deney gruplarındaki sıçanların periferik sinir dokularında bulunan hücrelerin ultrastrüktürel özellikleri araştırıldı.

3.3.6 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.

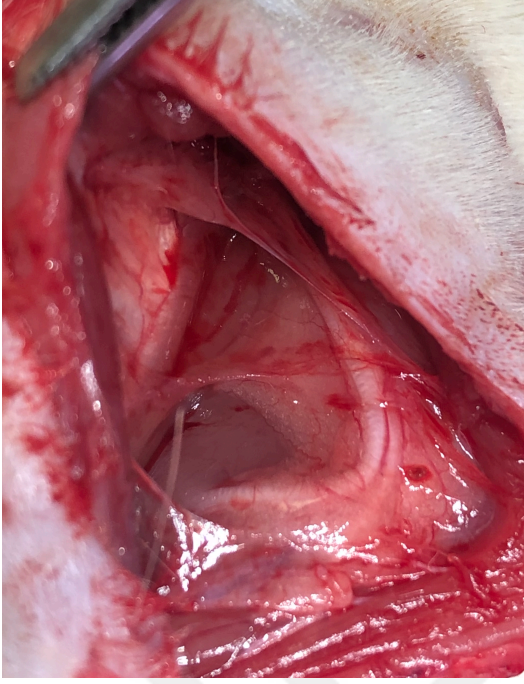
4. BULGULAR

4.1. KLİNİK BULGULAR

Sıçanların 4 hafta süresince belirli aralıklarla yara iyileşmesi ve nörolojik muayeneleri açısından izlenmiştir. Sonuç olarak deney ve kontrol grubu arasında anlamlı farklılık saptanmamıştır.

4.2. ANATOMİK BULGULAR

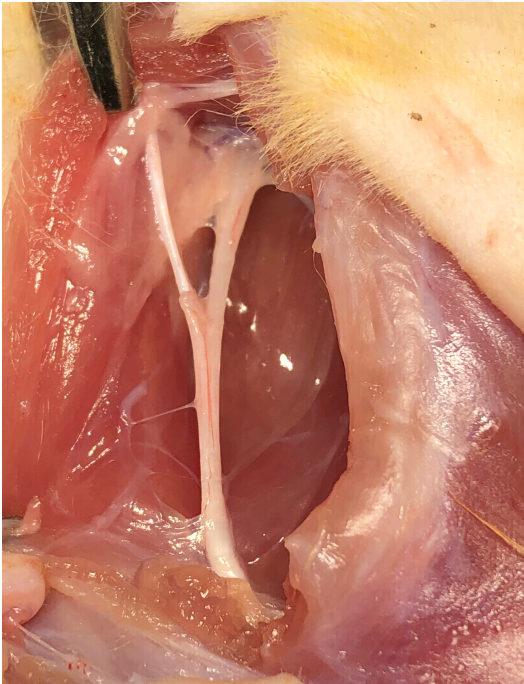
İlk operasyondan 4 hafta sonra eski insizyon yeri tekrar açıldı ve gözlemde bulunuldu. Operasyon lojunda herhangi bir enfeksiyon bulgusuna rastlanmadı. Topikal ve sistemik etanercept uygulanan deney gruplarındaki sinirin çevresindeki adezyonlar Kontrol grubuna göre anlamlı derecede azdı (Şekil 6-9)



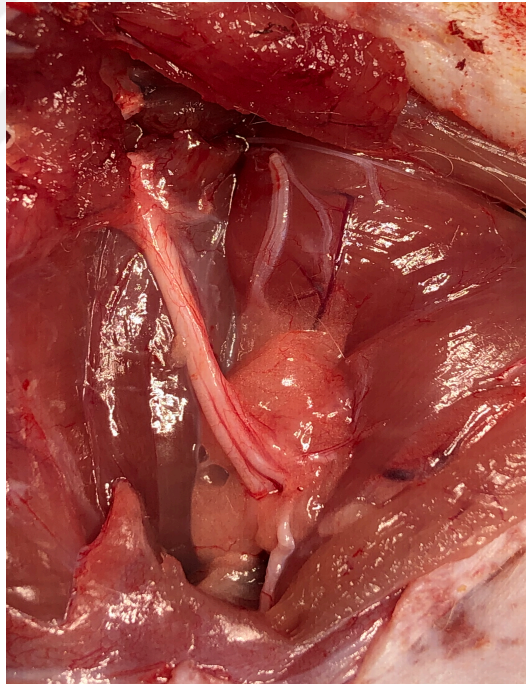
Şekil 6: Kontrol grubu 1



Şekil 7: Kontrol grubu 2



Şekil 8: Sistemik grup



Şekil 9: Topikal grup

Petersen sayısal gradeleme şemasına göre yapılan değerlendirmelerde cilt, kas ve derin fasya kapanmasıyla ilgili gruplar arasında anlamlı farklılık saptanmamıştır ($p>0,05$). Deney gruplarında sinirlerin ortaya konulabilmesi için diseksiyon gerekliliği ve yapışıklık miktarı

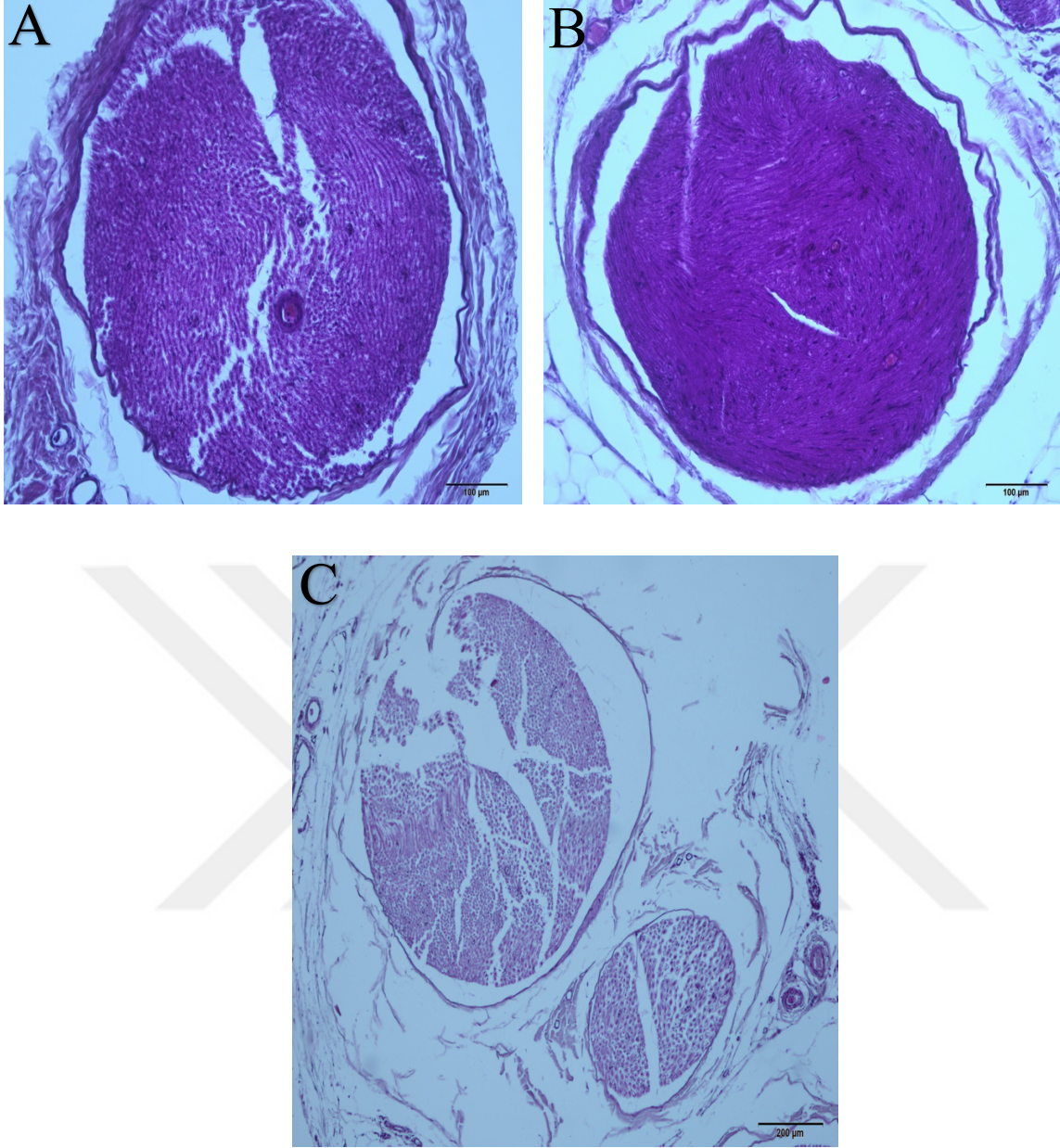
kontrol grubuna göre anlamlı derecede azdı ($p<0,001$). Deney grupları arasında ise sistemik gruptaki diseksiyon gerekliliği ve yapışıklık miktarı topikal gruba göre daha azdı.(Tablo 4).

Tukey's test	P değeri
Kontrol vs Sistemik Etanercept	>0,0001
Kontrol vs Topikal Etanercept	>0,0001
Sistemik Etanercept vs Topikal Etanercept	0,0274

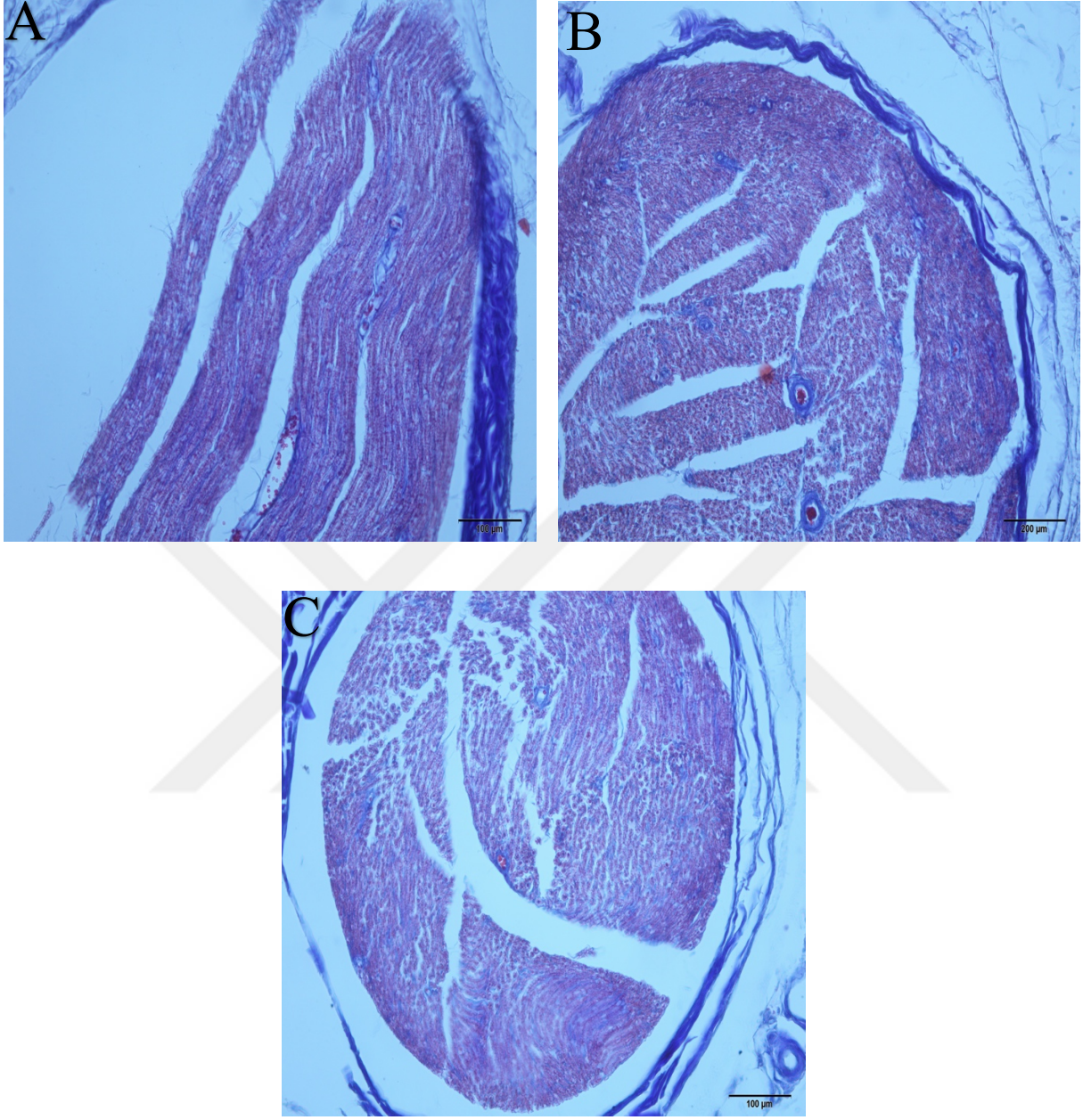
Tablo 3: Grupların adezyon yoğunluğu ve sinir ayrılabilirliği açısından One way ANOVA ile yapılmış istatistiksel karşılaştırması.

4.3. HİSTOPATOLOJİK BULGULAR

Kontrol grubunda band formundaki perinöral bağ dokusu ile Sistemik ve topikal etanercept uygulanmış sinir ve çevre dokular 100x-200x büyütmelemler ile gösterilmiştir. (Şekil 10, 11).



Şekil 10 : H&E ile boyanmış sıçanlardan siyatik sinir bölümlerinin fotomikrografları. (A) Kontrol grubu, (B) Topikal grup, (C) Sistemik grubun siyatik sinir ışık mikroskopik görüntüleri.



Şekil 11: Mason trikrom ile boyanmış sıçanlardan siyatik sinir bölümlerinin fotomikrografları. (A) Kontrol grubu, (B) Topikal grup, (C) Sistemik grubun siyatik sinir ışık mikroskopik görüntüleri.

Sinirlerin çevresindeki bağ dokusu yoğunluğu; granülasyon ve sinir çapı arasındaki farkın ve perinöral skar yoğunluğu (fibrosit/fibroblast yoğunluğu) dikkate alınarak değerlendirilmiştir.

Yapılan Mason trikrom ve H&E boyamalar sonucunda granülasyon/sinir çapı oranında ve perinöral skar yoğunluğunda kontrol grubu ve deney grupları arasında anlamlı farklılıklar gözleildi. Kontrol grubunda granülasyon/sinir çap oranı yüksek bulunurken deney gruplarında bu oran daha düşük saptanmaktadır. Ayrıca deney grupları arasında da sistemik grupta

granulasyon/sinir çapı oranı, topikal gruba göre daha düşük çıkmaktadır. Granulasyon/sinir çapı oranının düşük olması granulasyonun az olduğunu göstermektedir. Deney ve kontrol gruplarını kıyasladığımızda da granulasyonun sistemik grupta diğerlerine kıyasla anlamlı derecede az olduğu, topikal grupta da kontrol grubuna göre anlamlı derecede az olduğu gözlemlenmiştir.

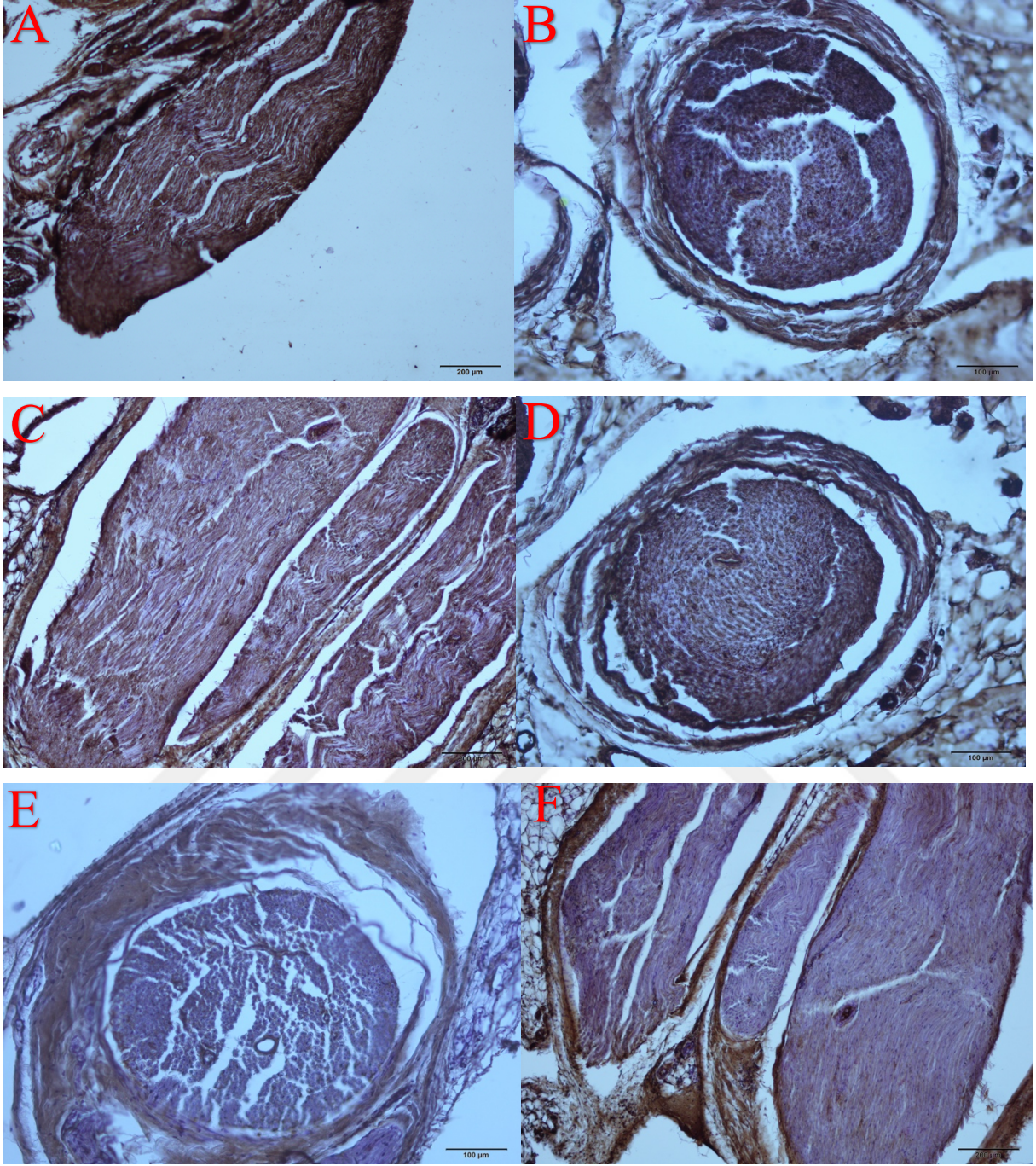
Perinöral skar yoğunluğu değerlendirildiğinde kontrol grubunda deney gruplarına kıyasla bu yoğunluğun anlamlı derecede fazla olduğunu görmekteyiz. Topikal grup ve sistemik grup kendi arasında karşılaştırıldığında ise topikal grupta perinöral skar yoğunluğunun daha fazla olduğunu gözlemlemekteyiz.

Histopatolojik bulguları bütün halinde incelediğimizde sistemik etanercept uygulamasının diğer gruplara kıyasla epinöral fibrozisi belirgin azalttığını ve topikal etanercept uygulamasının da kontrol grubuna göre epinöral fibrozisi anlamlı derecede azalttığını saptadık.

4.5. İMMUNOHİSTOKİMYASAL İNCELEME

Grupların Anti-TNF- α ve Anti-TGF- β 1 H-SCORE düzeyleri karşılaştırıldığında, gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunmuştur ($p < 0,001$). En yüksek Anti-TNF- α ve Anti-TGF- β 1 H-SCORE düzeyi kontrol grubunda görülürken; en düşük Anti-TNF- α ve Anti-TGF- β 1 H-SCORE düzeyi ise sistemik grubunda gözlemlendi. Gruplar arası karşılaştırma yapıldığında; kontrol grubu ile topikal ve sistemik gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görüldü ($p < 0,05$). Topikal ile Sistemik grup karşılaştırıldığında ise, istatistiksel olarak anlamlı bir fark görüldü. Sistemik grubunda diğer tüm gruplara göre Anti-TNF- α ve Anti-TGF- β 1 H-SCORE düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalış söz konusudur ($p < 0,05$). (Tablo:5-6-7)

Etanercept uygulanan grupların kontrol grubuna kıyasla TNF- α ve TGF- β 1 tutulumları aşağıdaki şekillerde gösterilmiştir. (Şekil: 12)

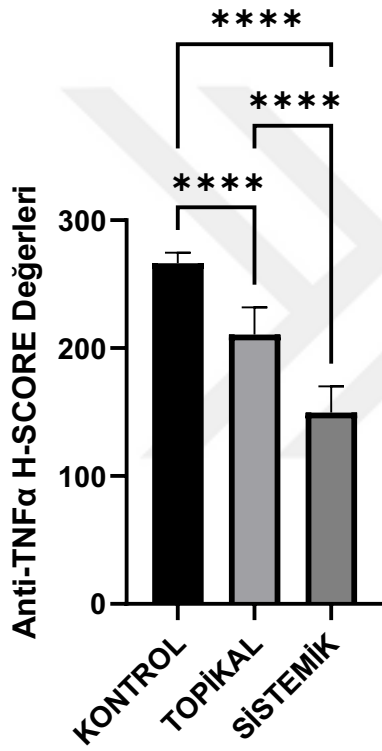


Şekil 12: TNF- α ve TGF- β 1 ile boyanmış olan sıçanlardan siyatik sinir bölümlerinin fotomikrografları. (A) TNF- α kontrol grubu, (B) TGF- β 1 kontrol grubu, (C) TNF- α topikal grup, (D) TGF- β 1 topikal grup, (E) TNF- α sistemik grup, (F) TGF- β 1 sistemik grup

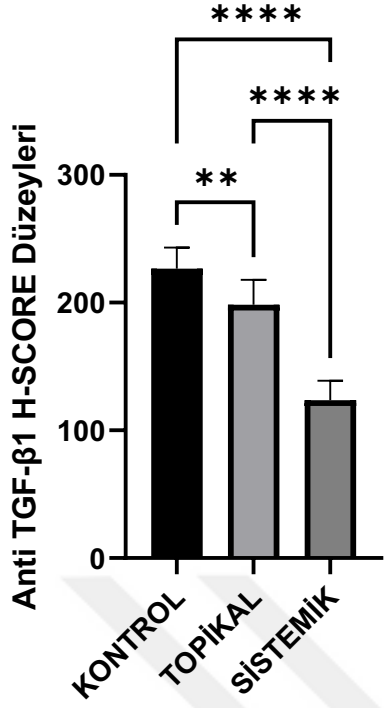
Gruplar	TNF- α H-SCORE \pm SD	TGF- β 1 HSCORE \pm SD
Kontrol	266,4 \pm 8,19	226,7 \pm 16,34
Topikal	210,6 \pm 21,20****	198,4 \pm 19,57**
Sistemik	149,7 \pm 20,43****	123,7 \pm 15,22****

Tablo 4: Kontrol, Topikal ve Sistemik gruplarına ait TNF- α ve TGF- β 1 H-SCORE düzeylerinin karşılaştırılması. Gruplardaki değerler ortalama (X) \pm standart sapma (SD) olarak ifade edildi.

*, Kontrol grubu ile kıyaslandığında; P < 0,05



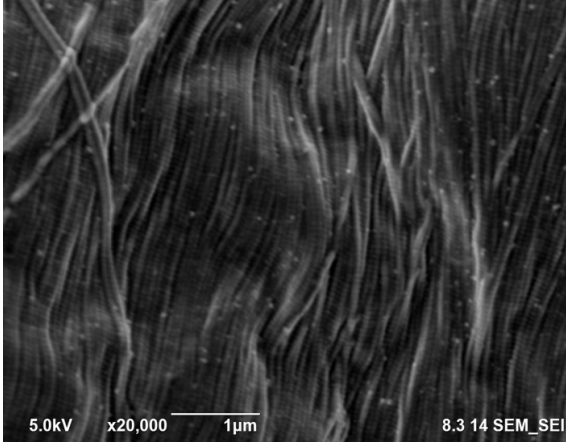
Tablo 5: Kontrol, Topikal ve Sistemik gruplarında Anti-TNF- α H-SCORE düzeylerinin karşılaştırılması.



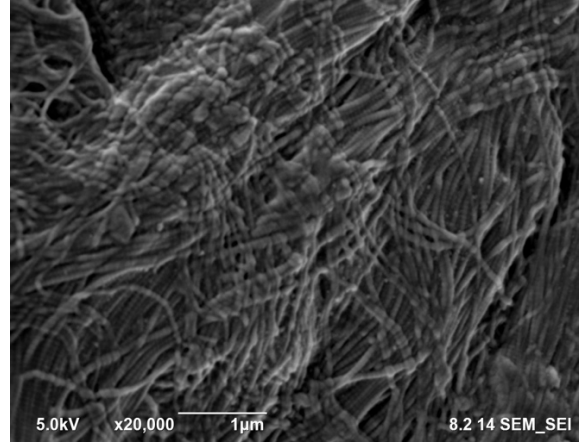
Tablo 6: Kontrol, Topikal ve Sistemik gruplarında Anti-TGF-β1 H-SCORE düzeylerinin karşılaştırılması.

4.6. SEM (TARAMALI ELEKTRON MİKROSKOBU) BULGULARI

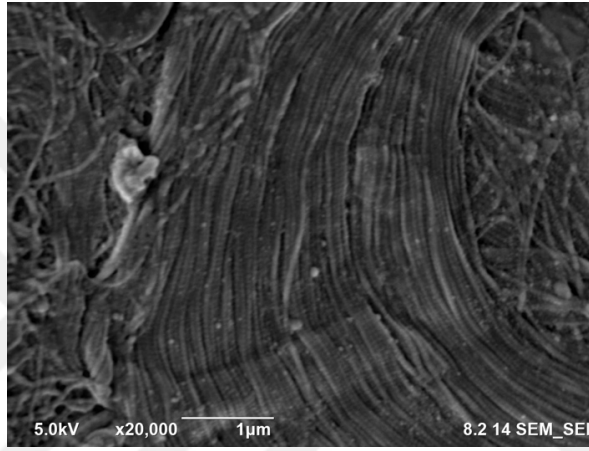
Yaptığımız SEM çalışmasında sinir yüzeyinde etanercept'in kontrol grubuna kıyasla sistemik ve topikal uygulamada ne kadar yapışıklık olduğunu inceledik. Kontrol grubunda sinir lifleri birbirine çok yapışık ve bir bütün halde izlendi. Topikal grupta bu yapışıklıkların kontrol grubuna kıyasla daha az olup ancak anlamlı derecede azalmadığını gözlemliyoruz. Sistemik gruba gelecek olursak sinir liflerinin çok büyük oranda düzensiz bir şekilde birbirlerinden ayrıldığını ve yapışıklığın son derece az olduğunu görüyoruz. Periferik sinir cerrahisi sonrası yapışıklığı azaltmak için uygulanan sistemik etanercept'in, topikal uygulamaya ve kontrol grubuna göre daha etkili olduğunu SEM incelemesi bize göstermektedir.(Şekil 13-14-15)



Şekil 13: Kontrol grubu



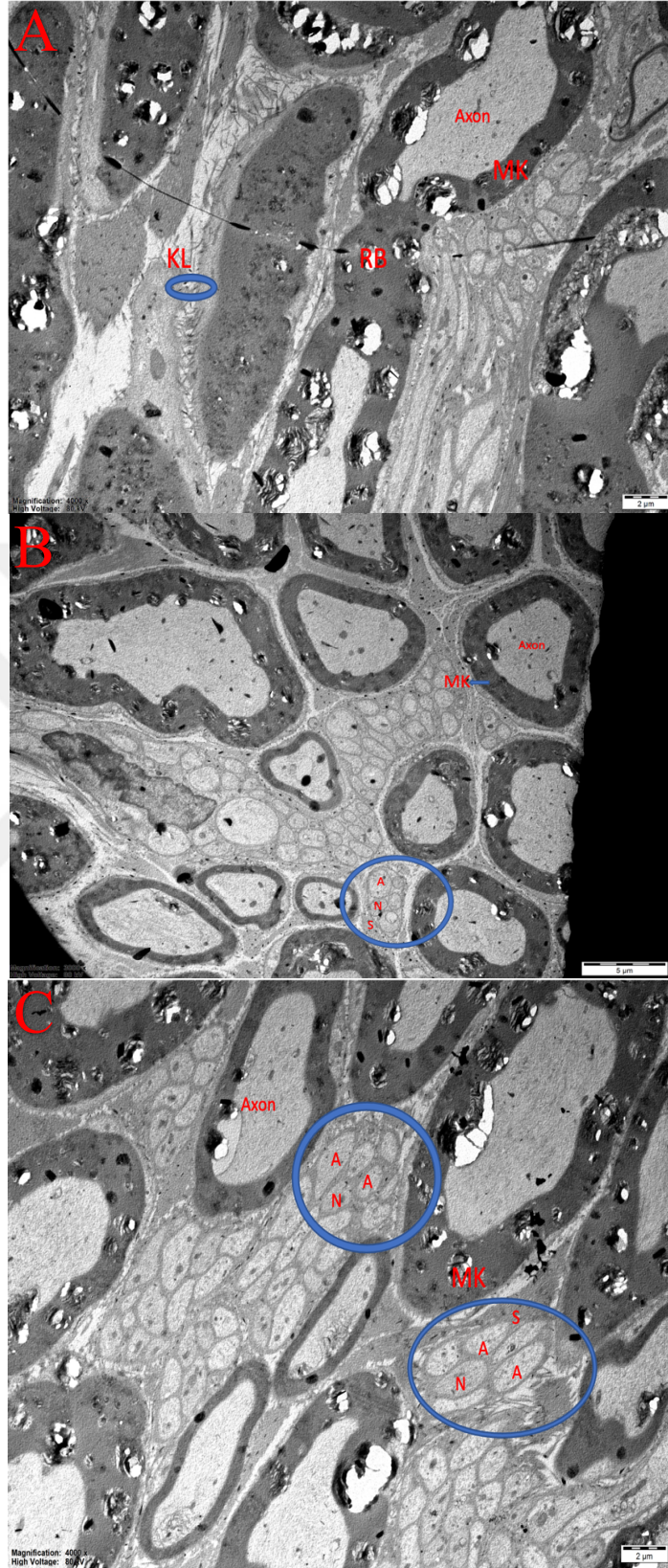
Şekil 14: Sistemik grup



Şekil 15: Topikal grup

4.7. TEM (TARAMALI ELEKTRON MİKROSKOBU) BULGULARI

Yaptığımız TEM incelemesinde kontrol grubunda yoğun kollajen lif oluşumu ve buna bağlı olarak da oluşan fibrozisin sistemik ve topikal etanercept uygulanan gruplara kıyasla daha yoğun olduğunu gözlemledik. Ayrıca myelin kılıf sınırlarının topikal ve sistemik daha düzenli ve intakt olduğunu ancak kontrol grubunda sınırların nisbeten daha düzensiz ve dejenerasyonun daha yoğun olduğunu gördük. Sistemik ve topikal gruplarda belirgin bir fibrozis oluşumu gözlenmemiş olup, sistemik grupta myelin kılıf ve schwann hücrelerinin topikal gruba göre daha düzenli ve hasarsız olduğu gözlemlenmiştir. Periferik sinir cerrahisi sonrası fibrozisi ve kollajen lif oluşumunu azaltmak için uygulanan sistemik ve topikal etanercept'in, kontrol grubuna göre daha etkili olduğunu TEM incelemesi bize göstermektedir.(Şekil: 16)



Şekil 16: Etanercept uygulaması sonrası siyatik sinir görüntüleri.(A) Kontrol grubu; (B) Sistemik etanercept uygulanan grup; (C) Topikal etanercept uygulanan grup. Kalın myelin kılıf içeren sinir lifleri ve myelin kılıf içermeyen schwann hücreleri (Mavi daire içerisindekiler). A, aksoplazma; S, sitoplazma; N, nukleus; MK, myelin kılıf; KL, kollajen lifler; RB, ranvier boğumu.

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.⁶⁴⁻⁶⁷ Normalde de yara iyileşmesi benzer süreçle gerçekleşmektedir.⁶⁸⁻⁷² Bu yüzden, adezyonlarda asıl amaç hiç oluşmaması değildir. Çok yoğun ve diske edilmesi 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.^{73,74} 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.^{10,75-78} 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.^{79,80}

Kato ve ark;¹⁰ Tümör nekroz faktörü-alfa (TNF), nöropatik ağrının başlamasında rol oynayan proinflamatuvar bir sitokindir. Lokal olarak uygulanan TNF antagonisti etanersept, nöropatik ağrıyı hedeflemek için umut verici yeni bir tedavi yaklaşımı sunar.

Goofe ve ark.³⁶ çalışmalarında göstermişlerdir ki; TNF aracılı olayların başlaması, TNF homotrimerlerinin hücre yüzeyi reseptörlerine bağlanmasını, bu reseptörlerin multimerizasyonunu ve ardından reseptörün hücre içi alanları yoluyla sinyal iletimini gerektirir.

TNF-reseptörlerinin çözümler formlarının doğal olarak var olduğu ve TNF-'nin hücre yüzeyi reseptörlerine bağlanması için rekabetçi inhibitörler olarak hareket etme kabiliyetine sahip olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte, bu doğal antagonistlerin varlığı yeterli değildir. enflamatuar hastalıkların çoğunda gözlenen yüksek TNF-alfa protein seviyelerinin aktivitesini bloke etmek için. Etanercept, bu proinflamatuar sitokine rekabetçi bir şekilde bağlanarak ve hücre yüzey reseptörleri ile etkileşimleri önleyerek TNF- alfa aktivitesini inhibe eder. Etanerceptin dimerik yapısı, proteinin TNF-'nin iki serbest veya reseptöre bağlı molekülüne, TNF-Reseptörünün çözümler monomerik formlarının 50 ila 1000 katı bir afinite ile bağlanmasına izin verir. Artan bağlanma afinitesi Etanercept'in, doğal olarak oluşan tek değerlikli formlara kıyasla rekombinant reseptörün dimerik formlarında gözlenen artmış TNF-alfa inhibitör aktivitede anahtar bir rol oynaması muhtemeldir.

Psoriatik deri lezyonlarında, sinoviyal eksplantlarda ve sıvı etanerceptte yüksek TNF alfa seviyeleri bulunmuştur ve sıvı etanercept, biyopsi plakları içindeki infiltre CD3 pozitif T hücrelerinin sayısının yanı sıra çeşitli inflamasyon belirteçlerini azaltmıştır. Etanercept ve infliximab ikisinin de hedef TNF-alfa'dır ; ancak birkaç önemli fark vardır. Etanercept bir füzyon proteini iken infliximab bir monoklonal kimerik antikordur. Etanercept, doğal olarak oluşan çözümler TNF-alfa reseptörlerinin aktivitesini taklit eder ve TNF-alfa'nin reseptörüne bağlanmasını önler. İnfliximab, zara bağlı ve çözümler TNF-alfa'ye bağlanır; ve ayrıca transmembran TNF-alfa ile hücrelerin hücre parçalanmasına neden olabilir.

Görgülü ve ark.⁹⁷ 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.

Günümüzde periferik sinir cerrahisi sonrası yapışıklıkların çok büyük bir sorun olduğundan bahsetmiştik. Hala bu sorun tam çözülememekle birlikte bir çok klinik deney yapılmaktadır. Daha önce bir çok ajan ile ve farklı tekniklerle cerrahi sonrası gelişen fibrozis azaltılmaya çalışılmıştır ancak hala tam anlamıyla etkili bir yöntem ve teknik ortaya konulamamıştır. Biz bu çalışmamızda fibrozis sonrası ortaya çıkan motor ve duyu kayıplarını, nöropatik ağrıları ve en önemli meselelerden biri olan rekürren cerrahideki zorlukları minimuma indirmeyi hedefledik. Bu hedefe ulaşmak için psöriyatik artritis tedavisinde kullanım endikasyonu almış

olan Tnf-alfa inhibitörü etanercept'i kullandık. Hem topikal hem sistemik uygulamasının olması bu çalışmanın güçlü yanlarından. Ayrıca patoloji örnekleri üzerinde yapılan SEM,TEM ve immunohistokimyasal çalışmaların daha önce bu ilaçla yapılmış klinik deneylerde olmaması bu çalışmanın etkinliğini daha da arttırmaktadır.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Perinöral skar,sinir cerrahisi sonrasında oluşabilen ve cerrahinin klinik sonuçlarını etkileyen önemli bir unsurdur. Biz bu çalışmamızda tnf-alfa inhibitörü olan etanercept'i kullanarak perinöral inflamasyonu azaltmayı hedefledik.İlacın avantajı uygulamasının teknik olarak kolay olup herhangi bir ek cerrahi işlem gereksinime ihtiyaç duyulmamasıdır. Dezavantajı ise maliyetinin yüksek olup endikasyon sınırlarının bulunmasıdır. Yaptığımız klinik çalışmanın neticesinde Sistemik Etanercept uygulamasının,topikal uygulamaya ve kontrol grubuna kıyasla perinöral skar oluşumunu ciddi bir şekilde engellediğini görmüş olup, ileride yapılacak olan başka klinik çalışmalarda da kullanılmaya değer bir ilaç olduğunu düşünüyoruz.



7. ÖZET

Giriş ve amaç: Periferik sinir cerrahisinde post operative sık yaşanan komplikasyonlardan bir tanesi perinöral adezyon ve skar oluşumudur. Bu komplikasyon cerrahinin başarısını etkileyerek uzun dönemde hastada ciddi nöropatik ağrı, motor ve duyu defisitlerine neden olabilmektedir. Bu çalışmada amaç perinöral adezyonun ve inflamasyonun azaltılmasında topikal ve sistemik Etanercept'in etkilerinin makroskopik, histopatolojik, immunohistokimyasal ve elektron mikroskopik yönlerinden incelenmesidir.

Gereç ve yöntem: Bu çalışma yirmi adet Wistar albino sıçanları ile iki 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 sıçanlara sistemik etanercept verildi. Diğer deney grubunda iste topikal etanercept 5 dakika boyunca 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 dokusunun sistemik etanercept gruplarında, topikal gruba göre anlamlı derecede az olduğu görüldü. Ayrıca yapılan makroskopik, mikroskopik ve diğer parametrelerde de sistemik ilaç uygulanan grupta oluşan yapışıklılığın diğer gruplara kıyasla çok daha az olduğu tespit edildi.

Sonuç: Periferik sinir cerrahisi sonrası oluşan perinöral yapışıklılıkları azaltmak amacıyla yapılan çalışmamız, Etanercept'in perinöral skar oluşumunu ciddi bir şekilde azalttığını ayrıyeten sistemik Etanercept uygulamasının topikal uygulamaya göre daha etkili olduğunu göstermiştir. Etanercept'in uygulama kolaylığı ve kolay edilebilirliği sayesinde klinik uygulamalarda kullanılabilirliği yüksektir. Ancak, bu maddenin klinik kullanımı için, farklı dozlarla yapılacak ve doz-etki ilişkisini gösterecek yeni çalışmalar gereklidir.

Anahtar kelimeler: Epinöral adezyon, Etanercept, Siyatik sinir

8.ABSTRACT

Introduction and purpose: Perineural adhesion and scar formation is one of the common post operative complications in peripheral nerve surgery. This complication affects the success of the surgery and may cause severe neuropathic pain, motor and sensory deficits in the long term. The aim of this study was to investigate the effects of topical and systemic Etanercept on the reduction of perineural adhesion and inflammation from macroscopic, histopathologic, immunohistochemical and electron microscopic aspects.

Materials and methods: This study was performed with twenty Wistar albino rats in two experimental and one control groups. The sciatic nerves of the rats in each group were exposed bilaterally. Thus, ten sciatic nerves were obtained for each group. The sciatic nerves were abrasion injured with repetitive brush movements together with the surrounding muscle tissues. Saline was administered in the control group and systemic etanercept was given to rats in one experimental group. In the other experimental group, topical etanercept was applied for 5 min. Hot plate test was performed four weeks after the surgical procedures. Afterwards, macroscopic and microscopic evaluations were performed in the sacrificed rats.

Results: There was no significant difference in closure of the skin and fascia cavity in all four groups. No neurologic deficit or side effects were detected in all four groups. Macroscopic and microscopic evaluations showed that perineural scar tissue was significantly less in the systemic etanercept group compared to the topical group. In addition, macroscopic, microscopic and other parameters showed that adhesions were significantly less in the systemic etanercept group compared to the other groups.

Conclusion: Our study, which was conducted to reduce perineural adhesions after peripheral nerve surgery, showed that Etanercept significantly reduced perineural scar formation and systemic Etanercept application was more effective than topical application. Etanercept's ease of administration and availability make it highly suitable for clinical applications. However, further studies with different doses and dose-effect relationships are required for the clinical use of this agent.

Key words: Epineural adhesion, Etanercept, Sciatic nerve

10. KAYNAKLAR

1. Dam-Hieu P, Lacroix C, Said G, Devanz P, Liu S, Tadie M. Reduction of postoperative perineural adhesions by Hyaloglidle 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, Delamarer 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. Vınay K, Ramzı 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. (Siemionow M, Brzezicki G. Current techniques and concepts in peripheral nerve repair. *Int Rev Neurobiol*. 2009;87:141-72.)
33. Neher MD, Weckbach S, Huber-Lang MS, Stahel PF. New insights into the role of peroxisome proliferator-activated receptors in regulating the inflammatory response after tissue injury. *PPAR Res* 2012; 2012: 728461.)
34. Pergel A, Kanter M, Yucel AF, Aydin I, Erboga M, Guzel A. Anti-inflammatory and antioxidant effects of infliximab in a rat model of intestinal ischemia/reperfusion injury. *Toxicol Ind Health* 2011
35. Guzel A, Kanter M, Pergel A, Erboga M. Anti-inflammatory and antioxidant effects of infliximab on acute lung injury in a rat model of intestinal ischemia/reperfusion. *J Mol Histol* 2012.)
36. Ben Goffe ¹, Jennifer Clay Cather Etanercept: An overview 2003 10.1016/mjd.2003.55432. Iskander FY. Trace and minor elements in four commercial honey brands. *J Radioanalyt Nuclear Chem* 1995; 201: 401–8.

37. Gaspari A, Gottlieb AB, Kang S, Gordon K, Feng A, Zitnik R, et al. Etanercept improves the clinical and pathological features of psoriasis. Presented at: Society for Investigative Dermatology, 2002. Abstract in press, *Journal of Investigative Dermatology*, 2003.
38. 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.
39. Deutsche Gesellschaft für Ernährung. "Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr". Umschau/Braus. Frankfurt am Main. 2000.
40. 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.
41. Yilmaz H, Yavuz O. Content of some trace metals in honey from South-Eastern Anatolia. *Food Chem* 1999; 65: 475-6.
42. 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.
43. 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.
44. Hepşen IF, Tilgen F, Er H. Propolis: Tıbbi özellikleri ve oftalmolojik kullanımı. *Turgut Özal Tıp Merkezi Dergisi* 1996; 3: 386-91.
45. 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.
46. 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.
47. Michaluart P, Masferrer JL, Carothers AM, et al. *Cancer Res* 1999; 59, 2347-52.
48. 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.
49. 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
50. Russo A, Longo R, Vanella A. Antioxidant activity of propolis: role of caffeic acid phenethyl ester and galangin. *Fitoterapia*. 2002;73:21-29.
51. 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.
52. 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
53. 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
54. Chen WYJ, Abatangelo G. Functions of hyaluronan in wound repair. *Wound Rep. Reg* 1999;7:79-89.

55. Jiang D, Liang J, Noble PW. Hyaluronan in Tissue Injury and Repair. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2007; 23:435–61
56. Toole BP. Hyaluronan: From Extracellular Glue to Pericellular Cue. *Nat Rev Cancer.* 2004 Jul;4(7):528-39
57. Almond A. Hyaluronan. *Cell Mol Life Sci.* 2007 Jul;64(13):1591-6
58. Girish KS, Kemparaju K. The magic glue hyaluronan and its eraser hyaluronidase: a biological overview. *Life Sci.* 2007 May 1;80(21):1921-43
59. 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.
60. 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.
61. 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.
62. 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.
63. Songer MN, Ghosh L, Spencer DL: Effects of sodium hyaluronate on peridural fibrosis after lumbar laminotomy and discectomy. *Spine* 15:550–554, 1990.
64. Lucas PA. Stem cells for mesothelial repair: An understudied modality. *Int J Artif Organs* 2007; 30(6): 550-556.
65. 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.
66. Christen D, Buchmann P. Peritoneal adhesion after laparotomy: prophylactic measures. *Hepatogastroenterology* 1991; 38(4): 283-286.
67. 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.
68. Holmdahl L, Risberg B. Adhesions: prevention and complications in general surgery. *Eur J Surg* 1997; 163(3): 169-174.
69. Ellis H. The cause and prevention of postoperative intraperitoneal adhesions. *Surg Gynecol Obstet* 1971; 133(3): 497-511
70. 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
71. Ellis H. The causes and prevention of intestinal adhesions. *Br J Surg* 1982; 69(5): 241-243
72. Holmdahl L, Marlier-Bannot S. The prevention of intestinal obstruction related to adhesions. *Ann Chir* 2006; 131(10): 647
73. Mastronardi L, Pappagallo M, Puzzilli F, Tatta C. Efficacy of the morphineAdcon-L compound in the management of postoperative pain after lumbar microdiscectomy. *Neurosurgery.* 2002; 50(3): 518-525.

74. 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.
75. 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.
76. 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.
77. 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.
78. 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
79. Hatipoğlu A, Türkyilmaz Z, Mert S: The effects of melatonin on postoperative intraabdominal adhesion formation. *Yonsei Med J* 2007;48:659–664
80. 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.
81. 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.
82. 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.
83. Song, J. J., Lim, H. W., Kim, K., Kim, K. M., Cho, S., et al. 2012, Effect of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on H(2)O(2) induced oxidative and inflammatory responses in human middle ear epithelial cells. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* 76, 675–679
84. 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
85. 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
86. 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.
87. Turgut A, Sak M.E., Turku G, Ozler A., Soydinc H.E., Evsen M.S., Evliyaoglu O., Akdemir F. *Gynecol Obstet Invest* 2013;75:281–288
88. 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
89. 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.

90. Goldberg RL, Toole BP. Hyaluronate inhibition of cell proliferation. *Arthritis and rheumatism*. 1987;30(7):769-78.
91. 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.
92. 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.
93. 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
94. 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.
95. 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.
96. 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.
97. 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.
98. 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.
99. Taşkale P, Topaloğlu İ. The Healing Effects of Vitamin E with Corticosteroid and Vitamin E Alone on Nevre Healing in Rats with Travmatic Facial Palsy *KBB İhtis Derg* 20(5):255-259,2010
100. K Kato ¹, S Kikuchi, V I Shubayev, R R Myers Distribution and tumor necrosis factor-alpha isoform binding specificity of locally administered etanercept into injured and uninjured rat sciatic nerve 2009 10.1016/j.neuroscience.2009.02.038