

T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

**AORTİK İSKEMİ REPERFÜZYON MODELİNDE OZON
TEDAVİSİNİN UZAK ORGAN MİYOKARD HASARI ÜZERİNE
ETKİSİ**

Dr. Aytuğ KOÇYİĞİT

**UZMANLIK TEZİ
KALP VE DAMAR CERRAHİSİ ANABİLİM DALI**

**DANIŞMAN
Yrd. Doç. Dr. Şenol GÜLMEN**

ISPARTA - 2012

ÖNSÖZ

Kalp ve Damar Cerrahisi Uzmanlık eğitimim süresince destek ve katkılarından dolayı hocalarım Prof. Dr. Hüseyin Okutan'a, Prof. Dr. Turhan Yavuz'a, Doç. Dr. Oktay Peker'e ve Yrd. Doç. Dr. Dr. Şenol Gülmen'e

Tez çalışmamın planlanmasında ve uygulamasında yardımını esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Şenol Gülmen'e, saygı ve teşekkürlerimi,

Tüm desteklerinden ve yardımlarından dolayı anneme, babama ve kardeşime

En zor ve yoğun meslek şartlarında mutluluk kaynağım canım eşim Şule'ye, biricik, tatlı kızım Sezer Naz'a sonsuz sevgilerimi sunarım.

Dr. Aytuğ KOÇYİĞİT
Isparta - 2012

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	iii
TABLolar DİZİNİ	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	v
RESİMLER DİZİNİ	vi
GRAFİKLER DİZİNİ	vii
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. İskemi.....	2
2.2. Reperfüzyon Hasarı.....	4
2.3. Ozon	5
2.3.1. Ozon ve Etkileri	5
2.3.2. Ozonun Kullanım Alanları.....	6
2.3.3. Medikal Ozon.....	7
2.3.4. Medikal Ozonun Elde Edilmesi	8
2.3.5. Medikal Ozonun Uygulama Biçimleri	9
2.3.6. Medikal Ozon'un Etki Mekanizmaları	13
3. GEREÇ ve YÖNTEM	17
3.1. İstatistiksel Yöntem.....	21
4. BULGULAR	23
4.1. Biyokimyasal Bulgular:	23
4.2. Histopatolojik Bulgular	31
5. TARTIŞMA	35
ÖZET	41
SUMMARY	42
KAYNAKLAR	43

TABLULAR DİZİNİ

Tablo 1. O ₃ 'ün genel olarak kullanım alanları gösterilmiştir	6
Tablo 2. Grupların biyokimyasal değerlendirme sonuçları.....	23
Tablo 3. Sham ve Kontrol gruplarının biyokimyasal değerlerinin karşılaştırılması .	27
Tablo 4. Sham ve IR gruplarının biyokimyasal değerlerinin karşılaştırılması.....	28
Tablo 5. Sham ve IR-Ozon gruplarının biyokimyasal değerlerinin karşılaştırılması	28
Tablo 6. Kontrol ve IR gruplarının biyokimyasal değerlerinin karşılaştırılması	29
Tablo 7. Kontrol ve IR gruplarının biyokimyasal değerlerinin karşılaştırılması	29
Tablo 8. IR ve IR-Ozon gruplarının biyokimyasal değerlerinin karşılaştırılması.....	30
Tablo 9. Grupların Troponin-I değerleri	30
Tablo 10. Gruplara göre histopatolojik değerlendirmeyle belirlenen sonuçlar	31

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Ozonun formülü.....	5
Şekil 2. Ozon jeneratörü yapısı.....	8

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1. Çalışmamızda kullanılan evozone marka ozon jeneratörü.....	9
Resim 2. Sham grubunda yer alan rat fotoğrafı. Batın açıldı. Ancak IR uygulanmadı.....	17
Resim 3. Aortik IR ve Aortik IR+ O ₃ gruplarında uygulanan aortik kros klemp.....	18
Resim 4. Sham grubu myokard histopatoloji örneği, histolojik grade “0”, HEx100	32
Resim 5. Kontrol grubu myokard histopatoloji örneği, multifokal ve orta dereceli myokardial disorganizasyon, miyofibrillerde şişme ve eozinofili bulguları, histolojik grade “2”, HEx100.....	33
Resim 6. Aortik IR grubu myokard örneği, belirgin ve yaygın myokardial disorganizasyon, miyofibrillerde şişme ve eozinofili, histolojik grade “3”, HEx100	33
Resim 7. Aortik IR+Ozone grubu myokard histopatoloji örneği, fokal ve hafif dereceli myokardial disorganizasyon, miyofibrillerde şişme ve eozinofili bulguları, histolojik grade “1”, HEx100.....	34

GRAFİKLER DİZİNİ

Grafik 1. SOD değerleri açısından grupların karşılaştırılması.....	24
Grafik 2. Katalaz değerleri açısından grupların karşılaştırılması	24
Grafik 3. MPO değerleri açısından grupların karşılaştırılması.....	25
Grafik 4. MDA değerleri açısından grupların karşılaştırılması	25
Grafik 5. IL-6 değerleri açısından grupların karşılaştırılması.....	26
Grafik 6. TNF değerleri açısından grupların karşılaştırılması	26
Grafik 7. TR-I değerleri açısından grupların karşılaştırılması.....	27

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Ozon (O_3), üç mol oksijen (O_2) atomunun aktiflenmiş şeklidir. Ozonun klinik ve medikal olarak kullanılabilmesi için O_2/O_3 karışım şeklinde hazırlanması gerekmektedir. O_3 uygulaması ile nitrik oksit (NO) düzeylerinde artış, iskemik alanlarda vazodilatasyon, hipokside azalma, süperoksit dismutaz (SOD) aktivasyonu ve glutatyon seviyesinde azalma ile oksidatif stresin azaltıldığı gösterilmiştir (1,2).

İskemi-reperfüzyon (IR) hasarı kalp cerrahisindeki en büyük sorunlardan biridir. İnfrarenal abdominal aort cerrahisi sırasında cerrahi teknik olarak uygulanan kros klemp ve sonrasında kros klempin kaldırılmasının aortik IR hasarının gelişimi ile sonuçlandığı bilinmektedir (1). Aortik IR hasarı sonucu ortaya çıkan; serbest oksijen radikalleri (SOR)'nin oluşumu, sistemik vazokonstrüktif mediatörler, nötrofil aktivasyonu, lipid peroksidasyonu (LPO) ve sistemik inflamatuvar yanıt uzak organ hasarına neden olmaktadır (1,2). Bu nedenle aortik IR'nin indüklediği miyokard hasarı; aort cerrahisi sonrası yüksek mortalite ile seyreden kardiyak yetmezlik gelişiminde önemli bir komplikasyon olarak kabul edilmektedir (2).

Aortik IR ile ilgili olarak yapılmış çok sayıda deneysel ve klinik araştırma ve denenmiş çeşitli kimyasal maddeler olmasına rağmen, kesin ve etkili tedaviyi saptamak amacıyla çalışmalar hızla devam etmektedir. IR hasarı ile ilgili olarak son yıllarda medikal O_3 tedavisinin diyabetik ayak yaralarının iyileşmesinde kolaylık sağladığı, periferik arter hastalıklarında kan akımını artırarak klaudikasyonu azalttığı ve IR hasarını azalttığı yönünde çalışmalar bulunmaktadır (3-5).

Medikal O_3 tedavisinin yaygın klinik kullanımına rağmen kardiyovasküler alanda araştırma sayısı oldukça sınırlıdır. Bu çalışmada, O_3 ile önkoşullanma yapılan ratlarda aortik IR modelinde uzak organ miyokard hasarı üzerine O_3 tedavisinin etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İskemi

Arteriyel kan akımı azalmasına bağlı organ ve dokunun yetersiz perfüzyonu sonucunda doku veya organların O₂ den yoksun kalması iskemi olarak tanımlanır. Vücut dışında oluşan doku iskemisi soğuk iskemi, vücut içinde oluşan iskemi ise sıcak iskemi olarak tanımlanır. Sıcak iskemiden en çok hepatositler etkilenirken, soğuk iskemiden en çok endotel ve kupffer hücreleri etkilenir (6). Hücresel enerji depolarının boşalması ve toksik metabolitlerin birikmesi sonucunda hücre hasarlanması ve hücre ölümüne neden olur. Dokuya gelen kan akımının azalması sonucunda; hücresel oksidatif fosforilasyon azalır ve adenozin 5'-trifosfat ve fosfokreatin gibi yüksek enerjili fosfat sentezi miktarı azalır (7). Hücre içinde enerji depolarının boşalması ile hücre zarında bulunan Na⁺K⁺-ATP az pompası durur. Hücre içinde Na⁺ ve Ca⁺⁺ iyon konsantrasyonları artar (8). Hücre içinde Ca⁺⁺ iyon konsantrasyonunun artışı hücre için sitotoksiktir (9). İskemiye bağlı Ca⁺⁺ artışı ile endojen fosfolipazların aktivasyonu artan membran fosfolipitlerinin parçalanmasına neden olabilir. Hücre içi Ca⁺⁺ artması ile aktive olan proteazlar hücre yapısına zarar verebilirler. Aynı zamanda, bu dönemde hücrede iyon konsantrasyonlarının değişimi ile proinflamatuvar sitokinlerin ve lökosit adhezyon moleküllerinin yapımında artış, buna karşılık antioksidan enzimlerin oluşumunda azalma meydana gelir. Bu durum hücrenin reperfüzyon döneminde hasara karşı dayanıksız hale gelmesine neden olur. İskemi döneminde ATP üretimi durduğu halde tüketim devam ettiği için ATP'den AMP ve adenozin oluşmaya devam eder. Adenozinin hücre dışına çıkması sonucu inozin ve hipoksantin oluşur. Sonuçta yüksek enerjili fosfat bileşikler olan (ATP) yıkımı, dokuda ksantin ve hipoksantin gibi pürin metabolitlerinin birikimi ile ksantin dehidrojenazın (KDH) ksantin oksidaza (KO) dönüşümüne yol açar (8). Normal şartlarda hipoksantin ürik asite metabolize olur ve bu reaksiyonda elektron alıcı olarak NAD⁺ (nikotinamid adenin dinükleotidin okside formu) kullanılır. Ancak hipoksi ya da iskemi durumunda KDH, KO'a dönüşmesi yüzünden hipoksantin ürik asite dönüşümü KO tarafından gerçekleşir ve bu reaksiyonda ise elektron alıcı olarak moleküler O₂ kullanılır (9).

Normal şartlarda:

KDH (NAD⁺)yi kullanarak

Hipoksantin \longrightarrow Ksantin ve ürik asid

İskemik şartlarda:

ATP \rightarrow parçalanır \rightarrow AMP ve Adenozin

Adenozin hücre dışına geçer \rightarrow inozin ve hipoksantin

AMP \rightarrow Hipoksantin

KDH \rightarrow KO oluşur.

İndirgenmiş O₂ türevleri hücre membranına ve elemanlarına zarar verirler. Bu gibi oksijen radikalleri iskemik dokularda, özellikle kan akımının düzelmesinden sonra artar. Toksik O₂ türevlerinin büyük ölçüde reperfüzyon sırasında zedelenme alanına gelen PMNL tarafından oluşturulduğu düşünülmektedir (10). Fosfolipit parçalanması sonucu iskemik hücrelerde biriken lipit yıkım ürünleri membranlar üzerinde yıkama etkisi yapar (10).

Membran hasarının mekanizmaları değişmekle beraber temel neden tanımlanan olaylarla Ca⁺⁺ bol miktarda hücre içine girmesidir (10).

İskeminin hücresel etkileri (11):

1-Membran potansiyelinin değişmesi

2-İyon dağılımının değişmesi (\uparrow intrasellüler Ca⁺⁺ / Na⁺)

3-Hücresel şişme

4-Hücre iskeletinin disorganizasyonu

5-Artmış hipoksantin

6-Azalmış ATP

7-Azalmış fosfokreatin

8-Azalmış glutatyon

9-Hücre içi asidoz

2.2. Reperfüzyon Hasarı

İskemik dokuda hasarın geri döndürülebilmesi ve toksik metabolitlerin temizlenmesi için yeniden kan akımı gerekmektedir. Ancak iskemik dokunun reperfüzyonu bir dizi olayın başlaması ile paradoksal olarak doku hasarına yol açar. Çeşitli çalışmalarda reperfüzyon hasarının iskemik hasara göre daha fazla toksik ürün oluşturduğu belirlenmiştir (12). İskemik dönemdeki oksidatif fosforilasyon hasarı, ATP depolarında tükenme, hipoksantin artışı ve hücre içi Ca^{++} da artış meydana getirir. Hücre içi Ca^{++} un artış hızı ve miktarı, en erken mekanizma olup, hücre nekroz ve apoptozuyla ilişkilidir (13,14). Reperfüzyon süresince Ca^{++} un artmış hücre içi birikimi devam eder. Doku iskemisi sonucu gelişen hücre içi Ca^{++} artışı ve ATP azalması birbirini tetikleyerek negatif etkiyi artırır. Hücre içi Ca^{++} birikiminin engellenmesi bu döngüyü kırarak Ca^{++} a bağlı oluşan hasarları azaltır (15). İskemi döneminde dokuda biriken KO dokuya aniden sunulan O_2 yi kullanarak hipoksantini ürik asite çevirirken bu reaksiyon esnasında bol miktarda SOR oluşumuna neden olur (16). Reperfüzyon döneminde dokuda nötrofil infiltrasyonu, kopleman sisteminin aktivasyonu, Ca^{++} aracılı proteazların aktivasyonu, araşidonik asit (AA) metabolizması gibi pek çok sistem de SOR oluşumunu artırarak hasara neden olmaktadır (16). Günlük uygulamada IR nun yer aldığı değişik olgular vardır. Şok, yanık, sepsis, pankreatit gibi olgularda ortaya çıkan hipovolemi ile iskemi ve bu durumların düzeltilmesi ile de reperfüzyon hasarı ortaya çıkmaktadır (16). Travmalarda ve travma cerrahilerinde hipovolemi yada kanama kontrolü nedeniyle yapılan klemp, tampon uygulamaları iskemiye neden olurken sonrasında reperfüzyon ile yine İR hasarı gündeme gelmektedir (16).

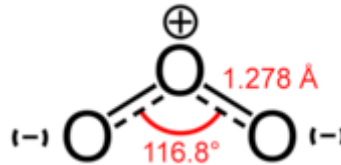
Kardiovasküler cerrahide de aort yada periferik arter klemp uygulaması sonrası ortaya çıkan tablo IR hasarı ile karakterizedir (16).

2.3. Ozon

2.3.1. Ozon ve Etkileri

O₃ atmosferik O₂ nin çok enerji yüklü, triatomik kimyasal şeklidir(Şekil-1).

Oda sıcaklığında O₃ renksiz ama karakteristik kokusu olan bir gazdır.



Şekil 1. Ozonun formülü (17).

O₃ ilk kez 1785 yılında kimyager Martin Marum tarafından kimyasal bir molekül olarak keşfedilmiştir. Alman kimyacı Christian Friedrich Schönbein O₃ ü ilk olarak 1840 yılında insanlarda kullanmıştır (18). Tıbbi anlamda dünyada en azından 150 yıldır kullanılmakta olan O₃ gerekliliği ve önemi son yıllarda daha fazlaca anlaşılmaya başlanmıştır. Klinik olarak kullandığımız O₃ tedavisi, 35 yıldır İtalya, Rusya, Almanya, ABD, Kanada, Malezya, Çin gibi birçok ülkede yoğun olarak uygulanmakta ve birçok O₃ tedavisi kliniği bulunmaktadır. Türkiye'de ise son yıllarda yoğun bir şekilde uygulanmakta ve hızla klinik uygulamalara girmektedir (19).

O₃ normal koşullar altında rengi olmayan, kendine özgü bir kokuya sahiptir (18). O₃ un kokusunu kimileri yosun kokusuna, kimileri yağmur sonrası toprak kokusuna, kimileri bozuk balık kokusuna, kimileri ise beklemiş çamaşır suyu kokusuna benzetir. Özellikle fırtınalı ve yağmurlu havalardan sonra, sıklıkla yükseklerde veya sahile yakın yerlerde farkedilir. O₃ adı mitolojide de olan Yunanca "koklamak" veya "Tanrının Nefesi" anlamına gelen ozein'den gelir. Latince ozein kötü kokulu anlamına gelir (19).

O₃ tabakası, atmosferin Stratosfer tabakasındadır, gökyüzünden gelen güneşten çıkan zararlı ışınlar O₃ tabakası tarafından emilir ve gökyüzündeki O₂ sağlıklı bir şekilde dünyaya gelmesine neden olur (19).

Zemin seviyelerine yakın yerlerde 10 milyon hava partikülü başına bir partikül O_3 ($= 0.1 \text{ ppm} = 200 \mu\text{g}/\text{m}^3$) konsantrasyonlarında duman şeklinde bulunur. 2000 metre yükseklikte, çok daha azalarak 0.03 - 0.04 ppm seviyelerine düşer (20).

Konsantrasyonu 20-30 kilometre (km) yükseklikte yaklaşık $1000 \mu\text{g}/\text{m}^3$ seviyesindedir. Normal koşullarda O_3 tabakasının kalınlığı yalnızca birkaç milimetre (mm) olmaktadır (20).

O_3 yoğunluğu hava kirliliği ölçümünde kullanılmaktadır. Ozonosferde mevcut O_3 tabakasının tahrip olmasına bağlı O_3 konsantrasyonunda düşüş, güneş ışınlarının ultraviyole bileşenlerine karşı korumanın azalması anlamına gelmektedir. Bu sürecin temel sorunlarından biri O_3 tabakasında olan incelmedir (19).

2.3.2. Ozonun Kullanım Alanları

O_3 hem sanayi, hem de biyoteknolojide yaygın bir kullanım alanı bulmuştur (19). (TABLO-1)

Tablo 1. O_3 'ün genel olarak kullanım alanları gösterilmiştir (19).

Suların dezenfeksiyonu Tat ve koku giderimi Renk giderimi Bulanıklık giderimi Metallerin uzaklaştırılması Bakteri ve virüslerin dezenfeksiyonu Nitrik ve amonyak giderimi Gıda endüstrisinde şişe ve yemek kaplarının dezenfeksiyonu Soğuk hava depoları Veterinerlik, hayvancılık Alfa toksin arındırılması Gıda ve havada kükürt giderilmesi Klima sistemleri Yüzme havuzları Klimalı sistemi olan yerler Havalandırma, boyler, soğutma kuleleri, nemlendirme sistemleri

Yüksek derecede zehirli aromatik ve heteroaromatik maddeler flokülasyon yoluyla tahrip edilerek yok edilir ve filtrelenerek elimine olurlar.

O₃ ün oksidasyon gücü atık suyun temizlenmesi ve yeniden işlenebilir hale getirmesinde en önemli araçlardan biri haline getirmektedir. O₃, oksidasyon gücü çok yüksek olan bir gaz ve bilinen en kuvvetli dezenfektandır (20).

O₃ gazının dezenfeksiyon etkisi, aynı şartlar altında klorunkinden 3125 defa daha fazladır. Spor, kist ve virüslere karşı klordan daha etkilidir (21).

Ayrıca O₃, havada bulunan O₂ in parçalanması yoluyla elde edildiği için kararsız yapısı nedeniyle dezenfeksiyon görevini tamamladıktan sonra daima hammaddesi olan O₂ e dönüşür. O₃ gazının dezenfeksiyon sonrasında atık ve kalıntı bırakmayan tek dezenfektan oluşu, özellikle gıda sanayiinde kullanımını, diğer dezenfektanlara göre avantajlı kılmaktadır (20).

O₃, yüksek oksidasyon gücü ile diğer dezenfektanlara göre çok üstündür. Hipoklorik asit'ten 25 kat, hipoklorit'ten 2500 kat, kloromin'den 5000 kat daha etkili olmasına karşın, onlar gibi atık ve zararlı maddeler ortaya çıkarmaz (21).

O₃, kısa bir süre sonra sonra tekrar O₂ e dönüştüğü için doğaldır ve yan etkisi yoktur.

Havadaki O₂ molekülü, yüksek enerji ile 2 adet O₂ atomuna parçalandıktan sonra, bir diğer O₂ molekülü ile tepkimeye girerek kararsız bir molekül oluşur. Bu yeni molekül O₃ tür. Bu kararsız yapısı ona üstün bir oksidasyon gücü verir. Kararsız yapısı sebebiyle ortamdaki bakteri, virüs, mantar, küf gibi istenmeyen organikleri yok ederken, demir, mangan, klor, nitrit vb. maddeleri de oksitleyerek ortamdan uzaklaştırır (20).

2.3.3. Medikal Ozon

Teknik O₃, O₃ ve havanın karışımı olup atmosferik havadan hazırlanır. Teknik O₃ ün tersine medikal O₃ elektrik deşarjı ile hazırlanır ve istenen doz ve konsantrasyonda O₂/O₃ karışımı elde edilir.

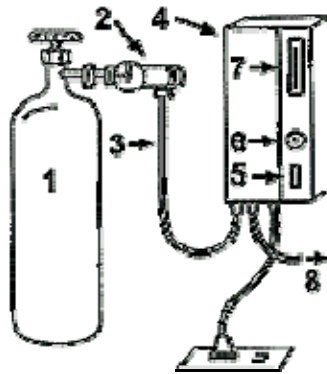
Medikal O₃, saf O₃ le saf O₂ karışımıdır. Uygulanmasına bağlı olarak O₃ konsantrasyonu 1-100 µg/ml (% 0.05-5 O₃) arasında değişebilir (21).

O₃ molekülü stabil bir molekül değildir. Tıbbi amaçla kullanılacak olan O₃ molekülü çalışma yerinde, özel bir jeneratör kullanılarak, taze şekilde hazırlanır ve

anında uygulanır, çünkü yarılanma ömrü ortalama olarak bir saattir ve kalan miktarı O_2 olarak ayrışır (20).

O_3 jeneratörleri teknik olarak farklılıklar göstermektedir. Temel olarak yüksek veya alçak frekanslı alternatif akımları temel alan, yüzey veya plazmik deşarjlı jeneratörler bulunmaktadır. Jeneratörlerde temel çalışma prensibi O_2 moleküllerinin O atomlarına ayrışmasını sağlamasıyla gerçekleşmektedir. Ayrışan atomlar diğer O_2 molekülleriyle birleşerek O_3 molekülünü oluşturur (21). (ŞEKİL-2)

Kullanılmayan O_3 , enerji açığa çıkartarak yeniden O_2 'e dönüşür. O_3 un kendiliğinden saf O_2/O_3 karışımına ayrışması öncelikle sistemin sıcaklık derecesine bağlıdır ve ikinci derece bir reaksiyonla gerçekleşir. O_3 'un ayrışması yalnızca sıcaklığa değil, sistemin bütününe bağlıdır. Konteynerin hacmi ne kadar küçük ve sıcaklık ne kadar yüksek olur ise, O_2/O_3 karışımının yarı ömrü daha az olur. Bunun yanında kullanılan konteynerin malzeme yapısı da yarı ömrü etkilemektedir. Örneğin 50 ml hacimli bir cam enjektörde 20 C sıcaklık ve 760 Torr (101.3 kPa) basınç altında yarı ömür 45 dakikadır. Aynı dışsal koşullarda yarı ömür süresi 20 dakika ile 3 gün arasında değişmektedir (21).



1. Oksijen tüpü, 2.Oksijen akım regülatörü 3. Oksijen çıkış tüpü 4. Ozon jeneratörü 5. Güç kaynağı 6. Konsantrasyon regülatörü 7. Akım ölçer 8. Ozon çıkışı

Şekil 2. Ozon jeneratörü yapısı (22).

2.3.4. Medikal Ozonun Elde Edilmesi

Farklı teknik yapılarda O_3 jeneratörleri piyasada bulunmaktadır. Örneğin, yüksek veya alçak frekanslı alternatif akımları temel alan, yüzey veya plazmik deşarjlı jeneratörler vardır. Düşük frekans voltajda plazmik deşarjlı medikal O_3

jeneratöründe medikal O_3 , seri bağlanmış iki yüksek voltaj tüpünden geçmektedir. Tüpler de yaklaşık 4000 ile 9000 V arasında değişen voltaja bağlıdır (19).

Enerji, tekil O_2 moleküllerinin, O_2 atomlarına ayrışmasını sağlar.

Atomlar, var olan bir O_2 molekülü ile birleşerek O_3 molekülünü oluşturur. Fazla veya kullanılmayan O_3 , katalitik yolla yeniden O_2 e dönüştürülür. (RESİM-1)



Resim 1. Çalışmamızda kullanılan evozone marka ozon jeneratörü

Kullanıcı kural olarak O_3 konsantrasyonunu iki parametre ile değiştirebilir: voltaj ve gaz akım miktarı (gaz akışı). Uygulanan voltaj artırıldıkça O_3 konsantrasyonu da artar. Gaz akışı arttıkça, yani O_2 'in deşarj bölgesinden akışı hızlandıkça, ayrışmamış O_2 moleküllerinin sayısı, yani O_3 konsantrasyonu daha az olacaktır. O_2 akışı çoğaldıkça ve daha fazla voltaj uygulandıkça, O_3 konsantrasyonu da yükselir. Ancak yaklaşık olarak 1-10 litre/dakikadan daha yüksek bir değerin uygulanması pratik olarak mümkün değildir. O_3 konsantrasyonu voltaja ek olarak sıcaklık, basınç, akış hacmi gibi çeşitli parametrelere bağlı olduğu için O_3 jeneratörlerinde O_3 konsantrasyonu sürekli olarak ölçülmelidir. Standart ölçüm olarak UV fotometresi, konsantrasyonun belirlenmesinde tercih edilen yöntemdir (20).

2.3.5. Medikal Ozonun Uygulama Biçimleri

a. Sistemik uygulama

b.Lokal uygulama

a.Sistemik uygulama şekilleri:

1-Major Otohemoterapi(MAH)

2-Minör Otohemoterapi

3- O₂/O₃ karışımının rektal insüflasyonu

b.Lokal uygulama şekilleri

1-Transkutanöz

2-İntraartiküler

3-İntramüsküler O₃ enjeksiyonu.

4- O₃ balneoterapi

5- O₃ lü su, krem, bitkisel yağ uygulamaları

a.Ozonun sistemik uygulanması

1-Major Otohemoterapi (MAH);

O₃ MAH Avrupa ülkelerinde pratikte uzun süredir kullanılmaktadır. MAH uygulaması şekli Wolff tarafından 1974 yılında tanımlanmıştır (23).

O₃ MAH uygulama tekniği sırasında 200 ile 250 ml. Arasında kan hastadan alınır. Heparin ya da sodyum sitrat eklenir. Sonra 15-80 µg/mL dozunda O₂/O₃ karışımıyla 5-10 dakika arasındaki bir süre için karşılaştırılır. Daha sonra kan hastaya tekrar verilir. Bu uygulama genellikle haftada 2 kez olmak üzere 7-8 haftalık süre gerçekleştirilir (24).

2-Minör Otohemoterapi

O₃ minör otohemoterapi uygulama tekniği sırasında 5 ile 10 ml. arasında kan hastadan alınır. Sonra 15-80 µg/mL dozunda hazırlanmış O₂/O₃ karışımıyla 10-20 saniye enjektör içerisinde karşılaştırılır. Daha sonra kan hastaya tekrar verilir. Bu uygulama genellikle haftada 2 kez olmak üzere 7-8 haftalık süre gerçekleştirilir (24).

Minör otohemoterapi işlemi 3-5 dk içinde gerçekleştirilirse şırınga içinde kan pıhtılaşması olmaz. Kronik hastalığı olan hastalar genel olarak trombozise yatkındırlar, bu durumlarda hastadan alınan kan heparinlenmelidir (20).

3- O₂/O₃ karışımının rektal insüflasyonu

Sistemik etkileri açısından MAH'ye gerçek bir alternatif oluşturmuştur. Bu yöntemle, yaklaşık 10-12 insüflasyonluk bir uygulama dizisini takiben MAH'ye benzer sonuçlar elde edilebilir. Rektal insüflasyon, katetere bağlı O₃ a dirençli bir

enjektör yardımı ile veya bir O₃ konteyneri ve silikon doz çantası kullanarak gerçekleştirilebilir. Kural olarak 150-300 ml O₂/O₃ karışımı tatbik edilir. (21)

Bu uygulama yönteminin çocuklarda en uygunu ve pratiği olduğu gösterilmiştir (25). İnsüflasyon, hastaya yüzü koyun yatar pozisyonda uygulanmalıdır. Genel olarak rektal insüflasyon, venöz yapılarının uygun olmadığı MAH endikasyonu olan hastalarda, bağırsaklarda proktit veya kolit gibi patolojik durumlarda veya immün sistemi zayıf pediatrik vakalarda rekürren enfeksiyonların tedavisinde kullanılabilir (26).

b. Lokal Ozon Uygulamaları;

1-Transkütanöz

Venöz ülserler ve geniş alana yayılan aşırı enfekte olmuş yaraların tedavisinde kullanılır. Yara, uygulama öncesinde salin ile yıkanır; ardından gaz kaçırmayı engellemek için doku çevresi iyice kapatılır. İçerisindeki hava önce açma-kapama musluğu ile çıkartılır ve ardından belirlenmiş O₂/O₃ karışımı ile doldurulurak ülser veya yara bölgesi ile gaz karışımının 10-15 dakika teması sağlanır (26).

2-İntraartiküler

Eklem içine veya çevresine enjekte edilecek medikal O₃ ün dozu ve hacmi eklem büyüklüğüne ve patolojinin klinik görünümüne bağlıdır. 5-60 ml arasında O₂/O₃ karışımı uygulanabilir. Uygulama sayısı haftada 2-3 olmalıdır. Terapi kürü süresi genellikle 3-5 haftadır. O₃ tedavisi tedavi etkinliğini belirgin olarak artıran medikal ve fizyoterapi metotları ile kombine edildiğinde tüm artropatilerde başarıyla kullanılabilir (20). İntraartiküler O₃ enjeksiyonunun başta omuz ve diz eklemleri olmak üzere akut ve kronik ağrılı eklem rahatsızlıklarında yararlı ve etkin olduğu kanıtlanmıştır. En önemli kullanım alanları gonartroz, akut/kronik ağrılı eklem rahatsızlıkları ve hareket kısıtlığı oluşturan eklem rahatsızlıklarıdır. İntraartiküler O₃ uygulaması, ağrılı eklemlerin tedavisinde yardımcı bir tedavidir (26).

3-İntramusküler

Intramusküler enjeksiyonlar için 10-20 ml hacimde ve 10000 mcg/L'ye kadar O₃ konsantrasyonlarında O₂/O₃ gaz karışımı kullanılabilir. Gaz karışımı yavaşça ve

hastada herhangi bir ağrıya neden olmadan yapılır. Bir tedavi kürünün süresi patolojinin türüne ve hastalığın şiddet derecesine göre değişir. Spinal osteokondroziste paravertebral yoldan ağrı noktalarına intramüsküler O₂/O₃ gaz karışımı enjeksiyonu özel önem taşır. Ağrının olduğu noktalara O₃ verilir. Kullanılan O₃ konsantrasyonu 5000 – 10000 mcg/L arasındadır. Bu tedavi, geleneksel tedavi ile karşılaştırıldığında, yan etkilerinin olmayışı ve yüksek klinik etkiye sahip olması avantajlarıdır (20).

4- O₃ Balneoterapi (Ozonlu su ile banyo)

Su yaygın cilt ve doku süreçlerinin iyileşmesine yardım eder. O₃ ün etkisi kan akımını uyarmak kadar aynı zamanda vazodilatatör, antiinflamatuvar ve bakterisidal etkileri O₃ -mineral banyoları özellikle periferik kan akımı bozuklukları, egzema, ülser ve hiperenfekte yaraların tedavisinde kullanım alanı sağlar. O₃ balneoterapi çok yaygın değildir, çünkü O₃'lu sudan buharlaşan gaz şeklindeki O₃ ün solunmasını önlemek için pahalı özel donanım gerekmektedir (20).

5- O₃ lü su, krem, bitkisel yağ uygulamaları

Ozonize su, krem ve bitkisel yağlar yeni veya yakın zamanda yapılmış cerrahi müdahaleler de dahil olmak üzere, enfekte olmuş her tür yaraya karşı topikal uygulama için endikedir. Ozonize su, kompresler biçiminde uygulanabilir. Kural olarak ozonize su, çift damıtılmış sudan taze olarak hazırlanır. Bu su maksimum 20 µg/ml O₃ absorbe eder ve oda sıcaklığında yarı ömrü yaklaşık 10 saattir. Pratik olarak herhangi bir gaz açığa çıkarmadığı için havaya O₃ karışmaz. Kullanılan O₃ miktarı suda erime özelliği ile orantılı olduğundan doz aşımı gözlenmez. Ozonize su, enfekte yaraların tedavisinde, mantar enfeksiyonları, liken veya küflerde, zona, herpes tedavisinde ve diş hekimliğinde hem dezenfektan olarak, hem de diş çekimi sonrasındaki yaraların tedavisinde, bukkal kavitedeki iltihaplar, candida veya prodontitis vakalarında kullanılabilir (26).

Lokal O₃ uygulamaları için aşağıdakilerin akılda tutulması gereklidir:

O₃ ün bakterisidal etkisi sadece nemli bölgede ortaya çıkar;

Yüksek dozda O₃ kanamayı durdurur, düşük dozda O₃ kanamayı yoğunlaştırır.

Yüksek dozda O₃ hücre bölünmesini baskılar, düşük dozda O₃ bu süreci stimüle eder.

Yüksek konsantrasyonda O₃ dezenfeksiyon için kullanılır; daha düşük konsantrasyonlarda O₃ epitelizasyon ve yara iyileşmesini hızlandırır (20).

2.3.6. Medikal Ozon'un Etki Mekanizmaları

O₃, kimyasal olarak radikal özelliği taşımamakla birlikte, florin ve persülfattan sonra, bilinen en güçlü üçüncü oksidan maddedir (29). O₃, yüksek oksidatif potansiyeline karşın çok selektif hareket eder. Bu selektivitenin nedeni O₃ molekülünün polar yapısı, yani pozitif polarize olmuş O₂ atomudur, bu da moleküle elektrofilik karakter kazandırır (20).

O₃, birçok diğer gaz gibi suda çözünebilir. O₃, oksijene göre 1,6 kat daha yoğun ve suda daha fazla çözünen bir moleküldür. Suda diğer gazlar gibi Henry kanununa göre çözünür. Çözünmesi ortam ısısından, basınçtan etkilenir ve konsantrasyonuna bağlıdır. Biyolojik sıvılarda O₃, O₂ den farklı olarak hızlı şekilde biyomoleküller ile reaksiyona girer (27).

O₂/O₃ karışımındaki O₃ afinite sırasıyla, çoklu doymamış yağ asitleriyle, antioksidanlarla ve sülfhidril (SH) grubu taşıyan tiyol bileşikleriyle reaksiyona girer. O₃'ün miktarının artışına bağlı olarak karbonhidratlar, proteinler, DNA ve RNA da bu reaksiyondan etkilenebilir. Tüm bu bileşikler O₃ karşısında elektron donörü gibi davranarak oksitlenirler. Sonuçta O₂⁻, H₂O₂ ve hipoklorik asit gibi SOR oluşur. Bu reaksiyonlardan en önemlisi doymamış yağ asitlerinin oksidasyonudur (27). Bu reaksiyonda her H₂O₂ ile birlikte iki de LPO oluşmaktadır (28,30).

O₃ molekülü ile biyoorganik maddeler arasındaki etkileşimin ürünü ozonid moleküldür. Aromatik bileşiklerin ozonizasyonu, polimer ozonidlerin oluşumu ile sonuçlanan olefinlerin ozonizasyonu gibi oluşur (20).

O₃ solunduğunda toksik bir gazdır. Göz ve hava yolu mukozasını irrite eder, akciğerdeki sürfaktanı ekiler. O₃ ün solunmasıyla meydana gelen patolojik semptomların sırası Flügge tarafından tanımlanmıştır. Uyku hali ile başlar, sonra solunum değişir, derin ve düzensiz bir hal alır. Son olarak nefes alıp verme durur. Ölüm nedeni respiratuar paralizdir (30).

Çalışma alanındaki havada bulunmasına izin verilen maksimum konsantrasyon (MAC) O₃ için, koku eşliğinden 10 kat daha yüksek olan 0,1 mg/m³ tür (31).

Terapötik dozlardaki O₃ konsantrasyonlarında eksternal (cilt veya yara yüzeyi), enteral (oral ve rektal) ve parenteral O₃ uygulamaları insan vücuduna hiçbir toksik etki oluşturmaz (20).

O₃'un biyolojik etkilerinin oluşabilmesi için SOR varlığı önemlidir. SOR, çeşitli patolojik süreçlerin hem başlatıcısı, hem ara basamaklarda işe karışabilen, hemde sonucunda oluşabilen reaktif maddelerdir. Bunlar, organizmada aerobik solunum sırasında mitokondride ve fagositlerde solunum patlaması gibi çeşitli fizyolojik durumlarda da oluşabilmektedir (32).

Oksidatif stresin hücre hasarındaki rolü ve hastalıkların altında yatan patolojik süreçlere etkisini açıklayan birçok çalışma yapılmıştır (33-37). Yapılan başka çalışmalarda ise oksidatif stresin bilinenin tersi etkilerinin de olabileceği görülmüştür. Bu çalışmalarda oksidasyon-redüksiyon reaksiyonlarının başta hücre içi haberleşme olmak üzere yararlı biyolojik mekanizmalarda etkili olduğu gösterilmiştir. Gerek reaktif moleküller gerekse, reaktif moleküllerin çeşitli biyolojik moleküllerle reaksiyona girmesi sonucu ortaya çıkan SOR fizyolojik düzeylerde hücrede önemli roller üstlenmektedir (38-40). Sıvılardaki çözünürlüğü fazla olan O₃'un bir kısmı plazmada bulunan antioksidanlar ile reaksiyona girerek bunların miktarlarını azaltır. O₃ etkisiyle oluşan kısa sürede meydana gelen olaylar sırasında çeşitli SOR de oluşabilmektedir. Bu radikallerin yarı ömrü kısa olduğundan, kan hastaya geri verilemeden önce bunlar ortadan kalkarak yerlerini LPO ürünlerine bırakırlar. Bunlar daha çok kandaki hakim hücre olan eritrositlerin membranlarının oksidasyonu ile ortaya çıkar. Eritrosit membranındaki doymamış yağ asitleri oksidasyona çok duyarlıdır. Bu reaksiyonlar sırasında ortaya çıkan H₂O₂, molekül yapısı itibariyle radikal olmayan oksitleyici bir moleküldür (27,29,41).

O₃'un tedavi edici etkinliklerinin en azından bir kısmından sorumlu - ikincil habercisi olarak H₂O₂'nin rol aldığı kabul edilmektedir. Etkilerinden biri eritrositlerde 2, 3-difosfogliserat düzeyini artırma yoluyla hemoglobin- O₂ ayrışma eğrisinin sağa kaymasına neden olmasıdır. Bu sayede O₂'in dokulara daha kolay bırakılmasını sağlar. Plazma konsantrasyonunda artış meydana gelen H₂O₂ hücrelerin

içine diffüze olarak; lökosit ve endotelial hücrelerde çeşitli interferon, interlökin ve transforme edici büyüme faktörü yapımını artıran uyarıları etkiler (32ak). LPO ürünlerinin yarı ömürleri uzun olduğu için ömrü çok kısa olan SOR'lerin ilk etkileri sonrasında O₃'un gecikmiş etkilerinden sorumlu olduğu düşünülmektedir. Yarı ömürleri uzun olduğu için bu ürünler ototransfüzyon ile vücuda verilmiş olur ve dolaşım yoluyla dokulara ulaşarak buralarda biyolojik etkiler gösterirler (41-43).

O₃'un konsantrasyonundaki aşırı artış sonucunda artan kuvvetli okside edici özelliği nedeniyle belli bir orandan sonra vücut için de toksik etkisi olabilir. Organizmadaki antioksidan savunma sistemleri yüksek O₃ oksidasyonuna karşı koyacaktır. Plazmanın sahip olduğu geniş antioksidan kapasite daha çok eritrositlerdeki antioksidan enzimler nedeniyle, kan O₃ toksisitesine karşı en dayanıklı dokudur. O₃ uygulamaları sırasında plazmada çözünen O₃ burada bulunan antioksidanlar ile reaksiyona girerek bunların konsantrasyonunu azaltmaktadır (41). Ancak MAH sonucu ortaya çıkan SOR artışı ve antioksidanların azalması geçici bir durumdur (43).

O₃ tedavisinin etkinliğini kanın toplam antioksidan gücü belirlemektedir. Kanın antioksidan kapasitesi düşük olduğunda O₃'un konsantrasyonu artmış olursa şiddetli membran oksidasyonu ile eritrositler hemolize olur, tam tersi olduğunda O₃ dan beklenen SOR ve H₂O₂ yanıtı yeterli olmayabilir ve arzulanan terapötik etki görülemeyebilir. O₃ uygulamaları sonucunda oluşması beklenen SOR ve LPO ürünlerinin terapötik etki oluşturabilmesi için belli konsantrasyonda olması gerekir (43). O₃ un terapötik konsantrasyonu yapılan çalışmalarla 10-80 µg/ml olarak belirlenmiştir. Bu konsantrasyonlardaki O₃ Rice-Evans'ın tarif ettiği total antioksidan kapasiteyi %25'den fazla düşürmediği gibi azalan antioksidanlar 20 dakika sonra eski haline gelmektedir (43-45).

O₃ uygulaması ile hem oksijenaz-1 (HO-1) enziminin aktive olduğu bildirilmiştir. Bu enzimin artışından SOR ve eritrosit hemolizi sorumlu olabilir. HO-1, hem halkasının yıkım yolunda görevi bulunan mikrozomal bir enzimdir ve yapımını oksidatif stres artışı, proinflamatuvar sitokinler ve NO ile artırmaktadır. Bu enzim etkisiyle hem molekülü biliverdin ve karbonmonoksit'e parçalanır. Son yıllarda HO-1 ile yapılmış çalışmalarda; antioksidan, antiapoptotik, antiinflamatuvar etkilerinin olduğu saptanmıştır. O₃ uygulamasıyla oluşan en fazla HO-1 artışının,

aynı zamanda O₃'un terapötik doz aralığı olarak da belirtilen 20-80 µg/ml arasında ortaya çıktığı gösterilmiştir (45-47).

Minör otohemoterapiyle O₃ tedavisinin immünmodülatuar bir etkisinin olduğu iddia edilmektedir. Minör otohemoterapi uygulanan enjeksiyon bölgesinde hafif derecede steril inflamasyon meydana gelmekte, bölgeye nötrofil ve monositler gelerek denatüre proteinleri ve parçalanmış eritrositleri fagosite etmektedir. Eğer kanda HCV, HBV ve HIV gibi virüsler bulunmakta ise O₃ tarafından inaktive edilip parçalanmış bu virüs atıkları bölgeye gelen bu immün hücreler tarafından ortadan kaldırılır. Böylece bu işlem bir çeşit aşı etkisi yaratır ve immün sistemi bu antijenlere karşı uyarır (27).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışmada Süleyman Demirel Üniversitesi Deney Hayvanı Üretim Laboratuvar'ından temin edilen, her iki cinsiyetten ve ortalama ağırlıkları 200-250 gr. olan 32 adet Wistar-Albino cinsi sıçan kullanıldı. Sıçanlar rastgele ve eşit sayıda (n=8) dört gruba ayrıldı. Sıçanlar deney öncesi 10 gün süre ile tel kafeslerde, 12 saat gece 12 saat gündüz sirkadiyan ritimde, ortam sıcaklığı 24-26°C ve nem oranı %50-60 olacak şekilde tutuldu. Sıçanların beslenmesinde standart ticari pellet yemi ve şehir içme suyu kullanıldı. Sıçanların yemleri, çalışmadan 12 saat öncesinde kesildi ancak bu dönemde su içmelerine izin verildi. Tüm sıçanların bakımları; Tıbbi Araştırmalar Ulusal Derneği tarafından biçimlendirilen 'Deney Hayvanlarının Bakım Prensipleri'ne ve Laboratuvar Hayvanı Kaynakları Enstitüsü tarafından hazırlanıp Ulusal Sağlık Enstitüsü tarafından yayınlanan (NIH basım no. 85-23, 1985 revize edildi) 'Laboratuvar Hayvanlarının Bakım ve Kullanımı için Kılavuz'a uygun olarak yapıldı. Çalışma protokolü ve deneysel yöntem Süleyman Demirel Üniversitesi Etik Kurulu tarafından onaylandı (17.02.2009 tarih ve 01/08 sayılı Etik Kurul kararı).

Deney modeli

Sıçanlar, eşit sayıda (n=8) ve rastgele olarak dört gruba ayrıldı. Sham grubunda, laparotomi ve infrarenal abdominal aorta (İAA) diseksiyonu yapıldı, ancak İAA oklüzyonu yapılmadı. (RESİM-2)



Resim 2. Sham grubunda yer alan rat fotoğrafı. Batın açıldı. Ancak IR uygulanmadı.

Kontrol + O₃ grubunda, sham grubundaki işlemlere ek olarak herhangi bir girişim yapılmadı. Ancak işlem öncesi 1 mg/kg/gün dozunda 10 günlük O₃ uygulaması gerçekleştirildi.

Aortik İR grubunda, İAA klemlenerek 60 dakika iskemi ve klemp kaldırılarak 60 dakika reperfüzyon uygulandı.(RESİM-3)



Resim 3. Aortik IR ve Aortik IR+ O₃ gruplarında uygulanan aortik kros klemp

Aortik İR + O₃ grubunda, İAA klemlenerek 60 dakika iskemi, klemp kaldırılarak 60 dakika reperfüzyon uygulandı. Kontrol grubuyla aynı şekilde 1 mg/kg/gün dozunda 10 günlük O₃ uygulaması gerçekleştirildi.

Aortik iskemi-reperfüzyon

Tüm ratlara intramuskuler enjeksiyonla 100 mg/kg dozda ketamine hydrochloride (ketalar flakon®, Pfizer, İstanbul, Türkiye) verilerek anestezi sağlandı ve bir ısıtma lambası altında supin pozisyon verildi. Cilt aseptik olarak hazırlandı ve orta hattan laparotomi yapıldı. Sıvı dengesini korumak amacıyla, 10 ml ılık serum fizyolojik peritoneal boşluğa verildi. Barsaklar ıslak gaz ile sola çekilerek abdominal aortaya ulaşıldı. İAA'ya travmatik olmayan bir mikrovasküler klemp (vascu-statts II, midi straight 1001-532; Scanlan Int, St. Paul, MN, USA) konuldu. Isı ve sıvı kaybını en az miktara indirmek için batın insizyonu kapalı tutuldu. 60 dakika oklüzyon sonrası batın tekrar açılarak İAA'daki mikrovasküler klemp kaldırıldı ve 60 dakika reperfüzyon uygulandı. Aortik klempleme ve reperfüzyon işlemi, klempleme işlemi sırasında distal aortada pulsasyonun kaybolmasıyla ve reperfüzyon ise klempin

kaldırılması sonrası distal aortada pulsasyonun geri gelmesiyle değerlendirildi. Böylece no-reflow fenomeni ekarte edildi.

Reperfüzyon süresinin sonunda tüm ratlarda biyokimyasal analiz için sağ ventrikülden kan örnekleri alındı. Tüm ratlar anestezi altında iken dekapitasyon yöntemi ile öldürüldü ve myokardiyal örnekler hazırlanarak ileriki biyokimyasal ve histolojik inceleme için ayrıldı. Miyokard doku örneklerinin bir kısmı biyokimyasal inceleme yapılmaya kadar -80 °C'de saklandı. Histopatolojik doku örnekleri ise değerlendirme yapılmaya kadar %10'luk formaldehid solüsyonu içinde saklandı.

Biyokimyasal İnceleme

Rat myokard doku örneklerinde; MDA, SOD, KAT ve MPO aktivitesi ölçüldü.

Rat serum örneklerinde; tumor necrosis factor-alfa, IL-6 ve Troponin I düzeyi ölçüldü.

Histopatolojik İnceleme

Myokardiyal hasar semikantitatif skorlama sistemi ile değerlendirildi. Bu skorlama sistemi myokardiyal disorganizasyon, myofibriler ödem ve myofibriler eozinofili temel alır ve değişiklikleri 0-3 arasında derecelendirir. 0, değişiklik yok; 1+, fokal, hafif değişiklikler, 2+, multifokal orta derece değişiklikler, 3+yaygın belirgin değişiklikler (48).

Biyokimyasal İşlemler

Eksi 80 °C'de saklanmış olan sıçan doku örnekleri oda sıcaklığına getirilerek serum fizyolojik ile yıkandı. Daha sonra %10'luk homojenat elde etmek için, %0.05 sodyum azid içeren 100 mmol/L soğuk fosfat tamponu (PH=7.4) içinde homojenize edildi (Ultra-Turrax T25, Janke and Kungel GmbH & Co., KG Staufen, Almanya). Bu homojenatlara 30 saniye süre ile ultrason dalgası uygulandı (Sonoplus UW 2070, Bandelin Electronic, Berlin Almanya) ve ardından süpernatant elde etmek için santrifüj edildi (5000 g'de 10 dakika). Süpernatantlar biyokimyasal incelemeler için kullanılmaya kadar -800 °C'de saklandı. Süpernatantın protein içeriği Lowry yöntemi ile saptandı (49). Rat myokard doku örneklerinde; MDA, SOD, KAT ve MPO aktivitesi ölçüldü.

Rat serum örneklerinde; TNF-alfa, IL-1 ve IL-6, Troponin-I düzeyi ölçüldü.

Malondialdehid ölçümü

LPO son ürünü olan MDA düzeyleri, Draper ve Hadley'in çift ısıtma yöntemi ile belirlendi (50). Bu yöntemde, MDA ile thiobarbitürik asit reaksiyonunun meydana getirdiği renk oluşumu spektrofotometrik ölçümle değerlendirilir. Bu amaçla, 100 gr/l'lik trikloroasetik asit solüsyonundan 2.5 ml, her santrifüj tüpünde 0.5 ml seruma (süpernatant) eklenerek 15 dakika süreyle kaynayan su banyosuna tabi tutuldu. Musluk suyu altında soğutulan tüpler 1000 g hızda 10 dakika santrifüj edildikten sonra elde edilen materyalin 2 ml'si, 6.7 g/l'lik thiobarbitürik solüsyonunun 1 ml'sine eklenerek 15 dakika kaynayan su banyosunda tutuldu. Bu solüsyon musluk suyunda soğutulduktan sonra absorbansı 532 nm'lik spektrofotometre ile (Shimadzu UV-1601, Shimadzu, Kyoto, Japonya) ölçüldü. MDA düzeyi, MDA-thiobarbitürik asit kompleksinin emilim katsayısı (emilim katsayısı e: $1.56 \times 10^4 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$) ile hesaplandı ve sonuç proteinin miligramındaki nanomol olarak ifade edildi.

Süperoksit dismutaz ölçümü

SOD aktivitesi, Spitz ve Oberley (51) ve Woolliams ve ark.na (52) ait yöntemler kullanılarak ölçüldü. SOD aktivitesinin tayini, 2-(4-iodofenol)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazoliumklorid ile reaksiyona girerek kırmızı bir formazan boya oluşturan SOR üreten ksantin oksidaz reaksiyonu temel alınarak yapıldı. SOD aktivitesi bu reaksiyonunun inhibisyon derecesi olarak belirlendi. Sonuçlar ünite/miligram (U/mgr) protein olarak ifade edildi.

Katalaz aktivite ölçümü

KAT aktivitesi Aebi (53) yöntemine göre ölçüldü. Bu yöntem, H_2O_2 parçalanma hızının hız sabitinin (s-1, k) belirlenmesi esasına dayanır. Hız sabiti, $k = (2.3/\Delta t)(a/b) \log (A_1/A_2)$ formülü kullanılarak hesaplandı. Formülde A1 0. saniye, A2 15. saniye absorbans değerlerini; a dilüsyon faktörünü, b süpernatant protein içeriğini göstermektedir. Sonuçlar k/mg protein olarak ifade edildi.

Miyeloproksidaz aktivite ölçümü

Dokuda PMNL birikiminin hassas bir göstergesi olan MPO aktivitesi, MPO'nun katalize ettiği H_2O_2 bağımlı tetrametylbenzidine oksidasyonu kullanılarak saptandı (54). Miyokard örnekleri 1 gr olarak tartıldı ve %0.5 hexadecyltrimethylammonium bromide (Sigma-Aldrich Corp, St Louis, MO, ABD) ile 9 ml 50 mM potasyum fosfat tamponu (pH=6) içine konuldu. Örnekler buz banyosu içerisinde 20 saniye süre ile homojenize edildi (Ultra-Turrax T25, Janke and Kungel GmbH & Co., KG Staufen, Almanya). Bu homojenatlara 30 saniye süre ile ultrason dalgası uygulandı (Sonoplus UW 2070, Bandelin Electronic, Berlin Almanya) ve ardından 40 °C'de, 1200 g hızla, 15 dakika süre ile santrifüj edildi. MPO aktivitesi 460 nm'de absorbandsa oluşan değişiklik ölçülerek saptandı. Kullanılan tampon içeriğinde, 50 mM potasyum fosfat, pH 6.0 (50 ml), 0.38 ml H_2O_2 (%0.3 solüsyon; Sigma-Aldrich Corp, St Louis, MO, ABD) ve 8.34 mg 0-dianisidine hydrochloride (Sigma-Aldrich Corp, St. Louis, MO, ABD) vardı. Süpernatant 1:80 (süpernatant: tampon) oranında karşılaştırıldı. MPO birimi $\Delta A/\text{min}/g$ doku olarak ifade edildi.

Histopatolojik inceleme

Sıçan miyokard doku örnekleri ayrı ayrı formalin solüsyonunda tespit edilerek, rutin takip işlemleri sonrası parafine gömülerek bloklandı. Beş mikrometrelik kesitler yapılarak hematoksilin-eozin boyasıyla boyandı ve ışık mikroskopu ile incelendi. Tüm örnekler deney gruplarından habersiz olan aynı patolog tarafından değerlendirildi. Miyokard hasarı; kesitlerde saptanan semikantitatif skorlama sistemi ile değerlendirildi. Bu skorlama sistemi myokardiyal disorganizasyon, myofibriler ödem ve myofibriler eozinofili temel alır ve değişiklikleri 0-3 arasında derecelendirir. 0, değişiklik yok; 1+, fokal, hafif değişiklikler, 2+, multifokal orta derece değişiklikler, 3+, yaygın belirgin değişiklikler olarak sınıflandırıldı (48).

3.1. İstatistiksel Yöntem

Deneyden elde edilen veriler bilgisayar ortamında istatistik yazılım programı (SPSS for Windows v.16.0, SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA) kullanılarak analiz

edildi. Veriler ilk olarak normal dağılım yönünden değerlendirildi. Normal dağılıma uyan verilerde çoklu gruplar tek yönlü varyans analizi (One-way ANOVA) ve bunu takiben Tukey's post-hoc parametrik testleri ile, ikişerli gruplar Student-t testi ile karşılaştırıldı. Normal dağılıma uymayan veriler ve kalpte tespit edilen histopatolojik hasar ise çoklu gruplarda Kruskal Wallis testi, herbir grubun kontrol grubu ile ikişerli olarak karşılaştırılmasında Mann-Whitney U testi ile non-parametrik yöntemlerle değerlendirildi. $P < 0.05$ değerlerinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar olduğu kabul edildi.

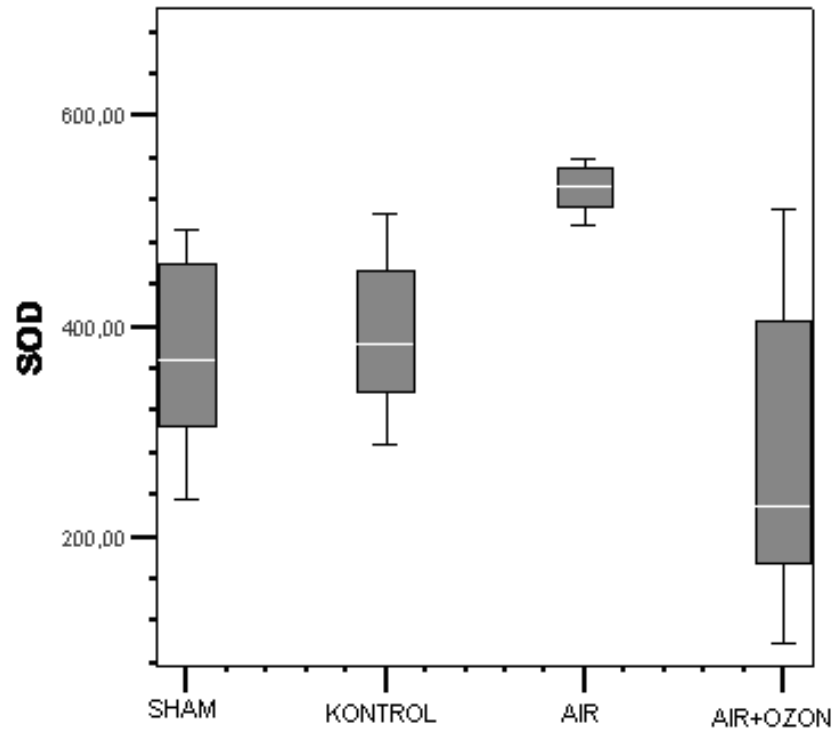
4. BULGULAR

4.1. Biyokimyasal Bulgular:

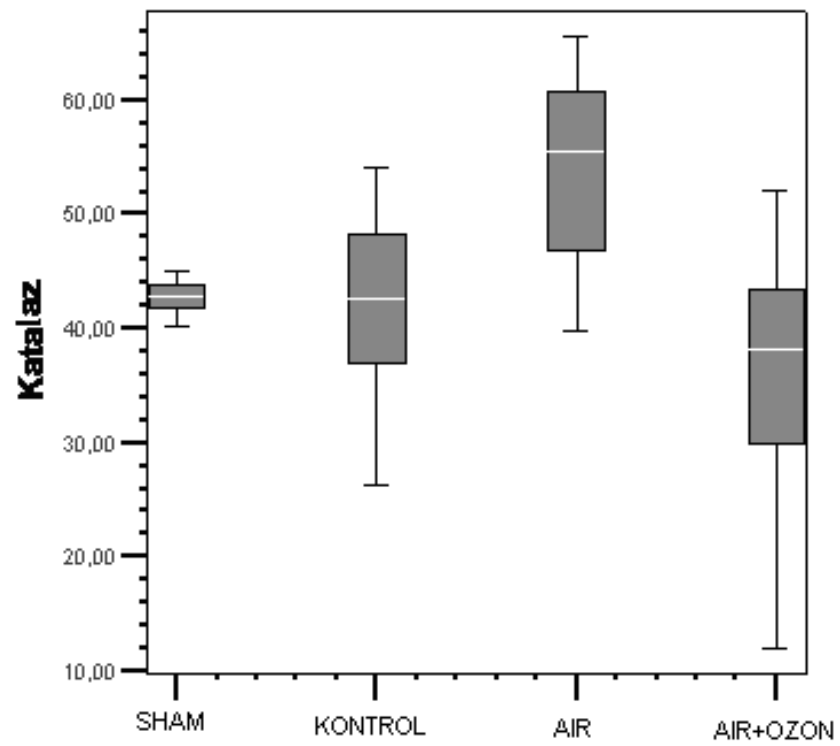
Çalışmamızda; tüm gruplara ait sıçan miyokard ve serum örneklerinde MDA, SOD, Katalaz, MPO, IL-6, TNF sonuçları gösterilmiştir (TABLO-2).

Tablo 2. Grupların biyokimyasal değerlendirme sonuçları

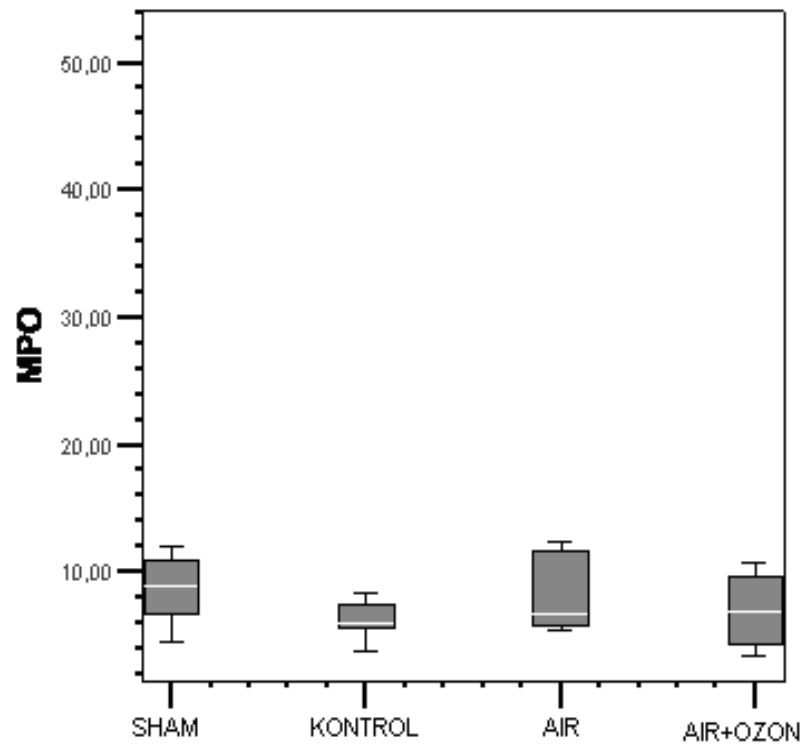
Gruplar		N	Minimum	Maximum	Mean	Standart Sapma
Sham	SOD	8	235,00	492,65	374,0525	92,79491
	Katalaz	8	40,23	44,97	42,7825	1,48043
	MPO	8	4,52	12,00	8,7075	2,78471
	MDA	8	,06	,20	,1200	,05071
	IL6	8	,78	4,82	2,0725	1,41073
	TNF	8	,14	1,51	,9600	,43651
Kontrol	SOD	8	287,74	679,39	414,5500	125,02634
	Katalaz	8	26,25	54,20	42,0363	9,06262
	MPO	8	3,82	31,33	9,1663	9,04238
	MDA	8	,05	,26	,1475	,06042
	IL6	8	,41	3,44	2,1263	1,03631
	TNF	8	1,33	2,48	1,9300	,43710
IR	SOD	8	497,21	612,60	538,6600	36,19790
	Katalaz	8	39,80	65,70	54,0313	9,16983
	MPO	8	5,48	52,17	13,2350	15,94387
	MDA	8	,08	,24	,1650	,05318
	IL6	8	,44	5,70	2,8875	1,65423
	TNF	8	1,29	3,15	2,1550	,77183
IR+Ozon	SOD	8	100,10	512,66	278,6837	148,43510
	Katalaz	8	11,92	52,05	35,8875	12,54196
	MPO	8	3,39	10,79	7,0475	2,96374
	MDA	8	,07	,35	,2050	,11377
	IL6	8	,57	4,35	2,6675	1,22229
	TNF	8	1,32	4,28	2,2488	,97313



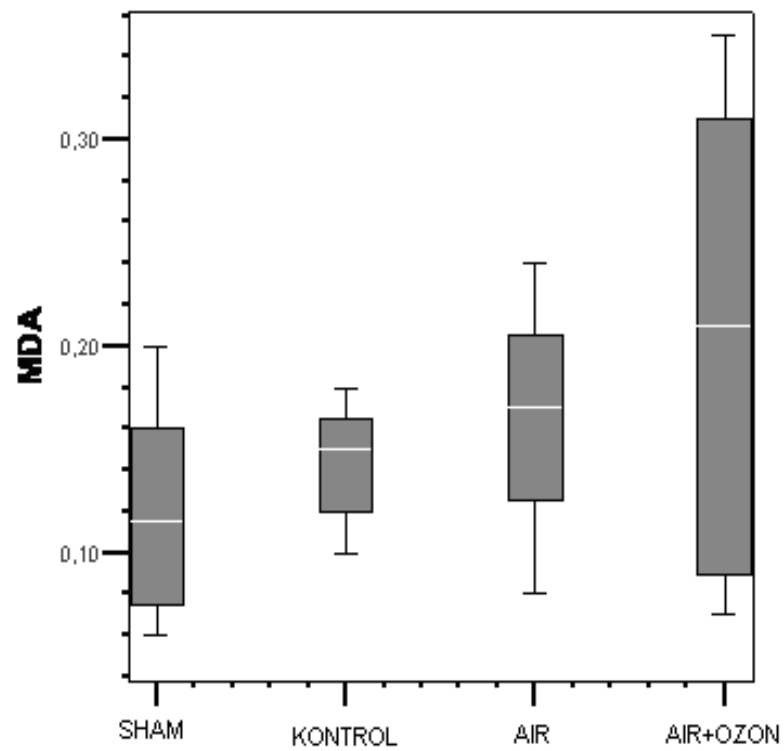
Grafik 1. SOD değerleri aısından grupların karşılaştırılması



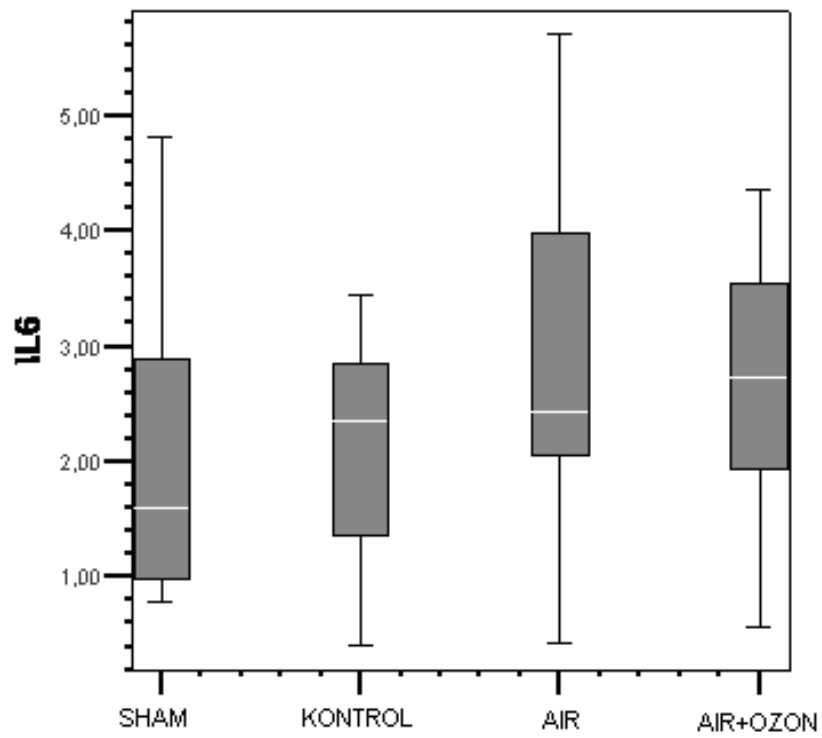
Grafik 2. Katalaz değerleri aısından grupların karşılaştırılması



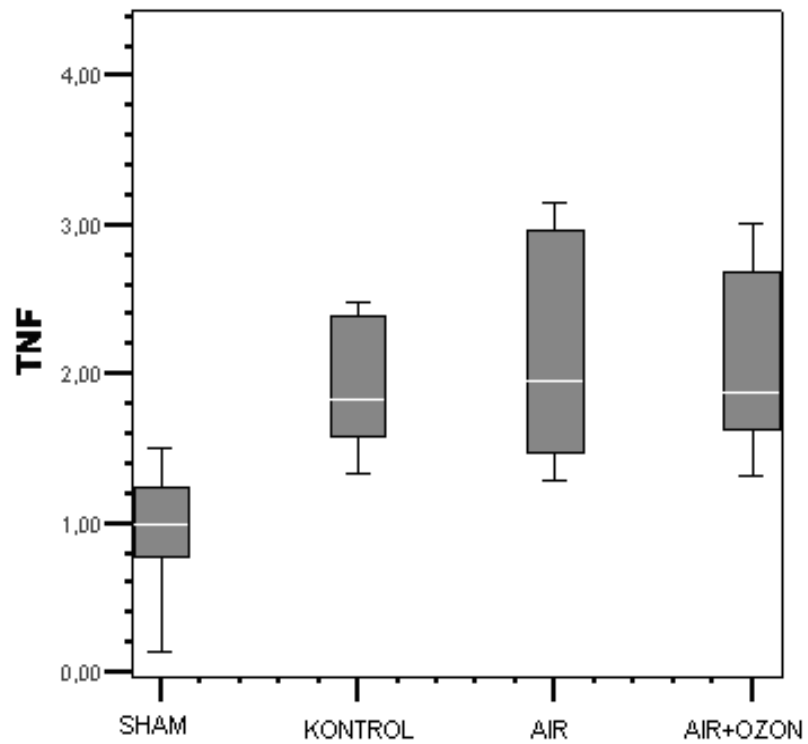
Grafik 3. MPO değerleri açısından grupların karşılaştırılması



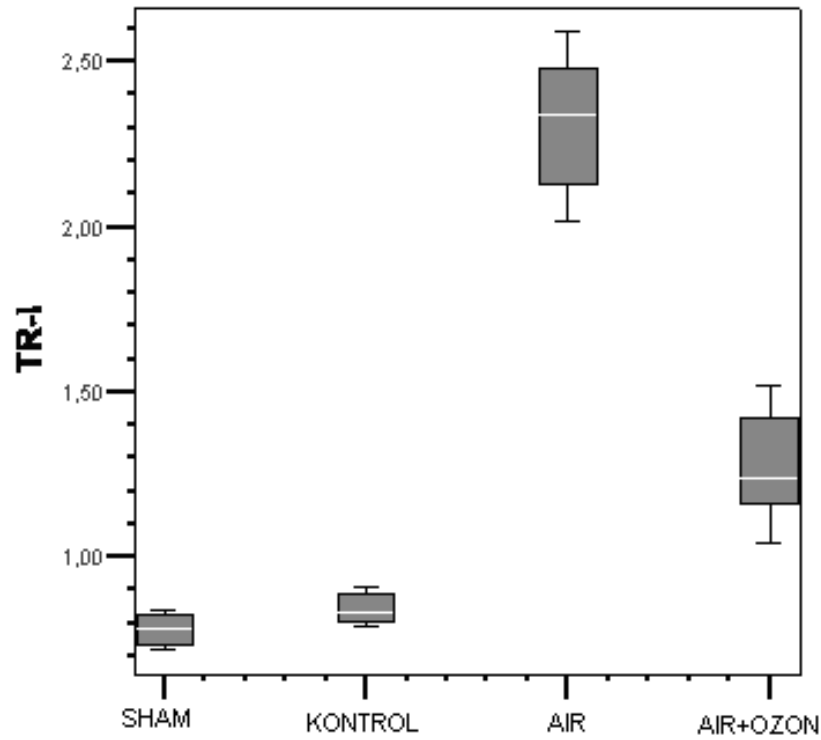
Grafik 4. MDA değerleri açısından grupların karşılaştırılması



Grafik 5. IL-6 değerleri açısından grupların karşılaştırılması



Grafik 6. TNF değerleri açısından grupların karşılaştırılması



Grafik 7. TR-I değerleri açısından grupların karşılaştırılması

Tablo 3. Sham ve Kontrol gruplarının biyokimyasal değerlerinin karşılaştırılması

	Gruplar	min	max	mean	Standart sapma	p
SOD	Sham	235,0	492,6	374,05	92,794	,529
	Kontrol	287,7	679,3	414,55	125,02	
Katalaz	Sham	40,23	44,97	42,78	1,48	,916
	Kontrol	26,25	54,20	42,03	9,06	
MPO	Sham	3,82	12,00	8,78	2,78	,294
	Kontrol	3,82	31,33	9,16	9,04	
MDA	Sham	,06	,20	,12	,05	,427
	Kontrol	,05	,26	,14	,06	
IL6	Sham	,78	4,82	2,07	1,41	,674
	Kontrol	,41	3,44	2,12	1,03	
TNF	Sham	,14	1,51	,96	,43	,002
	Kontrol	1,33	2,48	1,93	,43	

Sham ile Kontrol grupları karşılaştırıldığında; SOD, Katalaz, MPO, MDA, IL-6 değerleri açısından istatistiksel anlamlı fark bulunmadı, ($P > 0,05$). Ancak Kontrol grubunda TNF değerlerinde ($1,93 \pm 0,43$), Sham grubuna ($0,96 \pm 0,43$) göre istatistiksel anlamlı artış saptandı ($p = 0,002$), (TABLO-3).

Tablo 4. Sham ve IR gruplarının biyokimyasal değerlerinin karşılaştırılması

	Gruplar	min	max	mean	Standart sapma	p
SOD	Sham	235,0	492,6	374,05	92,794	,001
	IR	497,2	612,6	538,66	36,197	
Katalaz	Sham	40,23	44,97	42,78	1,48	,036
	IR	39,80	65,70	54,03	9,16	
MPO	Sham	3,82	12,00	8,78	2,78	1,000
	IR	5,48	52,17	13,23	15,94	
MDA	Sham	,06	,20	,12	,05	,102
	IR	,08	,24	,16	,05	
IL6	Sham	,78	4,82	2,07	1,41	,227
	IR	,44	5,70	2,88	1,65	
TNF	Sham	,14	1,51	,96	,43	,005
	IR	1,29	3,15	2,15	,77	

Sham ile IR grupları karşılaştırıldığında; MPO, MDA, IL-6 değerleri açısından istatistiksel anlamlı fark bulunmadı, ($P>0.05$). Ancak IR grubunda Katalaz (54.03 ± 9.16) ve SOD değerlerinde (538.66 ± 36.19), sham grubuna (42.78 ± 1.48) ve (374.05 ± 92.79) göre anlamlı artış saptandı, ($p=0.036$), ($p=0.001$). IR grubunda TNF değerlerinde (2.15 ± 0.77), Sham grubuna (0.96 ± 0.43) göre istatistiksel anlamlı artış saptandı ($p=0.005$), (TABLO-4).

Tablo 5. Sham ve IR-Ozon gruplarının biyokimyasal değerlerinin karşılaştırılması

	Gruplar	min	max	mean	Standart sapma	p
SOD	Sham	235,0	492,6	374,05	92,794	,172
	IR-Ozon	100,1	512,6	278,68	148,43	
Katalaz	Sham	40,23	44,97	42,78	1,48	,093
	IR-Ozon	11,92	52,05	35,88	12,54	
MPO	Sham	3,82	12,00	8,78	2,78	,294
	IR-Ozon	3,39	10,79	7,04	2,96	
MDA	Sham	,06	,20	,12	,05	,141
	IR-Ozon	,07	,35	,20	,11	
IL6	Sham	,78	4,82	2,07	1,41	,345
	IR-Ozon	,57	4,35	2,66	1,22	
TNF	Sham	,14	1,51	,96	,43	,002
	IR-Ozon	1,32	4,28	2,24	,97	

Sham ile IR-Ozon grupları karşılaştırıldığında; SOD, Katalaz, MPO, MDA, IL-6 değerleri açısından istatistiksel anlamlı fark bulunmadı, ($P>0.05$). Ancak IR-Ozon grubunda TNF değerlerinde (2.24 ± 0.97), Sham grubuna (1.93 ± 0.43) göre istatistiksel anlamlı artış saptandı ($p=0.002$), (TABLO-5).

Tablo 6. Kontrol ve IR gruplarının biyokimyasal değerlerinin karşılaştırılması

	Gruplar	min	max	mean	Standart sapma	p
SOD	Kontrol	287,7	679,3	414,55	125,02	,016
	IR	497,2	612,6	538,66	36,197	
Katalaz	Kontrol	26,25	54,20	42,03	9,06	,046
	IR	39,80	65,70	54,03	9,16	
MPO	Kontrol	3,82	31,33	9,16	9,04	,495
	IR	5,48	52,17	13,23	15,94	
MDA	Kontrol	,05	,26	,14	,06	,527
	IR	,08	,24	,16	,05	
IL6	Kontrol	,41	3,44	2,12	1,03	,462
	IR	,44	5,70	2,88	1,65	
TNF	Kontrol	1,33	2,48	1,93	,43	,835
	IR	1,29	3,15	2,15	,77	

Kontrol ile IR grupları karşılaştırıldığında; MPO, MDA, IL-6, TNF değerleri açısından istatistiksel anlamlı fark bulunmadı, ($P>0.05$). Ancak IR grubunda, SOD değerlerinde (538.66 ± 36.19) ve Katalaz değerlerinde (54.03 ± 9.16), Kontrol grubuna (414.55 ± 125.02) ve (42.03 ± 9.06) göre istatistiksel anlamlı artış saptandı ($p=0.016$), ($p=0.04$), (TABLO-6).

Tablo 7. Kontrol ve IR gruplarının biyokimyasal değerlerinin karşılaştırılması

	Gruplar	min	max	mean	Standart sapma	p
SOD	Kontrol	287,7	679,3	414,55	125,02	,074
	IR-Ozon	100,1	512,6	278,68	148,43	
Katalaz	Kontrol	26,25	54,20	42,03	9,06	,294
	IR-Ozon	11,92	52,05	35,88	12,54	
MPO	Kontrol	3,82	31,33	9,16	9,04	,916
	IR-Ozon	3,39	10,79	7,04	2,96	
MDA	Kontrol	,05	,26	,14	,06	,342
	IR-Ozon	,07	,35	,20	,11	
IL6	Kontrol	,41	3,44	2,12	1,03	,401
	IR-Ozon	,57	4,35	2,66	1,22	
TNF	Kontrol	1,33	2,48	1,93	,43	,712
	IR-Ozon	1,32	4,28	2,24	,97	

Kontrol ve IR-Ozon grupları karşılaştırıldığında; SOD, Katalaz, MPO, MDA, IL-6, TNF değerleri açısından istatistiksel anlamlı fark bulunmadı, ($P>0.05$). (TABLO-7)

Tablo 8. IR ve IR-Ozon gruplarının biyokimyasal değerlerinin karşılaştırılması.

	Gruplar	min	max	mean	Standart sapma	p
SOD	IR	497,2	612,6	538,66	36,19	,002
	IR-Ozon	100,1	512,6	278,68	148,43	
Katalaz	IR	39,80	65,70	54,03	9,16	,006
	IR-Ozon	11,92	52,05	35,88	12,54	
MPO	IR	5,48	52,17	13,23	15,94	,208
	IR-Ozon	3,39	10,79	7,04	2,96	
MDA	IR	,08	,24	,16	,05	,528
	IR-Ozon	,07	,35	,20	,11	
IL6	IR	,44	5,70	2,88	1,65	,793
	IR-Ozon	,57	4,35	2,66	1,22	
TNF	IR	1,29	3,15	2,15	,77	,834
	IR-Ozon	1,32	4,28	2,24	,97	

IR ve IR-Ozon grupları karşılaştırıldığında; MPO, MDA, IL-6, TNF değerleri açısından istatistiksel anlamlı fark bulunmadı, ($P>0.05$). Ancak IR-Ozon grubunda SOD (278.68 ± 148.43) ve Katalaz (35.88 ± 12.54) değerlerinde, IR grubuna göre (538.66 ± 36.19) ve (54.03 ± 9.16) istatistiksel olarak anlamlı azalma saptandı ($p=0.002$), ($p=0.006$), (TABLO-8).

Gruplara göre Troponin-I ortalama ve standart sapma değerleri

Tablo 9. Grupların Troponin-I değerleri

Gruplar	Min.	Max.	Mean	Standart Sapma	Gruplar arası anlamlı fark (P <0.05)
Sham(Grup 1)	0.72	0.84	0,7813	0,04704	1-2, 1-3, 1-4
Kontrol(Grup 2)	0.79	0.91	0,8450	0,04690	2-3, 2-4
IR (Grup3)	2.02	2.59	2,3138	0,20486	3-4
IR-Ozon(Grup4)	1.04	1.52	1,2775	0,16654	

Troponin-I mean değerlerine bakıldığında IR Grubunun (2,31) ile en yüksek ortalamaya sahip olduğu anlaşılmaktadır. IR+Ozon Grubunun (1,28), Kontrol grubunun (0,85) ve Sham grubunun ortalamasının (0,78) olduğu görülmektedir. Gruplar, Troponin-I açısından değerlendirildiğinde; Sham grubundaki değerler Kontrol, IR ve IR-Ozon gruplarına göre istatistiksel anlamlı düşük bulundu, ($p<0.05$). Kontrol grubu, IR ve IR-Ozon gruplarıyla karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı düşüklük bulundu, ($p<0.05$). IR-Ozon grubuyla IR grubu Troponin-I değerleri açısından karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı düşüklük bulundu ($p<0.05$), (TABLO-9).

4.2. Histopatolojik Bulgular

Histopatolojik inceleme sonucuyla belirlenen skora sistemiyle elde edilen bulgular aşağıda belirtilmiştir, (TABLO-10).

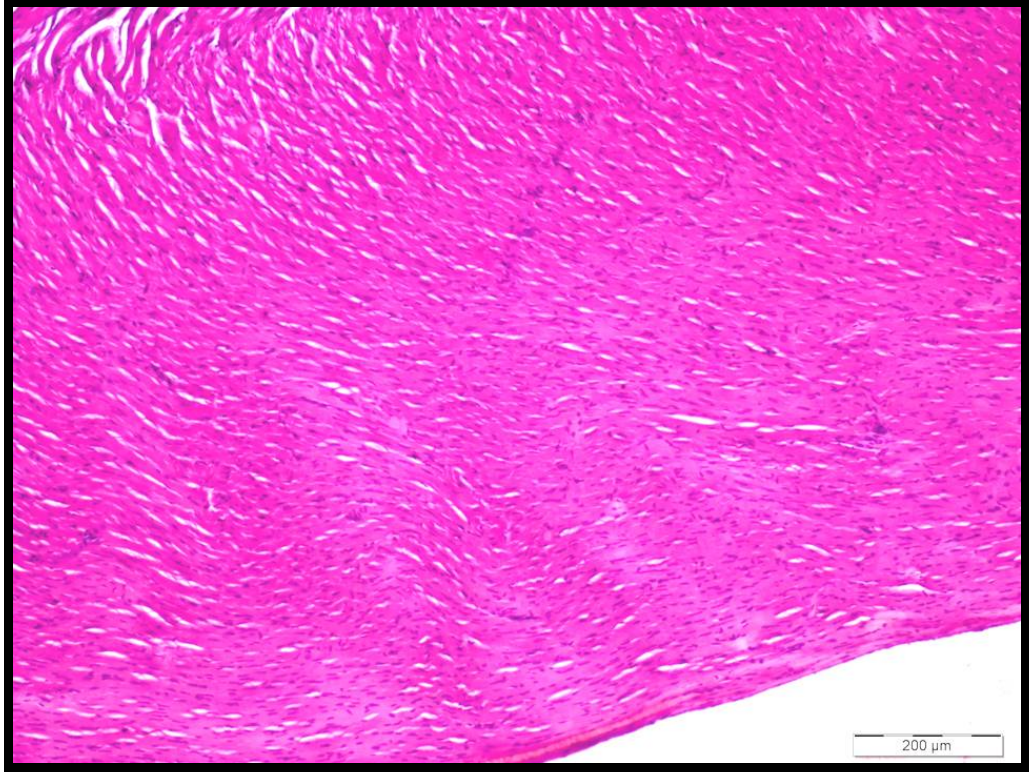
Tablo 10. Gruplara göre histopatolojik değerlendirmeyle belirlenen sonuçlar.

Grup		Minimum	Maximum	mean	Standart Sapma	Gruplar arası anlamlı fark p<0.05
Sham	GRUP-1	,00	1,00	,5000	,53452	1-2 1-3 1-4
Kontrol	GRUP-2	1,00	2,00	1,3750	,51755	2-3
IR	GRUP-3	1,00	3,00	2,0000	,53452	
IR-Ozone	GRUP-4	1,00	2,00	1,6250	,51755	

Grupların ortalama değerlerine bakıldığında; IR grubunun (2,00) ile en yüksek ortalamaya sahip olduğu anlaşılmaktadır. IR-Ozone grubunun ortalaması (1,63), Kontrol grubunun ortalaması (1,38) ve Sham grubunun ortalamasının (0,50) olduğu görülmektedir, (TABLO-10).

Histopatolojik değerlendirme sonucunda, Sham grubuyla (0.5 ± 0.5), Kontrol grubu (1.37 ± 0.51) karşılaştırıldığında istatistiksel azalma olduğu bulundu (**P=0,01**), (TABLO-10).

Sonuçlara göre sham grubunda kontrol grubuna oranla daha az hasarlanma olduğu görülmektedir, (RESİM-4).



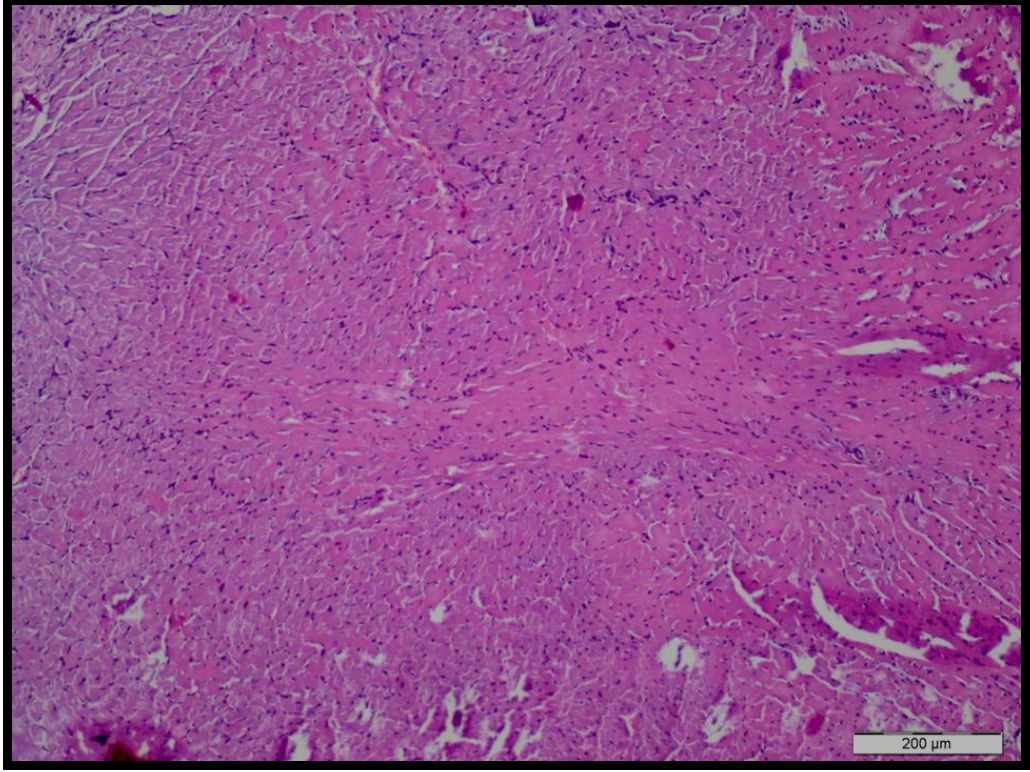
Resim 4. Sham grubu myokard histopatoloji örneği, histolojik grade “0”, HEx100

Histopatolojik değerlendirme sonucunda , Sham grubunda (0.5 ± 0.5), IR (2 ± 0.53) grubuna göre istatistiksel anlamlı azalma olduğu bulundu (**P=0,01**), (TABLO-10).

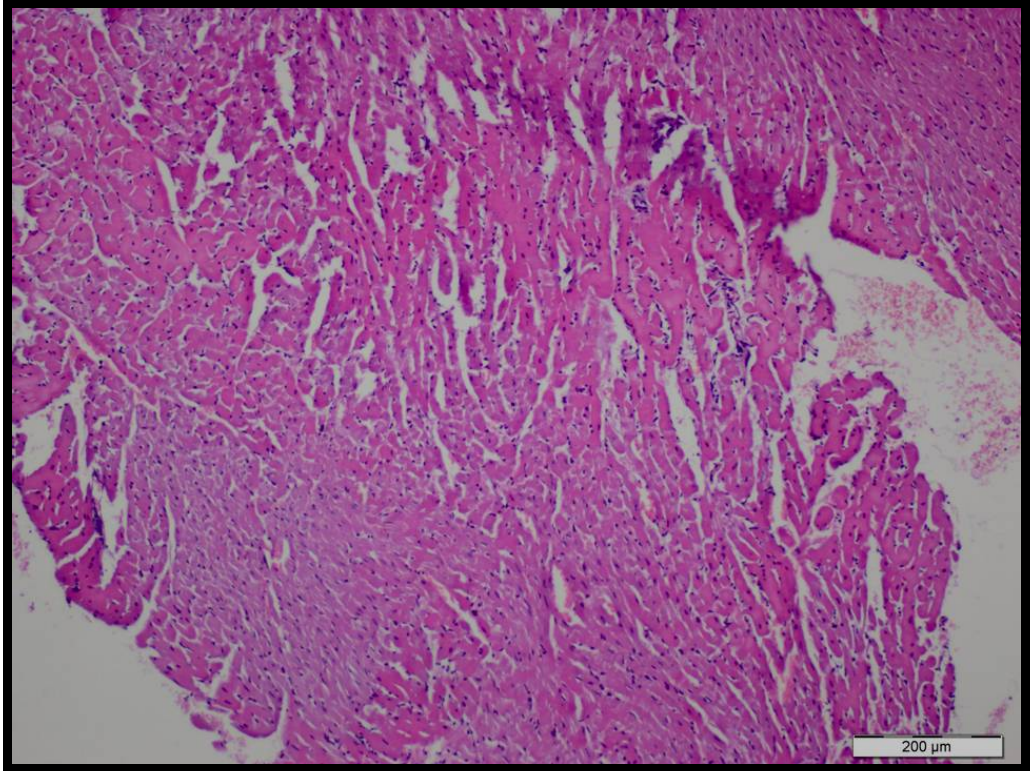
Histopatolojik değerlendirme sonucunda, Sham grubunda (0.5 ± 0.5), IR-Ozone (1.62 ± 0.51) grubuna göre istatistiksel anlamlı azalma olduğu bulundu (**p=0,03**), (TABLO-10).

Histopatolojik değerlendirme sonucunda, Kontrol grubunda (1.37 ± 0.51), IR grubuna (2 ± 0.53) göre istatistiksel anlamlı azalma olduğu anlaşılmaktadır (**P=0,036**), (TABLO-10).

Sonuçlara göre IR grubunda Kontrol grubuna oranla daha fazla hasarlanma meydana geldiği görülmektedir, (RESİM-5), (RESİM-6).



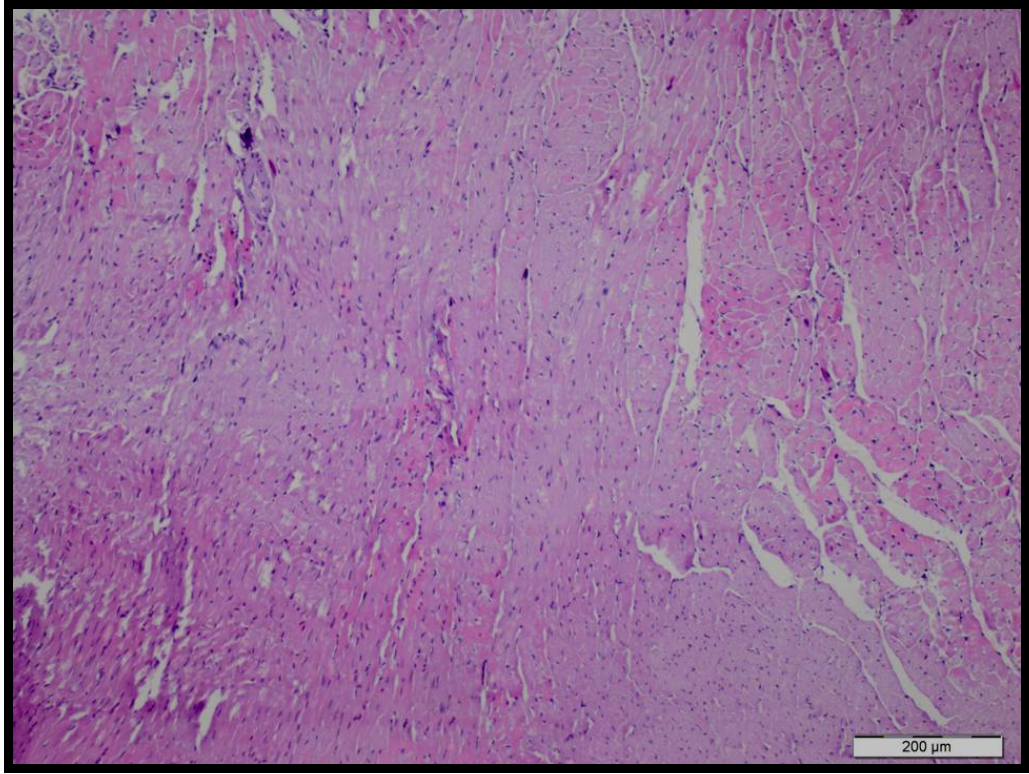
Resim 5. Kontrol grubu myokard histopatoloji örneği, multifokal ve orta dereceli myokardial disorganizasyon, miyofibrillerde şişme ve eozinofili bulguları, histolojik grade “2”, HEx100



Resim 6. Aortik IR grubu myokard örneği, belirgin ve yaygın myokardial disorganizasyon, miyofibrillerde şişme ve eozinofili, histolojik grade “3”, HEx100

Histopatolojik değerlendirme sonucunda, Kontrol (1.37 ± 0.51) ve IR-Ozone (1.62 ± 0.51) grupları arasında istatistiksel anlamlı farklılık olmadığı anlaşılmaktadır. ($p=0,333$). (TABLO-10) (RESİM-6)

Histopatolojik değerlendirme sonucunda, IR-Ozone (1.62 ± 0.51) grubunda IR(2 ± 0.53) grubuna göre daha az hasarlanma görölmesine rağmen iki grup arasında istatistiksel anlamlı farklılık olmadığı anlaşılmaktadır ($p=0,175$), (TABLO-10), (RESİM-6), (RESİM-7).



Resim 7. Aortik IR+Ozone grubu myokard histopatoloji örneği, fokal ve hafif dereceli myokardial disorganizasyon, miyofibrillerde şişme ve eozinofili bulguları, histolojik grade "1", HEx100

5. TARTIŞMA

Bu çalışmanın sonuçları O₃'un sıçanlarda aortik İR'nin indüklediği miyokard hasarı üzerine koruyucu etkileri olduğunu gösterdi. Bu hipotezi destekleyen üç temel bulgu; O₃ doku SOD ve katalaz değerlerinde anlamlı azalma sağladı, kan Troponin-I düzeylerinde anlamlı azalma sağlandı, ayrıca aortik İR'nin indüklediği miyokard hasarı ile ilişkili histopatolojik değişiklikler istatistiksel anlamlı saptanmamakla beraber azalma saptandı.

Aortik İR hasarı oluşumunda, SOR'nin oluşumu önemli bir yer tutar (55). Doku O₂ düzeyinin reperfüzyon sonucunda tekrar sağlanması ve moleküler O₂'nin hücre içerisinde oksidatif enzimler tarafından indirgenmesi artmış SOR'nin ortaya çıkması ile sonuçlanır. Süperoksit radikali, normal hücre metabolizmasında membran elektron transportu sırasında oluşan bir ara üründür (56). İskemik koşullarda ise, hipoksantin ve ksantin katabolizması sırasında ksantin oksidaz katalizörlüğünde bir reaksiyon ile oluşur.

SOR'ye karşı savunma ve en önemli hücre içi antioksidan enzim sistemleri SOD, katalaz ve glutatyon peroksidazdır.

SOR aracılığı ile oluşan İR hasarı LPO ile de ilişkilidir (57).SOR leri DNA ve protein düzeyinde zararlı etki göstermemekte, aynı zamanda fosfolipid ve poliansature yağ asitlerini içeren hücre membranında geçirgenliği bozarak, hücre içi kalsiyum birikimi ve hücre ölümüne neden olmaktadır (57,58).Bundan dolayı, hücre membranının LPO u İR hasarının önemli bir basamağıdır ve MDA, LPO nun son ürünü ve hassas bir göstergesi olarak kabul edilmektedir (50,59).

Lökositlerde lokalize bir enzim olan MPO, deneysel çalışmalarda uzak organ olarak pek çok dokuda olduğu gibi miyokard İR hasarında da nötrofil infiltrasyonunun göstergesi olarak kullanılmaktadır (60,61).

Aortik IR grubunda MDA ve MPO değerleri sham ve kontrol gruplarına oranla artmasına rağmen istatistiksel anlamlı artış bulunmadı. Toklu ve ark. (68) deneysel oksidatif organ hasarında nötrofil infiltrasyonunun inhibisyonu ile böbrek MPO seviyelerinde anlamlı azalma bildirmişlerdir. Uysal ve ark. (69) alt extremite İR modelinde melatoninin akciğer hasarı üzerine etkisini belirlemek amacıyla

yaptıkları çalışmada Aortik İR grubunda kanda ve dokuda MDA'nın yükseldiğini saptamışlardır. Ateş E. ve ark. (70) rat böbreğine eritropoetin etkisini araştırdıkları çalışmalarında İR uygulanan grupta MDA düzeylerinde artış saptamışlardır. Chen H. ve ark. O₃'ün aortik İR hasarına uzak organ böbrek etkisini araştıran iki ayrı çalışmada Aortik İR grubunda MDA düzeylerinin artmış olduğunu göstermişlerdir (71,72). Kayali ve ark.(73) ise b -glukan ile yaptıkları deneysel spinal kord hasarında doku MDA düzeylerinde anlamlı değişiklik saptamamışlar ve bunu iskemi süresi ile ilişki olarak bildirmişlerdir.

Çalışmamızda Aortik İR+ O₃ grubunda Aortik İR grubuna göre MDA ve MPO düzeyleri azalmış olarak saptanmasına rağmen istatistiksel anlamlı fark bulunmadı. Benzer şekilde Chen H ve ark. O₃ ile önkoşullanma gerçekleştirilen ratlarda ,renal İR hasarına etkisinin araştırıldığı çalışmalarında MDA düzeylerinin İR uygulanan grupta istatistiksel anlamlı azalma saptanmadığını belirtmişlerdir (72). Ozakyol AH. ve ark.'nın (74) ratlarda karaciğer İR hasarına L-nitro-arginine-methyl-ester (L-NAME)'in etkisini araştırdıkları çalışmanın sonucunda L-NAME verilen grupta karaciğer dokusunda MDA'nın anlamlı azalmadığı ancak İR hasarının histopatolojik olarak gerilediği görülmüştür. Bununla ilgili olarak verilen ilacın oluşan İR hasarını lipid peroksidasyonundan bağımsız olarak azaltabileceğini bildirmişlerdir.

Kapan ve ark.(75) yaptıkları deneysel aortik İR modelinde renal doku SOD düzeylerinin kontrol grubuna göre İR grubunda anlamlı düzeyde yükseldiğini bildirmişlerdir.

Mun ve ark. (76) da deneysel böbrek İR modelinde doku SOD ve katalaz düzeylerinin yükseldiğini bildirmişlerdir. Mezzetti A. ve ark. (77) kardiopulmoner bypass sırasında kanda KAT ve antioksidan enzim aktivitelerini araştırmışlar, İR sonrasında KAT ve diğer antioksidan enzim aktivitelerinde artış bulmuşlardır. Ayrıca bu artışın iskemik arrestin süresi ile ilişkili olduğunu ve reperfüzyonla serbest radikal üretiminin önceki iskemik periyodun şiddetine bağımlı olduğunu saptamışlardır. Kiriş ve ark. (78) İR modelinde renal hasarı araştırdıkları çalışmalarında İR hasar göstergesi olarak KAT aktivitesini incelemişler ve AİR grubunda kontrol grubuna göre KAT aktivitesinin anlamlı olarak arttığını saptamışlardır. Bu bulgularla uyumlu

olarak çalışmamızda aortik İR grubunda miyokard doku SOD ve katalaz düzeyleri kontrol ve sham grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı düzeyde yüksek bulundu.

Bununla birlikte, aortik İR + O₃ grubunda doku SOD ve katalaz seviyelerinin aortik İR grubuna göre anlamlı azaldığı saptandı. Dimakakos PB.ve ark.(79) deneysel modelde abdominal aortada oklüzyon oluşturup IR sonrası intestinal organlarda hasara karşı vitamin E'nin koruyucu etkisini araştırmışlardır. E vitamini etkisini belirlemek için kanda SOD aktivitesine bakılmış ve E vitamini verilen grupta SOD aktivitesinde azalma olduğu saptanarak vitamin E nin postiskemik hasara karşı koruduğunu belirtmişlerdir. Ege E ve ark.(80) deneysel tavşan spinal kord IR hasarına erdosteinin etkisini araştırdıkları çalışmada İR grubunda, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, SOD aktivitesinde anlamlı artma, erdostein verilen grupta SOD enzim aktivitesinde anlamlı azalma saptamışlardır. Erten SF. ve ark. (81) deneysel spinal kord iskemi reperfüzyon hasarına melatonin etkisini araştırmak için KAT değerlerine bakmışlar melatonin verilmesi ile IR uygulanan grupla yalnızca IR uygulanan gruba oranla KAT değerlerinde anlamlı azalma saptamışlardır. Leon OS ve ark (62) yaptıkları çalışmada Kontrollü O₃ verilmesinin oksidatif önkoşullanmaya veya oksidatif strese adaptasyonu sağlayarak SOR ile indüklenen hasarı azaltabileceğini göstermiştir. Re L ve ark. (60) düşük dozlarda O₃ ün endojen antioksidan sistemlerin korunması ve aktive edilmesini sağlayarak oksidatif önkoşullanmayı sağlayabileceği gösterilmiştir. O₃ ile oksidatif önkoşullanma yapılması, orta dereceli oksidatif stres yaratarak karaciğer hasarına karşı endojen antioksidan sistemleri uyarabilir (62). Ajamieh ve ark ratlarda yapılan hepatik IR modelinde O₃ oksidatif önkoşullanma ile sağlanan koruyucu mekanizmaların protein sentezi ile sağlandığı ve O₃ tedavisinin bu yolla mitokondriyal fonksiyonları ve hücrel redoks dengesini koruduğu belirlendi Ayrıca karaciğer dokusunda IR grubunda sham ve kontrol gruplarına göre SOD ve Katalaz değerlerinde anlamlı düşüş saptandı (64).

Benzer şekilde Chen H. ve ark.(72) sıçanlarda yaptıkları deneysel renal IR hasarında O₃ ile yapılan önkoşullanma sonucunda, SOD düzeylerini anlamlı ölçüde azalttığını bildirmişlerdir. Bu noktada; İR sırasında SOR'nin aşırı üretimini endojen antioksidan seviyelerine paralel olarak tüketime neden olabileceği bildirilmiştir. Ayrıca İR hasarı sırasında antioksidan enzim seviyelerinin; İR hasarının yaygınlığı,

iskemi ve reperfüzyonun ayrı ayrı sürelerine ve spesifik doku antioksidan kapasitesine bağlı olduğunu düşünmekteyiz. Bu bulgular O₃'un antioksidan özelliği ile aortik İR'nin indüklediği oksidatif stresi anlamlı ölçüde azalttığını desteklemektedir.

Çalışmamızda sham ve kontrol grupları karşılaştırıldığında TNF-alfa değerlerinde kontrol grubunda anlamlı artış saptanmıştır. Kontrol grubunda yapılan cerrahi girişimin sham grubuna oranla diğer çalışmalarda da belirtilen inflamasyon göstergesi olan TNF-alfa düzeyinde anlamlı artışa neden olduğu gösterilmiştir (82).

Lökositlerin reperfüzyon zedelenmesinde oluşan etkilerini artıran bir mediatör olan TNF-alfa, lökositlerin endotele yapışması ve prostoglandin ve PAF gibi bazı mediatörler aracılığıyla miyokard iskemi ve reperfüzyon hasarının artmasına neden olurlar. Bu etkiler Squadrito ve ark. yaptığı IR nun miyokard hasarına etkisi deneysel çalışması sonucunda TNF-alfa düzeyindeki artışla gösterilmiştir (182).

Yine Li ve ark. yaptığı deneysel çalışmada lokal TNF-alfa uygulamasıyla lökosit adezyonu başlamış, sonrasında sitokinlerin salınımı ve miyokard nekroz alanında artma saptanmıştır (83).

Bizim çalışmamızda da benzer şekilde Aortik IR grubunda TNF-alfa düzeyleri kontrol ve sham gruplarına göre istatistiksel anlamlı yüksek olarak bulunmuştur.

Çalışmamızda sham grubuyla, Aortik IR+O₃ grupları karşılaştırıldığında MPO, MDA, IL-6 değerleri açısından anlamlı fark saptanmadı. Ancak Sham grubunda TNF-alfa düzeyleri Aortik IR +O₃ grubuna oranla anlamlı düşük saptandı. Aoki ve ark benzer şekilde deney modelinde antioksidan özellikleri bilinen NaNO₂ yi karotis hasarı oluşturdukları kedilere verdikleri halde TNF düzeylerinin tedavi grubunda, sham grubuna oranla yüksek olduğunu belirlemişlerdir (84).

Çalışmamızda kan Troponin-I testinde Aortik IR + O₃ grubunda Aortik IR grubuna göre istatistiksel anlamlı azalma bulundu. Troponin-I kardiyak hasarlanmanın bilinen bir göstergesidir. Eckle T. ve ark yaptıkları çalışmada deneysel fare modelinde miyokardda uygulanan iskemik önkoşullanmanın, Troponin-I değerlerinde IR grubuna göre istatistiksel azalma sağladığını saptamışlardır (85).

Merin O ve ark. yaptıkları çalışmada izole rat kalpleri asendan aort kanülasyonu aracılığı ile Krebs-Hanseleit tampon solüsyonu ile perfüze edilmişler ve 15 dakika sonra perfüzyon sonlandırılarak 30 dakika boyunca global iskemi sağlanmış ve ardından perfüzyon tekrar başlanarak 40 dakika boyunca devam edilmiştir. Bazal hemodinamik parametreler iskemi öncesinde ve reperfüzyon başladıktan sonra her 10 dakikada bir alınmıştır. Reperfüzyon esnasında O₃ ile tedavi edilen grup kontrol grubu ile kıyaslanmıştır. Tedavi grubunda, reperfüzyondan 5 dakika sonra O₃ distile su içerisinde kollardan verilmiştir. Çalışma sonrasında reperfüzyon esnasında O₃ ile tedavi edilen grupta iyileşmenin daha iyi olduğu bildirilmiştir (67).

Çalışmamızda yapılan histopatolojik inceleme sonucunda Aortik IR+ O₃ grubunda Aortik IR grubuna göre daha az hasarlanma görülmesine rağmen istatistiksel anlamlı azalma bulunmadı.

Günümüzde düşük doz O₃ ile antioksidan enzimlerin, NO yolunun ve diğer hücrel aktivitelerin düzenlenebileceği kanıtlanmıştır ve birçok patolojik durumda O₃ ün etkilerini desteklemektedir (60) Ajamieh ve ark. O₃ ün karaciğeri endojen NO konsantrasyonunu düzenleyen mekanizmalar aracılığıyla koruduğunu göstermişlerdir (64).Bizim çalışmamızda NO değeri çalışılmamış olmasına rağmen daha önceki çalışmalarda O₃ un etki mekanizması içinde yer aldığı gösterilmiş olan NO sayesinde meydana gelen etkileri görmekteyiz. Artmış NO etkisiyle meydana gelen vazodilatasyon sonucunda miyokarda kanlanma artışı sonucunda Aortik IR+ O₃ grubunda Troponin-I değerlerinin Aortik IR grubuna göre anlamlı düşük saptandığı düşünülmüştür. Ayrıca miyokard perfüzyonunun NO artışı nedeniyle kan akımındaki artışa bağlı olarak daha iyi sağlandığı; bunun sonucunda Aortik IR+ O₃ grubunda Aortik IR grubuna göre histopatolojik olarak daha az hasarlanma meydana geldiği düşünülmüştür.

Sonuç olarak, çalışmamızda O₃'un deneysel infrarenal aortik IR modelinde oluşan miyokard hasarını azalttığı, istatistiksel anlamlı olmamakla beraber histopatolojik olarak gösterildi. Doku SOD, KAT düzeylerinde ve kanda Troponin-I düzeylerinde İR grubuna göre O₃ + İR grubunda istatistiksel olarak anlamlı azalma saptandı. Yine de, O₃ un bu konudaki etki mekanizmasının ve hemodinamik

etkilerinin; özellikle NO ile yapılacak çalışmalarla ayrıntılı olarak tanımlanması için farklı deneysel çalışmalara gereksinim vardır. Bu deneysel çalışmaların sonucunda, İAA cerrahisinde O₃ un gelişen miyokard hasarına etkisinin klinik olarak da araştırılabileceği düşüncesindeyiz.

ÖZET

Aortik İskemi Reperfüzyon Modelinde Ozon Tedavisinin Uzak Organ Miyokard Hasarı Üzerine Etkisi

Amaç: Bu çalışmanın amacı, rat infrarenal abdominal aortasında oklüzyon-reperfüzyon sonrası miyokarda oluşan iskemi-reperfüzyon hasarına ozonun etkisini araştırmaktır.

Materyal ve Metod: Otuz iki adet Wistar-Albino rat rastgele ve eşit sayıda (n=8) olmak üzere dört gruba ayrıldı. Sham grubunda laparotomi ve infrarenal abdominal aorta (İAA) diseksiyonu yapıldı ancak oklüzyon uygulanmadı. Kontrol grubunda ratlara 10 gün süreyle 1 mg/kg/gün dozunda intraperitoneal ozon(O₃) verildi. Daha sonra laparotomi ve infrarenal abdominal aorta (İAA) diseksiyonu yapıldı ancak oklüzyon uygulanmadı. Aortik iskemi reperfüzyon (AİR) grubunda İAA diseksiyonu yapıldı, İAA'ya kros-klemp konularak 60 dakika iskemi ve kros-klemp kaldırılarak 60 dakika reperfüzyon gerçekleştirildi. AİR + O₃ grubunda ise ratlara 10 gün süreyle 1 mg/kg/gün dozunda intraperitoneal O₃ verildi. Daha sonra İAA'ya kros-klemp konularak 60 dakika iskemi ve 60 dakika reperfüzyon uygulandı. Ratlar sakrifiye edildi ve rat miyokard örneklerinde biyokimyasal yöntemlerle malondialdehit (MDA) düzeyleri, süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (KAT) aktiviteleri ölçüldü. Rat serumunda TNF ve Troponin-I düzeyleri ölçüldü. Ek olarak miyokard dokularında histopatolojik inceleme yapıldı.

Sonuçlar: IR grubuna ait SOD, KAT, TNF ve Troponin-I aktivite değerleri sham grubundaki değerlere göre anlamlı derecede yüksek bulundu (p<0,05). IR grubunda kontrol ve O₃ +IR grubuna göre SOD, Katalaz ve Troponin-I değerleri anlamlı derecede yüksek bulundu (p<0,05). O₃ +IR grubu, IR grubuyla karşılaştırıldığında Troponin-I anlamlı derecede düşük saptandı (p<0.05).

Histopatolojik incelemede, miyokardiyal hasar açısından Kontrol ile IR grupları arasında IR de anlamlı yükseklik saptandı (p<0.05). Kontrol ve O₃ +IR grupları arasında anlamlı fark saptanmadı (p>0.05). O₃ +IR grubunda histopatolojik IR ye göre azaldı,ancak bu istatistiksel anlamlı bulunmadı.

Tartışma: Bu çalışmanın sonucunda ozonun infrarenal aortik iskemi-reperfüzyon sonrası oluşan miyokardiyal hasarı ve oksidatif stresi üç temel bulguyla azaltabileceği gösterilmiştir.Bunlar (i) O₃ doku SOD ve katalaz değerlerinde anlamlı azalma sağladı, (ii) Kan Troponin-I düzeylerinde anlamlı azalma sağlandı, (iii) Aortik İR'nin indüklediği miyokard hasarı ile ilişkili histopatolojik değişiklikler istatistiksel anlamlı saptanmamakla beraber azalma saptandı.

Anahtar kelimeler: İskemi, Reperfüzyon, Ozon, Miyokard hasarı

SUMMARY

The Effect of Ozone on Remote Organ Myocardial Injury Caused by Experimental Ischemia Reperfusion Model

Purpose: The purpose of this study is to examine the effect of ozone on ischemia reperfusion injury in myocardium occurring after occlusion –reperfusion of infrarenal abdominal aorta in rat.

Material and Method: Thirty two Wistar-Albino rats were randomized in equal numbers (eight per group) into four groups. Sham group underwent laparotomy and dissection of the infrarenal abdominal aorta (IAA) without occlusion. The ozone (O₃) was given intraperitoneally for ten days (1mg/kg/day) in Control group. Control group underwent laparotomy and dissection of the infrarenal abdominal aorta (IAA) without occlusion. Aortic ischemia reperfusion (AIR) group underwent dissection of the IAA, and then ischemia and reperfusion were done by clamping of the IAA for 60 min and declamping of the IAA for 60 min, respectively. O₃ + AIR group underwent ischemia and reperfusion by clamping of the IAA for 60 min and declamping of the IAA for 60 min, respectively, and O₃ was given intraperitoneally for ten days (1mg/kg/day) before procedure. Rats were sacrificed and the tissue levels of malondialdehyde (MDA) and activity levels of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) were measured in rat myocardial specimens. TNF and Troponin-I levels measured in rat serum. Histopathological examination of the myocardial specimens was also done.

Results: Tissue levels of SOD, CAT, TNF and Troponin-I in the AIR group were significantly higher than the levels in the sham group ($p < 0.05$).

Levels of SOD, CAT, and Troponin-I in the AIR group were significantly higher than the levels in the control and O₃ +AIR group ($p < 0.05$). Troponin-I level higher than AIR group against O₃ +AIR group ($p < 0.05$).

Histopathological examination showed that myocardial injury in the AIR group were significantly higher than in the control group ($p < 0.05$). There was no statistically significant difference between Control and O₃ +AIR group ($p > 0.05$).

Although histopathological injury in the AIR group were higher than in the O₃ +AIR group, there was no statistically significant differences between two groups.

Discussion: The results of this study indicate that ozone attenuates the myocardial injury and oxidative stress occurring after infrarenal aortic ischemia reperfusion by three factors. These factors are (i) decreases in tissue SOD and KAT levels, (ii) decreases in Troponin-I levels, (iii) in O₃ +AIR group histopathological injury less than AIR group, but it is not corrected statistically.

Keyword: Ischemia, Reperfusion, Ozone, Myocardial injury

KAYNAKLAR

1. Ajamieh HH, Menéndez S, Martínez-Sánchez G, Candelario-Jalil E, Re L, Giuliani A, et al. Effects of ozone oxidative preconditioning on nitric oxide generation and cellular redox balance in a rat model of hepatic ischaemia-reperfusion. *Liver Int.* 2004 Feb;24(1):55-62.
2. Peralta C, Leon OS, Xaus C, Prats N, Jalil EC, Planell ES, et al. Protective effect of ozone treatment on the injury associated with hepatic ischemia-reperfusion: antioxidant-prooxidant balance. *Free Radic Res* 1999;31(3):191-196.
3. Sanchez GM, Al-Dalain SM, Menendez S, Re L, Giuliani A, Jalil EC, et al. Therapeutic efficacy of ozone in patients with diabetic foot. *Eur J Pharmacol* 2005;523:151-161.
4. Biedunkiewicz B, Tylicki L, Nieweglowski T, Butakowski S, Rutkowski B. Clinical efficacy of ozonated autohemotherapy in hemodialyzed patients with intermittent claudication: an oxygen-controlled study. *Int J Artif Organs* 2004; 27:29-34.
5. Ajamieh H, Menendez S, Merino N, Sanchez GM, Re L, Leon OS. Ischemic and ozone preconditioning in the protection against ischemic-reperfusion injury. *Ozone Sci Eng* 2002;25: 241-250.
6. Maureen McMichael DVM, DACVECC, Rustin M. Moore DVM, PhD, DACVS Ischemia-reperfusion injury pathophysiology, part I. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care* 2004; 14 (4): 231–241.
7. Jennings RB, Reimer KA. The cell biology of acute myocardial ischemia. *Annu Rev Med* 1991; 42: 225-246.
8. Green CJ, Gower JD, Healing G, Cotterill LA, Fuller BJ, Simpkin S. The importance of iron, calcium and free radicals in reperfusion injury: an overview of studies in ischaemic rabbit kidneys. *Free Radic Res Commun* 1989;7: 255-64.
9. Orrenius S, Burkitt MJ, Kass GE, Dypbukt JM, Nicotera P. Calcium ions and oxidative cell injury. *Ann Neurol* 1992; 32 Suppl: S33-42.
10. Kumar V, Cotran R, Robbins SL., *Temel patoloji (Basic Pathology)*, 6. edisyon, Temmuz 2000 (syf 6-10,30-36)
11. Collard ,C.D. , Gelman,S.: pathophysiology , clinical manifestations and prevention of Ischemia-reperfusion injury. *Anesthesiology*,94,1133-1138(2001)
12. Mangino MJ, Anderson CB, Murphy MK, et al. Mucosal arachidonate metabolism and intestinal ischemia–reperfusion injury. 1989; *Am J Physiol*: 257:G299–G307.
13. Hatanaka N, Kamike W, Shimizu S, et al. Ca²⁺ release from mitochondria induces cytosolic enzyme leakage in anoxic liver. *J Surg Res* 1995; 58: 485–490
14. Shibasaki F, McKeon F. Calcineurin functions in Ca(2+)- activated cell death in mammalian cells. *J Cell Biol* 1995; 131:735–743.
15. Homer-Vanniasinkam S, Crinnion JN, Gough MJ: Post-ischaemic organ dysfunction: a review. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 1997; 14: 195-203.
16. Nuh zafer Cantürk, İskender Sayek. *Cerrahi araştırma kitabı.2005 nobel tıp kitabevleri*
17. sl.wikipedia.org adresinden alınmıştır.

18. Özler M., Öter Ş, Korkmaz A. The Use of Ozone Gas for Medical Purposes TAF Prev Med Bull 2009;8(1):59-64
19. www.ozon.com.tr
20. Oleg V. Maslennikov, Claudia N. Kontorshchikova, Irina A. Gribkova. Ozone therapy in Practice. Health Manual. - Nizhny Novgorod 2008
21. Viebahn R. The use of ozone in medicine. 2nd ed.Heidelberg: Karl F. Haug Publishers,1994,1-178
22. www.ozonservices.com
23. Wolff HH. Die Behandlung peripherer Durchblutungsstörungen mit Ozon. Erfahr-Heilkd. 1974; 23: 181-184.
24. Di Paolo N, Bocci V, Gaggiotti E. Ozone Therapy The International Journal of Artificial Organs / Vol. 27 / no. 3, 2004/ pp. 168-175
25. Di Paolo N, Bocci V. EBOO (Extracorporeal Blood Oxygenation and Ozonization). Cosenza, Italy: Bios Ed. 2003.
26. Ozonun tıpta kullanımı. Renate Viebahn-Haensler, İngilizce 4. baskıdan (2002) çeviri, 1. Türkçe baskı, 2005.
27. Bocci V. Scientific and medical aspects of ozone therapy. state of the art. Archives of Medical Research. 2006; 37: 425-435.
28. Pryor WA, Squadrito GL, Friedman M. The cascade mechanism to explain ozone toxicity: the role of lipid ozonation products. Free Radic Biol Med. 1995; 19(6): 935-41.
29. 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.
30. 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.
31. 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.
32. Trachootham D, Lu W, Ogasawara MA, Nilsa RD, Huang P. Redox regulation of cell survival. Antioxid Redox Signal. 2008; 10(8): 1343-74.
33. Korkmaz A, Oter S, Sadir S, Coskun O, Topal T, Ozler M, Bilgic H. Peroxynitrite may be involved in bladder damage caused by cyclophosphamide in rats. J Urol. 2005; 173(5): 1793-6.
34. Oter S, Korkmaz A, Topal T, Ozcan O, Sadir S, Ozler M, Ogur R, Bilgic H. Correlation between hyperbaric oxygen exposure pressures and oxidative parameters in rat lung, brain, and erythrocytes. Clin Biochem. 2005; 38(8): 706-11.
35. Farber JL, Kyle ME, Coleman JB. Mechanism of cell injury by activated oxygen species. Lab Invest. 1990; 62: 670-679.
36. Jannsen YMW, Van Houten B, Borm PJA, Mossman BT. Cell and tissue response to oxidative damage. Lab Invest. 1993; 69: 261-274.
37. Wiseman H, Halliwell B. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. Biochem J. 1996; 313: 17-29.

38. Powis G, Briehl M, Oblong J. Redox signaling and the control of cell growth and death. *Pharmacol Ther.* 1995; 65: 149-173.
39. Lander HM. An essential role for free radicals and derived species in signal transduction. *FASEB J.* 1997; 11: 118-124.
40. Thannickal VJ, Fanburg BL. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2000; 279(6): L1005–L1028.
41. Bocci V. Is it true that ozone is always toxic? The end of a dogma. *Toxicology and Applied Pharmacology.* 2006; 216: 493-504.
42. Halliwell B, Clement MV, Long LH. Hydrogen peroxide in the human body. *FEBS Lett.* 2000; 486: 10-13.
43. Bocci V, Aldinucci C, Bianchi L. The use of hydrogen peroxide as a medical drug. *Riv Ital Ossigeno Ozonoterapia.* 2005; 4: 30-39.
44. Rice-Evans C, Miller NJ. Total antioxidant status in plasma and body fluids. *Methods Enzymol.* 1994; 234: 279-93.
45. Bocci V, Aldinucci C, Mosci F, Carraro F, Valacchi G. Ozonation of human blood induces a remarkable upregulation of heme oxygenase-1 and heat stress protein-70. *Mediators Inflamm.* 2007; 2007: 1-6.
46. Fritz HB. Heme oxygenase-1: a therapeutic amplification funnel. *FASEB J.* 2005; 19(10): 1216-9.
47. LE Otterbein, MP Soares, K Yamashita, FH Bach. Heme oxygenase-1: unleashing the protective properties of heme. *trends in Immunology.* 2003; 24(8): 449-55
48. Isaacs, K.R. The cardiovascular system. In *Target Organ Pathology: A Basic Text* edited by J.Turton & J. Hooson. Taylor & Francis, London, pp:141-176
49. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-75.
50. Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 1990; 186:421-31.
51. Spitz DR, Oberley LW. An assay for superoxide dismutase activity in mammalian tissue homogenates. *Anal Biochem* 1989;179:8-18.
52. Woolliams JA, Wiener G, Anderson PH, McMurray CH. Variation in the activities of glutathione peroxidase and superoxide dismutase and in the concentration of copper in the blood in various breed crosses of sheep. *Res Vet Sci* 1983; 34: 253-6.
53. Aebi Y. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 1984;105: 12-126.
54. Tullis MJ, Brown S, Gewertz BL. Hepatic influence on pulmonary neutrophil sequestration following intestinal ischemia-reperfusion. *J Surg Res* 1996; 66: 143-6.
55. Bocci V. Scientific and Medical Aspects of Ozone Therapy. *State of the Art Archives of Medical Research* 2006;37: 425-435.
56. 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.
57. Bocci V, Valacchi G, Corradeschi F, Fanetti G. Studies on the biological effects of ozone: 8. Effects on the total antioxidant status and on interleukin-8 production. *Mediat Inflamm.* 1998; 7: 313-317.

58. Bocci V, Aldinucci C. Biochemical modifications induced in human blood by oxygenation-ozonation. *J Biochem Mol Toxicol*. 2006; 20(3): 133-8.
59. Travagli V, Zanardi I, Silvietti A, Bocci V. A physicochemical investigation on the effects of ozone on blood. *Int J Biol Macromol*. 2007; 41(5): 504-11.
60. Re L, Mawsouf MN, Menendez S, Leon OS, Sanchez GM, Hernandez F. Ozone therapy: Clinical and basic evidence of its therapeutic potential. *Arch Med Res* 2008; 39: 17-26.
61. Bocci V. Does ozone therapy normalize the cellular redox balance? Implications for therapy of human immunodeficiency virus infection and several other diseases. *Med Hypotheses* 1996; 46: 150-154.
62. Leon OS, Menendez S, Merino N, Castillo R, Sam S, Perez L, et al. Ozone oxidative preconditioning: a protection against cellular damage by free radicals. *Mediat Inflamm* 1998; 7: 289-294.
63. Al Dalain SM, Martinez G, Jalil EC, Menendez S, Re L, Giuliani A, et al. Ozone treatment reduces markers of oxidative and endothelial damage in an experimental diabetes model in rats. *Pharmacol Res* 2001; 44(5):391-396. ischemic preconditioning and intermittent and continuous inflow occlusion in the liver. *Ann Surg* 2002; 235:400-407
64. Ajamieh HH, Berlanga J, Merino N, Martinez-Sa'nchez G, Carmona AM, Menendez-Cepero S, et al. Role of protein synthesis in the protection conferred by ozone-oxidative-preconditioning in hepatic ischaemia/reperfusion. *Transplant Int* 2005; 18: 604-612.
65. Calunga JL, Menendez S, Barber E, Merino N, Cruz E. Ozone biological response in kidneys of rats submitted to warm ischemia. *Ozone Sci Eng*. 2003; 25: 233-240.
66. Sroczynski J, Antoszewski Z, Matyszczyk B, Krupa G, Rudzki H, Zbrońska H, et al. Clinical assessment of treatment results for atherosclerotic ischemia of the lower extremities with intraarterial ozone injection
67. Merin O, Atiias E, Elstein D, Schwalb H, Bitran D, Zimran A, et al. Ozone administration reduces reperfusion injury in an isolated rat heart model. *J Card Surg* 2007; 22: 339-342
68. Toklu HZ, Sener G, Jahovic N, Uslu B, Arbak S, Yeğen BC. Beta-glucan protects against burn-induced oxidative organ damage in rats. *Int Immunopharmacol* 2006;6: 156-69.
69. A Uysal, İ Akar, KK Özsin, A Rahman, B Üstündağ, Hİ Özercan. Alt ekstremitte iskemi reperfüzyonunun yol açtığı akciğer hasarında melatoninin koruyucu etkinliği. *Türk Göğüs Kalp Damar Cerrahisi Dergisi Ekim* 2006, Cilt 14, Sayı 4, Sayfa(lar) 308-314)
70. Ateş E, Yalçın A U, Yılmaz S, Köken T, Tokyol Ç. Protective effect of erythropoietin on renal ischemia and reperfusion injury. *ANZ Journal of Surgery* volume 75, page 1100-December 2005
71. Hui Chen, Bianzhi Xing, Xiuheng Liu, Bingyan Zhan, Jiangqiao Zhou et al. Ozone Oxidative Preconditioning Protects the Rat Kidney from Reperfusion Injury: The Role of Nitric Oxide *Journal of Surgical Research* 149, 287–295 (2008)
72. Hui Chen, Bianzhi Xing, Xiuheng Liu, Bingyan Zhan, Jiangqiao Zhou et al. Similarities Between Ozone Oxidative Preconditioning and Ischemic Preconditioning in Renal Ischemia/Reperfusion Injury *Archives of Medical Research* 39 (2008) 169-178

73. Kayali H, Ozdag MF, Kahraman S, Aydin A, Gonul E, Sayal A, et al. The antioxidant effect of beta-Glucan on oxidative stress status in experimental spinal cord injury in rats. *Neurosurg Rev* 2005;28:298-302.
74. Ozakyol AH, Tuncel N., Sarıcam T., Uzuner K., Ak D., Güner F. Effect of nitric oxide inhibition on rat liver ischemia reperfusion injury. *Pathophysiology*, 2000 Sep;7(3):183-188
75. Kapan S, Kiriş İ, Kılbas A, Altuntas İ, Karahan N, Okutan H. Eritropoetin'in sıçan aortik iskemi reperfüzyonunda akciğer hasarı üzerine etkisi. *Türk Göğüs Kalp Damar Cer Derg* 2009;17:110-6.
76. Mun KC, Lee HG, Lee TH, Kim YH, Kwak CS, Kim SP, et al. Effect of modified polyhemoglobin on the ischemia/reperfusion injury in kidney. *Transplant Proc* 2003;35: 99-100.
77. Mezzetti A, Lapenna D, Pierdomenico SD, Di Giammarco G, Bosco G, Di Ilio C, Santarelli P, Calafiore AM, Cuccurullo F. Myocardial antioxidant defenses during cardiopulmonary bypass. *J Card Surg.* 1993 Mar;8(2):167-71
78. Kiriş, İ., Okutan, H., Savaş, Ç., Yönden, Z., Delibaş, N. Deneysel aortik iskemi reperfüzyon modelinde renal hasara gadolinium klorürün etkisi. *Turkish J Vasc Surg* 2005;14(2):13-18
79. Dimakakos PB, Kotsis T, Kondi-Pafiti A, Katsenis K, Doufas A, Chondros K, Kouskouni E. Oxygen free radicals in abdominal aortic surgery. An experimental study. *J Cardiovasc Surg (Torino).* 2002 Feb;43(1):77-82
80. Ege E, İlhan A, Gurel A, Akyol O, Ozen S. Erdosteine ameliorates neurological outcome and oxidative stress due to ischemia/reperfusion injury in rabbit spinal cord. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2004 Oct;28(4):379-86
81. Erten SF, Kocak A, Ozdemir I, Aydemir S, Colak A, Reeder BS. Protective effect of melatonin on experimental spinal cord ischemia. *Spinal Cord.* 2003 Oct;41(10):533-8
82. Squadrito F, Altavilla D, Zingarelli B, et al: Passive immunization with antibodies against tumor necrosis factor (TNF- α) protects from the lethality of splanchnic artery occlusion shock. *Circ Shock* 1992; 237:223-230
83. Li H, Cybulsky MI, Gimbrone MA, Libby P: Inducible expression of vascular cell adhesion molecule-1 by vascular smooth muscle cells in vitro and within rabbit atheroma. *Am J Pathol* 1993;143:1551-1559
84. Aoki N, Siegfried M, Lefer AM: Anti-EDRF effect of tumor necrosis factor in isolated perfused cat carotid arteries. *Am J Physiol* 1989;25 H:1509-1513
85. Tobias Eckle, Almut Grenz, David Köhler, Andreas Redel, Melanie Falk et al. Systematic evaluation of a novel model for cardiac ischemic preconditioning in mice *AJP - Heart* November 2006 vol. 291 no. 5 H2533-H2540.