

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Anatomi Anabilim Dalı**

**SİYATİK SİNİR KESİSİNİ TAKİBEN INTRAPERITONEAL
YÖNTEMLE UYGULANAN OZON'UN SİNİR
REJENERASYONU ÜZERİNE ETKİSİ:
ULTRASTRÜKTÜREL, BİYOKİMYASAL
ELEKTROMİYOGRAFİK VE FONKSİYONEL ANALİZİ**

Eren ÖĞÜT

Yüksek Lisans Tezi

Antalya, 2014

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Anatomi Anabilim Dalı**

**SİYATİK SİNİR KESİSİNİ TAKİBEN INTRAPERITONEAL
YÖNTEMLE UYGULANAN OZON'UN SİNİR
REJENERASYONU ÜZERİNE ETKİSİ:
ULTRASTRÜKTÜREL, BİYOKİMYASAL
ELEKTROMİYOGRAFİK VE FONKSİYONEL ANALİZİ**

Eren ÖĞÜT

Yüksek Lisans Tezi

**Tez Danışmanı
Doç. Dr. Fatoş Belgin YILDIRIM**

Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi
Tarafından Desteklenmiştir. (Proje no:2013.02.0122.002)

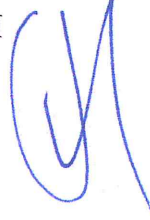
“Kaynakça Gösterilerek Tezinden Yararlanılabilir.”

Antalya, 2014

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

Bu çalışma jürimiz tarafından Anatomi Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir. 20/06/2014

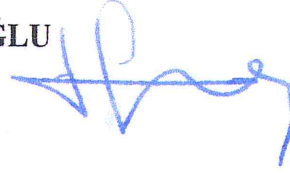
Tez Danışmanı : **Doç.Dr. Fatoş Belgin YILDIRIM**
Akdeniz Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Anatomi Anabilim Dalı



Üye : **Prof. Dr. Nurettin OĞUZ**
Akdeniz Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Anatomi Anabilim Dalı



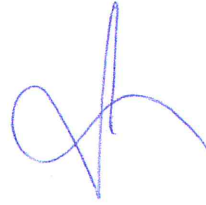
Üye : **Prof.Dr. Levent SARIKCIOĞLU**
Akdeniz Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Anatomi Anabilim Dalı



Üye : **Prof.Dr. Mutay ASLAN**
Akdeniz Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Biyokimya Anabilim Dalı



Üye : **Doç.Dr. Ferah KIZILAY**
Akdeniz Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Nöroloji Anabilim Dalı



ONAY:

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun/...../..... tarih ve/..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof..Dr. İsmail ÜSTÜNEL

Enstitü Müdürü

ÖZET

Periferik sinir yaralanma modelleri üzerinde ozon'un antioksidan ve nöroprotektif etkileri çalışılmıştır. Ancak, ozon'un 35-40 ug/ml 5 cc intraperitoneal olarak sinir kesisi üzerine olan koruyucu etkisini değerlendirip karşılaştıran araştırmalar literatürde azdır. Çalışmamızın amacı; ratlarda deneysel olarak oluşturulan periferik sinir kesisi modelinde ozonun iyileştirici etkilerini belirleyerek sinir kesisine bağlı morbiditeyi en aza indirmek ve klinik çalışmalara yön vermektir. Sunulan çalışmada, deneysel siyatik sinir kesisi , ozon uygulamasının etkilerinin, footprint analizi, elektron mikroskopi, elektrofizyoloji ve biyokimyasal yöntemlerle araştırılması amaçlandı. Yıllar içerisinde yapılan çalışmalar ozon'un (O₃) medikal kullanımını gündeme getirmiştir. Çalışmamızda 100 adet yetişkin, erkek, ağırlıkları 400-450gr arasında değişen *Rattus norvegicus*. Wistar albino rat kullanıldı. 100 adet Wistar cinsi sıçan 4 gruba ayrıldı., Kontrol grubu (n=20), hiçbir işlem yapılmadı, Sham grubu (n=20), ameliyat stresi yaratıldı. Grup 1'de (n=30) sinir kesilip dikildi, hiçbir tedavi uygulanmadı. Grup 2'de (n=30), sinir kesip dikimini takiben 35-40 ug/ml 5 cc ozon intraperitoneal olarak 2 ay süre ile uygulandı. Sinir rejenerasyonunu değerlendirmek için deney öncesi ve sonrası her bir grubun EMG (elektromiyografi) ölçümü yapıldı ve postoperasyon 1.gün ve 2., 4., 6. ve 8. haftalarda SFİ (siyatik fonksiyonel indeks) ve WRL (ayak geri çekme refleksleri) ölçüldü. Motor fonksiyon testi sonucunda grup 2 de postoperasyon 2.hafta=-80±5,19 ve postoperasyon 4.hafta=-37± 6.11 ve duysal fonksiyon testi postoperasyon 2. hafta $p=0.035$, $p<0.05$. SFI değerlerinde 1.grup ile karşılaştırıldığında 2.grupta $p<0.05$ istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmüştür. Elektrofizyolojik analiz sonucunda grup 1 ile karşılaştırıldığında grup 2'nin p min, p max, p-p, std.dev. değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı artış olduğu saptanmıştır ($p<0.001$). Elektron mikroskopik değerlendirme sonucunda grup 2 de, grup 1'e kıyasla daha fazla oranda schwann hücresi ve sitoplazmik organel tespit edilmiştir. Biyokimyasal analiz sonucunda, ozon tedavisi uygulanan kesi+ozon grubunda plazma SOD (Süperoksit dismutaz),CAT (katalaz),GPx (glutatyon peroksidaz) enzimlerinin değerleri, kesi grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede ($p<0.001$) artmıştır. Tekrarlayan ozon uygulamaları sonucunda antioksidan sistem uyarılarak oksidatif strese karşı direnç gelişir. Ratlarda deneysel olarak oluşturulan periferik sinir kesisinde ozon'un sinir rejenerasyonunu artırdığı biyokimyasal, ultrasütrüktürel, elektrofizyolojik ve fonksiyonel yöntemlerle tespit edildi. Sonuç olarak kesi tarzı sinir hasarında ozon uygulanan grupta daha hızlı ve kaliteli bir rejenerasyon elde edildi.

Anahtar Kelimeler: İntraperitoneal, Ozon, Ozonterapi

ABSTRACT

Several kinds of peripheral nerve injury models have been well studied in terms of neuroprotective and antioxidative effects of ozone. Nevertheless, definitive experimental studies are lacking on 35-40 ug/ml 5 cc intraperitoneal effects of ozone with intraperitoneal in peripheral nerve cut injuries. The aim of our study is investigate the effects of ozone on nerve healing in rat peripheral nerve cut model. In this study, the effects of intraperitoneal ozone on the rat sciatic nerve cut injury were examined by footprint analysis, electron microscopic, electrophysiologic and biochemical methods. Studies conducted have come into question for medical usage of ozone. In our study, a hundred adult, male, *Rattus norvegicus*. Wistar albino rats weighting 400-450 gr were divided into four groups. Groups were planned as follows: In group control (n=20) no cut injury was produced and no other treatment was given; in group sham-operated (n=20) only operation stress was performed; in group 1 (n=30) after the dissection of nerve, cut injury was performed and and no other treatment was given; in group 2 (n=30) after the dissection of nerve, cut injury was performed and ozone was given 35-40 ug/ml and 5 cc with intraperitoneal for 2 months. Before the beginning of experiment and after EMG (electromyography) test were performed and postoperation 1th day, 2nd, 4th, 6th and 8th months SFI (sciatic functional index) and WRL (withdrawal refleks) were measured for each group. Motor functional analysis showed that in group 2 postoperation 2nd month=-80±5,19 and postoperation 4th month=-37± 6.11 and pinch analysis showed that postoperation 2nd month $p=0,035$. $p<0.05$. SFI values of the 2nd group showed significant deference ($p<0.05$) compared with the 1th group. As a result of electrophysiologic analysis revealed that components p min, p max, p-p, std. dev. were significantly ($p<0.001$) increased in group 2 compared with group 1. Electron microscopic analysis revealed more schwann cells and cytoplasm organelles. Biochemical analysis showed that treatment with ozone in cut injury groups induced a significant increase in plasma SOD (superoxyde dismutase), CAT (catalase) and GPx (glutathione peroxidase) activities ($p<0.001$). Repetition of ozone administration creates resistance against oxidative stress via inducing antioxidative system. It was determined that ozone improves regeneration of experimental peripheral nerve cut with both biochemistry, electrophysiological, ultrastructural and functional procedure. In conclusion, application of ozone can improve nerve healing in ozone group.

Key words: Intraperitoneal, Ozone, Ozone Therapy

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmalarım boyunca bilgi birikimlerini, deneyimlerini, hoşgörülerini esirgemeyen; tez konumun seçilmesi, yürütülmesi ve tamamlanmasındaki katkılarından dolayı, danışman hocam Sayın Doç. Dr. Fatoş Belgin YILDIRIM'a sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca, tez çalışmalarım süresince büyük yardımlarını gördüğüm, bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım Anatomi Anabilim Dalı Öğretim Üyelerinden Sayın Prof. Dr. Levent SARIKCIOĞLU'na, Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyelerinden Sayın Prof. Dr. Mutay ASLAN'a, Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyelerinden Sayın Prof. Dr. Necdet DEMİR'e , Biyofizik Anabilim Dalı Öğretim Üyelerinden Sayın Prof. Dr. Nazmi YARAŞ'a sonsuz teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım. Tezimde istatistik alanındaki yardımlarından dolayı Tıp Eğitimi Anabilim Dalı Öğretim Üyelerinden Sayın Doç. Dr. Yeşim ŞENOL'a teşekkürlerimi sunarım. Anesteziyoloji ve Reanimasyon Anabilim Dalı bünyesinde yer alan Algoloji Ünitesinin ozon jeneratörü'nü kullanmama izin verdiği için Sayın Prof. Dr. Arif YEĞİN'e ve tüm idari personeline desteklerinden dolayı çok teşekkür ederim. Haftasonları ise ozon jeneratörü temininden dolayı Antalya Ozon Kliniğın tüm çalışanlarına ve tez sürecindeki destekleri ve yardımlarından dolayı Sayın Dr. Başar ŞENYÜZ'e teşekkür ederim.

Ayrıca tezimin hazırlanmasında emeği geçen Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı akademik ve idari personeli Sayın Arş. Gör. Esmâ KIRIMLI KONUK'a ve Sayın Biyolog Arife DEMİRTOP'a, Biyokimya Anabilim Dalı akademik personeli Sayın Arş. Gör. Ertan KÜÇÜKSAYAN'a teşekkür ederim. Deney Hayvanları Bakım ve Üretim Ünitesi idari personeli Sayın Sağ. tkn. İbrahim ÇALIŞKAN'a katkılarından dolayı çok teşekkür ederim. Beraber çalışma fırsatı bulduğum ve tez aşamasında yardımlarını esirgemeyen tüm asistan arkadaşlarıma da ayrıca teşekkür ederim. Yardımlarından dolayı Sağlık Bilimleri Enstitüsü akademik ve idari personeline teşekkürlerimi sunarım.

Yaşamım boyunca her zaman yanımda olan, beni yüreklendiren, her koşulda destekleyen fedakar anne ve babama çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

ÖZET	Sayfa
	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
TABLolar DİZİNİ	xiv
GİRİŞ VE AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER	
2. 1. Periferik Sinir Anatomisi	3
2. 2. Periferik Sinir Hasarı ve Rejenerasyonu	3
2. 3. Nervus Ischiadicus Anatomisi	6
2. 3. 1. Nervus Ischiadicus'un Yan Dalları	8
2. 3. 2. Nervus Ischiadicus'un Terminal Dalları	8
2. 4. Rat'ta Nervus Ischiadicus Anatomisi	8
2. 5. EMG Nedir?	9
2. 5. 1. EMG ve Sinir İleti İncelemeleri	9
2. 5. 2. EMG İşaretinin Ölçülmesinin Temelleri	10
2. 5. 3. EMG İncelemesinde Kullanılan Yöntemler	10
2. 5. 4. EMG ile Tespit Edilen Kimyasal ve Mekanik Olaylar	10
2. 5. 5. EMG'nin Uygulanma Yöntemi	11
2. 5. 6. EMG'nin Uygulanma Sebepleri	11
2. 5. 7. EMG Hangi Durumlarda Yapılır?	11
2. 6. Ozon Nedir?	12
2. 7. Medikal (Tedavi Amaçlı) Ozon Nedir?	13
2. 7. 1. Medikal Ozon Uygulamalarının Tarihçesi	13
2. 7. 2. Medikal Ozon ve Etki Mekanizması	14

2. 7. 3.	Medikal Ozon'un Terapötik (Tedavi Amaçlı) Gerekçesi	14
2. 7. 4.	Medikal Ozon Tedavisinin Temel İlkeleri	15
2. 7. 5.	Medikal Ozon'un Ana Uygulama Yöntemleri	15
2. 7. 5.1.	Intraperitoneal Yöntem	15
2. 7. 5.2.	Major Otohemoterapi (MAHT)	16
2. 7. 5. 3.	Minör Otohemoterapi (MİAHT)	16
2. 7. 5. 4.	Paravertebral İnfiltrasyon	16
2. 7. 5. 5.	İntraartiküler (Eklem İçi) İnfiltrasyon	17
2. 7. 5. 6.	İntradiskal (Disk İçi) İnfiltrasyon	17
2. 7. 5. 7.	Peridural (Translaminar) İnfiltrasyon	17
2. 7. 5. 8.	Subkutanöz (Deri Altı) Uygulama	17
2. 7. 5. 9.	Ozon Torbalama (Bagging) Yöntemi	17
2. 7.5.10.	Ozon Kupalama (Capping) Yöntemi	17
2. 7.5.11.	Fistüllerde İnsüflasyon	17
2. 7.5.12.	Vajinal İnsüflasyon	18
2. 7.5.13.	Veziköüretal İnsüflasyon	18
2. 7.5.14.	Otik (Kulak) İnsüflasyonu	18
2. 7.5.15.	Rektal İnsüflasyon	18
2. 7.5.16.	Ozonlanmış Salin (Serum Fizyolojik) Çözeltisi	18
2. 7.5.17.	Ozonlu Su, Yağ ve Kremelerle Topikal Uygulama	18
2. 7.5.18.	Oftalmolojik Yöntem	18
2. 7. 6.	Önerilmeyen ve Yasaklanan Uygulama Yolları	19
2. 7. 6. 1.	Ozon'un Direkt Venöz Uygulanması	19
2. 7. 6. 2.	Yasaklanan Uygulama Yolu	19
2. 7. 7.	Medikal Ozon Kullanımında Dikkat Edilmesi Gereken Durumlar ve Biyokimyasal Etkileri	21
2. 7. 8.	Bir Farmasötik Madde Olarak Medikal Ozon	21
2. 7. 9.	Medikal Ozon Tedavisinin Klinik Uygulamaları	21
2. 7. 10.	Medikal Ozonun Kullanıldığı Alanlar	22
2. 7. 11.	Yan Etki ve Kontrendikasyonları	22

MATERYAL VE METOT

3. 1.	Deney Gruplarının Oluşturulması	23
3. 2	Cerrahi İşlemler	24
3. 3	Ozon Terapisi	25
3. 3. 1.	Kontrol Grubu	27
3. 3. 2.	Sham Grubu	27
3. 3. 3.	Grup 1 (Kesi Grubu)	27
3. 3. 4.	Grup 2 (Kesi+Ozon Grubu)	27
3. 4.	Değerlendirme Testleri	27
3. 4. 1.	Motor Fonksiyon Testi (Yürüme Patern Analizi)	27
3. 4. 1. 1.	SFI Saptanması	28
3. 4. 2.	Duyusal Fonksiyon (Pinch) Testi	29
3. 4. 3.	Elektrofizyolojik Analiz	29
3. 4. 4.	Biyokimyasal Değerlendirme	32
3. 4. 4. 1.	Lipid Peroksidasyon Seviyelerinin Ölçümü	32
3. 4. 4. 2.	TBARS Miktarının Hesaplanması	33
3. 4. 4. 3.	Antioksidanların Tayini	33
3. 4. 4. 4.	Glutasyon Peroksidaz Enzim Aktivite Tayini	34
3. 4. 4. 5.	Süperoksit Dismutaz Enzim Aktivite Tayini	34
3. 4. 4. 6.	Katalaz Enzim Aktivitesinin Tayin Yöntemi	34
3. 4. 5.	Deneklerin Sakrifikasyonu	35
3. 4. 6.	Ultrastrüktürel Değerlendirme	35
3. 4. 6. 1.	Elektron Mikroskopik İnceleme	35
3. 4. 7.	İstatiksel Analiz	37

BULGULAR

4. 1.	Ultrastrüktürel Değerlendirme Bulguları	38
4. 1. 1.	Kontrol Grubu	38
4. 1. 2.	Sham Grubu	39
4. 1. 3.	Grup 1 (Kesi Grubu)	40
4. 1. 4.	Grup 2 (Kesi + Ozon Grubu)	41

4. 2.	Biyokimyasal Değerlendirme Bulguları	43
4. 2. 1.	Plazma Gpx Aktivitesi	43
4. 2. 2.	Doku CAT Aktivitesi	43
4. 2. 3.	Plazma CAT Aktivitesi	44
4. 2. 4.	Plazma SOD Aktivitesi	45
4. 2. 5.	Doku SOD Aktivitesi	46
4. 2 .6.	Plazma TBARS Düzeyleri	47
4. 2. 7.	Doku TBARS Düzeyleri	48
4. 3.	Motor ve Duyusal Fonksiyon Değerlendirme Testleri	48
4. 3. 1.	Duyusal Fonksiyon (Pinch) Testi Bulguları	48
4. 3. 2.	Motor Fonksiyon Testi Analizi Bulguları ve SFI Değerleri	50
4. 4.	Elektrofizyolojik Değerlendirme Bulguları	50
4. 4. 1.	Kontrol Grubu	51
4. 4. 2.	Sham Grubu	52
4. 4. 3.	Grup 1 (Kesi Grubu)	54
4. 4. 4.	Grup 2 (Kesi + Ozon Grubu)	55
TARTIŞMA		57
SONUÇLAR		61
KAYNAKLAR		62
ÖZGEÇMİŞ		80

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ACE	:	Anjiotensin Converting Enzim
Ach	:	Asetilkolin
ATP	:	Adenozin Trifosfat
BDMA	:	Benzildimethylamine
BT	:	Bilgisayarlı Tomografi
Ca⁺²	:	Kalsiyum
CAT	:	Katalaz
CMAP	:	Compound Muscle Action Potential
CO	:	Karbon Monoksit
CO₂	:	Karbon Dioksit
DDSA	:	Dodecenyl Succinic Anhydride
DNA	:	Deoksiribonükleik Asit
2,3 DPG	:	2,3-Diphosphoglycerate
EM	:	Elektron Mikroskopi
EMG	:	Elektromiyografi
G-6-PD	:	Glukoz 6 Fosfat Dehidrogenaz
GR	:	Glutasyon Redüktaz
GSH	:	Glutasyon
GST	:	Glutasyon S- Transferaz
GPx	:	Glutasyon Peroksidaz
HBV	:	Hepatit B Virüsü
HCV	:	Hepatit C Virüsü
HIV	:	Human Immunodeficiency Virus
HO-1	:	Hem Oksijenaz-1
H₂O₂	:	Hidrojen Peroksit
HNE	:	4-Hidroksi-2,3-Trans Nonenal
HCIO	:	Hipoklorik Asit
HT	:	Hemoterapi
IT	:	Intermediary Toe
ITF	:	Intermediary Toe Spread Factor
ITS	:	Intermediary Toe Spread
KOAH	:	Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı
L	:	Lumbal
LDH	:	Lumbal Disk Hernisi
Lig.	:	Ligamentum
LOP	:	Lipids Oxidation Products
MAHT	:	Major Otohemoterapi
MDA	:	Malonildialdehit
MiAHT	:	Minor Otohemoterapi
MÜAP	:	Motor Ünite Aksiyon Potansiyeli
MÜP	:	Motor Ünite Potansiyelleri

NAD	:	Nikotinamid Adenin Dinükleotit
NADP	:	Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
NO	:	Nitrik Oksit
N₂O₂	:	Nitrojen Dioksit
O₂	:	Oksijen
O₂·-	:	Süperoksit Radikali
O₃	:	Ozon
OsO₄	:	Osmium Tetraoksit
PL	:	Print Length
PLF	:	Print Length Factor
P-max	:	Maksimum Pozitif Pik
P-min	:	Minimum Negatif Pik
P-P	:	Pozitif Ve Negatif Pikler Arası Mesafe
PSS	:	Periferik Sinir Sistemi (Systemo Nervosum Periphericum)
PVC	:	Polivinil Klorür
PUFA	:	Çoklu Doymamış Yağ Asitleri
RNA	:	Ribonükleik Asit
ROS	:	Serbest Oksijen Radikalleri
ROT	:	Reaktif Oksijen Türevleri
S	:	Sakral
SFI	:	Sciatic Functional İndex
SFT	:	Sörensen Fosfat Tamponu
SH	:	Sülfhidril
SOD	:	Süperoksit Dismutaz
SR	:	Sarkoplazmik Retikulum
TBA	:	Tiyobarbitürik Asit
TBARS	:	Tiyobarbitürik Asit Reaktif Ürünleri
TEM	:	Geçirimli Elektron Mikroskobu
TGF	:	Transforme Edici Büyüme Faktörü
TS	:	Toe Spread
TSF	:	Toe Spread Factor

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil		Sayfa
1. 1.	Periferik Sinir Mikroanatomisi (Enine Kesit)	2
2. 1.	Nervus Ischiadicus Seyri	7
2. 2.	Ozon Oluşumunun Kimyasal Formülü	12
2. 3.	Doymamış Yağ Asitlerinin Oksidasyonu	19
2. 4.	Medikal Ozon Uygulama Sonrası Ortaya Çıkan Temel Biyolojik Etkiler	20
3. 1.	Siyatik Sinirin Kesisi ve Dikimi	25
3. 2. 1.	Ozon Hazırlanmasında Kullanılan Herrman Model Ozon Jeneratörü	26
3. 2. 2.	Enjektörün Ozon Jeneratöründe Yerleştirildiği Yer ve Ozon Konsantrasyon ve Hacminin Ayarlandığı Kısım	26
3. 3.	Siyatik Fonksiyon İndeksini Elde Etmek İçin Yapılan Yürüme Analiz Testi Değerlendirmede Kullandığımız ve Hazırladığımız Düzenek	28
3. 4.	Sıçan Ayak İzleri Kullanılarak Elde Edilen Ölçümler	29
3. 5. 1.	BIOPAC Systems, MP 150 Model EMG Cihazı ve Linear İsolated Stimülatör Stimilosa	30
3. 5. 2.	Alınan Sinyallerin Elektronik Ortama Aktarılması İçin Kurulan Düzenek	30
3. 5. 3.	İğne Elektrotların Sırasıyla (A,B,C,D) Subkutan Yerleştirilme Aşaması.	31
3. 5. 4.	ACQ Knowledge 4.1 Programı İle EMG Analizi	32
3. 6.	Glutasyon Peroksidaz Enzim Aktivitesinin Tayin Yöntemi	34
3. 7.	SOD Enzim Aktivitesinin Tayin Yöntemi	34
3. 8.	Katalaz Enzim Aktivitesinin Tayin Yöntemi	35
4. 1. 1.	Kontrol Grubuna Ait Siyatik Sinirden Alınmış Yarı-İnce Plastik Kesit Mikrografi	38
4. 1. 2.	Kontrol Grubuna Ait Siyatik Sinir Elektronmikrografi	39
4. 2. 1.	Sham Grubuna Ait Siyatik Sinir Örneğinden Alınan Yarı İnce Kesitin Genel Görünümü	39
4. 2. 2.	Sham Grubuna Ait Siyatik Sinir Elektron Mikrografi	40
4. 3. 1.	Grup 1 Deneklerinden Elde Edilen Plastik Yarı İnce Kesit Işık M krografları	41
4. 3. 2.	Grup 1 Siyatik Sinir Elektron Mikrografları	41
4. 4. 1.	Grup 2 Plastik Yarı İnce Kesit Işık Mikrografi	42
4. 4. 2.	Grup 2 Örneklerine Ait Elektron Mikrografları	42
4. 5. 1.	Kontrol Grubu EMG Kayıt Örnekleri Karşılaştırılması	52
4. 5. 2.	Sham Grubu EMG Kayıt Örnekleri Karşılaştırılması	53
4. 5. 3.	Grup 1 EMG Kayıt Örneklerinin Karşılaştırılması	54
4. 5. 4.	Grup 2 EMG Kayıt Örneklerinin Karşılaştırılması	55

TABLULAR DİZİNİ

Tablo		Sayfa
3. 1. 1.	Rat Gruplarının Sayısal Dağılımı	23
3. 1.2.	Rat Sayılarının Gruplara Göre Grafiği	24
4. 1.	Gruplar Arası Gpx Aktivitesi Değerlendirilmesi	43
4. 2. 1.	Gruplar Arası Doku CAT Aktivitesi Değerlendirilmesi	43
4. 2. 2.	Gruplar Arası Doku CAT Aktivitesinin İstatiksel Analizi	44
4. 3. 1.	Gruplar Arası Plazma CAT Aktivitesi Değerlendirilmesi	44
4. 3. 2.	Gruplar Arası Plazma CAT Aktivitesinin İstatiksel Analizi	45
4. 4. 1.	Gruplar Arası Plazma SOD Aktivitesi Değerlendirilmesi	45
4. 4. 2.	Gruplar Arası Plazma SOD Aktivitesinin İstatiksel Analizi	45
4. 5. 1.	Gruplar Arası Doku SOD Aktivitesinin Değerlendirilmesi	46
4. 5. 2.	Gruplar Arası Doku SOD Aktivitesinin İstatiksel Analizi	46
4. 5. 3.	Gruplar Arası Mean ve Standart Deviasyonları (Doku SOD)	46
4. 6. 1.	Gruplar Arası Plazma TBARS Düzeyleri Değerlendirilmesi	47
4. 6. 2.	Gruplar Arası Plazma TBARS Düzeyleri İstatiksel Analizi	47
4. 7. 1.	Gruplar Arası Doku TBARS Düzeyleri Değerlendirilmesi	48
4. 7. 2.	Gruplar Arası Doku TBARS Düzeyleri İstatiksel Analizi	48
4. 7. 3.	Gruplar Arası Doku TBARS Düzeyleri Ortalamaları	48
4. 8. 1.	Grade 2 Geri Çekme Refleksi İle Cevap Veren Rat Sayıları	49
4. 8. 2.	Grade 3 Geri Çekme Refleksi İle Cevap Veren Rat Sayıları	49
4. 9. 1.	Motor Fonksiyon Verilerinin Grafiği	50
4. 10.	Gruplar Arasında P-P, P Max, P Min Değerlerinin Karşılaştırılması.	51
4. 11.	Kontrol Grubu İçinde Ortalama P Max, P Min ve P-P Değerlerinin Karşılaştırılması	52
4. 12.	Sham Grubu İçinde Ortalama P Max, P Min ve P-P Değerlerinin Karşılaştırılması	53
4. 13.	Grup 1 İçinde Ortalama P Max, P Min ve P-P Değerlerinin Karşılaştırılması.	55
4. 14.	Grup 2 İçinde Ortalama P Max, P Min ve P-P Değerlerinin Karşılaştırılması	56

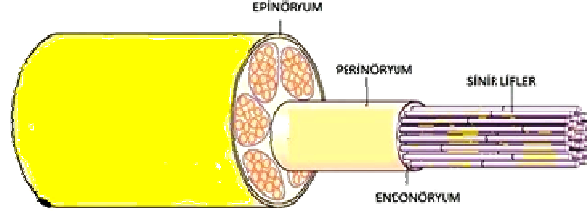
GİRİŞ VE AMAÇ

Periferik sinir sistemi, santral sinir sistemi ile periferik hedef organlar arasında çift yönlü uyarı iletimini sağlayan, bu sayede motor, duyu ve otonomik fonksiyonlarının düzenlenmesinde önemli rol oynayan bir sistemdir. Merkezi sinir sistemini oluşturan beyin ve omurilik dışında kalan sinir sistemi yapıları (sinirler, sinir ağları, ganglionlar) periferik sinir sistemi (systemo nervosum periphericum - PSS) kapsamında ele alınırlar. Ganglionlar, periferde bulunan sinir hücre gövdesi topluluklarıdır. Bir periferik sinir, tek tip liften (sensitif veya motor) oluşabildiği gibi mixt'te olabilir. Periferden aldığı izlenimleri (ağrı, ısı, ışık, ses vb.) merkezi sinir sistemine taşıyan sinirlere duysal sinirler (n. sensorius), merkezi sinir sisteminden aldığı emirleri periferdeki efektör yapılara (kas, bez vb.) taşıyan aktivatör sinirlere motor sinirler (n. motorius, somatomotor veya visseromotor), ortak olarak motor ve duysal liflerden oluşmuş sinirlere ise karma sinir (n. mixtus) denir. PSS dokusu; nöronlar, nöronların uzantıları sinir sisteminin savunmasını sağlayan hücrelerden oluşur. [1].

Embriyolojik olarak periferik sinirler ektoderm tabakasından gelişir. Gestasyonun üçüncü ve dördüncü haftalarında nöral krest hücreleri nöroektoderm'i oluşturur ve bu yapı mezoderm içine göç eder. Burada dorsal kök gangliyonlarına, schwann hücrelerine ve diğer nöroblastik hücrelere dönüşürler. Medulla spinalis (omurilik) geliştikçe, bazal plaktaki motor nöron aksonları mezodermal tabakadan gelişen kas dokusu içine dağılırlar. Dorsal kök gangliyonlarından da periferde doğru dağılım başlar. Fötal yaşamın yaklaşık dördüncü ayında, schwann hücreleri bu dağılan axonların miyelinizasyonuna başlarlar. Bazı motor nöronlarda ise bu miyelinizasyon süreci doğum sonrası birinci yıla kadar uzayabilir [2]. Bir periferik sinir ; duysal, motor ve sempatik liflerden oluşur. Bu lifler dorsal kök gangliyonlarında, anterior motor boynuzda ve sempatik ganglionlarda yerleşmiş sinir hücre gövdelerinin uzantılarıdır. Bu lifler elektriksel ileti taşıyan aksonlardan oluşur. Aksonlar, schwann hücreleri ile desteklenir. Miyelinli veya miyelinsiz yapıda olabilirler. Miyelinli sinirlerde miyelin tabakası schwann hücreleri tarafından yapılır. Miyelinli aksonlarda, miyelinli bölümler arasında ranvier boğumları vardır. Bu elektriksel iletinin akson boyunca akselerasyonunu sağlar. Bir sinirin miyelinizasyon miktarı onun ileti hızına da etki eder. Kalın miyelinli liflerde ileti hızı, ince liflere oranla daha fazladır. Akson içeriği aksoplazma olarak adlandırılır. Bu oluşum, akson'un yapısal bütünlüğünün korunmasında etkilidir ve akson boyunca iletide faydalıdır [3].

Sinir lifi endonöryum ile sarılıdır [Şekil 1.1.] ve endonöral boşlukta kapiller ağ uzanır. Buradaki kapiller endotel hücreler, difüzyona ve kritik önem taşıyan proteinlerin ve kimyasalların geçişine izin veren kan-sinir bariyeri görevi görür [4]. Bir grup sinir lifi bir araya gelip sinir fasiküllerini oluşturur [5]. Perinöryum, her bir sinir fasikülünü saran kılıftır. Zar yapısı ortalama on tabaka halinde katmanlanmış,

düzleşmiş hücrelerden oluşmuştur. Kan-beyin bariyerinin devamı gibi işlev görür. Difüzyonu düzenler ve interfasiküler basıncın oluşumunda etkilidir [7]. Dış epinöryum, fasikülleri grup halinde saran en dış kılıftır. Buradan grup fasiküllerin arasına giren ve fasikülleri içeriden saran uzantıları interfasiküler epinöryumu oluşturur. Periferik sinirden kesit alındığında, sinir fasikülü, epinöryum oranı sinirden sinire, kişiden kişiye ve aynı sinirde geçtiği anatomik yerlere göre değişiklik gösterir [6]. Periferik sinirler, kan akımı bakımından zengindir [8].



Şekil 1.1. Periferik sinir mikroanatomi (enine kesit) [220].

Endonöryum içinde lenfatikler yoktur. Longitudinal vasküler plexuslar arasında bağlantılar vardır ve bağlantıların varlığının avantajı, sinirin yatağından mobilizasyonuna toleransı artırır [9]. Periferik sinirlerin çoğu bölgesinde benzer görevdeki fasiküller kalınlaşmış iç endonöryum ile ayrıca sarılarak grup haline gelmiştir. Fasiküler gruplar arasında bağlantılar sık değildir ancak grup içindeki fasiküller arasında sinir bağlantı ağı mevcuttur [10,11].

Son yıllarda, periferik sinir rejenerasyonu üzerine yapılan tüm çalışmalara rağmen, sinir hasarı sonrasında halen istenilen boyutlarda sinir iyileşmesi elde edilememektedir. Bu nedenle periferik sinir yaralanmaları üzerine sürekli klinik ve deneysel olarak yeni çalışmalar denetlenmektedir. Uyguladığımız tedavi şekli ile orta düzeyde (35-40 µg/ml) ozon konsantrasyonu ve 5 ml ozon dozunun sıçan periferik sinirinin yapı ve fonksiyonu üzerindeki etkisi, kesilen sinirin tedavi sonrası rejenerasyon yeteneği ve ozonun plazma antioksidan sistem üzerine olan aktivasyonunu görmeyi planlıyoruz. Bu noktada periferik sinirle ilişkili hastalıklarda ozonoterapinin güvenilirliğini tanımlamak, ultrastrüktürel, biyokimyasal elektrofizyolojik ve işlevsel açıdan siyatik sinir yapısı üzerine anlamlı etkisini değerlendirmek temel amacımızdır. Biyokimyasal açıdan intraperitoneal yöntemin tedavi edici etkilerine aracılık eden en önemli süreçlerden bir tanesi antioksidan enzim sisteminin aktivasyonudur. Antioksidan özelliği olan bu moleküllerin ozon aracılığı ile oksitlenmesi, kan plazmasının redoks dengesini değiştirerek antioksidan ve antiinflamatuvar sistemi harekete geçirmesini sağlar. Etki çalışmaları yapılmış çeşitli uygulamalar arasında yer alan elektrofizyolojik testler de periferik sinir rejenerasyonunu değerlendirmede sıkça kullanılanlardır. Klinik yönden EMG (elektromiyografi) bulgularının sinir liflerinin fonksiyonları hakkında bilgi verdiği sonuçlar, akılda tutulması gereken önemli bir noktadır. Tedavi sonrası gruplar arası karşılaştırmada sinir rejenerasyonunun hangi grupta daha hızlı olduğunu EMG bulgularıyla göstermek bir diğer amacımızdır. Ultrastrüktürel olarak schwann hücreleri sinir rejenerasyonunda anahtar rol oynayan hücrelerdir. Tedavi uyguladığımız grupta görmeyi beklediğimiz sonuçlardan biri de schwann hücresi sayısında bir artış olması veya çeşitli nörotrofik faktörlerin sekresyonu ile rejenerasyona destek sağlamasıdır.

GENEL BİLGİLER

2.1. Periferik Sinir Anatomisi

İnsanda sinir sistemi en az 10 milyar sinir hücresi içerir [12,13]. Sinir dokusu, entegre bir iletişim ağı halinde vücuda dağılmıştır. Yapısal olarak sinir dokusu iki hücre tipi içerir. Bunlar; çevreden gelen uyarıları sinir impulslarına çevirmek ve iletmek üzere farklılaşan sinir hücreleri (nöronlar) ile bu hücelere mekanik ve metabolik olarak destek olan bağ dokusu hücrelerinin (nörogliya hücreleri) oluşturduğu sinir dokusuna özel bir destek dokusundan (glial doku) meydana gelmiştir. Sinir dokusu sinir sistemini oluştururken, bu sistemin farklı fonksiyonel bölümlerine göre bazı morfolojik farklılıklar gösterir. Sinir sistemi anatomik olarak, beyin ve spinal korttan oluşan santral sinir sistemi ve periferik sinir sistemi olmak üzere ikiye ayrılır [12,14,15]. Periferik sinir sistemi merkezi organlar ile organizmanın en uzak noktasındaki yapılara kadar tüm bölgelerini birbirine bağlayan sinir sistemi bölümüdür. Periferik sinirler ve bunların yolları üzerinde bulunan ganglionlar ile reseptörlerden oluşmuştur. Verileri taşıyacak şekilde dizayn edilmiş olup sempatik ve otonomik yollarla çevresel değişiklikleri yönlendirir. Periferik sinirler; nöronlar, destek bağ dokusu, hücresel yapılar ve hedef organlardan oluşan kompleks bir yapıdır [16,17].

Nöronlar birbirleri ile dendrit denilen sitoplazmik uzantılar ile temas kurarken, her nöron periferde genelde tek bir akson gönderir. Bir periferik sinir, boyutuna göre bir veya daha fazla sinir lifi içerebilmektedir. Periferik sinirin lifleri endonöryum denilen, schwann hücresi ve retiküler kollajen ağlardan oluşan yapı ile sarılıdır. Sinir liflerinin bir araya gelmesi ile fasikül oluşur ve perinöryum ile sarılıdır. Fasiküllerin bir araya gelmesi ile ise periferik sinir oluşur ve epinöryum tarafından kuşatılır. Periferik sinirlerde miyelinli ve miyelinli aksonlar bulunmaktadır. Miyelin, periferik sinir sisteminde schwann hücrelerinin akson etrafında sirküler tarzda defalarca dolanması ile meydana gelir. Myelinli liflerde 1-2 mm aralıklarla ranvier düğümleri bulunmaktadır. Bu sayede myelinli lifler çıplak liflere oranla yaklaşık 8 kat daha hızlı saltatuar (sıçrayıcı) iletim yapabilmektedir [16,17].

Periferik sinirler, omurilik ön boynuzdaki motor nöronların, dorsal ganglionlardaki duyuusal nöronların ve sempatik ganglionlardaki sempatik nöronların destek bağ dokusu ile çevrili aksonal uzantılarından oluşan ve sonlandıkları hedef organa göre motor, duyu ya da otonomik fonksiyonları olan yapılardır [21,22]. Periferik sinir yaralanmaları, akut penetran travmalardan kronik kompresyon nöropatileri, doğum travması gibi iatrojenik nedenlere uzanan çok geniş bir spektrumda karşımıza çıkabilirler [21,23].

2.2. Periferik Sinir Hasarı ve Rejenereasyonu

Periferik sinir yaralanmalarında birtakım yapısal ve işlevsel değişiklikler ortaya çıkar. Optimal cerrahi onarıma rağmen duyu ve motor fonksiyon zayıflar [24,25].

Periferik sinir hasarlarının neden olduğu bu yetersizlik yaralanmanın tipi, onarım metodu [25], yaralanmanın medulla spinalis'ten uzaklığı [26] ile yakından ilişkilidir. Yaralanmanın etyolojik nedeninden bağımsız olarak, sinir dokusunda iyileşmenin tam olmaması veya sinirin uygun olmayan rejenerasyonu, sıklıkla fonksiyonel kayıp ve ağrı ile sonuçlanır [22,27,28].

Periferik sinir lezyonları Seddon ve Sunderland tarafından değişik şekillerde sınıflandırılmıştır. Seddon'un sınıflamasına göre periferik sinir lezyonları nöropraksi, aksonotmezis ve nörotmezis olarak üç başlıkta incelenmektedir [219]. Nöroprakside, sinir liflerinin tümünde veya çoğunda anatomik bütünlük korunmuştur. En hafif sinir hasarına nöropraksi denir. Nöroprakside aksonun devamlılığı bozulmamışken, siniri kaplayan miyelin kılıfı hasar gördüğünden sinir iletisi bozulur. Sinir iletisi sinirin hasar gördüğü kısımda yokken, sinirin distal ve proksimal kısımlarında normaldir. Hasar gören kısmın distalinde motor ve duyu kaybı söz konusudur [18, 219]. Aksonotmezisde, travmaya uğrayan sinir lifleri aksonlarında Wallerian dejenerasyon vardır. Aksonda ve bunu kaplayan miyelin kılıfında devamlılık nispeten bozulmuştur. Endonöryum sağlamdır. Lezyon bölgesi altında motor, duysal ve otonomik tüm fonksiyonlar kaybolmuştur. Dış doku desteğinin sağlam olması aksonda rejenerasyonu kolaylaştırır ve cerrahi girişime gerek kalmadan iyi bir iyileşme gerçekleşir. Nörotmezisde, sinir aksonları ile kılıfın da kesilmiş olduğu durumlar söz konusudur. Hem akson, hem de bunu çevreleyen yumuşak dokunun devamlılığı bozulmuştur. Diğer bir deyimle sinirde tam bir kopma söz konusudur. Klinik başlangıçta, aksonotmezise benzer ancak kılıf da kesilmiş olduğu için proksimalden rejenerasyon söz konusu değildir. Distalde sinir iyileşirse de sinirde devamlılığı sağlamak için cerrahi onarım gerekir. [217].

Sunderland sınıflaması sinir hasarını 5 grupta toplar. Birince derece yaralanma Seddon sınıflamasındaki nöropraksiye eşittir. Miyelin zararı vardır, prognozunda haftalar, aylar içinde mükemmel düzelme görülür. İkinci derece yaralanma Seddon sınıflamasındaki aksonotmezise eşittir. Sunderland ikinci derece hasarda; akson kaybı izlenir, endonöral tüpler, perinöryum, epinöryum sağlamdır. Kasa olan mesafeye bağlı olarak iyi prognoz görülür. Üçüncü derece yaralanmada endonöryumda hasar vardır, ancak epinöryum ve perinöryum sağlamdır. Kendiliğinden iyileşme mümkündür, ancak bazen cerrahi girişim gerekebilir. Dördüncü derece hasarda; akson kaybı, endonöral tüp ve perinöryum hasarı görülürken epinöryum sağlamdır. Kötü prognoz görülür, aksonlar hatalı yöne gidebilir ve cerrahi girişim gerekir. Seddon'da Nörotmezis'e karşılık Sunderland beşinci derece yaralanmada; sinire ait tüm katmanlar kopmuştur, akson kaybı görülür, endonöral tüp, perinöryum ve epinöryum ağır hasarı vardır. Cerrahi girişim şarttır ve prognoz cerrahiden sonra belirlenir [218].

Periferik sinir hasarı farklı şiddetlerde gerçekleşebilmektedir [29,30]. Travmada, aksonal yaralanmayı takiben sinir hücresinde meydana gelen değişiklikler 'kromatoliz' olarak tanımlanmaktadır [31]. Bu değişiklikler sinir kesisini takiben 1 ile 3 hafta arasında oluşmaktadır ve periferik nöronlarda ölüm olmadığı ve denervasyonun yaralanma sonrası ilk 5 hafta içerisinde olduğu bildirilmektedir [43]. Takip eden süreçte hücre gövdesinde oluşan tipik yanıt, hücre hacminin artması, hücre çekirdeğinin perifere doğru yer değiştirmesi ve sitoplazmadaki bazofilik

materyalin ortadan kalkmasıdır. Protein sentezinin hücre içerisinde arttığını gösteren bu bulgu, RNA konsantrasyonunun artışına bağlıdır. Hücrede nükleik asitlerin ve lipidlerin sentezi için gerekli olan glikoz-6-fosfat dehidrogenaz enzim aktivitesinde de artış gözlenir ve protein sentezindeki artış, iyileşme ve rejenerasyona hazırlık yönünde olmaktadır. Yine nörofilaman ve mikrotübüler yapıdaki proteinlerin, aktin, tubulin ve peripherin'in sentezi artarken; transport fonksiyonu için gerekli proteinlerin sentezi azalmaktadır. Travmaya bağlı meydana gelen reaksiyonun şiddeti, lezyonun yerleşim yerine ve tipine göre farklılık göstermektedir [31]. Gelişen süreç yapısal ve fonksiyonel bütünlük kaybı ile karakterizedir. Makrofajlar bu alandaki akson ve miyelin kılıfı fagosite ederler. Nörofilamentöz yapılar ve mikrotübüller gibi hücre iskeletini oluşturan yapılar granüler ve amorf yapılar haline dönüşürler [32]. Aksonlar içerisinde artan Ca^{+2} konsantrasyonunun, dejenerasyon sürecini başlatan mekanizma olduğu düşünülmektedir. Normalde akson ile endonöral ortam arasındaki kalsiyum konsantrasyonu farkı, aktif kalsiyum pompası sayesinde dengede tutulmaktadır ve hücre içindeki düşük kalsiyum seviyesi korunmaktadır. Yaralanma sonrası bu bölgede gerçekleşen kimyasal ve hücrel reaksiyonlar, sinir rejenerasyonunun kalitesi açısından çok önemlidir. Bu alanda kan hücreleri ve makrofajları içeren eksuda, aralığı doldurarak fibrin pıhtı oluşumunu sağlamaktadır [32]. Daha sonra kapillerlerin ve epinöral kökenli fibroblastların bu aralığa migrasyonu gözlenir ve burada rol alan fibroblastların proliferasyon olmaları oldukça uzun zaman alır, kollajen depolanması proliferasyon fibroblast ve schwann hücreleri tarafından gerçekleştirilmektedir. Cajal 1905 yılında, distal sinir segmentindeki bazı maddelerin rejenerasyon olan sinir liflerini kendilerine yönlendirdiğini gözlemlemiştir. Bu olay **nörotropizm** olarak adlandırılır sorumlu olan faktörler hücrel adezyon molekülleri olarak adlandırılan bir takım molekülleridir [33].

Sinir hücrelerinin gövdelerinde bazı hayati fonksiyonların sürdürülebilmesi ve sinir hasarı sonrasında oluşan dejenerasyon ve rejenerasyon süreci için hücrel iletişime ve bu iletişimde düzenleyici rolleri olan bu nörotrofik faktörlere ihtiyaç vardır [23,27,34]. Sinir rejenerasyonunu arttırmak amacıyla birçok ajan araştırılmaktadır. Periferik sinir cerrahisi, sinir devamlılığını restore etmek ve sinirin rejenerasyonu ve fonksiyonel düzelmeyi optimal düzeyde oluşturabilmek amacıyla yapılmalı ve planlanmalıdır. Çünkü rejenerasyonda iki anahtar faktör önemli rol oynar; devamlılık (rejenerasyonu teşvik etmek için bir rehber görevi görür) ve uygun diziliş (duyusal lifler uygun duyusal hedeflere, motor lifler uygun kaslara yönlendirilir) [23-35].

Sinir hasarını simüle etmek üzere çeşitli deney hayvanlarında farklı sinir hasarı modelleri oluşturulmuştur. Periferik sinir hasarları, uzun süre sıkışmanın oluşturduğu hasardan, termal, iskemik, kimyasal hasara ve travma sonucu meydana gelen akut yaralanmalara kadar değişken bir spektrumu içerir. Kesici alet yaralanmaları ve ateşli silah yaralanmaları sonucu sinir hasarı oluşturulabilir. Germe-traksiyon tarzı yaralanma, genellikle fraktür-dislokasyonu sonrası meydana getirilir [23]. Periferik sinirler, kollajen içeren endonöryumları sayesinde belli bir elastikiyete sahiptirler; ancak traksiyon kuvveti sinirin esneme kapasitesini aşarsa bu tip hasar meydana gelebilir ve devamlılık tamamen kaybolabilir. Bununla birlikte, çoğu yaralanmada devamlılığın genellikle korunduğu bildirilmiştir. Laserasyon tipi yaralanma sıklıkla bıçak benzeri penetran aletlerle oluşturulabilir. Bu tip yaralanmalarda tam bir kesi

olabilmesine rağmen, bazı sinir elemanlarının devamlılığı korunabilir [23,35]. Kompresyon tipi yaralanmalar ise tuzak nöropatileri, alçı sıkıştırması, kompartman sendromu gibi nedenlerle meydana gelebilir. Sinir devamlılığı korunmuş olmasına rağmen, hem duyu hem de motor kayıp oluşabilir. Patofizyolojisi tam açıklanamamıştır, ancak muhtemel mekanizma mekanik kompresyon ve bunun sonucunda oluşan iskemidir [23]. Herhangi bir ilacın periferik sinir içine veya yakınına enjeksiyonu geçici duyu kaybından paraliziye kadar değişen oranlarda sinir hasarı yapabilir. Şiddetli iskemik hasara uğramış sinirde, genellikle fonksiyonun kaybolabileceği ve tam bir iyileşmenin olmadığı kabul edilmektedir. Elektrik ve termal yaralanmaların tedavileri zordur ve prognozları kötüdür. Sinir hasarına ek olarak yumuşak doku hasarı da söz konusudur [27,34]. Periferik sinir hasarı oluşturmak için ezi [44, 45], kesi [46], termal hasar [47], nörotoksik maddeler [48, 49] ve iske mi [50] gibi modeller kullanılmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda bu modeller içerisinde en çok kullanılanları; siyatik sinirin tam kesisi ve ezisidir [51].

Periferik sinir sistemine ait ilk veriler Hippocrates'e (M.Ö. 460-370) kadar uzanmaktadır, fakat sinir kesilerinin duysal ve motor kayba yol açtığını ilk olarak bildiren Galen (M.S. 130-200) olmuştur [37]. Periferik sinirlerin dikilmesi ile ilgili ilk kayıtlar ise P. Aegineta (7. yy), William'a (13. yy) aittir [38]. Bir periferik sinir kesildiğinde, kesildiği yerde rejenerasyon için büyük çaba sarf etmektedir. Nöronların çoğu yaşamaya devam eder ve periferik sinir gövdesinin fizyolojisi rejenerasyona destek olur. Periferik sinirde iyileşme süreci, rejenere olmuş aksonların periferdeki hedef organlarla fonksiyonel bağlantı oluşturması ile sonlanır. Sinirin iyileşme düzeyi, bu olaylar dizisinde fonksiyonun geri kazanımı ve uygun bağlantıların sağlanması için ekstra selüler ve selüler nöronal elementlerin ortak etkilerine bağlıdır. Bu elementler: ekstra selüler matriks, nörotrofik ve nörotropik faktörlerdir [51].

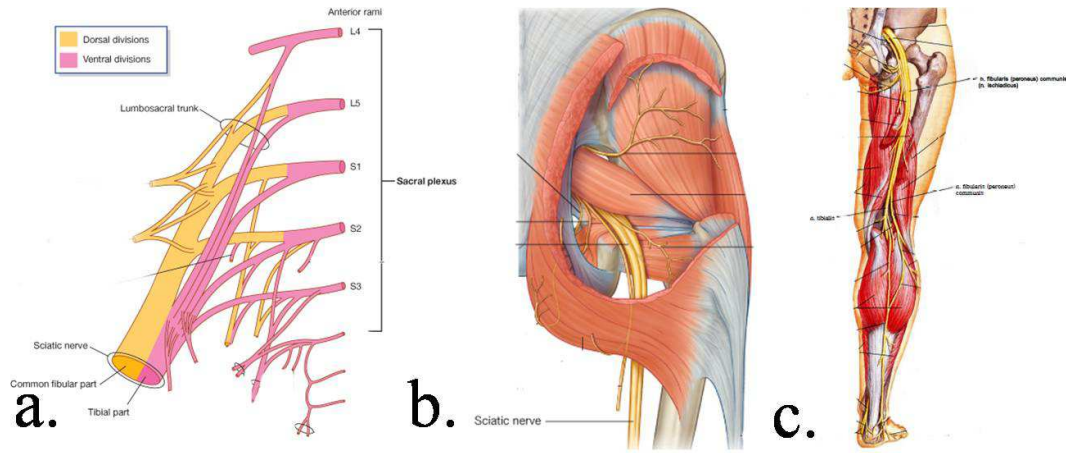
2.3. N. Ischiadicus Anatomisi

N. ischiadicus (L₄₋₅ - S₁₋₂₋₃) vücudumuzun en uzun ve en kalın siniri olup, S₄ hariç plexus sacralis'in oluşumuna katılan tüm sinirlerden lifler alır [Şekil 2.1.a.]. Pleksus sacralis L₄-L₅ ve S₁-S₃ spinal sinirlerin ventral dallarından şekillenir ve geniş olan radix superior ile daha küçük olan radix inferior'dan oluşur. Radix superior truncus lumbosacralis'i (L₄-L₅) içerir. Radix inferior ise S₁- S₃ spinal sinirlerden oluşur. Radix superior ve radix inferior siyatik siniri oluşturmak için m. piriformis'in alt kenarında birleşir [52] ve foramen ischiadicum majus' tan geçerek, trochanter major ve tuber ischiadicum arasından uyluğa doğru ilerler [53].

Foramen ischiadicum majus; alttan lig. sacrospinale, üstten os ilium, önden os ischii ve arkadan os sacrum tarafından sınırlandırılan pelvisin arka yan tarafında yer alan oval bir boşluktur. Bu foramen'den m. piriformis, n. ischiadicus, a.v. glutea superior, n. gluteus superior, n. pudendus ile m. quadratus femoris ve m. obturatorius internus'a giden sinirler gibi önemli yapılar geçer [54, 55].

N.ischiadicus, foramen ischiadicum majus' tan geçtikten sonra genellikle m. piriformis' in altından geçer [Şekil 2.1.b.]. ve aşağıya doğru ilerlerken m. gemellus superior' un posterior yüzü, m. obturatorius internus, m. gemellus inferior ve m. quadratus femoris ile komşuluk yapar. Ek olarak n.ischiadicus, seyri sırasında

medialde tuber ischiadicum ve hamstring grubu kasların başlama yerindeki tendonlarıyla yakın ilişki halindedir. N. ischiadicus'un lateral kenarı, m. biceps femoris'in caput longum' unun tendonu ve aşağıda m. semitendinosus'un r. muscularis'i ile yakın ilişkidir. N.ischiadicus uyluktaki seyri sırasında, lateralden m. biceps femoris; medialden m. semitendinosus tarafından oluşturulan fossada aşağı doğru ilerler [Şekil 2.1.c.]. [56-58]. N.ischiadicus; a. glutea inferior'un dalı a. comitans nervi ischiadici' den [59], dizin yakınında a. poplitea'nın birçok dalından, a. circumflexa femoris medialis ve lateralis ile a.glutea inferior' dan ayrılan nutrisyonel arterlerden beslenir [57]. N.ischiadicus, uyluğun arka tarafında ilerledikten sonra fossa popliteada veya fossa poplitea'nın üzerinde çeşitli seviyelerde n. tibialis ve n. fibularis communis dallarına ayrılır [Şekil 2.1.c.]. [60].



Şekil 2.1a-c. N.ischiadicus seyri **a.**Plexus Sacralis **b.**N.İschadicus (Regio Glutea) **c.**N.İschadicus (Regio Poplitea) [221,222].

N.ischiadicus regio poplitea' dan sonra truncus medialis n.tibialis; truncus lateralis ise n.fibularis communis olarak devam eder [18-20]. N.ischiadicus'un n. tibialis dalı, n. fibularis communis'e göre daha kalındır ve orta hatta paralel ve az oranda lateralde olarak ilerler. Aşağıda, m. gastrocnemius' un başları arasından geçer. N. fibularis communis, m. biceps femoris' in medial kenarını takip eder ve laterale doğru caput fibulae'ye gelir. Collum fibulae' yi dolanarak bacağın ön dış kısmında m. peroneus longus'a girer ve burada n. fibularis superficialis ve n. fibularis profundus dallarına ayrılır. N. tibialis ve n. fibularis communis; n. saphenus tarafından innerve edilen bacak ve ayağın anteromedial hariç dizin aşağısındaki tüm bacak ve ayağın innervasyonunu sağlar [61].

N.ischiadicus 1,5-2 cm genişliğinde, yassı bir şerit halinde olup, regio glutealite, m.gluteus maximus ile m.obturatorius internus ve m.quadratus femoris arasında aşağıya doğru iner. N.ischiadicus, m. piriformis'in aşağısında, gemellus, quadratus ve obturatorius internus kaslarının yukarısında kalan bir çanağın içerisinde yerleşiktir [62,63]. Regio glutealite hiçbir musküler yan dal vermez ve m.quadratus femoris'in alt kenarı hizasında, uyluk arka bölgesine girer. Uyluk arka bölgesinde, m.adductor magnus'un üzerinde uzanır ve yüzeyden m. biceps femoris'in caput longum'u tarafından çaprazlanır. N.ischiadicus, genellikle uyluğun 1/3 alt bölümünde, fossa poplitea'ya ulaşmadan önce iki terminal dalına (n. tibialis ve n.fibularis communis'e) ayrılır. Bazen, bu iki terminal dal, varyasyonel olarak

pelvis'te ayrılır; bu durumda genellikle n.fibularis communis bölümü, m.piriformis içinden veya üst tarafından geçerek regio glutealis'e girer. N.ischiadicus, uyluk arka bölgesindeki hamstring grubu kaslar ile bacak ve ayağın tüm kaslarına motor innervasyon; bacağın dışyan ve arka, ayağın tüm bölümlerindeki derinin ise sensitif innervasyonunu sağlar [64].

2.3.1. Nervus Ischiadicus'un Yan Dalları

a. Rami Articulares: N.ischiadicus'un proksimal bölümünden veya doğrudan plexus sacralisten çıkan bu dallar, art.coxae'nin kapsülünün arka bölümünden girerler [55,64].

b. Rami Musculares: Sinirin pars tibialis bölümünden, "hamstring kaslar" olarak da bilinen m.semitendinosus, m.semimembranosus ve caput longum m.bicipitis femoris ile m.adductor magnus'un hamstring bölümüne; pars fibularis / peronei communis bölümünden, caput breve m.bicipitis femoris'e giden musküler dallar çıkar [64]. Önce kalçanın derin katında, sonra uyluğun arka bölgesinde olmak üzere fossa poplitea'ya kadar ilerleyerek orada iki uç dala ayrılır. Foramen infrapiriformede a. glutea inferior, a., n. pudendalis'in dış yanındadır [55,64].

2.3.2. Nervus Ischiadicus'un Terminal Dalları

N.ischiadicus , trochanter major ve tuber ischiadicum' un arasından fossa poplitea' ya doğru ilerler [65]. N.ischiadicus'un n. tibialis ve n. fibularis communis dalları tek bir epinöral kılıf ile çevrilmiştir ve n.ischiadicus'un bu terminal dallarına ayrılması, fossa poplitea üzerinde veya fossa poplitea içinde farklı seviyelerde gerçekleşebilir [66].

a. Nervus Tibialis

Nervus tibialis, n.ischiadicus'un daha kalın olan uç dalı olup, fossa poplitea'nın iç yan bölümünde yer aldığı için, bazı anatomistler tarafından "medial popliteal sinir" olarak da adlandırılır. N. tibialis, plexus sakralis'in oluşumuna katılan L₄₋₅, S₁₋₂₋₃ spinal sinirlerin ön divüzyonlarından kaynak alan lifler tarafından oluşturulur [64-66].

b. Nervus Fibularis (Peroneus) Communis

Nervus fibularis communis, n.ischiadicus'un daha ince olan ve dış yanda yer alan terminal dalı olup, L₄₋₅ ve S₁₋₂ 'nin ön dallarının dorsal divüzyonlarından gelen lifler tarafından oluşturulur. N.fibularis communis, n.ischiadicus'tan ayrıldıktan sonra, fossa poplitea'da m.biceps femoris'in tendonunun iç yan kenarı boyunca oblik olarak aşağıya, dış yana doğru uzanır. M.gastrocnemius'un lateral başı ile m.biceps femoris tendonu arasından geçerek caput fibulae ve collum fibulae'yi dolanan sinir, m.peroneus longus'un derininde, n.fibularis profundus ve n.fibularis superficialis olarak adlandırılan uç dallarına ayrılır. N.peroneus communis'ten uç dallar ayrılmadan önce hiçbir musküler yan dal çıkmaz; sadece iki artiküler, iki tane de deri dalı çıkar [55,64-66].

2.4. Rat N. Ischiadicus Anatomisi

Ratlarda n. ischiadicus (siyatik sinir), L₅₋₆, S₁ sinir liflerinin birleşmesiyle oluşur. N. ischiadicus pelvis minörde os ischii ve os sacrum'un facies dorsalisleri arasındaki derin olukta ilerler. N. ischiadicus incisura'dan geçtikten sonra

m.piriformis'in facies ventralisinde ilerler. M. piriformis'in 1-2 mm kaudalinde m.quadratus femoris üzerinden oblik olarak regio cruris'e girer. M. piriformis seviyesinde, küçük bir dal vererek, m. biceps femoris, m. semitendinosus ve m. semimembranosus'u innerve eder. Sonra art. genu'nun yaklaşık 5 mm kranialinde n. fibularis ve n. tibialis posterior denilen 2 ana dala ayrılır [70,71].

N.ischiadicus, plexus sacralis'ten ayrılıp pelvis minör içerisinde ilerleyerek, incisura ischiadica'dan geçer ve femur'un posterioruna girer. Pelvis içerisinde n.ischiadicus 2 ana komponentten oluşur. Anterior (ventral) ve posterior (dorsal) komponentler distalde birleşip n.peronealis ve n.tibialis'in ayrıldığı noktadan yukarıya doğru, incisura ischiadica'ya kadar disseke edilebilir. N.ischiadicus'un truncus anterior'u; n. tibialis ve m. quadratus femoris, Mm. gemelli, m. obturator internus'a giden kaslar dallardan oluşur. Truncus posterior'u ise n. peroneus communis ve m.biceps femoris caput anterior, m. piriformis, m. gluteus superior ve m. gluteus inferior'a giden kaslar dallardan oluşur. N.peroneus communis trochanter major seviyesinde n.suralis dalını verir. Bu crus'un arka distal lateral kısmına, pedis'in ve digiti minimi'nin lateral kısmına kutanöz dallar verir. Daha sonra n.peroneus communis yüzeysel ve derin olmak üzere iki dala ayrılır. N. peroneus superficialis, ayağın dorsal yüzeyini, hallux'un medialini, 2.,3.,4. dorsal interdigital bölgenin duyusunu alır. N. peroneus profundus ise pedis'in dorsalinde 1. interdigital bölgenin duyusunu alır. N.tibialis, n.plantaris medialis ve lateralis ile pedis'in plantar yüzeyi, digiti minimi'nin laterali, hallux'un plantar yüzü ve 1.,2.,3.,4. interdigital bölgenin sensitif duyusunu alır [72].

2.5. EMG Nedir?

Elektromiyografi (EMG), elektro (elektriksel), nöro (sinir), miyo (kas) ve grafi (yazı) sözcüklerinden oluşan bir kısaltma olup, sinirler ve kasların elektriksel sinyallerinin yazdırılması anlamını taşır. EMG, uygulandığı sinirlerin ve kasların elektriksel yöntemlerle incelendiği bir laboratuvar tanı yöntemidir. EMG çevresel sinirleri etkileyen hastalıklarda tanı koymak, tanıyı doğrulamak, çevresel sinirlerde ortaya çıkan işlev bozukluklarını ya da yapısal hasarların şiddetini belirlemek, hastalık sürecini izlemek ve uygulanan tedavinin etkisini değerlendirmek için başvurulan bir inceleme yöntemidir. Bir EMG incelemesinde hastaya farklı testler uygulanabilir. En çok uygulanan testler 'sinir ileti çalışmaları' ve 'iğne elektromiyografisi' testleridir [73,74].

2.5.1.EMG ve Sinir İleti İncelemeleri

EMG incelemesi sırasında, duyu ve motor sinirlerde ileti çalışmaları ayrı ayrı yapılır. Bu yöntemlerde genel olarak, deri üzerinden uyarıcı elektrotlarla sinirlerin belirli noktalarına verilen elektrik uyarıları, bu sinirlerde aksiyon potansiyeli adı verilen ve sinir lifleri boyunca iletilen biyolojik bir sinyal ortaya çıkarır. Bu sinyal belirli bir uzaklıktan sonra yine sinir üzerindeki deri üzerine yerleştirilen kayıt elektrotları ile kaydedilir. Sinir ileti incelemelerinde ana prensip sinir yolunun bir noktasından yüzeysel veya iğne ile elektrik akımı verilerek uyarının sonlandığı noktadaki sinirin diğer bir noktasından uyarının iletim özelliklerinin kayıt elektrotları ile kaydedilerek değerlendirilmesidir. Bunun için sinirin üzerindeki bölgelere düşük şiddette elektrik akımı uygulanır ve sinirin veya derinin başka bir yerinden bu akım, kayıt elektrodu ile kayıt cihazında toplanarak ilgili parametreler

ölçülüp yorumlanır. Böylece sinirin sağlıklı fonksiyon yapıp yapmadığı anlaşılır [73,74].

2.5.2. EMG İşaretinin Ölçülmesinin Temelleri

EMG işaretleri, yüzey elektrotları ve iğne elektrotlar olmak üzere iki tip elektrot aracılığıyla ölçülmektedir. Bunlardan yüzey elektrotları ile yapılan ölçümlerde, geniş bir alandaki elektriksel aktivite ile ilgili bilgi edinilmektedir. Bir motor ünitesinin veya üniteler grubunun incelenmesinde, elektrotların bilgi topladıkları alttaki alan çok geniş olabilir. Ayrıca, yüzeydeki kasların faaliyetinin alttaki kaslardan gelen bilgiyi maskeleymesi sebebiyle yüzey elektrotlarını yalnız yüzeydeki kasların incelenmesinde kullanmak gerekmektedir. Yüzey elektrodunun uygulanması çabuk ve basittir ve rahatsızlık verme oranı en azdır. Ama sadece yüzeysel kaslar için kullanılır, yan sesten etkilenebilir, standart elektrot yerleşimi yoktur, deneğin hareket kabiliyetini engelleyebilir ve dinamik kassal aktiviteleri kayıt etmede sınırlılıklar vardır [76-79].

Kaslardaki sorunların tanısı için EMG incelemesinde iğne elektrotları kullanılır. Bu yüzden iğne EMG'si olarak da adlandırılır. İğne elektrotlarla yapılan EMG incelemesinde herhangi bir elektriksel uyarı verilmez. Yalnız kaslarda normal veya anormal elektriksel aktivitenin kaydedilmesi için kullanılır. Genellikle konsantrik iğneler kullanılır. Bu iğneler bilinen enjektör iğnelerinin içine çok ince bir tel konulması ile kayıt elektrodu hâline getirilmiştir. Aşırı derecede duyarlıdır, tek bir kasın kasılma sinyallerini kaydeder, derin kaslara ulaşabilir, yan ses ihtimali vardır ama yeniden yerleştirme zaman alabilir ve ölçülen bölge tüm kası temsil etmeyebilir [76-79].

2.5.3. EMG İncelemesinde Kullanılan Yöntemler

Duyusal aksiyon potansiyelleri (boyut, genlik, ileti hızı, ileti zamanı), duyusal sinir lifleri, birleşik kas aksiyon potansiyeli , kas yanıtı (boyut, ileti hızı, ileti zamanı) motor sinirler, refleks ve geç yanıt, periferik sinir proksimal bölümleri, duyu yolları, iğne EMG fibrillasyon, motor ünite aksiyon potansiyeli (MÜAP) kastaki nörojenik ve miyojenik değişikliklerdir [75].

2.5.4. EMG İle Tespit Edilen Kimyasal ve Mekanik Olaylar

Kasların kasılması sırasında biyopotansiyel işaretler oluşur. Bu biyopotansiyel işaretlere, vücuttaki çeşitli elektrokimyasal olaylar sebep olur. İstemli kas hareketleri, beyinde oluşturulan elektriksel uyarıların sinirler vasıtasıyla kaslara iletilmesi sonucunda meydana gelir. Kas liflerinin kasılmalarına sinirlerden gelen elektriksel uyarılar sebep olduğu gibi, kasların kasılması da yine elektriksel bir işaretin ortaya çıkmasına sebep olur. Ortaya çıkan bu işaret, elektromiyogram cihazına bağlı elektrotlar aracılığıyla ölçülür. Kasların kasılması, sinirler aracılığıyla beyinden iletilmiş olan uyarıcı potansiyellerin kaslarda oluşturduğu motor ünite aksiyon potansiyeli (MÜAP) olarak bilinen elektriksel potansiyeller sayesinde olur. Bir motor sinir, birçok kas fibriline bağlanır ve bağlandığı kas fibrilini sinirle donatır. Bir motor sinir hücresi ve tüm kas fibrilleri birlikte motor üniteyi oluşturur. Motor nöron ile kas fibrili arasında bulunan sinaps, sinir-kas kavşağı olarak adlandırılır. Burası sinir ve kas sistemi arasındaki iletişimin meydana geldiği yerdir. Sinir iletilerinin sinir uçlarına vardığı yerler, '**sarkolemmaya yakın olarak yerleşen akson terminalleri**'

olarak adlandırılır. Sinir ileti bu bölgeye vardığında, bu sinir uçları tarafından bir nörotransmitter olan asetilkolin (ACh) salgılanır. Salgılanan bu ACh'ler sarkolemma üzerinde bulunan reseptörlere tutunur. Eğer yeterli sayıda ACh reseptörlere tutunursa kas hücresi zarlarında bulunan iyon kapıları açılır. Sodyumların içeri girmesi sonucu da elektriksel ileti başlamış olur. Bu süreç depolarizasyon olarak adlandırılır ve aksiyon potansiyelinin başlamasıyla sonuçlanır. Depolarizasyon süresince kalsiyum iyonları (Ca^{2+}), SR'den salgılanır ve miyofilamentlere doğru kas kasılmasını başlatmak üzere hareket eder. Depolarizasyon sırasında iyonların hareketleri elektrot aracılığıyla tespit edilebilen elektromanyetik bir alan oluşturur. Zar potansiyelindeki değişiklikler, -70mV'luk dinlenim zar potansiyeli değerinden +30mV değerine kadar gider ve hızla dinlenim değerine geri döner [80].

Oluşan bu elektriksel akımın bir bölümü de deriye yayılır. MÜAP sonucu deriye yayılan bu elektriksel potansiyeller elektrotlarla ölçülebilir [81]. Birden çok kas lifi eş zamanlı kasılırsa deride elektrik potansiyellerinin summasyonu çok büyük değerlere yükselebilir. Kasılmanın miktarı MÜAP'ların sayısının ve sıklığının artması ile artar. Kasların kasılı olduğu veya olmadığı durumlarda MÜAP'ların incelenmesi, şeklinin ya da sıklığının normal sınırlar içinde olup olmaması veya normalde karşılaşılmayan elektriksel aktivitelere rastlanması kaslardaki sorunları belirlemek için incelenen değişkenlerdir [80,82-84].

Kas kasılması Ca^{+2} salınımı bitene kadar devam eder. Kas stimülasyonu Ca^{+2} salınımını durdurduğu zaman troponin, aktin ve miyozin etkileşimini durdurur. Daha sonra yeni bir sinir ileti kas fibril zarına ulaşana kadar Ca^{+2} depolandığı yer olan sarkoplazmik retikulum'a aktif kalsiyum salgılama sistemi ile geri pompalanır [80]. Deaktivasyon iki amaca hizmet eder: İlki miyozin çapraz köprüleriyle, aktin filamentler arasındaki mekaniksel iletiyi engellemesi, ikincisi ise ATP parçalanmasında rol alan miyozin ATPaz aktivitesini engeller. Kasın gevşeme durumu, aktin ve miyozin filamentlerinin orjinal durumlarına geri dönmesi sonucu oluşur [85]. EMG uygulamaları sonucunda elde edilen veriler; merkezi kontrol stratejileri, sinir hücreleri boyunca olan sinyalin sinir kas kavşağına transferi, motor ünite kas hücrelerinin elektriksel aktivasyonu, karmaşık biyomekaniksel olaylar zinciri, agonist ve antagonist kas tendonları üzerine etki eden ve kemiklere taşınan baskının üretimi hakkında bilgi edinilmesini sağlar [80-85].

2.5.5. EMG'nin Uygulanma Yöntemi

N. ischiadicus'un seyri doğrultusunda 4 iğne elektrot yerleştirilir. 1 elektrot ise yalıtımı sağlamak için farklı bir tarafa yerleştirilir. İğne ucuna yakın olan kas bölgesinde o kasın kasılması için beyinden gönderilen uyarıların oluşturduğu motor ünite aksiyon potansiyelleri veya diğer elektriksel aktiviteler cihazın ekranından izlenir. Kaydedilen ilk ve son değerler istenilen parametrelere göre ölçülür ve karşılaştırma yapılarak sinirin rejenerasyon yeteneği tespit edilir [99-101].

2.5.6. EMG'nin Uygulanma Sebepleri

EMG ve sinir ileti incelemeleri sırasıyla medulla spinalis'in ön boynuz hücreleri, sinir kökleri, sinir ağları, uç sinirler, sinir kas kavşağı ve kas hastalıklarının tanısını koymada kullanılan bir yöntemdir [95-98]. Uygulanması kolay olması nedeniyle çoğu zaman tek başına veya görüntüleme teknikleri, kan biyokimyası gibi diğer yardımcı yöntemlerle birlikte olası en kesin tanıya götürmek için

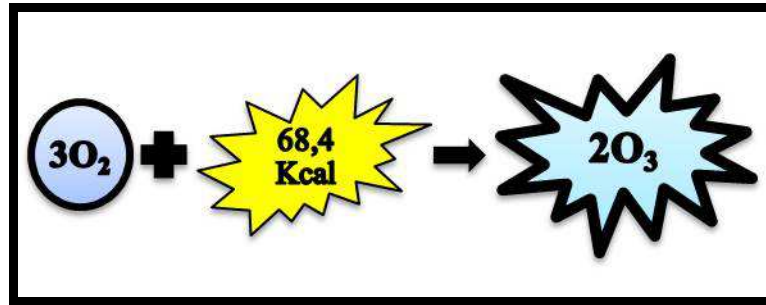
kullanılmaktadır [102]. Sıklıkla bel ve boyun fitiklarının, uç sinirlerin belli noktalarda sıkışmasının neden olduğu ağrılı durumlarda, his kusurlarında [103], nöropati ve miyopati [95,96] gibi hastalıkların teşhisinde, kol ve bacak güçsüzlüklerinin görüldüğü bazı durumlarda, sınırlı veya yaygın kas erimelerinde sinir ve kasların ne kadar zarar gördüğünün ölçümünde kullanılır [95-98].

2.5.7. EMG Hangi Durumlarda Yapılır?

Polinöropatiler [86], diyabet [87], B₁₂ vitamini veya folik asit eksikliği [88] gibi metabolik durumlar, böbrek yetmezliği [89] ve karaciğer yetmezliği gibi organ disfonksiyonları, romatolojik hastalıklar, kronik alkol kullanımı [90] ya da bazı meslek hastalıklarında toksik madde alımları, malign hastalıklar, guillain barre sendromu [91] gibi otoimmün hastalıklar, kalıtsal nedenler [92], Motor nöron hastalıkları [93,94].özellikle de periferik sinir demiyelinizasyonunda EMG kullanılır [86-92].

2.6. Ozon Nedir?

Ozon üç oksijen atomundan oluşan bir kimyasal bileşiktir (O₃). İki atomlu normal atmosferik oksijenin (O₂) çok yüksek enerji taşıyan bir şeklidir [Şekil 2.2.]. Oksijenin allotropudur, trioksijen olarak da tanımlanır. O₃ oda sıcaklığında renksiz, karakteristik kokusu olan bir gazdır. İsmi Yunanca "koklamak" manasına gelen ozein'den gelir. Alman kimyacı Christian Friedrich Schönbein (1799-1868) tarafından 1840 yılında keşfedilmiştir [104,105].



Şekil 2.2. Ozon oluşumunun kimyasal formülü [104].

Zemin seviyelerine yakın yerlerde 10 milyon hava partikülü başına bir partikül O₃ 200 µg/ml (0.1 ppm) konsantrasyonlarında duman şeklinde bulunur. 2000 metre yükseklikte, çok daha azalarak 0.03-0.04 ppm seviyelerine düşer. 1860 yılında Monako şehrinin su arıtma tesisinde dezenfeksiyon amacıyla ozon kullanılmaya başlanmıştır. Ozonun bu dezenfekte edici etkisi güçlü okside edici özelliğinden kaynaklanmaktadır. Ozon kimyasal yapısı itibarıyla radikal özelliği taşımamakla birlikte, florin ve persülfattan sonra, bilinen üçüncü en güçlü oksidan maddedir [105].

Ozon terapi, saf oksijen ile ozonun % 0,05-5 O₃; % 95-99.95 O₂ olacak şekilde belirli oranlarda karıştırılıp, bu karışımın değişik yöntemlerle hastaya veya deneğe uygulanmasını içeren bir tedavi şeklidir [106,107]. Bu karışım intravenöz, intramuskuler, intraartiküler, intraplevral, intrarektal, intradiskal ve topikal de uygulanabilir [109,110].

2.7. Medikal (Tedavi Amaçlı) Ozon Nedir?

Keşfinden sonraki ilk yıllarda dezenfeksiyon amacıyla kullanılırken yıllar içerisinde yapılan çalışmalar medikal kullanımını gündeme getirmiştir. Medikal ozon, daima saf ozon ve saf oksijenin karışımı şeklinde kullanılır. Uygulamaya bağlı olarak ozon konsantrasyonu 1-100 ug/ml (%0,05-5) arasında değişir. Medikal ozon uygulamasının organizmada oluşturduğu etkiler dikkate alınarak, birçok hastalığın tedavisinde kullanılabilmesi düşünülmüştür. Deri ve mukoza enfeksiyonları, yara iyileşmesi, tümörler, peritonitler, ortopedik hastalıklar, göz hastalıkları ve diş hekimliğinde kullanılmaktadır [108].

Araştırmalar, ozonun önemli ölçüde anti-bakteriyel, anti-viral ve anti-fungal etkisi olduğunu göstermiştir. Ozonun çeşitli dolaşım bozukluklarının tedavisinde dolaşımı uyarıcı olarak yararlı olduğu ve organik işlevlerin yeniden canlandırılmasında çok etkili olduğu ispat edilmiştir. Ozon sayesinde oluşan aktivasyona cevap olarak, vücudun bağışıklık hücreleri sitokin adı verilen özel habercileri üretir. Sitokin interferon ya da interlökin gibi önemli araçları içerir. Bu haberciler hastalıklara direnmek için görevli bütün bağışıklık sistemi boyunca zincirleme bir şekilde pozitif değişiklikler oluşturarak diğer bağışıklık hücrelerini haberdar ederler. Ozon, bağışıklık sisteminin güçlü bir düzenleyicisidir. Bu benzersiz özelliği ile aktif olarak bağışıklık sistemleri üzerinde etkilidir [110-115].

Akciğer ve gözler ozonun toksik etkisine en hassas organlardır. Gözdeki irritasyonu ve akciğere olan etkileri; konsantrasyon, sıcaklık, nem ve maruz kalınan süreye bağlı olarak değişir. Düşük konsantrasyonda ozon inhalasyonu, boğazda irritasyon ve buna bağlı öksürüğe neden olabilir. Yüksek konsantrasyonlardaki inhalasyon ise bronşiyal mukoza ve pnömosit hücresi hasarı buna bağlı akciğer ödemeine neden olabilir [107,113].

2.7.1. Medikal Ozon Uygulamalarının Tarihçesi

1915 yılında Dr. Albert Wolf 1. Dünya Savaşında gangren ve ateşli silah yaralarını ozonla tedavi etmeyi başardı. 1926 yılında Dr. Otto Warbrug kanserin; vücuttaki hücrelerin oksijen alımının yetersizliğinde geliştiğini kanıtladı. Bu konudaki çalışmaları ile 1931 ve 1944 Yılında Nobel ödülü aldı. 1935 yılında Dr. E. Payr cerrahide, Dt. E. A. Fisch diş hekimliğinde ozonu kullandı. 1937 yılında Dr. P. Auburg cerrahide ozonu rektal uyguladı. 1957 yılında Dr. J. Hansler medikal ozon jeneratörü patenti aldı. 1958 yılında Dr. J. Hansler ve Dr. Hans Wolf derideki hastalıklarda, ozonu bagging yöntemi ile uyguladı. 1968 yılında Dr. Hans Wolf Frankfurt, Almanyada major otohemoterapi yöntemini ortaya koydu. 1975 yılında Dr. Buckley ve arkadaşları ozon tedavisinde peroksit oluşumu ile sağlanan yüksek oksijenlemenin glutatyon enzim sistemi üzerinden eritrositleri aktive ettiğini ilk kez kanıtladı. Aynı yönde diğer bilimsel çalışmalar 1979 yılında Dr. Freeman ve arkadaşları, 1977 ve 1986 yıllarında Dr. Washüttl ve arkadaşları, 2001 yılında da Dr. Lell ve arkadaşları tarafından da ortaya konuldu. 1976 yılında Dt. R. Türk diş hekimliğinde ozonlu su ile hastalarını tedavi etti. 1977 yılında Dr. Renate Viebahn ozonun vücuttaki etkilerini fizyolojik olarak açıkladı. Aynı yıl Dr. O. Ratikansky cerrahide ozonla başarılı sonuçlar aldı. 1979 yılında Dr. George Freibott ilk kez AIDS hastalarında ozon terapi uyguladı. 1981 yılında Dr. H. Werkmeister düşük ozon dozlarının yaraları iyileştirdiğini gösterdi. 1981 yılında Dr. Ziad Fahmy

intraartiküler (eklem içi) ozon tedavisiyle hastalarını tedavi etti. 1987 yılında Dr. H. G. Knoch cerrahi kolit hastalarını rektal uygulama ile tedavi etti. 1989 yılında Dr. E. Riva Sanseverino omurgada ozon tedavisi uyguladı. 1990 yılında Dr. Bocci ozonun immun sistemi nasıl güçlendirdiğini bilimsel olarak kanıtladı. 1991 yılında H. Kirchner diş hekimliğinde kanal tedavilerinde ozonu başarıyla uyguladı. 1998 yılında Dr. Bocci ve Dr. Leon, 1999 yılında da Dr. Peralta farmakolojik olarak ozonun serbest radikallere karşı antioksidan sistemleri nasıl aktive ettiğini bilimsel olarak gösterdi. 2001 yılında Dr. Lell ve arkadaşları ozon verilmiş hayvanların daha sonra sıtma etkeni ile hastalandıklarında etkenin kan hücrelerinde büyüüp üreyemediğini gösterdi [104,105,108-116].

2.7.2. Medikal Ozon ve Etki Mekanizması

Kan ozon/oksijen ile karşılaştığında aşağıdaki biyokimyasal reaksiyonlar oluşur. Oksijen '**Henry Kanunu**' gereği çözünür ve 5-10 dakika içinde venöz kan içindeki hemoglobini tamamen satüre hale getirir. Plazmada çözünen oksijen de ortalama oksijen basıncını 350-400 mmhg'ye çıkarır. Ozon sıvılarda oksijenden yaklaşık 10 kat daha kolay çözünür ancak Henry Kanununa uymaz. Bunun nedeni plazma ile karşılaştığında saniyeler içerisinde moleküler oksijen ve oksijen radikale dönüşmesidir [115].

Ortaya çıkan oksijen radikalleri plazmanın suyu ile reaksiyona girerek hidrojen peroksit oluşumuna neden olur. Hidrojen peroksit organizmada bilinen en önemli ikinci habercilerden bir tanesidir. Plazmada yüksek konsantrasyonda oluşur ve hızla şekilli elemanların içine girer. Ortaya çıkan oksijen radikallerinin ikinci hedefi plazmadaki çift bağdan zengin moleküllerdir (özellikle sülfidril gruplarından zengin). Bu moleküllerin çoğu plazmanın antioksidan kapasitesinin önemli bir bölümünü oluşturan üre, ürik asit ve albumindir. Antioksidan özelliği olan bu moleküllerin ozon aracılığı ile oksitlenmesi kan plazmasının redoks dengesini geçici olarak değiştirir ve terapötik şok denilen sürece neden olur. Eritrositler bu duruma antioksidan ve antiinflamatuvar yollarla reaksiyon gösterirler [115].

Bunların yanında çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA) ile de aynı reaksiyona girerek, LOP (lipids oxidation products) adı verilen okside lipid ürünleri oluştururlar. Bu ürünler dolaşıma girdikten sonra tüm dokulara yayılır ve başta immun sistem ve kemik iliği olmak üzere aktivasyon artışına neden olur [108,115]. Ozon ile artan aktivasyona yanıt olarak vücudun bağışıklık hücreleri, sitokin adı verilen özel haberciler üretirler. Bu hücreler, enfeksiyonlara direnmek için uyarılan immun sistem boyunca diğer bağışıklık hücrelerini uyarır [112]. Ozon lipid peroksidasyonunu ve oksidatif mitokondrial hasarını azaltarak ayrıca antioksidan olan diğer enzimlerin salınımını stimüle ederek infarktlı bölgeyi sınırlar. Ek olarak, infarktlı bölgede ödemi ve eksitotoksik hasarı da azaltır [113,118].

2.7.3. Medikal Ozon'un Terapötik (Terapi Amaçlı) Gerekeşi

Medikal ozonun terapötik endikasyonları, ozonun düşük fizyolojik konsantrasyonlarının hücre içerisinde önemli roller oynayabileceği bilgisine dayanmaktadır. Moleküler düzeyde, bu tedaviye ait klinik kanıtları destekleyen farklı etki mekanizmaları gösterilmiştir. Ozonun terapötik, etkili olmayan ve toksik konsantrasyonları bulunmaktadır. 5-10 µg/ml ve daha düşük ozon konsantrasyonlarının geniş bir güvenilirlik sınırı içerisinde terapötik etkilere sahip

olduğu kanıtlanmıştır ve dolayısıyla günümüzde terapötik konsantrasyonların 5-60 µg/ml arasında olduğu kabul edilmektedir. Bu aralık lokal ve sistemik uygulama tekniklerinde geçerlidir. Her uygulama yolunun minimum ve maksimum dozlarının yanı sıra kontrol edilmesi gereken konsantrasyon ve hacime sahiptir. Tüm terapötik dozlar etki mekanizmasına göre üç gruba ayrılmaktadır [110,111,114,116,118].

a. Düşük Dozlar: Ozonun düşük konsantrasyon değerleri 10 - 30 µg/ml dir. Bu dozlar immünomodulator (bağışıklık sistemini düzenleyici) etkiye sahiptir ve bağışıklık sisteminin etkilendiği yönünde şüphelenilen hastalıklarda kullanılmaktadır [114,116,117,124].

b. Orta Düzeydeki Dozlar: Ozon'un orta konsantrasyon değerleri 30 – 50 µg/ml'dir. Bu dozlar antioksidan enzim savunma sistemini uyarırlar. Diyabetes mellitus (özellikle tip 2 diyabet), [119-123] ateroskleroz, KOAH (kronik obstrüktif akciğer hastalığı) , parkinson [124], alzheimer ve senil demans (bunama) benzeri kronik dejeneratif hastalıklarda en fazla faydayı sağlamaktadır [114,116,117,119-123].

c. Yüksek Dozlar: Ozon'un yüksek konsantrasyon değerleri ise 50 - 80 µg/ml arasında değişir. Özellikle ülserde veya enfekte yaralarda uygulanmaktadır. Ozonize su [126,132] ve yağlarda kullanılmaktadır. Yağın ozonlanması tıbbi jeneratörler ile asla başarılamamaktadır; çünkü yağ buharının yüksek voltaj borularına difüze olmasının önüne geçilememektedir. Ortaya çıkan sonuç çeşitli toksik maddelerin üretilmesidir. Ozonun çıkışını kesen bir subaba sahip jeneratörler bunun istisnasıdır [114,127-130].

2.7.4. Medikal Ozon Tedavisinin Temel İlkeleri

Herhangi bir ozon tedavisi uygulanmadan önce dikkate alınması gereken üç temel ilke vardır. 1. Zarar Vermemek, 2. Dozu Kademeli Artırmak, 3. Gerekli Konsantrasyonu Uygulamak [110-118].

2.7.5. Medikal Ozon'un Ana Uygulama Yöntemleri

Tıbbi ozon lokal veya parenteral olarak uygulanabilmektedir. Ozonun çeşitli uygulama yöntemleri tek başına veya sinerjik etki elde etmek için birkaç yöntemin kombinasyonu şeklinde tatbik edilebilir [110-118].

2.7.5.1. Intraperitoneal Yöntem

Prosedür; operasyon bölgesi dezenfekte edilerek sağ alt kadrandan belirli konsantrasyon ve hacimde intraperitoneal enjeksiyon yapılır. Bu yöntem sağlam perinöryum ve epinöryum koşulları altında gerçekleştirilmelidir. Bu nedenle ozonun intraperitoneal enjeksiyonu sırasında periferik sinir blokajını engellemek için denek/hasta anestezide olmamalıdır. İğne yavaşça geçirilerek uygulanmalı ve doğrudan sinire girişi, sinirde mekanik hasarı ve sinir liflerinde oksidatif hasarı engellemek için deneğin ya da hastanın tepkileri gözlemlenmelidir [214]. İmmünokompetant hücrelerin aktive olamaması nedeniyle 80 µg/ml ve üzeri ozon konsantrasyonlarından kaçınılmalıdır [114,132]. Ozonun peritonitis olgularında, özellikle intraperitoneal yolla uygulanması, hastalığın sağaltımında önemli bir rol oynar. Ozon hem gram (+) hem de gram (-) bakteriler üzerinde bakterisidal etki gösterir. Aynı zamanda uyarıcı etkisi ile antioksidan sistemlerin aktive edilmesini

sağlar. Bu durum peritonitislerin sağaltımında büyük bir önem arz eder [118]. Souza ve ark. (2010) tarafından yapılan bir çalışmada, ratlarda fekal kontaminasyon ile peritonitis oluşturularak intraperitoneal ozon sağaltımı yapmışlardır. Ozonun, bakterileri inaktif hale getirerek, sitokinlerin salınımını azalttığı ve enfeksiyona karşı yangısal cevabı sınırlandırdığı gösterilmiştir [191]. Tavşanlarda yapılan bir araştırmada, deneklerin kulaklarında sokuamoz hücre karsinoması oluşturulmuş ve sağaltım için denekler 3 gruba ayrılmıştır. Gruplardan birine sadece O₂, diğerine O₃/O₂ karışımı **intraperitoneal** üfleme yöntemiyle (kombine yöntem) verilmiştir. Diğer grup kontrol grubu olarak belirlenmiş ve bu deneklere herhangi bir uygulama yapılmamıştır. Çalışma sonunda elde edilen bulgulara göre, O₂ verilen deneklerin %23,1'nin yaşadığı, ozon grubunda yer alanların %50'sinin yaşadığı ve kontrol grubunda ise %7,1'inin yaşadığı saptanmıştır [110].

2.7.5.2. Major Otohemoterapi (MAHT)

Bu yöntemde; bir miktar kan vücut dışına alınarak, ozona dayanıklı bir şişede 5-10 dakika oksijen/ozon karışımıyla temas ettikten sonra tekrar aynı kişiye geri verilir (ototransfüzyon). Bu uygulama şekli major otohemoterapi (MAHT) olarak adlandırılmaktadır [105]. Aktive olmuş trombositler büyüme faktörlerini salarak iskemi ve ülserli hastalarda iyileşmeye olumlu katkı sağlar [111,132]. Kullanılacak hacim aralığı 50-100 ml arasında değişmektedir. Perfüzyon seti kullanılmalı ve asla polivinil klorür (PVC)'den veya ozonla tepkimeye girebilecek diğer maddelerden üretilmemelidir. Hemoliz riskinin artışı, 2,3-diphosphoglycerate (2,3 DPG) 'nin indirgenmesi ve immünokompetant hücrelerin aktive olamaması nedeniyle 80 µg/ml ve üzeri ozon konsantrasyonlarından kaçınılmalıdır [114,132]. MAHT uygulamaları sırasında plazmada çözünen ozonun burada bulunan antioksidanlar; bilirubin [133,134], askorbik asit [135], SH grubu taşıyan glutatyon ve albumin [136] ile reaksiyona girer [133-136].

2.7.5.3. Minör Otohemoterapi (MiAHT)

Ozonun diğer bir uygulama şekli olan minör otohemoterapide ise özel steril bir düzenek yardımıyla hastadan 10ml kan yavaşça alınır ve belirli konsantrasyondaki oksijen/ozon karışımı bir dakika inkübe edilir. Ozonlanmış 10 ml kan intramusküler yolla hastaya geri verilir (steril ozona dayanıklı tek kullanımlık sarf malzemesi kullanılır). Eğer kan içinde HCV, HBV ve HIV gibi virüsler var ise ozon tarafından inaktive edilip parçalanmış bu virüs atıkları bölgeye gelen immün hücreler tarafından ortadan kaldırılır. Bu yöntemle spesifik olmayan bağışıklık sistem aktivasyonu yapılır, alerjik hastalıklarda ve immun sistemi güçlendirmekte kullanılır [105,114,137].

2.7.5.4. Paravertebral İnfiltrasyon

Omurganın 2 cm lateralinden infiltrasyon yapılır. İğnelerin dağılımı daima herni'nin 2 cm altında ve 2 cm üzerinde bilateral ve lateralidir. Hastanın bünyesi ve/veya tedavi edilecek alan dikkate alınırken 2 - 4 cm arasındaki bir derinlik düşünülmelidir. Bu prosedür için önerilen iğne büyüklüğü 30 G x 1"(25mm)' dir [110,111,114,125]. Servikal, lumbal ve dorsal hernilerde 10-20 µg/ml konsantrasyon ve 5 ml hacim ozon kullanılır [114,125,138].

2.7.5.5. İntraartiküler (Eklem İçi) İnfiltrasyon

Konsantrasyonu 5-20 µg/ml'ye ayarlanır. Eklem büyüklüğünün fonksiyonu olarak ekstremitelerin distal kısmına 1-2 ml hacim verilirken diğer bölümlere 5-20 ml hacim verilir [114,171,175].

2.7.5.6. İntradiskal (Disk İçi) İnfiltrasyon

Mobil radyolojik görüntüleme, floroskopik kontrol ya da Bilgisayarlı tomografi (BT) altında, 2-4 haftada bir tekrarlanabilmesine rağmen, genel olarak sadece bir kez disk içi infiltrasyon (enjeksiyon) yapılmalıdır. Lomber diskoliziste; 25-30 ug/ml konsantrasyonunda 5-10 ml hacim oksijen-ozon karışımı kullanılmaktadır [114].

2.7.5.7. Peridural (Translaminal) İnfiltrasyon

20 ug/ml konsantrasyon ve 5 ml hacim oksijen-ozon karışımı kullanılır. Disk içi yöntemle göre indirekt yöntem olmasına rağmen disk hernisinin tedavisinde düşünülmesi gereken alternatifler translaminal peridural yöntem veya hiatus sacralis yoludur; çünkü bu yöntemle radyasyon riskine maruz kalmaz. Şüpheli disko-radiküler bölge seviyesindeki spatium periduralede gaz birikimi diskte ve hasar görmüş sinir kökü üzerinde etkili olmaktadır [125,138]. Başarı oranı %70'in üzerindedir, iyileşmek için minimum süre gerektirir. Her durumda, yorumu yapılan üç teknik kesin asepsis (bakteri, virüs, mantar, parazit gibi hastalık yapıcı maddelerin bulunmaması veya bu maddelerle temas edilmemesi) ve sterilite önlemleri gerektirir [110-114,125,138].

2.7.5.8. Subkutanöz (Deri Altı) Uygulama

Kullanılacak ozon konsantrasyonu 30 G iğneyle ve düşük hacimde (1-2 ml hacim) gazla birlikte, 5-10 µg/ml'dir. Nöropatik ağrının tedavisinde de etkilidir [86,95,96,114].

2.7.5.9. Ozon Torbalama (Bagging) Yöntemi

Özellikle ekstremitelerdeki infeksiyon, ülser ve lokal deri lezyonlarında tek veya major otophemoterapi ile kombine olarak uygulanan etkin bir yöntemdir [132]. Deri ıslatıldıktan sonra özel dizayn edilmiş bir torba ile lezyonun olduğu bölge çevrelenir. Torbanın gaz karışımını torba içine veren ve gazı emen giriş ve çıkışları bulunur. Torbalama tedavisi boyunca gaz girişi ve çıkışı aynı hızda devam eder [139]. Lezyonun aşamasına ve gelişimine göre 20-30 dakika 20-60 µg/ml konsantrasyonları kullanılır [132,139].

2.7.5.10. Ozon Kupalama (Capping) Yöntemi

15-20 dakika arasında değişen tedavi sürelerinde 15-60 µg/ml arasındaki konsantrasyonlar kullanılmaktadır [110-116].

2.7.5.11. Fistüllerde İnsüflasyon

İnsüflasyon ozon gazı üfleme yöntemidir. Kutanöz, perianal ve cerrahi fistüllerde olmak üzere basınçla oluşabilecek tehlikeli ve ağrılı artışları önlemek için kapalı boşluk içerisinde bloke olma ihtimali veya kistik tarzda gaz birikiminin oluşabileceğinin akılda tutulması gerekir [114].

2.7.5.12. Vajinal İnsüflasyon

Bu uygulama ozon yıkıcı (destrüktör) cihaz gerekmektedir. Bu uygulama için 10 dakika 0.1-0.2 l/dak. sürekli akış hızında 1000-2000 ml hacim ve 20-40 µg/ml konsantrasyonunda ozon kullanılır [110-118].

2.7.5.13. Vezikoüretal İnsüflasyon

Mesane veya üretra içerisine 50-100 ml arasında ozon verilir. Önerilen konsantrasyonlar 10-25 µg/ml arasındadır. Tedavi tek olarak veya ozonlu suyla yapılan bir ön irrigasyon prosedürüyle birleştirilebilmektedir [140,141].

2.7.5.14. Otik (Kulak) İnsüflasyonu

Auris eksternus nemlendirilir ve ardından destrüktörlü enjektörle veya özel bir kulaklıkla insüflasyon gerçekleştirilir. Kulak zarı inspeksiyonu yapılmalıdır ve 5 dakika süre ile 20-30 µg/ml arasındaki ozon konsantrasyonları kullanılmaktadır [110-118].

2.7.5.15. Rektal İnsüflasyon

Kullanılacak konsantrasyonlar hastanın oksidatif stres evresine ve tedavi edilecek patolojiye bağlıdır. Rektal insüflasyonu uygulamak için, anal sfinkterin 1-2 cm içerisine kateter sokularak yapılır [140,141].

2.7.5.16. Ozonlanmış Salin (Serum Fizyolojik) Çözeltilisi

Prosedür; 10 dakika % 0.9 luk 200 ml salin çözeltisinde kabarcık oluşturmak (sıvı içinden ozon gazı geçirmek), bu süre 20 µg/ml konsantrasyonundan 200 µg/ml konsantrasyonuna kadar uzanan yeterli çözelti satürasyonunu elde etmek için gerekli süredir. Ardından, 25-30 dakika boyunca hastaya bir serum setiyle bu çözeltinin transfüzyonuna başlamak, çözeltideki konsantrasyonu korumak için şişede sürekli ozon kabarcıklarının oluşması sağlanır. Transfüzyon sırasında kabarcık oluşumunu sürdürmeksizin çözeltideki ozon konsantrasyonunu koruyan bir ozon ekipmanı bulunmaktadır [141-143].

2.7.5.17. Ozonlu Su, Yağ ve Kremlerle Topikal Uygulama

Yara, ülser ve çeşitli enfekte lezyonlara karşı farklı konsantrasyonlarda uygulanmaktadır. Dezenfeksiyon, rejenerasyon yeteneği ve uygulanacak olan doku türüne göre yüksek, orta ve düşük doz verilir [144]. Bir takım deri infeksiyonlarının tedavisinde ozonun deriye direkt ya da ozonlanmış yağ veya kremin topikal uygulanmasıdır (diyabetik ülser, yanık, cerrahi yaralar, abse ve radyodermatit) [128,139,144].

2.7.5.18. Oftalmolojik Yöntem

Oftalmolojik olgularda (keratit, korneal ülserler, konjunktivit, maküler dejenerasyon ve göz yanıkları), göz çevresine göre ayarlanmış özel bir gözlük kullanılmaktadır. Öncesinde anestezi göz damlaları uygulanır ve 5 dakika 20-30 µg/ml ozon konsantrasyonu verilir. 35 µg/ml konsantrasyon ve 1-2 ml hacim subkonjunktival ozon uygulamasıyla birleştirilebilmektedir [165, 166].

2.7.6. Önerilmeyen ve Yasaklanan Uygulama Yolları

2.7.6.1. Ozonun Direkt Venöz Uygulanması

Hassas akış kontrolüne ihtiyaç duyulan intravenöz tedavi, infüzyon pompaları ile uygulanmaktadır [145]. Yavaş infüzyon pompasıyla 20 ml hacminde kullanılmasında dahi meydana gelebilen hava embolizmi riski nedeniyle uygulanmaması kesin olarak önerilir [110,111]. Yarı ömürlü yada yüksek riskli ilaçların uygulamasında bu cihazların çalışma güvenliğinin arttırıldığını görmekteyiz. Fakat bu cihazlarda istenilen orandan daha yüksek miktarda ilaç uygulamalarına yol açacak programlama hatalarının önüne henüz geçilmiş değildir [145].

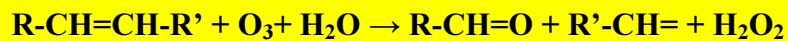
2.7.6.2. Yasaklanan Uygulama Yolu

Solunum yolu (inhalasyon) yüksek düzeyde toksik olması nedeniyle uygulanması yasaklanmıştır. Akciğerin anatomik ve biyokimyasal özellikleri ozonun verdiği oksidatif hasara karşı bu organı son derece hassas kılmaktadır [107,110,113-115].

2.7.7. Medikal Ozon Kullanımında Dikkat Edilmesi Gereken Durumlar ve Biyokimyasal Etkileri

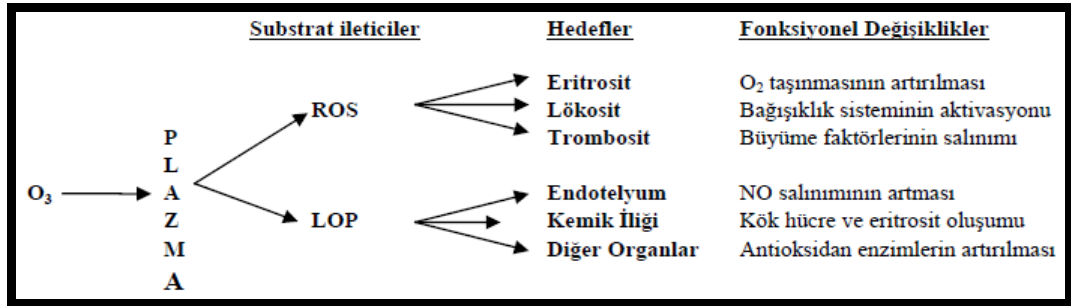
Ozon, hiçbir zaman saf olarak verilmemeli ve belli oranda oksijenle karıştırılarak uygulanmalıdır. Bu karışımda oksijen %95'den az, ozon da %5'ten fazla olmamalıdır. Normal atmosfer havasının bu karışıma girmesi engellenmelidir. Çünkü ozonun reaktif özelliğinden dolayı hava ile teması sonucu toksik bir gaz olan nitrojen dioksit (N₂O₂) oluşabilmektedir. Ayrıca emboliye sebep olmaması için ozon gaz olarak damar sistemi içerisine verilmemelidir [105].

Ozon, diğer gazlar (O₂, CO₂) gibi suda çözünebilir. Ozon oksijene göre 1,6 kat daha yoğun ve suda çözünürlüğü 10 kat daha fazla olan bir moleküldür. Saf suda diğer gazlar gibi Henry kanunu'na (Sıvı ile temas halinde olan bir gazın basıncı arttırıldıkça, o gazın temas halinde olduğu sıvı içerisindeki çözünürlüğü artar) [146] göre çözünür. Çözünmesi ısıya, basınca ve konsantrasyonuna bağlıdır. Biyolojik sıvılarda ise ozon oksijenden farklı olarak hızlıca biyomoleküller ile reaksiyona girer. Uygulanan ozon/oksijen karışımındaki ozon afinitesi sırasıyla; çoklu doymamış yağ asitleriyle, antioksidanlarla ve sistein gibi sülfhidril (SH) grubu taşıyan tiyol bileşikleriyle reaksiyona girer. Ozonun miktarına bağlı olarak karbonhidratlar, proteinler (dolayısıyla da enzimler), DNA ve RNA da bu reaksiyondan etkilenebilir. Tüm bu bileşikler ozon karşısında elektron donörü gibi davranarak oksitlenirler. Sonuçta süperoksit (O₂⁻), hidrojen peroksit (H₂O₂) ve hipoklorik asit (HClO) gibi reaktif oksijen türevleri (ROT) oluşur. Bu reaksiyonlardan en önemlisi doymamış yağ asitlerinin oksidasyonudur. Ana reaksiyon aşağıdaki gibidir [Şekil 2.3.] [111,147].



Şekil 2.3. Doymamış yağ asitlerinin oksidasyonu [25,111].

Bu reaksiyonda her hidrojen peroksit ile birlikte iki de lipit oksidasyon ürünü (lipid oxidation products; LOP) oluşmaktadır. Lipit oksidasyon ürünleri için iyi bilinen örnekler şunlardır; lipoperoksit radikalleri, hidroperoksitler, malondialdehit [147] , izoprostan, alkenaller ve 4-hidroksi-2,3-trans nonenal (HNE) [148,149]. Ozonun temel biyolojik etkilerinin [Şekil 2.4.] ortaya çıkması için serbest radikallerin varlığı önemlidir. Serbest radikaller, çeşitli patolojik süreçlerin başlatıcısı olabileceği gibi ara basamaklarda veya reaksiyon sonucunda ortaya çıkabilen reaktif maddelerdir. Bunlar, organizmada aerobik solunum sırasında mitokondride ve fagositlerde solunum patlaması gibi çeşitli fizyolojik durumlarda da oluşabilmektedir [111].



Şekil 2.4. Medikal ozon uygulama sonrası ortaya çıkan temel biyolojik etkiler [203].

Aerobik canlılar serbest radikallerin toksik etkilerinden korunmak için antioksidan sistemler geliştirmişlerdir. Non enzimatik olanlar; ürik asit, askorbik asit, protein (özellikle albumin), protein olmayan tiyoller, vitamin E ve bilirubindir. Enzimatik olanlar ise süperoksit dismutaz (SOD) [150] katalaz (CAT) [151] ile glutatyon peroksidaz (GPx) [152,153] glutatyon s-transferaz (GST) [154,155] glutatyon (GSH) [156] ve glutatyon redüktazdan (GR) [157] oluşan glutatyon sistemidir [111].

Reaktif moleküller ve bunların çeşitli biyolojik moleküllerle reaksiyona girmesi sonucu ortaya çıkan oksidasyon ürünleri düşük konsantrasyonlarda (fizyolojik düzeylerde) hücrede önemli roller üstlenmektedir. Sıvılardaki çözünürlüğü fazla olan ozon'un bir kısmı plazmada bulunan antioksidanlar ile reaksiyona girerek bunların miktarlarını azaltır. Bu anlık olaylar sırasında çeşitli reaktif oksijen radikalleri de oluşabilmektedir. Bu radikallerin yarı ömrü çok kısa olduğu için ototransfüzyondan önce bunlar ortadan kalkarak yerini lipit oksidasyon ürünlerine bırakırlar. Bu ürünler, büyük oranda kandaki baskın hücre olan eritrositlerin membranlarının oksidasyonu ile ortaya çıkar. Eritrosit membranındaki doymamış yağ asitleri oksidasyona çok duyarlıdır. Bu reaksiyonlar sırasında ortaya çıkan hidrojen peroksit, molekül yapısı itibariyle radikal olmayan oksitleyici bir moleküldür [110-112, 116, 144].

Hidrojen peroksitin ozonun tedavi edici etkinliklerinin en azından bir kısmından sorumlu ikincil habercisi gibi davrandığı kabul edilmektedir. İlk etkilerinden biri eritrositlerde 2,3-difosfogliserat [158] düzeyini artırma yoluyla hemoglobin-oksijen ayrışma eğrisinin sağa kaymasına ve böylece oksijenin dokulara daha kolay bırakılmasına neden olmasıdır. Plazmada konsantrasyonu artan hidrojen

peroksit kolayca hücrelerin içine diffüze olarak; lökosit ve endotelial hücrelerde çeşitli interferon, interlökin ve transforme edici büyüme faktörü (TGF) yapımını da artıran uyarıları tetikler. Lipit oksidasyon ürünlerinin yarı ömürleri ise saatlere varabilmekte, dolayısıyla ömrü çok kısa olan oksijen radikallerinin ilk etkileri sonrasında ozonun gecikmiş etkilerinden sorumlu tutulmaktadır [110, 111, 116].

Ozonun konsantrasyonuna bağlı olarak artan kuvvetli okside edici özelliği nedeniyle belli bir orandan sonra vücut için de toksiktir. Antioksidan savunma sistemleri önce ozon oksidasyonuna karşı koyacaktır. Plazmanın sahip olduğu geniş antioksidan kapasite ve eritrositlerdeki antioksidan enzimler nedeniyle, kan ozon toksisitesine karşı en dirençli dokudur. Kan tedavisinde, tüm kanda 80 veya üzeri µg/ml ozon konsantrasyonları da kabul edilmemelidir; çünkü hemoliz riski artar (ml olarak tüm kanda 100 µg ozon için %10'a kadar), 2,3-difosfogliserat (2,3-DPG) düşer ve sonuç olarak, immünokompetan hücreler etkinleştirilemez. Yapılan çalışmalarda ozonun terapötik konsantrasyonu 10-80 µg/ml olarak belirlenmiştir [111,159,160].

Ozon uygulaması ile hem oksijenaz-1 (HO-1) enziminin de uyarıldığı bildirilmiştir. Bu enzimin artışından gerek serbest oksijen radikalleri, gerekse yukarıda sözü edilen ılımlı eritrosit hemolizi sorumlu olabilir. HO-1, hem halkasının yıkım yolunda görev alan mikrozomal bir enzimdir ve yapımı oksidatif stres artışı, proinflamatuvar sitokinler ve nitrik oksit (NO) ile uyarılabilmektedir. Bu enzim hem molekülünü biliverdin ve karbon monoksit'e (CO) parçalar [161]. Son yıllarda HO-1 ile yapılmış birçok çalışmada bu enzimin; antioksidan, antiapoptotik ve antiinflamatuvar etkilerinin olduğu gösterilmiştir [162].

Ozon uygulaması sonucu görülen en etkin HO-1 artışının [152,163] aynı zamanda ozonun terapötik doz aralığı olarak da vurgulanan 20-80 µg/ml arasında ortaya çıktığı gösterilmiştir. Yine HO-1'in yanında ısı şok protein-70'in de arttığı gösterilmiştir [164].

2.7.8. Bir Farmasötik Madde Olarak Medikal Ozon

Gaz halindeki farmasötikler ayrıcalıklıdır ve özel uygulama şekilleri gerektirmektedir. Medikal ozon/oksijen karışımları göz önüne alındığında, oksijen yalnızca ozon hazırlamak için bir gaz olarak değil, aynı zamanda pratikte uygulanan 1.0-100 µg/ml konsantrasyon aralığına karşılık olarak 0.05-5 ml hacim aralığındaki ozona bir solvent olarak kullanılmaktadır [105,111].

2.7.9. Medikal Ozon Tedavisinin Klinik Uygulamaları

Ozon tedavisinin özellikle inflamatuvar sürecin yoğun olarak yaşandığı ve immün sistemin ön planda yer aldığı fizyopatolojik durumlarda tedavi edici etkisi şaşırtıcıdır. Ozon uygulamaları yara iyileşmesi, yaşa bağlı maküler dejenerasyon [165,166], iskemik ve infeksiyöz hastalıklarda yapılan vaka analiz çalışmalarında olumlu etkiler göstermiştir. Bunun yanında basit diş ve ağız enfeksiyonlarından hepatitlere kadar uzanan geniş bir aralıktaki çeşitli enfeksiyon hastalıklarında etkin olarak uygulanmaktadır [111].

Martinez-Sanchez ve arkadaşları diyabetik ayak gelişmiş hastalarda yaptıkları çalışmada ozon tedavisinin etkinliğini değerlendirmişlerdir [167,168]. Bu çalışmada ozon tedavisi uygulanan hastalarda antibiyotik tedavisi alanlara göre yara iyileşmesi hızlanmış, hastanede kalma süreleri kısalmış, glisemi düzeyleri daha iyi kontrol edilebilmiş ve antioksidan enzim düzeyleri artmış olarak bulunmuştur [111]. Ayrıca çeşitli derecelerde artrit ve artroz vakaları ile romatizmal hastalıkları da kapsayan ortopedik hastalıklarda da faydalı etkiler rapor eden araştırmalar dikkat çekmektedir [169-171].

2.7.10. Medikal Ozonun Kullanıldığı Alanlar

Ozon çeşitli hastalıkların tedavisinde farklı uygulama şekilleri ve dozlarda kullanılır. Ozonterapi düşük riskli ve genellikle standart medikal tedavilerin eşliğinde tamamlayıcı, destekleyici ve yeniden yapılandırıcı bir metottur. Romatizmal hastalıklarda (ankilozan spondilit ve romatoid artrit tedavisi) [171,175], hepatitlerin (Hepatit B ve Hepatit C) [172,173], eklem kireçlenmelerinin (artrozlar, eklem sıvısının azalması vs.) [174,175], kemik erimesinin (osteoporoz) tedavisinde ve osteonekrozda kullanılır [176].

Ayrıca kronik yorgunluk ve fibromiyalji [177], özellikle lumbal disk hernisi [125, 178,179], vertigo (baş dönmesi) ve tinnitus (kulak çınlamasının) [180], baş ağrısı [181], multipl skleroz, parkinson gibi dejeneratif sinir sistemi hastalıkları [182,183], hipertansiyon ve kalp hastalıkları [184], Tip 2 diyabet, diyabetik ayak yaraları, kapanmayan yaralar, yanıklar [167,168,185,186], kanser (kemoterapi etkinliğinin artırılması ve yan etkilerinin azaltılması) [187], ülseratif kolit [188], gastrit ve mide ülseri [189], kalp damar hastalıkları, venöz yetmezlik [190-192], akut ve kronik enfeksiyon hastalıkları [193,194], sedef hastalığı, vitiligo, egzema, liken planus, skleroderma, mantar hastalıkları, akne gibi cilt hastalıkları [195], yaşlılığa bağlı görme sorunları (maküler dejenerasyon) tedavisinde kullanılmaktadır [165,166].

2.7.11. Yan Etki ve Kontrendikasyonları

Bazı durumlarda ozon terapisinin uygulanması sakıncalı olabilir. Bu durumlar: glukoz 6 fosfat dehidrogenaz (G-6-PD) enzim eksikliği [196,197], özellikle erken dönem olmak üzere hamilelik, anjiyotensin konvertin enzim (ACE) inhibitörü tedavisi görenler, hipertiroidi, hemofili, kontrol altına alınamayan kardiyovasküler rahatsızlıklar ve ozona reaksiyon gösteren astım ve allerjik hastalıkları olanlarda uygulanması sakıncalıdır [111].

MATERYAL VE METOT

3.1. DeneY Grublarının Oluşturulması

Rat (sıçan) n. ischiadicus'u (siyatik siniri) memeli hayvanlar arasında, elektron mikroskopi düzeyinde bile insan sinir dokusundan ayırt edilemeyen hücre sel detaylara sahip, ucuz ve temini kolay sinir dokusu kaynağıdır [67]. Rat n. ischiadicus'u ve dalları deneysel sinir cerrahisinde ve sinir rejenerasyonu çalış malarında en çok kullanılan sinirlerdir [68,69]. Bu nedenle çalışmamızda yaklaşık 400-450gr ağırlığında 100 adet *Rattus norvegicus* Wistar albino türü genç erkek rat kullanılmıştır. Denekler üzerinde yapılan tüm işlemler ve çalışma protokolü Akdeniz Üniversitesi DeneY Hayvanları Etik Kurul Yönetmeliğine uygun olarak yapılmıştır. DeneY öncesinde bütün ratların normal lokomotor aktivite (yürüme) sergilemeleri kontrol edilmiş, normal olmayanlar deneY grubundan çıkartılmıştır. Bütün bu işlemler tüm gruplarda standart olarak uygulanmıştır. Denekler Akdeniz Üniversitesi DeneY Ünitesi laboratuvarında kafesler içerisinde (standart koşul :12 saat gün ışığı, 12 saat karanlık, havalandırılmalı, sabit ısılı odalarda) bakıma alınmıştır.

Çalışma boyunca sıçanlara, beslenmeleri için standart ticari sıçan yemi ve içme suyu olarak da çeşme suyu verildi. Hayvanlara beslenme ve su tüketimlerinde bir sınırlandırılma yapılmadı, sıçanların istedikleri kadar yem ve su tüketmelerine izin verildi. 100 adet Wistar sıçan rastgele 4 gruba ayrıldı ve 3 farklı işlem uygulandı. Kontrol (n=20) , Sham (n=20), Grup 1 (n=30) ve Grup 2 (n=30) olarak sayıları belirlendi [Tablo 3.1.1 ve 3.1.2]. Tüm grupların belirtilen sürelerde EMG ölçümü, duyu sal ve motor fonksiyon analizi yapıldı.

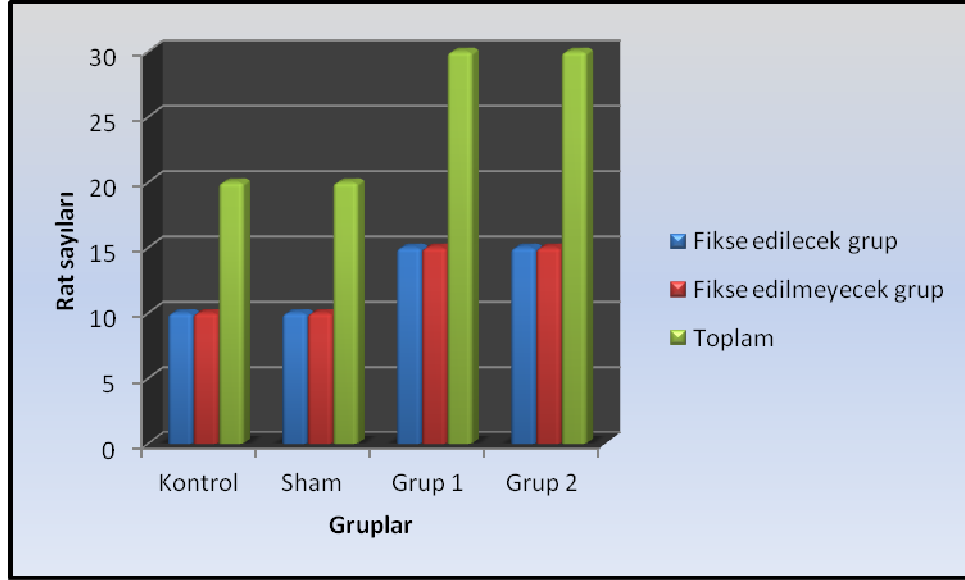
Tablo 3.1.1. Rat gruplarının sayısal dağılımı. Kontrol (n=20) , Sham (n=20), Grup 1 (n=30) ve Grup 2 (n=30) .

Gruplar	Fikse edilen grup	Fikse edilmeyen grup	Toplam
Kontrol	10	10	20
Sham	10	10	20
Grup 1	15	15	30
Grup 2	15	15	30

Gruplar elektron mikroskobik ve biyokimyasal işlemler için 2 ayrı alt gruba ayrılmıştır. Fikse edilen grup, EM (elektron mikroskopi) incelemesi için transkardial perfüzyon işlemine tabi tutulmuştur. Fikse edilmeyen grup ise biyokimyasal analizler için kan ve doku örnekleri alınan gruptur. Bu nedenle Kontrol ve Sham gruplarında denek sayısı fikse edilen ve edilmeyen alt grupta 10'ar tane olarak belirlenmiştir [Tablo 1 ve 2]. Kontrol ve Sham grubu dışındaki denek sayısının her bir alt grupta 15

olmasının nedeni siyatik sinir kesisi uygulanan deneklerin kesi uygulanan ekstremitelere saldırarak yeme davranışı (ototomi) göstermeleridir. Bu davranışı gösteren deneklerin etik açıdan deneyden çıkarılması gerektiğinden yürüme patern analizi yapılabilecek denek sayısı azalacaktır. Bu sebeple her bir alt grupta ototomi davranışını gösterebilecek 5 denek de dikkate alınarak denek sayısı 15 olarak belirlenmiştir [Tablo 3.1.1 ve 3.1.2].

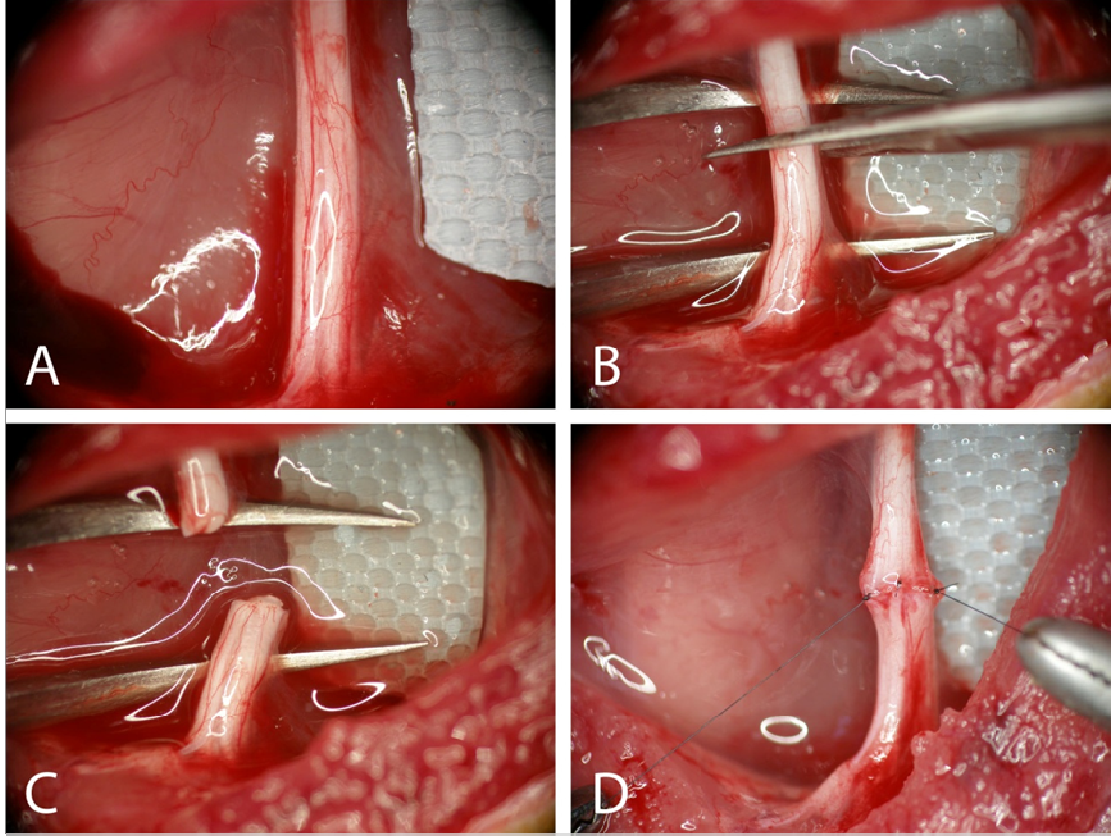
Tablo 3.1.2. Rat sayılarının gruplara göre grafiği.



Kontrol ve Sham grubuna herhangi bir madde enjeksiyonu yapılmadı. Kontrol grubuna sakrifikasyon gününe kadar hiçbir cerrahi işlem uygulanmadı. Sham grubuna çalışmanın başlangıcında ameliyat stresi yaratıldı fakat siyatik siniri cerrahisi yapılmadı. Grup 1'e herhangi bir madde enjeksiyonu olmadan siyatik siniri kesilip dikildi. Grup 2'nin hem siyatik sinirleri kesilip dikildi hem de 5 ml hacim ve 40µg/ml konsantrasyonunda ozon intraperitoneal olarak enjekte edildi. Bu grupta, sıçanlarda siyatik sinirin yapısı ve fonksiyonu üzerine ozonun etkisi değerlendirildi ve diğer gruplarla karşılaştırıldı. Gruplar arasında siyatik sinir fonksiyon indeksi (SFI) karşılaştırması yapıldı.

3.2. Cerrahi İşlemler

Cerrahi işlem öncesinde deneğin, 15 mg/kg XylazinHCl (Rompun®) ve 100 mg/kg Ketamin'in (Ketalar®) intraperitoneal enjeksiyonu sonrası yeterli anestezisi sağlanmıştır. Daha sonra sol arka ayak yeterli oranda tıraşlandıktan sonra, flaster yardımıyla sol arka ekstremitte ve kuyruk sabitlenerek uyluğun arka-yan kısmında longitudinal bir kesi uygulanmıştır. Makas veya pens yardımıyla gluteal kaslar ve biceps femoris kası arasından girilerek sol siyatik sinire ulaşılmıştır. Daha sonra uyluk ortasındaki bir seviyede cerrahi mikroskop altında siyatik sinirin total kesisi (grup 1,2) yapılmıştır [Şekil 4]. Siyatik sinir kesisi uygulanmasından hemen sonra sinir uçları 10.0 dikiş materyali ile koapte edilmiştir.



Şekil 3.1.Siyatik Sinirin Kesisi ve Dikimi. A. Siyatik Siniri Normal Görünümü. B. ve C. Sinir kesisi. D. Sinir Dikimi.

Cerrahi işlem sonrasında cilt derisi 2.0 dikiş materyali ile kapatılmış ve antiseptik solüsyon ile kesi bölgesi silinmiştir. Cerrahi operasyon sonrası ağrının dindirilmesi amacıyla Tramadol HCl (Contramal®) uygulanmıştır. Denekler her kafeste 4 adet olacak şekilde postoperatif bakım odasında sınırsız yem ve su verilerek iyileşmeye bırakılmıştır. Cerrahi işlemin uygulandığı gün 0. gün olarak değerlendirilmiştir. Tüm değerlendirme testleri bittikten sonra (8. hafta) EMG ölçümlerini takiben siyatik sinir kesisinin uygulandığı yerin distal bölümü alınarak biyokimyasal ve ultrastrüktürel analizde kullanılmıştır.

3.3. Ozon Terapisi

Ozon, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon Anabilim dalı Algoloji (Ağrı Bilimi) Ünitesinin izni, bilgisi ve kontrolü dahilinde 'Hermann model' ozon jeneratörü tarafından temin edildi [Şekil 3.2.1. ve Şekil 3.2.2].



Şekil 3.2.1. Ozon hazırlanmasında kullanılan HERMANN model ozon jeneratörü.

Ozon %0,05-5 O₃; %95-99,95 O₂ olacak şekilde HERMANN model ozon jeneratöründe hazırlanmıştır. Jeneratör istenen ozon konsantrasyonuna ayarlanır ve üretilir. Ozonizerın çıkışına bir şırınga oturtulur ve hava ile karışmasından kaçınmak gerekir. Kesi sonrası tedavi uygulanan gruba (Grup 2) 2 ay süre ile intraperitoneal olarak ilk ay her gün, 2.ay haftada 2 kez her sıçana 35-40 ug/ml konsantrasyon ve 5 ml hacim ozon intraperitoneal yolla enjekte edilmiştir.



Şekil 3.2.2. Enjektörün ozon jeneratöründe yerleştirildiği yer ve ozon konsantrasyon ($\mu\text{g}/\text{ml}$) ve hacminin (ml) ayarlandığı kısım.

3.3.1. Kontrol Grubu

Bu grupta herhangi bir cerrahi işlem ve ozonterapi yapılmadan denekler 8 hafta boyunca yaşatılıp, değerlendirme testleri ve EMG ölçümleri yapıldıktan sonra siyatik sinir dokuları alınmıştır ve diğer gruplarla karşılaştırılmıştır.

3.3.2. Sham Grubu

Bu grupta, herhangi bir cerrahi işlem ve ozon enjeksiyonu yapılmamıştır; sadece ameliyat stresi yaratılmıştır. Sakrifikasyon gününe kadar yaşatıldıktan sonra sinir dokuları alınmıştır ve diğer gruplarla karşılaştırılmıştır.

3.3.3. Grup 1 (Kesi grubu)

Bu grupta, siyatik sinir kesisi uygulandıktan sonra sinir uçları 10.0 dikiş materyali yardımıyla epinöral olarak onarılmış. Daha sonra denekler postoperatif bakım odasında sakrifikasyon gününe kadar yaşatılmıştır. Bu gruba cerrahi işlem uygulanmış fakat ozon enjeksiyonu yapılmamıştır.

3.3.4. Grup 2 (Kesi+ ozon grubu)

Bu grupta, siyatik sinir kesisi uygulandıktan sonra sinir uçları 10.0 dikiş materyali yardımıyla epinöral olarak onarılarak ozon+oksijen (HERMANN model ozon jeneratörü tarafından hazırlanarak) verilmiştir. Cerrahi işlem uygulandıktan hemen sonra 08.05.2013 tarihinden itibaren 1 ay düzenli olarak her gün 35-40 µg/ml konsantrasyonda her bir sığana 5 ml hacimde olacak şekilde ozon intraperitoneal olarak verilmiştir. İkinci ayda 08.06.2013 tarihinden itibaren ise haftada 2 kez intraperitoneal olarak ozon enjeksiyonu yapılmıştır. Özellikle ozon'un jeneratörden alındıktan kısa bir süre sonra uygulanmasına dikkat edilmiş, hava ile teması engellenmiştir. Enjeksiyondan önce ve enjeksiyon sırasında içi ozon+oksijen ile dolu 20 veya 10 cc lik enjektörler 35-40 µg/ml'lik ozon konsantrasyon seviyesini azaltmamak için güneş ışığı geçirmeyen, buz kalıpları barındıran çantada muhafaza edilmiştir. 8.haftanın sonunda deneklere tüm gruplara uygulanan değerlendirilme testleri ve EMG analizi yapılmış olup sakrifiye edilerek sinir dokuları alınmıştır.

3.4. Değerlendirme Testleri

3.4.1. Motor Fonksiyon Testi (Yürüme Patern Analizi)

Siyatik sinir rejenerasyonunun fonksiyonel olarak izleminde çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemlerin günümüzde kullanılanları arasında siyatik sinir fonksiyon indeksi, başparmak yayılma testi, ekstensör postural zorlama, nosiseptif fonksiyon testi, gastrokinemius ve soleus ağırlık ve/veya hacim ölçümü ve kinematik ölçümler sayılabilir [208,209].

Bu çalışmada deneklerin sinir rejenerasyonunun klinik takibinde Siyatik Sinir Fonksiyon İndeksi (SFI) kullanıldı. Yürüme analizi 60 cm uzunluğunda, 7.8 cm genişliğinde, 10 derecelik eğime sahip bir yürüme bandı üzerinde yapıldı [Şekil 3.3.a-c.].



Şekil 3.3.a-c. Siyatik fonksiyon indeksini (SFI) elde etmek için yapılan yürüme analiz testi değerlendirmesinde kullandığımız ve hazırladığımız düzenek. a. foot print analiz düzeneği yandan, b. üstten, c. iç kısmından görüntüsü.

Denekler bu koridorda yürümeye alıştırdıldı ardından kağıt ve damga düzeneği kullanılarak yürüme analizleri yapıldı. Bu yöntemde 8,2cm×42cm boyutlarında beyaz kağıt yürüme koridoruna yerleştirildi. Deneklerin her iki arka ayağı çini mürekkebi konulmuş mürekkep tablasına bastırılarak yeteri kadar boyandıktan sonra, yürüme koridorunda serbestçe yürümelerinin ardından beyaz kağıda çıkan ayak izleri alındı [Şekil. 3.3.a.b.]. Bu izler kullanılarak Bain ve ark. tarafından 1989’da modifiye edilen formül ile SFI değerleri hesaplandı. SFI değerinin hesaplanmasında üç farklı parametre kullanılarak değerlendirmeler yapılmıştır (**PL**: topuk ile üçüncü parmağın uç kısmı arasındaki mesafe, **TS**: birinci ve beşinci ayak parmakları arasındaki mesafe, **ITS**: ikinci ve dördüncü parmaklar arasındaki mesafe). Bu yöntemde yüzde olarak sonuç elde edilmekte ve 0 civarındaki sonuçlar normal siyatik sinir fonksiyonunu gösterirken 100 civarındaki sonuçlar tam kesiyi ifade etmektedir. Yürüme patern analizi için 1.gün, 2.hafta, 4.hafta, 6.hafta, 8.haftalarda alınan ayak izleri kullanılarak siyatik fonksiyon indeksi hesaplanmıştır.

3.4.1.1. SFI Saptanması

Bain ve ark. tarafından önerilen SFI hesaplama formülü:

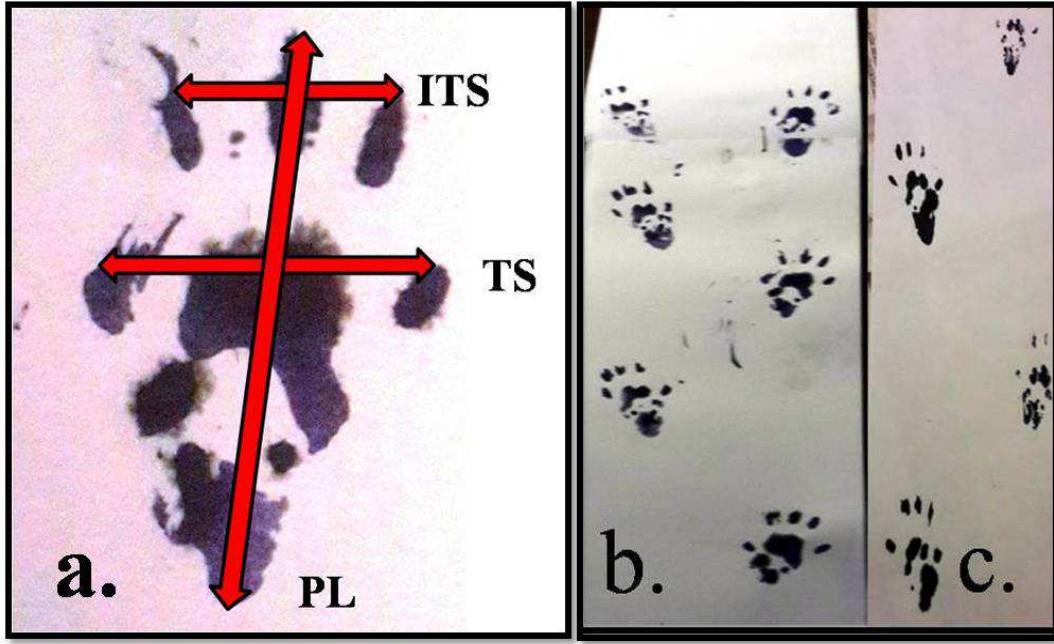
$$\text{SFI} = -38,3 \times \text{PLF} + 109,5 \times \text{TSF} + 13,3 \times \text{ITF} - 8,8$$

Burada;

- **PLF (print length factor) = (DeneySEL PL – Normal PL) / Normal PL**
- **TSF (toe spread factor) = (DeneySEL TS – Normal TS) / Normal TS**
- **ITF (intermediary toe spread factor)=(DeneySEL IT-Normal IT)/Normal IT**

- **PL:** Topuklar ve üçüncü ayak parmakları arası mesafe
- **TS:** Birinci ve beşinci parmak arası genişlik
- **IT/ITS:**İkinci ve dördüncü ayak parmakları arasındaki mesafedir [Şekil 3.4.a-c].

Çalışmada tüm denekler için 1.gün, 2.hafta, 4.hafta, 6.hafta, 8.hafta sonunda SFI hesaplandı. Belirtilen zamanlarda gruplar arasındaki fark ve her grup için iki farklı zaman aralığı arasındaki farklar değerlendirildi.



Şekil 3.4.a-c. Sıçan ayak izleri kullanılarak elde edilen ölçümler. a. **PL:** Topuklar ve üçüncü ayak parmakları arası mesafe. **TS:** Birinci ve beşinci parmak arası genişlik . **IT/ITS:**İkinci ve dördüncü ayak parmakları arasındaki mesafedir. b. ve c. Yürüme koridorunda deneklerin ayak izlerinin alınması.

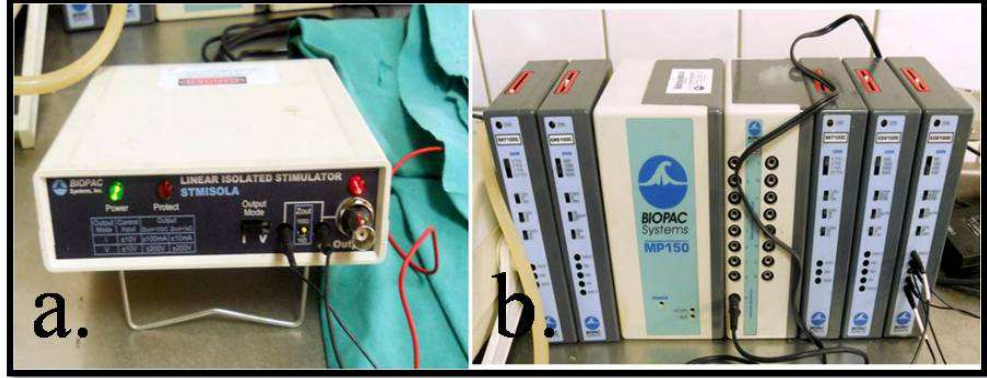
3.4.2. Duyusal Fonksiyon (Pinch) Testi

Duyusal fonksiyon, pinch testi ile analiz edilmiştir. Bunun için denek fazla strese maruz bırakılmadan nazik bir şekilde tutulmuş ve ayak taban derisi sinir kesisi uygulamasında kullanılan bir penset yardımıyla kısıtılmıştır. Buna geri çekme refleksi (foot withdrawal) ile cevap veren rat sayıları Grade 0,1,2,3 olarak her grup için 1.gün, 2.hafta, 4.hafta, 6.hafta, 8.haftalarda kaydedilmiştir.

3.4.3. Elektrofizyolojik Analiz

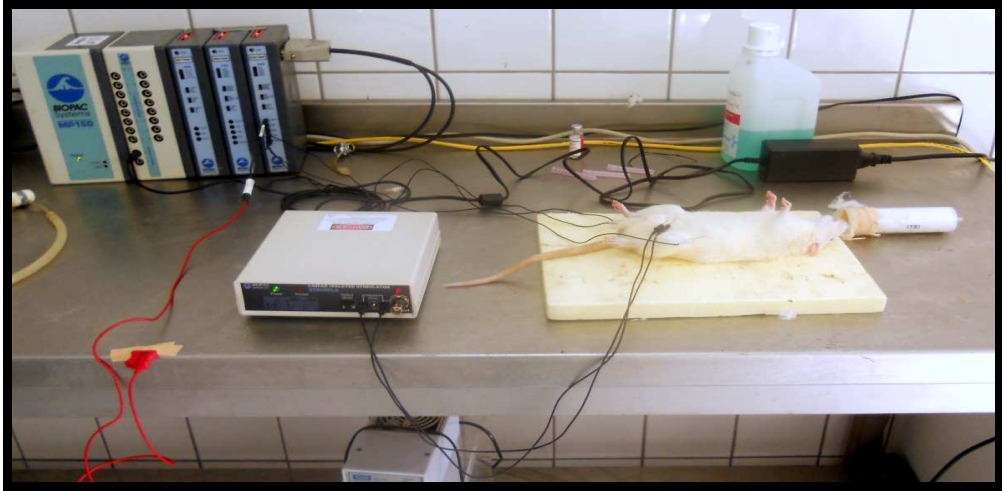
Elektrofizyolojik çalışmalar siyatik sinir üzerinde standart metot kullanılarak gösterilmiştir. Çalışmada yer alan her gruptan tüm deneklere 1.gün ve 8. hafta sonunda elektrofizyolojik testler uygulandı. Testler Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Bakım ve Üretim Ünitesinde BIOPAC Systems, MP 150 model EMG (Elektromiyografi) cihazı ve Linear isolated stimülatör stmilosa ile yapıldı [Şekil 3.5.1.a,b.]. Deneklere EMG analizi öncesi etanol verildi. Emg

sonuçlarını etkileme (değiştirebilme) ihtimali hesaba katılarak hiçbir deneğe xylazine ve ketamine uygulanmadı.



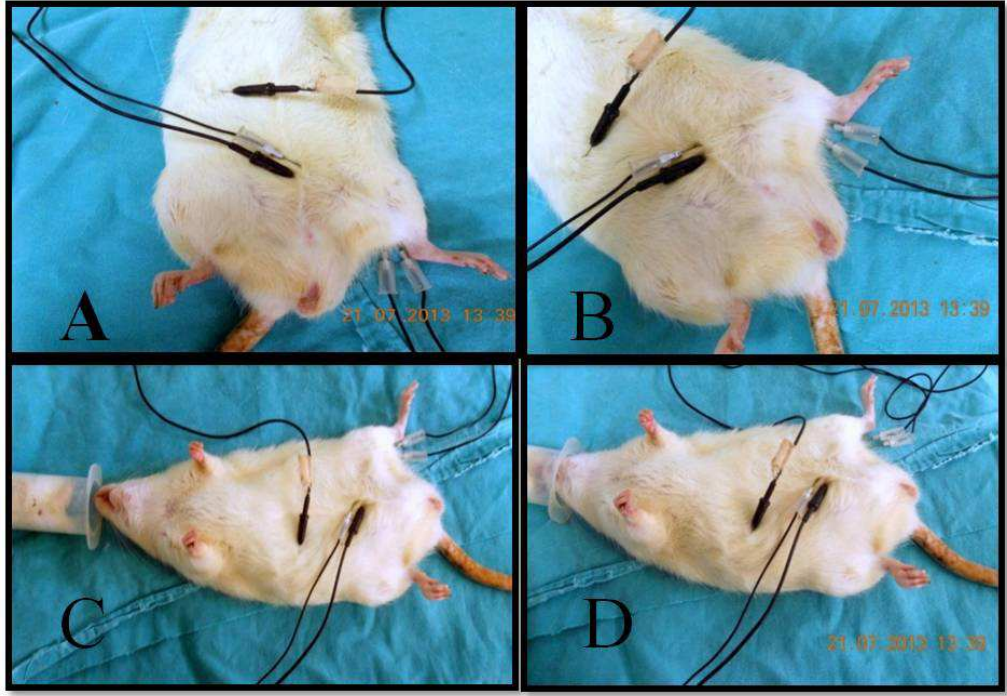
Şekil 3.5.1.a,b. BIOPAC Systems. a. Linear isolated stimulator stmilosa. b. MP 150 model EMG (Elektromiyografi) cihazı.

Siyatik siniri uyluk bölgesinden uyarılarak, kayıtlar ve uyarım paslanmaz çelik derialtı (subcutan) elektrotlar kullanılarak sağlanmıştır. Sinyallerin yükseltilmesi, elektronik ortama aktarılması ve stimülasyonun verilmesi için elektrofizyolojik ölçümler bilgisayar destekli MP150 sinir ileti hızı ölçüm kiti (Biopac systems, Inc., USA) kullanılarak yapıldı [Şekil 3.5.2.].



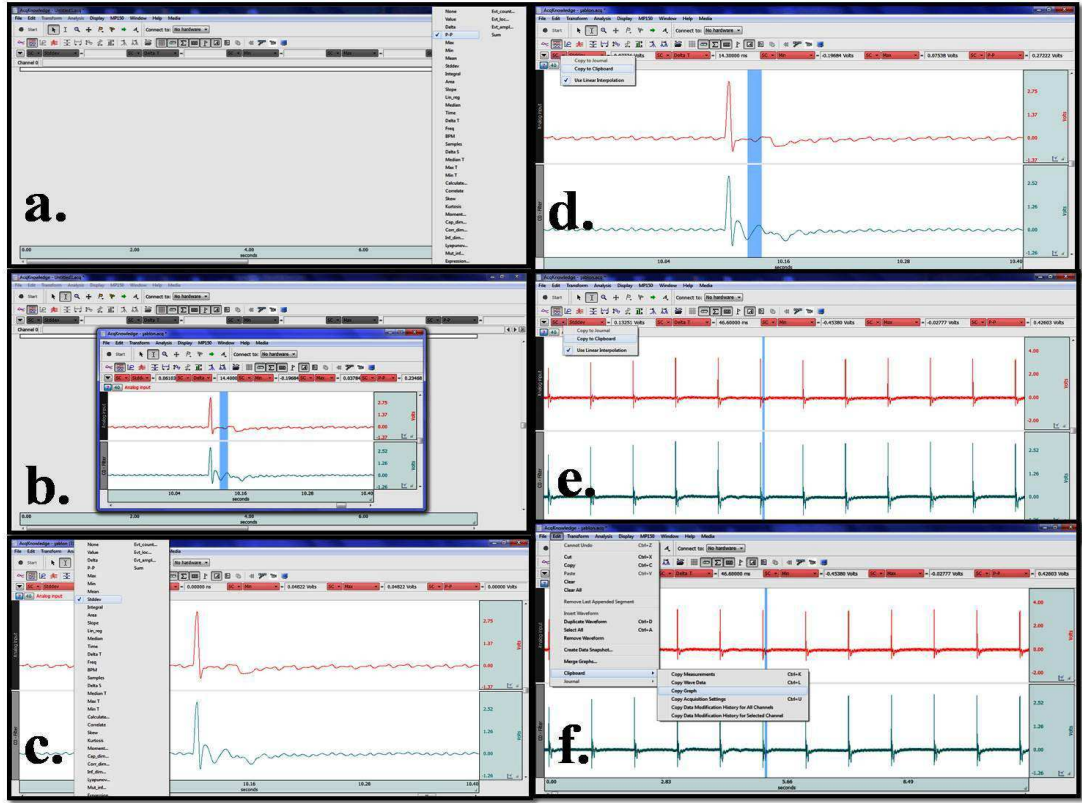
Şekil 3.5.2. Alınan sinyallerin bilgisayara aktarılması için kurulan düzenek.

Deneğin sakral bölgesine deri altına topraklama için iğne elektrot yerleştirildi. Uyarı veren kanca şeklindeki elektrot incisura ischiadica'dan yaklaşık 10 mm distale ve kesim yapılan alanın 5 mm proksimaline yerleştirildi. Kayıt elektrotları olan iğne elektrotlar ise, sol taraf n.ischiadicus (siyatik siniri) 'un seyrine göre subkutan olarak yerleştirildi [Şekil 3.5.3.].



Şekil 3.5.3. İğne elektrotların sırasıyla (A,B,C,D) subkutan yerleştirilme aşaması.

EMG kayıtları, 1 miliamper akım aralığında, %0-%100 arasında akım hızı arttırılıp azaltılarak her bir grup için supramaksimal uyarı eşikleri bulunduğundan sonra alındı. Çizdirilen aksiyon potansiyeli eğrilerinde uyarıdan defleksiyonun başladığı zamana kadar geçen süre, yani 'latans' değerleri, oluşan potansiyelin tepe-tepe amplitüdü (p-p amplitüt) ve maksimal pozitif yöndeki tepe-taban pik değerleri (p-max.- p-min.), standart deviasyon, delta t, mean değerleri ACQ Knowledge 4.1 programı ile analiz edildi. [Şekil 3.5.4.a-f].



Şekil 3.5.4.a-f. ACQ Knowledge 4.1 Programı İle EMG Analizi. Sırasıyla **a.** İstenen Değerlerin Seçilmesi. **b.** P-Max., P-Min. Değerlerinin Seçilip Okutulması. **c.** Standart Deviasyon ve Delta T değerlerinin Seçilip Okutulması. **d.** Parametreler Okutulduktan Sonra Değerlerin Excel'e Kayıt Aşaması. **e.** Dalga Formlarının Horizontal Kaydı. **f.** Grafiğin Kopyalanıp Kaydedilme Aşaması.

Kontrol ve Sham gruplarındaki deneklerin sağlam sol taraf sinirlerinden, Grup1 ve Grup 2 deki deneklerin ise siyatik siniri kesim ve dikim işlemi uygulanmış olan sol taraf sinirlerinden ölçülen aksiyon potansiyeli eğrileri çizdirilerek ortalama değerler alındı ve bu değerler istatistiksel olarak birbirleri ile karşılaştırıldı.

3.4.4. Biyokimyasal Değerlendirme

3.4.4.1. Lipid Peroksidasyon Seviyelerinin Ölçümü

Bütün deney gruplarından tedavi bitiminde alınmış olan tam kan (kardiak puncture) örneklerinden plazma ayrılmıştır ve sıvı nitrojen tankına aktarılıp hemen dondurularak -80°C 'de analiz edilene kadar saklanmıştır. Sinir dokusunda lipid peroksidasyonunun ölçümü için deneklerin sakrifikasyonu sonrası siyatik sinir diseke edilerek sıvı nitrojende dondurulmuş ve -80°C 'da analiz edilene kadar saklanmıştır. Ölçüm öncesinde sinir dokuları 1 mM EDTA içeren 50 mM soğuk K_2HPO_4 (pH= 7) tamponunda, buz üzerinde (Biofuge15R, Heroeus, Germany) homojenize edilmiştir. Elde edilen homojenatlar 4°C 'da, 10000 x G'de , 15 dakika, santrifüj edilerek ve elde edilen süpernatantlarda lipid peroksidasyonu analiz edilmiştir. Araştırmamızda lipid peroksidasyonunu değerlendirmek için, tiyobarbitürik asit reaktif ürünleri (TBARS) oluşumuna bakılmıştır. Tiyobarbitürik asit lipid peroksidasyon son ürünü olan

malonildialdehit (MDA) ile etkileşime girmektedir. TBARS yöntemi, ölçülen ürünlerin çoğunluğunu MDA teşkil etmesi, çok basit ve hızlı olması nedeniyle tercih edilen bir yöntemdir.

Prensip

Bu metod'un temel prensibi, lipid peroksidasyonunun son ürünü olan MDA'nın, 2-tiyobarbitürik asit (TBA) ile reaksiyona girmesi ve oluşan bileşiğin butanol fazına ekstrakte edilerek 525 nm eksitasyon ve 547 nm emisyon dalga boyunda spektrofotometrik olarak okunması esasına dayanır.

Reaktifler

- 1- 29 nm tiobarbitürik asit (Sigma-T5500): 0.418 g TBA, 50 ml distile su ve 50 ml glacial asetik asit (Aceticacidglasialetrapure, Merck-56) içinde çözülür.
- 2- 5 M HCl (Hydrochloricacid, Merck-314).
- 3- n-Bütanol (n-Butanol, Merck-329).
- 4- Standart solüsyonu: Tetraetoksipropan (1,1,3,3-tetraethoxy-propane, Sigma-T9889). Stok solüsyonundan distile su ile sulandırılarak hazırlanmıştır.

İşlemler

1 ml distile su içeren tüpe 50 µl doku süpernatantı veya 200 µl plazma konulduktan sonra, 1 ml tiobarbitürik asit (TBA, 29 mmol/L) eklenmiştir. Tüp iyice karıştırıldıktan sonra, 1 saat süreyle 95-100 °C arasında kaynatılmıştır. Numuneler soğutulduktan sonra 25 µl HCl (5 mol/L) ve 3.5 ml n-bütanol eklenerek vortekslenmiş ve bu işlemi takiben 3000 x g'de 10 dakika santrifüj edilerek, bütanol fazı ayrılmıştır. Bütanol ekstraktının floresansı, eksitasyon dalga boyu 525 nm, emisyon dalga boyu 547 nm olarak spektrofotometrede (Perkin Elmer Luminescence spectrometer, LS45'de) okunmuştur.

3.4.4.2. TBARS Miktarının Hesaplanması

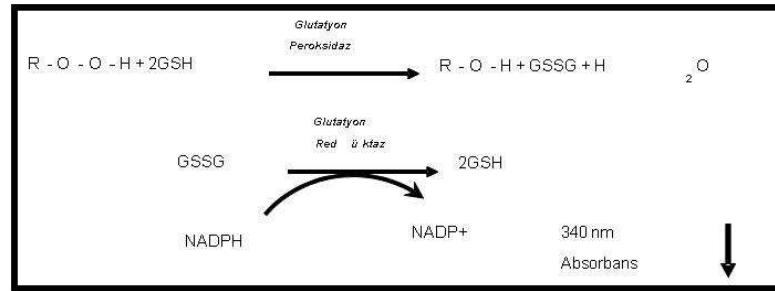
1,1,3,3,-tetra-metoksi-propan standardı numune gibi çalışılmış ve standard grafiği oluşturulmuştur. Doku ve plazma TBARS miktarı bu grafik yardımıyla hesaplandıktan sonra nmol/g protein olarak rapor edilmiştir.

3.4.4.3. Antioksidanların Tayini

Bütün deney gruplardan tedavi bitiminde alınacak tam kan örneklerinden plazma ayrılarak ve sıvı nitrojende hemen dondurularak -80°C'da analiz edilene kadar saklanmıştır. Bu örneklerde aşağıda belirtilen şekilde antioksidan enzimlerin ölçümü yapılmıştır. Sinir dokusunda antioksidanların ölçümü için deneklerin sakrifiyonu sonrası siyatik sinir diseke edilerek sıvı nitrojende dondurulmuş ve -80°C'da analiz edilene kadar saklanmıştır. Ölçüm öncesinde sinir dokuları hazırlanan tamponlarda, buz üzerinde homojenize edilmiştir. Elde edilen homojenatlar 4°C'da, 10000 xG'de 15 dakika, santrifüj edilmiş ve elde edilen süpernatantlarda antioksidan enzimler analiz edilmiştir.

3.4.4.4. Glutasyon Peroksidaz Enzim Aktivite Tayini

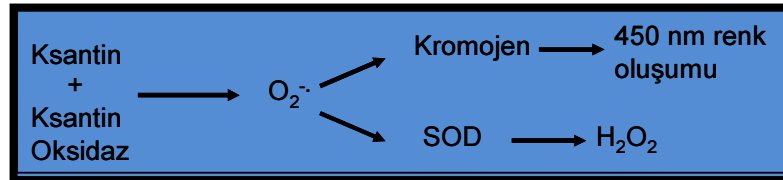
Glutasyon peroksidaz enzimi, H_2O_2 dahil tüm hidroperoksitlerin redüksiyonunu sağlar. Bu işlevi sırasında da redükte glutasyonu kullanır. Oluşan okside glutasyon, glutasyon redüktaz enzimi ile tekrar indirgenir. Bu indirgenme sırasında NADPH kullanılır ve $NADP^+$ oluşur. NADPH'nın reaksiyon ortamından kaybı 340 nm'de absorbans azalmasına neden olur ve bu azalmanın miktarından GPx enzim aktivitesi tayin edilir. Glutasyon peroksidaz enzim aktivitesinin hesaplanması, NADPH'nın 340 nm'deki extinction coefficienti ($0.00622 \mu M^{-1}$) değerinden yapılır. Bir ünite GPx aktivitesi, 1 dakikada kullanılan μmol NADPH olarak hesap edilir [Şekil 3.6.].



Şekil 3.6. Glutasyon peroksidaz enzim aktivitesinin tayin yöntemi.

3.4.4.5. Süperoksit Dismutaz Enzim Aktivite Tayini

Süperoksitdismutaz enzim aktivite tayini kompetatif inhibisyon yöntemine dayanmaktadır. Bu yöntemde, reaksiyon ortamında sürekli olarak süperoksit anyonu oluşturan ksantinoksidaz-hipoksantin sistemi mevcuttur. Bu sistemin açığa çıkardığı süperoksit anyonları reaksiyon ortamına ilave edilen kromojeni indirger ve 450 nm'de ölçülebilen renk oluşumuna neden olur. Hasta örneklerinde ne kadar SOD enzimi varsa, renk oluşumu o kadar az olacaktır [Şekil 3.7.].

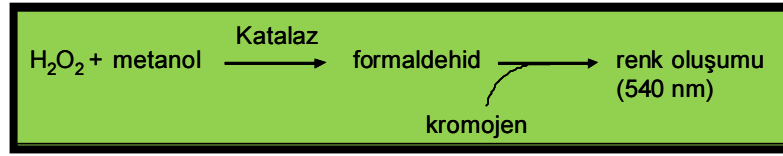


Şekil 3.7. SOD enzim aktivitesinin tayin yöntemi.

Örneklerdeki SOD enzim aktivitesinin hesaplanması, oluşturulacak SOD standard eğrisiyle yapılır. Bir ünite SOD aktivitesi, maksimum renk oluşumunu %50 inhibe eden SOD miktarı olarak kabul edilir.

3.4.4.6. Katalaz Enzim Aktivite Tayini

Katalaz enziminin hem katalitik, hem de peroksidatik aktivitesi mevcuttur. Katalitik aktivite H_2O_2 'i moleküler oksijene ve suya çevirir. Peroksidatik aktivite ise düşük moleküler ağırlıklı alkollerini okside ederek su oluşturur. Hidrojen peroksiti parçalayan tek enzim katalaz değildir ama alifatik alkollerini substrat olarak kullanan tek enzim katalazdır [Şekil 3.8.].



Şekil 3.8. Katalaz enzim aktivitesinin tayin yöntemi.

Katalaz enzim düzeyleri tayin edilirken bu nedenle enzimin peroksidatik aktivitesine bakılmıştır. Ortama alkol olarak metanol konulmuş ve oluşan formaldehid Purpald kromojeni ile reaksiyona sokularak renk oluşumu tayin edilmiştir [Şekil 3.8.].

Katalaz enzim aktivitesinin hesaplanması oluşturulacak formaldehid standard eğrisiyle yapılır. Bir ünite katalaz aktivitesi, 1 dakikada oluşan μmol formaldehid olarak hesap edilir.

3.4.5. Deneklerin Sakrifikasyonu

Deneklerin 15 mg/kg XylazinHCl (Rompun®) ve 100 mg/kg Ketamin'in (Ketalar®) intramuskuler injeksiyonu ile yeterli anestezisi sağlandıktan sonra göğüs bölgesi açılarak kalbe ulaşılmıştır. Transkardiyal perfüzyon işlemi için, kalbin sol ventrikülüne bir kanül yardımıyla girilip sağ atrium'a bir delik açılmıştır. Transkardiyal perfüzyon için 250 ml heparinize serum fizyolojik ile vasküler yatak yıkanarak temizlendikten sonra aynı yolla tespit solüsyonu verilmiştir. Fiksasyon basamağında her bir hayvan için 250 ml 0.1 M fosfat tamponunda hazırlanmış %4 paraformaldehit ve %2 glüteraldehit karışımı kullanılmıştır.

3.4.6. Ultrastrüktürel Değerlendirme

3.4.6.1. Elektron Mikroskopik İnceleme

Deneklerin sakrifasyonu sonrası siyatik sinire yukarıda tarif edilen yolla ulaşarak, siyatik sinir ve ilgili periferik sinir bölümü, dokuya zarar vermeden diseke edilerek hazırlanmış %4'lük Glüteraldehit (0,1 M SFT tamponunda hazırlanmış) solusyonunda 4 °C de 2 saat (sinir dokusu alındıktan sonra 1 saat glüteraldehitte bekletildi daha sonra trimleme yapıp aynı glüteraldehit şişesinde 1 saat daha bekledi) süreyle fikse edilmiştir. Daha sonra 3x10' lık süreyle oda sıcaklığında 0.1 M SFT (Sorensen fosfat tamponundan) 'den geçirilmiştir. Her 10 dakikada bir rotatordan geçirildi. SFT solüsyonu ile yıkama işlemi yapılmıştır.

Bunu takiben aynı tamponda yıkanan örneklerin %1'lik osmium tetraoksit (OsO_4) solusyonunda 2 saat süre ile rotatora bırakılmıştır ve postfiksasyonu sağlanmıştır. 2 saat sonunda SFT solüsyonu ile tekrar 3x10' lık süreyle oda sıcaklığında her 10 dakikada bir rotatordan geçirilerek yıkama işlemi yapılmıştır. Örnekler %30'dan başlayan yükselen etil alkol serilerinden geçirilmiştir. %30, %50, %70 etil alkol serilerine +4°C'de 3x10' süreyle bırakılmıştır. Dehidratasyonları sağlanıp %70 lik seri bittikten sonra 1 saat süreyle uranil asetat'a (ön boyama amacıyla ,en bloc staining) bırakılmıştır. 1 saat sonunda örnekler tekrar %80, %90, %96 ve %100'lük artan alkol serilerinden +4°C'de 3x10' süreyle geçirilmiştir. Son dehidratasyonları sağlandıktan sonra propilen oksite +4°C'de 2x10' süreyle bırakılmıştır. Bu sırada karışım hazırlanmıştır. Karışım 1:1 oranında, 1.araldit ve 1

propilen oksit şeklinde hazırlanmış olup 1.Araldit ise 50 ml Araldite ana karışımı ile hızlandırıcı olarak 1 ml BDMA karıştırılarak hazırlanmıştır.

Örnekler 20 dakika beklendikten sonra karışımda (ara çözeltilde) 2-4 saat süre ile rotatora bırakılmıştır. Süre bitince 1.Araldite alınıp ve bu aşamada şişeler değiştirilmiştir. Araldit içerisine dokular konulurken önce fikse aralditin gitmesi için tahta bir çubuk yardımıyla filtre kağıdına konulup sonra araldit içerisine alınmış ve yeni şişelerin üzeri etiketlenmiştir. Yeni kapakları takılıp, rotatora 25 °C'de 1 gün beklemesi için bırakılmıştır. Ertesi gün Araldite CY212 (Araldite M) içine gömülerek bloklama yapılmıştır. 60 °C ye ayarlı etüve 48 saat süre polimerizasyon için bırakılmıştır. Elde edilen bloklardan ultramikrotomla alınan 300 nm lik yarı ince kesitler toluidin mavisi ile boyanarak ışık mikroskopta; ince kesitler almak için daha spesifik trimleme yapılmış ve ultramikrotomda 70 nm lik ince kesitler alınmıştır. Kontrastlama işlemine uranil asetatla başlanmış ve kesitler uranil asetatla 5 dakika bekletilmiştir. Önce distile su ile yıkanmış ardından kurşun sitrata alınmıştır. Kurşun sitrat damlaları üzerinde 5 dakika bekletilen kesitler tekrar distile su ile yıkanmıştır ve suyu alınmış kesitler gri saklama kutusuna alınmış ve elektron mikroskopik analiz için uygun hale gelmiştir. Elde edilen kesitler Leo906E TEM (geçirimli elektron mikroskop) ile incelenerek fotoğraflanmıştır.

Kullanılan solüsyonlar:

1. 0,2 M Sörensen Fosfat Tamponu (SFT):

13,6 gr Kalium Dihidrojen Fosfat, 500 ml bidistile su içerisinde çözüldü (A solüsyonu).

14,2 gr Disodyum Hidrojen Fosfat, 500 ml bidistile su içerisinde çözüldü (B solüsyonu).

Ardından 1L'lik balon jöje'de A ve B solüsyonları karıştırıldı, ph 7,3 olacak şekilde ayarlandı.

0,1 M Sörensen Fosfat Tamponu (SFT): 0,2 M SFT stok solüsyonu 1:1 oranında bidistile su ile dilüe edilerek hazırlandı.

2. %4'lük Gluteraldehit:

%25'lik stok gluteraldehit'ten 16 ml alınıp, 84 ml 0,1 M SFT eklenerek hazırlanmıştır.

3. Osmiyum Tetroksit (OsO₄): (10x100 mg; TAAB)

4. Uranil Asetat:

1gr uranil asetat, 100ml %75'lik etil alkol içerisinde çözümlenerek hazırlanmıştır.

5. Propilen Oksit: (TAAB)

6. Araldit Ana Karışımı:

91 ml Araldit CY 212 (TAAB)

84 ml DDSA (Dodecenyl Succinic Anhydride; TAAB)

7. 1. Araldit:

50 ml Araldit ana karışımı
1 ml BDMA (Benzylidimethylamine; EMS)

8. %1'lik Toluidin Mavisi:

1 gr Toluidin Mavisi
1 gr Boraks
100 ml distile su

9. Ultramikrotom:

UCT125 Leica Ultramicrotome.

10. Gözlem:

Geçirimli Elektron Mikroskobu: Zeiss Leo-906E TEM.

3.4.7. İstatiksel Analiz

Yürüme patern analizinden elde edilecek veriler her bir grup için SFI olarak (ortalama \pm standart sapma) hesaplanmıştır sonra gruplar arasında istatistiksel anlamlılık için iki ortalama arasındaki farkın anlamlılık testi (student t), SFI verilerinin kaydedileceği günlerde gruplar arasındaki istatistiksel anlamlılık tek yönlü varyans analizi (Post Hoc test olarak Tukey testi) kullanılmıştır. Pinch test verileri Ki-kare testi ile değerlendirilmiştir. Elektrofizyolojik analizden elde edilecek veriler \pm standart hata olarak değerlendirilmiştir. Grupların karşılaştırılmasında Kruskal-Wallis varyans analizi, Çoklu karşılaştırmalarda ise Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. Biyokimyasal analizden elde edilecek plazma ,doku katalaz enzim aktiviteleri, GPx doku aktivitesi, doku SOD aktivitesi, plazma ve doku TBARS verileri, gruplar arasındaki istatistiksel farklılık tek yönlü varyans analizi ve sonrasında Tukey testi ile değerlendirilmiştir. Plazma SOD ve GPX aktivite verileri gruplar arasındaki istatistiksel farklılık Kruskal-Wallis tek yönlü varyans analizi ile değerlendirilmiştir. Tüm istatistiksel analizler için SPSS (versiyon 13.0) programı kullanılarak ve anlamlılık düzeyi tüm testler için 0.05 veya 0.001 olarak belirlenmiştir.

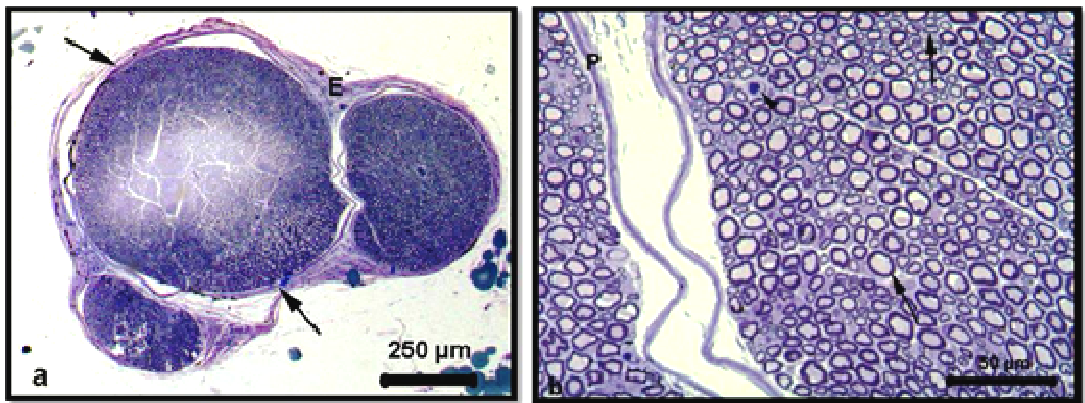
BULGULAR

4.1. Ultrastrüktürel Değerlendirme Bulguları

4.1.1. Kontrol Grubu

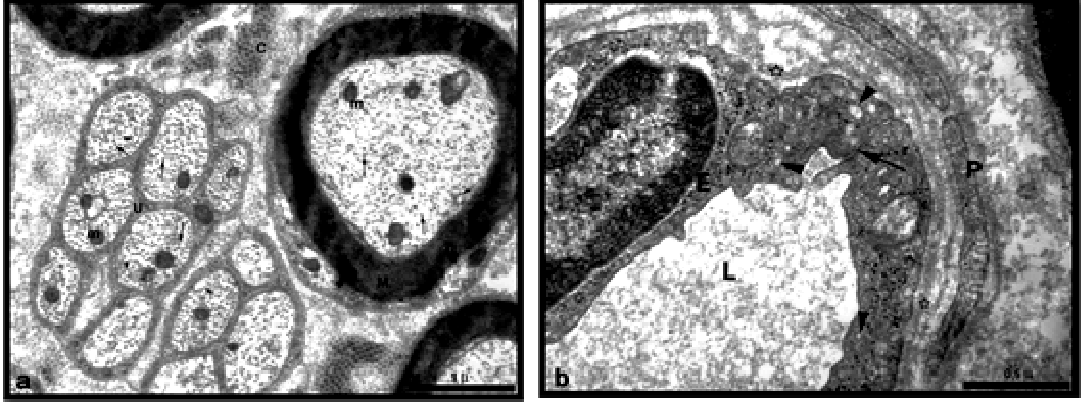
Kontrol grubu yarı-ince plastik kesitlerinde Epinöryum normal yapı gösterirken perinöryum ile ilişkisi bazı alanlarda ayrılma nedeniyle kopmuştu. Aynı ayrılma perinöryum ile endonöryum arasında da izlendi. Hem epinöryumda hem de perinöryumda izlenen bu ayrılmalar preperasyona bağlı artifakt olarak değerlendirildi. Siyatik sinir plastik yarı ince kesitlerinde farklı çaplarda miyelinli sinir lifler ve vasa nervorumlar izlenmekteydi. Sinir gövdesini dıştan bütün olarak saran epinöryum kesintisiz bir şekilde bütün demetleri saracak şekilde izlendi. Siniri oluşturan farklı çaplardaki miyelinli sinir liflerinde herhangi bir deformasyon örneğine rastlanmadı [Şekil 4.1.1.a,b.].

Kontrol grubuna ait örneklerin elektron mikroskopik incelemesinde miyelinli ve miyelinsiz liflerin normal ultrastrüktür sergiledikleri izlendi. Her iki lif tipinde de Schwann hücresi, hücre membranı ve sitoplazmik kompozisyonu bakımından normal görünümdeydi. Miyelin kılıf yapısı kalın ve ince liflerin her ikisinde de normal yapı göstermekteydi. Miyelin kılıf oluşturan Schwann hücresi membran katmanları arasında herhangi bir açılma veya lokal erimelere rastlanmadı. Axolemma miyelin kılıf ilişkisi ve mezakson yapıları normal görünümde olup ayrılmalar izlenmedi. Axoplazmada organeller normal morfoloji sergilemekteydi, nörotübüller ve nöroflamanlar net olarak izlenebiliyordu. Mitokondriyonlar ve düz endoplazma retikulumu normal yapıya sahipti [Şekil 4.1.1.a,b.].



Şekil 4.1.1.a,b. Kontrol grubuna ait siyatik sinirden alınmış yarı-ince plastik kesit mikrofafi. a) Düşük büyütmede sinirin genel görünümü. Epinöryum (E), Perinöryum (oklar). b) Aynı örnekten alınmış daha yüksek büyütmede alınmış mikrofafi. Perinöryum (P), farklı kalınlıklarda miyelinli sinir lifleri (oklar) ve kapiller kesiti (ok başı) izlenmekte. Toluidin mavisi.

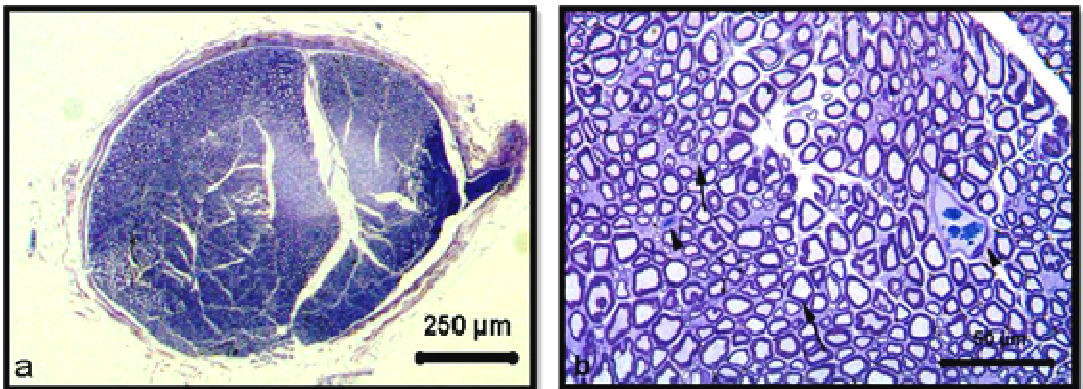
Siniri besleyen endonöral kapiller ultrastrüktüründe endotel ve perisitler normal görünümdeydiler. Endotel sıkı bağlantıları ve çepeçevre uzanan kesintisiz bir bazal lamina izlendi [Şekil 4.1.2.a,b.].



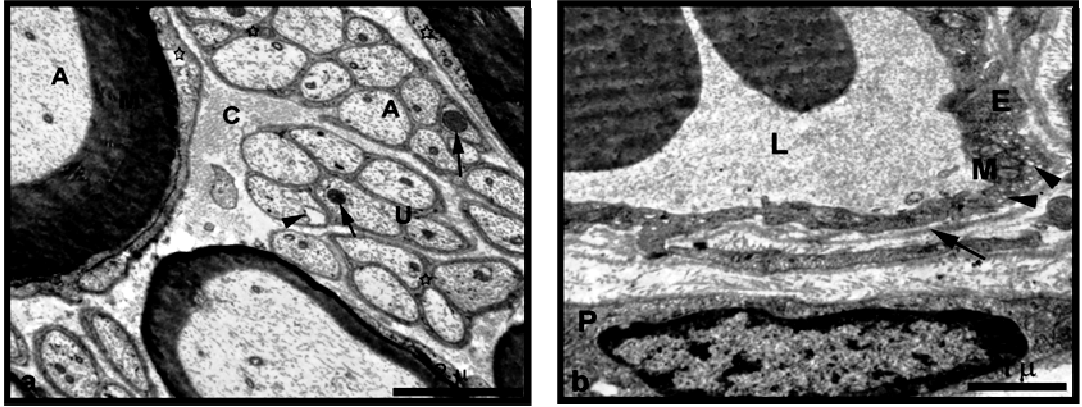
Şekil 4.1.2.a,b. Kontrol grubuna ait siyatik sinir elektronmikrografı. a) Miyelinli (M) ve miyelinsiz (U) sinir liflerinde aksoplazmada mitokondriyonlar (m), düz endoplazmik retikulum kesecikleri (ok başları) ve nörotübüller (oklar) izlenmekte. Bütün yapılar endonöryum ait kollejen liflerince (C) çevrelenmiş durumda. b) Kontrol grubu siyatik sinir endonöryumu içerisinde içerisinde vasa nervorum kesidinde lümeni (L) döşeyen endotel hücreleri arasında sıkı bağlantı kompleksi (ok) ve sitoplazmalarında pinositotik veziküller (ok başları) izlenmekte. Endotel hücrelerini çepe çevre kesintisiz bir bazal lamina (*) ve perisit (p) uzantıları çevrelemekte.

4.1.2. Sham Grubu

Sham grubu örneklerinden alınan yarı ince kesitler incelendiğinde kontrollerle benzer özellikler izlendi. Siyatik sinirde yer alan farklı çaplara sahip miyelinli sinir lifleri ve endonöryal vasa nervorumlar içermekteydi [Şekil 4.2.1.a,b.]. Elektron mikroskopik incelemede siyatik sinir ultrastrüktürü kontrol grubuna benzer özellikler göstermekteydi [Şekil 4.2.2.a,b.].



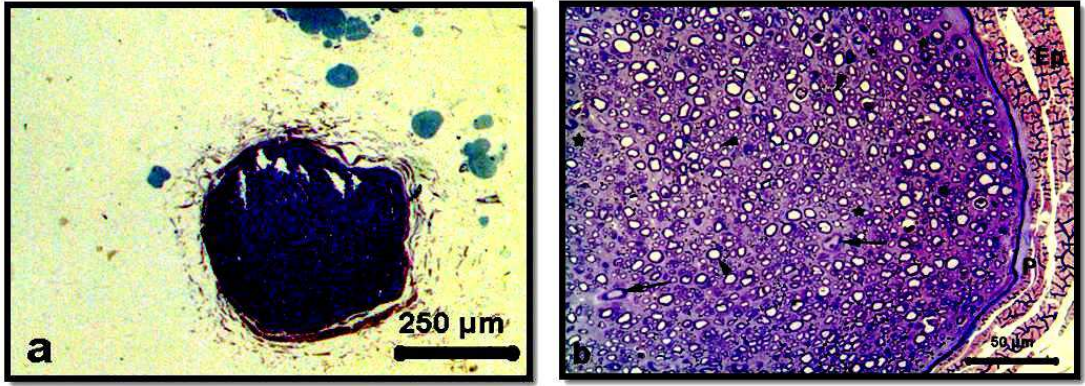
Şekil 4.2.1.a,b. Sham grubuna ait siyatik sinir örneğinden alınan yarı ince kesitin genel görünümü (a). Aynı örnekten yüksek büyütmede alınan ışık mikrografta çeşitli çaplarda miyelinli sinir lifleri (oklar) ve vasa nervorumlar (ok başları) izlenmekte(b). Toluidin mavisi.



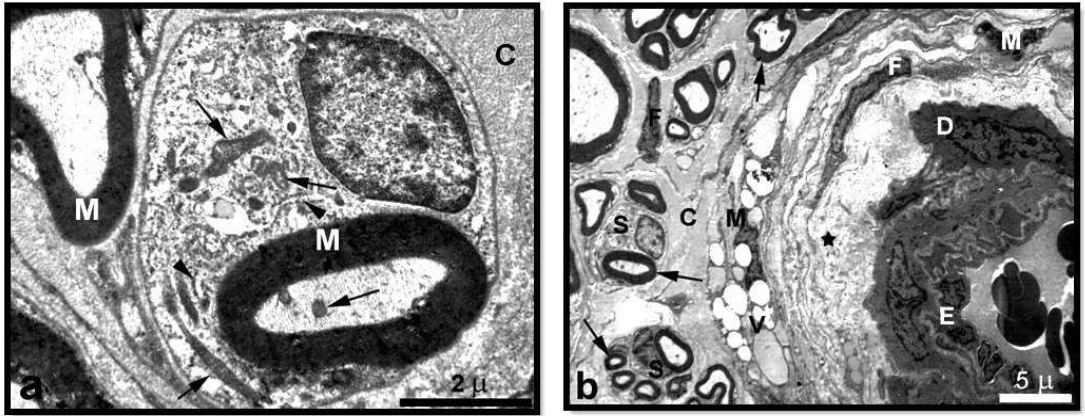
Şekil 4.2.2.a,b. Sham grubuna ait siyatik sinir elektronmikrografı. (a); Miyelinli (M) ve miyelinsiz (U) sinir liflerini çevreleyen ince Schwann hücresi sitoplazmalar (*) ve bunlara ait aksonlarda (A) aksoplazma içerisinde mitokondriyonlar (oklar) ve düz endoplazmik retikulumu (ok başları) kesecikleri ve endonöryuma ait kollejen demetleri izlenmekte (b); Endonöral vasa nervorum kesitinde lümeni (L) çevreleyen, sitoplazmasında bir çok pinositotik vezikülleri (ok başları), mitokondriyonları içeren ve çepeçevre bazal laminayla (ok) çevrelenmiş endotel (E) hücresi izlenmekte. Kapiller çevresinde yer alan perisit (P) görülmekte.

4.1.3. Grup 1 (Kesi Grubu)

Grup 1 deneklerinden alınan örneklerin yarı ince ve elektron mikroskopik incelemelerinde sinirde oluşturulan travmaya bağlı olarak sinir lifi rejenerasyon görüntüleri izlendi. Sinir gövdesi içerisinde farklı çaplarda ve farklı kalınlıklarda kılıfa sahip miyelinli sinir lifleri izlendi. Sinir gövdesi yoğun olarak rejeneratif lifler gösterirken çok az miktarda miyelin kalıntısı ve deformatif miyelinli akson izlendi [Şekil 4.3.1.a,b.]. Elektron mikroskopik incelemede rejenerasyona bağlı olarak miyelinli sinir lifleri çevresinde geniş sitoplazmalı schwann hücreleri izlendi. Bu hücreler normalde herhangi bir travmaya maruz kalmamış kontrol ve Sham gruplarındakilerle karşılaştırıldığında hem daha fazla sitoplazma alanına sahiptiler, hem de sitoplazma, organel bakımından oldukça zengin bir görünüm sergilemekteydi. Miyelinli lifler etrafında normalde çok ince bir hat şeklinde bulunan sitoplazmik alan bu grupta oldukça geniş bir alanı kaplamaktaydı. Schwann hücreleri çok miktarda mitokondriyon, granüllü endoplazmik retikulum, lizozom ve veziküller bulundurmaktaydı. Endonöryum oldukça yoğun bir kollajen demet içeriğine sahipti. Tüm lifler sıkı bir şekilde kollajen lifleri tarafından sarılmaktaydı. Kollajen liflerin oluşturduğu demetler arasında fibroblastların ince uzantıları yer almaktaydı [Şekil 4.3.2.a,b].



Şekil 4.3.1.a,b. Grup 1 deneklerinden elde edilen plastik yarı ince kesit ışık mikrografları. (a); Düşük büyütmede alınmış siniri total olarak gösteren mikrograf. (b); yüksek büyütmede alınmış yarı ince kesit ışık mikrografında siniri oluşturan miyelinli liflerin hemen tamamının rejenerasyon gösterdiği, liflerin farklı çaplara sahip olduğu (ok başları) izlenmekte. Vasa nervorum (oklar), Endonöryum (yıldızlar), Perinöryum (p),Epinöryum (Ep).

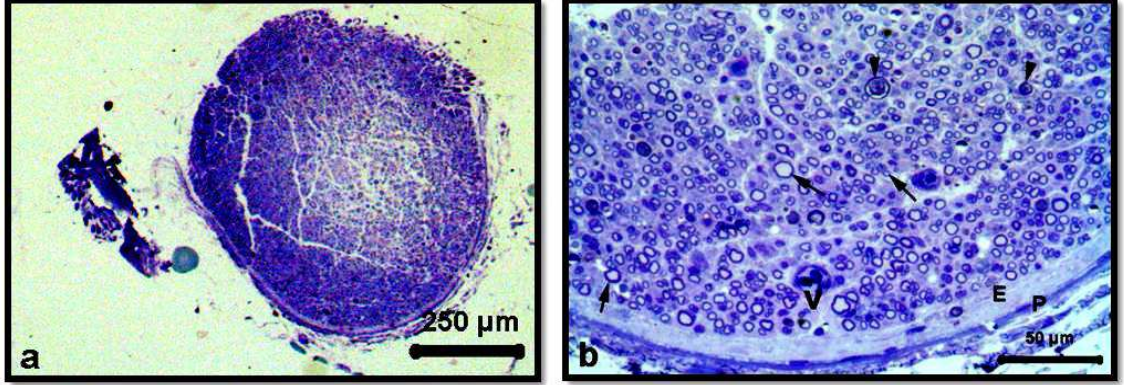


Şekil 4.3.2.a,b. Grup 1 siyatik sinir elektron mikrografları. (a); Endonöral kollejen liflerce çevrelenmiş rejenerasyon geçirmiş ve remiyelinize olan miyelinli aksonlar (M). Schwann hücresi sitoplazmasında mitokondriyonlar (oklar) ve granüllü endoplazma retikulumu (ok başı) izlenmekte. (b) Arteriöl düzeyinde endonöral bir vasa nervorum elektron mikrografı. Endotel hücreleri (E) , düz kas hücresi (D) perivasküler bağ dokusu (Yıldız) fibroblast (F) ve makrofajlar (M) izlenmekte. Endonöral kollejenle (C) çevrelenmiş Schwann hücresi (S) ve miyelinli lifler izlenmekte.

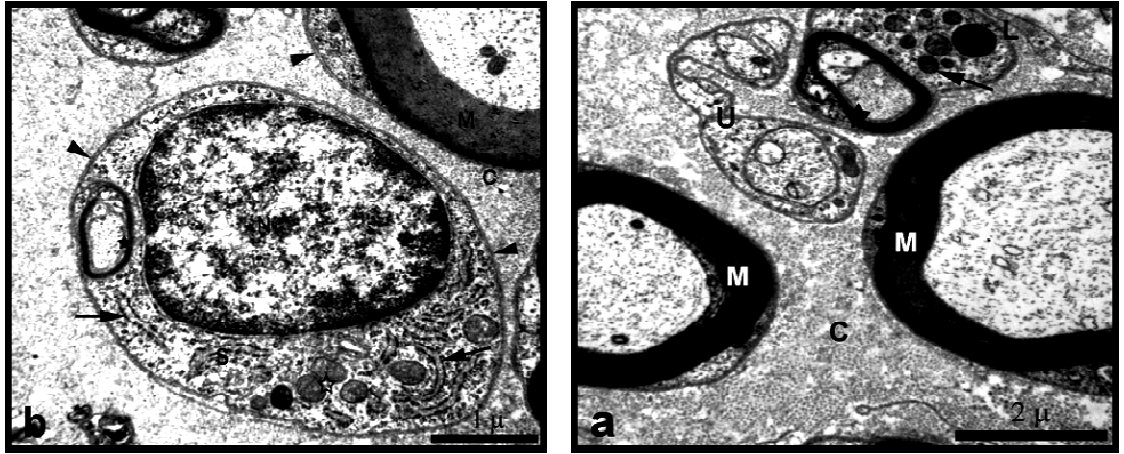
4.1.4. Grup 2 (Kesi + Ozon Grubu)

İkinci gruba ait siyatik sinir örneklerinden alınan plastik yarı ince kesitler incelendiğinde grup 1 örneklerine benzer özellikler izlendi [Şekil 4.4.1.a,b.]. Tüm sinir gövdesi farklı çaplarda rejeneratif remiyelinize aksonlar içermektedir. Tüm kesitte birkaç tane deformasyona uğramış miyelinli lif görüldü. Lifler arası dolduran endonöral bağ dokusu miktarı bu grupta da artmıştı. Schwann hücresi ultrastruktürü Grup 1 örneklerine benzer şekilde aktif sitoplazma özelliği gösteren gelişmiş granüllü endoplazma retikulumu, çok miktarda mitokondriyon ve lizozomlar bulundurmaktaydı [Şekil 4.4.2.a,b.]. Grup 2 örnekleri Schwann hücresi ve

sitoplazmik organel zenginliği dışında Grup 1 örneklerinden ultrastrüktürel olarak dikkat çekici bir farklılık göstermemektedir.



Şekil 4.4.1.a,b. Grup 2 plastik yarı ince kesit ışık mikrofrafı. (a); Düşük büyütmede total sinir enine kesiti. (b); Yüksek büyütmede sinir gövdesinin farklı çaplara sahip rejeneratif miyelinli liflerden (oklar) oluştuğu gözlenmektedir. Bazı alanlarda birkaç dejeneratif miyelinli lif yapısı izlenmektedir (ok başları). Sinir gövdesinde yaygın bir endoneurial yapılanma dikkat çekmektedir (E). Perinörium (P), Vasa nervorum (V).

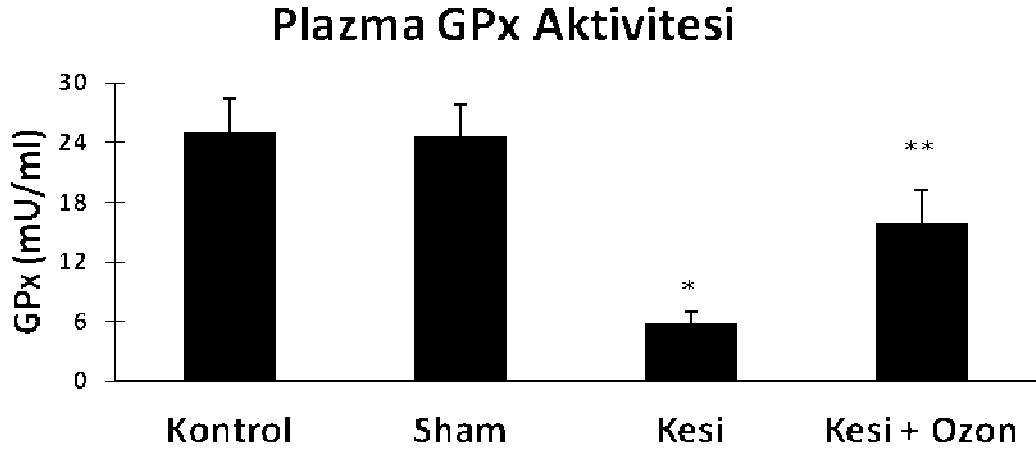


Şekil 4.4.2.a,b. Grup 2 örneklerine ait elektron mikrofrafı. (a); Endoneurial kollejen lifleri (C) arasında miyelinli (M) ve miyelinsiz aksonlar (U), sitoplazmasında rejenerasyon gösteren remiyelinize bir akson (dolu yıldız), mitokondriyonlar (Ok) ve lizozom içeren bir Schwann hücresi görülmektedir. (b); Rejenerasyona girmiş remiyelinize bir akson (dolu yıldız) içeren, aktif sitoplazmalı Schwann hücresi (S) izlenmektedir. Heterokromatik nükleus (N) ve çok iyi gelişmiş granüllü endoplazmik retikulum sarrıçları, bol miktarda mitokondriyon (boş yıldızlar) içeren sitoplazmasıyla dikkat çekmektedir. Schwann hücreleri ve kesintisiz bir bazal laminayla (ok başları) kollejen liflerce doldurulmuş (C) endoneurial bağ dokusundan izole edilmektedir.

4.2. Biyokimyasal Değerlendirme Bulguları

4.2.1. Plazma GPx Aktivitesi

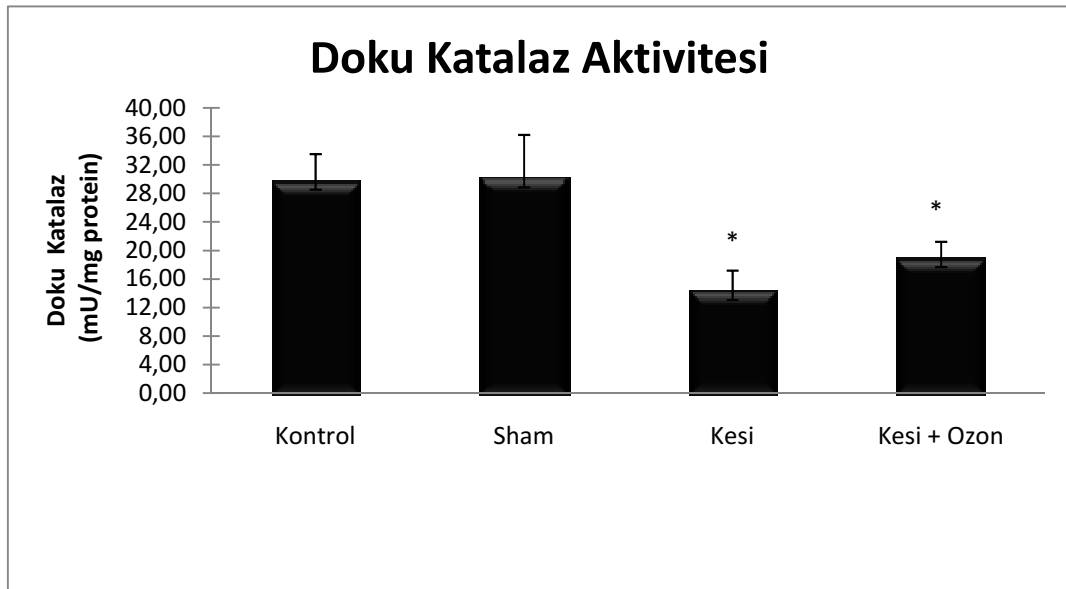
Tablo 4.1. Gruplar arası plazma GPx aktivitesi değerlendirilmesi. Kesi + Ozon grubunun (Grup 2) GPx aktivitesi Kesi grubuna (Grup 1) göre daha fazla artmıştır. Çok ileri düzeyde anlamlı farklılık tespit edilmiştir.



Gruplar arasındaki istatistiksel farklılık tek yönlü varyans analizi ve sonrasında tukey testi ile değerlendirildi. *, $p < 0.001$ kontrol, sham, kesi+ozon (grup 2) grupları ile karşılaştırıldığında ve **, $p < 0.001$ kontrol, sham ve kesi (grup 1) grupları ile karşılaştırıldığında plazma GPx aktivitesinde anlamlı farklılık görüldü [Tablo 4.1.].

4.2.2. Doku Katalaz Aktivitesi

Tablo 4.2.1. Gruplar arası doku CAT aktivitesi değerlendirilmesi.



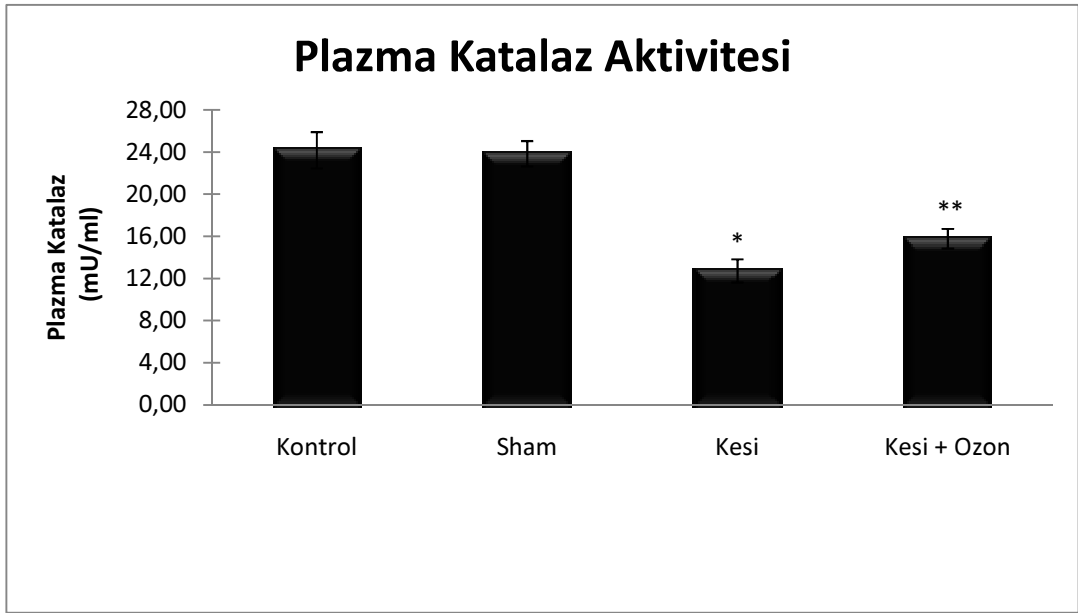
Gruplar arasındaki istatistiksel farklılık tek yönlü varyans analizi ve sonrasında tukey testi ile değerlendirildi. *, $p<0.001$ kontrol ve sham grupları ile karşılaştırıldığında ozon tedavisi doku katalaz aktivitesinde kesi grubuna göre anlamlı fark oluşturmadı [Tablo 4.2.1 ve Tablo 4.2.2.].

Tablo 4.2.2. Gruplar arası doku katalaz aktivitesi'nin istatistiksel analizi.

GRUP	DOKU KATALAZ AKTİVİTESİ (mU/mg protein)	n
Kontrol	29.55 ± 3.97	12
Sham	29.86 ± 6.36	12
Kesi	14.07 ± 3.11 *	5
Kesi + Ozon	18.68 ± 2.54*	10
Column	Mean	Std. Dev.
Kontrol	29.55	3.97
Sham	29.86	6.36
Kesi	14.07	3.11
Kesi + Ozon	18.68	2.54

4.2.3. Plazma Katalaz Aktivitesi

Tablo 4.3.1. Gruplar arası plazma CAT aktivitesi değerlendirilmesi



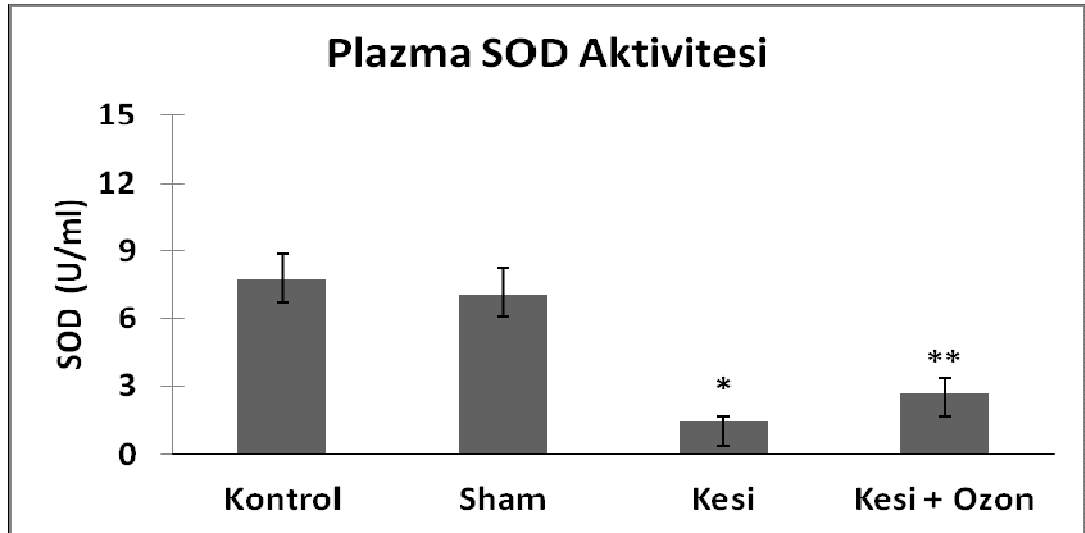
Gruplar arasındaki istatistiksel farklılık tek yönlü varyans analizi ve sonrasında tukey testi ile değerlendirildi. *, $p<0.001$ kontrol, sham, kesi+ozon (grup 2) grupları ile karşılaştırıldığında ve **, $p<0.001$ kontrol, sham ve kesi (grup 1) grupları ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık bulundu. [Tablo 4.3.1 ve Tablo 4.3.2.]. Ozon grubunun plazma katalaz aktivitesini arttırdığı görüldü.

Tablo 4.3.2. Gruplar arası plazma CAT aktivitesinin istatistiksel analizi

GRUP	PLAZMA KATALAZ AKTİVİTESİ (mU/ml)	n
Kontrol	24.16 ± 1.73	13
Sham	23.84 ± 1.28	12
Kesi	12.71 ± 1.10 *	13
Kesi + Ozon	15.77 ± 0.93 **	12
Column	Mean	Std. Dev.
Kontrol	24.16	1.72
Sham	23.84	1.20
Kesi	12.71	1.10
Kesi + Ozon	15.77	0.93

4.2.4. Plazma SOD Aktivitesi

Tablo 4.4.1. Gruplar arası plazma SOD aktivitesi değerlendirilmesi.



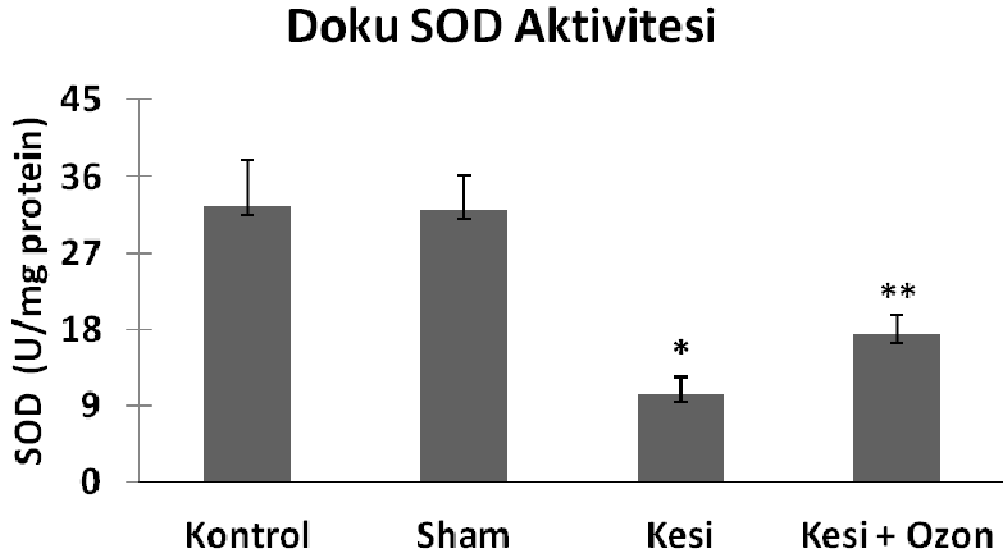
Gruplar arasındaki istatistiksel farklılık tek yönlü varyans analizi ve sonrasında tukey testi ile değerlendirildi. *, $p < 0.001$ kontrol, sham, kesi+ozon (grup 2) grupları ile karşılaştırıldığında **, $p < 0.01$ kontrol, sham ve kesi (grup 1) grupları ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık gösterdi [Tablo 4.4.1 ve Tablo 4.4.2].

Tablo 4.4.2. Gruplar arası plazma SOD aktivitesinin istatistiksel analizi.

GRUPLAR	PLAZMA SOD AKTİVİTESİ (U/ml)	n
Kontrol	7.70 ± 1.23	13
Sham	7.06 ± 1.17	12
Kesi	1.39 ± 0.31 *	13
Kesi + Ozon	2.69 ± 0.64 **	12

4.2.5. Doku SOD Aktivitesi

Tablo 4.5.1. Gruplar arası doku SOD aktivitesi'nin değerlendirilmesi.



Gruplar arasındaki istatistiksel farklılık tek yönlü varyans analizi ve sonrasında tukey testi ile değerlendirildi. *, $p < 0.001$ kontrol, sham, kesi+ozon (grup 2) grupları ile karşılaştırıldığında, **, $p < 0.05$ kontrol, sham ve kesi (grup 1) grupları ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık gösterdi [Tablo 4.5.1, Tablo 4.5.2., Tablo 4.5.3.].

Tablo 4.5.2. Gruplar arası doku SOD aktivitesinin istatistiksel analizi.

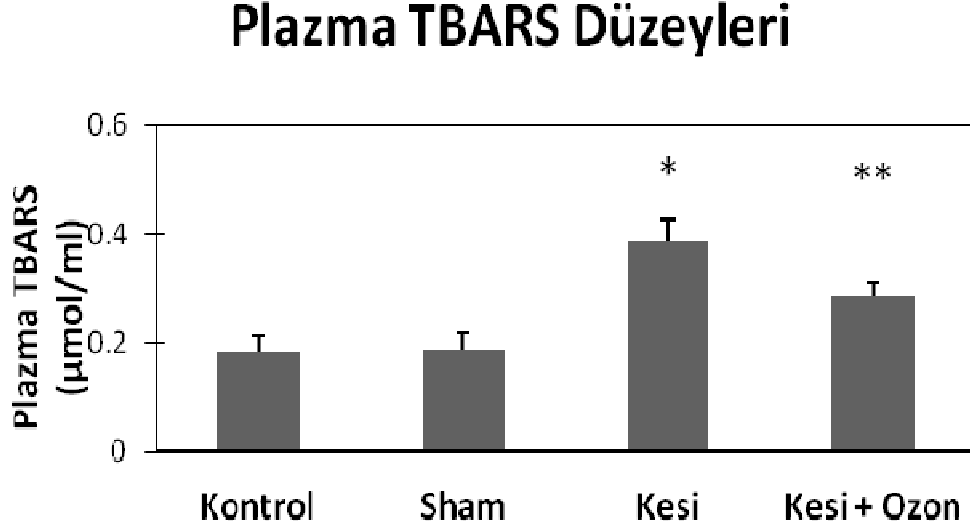
GRUPLAR	DOKU SOD AKTİVİTESİ (U/mg protein)	n
Kontrol	32.58 ± 5.44	12
Sham	32.00 ± 4.10	12
Kesi	10.46 ± 1.97 *	5
Kesi + Ozon	17.35 ± 2.35 **	10

Tablo 4.5.3. Gruplar arası mean ve standart deviasyonları (Doku SOD).

Column	Mean	Std. Deviasyon
Kontrol	3.257.669	5.440.394
Sham	3.200.418	4.096.013
Kesi	1.045.938	1.971.217
Kesi + Ozon	1.734.655	2.354.007

4.2.6. Plazma TBARS Düzeyleri

Tablo 4.6.1. Gruplar arası plazma TBARS düzeyleri değerlendirilmesi.



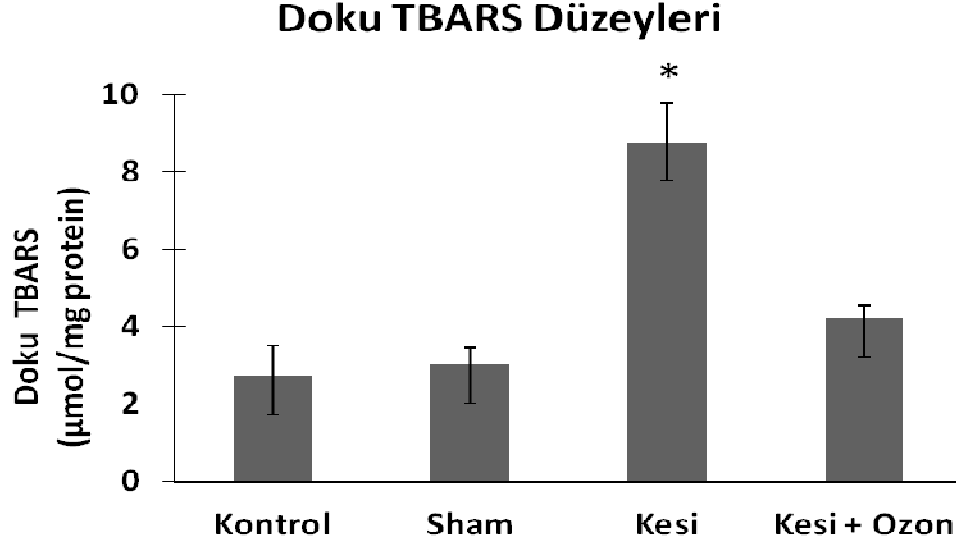
Gruplar arasındaki istatistiksel farklılık tek yönlü varyans analizi ve sonrasında tukey testi ile değerlendirildi. *, $p < 0.001$ kontrol, sham ve kesi+ozon (grup 2) grupları ile karşılaştırıldığında, **, $p < 0.001$ kontrol, sham ve kesi (grup 1) grupları ile karşılaştırıldığında grup 1 de anlamlı bir farklılık görüldü [Tablo 4.6.1. ve Tablo 4.6.2.].

Tablo 4.6.2. Gruplar arası plazma TBARS düzeyleri istatistiksel analizi.

GRUP	PLAZMA TBARS (µmol/ml)	n
Kontrol	0.18 ± 0.029	11
Sham	0.19 ± 0.03	12
Kesi	0.38 ± 0.042*	12
Kesi + Ozon	0.28 ± 0.026**	12

4.2.7. Doku TBARS Düzeyleri

Tablo 4.7.1. Gruplar arası doku TBARS düzeyleri değerlendirilmesi.



Tablo 4.7.2. Gruplar arası doku TBARS düzeyleri istatistiksel analizi.

GRUPLAR	DOKU TBARS (µmol/mg protein)	n
Kontrol	2.72 ± 0.79	12
Sham	3.02 ± 0.41	12
Kesi	8.76 ± 1.02*	5
Kesi + Ozon	4.20 ± 0.34	10

Tablo 4.7.3. Gruplar arası doku TBARS düzeyleri ortalamaları ve SEM değerleri.

GRUPLAR	Ortalama	SEM
Kontrol	2.72	0.79
Sham	3.02	0.41
Kesi	8.76	1.02
Kesi + Ozon	4.20	0.34

Gruplar arasındaki istatistiksel farklılık tek yönlü varyans analizi ve sonrasında tukey testi ile değerlendirildi. *, $p < 0.001$ kontrol, sham ve kesi+ozon (grup 2) grupları ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık gösterdi [Tablo 4.7.1., Tablo 4.7.2., Tablo 4.7.3.].

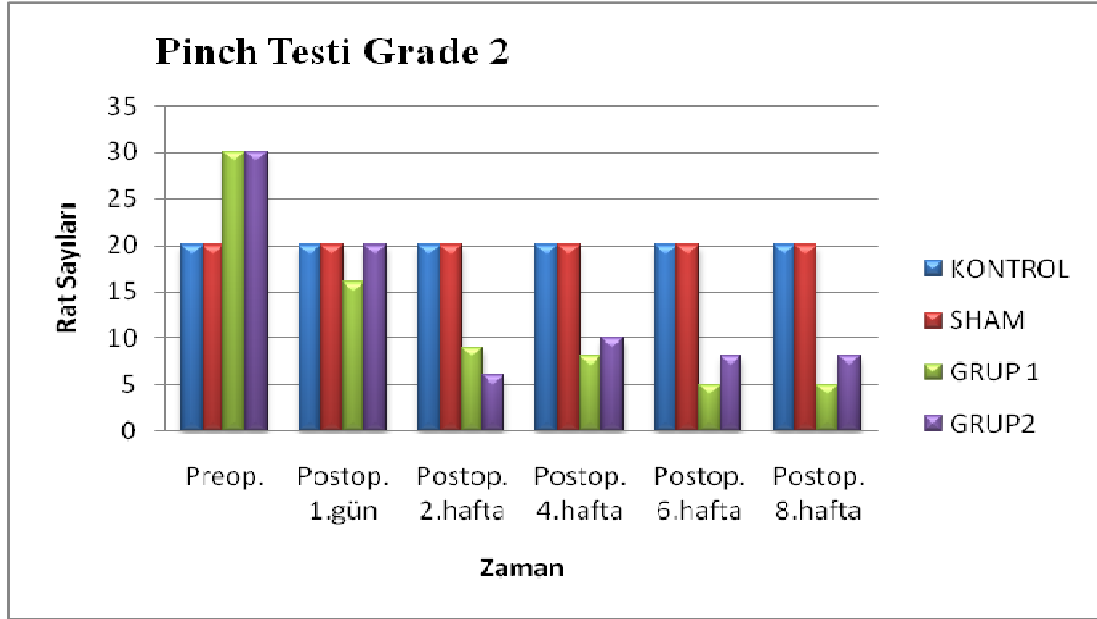
4.3. Motor ve Duyusal Fonksiyon Değerlendirme Testleri

4.3.1. Duyusal Fonksiyon (Pinch) Testi Bulguları

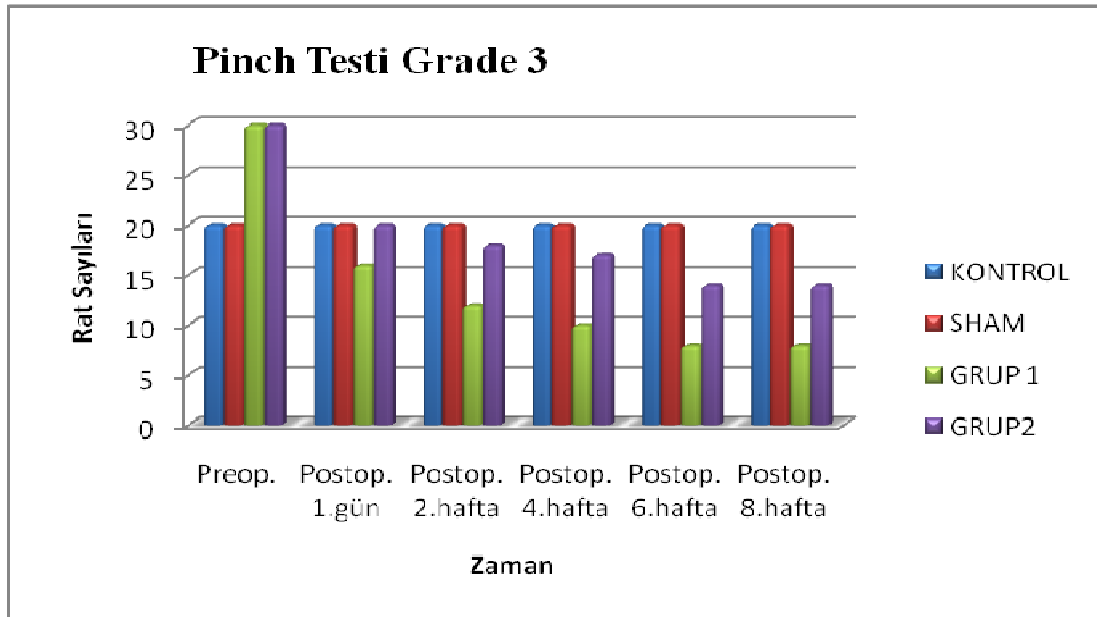
Pinch test verileri Ki-kare testi ile değerlendirildi. Grade 0 ve Grade 1'de anlamlı farklılık görülmezken, Grade 2 ve 3'te $p < 0.05$ olduğundan anlamlı farklılık görülmüştür. Duyusal fonksiyon testi bulgularına göre Grup2 ve Grup1

karşılaştırıldığında preoperasyon $p=0.007$, postoperasyon 2. haftada $p=0.035$. $p<0.05$ olduğu için istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmüştür [Tablo 4.8.1. Tablo 4.8.2]. Özellikle postoperasyon 2.haftada anlamlı farklılık çıkmış olması ozon'un periferik sinir üzerinde iyileştirici etkisi olduğunu gösterir.

Tablo 4.8.1. Grade 2 geri çekme refleksi ile cevap veren rat sayıları. 1.gün, 2., 4., 6.,8. haftada Pinch testine orta derecede yanıt düzeyinde geri çekme refleksi (footwithdrawal) ile cevap veren rat sayılarının grafiği. Grup 2 (kesi+ozon) yapılan grubun grade 2 değerleri 4., 6. ve 8. haftada grup 1'e göre daha yüksek çıkmıştır.



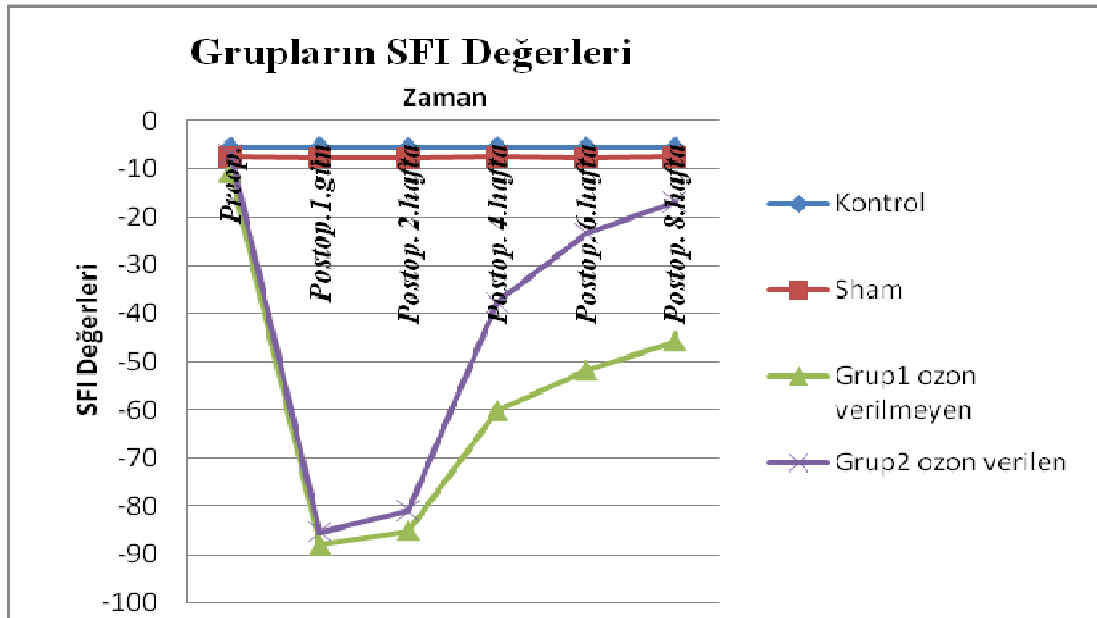
Tablo 4.8.2. Grade 3 geri çekme refleksi ile cevap veren rat sayıları. Pinch testi grade 3 (tam bir yanıt) geri çekme refleksi (footwithdrawal) ile cevap veren rat sayıları 1.gün, 2.,4.,6.,8. haftada tespit edilmiştir. Grup 2 grade 3 sayıları grup 1 e göre daha fazladır.



4.3.2. Motor Fonksiyon Testi Analizi Bulguları ve SFI değerleri

Yürüme patern analizinden elde edilen veriler her bir grup için SFI olarak (ortalama \pm standart sapma) hesaplandı sonra gruplar arasında istatistiksel anlamlılık için iki ortalama arasındaki farkın anlamlılık testi (student t) kullanıldı. SFI verilerinin kaydedildiği günlerde gruplar arasındaki istatistiksel anlamlılık tek yönlü varyans analizi (Post Hoc test olarak Tukey testi) kullanıldı. Grup 2 ve Grup 1 mean değerleri karşılaştırıldığında preoperasyondan postoperasyon 8.haftaya kadar (postoperasyon 1.gün= $-85 \pm 6.11.$, postoperasyon 2.hafta= $-80 \pm 5.19.$, postoperasyon 4.hafta= $-37 \pm 6.11.$, postoperasyon 6.hafta= $-23 \pm 5.89.$, postoperasyon 8.hafta= -16 ± 5.06) negatif değerlerin katsayılarında belirgin bir azalma gözlenmiştir [Tablo 4.9.]. Bu sonuçlar bize sinirde iyileşme olduğunu göstermiştir.

Tablo 4.9. Motor fonksiyon testi verilerinin grafiği. Buna göre Grup 2'nin 8. haftaya kadar olan yürüme analizleri özellikle 2. ve 6. haftada Grup 1'e göre daha iyi sonuç göstermiştir.

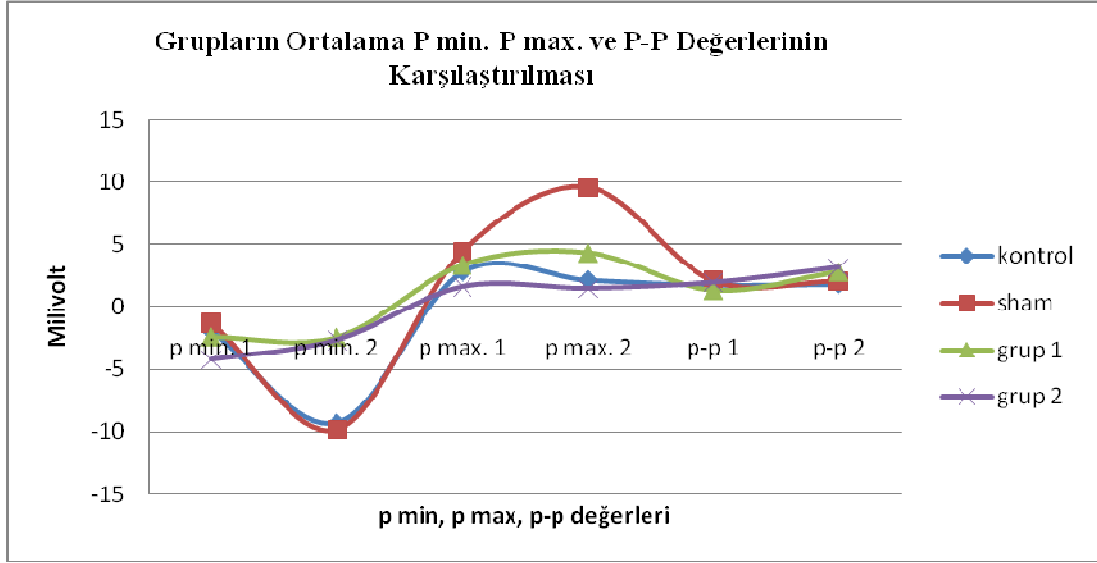


4.4. Elektrofizyolojik Değerlendirme Bulguları

Elektrofizyolojik incelemelerde her grupta ortalama latans süresi, pozitif ve negatif pikler arası mesafe (p-p arası mesafe) ve maksimum pozitif pik (p-max.), negatif pik (p-min.), standart deviasyon değerleri hesaplandı [Tablo 4.10.].

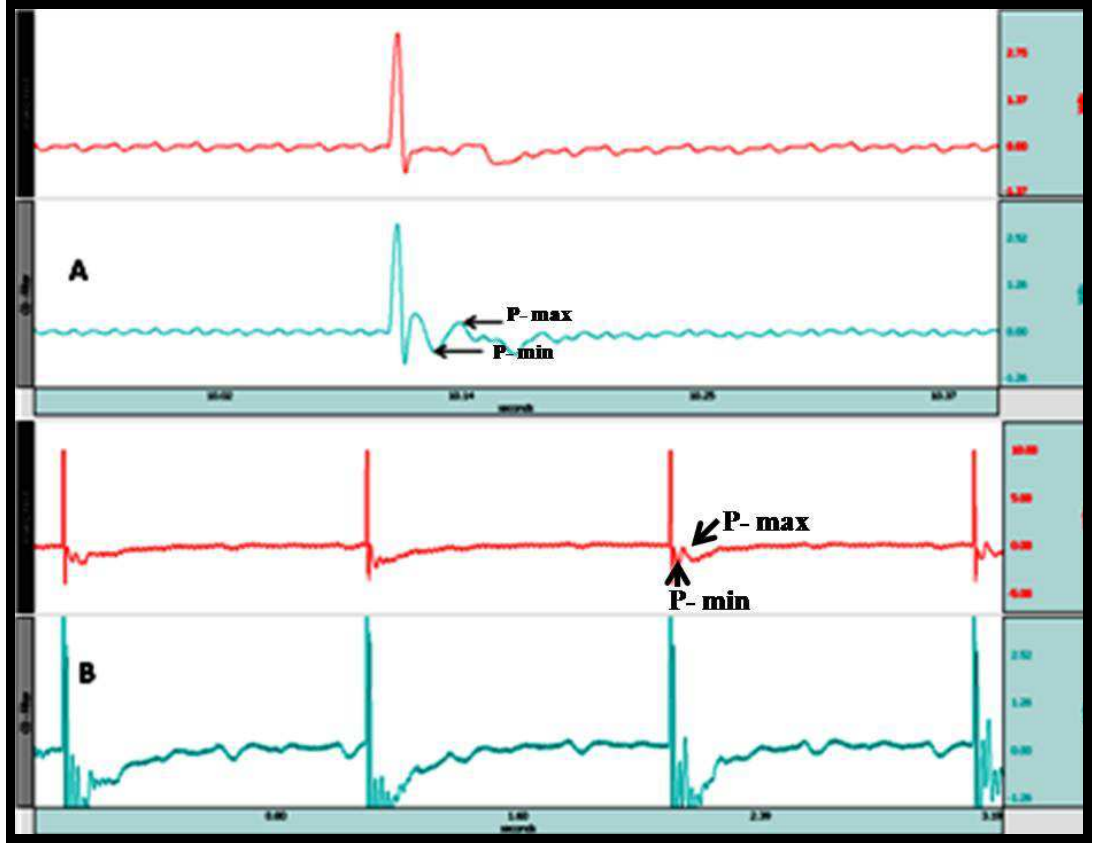
Gruplar arasında ve aynı grubun denekleri arasında ilk ve son ölçümlerin ortalama değerleri karşılaştırıldı. Kontrol ve Sham grubunun sağlam tarafından alınan ölçümler ile grup 1 ve grup 2' nin deney tarafından (sol taraf) alınan ölçümler birbirleri ile karşılaştırıldı. Farklı gruplardan elde edilen EMG kayıtlarına ilişkin örnekler şekilde gösterilmektedir [Şekil 4.5.1.a,b., Şekil 4.5.2.a,b., Şekil 4.5.3.a,b., Şekil 4.5.4.a,b.].

Tablo. 4.10. Gruplar arasında ortalama p-p, p-max., p-min. değerlerinin karşılaştırılması. Pozitif ve negatif pikler arasındaki mesafenin (p-p arası mesafe), p-max., p-min. değerlerinin gruplar arasında karşılaştırılması.



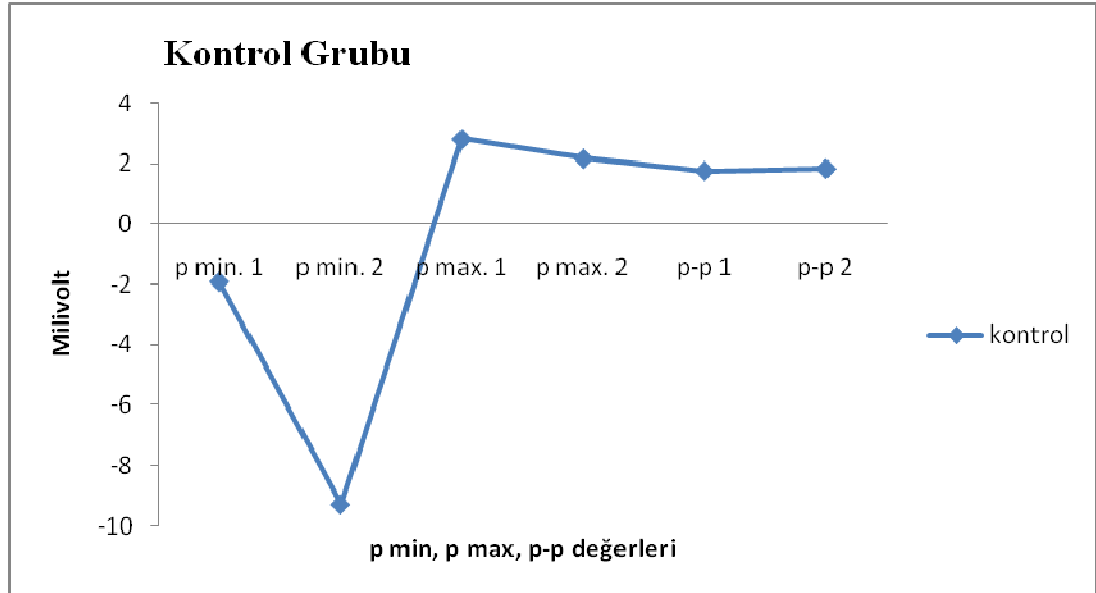
4.4.1. Kontrol Grubu

Kontrol ve sham grupları arasında p-p 1 (p-max. ile p min. değerleri arasındaki farkın 1.gün ölçümü) değerleri açısından anlamlı farklılık bulunmazken, p-p 2 (p-max. ile p min. değerleri arasındaki farkın 8 hafta sonunda ölçümü) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmaktadır ($p < 0.05$, uygulanan test Mann Whitney U ve Wilcoxon testidir) [Şekil 4.5.1.a,b.]. Diğer gruplarla kıyaslandığında sadece Kontrol ve Sham grubu için p-min.1 ve p.min. 2 ortalama değerleri arasında anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p < 0.001$). [Tablo 4.11.]. 4 grup arasında p-max. 1 (ilk ölçüm) ve p-max. 2 (8.hafta ölçümü) ortalama değerleri arasında anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p < 0.05$, Kruskal Wallis testi uygulanmıştır). Latans ölçümleri de gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermektedir ($p < 0.05$). Çalışma grubu olgularda latans ölçümü kontrol grubundan anlamlı düzeyde düşük olarak saptanmıştır. Kontrol grubunun ortalama latans değerleri arasında anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p < 0.05$, Kruskal wallis testi uygulanmıştır).



Şekil 4.5.1.a,b. Kontrol gruplarından alınan EMG kayıt örneklerinin karşılaştırması. A.İlk (1.gün) p-max. ve p-min. ölçümü B. 8. hafta sonunda alınan p-max. ve p-min. ölçümü.

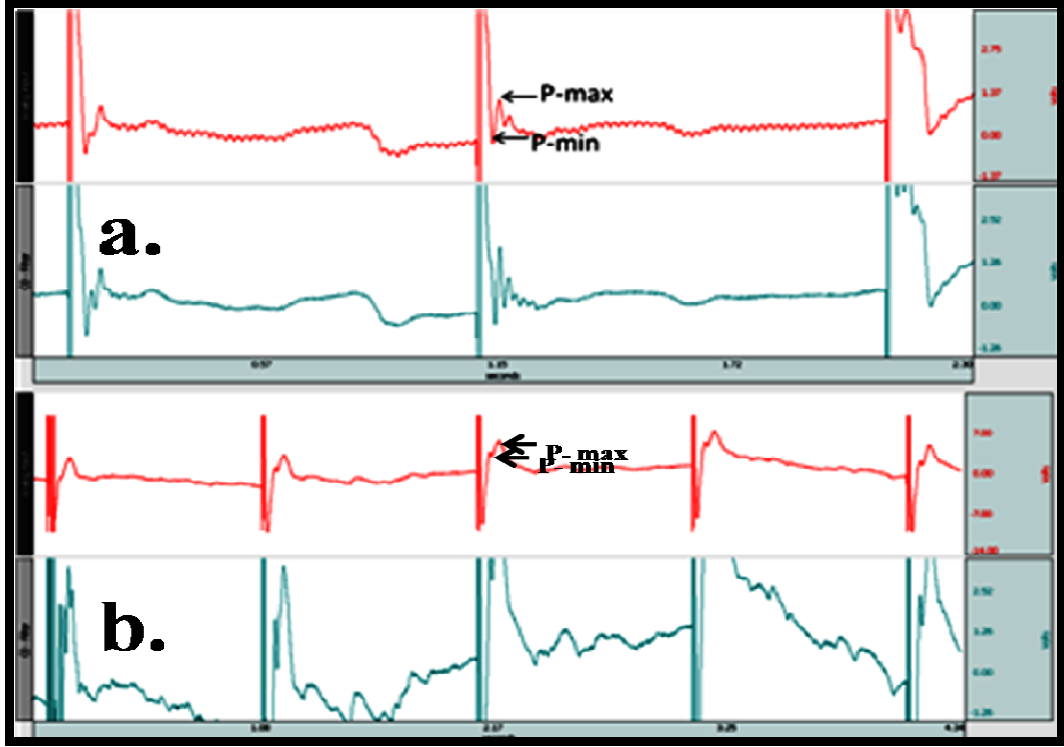
Tablo 4.11. Kontrol grubu içinde ortalama p max., p min. ve p-p değerlerinin karşılaştırılması.



4.4.2. Sham Grubu

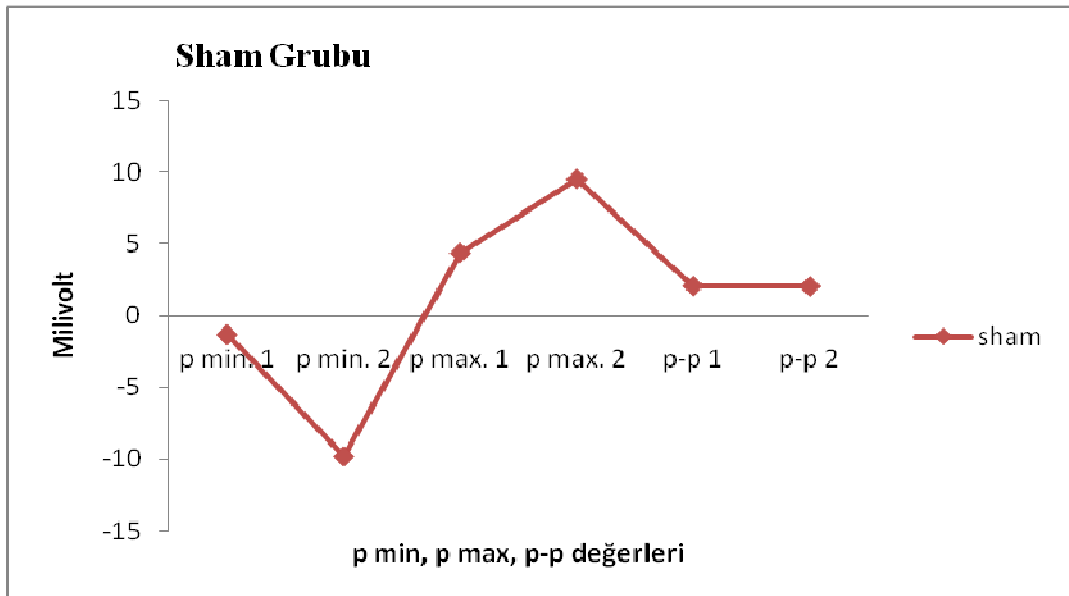
İlk (1.gün) ölçülen p-p 1 değerleri arasında kontrol ve sham grubu arasında anlamlı bir farklılık bulunmazken, son ölçülen (8.hafta) p-p 2 değerleri arasında

istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmaktadır ($p < 0.05$, uygulanan test Mann Whitney U ve Wilcoxon testidir). Kontrol ve Sham grupları için ortalama p-min. ve p-max. değerleri arasında anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p < 0.001$, uygulanan test Kruskal Wallis testidir). Sham grubu için p-max. 1 (ilk ölçüm) ve p-max. 2 (8.hafta ölçümü) ortalama değerleri arasında anlamlı farklılık bulunmaktadır (Mann Whitney U Testi uygulanmıştır.) [Şekil 4.5.2.a,b.].



Şekil 4.5.2.a,b. Sham grubundan alınan Emg kayıt örnekleri karşılaştırması. P max. ve P min. değerleri gösterilmiştir. a. İlk ölçüm b. 8. hafta sonunda alınan ölçümdür.

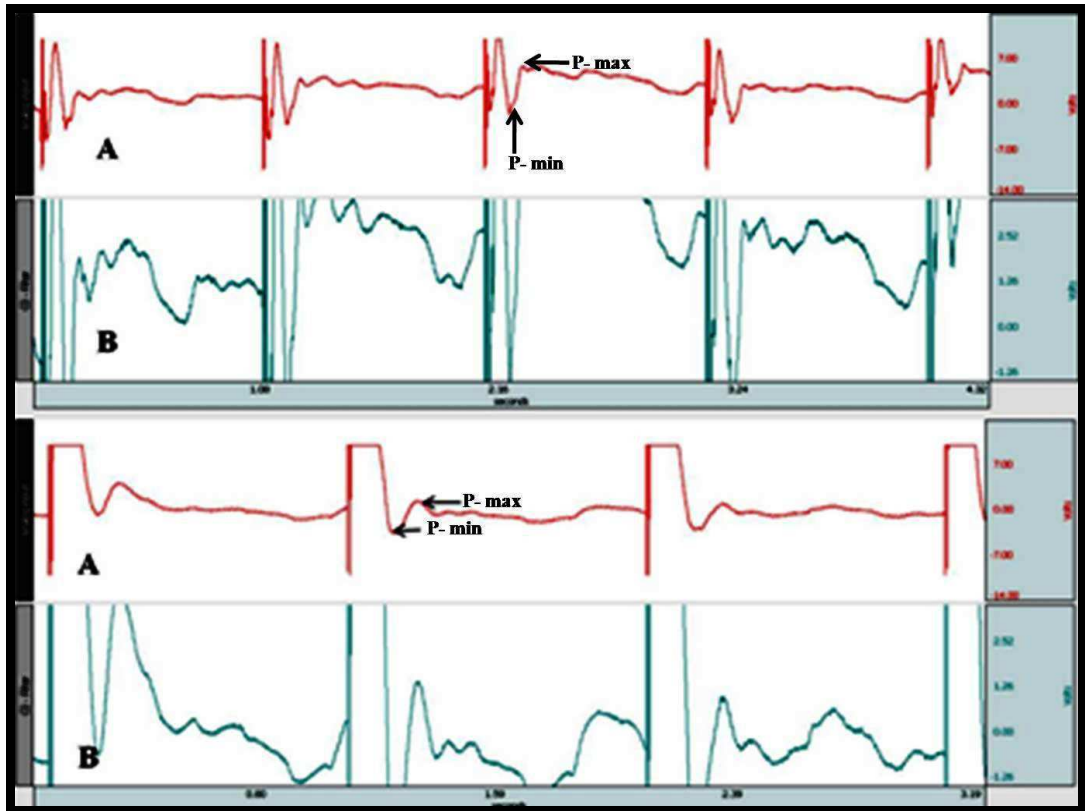
Tablo 4.12. Sham grubu içinde ortalama p max, p min ve p-p değerlerinin karşılaştırılması.



Yine 4 grup arasında maximum değerler açısından anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p<0.05$, Kruskal Wallis testi uygulanmıştır.) [Tablo 4.12.]. 4 grubun ortalama latans değerleri arasında anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p<0.05$, Kruskal Wallis).

4.4.3. Grup 1 (Kesi Grubu)

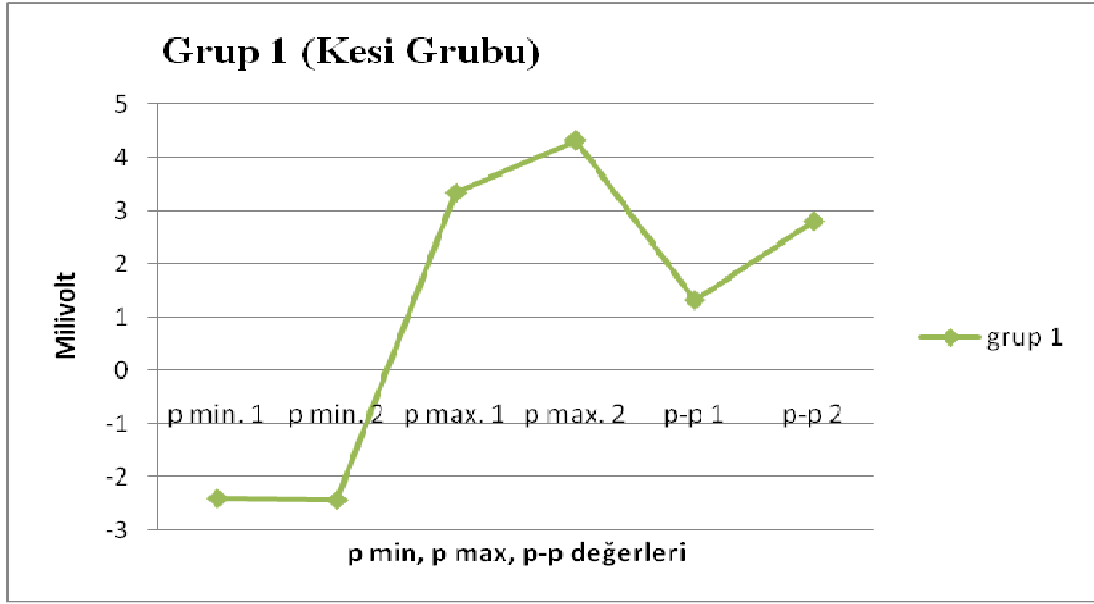
Grup 1 (kesi grubu) ve Grup 2 (kesi+ ozon grubu) arasında p-p 1 ve p-p 2 ortalama değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki vardır [Tablo 4.13]. $p=0.01$, $p<0.05$, uygulanan test Mann Whitney U ve Wilcoxon Testidir. Standard deviasyon değeri için grup 1'de anlamlı bir farklılık görülmemiştir ($p=0.296$, $p>0.05$, Mann Whitney U Testi). 4 grup arasında maximum değerler açısından anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p<0.05$, Kruskal Wallis testi uygulanmıştır) [Şekil 4.5.3.a,b.].



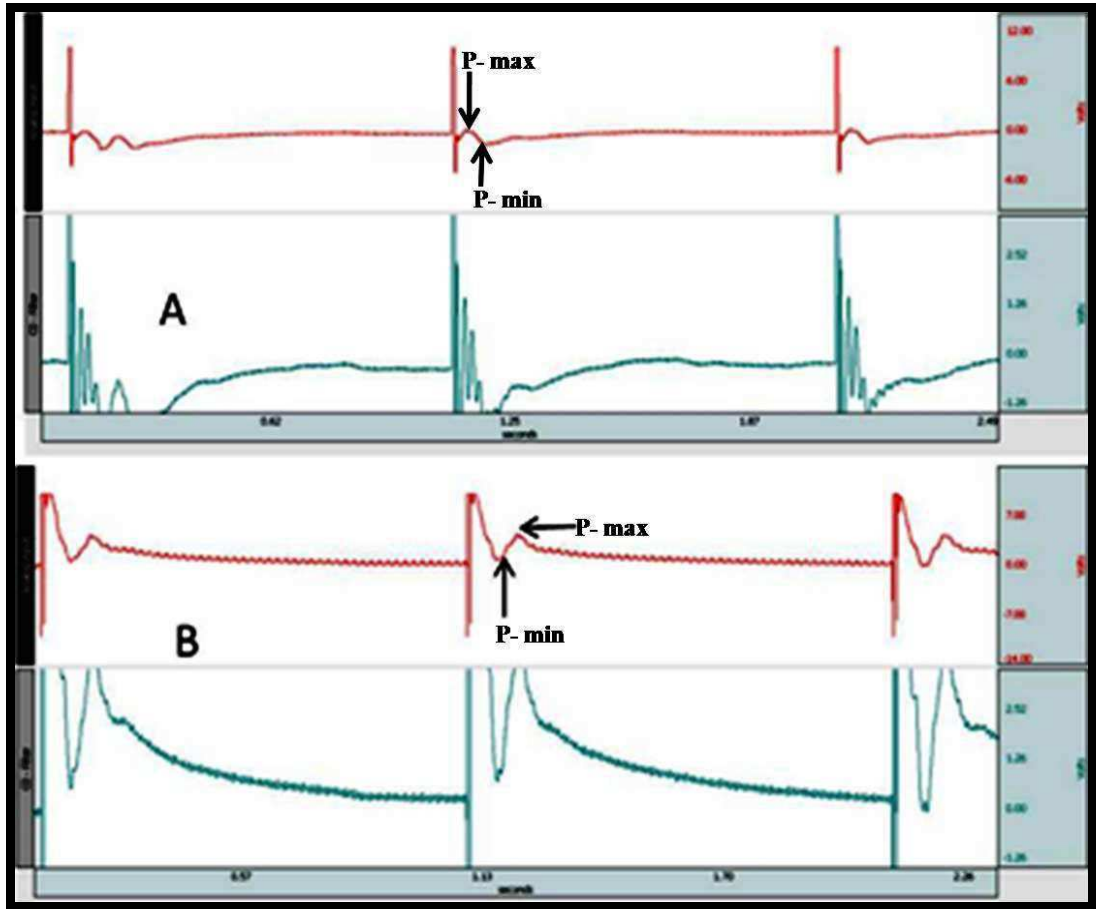
Şekil 4.5.3.a,b. Grup 1 EMG kayıt örnekleri karşılaştırılması. P max ve P min değerleri gösterilmiştir. A. İlk ölçüm B. 8 hafta sonunda alınan ölçümdür.

Özellikle Grup 1' de latans 1 ve latans 2 değerleri arasında anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p<0.05$, uygulanan test Mann Whitney U Testi) ve dört grubun ortalama latans değerleri arasında farklılık bulunmaktadır ($p<0.05$, Kruskal Wallis Testi).

Tablo 4.13. Grup 1 içinde ortalama p max., p min. ve p-p değerlerinin karşılaştırılması.



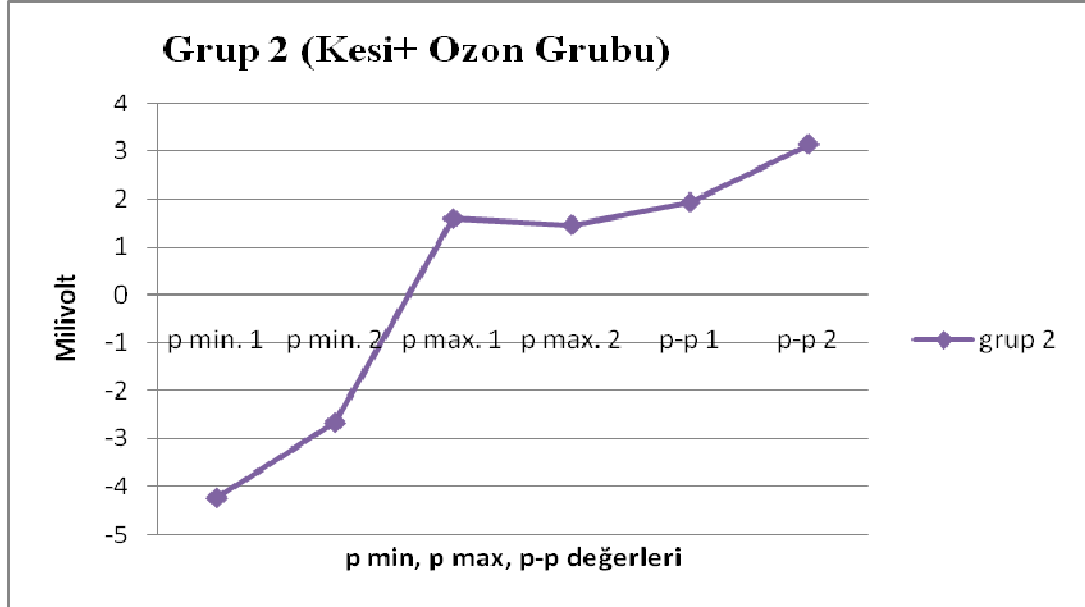
4.4.4. Grup 2 (Kesi + Ozon Grubu)



şekil 4.5.4.a,b. Grup 2'den alınan EMG kayıt örnekleri karşılaştırılması. A. Postoperasyon öncesi ilk ölçüm, B.postoperasyondan 8.hafta sonra yapılan P max. ve P min. ölçümü ölçümü.

Grup 2 için p-min. 1 ve p-min. 2 ortalama değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki vardır ($p < 0.001$). P min. 1 için grup 2 ortalama değerler açısından farklılıklar vardır ($p < 0.05$, Kruskal Wallis testi uygulanmıştır) [Şekil 4.5.4.a,b., Tablo 4.14].

Tablo 4.14. Grup 2 içinde ortalama p max., p min. ve p-p değerlerinin karşılaştırılması.



Grup 2 için standart deviasyon açısından fark bulunmaktadır ($p < 0.001$, Mann Whitney U Testi). Grup 1 (kesi grubu) ve Grup 2 (kesi+ ozon grubu) arasında p-p 1 ve p-p 2 ortalama değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki vardır ($p < 0.05$, uygulanan test Mann Whitney U ve Wilcoxon Testidir). 4 grup arasında maximum değerler açısından anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p < 0.05$, Kruskal Wallis testi uygulanmıştır.). 4 grubun ortalama latans değerleri arasında anlamlı farklılık bulunmaktadır. ($p < 0.05$, Kruskal Wallis testi uygulanmıştır). Süre ölçümleri ise gruplara göre istatistiki olarak anlamlı farklılık göstermemektedir ($p > 0.05$).

TARTIŞMA

Periferik sinir yaralanmaları morbidite, ekonomik ve sosyal aktivite kaybının önemli sebeplerinden biridir [24]. Periferik sinir yaralanmalarından sonra tedavideki asıl amaç, sinir bütünlüğünün tekrar sağlanarak iletimin geri dönüşünü ve dolayısıyla kaybolan motor ve duyu fonksiyonlarının restorasyonunu sağlamaktır [22,27,28]. Periferik sinir rejenerasyonun klinik sonuçlarını etkileyen çeşitli nedenler vardır. Onarım hattında oluşan iskemi ve devamındaki inflamatuar süreçte, yaralanma bölgesinde başta serbest oksijen radikalleri olmak üzere, toksik etkili birçok ajan birikir [39,40]. Sonuçta membran permeabilitesi bozulur ve hücre içine kalsiyum akışı başlar. Hücre içinde kalsiyum iyonunun artması proteolitik enzimleri aktive ederek, nörofilament ve mikrotübülleri de kapsayan hücre yapı taşlarının yıkımına neden olur [41,42].

Periferik sinir kesileri sonrası hücre gövdesinde görülen kromatolitik değişiklikler iyi bilinmektedir. Periferik sinir iyileşmesini tam olarak anlamak için hasarın tam olarak anlaşılması yani, hasar sonrası dönemde sinir ve çevre dokularda oluşan değişikliklerin morfolojik ve moleküler düzeyde bilinmesi gereklidir. Bu amaca yönelik olarak sinir hasarını simüle etmek üzere çeşitli deney hayvanlarında farklı sinir hasarı modelleri oluşturulmuştur. Bu deney modellerinin birbirlerinden farklılığı hasarının oluşturulma yeri, şiddeti, biçimi ve süresidir. Periferik sinir hasarı oluşturmak için ezi [44,45], kesi [46], termal hasar [47], nörotoksik maddeler [48,49] ve iskemi [50] gibi modeller kullanılmaktadır. Bu modeller içerisinde en çok kullanılanları; siyatik sinirin tam kesisi ve ezisidir [51]. Daha çok tercih edildiği için çalışmamızda rat periferik sinir hasarı modeli olarak siyatik sinirin tam kesisini kullandık.

Ozon kimyasal yapısı itibariyle radikal özelliği taşımamakla birlikte, florin ve persülfattan sonra, bilinen üçüncü en güçlü oksidan maddedir [105]. Dr. Bocci ve Dr. Leon, 1999 yılında da Dr. Peralta farmakolojik olarak ozonun serbest radikallere karşı antioksidan sistemleri nasıl aktive ettiğini bilimsel olarak gösterdi [111,115]. Ozon üç oksijen atomundan oluşan bir kimyasal bileşiktir (O_3). İki atomlu normal atmosferik oksijenin (O_2) çok yüksek enerji taşıyan bir şekli [104,105] olup lipid peroksidasyonunu ve mitokondrial hasarı azaltarak ayrıca antioksidan olan diğer enzimlerin salınımını stimüle ederek infarktlı bölgeyi sınırlar. Ek olarak infarktlı bölgede ödem ve eksitotoksik hasarı azaltır [113,118].

Çok yüksek konsantrasyonları oksidatif hasar yaparken düşük konsantrasyonlarının hiçbir terapötik etkisi yoktur. Ozon uygulamaları yara iyileşmesi [203] , peritonit [203,204] , pürülene ve iyileşmeyen yaralar [203] , dekübitisler [203-205], termik travmalar [203,204], yıkılcı akciğer ve pleura hastalıkları [203-205], artropatiler, arteriosklerozis [50,51], diabetes mellitus komplikasyonları [120-123, 203-205], pankreatitler ve lumbal disk hernilerinin

(LDH) tedavisi [125, 203-205] , gibi birçok kullanım alanı vardır ayrıca yaşa bağlı maküler dejenerasyon [165,166,206,207], iskemik ve enfeksiyöz hastalıklarda [206,207], yapılan vaka analiz çalışmalarında da olumlu etkiler göstermiştir. Bunun yanında basit diş ve ağız enfeksiyonlarından [198, 206,207], hepatitlere [206,207], kadar uzanan geniş bir aralıktaki çeşitli enfeksiyon hastalıklarında etkin olarak uygulanmaktadır [206,207]. Bu bilgilere dayanarak özellikle klinikte çok geniş bir dağılım alanı olan ozonun siyatik sinir tam kesisi üzerine tedavi edici etkisini elektron mikroskopik (EM), elektrofizyolojik (EMG) ve biyokimyasal olarak gösterdik.

Ozon terapi, saf oksijen ile ozonun belirli oranlarda (%0,05-5 O₃; %95-99.95 O₂) karıştırılıp, bu karışımın değişik yöntemlerle hastaya uygulanmasını içeren bir tedavi şeklidir [106,107]. Ozon, hiçbir zaman saf olarak verilmemeli ve belirli oranda oksijenle karıştırılarak uygulanmalıdır. Bu karışımda oksijen %95'den az ozon ise %5'ten fazla olmamalıdır [105]. Ozon tedavisi otohemoterapi, intraperitoneal, rektal insüflasyon ve ozonlu su şeklinde uygulanabilmektedir. [118]. Ozon güçlü bir oksidasyon oluşturma yeteneğine sahiptir [106]. Bocci V, Travagli V' nin [144] ozon'un biyolojik etkilerini açıklamak için yaptıkları çalışmada daha çok intraperitoneal uygulama yöntemi tek başına veya kombine olarak uygulanmıştır [144]. Bu yüzden çalışmamızda intraperitoneal yöntem kullanılmıştır.

Q.Lin ve arkadaşları [214] ratlarda periferik sinir ve yapısı üzerine ozon'un farklı konsantrasyonlarının etkisini değerlendirdikleri çalışmada siyatik siniri etrafına enjekte edilen 10-80 µg/ml ozon konsantrasyonunun periferik sinirde ciddi bir hasara ve sekele neden olmadığını ve ozon konsantrasyonu 80 µg/ml altında olduğu zaman antioksidan sistemin dokulardaki ve hücrelerdeki hasarı sınırladığını ve klinik çalışmalarda 20-50 µg/ml konsantrasyonda ozon kullanıldığını belirtti [214]. Bu yüzden çalışmamızda uygulanan ozon konsantrasyonu 10 -80 µg/ml aralığında olmasına dikkat edildi ve klinik çalışmalarda 20-50 µg/ml konsantrasyonda ozon kullanıldığı için 35 -40 µg/ml (orta konsantrasyonda) ozon konsantrasyonu Hermann marka klinik ozon jeneratörü tarafından hazırlanmıştır ve tedavi gören gruptaki (grup 2) her deneğe 5 ml olmak üzere 2 ay süre ile intraperitoneal olarak ozon verilmiştir.

Ozon suda kolayca çözünür ve ayrışır. İnflamatuar hücre faktörlerini sınırlandırabilir, siklooksijenazı aktive eder ve histiositik oksidasyona karşı stres cevabını azaltır. Ozon plazmaya geldiğinde ayrışır ve antioksidanlarla hızlı reaksiyona girer hidrojen peroksit ve lipid peroksidasyon ürünleri gibi çoklu doymamış yağ asitleri üretir, 4 hidroksinenonal kanın fizyolojik fonksiyonlarını ve endotelial hücreleri aktive eder ve çeşitli hastalıkları düzenler ve tedavi eder. Serbest radikaller çeşitli patolojik süreçlerin gerek başlatıcısı, gerek ara basamaklarda işe karışabilen, gerekse sonucunda ortaya çıkabilen reaktif maddelerdir. Bunlar, organizmada aerobik solunum sırasında mitokondride ve fagositlerde solunum patlaması gibi çeşitli fizyolojik durumlarda da oluşabilmektedir [23]. Aerobik canlılar serbest radikallerin toksik etkilerinden korunmak için antioksidan sistemler geliştirmişlerdir. Bunlar enzimatik olan ve non enzimatik olanlar diye ayrılır. Enzimatik olanları süperoksit dismutaz (SOD) [150] katalaz (CAT) [151] ile glutatyon peroksidaz (GPx) [152,153] glutatyon s-transferaz (GST) [154,155] glutatyon (GSH) [156] ve glutatyon redüktazdan (GR) [157] oluşan glutatyon

sistemidir [111]. Bu nedenle çalışmamızda enzimatik antioksidan özelliği gösteren süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPx) ve MDA (malonil dialdehit) çalışılmıştır.

Bocci ve Carlo [108] yaptıkları çalışmada uygulanan ozon dozu ile doğru orantılı olarak glutatyon ve total antioksidan seviyesinde önce azalma ve lipit peroksidasyonu, okside glutatyon düzeyinde artma olduğunu göstermiş ve uygulamadan 20 dakika sonra antioksidan düzeylerinin eski haline döndüğünü tespit etmiştir [108]. Yine Bocci V, Travagli V, Rice-Evans C ve arkadaşlarının [115] yaptıkları çalışmalarda ozonun terapötik konsantrasyonu 10-80 µg/ml olarak belirlenmiştir. Bu ozon konsantrasyonu total antioksidan kapasitesini %25'ten fazla düşürmediği gibi azalan antioksidanların 20 dakika sonra eski haline gelmesinde rol oynadığını belirtmiştir. Bu bulguları destekleyici olarak gruplarımız arasındaki istatistiksel farklılık tek yönlü varyans analizi ve sonrasında tukey testi ile değerlendirilmiştir. $p<0.001$ kontrol, sham, kesi+ozon grupları ile karşılaştırıldığında ve $p<0.01$ kontrol, sham ve kesi grupları ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık göstermiştir. Kesi+ozon verilen grupta plazmada GPx (glutatyon peroksidaz), SOD (süperoksit dismutaz), CAT (katalaz) ve MDA (malonil dialdehit) aktivitesini arttırdığı yani hücre içi antioksidan enzim seviyelerinde yükselme görülmüştür. Süperoksit dismutaz, doğal antioksidan savunma sisteminde yer alan ve süperoksit anyonların ortamdan uzaklaştırılmasını sağlayan enzimlerden birisidir. Sinir kesisi sonucunda ortamda meydana gelen enflamatuvar reaksiyonlara bağlı olarak süperoksit anyonların artış göstermesi, buna bağlı olarak membranların zarar görmesi sonucu SOD aktivitesinin azalması, serbest oksijen radikallerinin oksidatif hasarlarını arttıracaktır. Çalışmamızda siyatik sinir kesisi sonrası SOD aktivitesinin, kesi+ozon grubunda kesi grubuna göre artış gösterdiği ve SOD aktivitesinin anlamlı olarak arttığı dikkati çekmektedir. Bu ozon'un antiinflamatuvar etkisinin bir sonucu olarak değerlendirilebilir. Çalışmamızda gördüğümüz antioksidan enzim seviyesinin yükselmesinin bir nedeni daha olarak; ozonun plazmada reaktif oksijen örnekleri (ROS) üretmesi, ROS'un da çok sayıda biyokimyasal yolu tetiklemesi ve bu yolla plazmadaki antioksidan enzim seviyesini yükselterek sinir kesisi üzerine rejenerasyon yeteneğini arttırmasından kaynaklandığı düşünülebilir.

Q.Lin ve arkadaşları'nın [214] ratlarda yapmış oldukları çalışmada periferik sinir ve yapısı üzerine intraperitoneal olarak uyguladıkları ozon'un farklı konsantrasyonlarının etkisini ışık mikroskobu ile değerlendirmişlerdir [214]. Çalışmada ozon verilen grupta epinöryumda az bir hasar görülmüşken, perinöryumda sinir lif ve demetlerinde açık bir hasar olmadığını ve tüm ozon gruplarının özelliklerinin yaklaşık olarak aynı olduğunu rapor etmişlerdir [214]. Periferik sinir kesisi modelinde uyguladığımız intraperitoneal yöntemde benzer şekilde yaptığımız ışık mikroskopik incelemesinde yarı ince kesit ışık mikrograflarında kesi (grup 1) ve kesi+ozon (grup 2) gruplarının miyelinli ve miyelinsiz liflerin normal ultrastrüktür sergiledikleri ve perinöryumda sinir lif ve demetlerinde belirgin bir hasar olmadığı gözlemlendi.

Vogelaar ve ark. [213] oluşturdukları sinir hasarı sonrasında, duyu ve motor fonksiyonların yaklaşık 3.haftadan itibaren ileri derecede geri döndüğünü ve 30. günde hem siyatik fonksiyonel indeksin hem de geri çekme refleksinin normale

yakın değerlere geldiğini gözlemlemişlerdir [213]. Bervar M [216] ise yapmış olduğu çalışmada sinir kesisi sonrası uygulanan tedavinin motor fonksiyonel iyileşme üzerine etkisini değerlendirmek üzere yaralanma sonrası footprint analizi yapılmasının motor fonksiyonel iyileşmenin önemli bir göstergesi olduğunu belirtmiştir [216]. Bu nedenle değerlendirme testlerinden biri olarak footprint analizi uygulanmıştır ve 1.gün, 2., 4., 6. ve 8. haftada yapılan footprint analiz sonuçları değerlendirildiğinde, kesi sonrası 1. gün ve 2.haftada gruplar arasında anlamlı bir fonksiyonel iyileşmenin oluşmadığı görülmüştür. Buna karşın -50 SFI değerine ulaşılması grup 2'de postoperatif 4.haftada gerçekleşirken, grup 1 de postoperatif 8.haftada SFI değerindeki -50' lik düzeye ulaşmıştır. Aynı zamanda grup 2'de postoperatif 6. ve 8. haftada iyileşmenin belirgin olduğu dikkati çekmektedir. Kesi+ozon grubunda kesi grubuna göre belirgin bir fonksiyonel iyileşme meydana gelmesine rağmen, 8 haftalık süre içinde grupların hiçbirinde tam bir motor fonksiyonel iyileşmenin oluşmadığı gözlenmektedir.

Duyusal fonksiyon testi bulgularına göre Grup 2 ve Grup 1 karşılaştırıldığında preoperasyon $p=0,007$, postoperasyon 2. hafta $p=0,035$. $p<0.05$ olduğu için anlamlı bir farklılık görülmüştür. Özellikle postoperasyon 2.haftada anlamlı farklılık çıkmış olması ozonun periferik sinir kesisi üzerinde iyileştirici etkisi olduğunu gösteriyor olabilir. Bu değerler duysal fonksiyon testi bulgularımızı desteklemektedir. Stoll G ve Müller HW. [215] yapmış oldukları çalışmada da periferik sinir yaralanmasında sinir lifleri ve schwann hücrelerinin primer hedef oldukları belirtmiştir [215]. Periferik sinir kesisi modelinde uyguladığımız intraperitoneal yöntemde yaptığımız elektron mikroskopik incelemesinde deneklerden elde edilen siyatik sinir elektron mikrograflarında grup 2 örnekleri schwann hücresi ve sitoplazmik organel zenginliği ile grup 1 örneklerine göre ultrastrüktürel olarak farklılık göstermekteydi. Bu nedenle tedavi uyguladığımız grupta görmüş olduğumuz primer hedef hücrelerinin rejenerasyon için önemli bir adım olduğunu düşünmekteyiz.

Chung MS ve arkadaşları [211] supramaksimal uyarım ile elde edilen bileşik kas aksiyon potansiyel eğrilerinde amplitüt olarak pozitif ve negatif pikler arası mesafe (p-p arası mesafe) ölçüldüğünü belirtmiştir [211]. Wolthers M ve ark. [212] bu ölçüm ile uyarıya yanıt veren motor lif popülasyonu, bunların cevaplarının senkronizasyonu ve akson tarafından innerve olan motor ünitenin boyutu hakkında bilgi sahibi olunabildiğini ve aksonal rejenerasyon artıp, remiyelinizasyon ilerledikçe, daha fazla lifte oluşan değişim ile cevabın senkronizasyonu ve amplitüdün artacağını rapor etmişlerdir [212]. Bu nedenle pozitif ve negatif pikler arası mesafe (p-p arası mesafe), latans süresi, maksimum pozitif pik (p-max) değerleri ve minimum pozitif pik (p-min) değerleri ölçüldü. Çalışmamızda dört grubun ortalama latans değerleri arasında farklılık bulunmaktadır ($p<0.05$). Grup 2 için p-min 1 ve p-min 2 ortalama değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmuştur ($p<0.001$). Yine Grup 1 (kesi grubu) ve Grup 2 (kesi+ ozon grubu) arasında p-p 1 ve p-p 2 ortalama değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık vardır ($p<0.05$). Ozon tedavisi uyguladığımız grubun 1.günü ve 8.hafta sonunda yaptığımız EMG ölçümleri arasındaki p-p, p max ve p min değerleri arasındaki fark bizi ozon'un sinir rejenerasyonu üzerine anlamlı bir etkisi olduğunu düşündürmektedir.

SONUÇLAR

Çalışmamızda fonksiyonel, elektrofizyolojik (EMG), biyokimyasal ve elektron mikroskopik düzeyde periferik sinir kesisi sonrası intraperitoneal olarak uygulanan ozon'un morfolojik hasarı onarmada etkili olduğunu ve iyileşmenin SFI ve EMG sonuçlarıyla da desteklenerek postoperasyonun 8.haftasında maximum düzeyde olduğunu tespit ettik.

Ratlar üzerinde intraperitoneal yöntemle uygulanan ozonun oksidatif stresi azaltarak nöroprotektif etkisi olduğunu gösterdik ancak klinikte uygun doz ve muhtemel yan etkilerinin daha fazla araştırılması gerekmektedir.

İntraperitoneal yöntemle uygulanan ozonun gelecekte periferik sinir cerrahisinden sonra uygulanabilirliği olan alternatif bir yöntem olabileceğini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Waxman SG: Sinir Dokusu: Korrelatif Nöroanatomi. 24. Baskıdan çeviri. Yıldırım M (Ed) Nobel Tıp Kitapevleri Ltd Sti, İstanbul 2002, S: 8-19.
2. Sadler TW: Embryonic period: Third to eight week. In Langman J, ed:Langman' s medical embryology, 6th ed. Baltimore, Williams and Wilkins,1990;61-66;356-362.
3. Weiss DG, Gross GW: The microstream hypothesis of axoplasmic transport; characteristics, predictions and compatibility with data. In Weiss DG, ed: Axoplasmic Transport. Berlin, Springer-Verlag, 1982;362-383.
4. Allt G, Lawrenson JG: The blood-nerve barrier: enzymes, transporters and receptors - a comparison with the blood-brain barrier (review). Brain Res Bull 2000;52: 1-12.
5. Ushiki T, Ide C: Three dimensional organization of the collagen fibrils in the rat sciatic nerve as revealed by transmission and scanning electron microscopy. Cell Tissue Res 1990;260:175-184.
6. Sunderland S: The connective tissue of peripheral nerves. Brain 1965;88: 841-854.
7. Myers RR, Powel HC, Costello ML: Endoneurial fluid pressure: direct measurement with micropipettes. Brain Res 1978;148:510-515.
8. Lundborg G: The intrinsic vascularization of human peripheral nerves: Structural and functional aspects. J Hand Surg 1979;4: 34-41.
9. Lundborg G: Nerve injury and repair. Churchill Livingstone, New York 1988; 32-63.
10. Jabaley ME, Wallace WH, Heckler FR.:Internal topography of major nerves of the forearm and hand. J Hand Surg 1980;5A:1-18.
11. Watchmaker GP, Gumucio CA, Crandall RE, et al: Fascicular topography of the median nerve. J Hand Surg, 1991;16A:53-59.
12. Snell R.S., Clinical Neuroanatomy for Medical Students, Little Brown and Company, Boston. 1980: 87-114.
13. Jung-Tetas I, Baulieu EE. 1998. Steroid hormone receptors and steroid action in glial cells of the central and peripheral nervous system. J Steroid Biochem Mol Biol; 65 (1-6): 243-51.

14. Ganong WF; Çeviren: Doğan A. Tıbbi Fizyoloji. Barış kitabevi. İstanbul, 1995.
15. Stevens A., Lowe J.S., Human Histology, Mosby, London, 1997: 92-4.
16. Snell R. (ed.) Nerve fibers, peripheral nerves, receptor and effector endings, dermatomes and muscle activity. In: Clinical neuroanatomy. 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2006; 69-132.
17. Okutan O. Periferik sinir sisteminin anatomisi. In: Demircan N, Zileli M. (eds.) Periferik sinir cerrahisi. 1st ed. Ankara: Türk NöroÇirurji Derneği, 2008; 7-26.
18. Stewart JD. Compression and entrapment neuropathies. In: Dyck PJ, Thomas PK, editors. Peripheral Neuropathy, 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders Company; 1993; 961-79.
19. Akarırmak Ü. Tuzak Nöropatiler. In: Beyazova M, Gökçe-Kutsal Y, editors. Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon. Ankara: Güneş Kitabevi; 2000; 2071-89.
20. Filler AG. Piriformis and related entrapment syndrome: diagnosis and management. Neurosurg Clin N Am 2008;19:609-22.
21. Shenaq SM, Kim JYS. Repair and grafting of peripheral nevre. In: Mathes SJ, editor. Plastic surgery. 2nd ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2006;1:719-43.
22. Winograd JM, Mackinnon SE. Peripheral nevre injuries: Repair and reconstruction. In: Mathes SJ, editor. Plastic surgery. 2nd ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2006;7:47-514.
23. Burnett MG, Zager EL. Pathophysiology of peripheral nerve injury: A brief review. Neurosurg Focus. 2004;16(5): 1-7.
24. Dagum AB. Peripheral nerve regeneration, repair and grafting. J Hand Ther. 1998;11:111-7.
25. Glickman LT, Mackinnon SE. Sensory recovery following digital replantation. Microsurgery. 1990;11:236-42.
26. Khan M, Griebel R. Acute spinal cord injury in the rat. Comparison of three experimental techniques. Can J Neurosci.1983;10:161-164.
27. Dahlin LB. The biology of nevre injury and repair. J Am Surg Hand. 2004;4(3):143-55
28. Terenghi G. Peripheral nerve regeneration and neurotrophic factors. J Anat. 1999;194(Pt 1):1-14.
29. Seddon HJ. A classification of nerve injuries. BMJ 1942; 2:237-239.
30. Seddon HJ. Three types of nerve injury. Brain 1943; 66:237-288.

31. Lundborg G, Dahlin LB, Structure and function of peripheral nerve. Operative Nerve Repair and Reconstruction. editors: Gelberman RH. JB Lippincott. Philadelphia. 1991: 3-15.
32. Lundborg G, Nerve Injury and Repair. Churchill Livingstone. New York.1988: 149-195.
33. Bixby JL, Zhang R, Purified N-cadherin is a potent substrate for the rapid induction of neurite outgrowth. J Cell Biol 1990; 110: 1253-60
34. Lundborg G. Nerve regeneration and repair. A review. Acta Orthop Scand. 1987;58(2):145-69.
35. 4. Robinson LR. Traumatic injury to peripheral nerves. Muscle and Nerve, 2000;23: 863-73.
36. Watchmaker GP, Mackinnon SE. Advances in Peripheral Nerve Repair. Clinics Plast Surg 1997; 24 : 63-73.
37. Saleh MS, John YS, Repair and grafting of the peripheral nerve. Plastic Surgery. 2th edition. ed: Stephen J. Mathes. Saunders. Philadelphia. 2000: 719-73
38. Thomas PK, Berthold CH, Ochoa J. Microscopic anatomy of the peripheral nervous system. Peripheral Neuropathy. 3rd edition. editor: Dyck P. Philadelphia;WB Saunders 1993: 28-80.
39. Crews LL, Wigston DJ. The dependence of motoneurons on their target muscle during postnatal development of the mouse. J Neurosci. 1990 May;10:1643-53.
40. Anneser JM, Berthele A, Borasio GD, Castro-Lopes JM, Zieglgansberger W, Tolle TR. Axotomy of the sciatic nerve differentially affects expression of metabotropic glutamate receptor mRNA in adult rat motoneurons. Brain Res. 2000;868:215-21.
41. Devor M, Schonfeld D, Seltzer Z, Wall PD. Two modes of cutaneous reinnervation following peripheral nerve injury. J Comp Neurol. 1979;185:211-20.
42. Seltzer Z, Dubner R, Shir Y. A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. Pain. 1990;43:205-18.
43. Kim SH, Chung JM. An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. Pain. 1992 ;50:355-63.

44. Decosterd I, Allchorne A, Woolf CJ. Progressive tactile hypersensitivity after a peripheral nerve crush: non-noxious mechanical stimulus-induced neuropathic pain. *Pain*. 2002;100:155-62.
45. Sarikcioglu L, Ozkan O. Yasargil-Phynox aneurysm clip: a simple and reliable device for making a peripheral nerve injury. *Int J Neurosci*. 2003 Apr;113:455-64.
46. Sarikcioglu L, Demir N, Demirtop A. A standardized method to create optic nerve crush: Yasargil aneurysm clip. *Exp Eye Res*. 2007 Feb;84:373-7.
47. Wall PD, Devor M, Inbal R. Autotomy following peripheral nerve lesions: experimental anaesthesia dolorosa. *Pain*. 1979 Oct;7:103-11.
48. DeLeo JA, Coombs DW, Willenbring S. Characterization of a neuropathic pain model: sciatic cryoneurolysis in the rat. *Pain*. 1994 Jan;56:9-16.
49. DeLeo JA, Yeziarski RP. The role of neuroinflammation and neuroimmune activation in persistent pain. *Pain*. 2001 Feb 1;90:1-6.
50. Shimoyama M, Tanaka K, Hasue F, Shimoyama N. A mouse model of neuropathic cancer pain. *Pain*. 2002 Sep;99:167-74.
51. Sarikcioglu L, Demirel BM, Demir N, Yildirim FB, Demirtop A, Oguz N. Morphological and ultrastructural analysis of the watershed zones after stripping of the vasa nervorum. *Int J Neurosci*. 2008 Aug;118:1145-55.
52. Diel J, Ortiz O, Losada R A, Price D B, Hayt M W, Katz D S. The Sacrum: Pathologic Spectrum, Multimodality Imaging, and Subspecialty Approach. *RadioGraphics*, 2001, 21: 83–104.
53. Schwemmer U, Markus CK, Greim CA, Brederlau J, Trautner H, Roewer N. Sonographic imaging of the sciatic nerve and its division in the popliteal fossa in children. *Paediatr Anaesth* 2004; 14(12): 1005-8.
54. Lanzieri C F, Hilal S K. Computed Tomography of the Sacral Plexus and Sciatic Nerve in the Greater Sciatic Foramen. *AJR* 1984; 143: 165-8.
55. Yıldırım M. Regio Glutealis. İçinde: Topografik Anatomi. 2. Baskı. Ankara: Nobel Tıp Kitabevleri, 2004: s.106.
56. Ripani M, Continenza M A, Cacchio A, Barile A, Parisi A, De Paulis F. The ischiatic region: normal and MRI anatomy. *J Sports Med Phys Fitness*. 2006; 46(3): 468-75.
57. Srinivasan J, Escobar D, Ryan M, Darras B, Jones HR. Pediatric sciatic neuropathies due to unusual vascular causes. *J Child Neurol*. 2008; 23(7): 738-41.

58. Stephanie J. Woodley Susan R. Mercer. Hamstring Muscles: Architecture and Innervation. *Cells Tissues Organs*. 2005; 179: 125–141.
59. Ugrenovic S, Javanovic I, Vasovic L, Stefanovic B D Extraneural Arterial Blood Vessels of Human Fetal Sciatic Nerve. *Cells Tissues Organs* 2007; 186: 147–153.
60. Güvençer M, İyem C, Akyer P, Tetik S, Naderi S. Variations in the high division of the sciatic nerve and relationship between the sciatic nerve and the piriformis. *Turkish Neurosurgery* 2009;19 (2):139-44.
61. Vloka J D, Hadzic A, Lesser J B, Kitain E, Geatz H, April E W, Thys D M. A Common Epineural Sheath for the Nerves in the Popliteal Fossa and Its Possible Implications for Sciatic Nerve Block. *Anesth Analg* 1997; 84: 387-90.
62. Arıncı K, Elhan A. Periferik Sinir Sistemi. İçinde: *Anatomi*. 3. Baskı. Ankara: Güneş Kitabevi, 2001;(2):178.
63. Kolb L, Gray S. Peripheral neuritis as a complication of penicillin therapy. *JAMA* 1946; 132:323–326.
64. Zeren Z. *Sistemik İnsan Anatomisi*. İstanbul: Ekim Yayınları, 1982: 547.
65. Güvençer M, İyem C, Akyer P, Tetik S, Naderi S. Anatomic considerations and the relationship between the piriformis muscle and the sciatic nerve. *Surg Radiol Anat* 2008, 30: 467–74.
66. Vloka J D, Hadzic A, April E W, Thys D M. The Division of the Sciatic Nerve in the Popliteal Fossa: Anatomical Implications for Popliteal Nerve Blockade. *Anesth Analg* 2001; 92: 215-7.
67. Mackinnon SE, Hudson AR, Hunter DA. Histologic Assessment of Nerve regeneration in the Rat. *Plast Reconstr Surg* 1985; 75: 384-8.
68. Swett JE, Torigoe Y, Elie VR et al. Sensory Neurons of the Rat Sciatic Nerve. *Exp Neurol*. 1991; 114: 82-103.
69. Swett JE, Wikholm RP, Blanks HI et al. Motoneurons of the rat sciatic nerve. *Exp Neurol*. 1986; 93: 227-52.
70. Uysal CA et al. Sciatic nerve anatomy in rat re-visited: a more proximal intervention. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 2009;62(6):847-9.
71. Fumio Asato et al. Variation in rat sciatic nerve anatomy: Implications for a rat model of neuropathic pain. *Journal of the Peripheral Nervous System* 2000;5:19–21.
72. *Transactions of the American Philosophical Society* Greene EC. *Anatomy of the Rat*. 1963: P:27-35.

73. Esslen E: Electromyography and electroneurography. Fish U (ed): Facial Nerve Surgery. Birmingham, AL, Aesculapius Publishing, 1977:93-100.
74. Kartush JM et al. Facial electroneurography: clinical and experimental investigations. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1985; 93: 516-526.
75. Kızıltan M, Boyun, Bel ve Ekstremitte Ağrılarında EMG, İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri: Sempozyum Dizisi No: 30 Mayıs 2002;147-153.
76. Bakker CD, van Kuijk AA, Geurts AC, Stegeman DF, Pasma JW. Can forearm muscle activity be selectively recorded using conventional surface EMG-electrodes in transcranial magnetic stimulation? A feasibility study. *J Electromyogr Kinesiol.* 2014.03.06. pii: S1050-6411(14)00052-2. doi: 10.1016/j.jelekin.2014.02.006.
77. Hackett L, Reed D, Halaki M, Ginn KA. Assessing the validity of surface electromyography for recording muscle activation patterns from serratus anterior. *J Electromyogr Kinesiol.* 2014 Apr;24(2):221-7. doi: 10.1016/j.jelekin.2014.01.007. Epub 2014 Jan 31.
78. Sanders DB. Measuring jitter with concentric needle electrodes. *Muscle Nerve.* 2013 Mar;47(3):317-8. doi:10.1002/mus.23709. Epub 2012 Dec 1.
79. Stalberg E. Jitter analysis with concentric needle electrodes. *Ann N Y Acad Sci.* 2012 Dec;1274:77-85. doi: 10.1111/j.1749-6632.2012.06775.
80. Wilmore JH., Costil DL., Physiology of Sport and Exercise, Human Kinetics. Hong Kong, 2004; (39-44):45-53.
81. Chusid JG., Correlative Neuroanatomy and Functional Neurology, Lange Medical, California, 1993;17-18.
82. Basmajian JV., Latif A., Integrated actions and functions of the chief flexors of the elbow. *J. Bone Joint Surg,* 1957 (39); 1106-1118.
83. Soderberg, G.L., Recording techniques. In: Selected topics in surface electromyography for use in the occupational setting: expert perspectives, G.L., Soderberg (Eds). DHHS (NIOSH) Publication, USA.1992: (91-100);24-41.
84. Cerny FJ., Burton HW., Exercise Physiology for Health Care Professionals, Human Kinetics, United States of America. 2001;142.
85. Mc Ardle WD., Katch FI., Katch VL., Exercise Physiology, Energy, Nutrition and Human Performance, Lea and Febiger, Philadelphia, 1981;359.

86. Loginova NN, Voitenkov VB. Infrared thermography and electroneuromyography in occupational polyneuropathy diagnosis. *Med Tr Prom Ekol.* 2013;(8):46-8.
87. Le Floch JP, Le Lièvre G, Verroust J, Philippon C, Peynegre R, Perlemuter L. Factors related to the electric taste threshold in type 1 diabetic patients. *Diabet Med.* 1990;7(6):526-31.
88. Yilmaz M, Aktug H, Oltulu F, Erbas O. Neuroprotective effects of folic acid on experimental diabetic peripheral neuropathy. *Toxicol Ind Health.* 2013/12/5.
89. Z'Graggen WJ, Aregger F, Farese S, Humm AM, Baumann C, Uehlinger DE, Bostock H. Velocity recovery cycles of human muscle action potentials in chronic renal failure. *Clin Neurophysiol.* 2010;121(6):874-81. doi: 10.1016/j.clinph.2010.01.024.
90. Teräväinen H, Juntunen J, Eriksson K, Larsen A. Virchow's Myopathy associated with chronic alcohol drinking. Histological and electrophysiological study. *Arch A Pathol Anat Histol.* 1978;378(1):45-53.
91. Inaloo S, Katibeh P. Guillain-barre syndrome presenting with bilateral facial nerve palsy. *Iran J Child Neurol.* 2014;8(1):70-2.
92. Da YW., Li Y., Zhang XQ., Jia JP., Clinical and imaging features and genetic analysis of a case with adult-onset Krabbe disease. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi.* 2013;(5):585-8. doi: 10.3760/cma.j.issn.1003-9406.2013.05.017.
93. Sandberg A, Nandedkar SD, Stalberg E. Macro electromyography and motor unit number index in the tibialis anterior muscle: differences and similarities in characterizing motor unit properties in prior polio. *Muscle Nerve.* 2011;43(3):335-41. doi: 10.1002/mus.21878.
94. Bucheli M, Andino A, Montalvo M, Cruz J, Atassi N, Berry J, Salameh J. Amyotrophic lateral sclerosis: analysis of ALS cases in a predominantly admixed population of Ecuador. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener.* 2014 ;15(1-2):106-13. doi: 10.3109/21678421.2013.852590.
95. Sharma A, Sane H, Paranjape A, Bhagawanani K, Gokulchandran N, Badhe P. Autologous bone marrow mononuclear cell transplantation in Duchenne muscular dystrophy-a case report. *Am J Case Rep.* 2014;28(15):128-34. doi: 10.12659/AJCR.890078. eCollection 2014.
96. Van den Bergh PY, Martin JJ, Lecouvet F, Udd B, Schmedding E. Laing early-onset distal myopathy in a Belgian family. *Acta Neurol Belg.* 2014.
97. Meekins GD, So Y, Quan D. American Association of Neuromuscular & Electrodiagnostic Medicine evidenced-based review: use of surface

electromyography in the diagnosis and study of neuromuscular disorders. *Muscle Nerve*. 2008;38(4):1219-24. doi: 10.1002/mus.21055.

98. Gokgoz E, Subasi A. Effect of multiscale PCA de-noising on EMG signal classification for diagnosis of neuromuscular disorders. *J Med Syst*. 2014;38(4):31. doi: 10.1007/s10916-014-0031-3.
99. Kamali T, Boostani R, Parsaei H. A Multi-Classifer Approach to MUAP Classification for Diagnosis of Neuromuscular Disorders. *IEEE Trans Neural Syst Rehabil Eng*. 2013;22(1):191-200.
100. Stashuk D. W., Brown W. F., Bolton C. F., Aminoff M. J., Eds. *Quantitative Electromyography in Neuromuscular Function and Disease*, 1 ed. Philadelphia, PA: Elsevier, 2002;(1):311–348.
101. Pattichis C.S., Pattichis M.S.. Time-scale analysis of motor unit action potentials. *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, 1999;(46:11),1320–1329.
102. Thumfart WF. Electromyography of the larynx and related technics. *Acta Otorhinolaryngol Belg*. 1986;40(2):358-76.
103. Lee JH, Lee SH. Physical examination, magnetic resonance image, and electrodiagnostic study in patients with lumbosacral disc herniation or spinal stenosis. *J Rehabil Med*. 2012;44(10):845-50. doi: 10.2340/16501977-1034.
104. Rubin, Mordecai B. The History of Ozone. The Schönbein Period, 1839-1868. *Bull. Hist. Chem*. 2001;26 (1):40-50.
105. Bocci V. Scientific and medical aspects of ozone therapy. state of the art. *Archives of Medical Research*. 2006;37:425–435.
106. Rowland FS. Stratospheric ozone depletion. *Phil Trans R Soc B*. 2006; 361:769-790.
107. Sanhueza PA, Reed GD, Davis WT, Miller TL. An environmental decision-making tool for evaluating ground-level ozone-related health effects. *J Air Waste Manag Assoc*. 2003;53;12:1448-59.
108. Bocci V, Aldinucci C. Biochemical modifications induced in human blood by oxygenation ozonation. *J Biochem Molecular Toxicology*. 2006;20(3);133-138.
109. Ohtsuka H, Ogata A, Terasaki N, Koiwa M, Kawamura S. Changes in leukocyte population after ozonated autohemoadministration in cows with inflammatory diseases. *Journal of Veterinary Medical Science*. 2006;68(2):175-178.
110. Güzel Ö. Medikal Ozon ve veteriner cerrahide kullanımı. *İstanbul Üniv. J. Fac. Vet. Med*. 2011;37;2:177-184.

111. Özler M, Öter Ş, Korkmaz A. The Use of Ozone Gas for Medical PurposesTAF Prev Med Bull. 2009; 8(1):59-64.
112. Jacqueline IK. Kirk-Othmer encyclopedia of chemical technology. John Wiley & Sons. 1981;3rd ed.
113. Wright ES, Dziedzic D, Wheeler CS. Cellular, biochemical and functional effects of ozone: new research and perspectives on ozone health effects. Toxicol Lett. 1990;51(2):125-45.
114. Babuççu O. Ozone therapy: myth and fact. Turk Plast Surg 2011;19 (3):105-112.
115. Travagli V, Zanardi I, Silvietti A, Bocci V. Physicochemical investigation on the effects of ozone on blood. International Journal of Biological Macromolecules.2007;4:1504-511.
116. Lin YH., Hsien HJ.Characteristics transformation of humic acid during ozonation and biofiltration treatment processes. Water Environ Res. 2011;83(5):450-60.
117. Mel'nikova AM., Kaler GV., Babich GV., Romanov SL, Matus VK. Zh The conflicting action of low and high doses of ozone on the reproductive capacity and respiratory activity of Candida utilis yeast cells. Obshch Biol. 1989;50(6):815-8.
118. Rodriguez Z, Guanche D, Alvarez R, Rosales F, Alonso Y, Schulz S. Preconditioning with ozone/oxygen mixture induces reversion of some indicators of oxidative stress and prevents organic damage in rats with fecal peritonitis. Journal of Inflammation. Research. 2009;58;371-375.
119. Bocci V, Zanardi I, Huijberts MS, Travagli V. An integrated medical treatment for type-2 diabetes. Diabetes Metab Syndr. 2014;8(1):57-61. doi: 10.1016/j.dsx.2013.10.004.
120. Albedah AM, Khalil MK, Elolemy AT, Alrasheid MH, Mudaiheem AA, Elolemy TM Ozone therapy in postgraduate theses in Egypt: systematic review.J Egypt Public Health Assoc. 2013;88(2):57-66. doi: 10.1097/01.EPX.0000431630.91853.ce.
121. Bocci V, Zanardi I, Huijberts MS, Travagli V. Diabetes and chronic oxidative stress. A perspective based on the possible usefulness of ozone therapy. Diabetes Metab Syndr. 2011;5(1):45-9. doi: 10.1016/j.dsx.2010.05.014. Epub 2010 Jun 7.
122. Gazin IK. Pathophysiological aspects of endotoxemia complicated with purulent infection of the foot and correction of endotoxemia with

conventional treatment and with application of ozonized physiological solution in patients suffering from diabetes mellitus. *Patol Fiziol Eksp Ter.* 2008;(4):23-5.

123. Gazin IK. Criteria for intoxication in the evaluation of severity of endotoxiosis, the efficiency of ozone therapy and traditional treatment in patients with diabetes mellitus complicated by pyonecrotic lesions of the lower extremities *Klin Lab Diagn.* 2008;(6):21-3.
124. Re L, Mawsouf MN, Menéndez S, León OS, Sánchez GM, Hernández F. Ozone therapy: clinical and basic evidence of its therapeutic potential. *Arch Med Res.* 2008;39(1):17-26.
125. Fort NM, Aichmair A, Miller AO, Girardi FP. L5-S1 *Achromobacter xylosoxidans* Infection Secondary to Oxygen-Ozone Therapy for the Treatment of Lumbosacral Disc Herniation: A Case Report and Review of the Literature. *Spine (Phila Pa 1976).* 2014;39(6):E413-6. doi: 10.1097/BRS.000000000000195.
126. Katti SS, Chava VK Effect of Ozonised water on Chronic Periodontitis - A Clinical Study. *J Int Oral Health.* 2013;5(5):79-84.
127. Guerrer LV, Cunha KC, Nogueira MC, Cardoso CC, Soares MM, Almeida MT. "In vitro" antifungal activity of ozonized sunflower oil on yeasts from onychomycosis. *Braz J Microbiol.* 2012;43(4):1315-8. doi: 10.1590/S1517-838220120004000011.
128. Guinesi AS, Andolfatto C, Bonetti Filho I, Cardoso AA, Passaretti Filho J, Farac RV. Ozonized oils: a qualitative and quantitative analysis. *Braz Dent J.* 2011;22(1):37-40.
129. Daud FV, Ueda SM, Navarini A, Mímica LM. The use of ozonized oil in the treatment of dermatophytosis caused by *microsporum canis* in rabbits. *Braz J Microbiol.* 2011;42(1):274-81. doi: 10.1590/S1517-83822011000100035.
130. Sechi LA, Lezcano I, Nunez N, Espim M, Duprè I, Pinna A, Molicotti P, Fadda G, Zanetti S Antibacterial activity of ozonized sunflower oil (Oleozon). *J Appl Microbiol.* 2001;90(2):279-84.
131. Fahmy Z. The Application of Ozone Therapy in Pain Management, Rheumatic and Orthopaedic Diseases. 2008;Book of Rheumatology:671.
132. de Monte A, van der Zee H, Bocci V. Major ozonated autohemotherapy in chronic limb ischemia with ulcerations. *J Altern Complement Med.* 2005;11(2):363-7.
133. Li LJ, Yang YG, Zhang ZL, Nie SF, Li Z, Li F, Hua HY, Hu YJ, Zhang HS, Guo YB. Protective effects of medical ozone combined with traditional

Chinese medicine against chemically-induced hepatic injury in dogs. *World J Gastroenterol.* 2007 Dec 7;13(45):5989-94.

134. Balta S, Balta I, Mikhailidis DP, Ozturk C, Demirkol S, Celik T, Kilic S, Demir M, Iyisoy A. Bilirubin Levels and Their Association with Carotid Intima Media Thickness and High-Sensitivity C-reactive Protein in Patients with Psoriasis Vulgaris. *Am J Clin Dermatol.* 2014 Apr 3.
135. Ali A, Ong MK, Forney CF. Effect of ozone pre-conditioning on quality and antioxidant capacity of papaya fruit during ambient storage. *Food Chem.* 2014;142:19-26. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.07.039.
136. Larini A, Bianchi L, Bocci V. The ozone tolerance: I) Enhancement of antioxidant enzymes is ozone dose-dependent in Jurkat cells *Free Radic Res.* 2003;37(11):1163-8.
137. Gracer RI, Bocci V. Can the combination of localized "proliferative therapy" with "minor ozonated autohemotherapy" restore the natural healing process? *Med Hypotheses.* 2005;65(4):752-9.
138. Zhang Y, Ma Y, Jiang J, Ding T, Wang J. Treatment of the lumbar disc herniation with intradiscal and intraforaminal injection of oxygen-ozone. *J Back Musculoskelet Rehabil.* 2013 Jan 1;26(3):317-22. doi: 10.3233/BMR-130386.
139. Kutlubay Z, Engin B., Serdaroğlu S., Tüzün Y. Dermatolojide Ozon Tedavisi. Review. *İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Dermatoloji Anabilim Dalı, Dermatoz* 2010 ; 1(4) : 209-216.
140. Clavo B, Ceballos D, Gutierrez D, Rovira G, Suarez G, Lopez L, Pinar B, Cabezón A, Morales V, Oliva E, Fiuza D, Santana-Rodriguez N. Long-term control of refractory hemorrhagic radiation proctitis with ozone therapy. *J Pain Symptom Manage.* 2013;46(1):106-12. doi: 10.1016/j.jpainsymman.2012.06.017.
141. Bocci V, Zanardi I, Borrelli E, Travagli V. .Reliable and effective oxygen-ozone therapy at a crossroads with ozonated saline infusion and ozone rectal insufflation. *J Pharm Pharmacol.* 2012;64(4):482-9. doi: 10.1111/j.2042-7158.2011.01427.x.
142. Qu DD, Peng FJ, Liu L, Yang SL, Guo YB. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi.* Effect of ozonized saline on signaling passway of Keap1-Nrf2-ARE in rat hepatocytes. 2011;19(5):367-71. doi: 10.3760/cma.j.issn.1007-3418.2011.05.013.
143. Elvis AM, Ekta JS. Ozone therapy: A clinical review. *J Nat Sci Biol Med.* 2011 Jan;2(1):66-70. doi: 10.4103/0976-9668.82319.

144. G, Fortino V, Bocci V. The dual action of ozone on the skin. *Br J Dermatol.* 2005; 153:1096-1100.
145. Rodríguez,S.M., Galindo,A.S., Llamazares,C.M.F., Herce,J.L., López,I.G., Álvarez,A.C., Sáez,M.S. Smart pump alerts: All that glitters is not gold, *International Journal of Medical Informatics.* 2012;81: 344–350.
146. Allen, J. M., W. X. Balcavage, B. R. Ramachandran, and A. L. ShROUT. Determination of Henry's Law constants by equilibrium partitioning in a closed system using a new in situ optical absorbance method. *Environ. Toxicol. Chem.*,1998;17,1216–1221.
147. McCord J. Human disease, free radicals and the oxidant /antioxidant balance.*Clin Biochem* 1993;26: 351 - 357.
148. Leurs R, Rademaker B, Kramer K, Timmerman H, Bast A. The effects of 4-hydroxy-2,3-trans-nonenal on beta-adrenoceptors of rat lung membranes. *Chem Biol Interact.* 1986;59(2):211-8.
149. Hyun DH. Effect of the overexpression of mutant ubiquitin (K48R) on the cellular response induced by 4-hydroxy-2,3-trans-nonenal, an end-product of lipid peroxidation. *Neurosci Lett.* 2010;477(3):115-20. doi: 10.1016/j.neulet.2010.04.045.
150. Zakošek Pipan M, Mrkun J, Kosec M, Nemeč Svete A, Zrimšek P. Superoxide dismutase: a predicting factor for boar semen characteristics for short-term preservation. *Biomed Res Int.* 2014;2014:105280. doi: 10.1155/2014/105280.
151. Rozpądek P, Ślesak I, Cebula S, Waligórski P, Dziurka M, Skoczowski A, Miszałski Z..Ozone fumigation results in accelerated growth and persistent changes in the antioxidant system of *Brassica oleracea L. var. capitata f. alba.* *J Plant Physiol.* 2013;170(14):1259-66. doi: 10.1016/j.jplph.2013.04.018.
152. Sagai M, Bocci V. Mechanisms of Action Involved in Ozone Therapy: Is healing induced via a mild oxidative stress?,*Med Gas Res.* 2011 Dec 20;1:29. doi: 10.1186/2045-9912-1-29.
153. Morsy MD, Hassan WN, Zalat SI. Improvement of renal oxidative stress markers after ozone administration in diabetic nephropathy in rats.*Diabetol Metab Syndr.* 2010;2(1):29. doi: 10.1186/1758-5996-2-29.
154. Hwang BF, Young LH, Tsai CH, Tung KY, Wang PC, Su MW, Lee YL, Fine particle, ozone exposure, and asthma/wheezing: effect modification by glutathione S-transferase P1 polymorphisms. *PLoS One.* 2013;8(1):e52715. doi: 10.1371/journal.pone.0052715.

155. Islam T, Berhane K, McConnell R, Gauderman WJ, Avol E, Peters JM, Gilliland FD Glutathione-S-transferase (GST) P1, GSTM1, exercise, ozone and asthma incidence in school children. *Thorax*. 2009;64(3):197-202. doi: 10.1136/thx.2008.099366.
156. Spodniewska A. Glutathione and glutathione-related enzymes in rats exposed to dimethoate and/or pyrantel. *Pol J Vet Sci*. 2014;17(1):105-12.
157. Altunkaynak BZ, Unal D, Altunkaynak ME, Halici Z, Kalkan Y, Keles ON, Aksak S, Selli J, Unal B Effects of diabetes and ovariectomy on rat hippocampus (a biochemical and stereological study). *Gynecol Endocrinol*. 2012;28(3):228-33. doi: 10.3109/09513590.2011.59366.
158. Akkuş İ, Türkmen F, Yeğin M 2,3-Difosfogliserat (2,3-DPG) ve Klinik Önemi, Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya ABD, Türkiye Klinikleri *J Med Sci*.1988;8(5):363-7.
159. Pridham J., Sampson J., Rice-Evans C. Antioxidant potential of intermediates in phenylpropanoid metabolism in higher plants. *FEBS Lett*.1995;368, 188-192.
160. Rice-Evans C. A., Miller J. M., Paganga G., Structure-antioxidant activity relationship of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic. Biol. Med*. 1996;20:933-956.
161. Ollinger R, Wang H, Yamashita K, Wegiel B, Thomas M, Margreiter R, Bach FH. Therapeutic applications of bilirubin and biliverdin in transplantation. *Antioxid Redox Signal*. 2007;9(12):2175-85.
162. Sokhi UK, Bacolod MD, Emdad L, Das SK, Dumur CI, Miles MF, Sarkar D, Fisher PB. Analysis of Global Changes in Gene Expression Induced by Human Polynucleotide Phosphorylase (hPNPaseold-35). *J Cell Physiol*. 2014 Apr 14. doi: 10.1002/jcp.24645.
163. Pecorelli A, Bocci V, Acquaviva A, Belmonte G, Gardi C, Virgili F, Ciccoli L, Valacchi G. NRF2 activation is involved in ozonated human serum upregulation of HO-1 in endothelial cells. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2013;267(1):30-40. doi: 10.1016/j.taap.2012.12.001.
164. Bauer AK, Rondini EA, Hummel KA, Degraff LM, Walker C, Jedlicka AE, Kleeberger SR. Identification of candidate genes downstream of TLR4 signaling after ozone exposure in mice: a role for heat-shock protein 70. *Environ Health Perspect*. 2011;119(8):1091-7. doi: 10.1289/ehp.1003326.
165. Borrelli E, Bocci V. Visual Improvement Following Ozonotherapy in Dry Age Related Macular Degeneration; a Review. *Med Hypothesis Discov Innov Ophthalmol*. 2013;2(2):47-51.

166. Borrelli E, Diadori A, Zalaffi A, Bocci V. Effects of major ozonated autohemotherapy in the treatment of dry age related macular degeneration: a randomized controlled clinical study. *Int J Ophthalmol.* 2012;5(6):708-13. doi: 10.3980/j.issn.2222-3959.2012.06.11.
167. Martínez-Sánchez G, Al-Dalain SM, Menéndez S, ve ark. Therapeutic efficacy of ozone in patients with diabetic foot. *Eur J Pharmacol.* 2005;523:151-161.
168. Borge MV, de la Morena HL, Dufourny CI, Martínez FA, Sánchez PLF. Diabetic foot and risk factors. *Ann Med Interna.* 2007;24:263-266.
169. Vaillant JD, Fraga A, Díaz MT, Mallok A, Viebahn-Hänsler R, Fahmy Z, Barberá A, Delgado L, Menéndez S, Fernández OS. Ozone oxidative postconditioning ameliorates joint damage and decreases pro-inflammatory cytokine levels and oxidative stress in PG/PS-induced arthritis in rats. *Eur J Pharmacol.* 2013;714(1-3):318-24. doi: 10.1016/j.ejphar.2013.07.034.
170. Chen H, Yu B, Lu C, Lin Q. The effect of intra-articular injection of different concentrations of ozone on the level of TNF- α , TNF-R1, and TNF-R2 in rats with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int.* 2013;33(5):1223-7. doi: 10.1007/s00296-012-2529-7.
171. Yu B, Chen HQ, Lu CH, Lin QR, Wang BW, Qin CH. Effect of intra-articular ozone injection on serum and synovial TNF- α , TNFR I, and TNFR II contents in rats with rheumatoid arthritis. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao.* 2011;31(6):1055-8.
172. Neronov VA. Experience with the use of ozone for the treatment of chronic viral hepatitis. *Vopr Kurortol Fizioter Lech Fiz Kult.* 2009;(6):14-7.
173. Jiao XJ, Peng X. Clinical study of medical ozone therapy in chronic hepatitis B of 20 patients. *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi.* 2008;22(6):484-5.
174. Li JH, Zhou LX, Li GY, Cheng B. Treatment of middle-aged and aged patients with knee osteoarthritis of yang-deficiency induced cold-damp syndrome by ozone combined Chinese materia medica: a clinical research *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi.* 2013;33(4):471-5.
175. Al-Jaziri AA, Mahmoodi S. Painkilling effect of ozone-oxygen injection on spine and joint osteoarthritis. *Saudi Med J.* 2008;29(4):553-7.
176. Agrillo A, Ungari C, Filiaci F, Priore P, Iannetti G. Ozone therapy in the treatment of avascular bisphosphonate-related jaw osteonecrosis. *J Craniofac Surg.* 2007;18(5):1071-5.

177. Hidalgo-Tallón J, Menéndez-Cepero S, Vilchez JS, Rodríguez-López CM, Calandre EP. Ozone therapy as add-on treatment in fibromyalgia management by rectal insufflation: an open-label pilot study. *J Altern Complement Med.* 2013;19(3):238-42. doi: 10.1089/acm.2011.0739.
178. Gazzeri R, Galarza M, Neroni M, Esposito S, Alfieri A. Fulminating septicemia secondary to oxygen-ozone therapy for lumbar disc herniation: case report. *Spine (Phila Pa 1976).* 2007;32(3):121-3.
179. Muto M, Avella F. Percutaneous treatment of herniated lumbar disc by intradiscal oxygen-ozone injection. *Interv Neuroradiol.* 1998;4(4):279-86.
180. Menéndez S, Del Cerro A, Alvarez T, Hernández F. Application of ozone therapy in the vestibulocochlear syndrome. *Rev Recent Clin Trials.* 2012;7(4):321-8.
181. Clavo B, Santana-Rodriguez N, Gutierrez D, Lopez JC, Suarez G, Lopez L, Robaina F, Bocci V.J. Long-term improvement in refractory headache following ozone therapy. *Altern Complement Med.* 2013;19(5):453-8. doi: 10.1089/acm.2012.0273.
182. Struchkov PV, Selitskii GV, Korobeinikova MV, Zubkova AV. Use of ozonotherapy (OT) in combined treatment of patients with discirculatory encephalopathy (DEP). *Vopr Kurortol Fizioter Lech Fiz Kult.* 2008;(2):10-3.
183. Angoa-Pérez M, Jiang H, Rodríguez AI, Lemini C, Levine RA, Rivas-Arancibia S. Estrogen counteracts ozone-induced oxidative stress and nigral neuronal death. *Neuroreport.* 2006;17(6):629-33.
184. Khmeleva EV, Vitkina TI, Antoniuk MV, Novgorodtsev AD. Medical applications of ozone for the rehabilitation of the patients presenting with chronic bronchitis and arterial hypertension. *Vopr Kurortol Fizioter Lech Fiz Kult.* 2012;(3):3-8.
185. Wainstein J, Feldbrin Z, Boaz M, Harman-Boehm I. Efficacy of ozone-oxygen therapy for the treatment of diabetic foot ulcers. *Diabetes Technol Ther.* 2011;13(12):1255-60. doi: 10.1089/dia.2011.0018.
186. Zubarev PN, Risman BV. Ultrasonic cavitation and ozonization in treatment of patients with pyo-necrotic complications of diabetic foot syndrome *Vestn Khir Im I I Grek.* 2011;170(1):48-53.
187. Clavo B, Santana-Rodriguez N, López-Silva SM, Dominguez E, Mori M, Gutierrez D, Hernandez MA, Robaina F. Persistent PORT-A-CATH®-related fistula and fibrosis in a breast cancer patient successfully treated with local ozone application. *J Pain Symptom Manage.* 2012;43(2):3-6. doi: 10.1016/j.jpainsymman.2011.09.002.

188. Geng Y, Wang W, Ma Q, Peng LQ, Liang ZH. Ozone therapy combined with sulfasalazine delivered via a colon therapy system for treatment of ulcerative colitis. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*. 2010;30(12):2683-5.
189. Lelianov AD, Budrin VA, Novikov AS, Guseva ED, Nesterov AA, Kirsov PP. Optimization of the treatment of stomach ulcer in patients subjected to perforated gastroduodenal ulcer closure *Eksp Klin Gastroenterol*. 2007;(5):81-5.
190. El-Sawalhi MM, Darwish HA, Mausouf MN, Shaheen AA. Modulation of age-related changes in oxidative stress markers and energy status in the rat heart and hippocampus: a significant role for ozone therapy. *Cell Biochem Funct*. 2013;31(6):518-25. doi: 10.1002/cbf.2930.
191. Souza YM, Fontes B, Martins JO, Sannomiya P, Brito GS, Younes RN, Rasslan S. Evaluation of the effects of ozone therapy in the treatment of intra-abdominal infection in rats. *Clinics (Sao Paulo)*. 2010;65(2):195-202. doi: 10.1590/S1807-59322010000200012
192. Bocci V, Travagli V, Zanardi I. May oxygen-ozone therapy improves cardiovascular disorders? *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets*. 2009 Jun;9(2):78-85.
193. Sin'kov EV. Treatment of patients with acute and chronic suppurative middle ear diseases using ozone preparations. *Vestn Otorinolaringol*. 2009;(3):34-5.
194. Lelianov AD, Ivliev NV, Bazhenov SM, Nesterov AA. Experimental substantiation of use of sodium hypochlorite and ozone at a formation of intestinal anastomosis in conditions of acute intestinal obstruction and peritonitis. *Eksp Klin Gastroenterol*. 2009;(5):54-8.
195. Davatdarova M, Kazimov A. Comparative estimation of medicinal and complex therapy influence on immunological indexes in the patients with acne disease. *Georgian Med News*. 2008 Oct;(163):80-3.
196. Gaskin RS, Estwick D, Peddi R. G-6-PD deficiency: its role in the high prevalence of hypertension and diabetes mellitus. *Ethn Dis* 2001;11:749-54.
197. Ann-Joy C, Daniel TC, Lai-Chu S. Poor prognosis in nasopharyngeal cancer patients with low G6PD activity. *Jpn J Cancer Res*. 2001; 92:576-81.
198. M.Gupta G, Mansi B. Ozone therapy in periodontics. *J Med Life*. 2012;5(1):59-67.
199. Iida H, Nagasaka T, Shindo K, Shiozawa Z. Effect of the free radical scavenger edaravone on peripheral nerve ischemia-reperfusion injury. *Muscle Nerve*. 2009;40; 582-588.

200. Stecker M, Baylor M, Wolfe K, Stevenson J. Acute nerve stretch and the compound motor action potential. *J Brachial Plex Peripher Nerve Inj* .2011;6;1-4.
201. Wasowicz W, Jean N, Peratz A. Optimized steps in fluorometric determination of thiobarbituric acid-reactive substances in serum. Importance of extraction hand influence of sample, preservation and storage. *Clin. Chem.* 1993;39: 2522-2526.
202. Di Paolo N, Gaggiotti E, Galli F. Extracorporeal blood oxygenation and ozonation: clinical and biological implications of ozone therapy. *Redox Rep.* 2005;10(3):121-30.
203. Bocci V. Is it true that ozone is always toxic? The end of a dogma. *Toxicology and Applied Pharmacology*,2006b;216(3):493-504.
204. Lu W, Li H, He F. Treatment of large lumbar disc herniation with percutaneous ozone injection via the posterior-lateral route and inner margin of the facet joint. *World Journal of Radiology.* 2010;2(3):109-112.
205. Nogales C, Ferrari P, Kantarovich E. Ozone therapy in medicine. *The Journal of Contemporary Dental Practice*, 2008;9(4):75-84.
206. Stübinger S, Sader R, Filippi A. The use of ozone in dentistry and maxillofacial surgery: a review. *Quintessence Int.* 2006;37(5):353-9.
207. Bocci V. The case for oxygen-ozonotherapy. *Br J Biomed Sci.* 2007; 64(1):44-9.
208. Bain JR, Mackinnon SE, Hunter DA. Functional evaluation of complete sciatic, peroneal and posterior tibial nerve lesions in the rat. *Plast Reconstr Surg* 1989;83:129-136.
209. Varejao AS, Melo-Pinto P, Meek MF, Filipe VM, Bulas-Cruz J. Methods for the experimental functional assessment of rat sciatic nerve regeneration. *Nerurol Res* 2004;26(2): 186-194.
210. M. Lowery, C.L. Vaughan, P. Nolan, and M.J. O'Malley, Spectral compression of the electromyographic signal due to decreasing muscle fibre conduction velocity, *IEEE Transactions on Rehabilitation Engineering*, 2000;8:353-361.
211. Chung MS, Baek GH, Oh JH, Lee YH, Bin SW, Gong HS. The effect of muscle length and excursion on muscle contracture after tendon injury: A study in rabbit soleus muscles. *Injury.* 2007;38(10):1139-45.

212. Wolthers M, Moldovan M, Binderup T, Schmalbruch H, Krarup C. Comparative electrophysiological, functional and histological studies of nerve lesions in rats. *Microsurgery*. 2005;25(6):508–19.
213. Vogelaar CF, Vrinten DH, Hoekman MF, Brakkee JH, Burbach JP, Hamers FP. Sciatic nerve regeneration in mice and rats: Recovery of sensory innervation is followed by a slowly retreating neuropathic pain-like syndrome. *Brain Res*. 2004;1027(1–2):67–72.
214. Lin Q, Chen H, Lu C, Wang B, Zhang Y, He X, Yu B. Effects of ozone on sciatic nerve in rat. *Interventional Neuroradiology*. 2011;17;281-285.
215. Stoll G, Müller HW. Nerve injury, axonal degeneration and neural regeneration: basic insights. *Brain Pathology*. 1999; 9: 313-325.
216. Bervar M. Video analysis of standing-an alternative footprint analysis to assess functional loss following injury to the rat sciatic nerve. *J Neuroscience Methods*, 2000; 102:109-116.
217. Dumitru D, Zwarts MJ. Focal peripheral neuropathies. In: Dumitru D, Amato AA, Zwarts MJ, eds. *Elektrodiagnostic Medicine*. 2nd ed. Philadelphia: Hanley & Belfus, inc. 2002;24,1043-1070.
218. Yazıcı JS. Spinal sinirlerin hastalıkları. Öge AE, editor. *Nöroloji. Nobel Tıp Kitabevleri*, 2004; 573-590.
219. Ertaş M. Periferik sinirlerin anatomi, fizyoloji ve patolojik süreçleri. In: Öge AE. Ed. *Nöroloji. Nobel Tıp Kitabevleri*, 2004; 555-562.
220. Şekil- <http://www.doktorsalihaydin.com/sinir-yaralanmalari.html>
221. Drake R.L., Vogl W., Mitchell A. *Gray's Anatomy For Students*. 2004; Elsevier Inc. <http://www.studentconsult.com/content/default.cfm?ISBN=0443066124&ID=C00166124>
222. Netter F.H. *Netter insan anatomi atlası*. 5.ed. İstanbul. Nobel Tıp Kitabevleri, 2011; 504.

ÖZGEÇMİŞ

Eren ÖĞÜT 30.05.1983 tarihinde Ankara’da doğdu. İlköğrenimini Isparta Fevzi Çakmak Paşa İlköğretim okulunda tamamladı. Ortaöğrenimi ve liseyi Isparta Anadolu Lisesinde tamamladı. 2002 yılında İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyolojik Bilimler bölümünde lisans öğrenimine başladı ve 29.06.2006 tarihinde mezun oldu. 13.09.2008- 14.01.2009 tarihlerinde askerlik hizmetini tamamladı. 2011 yılında Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü’nde Anatomi Yüksek Lisans eğitimine başladı. Halen Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Anatomi Anabilim Dalı’nda Araştırma görevlisi olarak görev yapmaktadır.