



T.C.
SAĞLIK BAKANLIĞI
TÜRKİYE KAMU HASTANELERİ KURUMU
Ankara İli 2. Bölge Kamu Hastaneleri Birliği Genel Sekreterliği
Ankara Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi
TIBBİ BİYOKİMYA BÖLÜMÜ

OZON TEDAVİSİNİN KANIN TOPLAM OKSİDAN VE TOPLAM ANTİOKSİDAN DURUMLARI ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Uzmanlık Tezi
Semra IŞIKOĞLU

Ankara, 2013

**T.C. SAĞLIK BAKANLIĞI
ATATÜRK EĞİTİM ve ARAŞTIRMA HASTANESİ
TIBBİ BİYOKİMYA BÖLÜMÜ**

**OZON TEDAVİSİNİN KANIN TOPLAM OKSİDAN VE
TOPLAM ANTİOKSİDAN DURUMLARI ÜZERİNE
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Uzmanlık Tezi
Semra İŞİKOĞLU

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Özcan EREL

Ankara, 2013

ÖNSÖZ

Tıpta uzmanlık eğitimim süresince teorik ve pratik bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım belki de en önemlisi yaşama dair birçok tecrübeler edindiğim, sonsuz hoşgörülerini esirgemeyen çok değerli hocam **Prof. Dr. Özcan EREL**'e,

Uzmanlık eğitimim boyunca bana destek ve yol gösterici olan hocalarım **Başasistan Doç. Dr. Cemile KOCA** ve **Başasistan Uz. Dr. Serpil ERDOĞAN**'a

Bilgi ve deneyimlerinin yanında bizlere her zaman manevi destekleriyle de yardımcı olan birer abi ve abla gibi davranan sevgili uzmanlarım **Uz. Dr. Orhan ŞEN** ve **Uz. Dr. Pervin BARAN**'a

Ozon terapilerinde çalışmam boyunca tecrübelerinden ve yardımlarından faydalandığım Medizone Sağlık Hizmetleri'nden başta **Dr. Muhammet EMİN Bey** olmak üzere tüm ekibine,

Birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum ve hep sevgiyle hatırlayacağım çalışma arkadaşlarım **Dr. Salim NEŞELİOĞLU**, **Dr. Merve ERGİN** ve **Dr. Murat ALIŞIK**'a,

Bana her türlü desteği sağlayan, her zaman yanımda olan ve bugünlere ulaşmamda büyük paya sahip **sevgili AİLEME**

En derin saygı ve sevgilerimle teşekkür ederim...

Semra IŞIKOĞLU
Ankara, 2013

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖNSÖZ.....	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
RESİMLER DİZİNİ.....	vii
TABLOLAR DİZİNİ.....	vii
KISALTMALAR.....	viii
GİRİŞ.....	1
1. GENEL BİLGİLER.....	2
1.1. OZON TEDAVİSİ.....	2
1.1.1. OZON NEDİR?.....	2
1.1.2. OZONUN KLASİK UYGULAMA TARİHÇESİ.....	3
1.1.3. TIBBİ AMAÇLI OZON GAZI OLUŞTURULMASI.....	4
1.1.4. OZON TEDAVİ YÖNTEMİ.....	6
1.1.4.1. Medikal Ozon Uygulama Biçimleri.....	8
1.1.4.1.1. Sistemik uygulama biçimleri.....	8
1.1.4.1.1.a. Major Otohemoterapi (MAH).....	8
1.1.4.1.1.b. Minör Terapi.....	8
1.1.4.1.1.c. Rektal O ₃ /O ₂ insüflasyonu.....	9
1.1.4.1.2. Topikal Uygulamalar.....	10
1.1.4.1.2.a. Düşük basınçlı ozon gazı uygulaması.....	10
1.1.4.1.2.b. Transkutanöz ozon imersiyonu.....	10
1.1.4.1.2.c. Ozonize su uygulaması.....	11
1.1.4.1.2.d. Topikal rektal insüflasyon.....	11
1.1.4.1.2.e. İntraartiküler ozon enjeksiyonu.....	11
1.1.4.1.3. Ozonize edilmiş zeytinyağı.....	12
1.1.4.2. Medikal Ozonun Etkisi.....	12
1.1.4.3. Medikal ozon tedavisinin klinik endikasyonları.....	13
1.1.4.3.a. Enfeksiyöz Hastalıklarda.....	13
1.1.4.3.b. Vaskular Bozukluklarda.....	13
1.1.4.3.c. Baskılanmış İmmün Sistemde.....	14
1.1.4.3.d. Dejeneratif Hastalıklarda.....	14
1.1.4.3.e. Ortopedik Hastalıklarda.....	14
1.1.4.4. Medikal ozon tedavisinin yan etki ve kontrendikasyonları.....	16
1.2 SERBEST RADİKALLER VE REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİ.....	19
1.2.1. Hücre içi mesajcılar olarak ROS ve RNS.....	19
1.2.2.1. Reaktif Oksijen Türleri (ROS).....	23
1.2.2.1.a. Süperoksit Radikali (O ₂ ⁻).....	24
1.2.2.1.b. Hidrojen Peroksit (H ₂ O ₂).....	24
1.2.2.1.c. Hidroksil Radikali (OH [•]).....	25
1.2.2.1.d. Singlet Oksijen (¹ O ₂).....	25
1.2.2.1.e. Perhidroksil radikali (H ₂ O [•]).....	25
1.2.2.1.f. Nitrik oksit (NO).....	25
1.2.2.2.a. İleri Oksidasyon Protein Ürünleri.....	26

1.2.2.2.b.	Lipid Peroksidasyonu.....	26
1.2.2.2.c.	Lipid peroksidasyonu ve hücre iletişimi.....	27
1.2.2.2.d.	Okside lipidler ile sinyalleşme.....	28
1.2.2.2.e.	Okside steroidler ile sinyalleşme.....	28
1.2.2.2.f.	Lipid peroksidasyon son ürünü olan aldehidler ile sinyalleşme.....	29
1.2.2.2.f.1.	Aldehidlerden 4-HNE.....	30
1.2.3.	Antioksidan Moleküller.....	31
1.2.3.1.	Enzim Karakterli Antioksidanlar.....	32
1.2.3.1.a.	Süperoksid Dismutaz (SOD, EC 1.15.1.1.).....	32
1.2.3.1.b.	Katalaz (KAT, EC 1.11.1.6.).....	32
1.2.3.1.c.	Glutatyon Peroksidaz (GSH-Px, EC 1.11.1.9.) ve Glutatyon Redüktaz (GSH-Rd, EC 1.6.4.2.).....	33
1.2.3.1.d.	Glukoz 6 Fosfat Dehidrogenaz (G6PD, EC 1.1.1.49.).....	33
1.2.3.1.e.	Paraoksonaz (PON, EC 3.1.8.1.).....	34
1.2.3.1.f.	Arilesteraz (ArEs, EC 3.1.1.2.).....	35
1.2.3.2.	Enzimatik Olmayan Antioksidanlar.....	35
1.2.3.2.a.	Antioksidan vitaminler.....	35
1.2.3.2.b.	Karotenoidler.....	36
1.2.3.2.c.	Glutatyon (GSH).....	36
1.2.3.2.d.	Ürik asit (Ürat).....	36
1.2.3.2.e.	Bilirubin.....	36
1.2.3.2.f.	Melatonin.....	37
1.2.3.2.g.	Seruloplazmin.....	37
1.2.3.2.h.	Transferin.....	37
1.2.3.2.i.	Ferritin.....	37
1.2.3.2.j.	Tiyol grubu içeren moleküller.....	37
1.2.3.3.	Total Antioksidan Durum.....	38
1.3.	OZONUN VE SEBEP OLDUĞU OKSİDATİF STRESİN ETKİLERİ.....	40
2.	GEREÇ ve YÖNTEM.....	47
2.1.	MATERYAL.....	47
2.1.1.	Ozon uygulaması ve Örneklerin hazırlanması.....	47
2.1.2.	Kimyasallar.....	48
2.1.3.	Kullanılan cihazlar.....	48
2.2.	METODLAR.....	48
2.2.1.	İleri oksidize Protein Ürünleri (AOPP).....	48
2.2.2.	İskemi Modifiye Albumin (İMA).....	49
2.2.3.	Total Oksidan Durum (TOS).....	51
2.2.4.	Total Antioksidan Durum (TAS).....	51
2.2.5.	Oksidatif Stres İndeksi (OSİ).....	52
2.2.6.	Total Tiyol Düzeyleri (TTL).....	53
2.2.7.	Arilesteraz (ARES).....	53
2.2.8.	Paraoksonaz (PON).....	54
2.2.9.	Stimüle Paraoksonaz (SPON).....	55
2.3.	İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME.....	55
3.	BULGULAR.....	56
4.	TARTIŞMA.....	65
5.	KAYNAKLAR.....	71

ÖZET

Ozonterapi, yaklaşık 40 yıldır dünya çapında kullanılmaktadır. En önemli endikasyonları arteriyel dolaşım bozuklukları, enfeksiyonlar, immünyetmezlikten kaynaklanan hastalıklar, kanser hastalarının ek tedavisi, romatizmal hastalıklardır. Ozonun moleküler, fizyolojik ve klinik etkilerinin ortaya çıkması için ise serbest radikallerin oluşturulması gerekir.

Çalışmamızın amacı; medikal tedavide kullanılan oksidan özellikli ozonun kan ile etkileşiminden sonra mevcut olan biyolojik moleküllerde etkisini ve oksidan/antioksidan maddelerin düzeylerindeki değişimleri araştırmaktır.

Çalışmamıza katılan 35 gönüllünün yaş ortalaması $42,37 \pm 13,96$ idi. Katılımcılara major ototerapi yapıldı ve bu kişilerden tedavi öncesinde ve sonrasında antekubital venden kanlar alındı. Alınan örnekler hemen santrifüj edilip 2 saat içerisinde çalışıldı. Ozonun oksidan etkisi serumda Total Oksidan Durum, İskemi Modifiye Albumin, İleri Oksidan Protein Ürünleri testleri ile antioksidan etkisi ise Total Antioksidan Durum, Total Tiyol Düzeyleri, Arilesteraz, Paraoksonaz, Stimüle Paraoksonaz testleri ile değerlendirildi. Serumda oksidatif stresin denge durumu ise OSİ ile analiz edildi. Verilerin istatistik analizleri yapıldı ve bulgular $p < 0,05$ anlamlılık düzeyinde değerlendirildi.

Tedavi öncesi oksidan/antioksidan molekül seviyeleri tedavi sonrasındakiler ile kıyaslandı. Elde edilen sonuçlara dayanarak oksidan durum ile ilgili olan TOS ve İMA testleri istatistiksel olarak anlamlı artış gösterdi (TOS ve İMA sırasıyla için p değerleri sırasıyla, 0,019 ve 0,005). Ancak AOPP de ılımlı bir artış olsa da bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0,533$). Antioksidan moleküllerden ise TAS, PON, SPON, ARES tedavi sonrasında önemli derecede azalış gösterdi (sırasıyla TAS, PON, SPON ve ARES için p değerleri 0,047; <0.0001 , <0.0001 ; <0.0001). Oksidatif dengenin belirteci olan OSİ ise artış gösterse de bu artış istatistiksel olarak anlamsızdı.

Çalışmamızda tedavi sonrasında numunelerde oksidan moleküller şiddetle artarken, antioksidanlar da bir o kadar azalmıştır. Bu durum ozonla oluşan reaktif oksijen türlerinin bir göstergesidir ve ozonun fonksiyon göstermesi için gereklidir. Oksidanların artışı, ise nötralizasyon amacıyla plazmada bulunan antioksidanların miktarını düşürmüştür.

Anahtar kelimeler: Ozon tedavisi, Oksidan moleküller, Antioksidan moleküller

ABSTRACT

The ozone therapy is used worldwide for nearly 40 years. The most important indications for the ozone therapy are the arterial circulatory disorders, infections, diseases caused by immune deficiency, for additional treatment of patients with cancer, and rheumatic diseases. Free radicals must be generated to get molecular, physiological and clinical effects of the ozone therapy.

The aim of this study is to evaluate the oxidant effect of ozone therapy on biological molecules in blood and the changes in the levels of oxidant/antioxidant after ozone therapy.

The study involved 35 volunteers, with the mean age of 42.37 ± 13.96 . Major autotherapy is applied to participants and blood samples were taken from the antecubital vein before and after the treatment. Samples taken were centrifuged immediately and examined within 2 hours. Oxidant effect of ozone in serum was evaluated by total oxidant status, ischemia modified albumin and advanced oxidant product of protein, while antioxidant effect was evaluated by total antioxidant status, total thiol levels, arylesterase, paraoxonase and stimulated paraoxonase tests. The equilibrium state of oxidative stress in serum was analysed by OSI. Statistical analysis of data was performed and results were evaluated at the significance level of %5 ($p < 0,05$). pretreatment levels of Oxidant/antioxidant molecules were compared with posttreatment levels.

Based on the results; TOS and IMA tests that are related with oxidant status showed statistically significant increase (p values for TOS and IMA were 0,019 and 0,005, respectively) On the other hand increase of AOPP wasn't statistically significant (p value for AOPP was 0,533). Antioxidant status reflected by TAS, PON, SPON, ARES tests decreased after the treatment (p values for TAS, PON, SPON and ARES were 0,047; 0,0001; 0,0001 and 0,0001, respectively). Increase of OSI, that is a sign of oxidant balance wasn't statistically significant.

In our study, oxidant molecules were strongly increased and antioxidants were decreased in post treatment samples. It is believed that its is an indicator of reactive

oxygen species formed by ozone and formation of ROS is necessary for ozone activity. Decreased antioxidants levels might be because of consumption of them in neutralization of oxidants.

Key words: Ozone-therapy, oxidant molecules, antioxidant molecules



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa No
1-1: Ozonosferdeki ozon oluşumu ve çözülümü	2
1-2: Bir tıbbi ozon jeneratörünün işleyiş ilkesi	6
1-3: Vakum altında ozona dayanıklı bir cam şişe ile ozonlu otohemoterapi gerçekleştirmek için gerekli bileşenlerin şematik çizimi	7
1-4: Glutasyon redoks döngüsü	33
1-5: Fenton ve Haber Weiss reaksiyonları	40
1-6: ROS ve LOP'un hücre içindeki etkileri	42
3-1: Ozon tedavisi öncesi ve sonrası TAS grafiği	56
3-2: Ozon tedavisi öncesi ve sonrası TOS grafiği	56
3-3: Ozon tedavisi öncesi ve sonrası OSİ grafiği	57
3-4: Ozon tedavisi öncesi ve sonrası AOPP grafiği	58
3-5: Ozon tedavisi öncesi ve sonrası İMA grafiği	59
3-6: Ozon tedavisi öncesi ve sonrası TTL grafiği	59
3-7: Tedavi öncesi ve sonrası PON seviyeleri	60
3-8: Tedavi öncesi ve sonrası SPON seviyeleri	61
3-9: Tedavi öncesi ve sonrası SPON seviyeleri	61
3-10: Seans sayısının İMA'ya etkisi	63

TABLolar DİZİNİ

Tablo	Sayfa No
1-1: Tıbbi ozonun spesifik (tıbbi ve fizyolojik) etkileri ve endikasyonları	16
1-2: Solunan havadaki ozon gazı konsantrasyonu ile artan toksik etkiler	18
1-3: Serbest radikallerinin hücre fonksiyonlarındaki önemli rolleri	20
1-4: Antioksidan moleküllerin sınıflandırılması	31
3-1: Tedavi öncesi ve sonrasında TAS, TOS, OSİ ortalamaları±SD ve anlam düzeyi	57
3-2: Tedavi öncesi ve sonrasında AOPP, İMA, TTL ortalamaları±SD ve anlam düzeyi	60
3-3: Tedavi öncesi ve sonrasında AOPP, İMA, TTL ortalamaları±SD ve anlam düzeyi	62
3-4: Testlerin tedavi öncesi ile sonrasına göre ANOVA analizi	63
3-5: Seansların tedavi öncesi ve sonrasına etkisini gösteren Tukey analizi	64

RESİMLER DİZİNİ

Resim	Sayfa No
1-1: Ozon jeneratörü	6
1-2: Belirli dozda O ₃ /O ₂ karışımının rektal irigasyonu için kullanılan ekipman	9

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

MAH:	Major ototerapi
H₂O₂:	Hidrojen peroksit
PUFA:	Poliansatüre yağ asidi
ROS:	Reaktif oksijen türü
N₂O₂:	Nitrojen dioksit
O₃:	Ozon
—SH:	Sülhidril grubu
LOP:	Lipid oksidasyon ürünleri
PDGF:	Platelet derive growth faktör
TGF β1:	Değiştirici büyüme faktörü β 1
SOD:	Süperoksit dismutaz
KAT:	Katalaz
GSH Px:	Glutasyon peroksidaz
G6PDH:	Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz
ACE:	Anjiotensin çevirici enzim
·NO:	Nitrik oksit
RNS:	Reaktif nitrojen türleri
MAPK:	Mitojen-aktive protein kinaz
O₂⁻:	Süperoksit anyon radikali
HO·:	Hidroksil radikali
ROOH·:	Peroksil radikali
RO·:	Alkoksil radikali
NO₂:	Azot dioksit
H₂O₂:	Hidrojen peroksit
¹O₂:	Singlet oksijen
HOCl:	Hipoklorik asit
LOOH:	Lipit hidroperoksit
·ONOO:	Peroksinitrit radikali
AOPP:	İleri oksidasyon protein ürünleri
4-HNE:	4-hidroksinonenal
4-HHE:	4-hidroksi-2e-heksenal
4-HDDE:	4-hidroksi-2e,6z-dodekadienal
LO:	Lipoksijenaz
OxLDL:	Okside LDL'ler
EGFR:	Epitelyal growth faktör reseptörü
JNK:	c-Jun NH ₂ -terminal kinaz
ERK:	Ekstraselüler sinyal düzenleyici yollar
AP-1:	Aktivatör protein-1
PC 12:	Rat adrenal medullada oluşturulmuş feokromasitoma hücreleri
Nrf2:	Nf-E2-ilişkili transkripsiyon faktör-2
FAD:	Flavin adenin dinükleotid
eNOS:	Endotelyal nitrik oksit sentaz
MM-LDL:	Minimal modifiye ldl
ARES:	Ariesteraz
PON:	Paraoksonaz
GSH:	Redükte glutasyon

GSSG:	Oksidize glutatyon
HO-1:	Hem oksijenaz-1
MP:	Metalloproteinaz
İMA:	İskemi modifiye albumin
TAS:	Total antioksidan durum
TOS:	Total oksidan durum
TTL:	Total tiyol seviyeleri
SPON:	Stimüle paraoksonaz enzimi
DTT:	Dithiothreitol
CoCl₂:	Kobalt klorür
ABTS:	2,2-azinobis- 3-etil-benzothiazolin-6-sülfonik asit
OSİ:	Oksidatif stres indeksi
TTL:	Total tiyol düzeyleri
DTNB:	5,5-ditiyo bis 2-nitrobenzoik asit
TNB:	5-tiyo-2-nitrobenzoik asit

GİRİŞ

Ozonterapi ya da daha spesifik olarak major ototerapi (MAH), yaklaşık 40 yıldır dünya çapında kullanılmaktadır. Bu terapi hakkında ilk rapor Wolff tarafından 1974 yılında yayımlanmıştır (10). Bocci'ye göre ilgisizlik ve önyargı nedeniyle hakkında pek araştırma yapılamamakla beraber, ozonun pek çok hastalığın tedavisinde etkisi olduğu bilinmektedir (2).

Major otohemoterapinin en önemli endikasyonları; arteriyel dolaşım bozuklukları, enfeksiyonlar, bağışıklık yetersizliğinden kaynaklanan hastalıklar, kanser hastalarının ek tedavisi, romatizmal hastalıklar ve eklem iltihaplarıdır (2).

Ozon tedavisinin özellikle inflamatuvar sürecin yoğun olarak yaşandığı ve immün sistemin ön planda yer aldığı fizyopatolojik durumlarda tedavi edici etkisi şaşırtıcıdır. Ozonun bu etkisinin oksidan özellikte oluşundan kaynaklandığı düşünülmektedir (6).

Ozon (O_3), MAH aracılığıyla kana karıştırılınca plazmada hızlıca Hidrojen Peroksit (H_2O_2) oluşturur ve bu H_2O_2 albumine bağlı Poliansatüre yağ asidi (PUFA) ile reaksiyona girerek LOP oluşumuna neden olur. Hidrojen peroksit, en iyi bilinen reaktif oksijen türü (ROS) olup genel kabul görmüş, ana hücre içi sinyal moleküllerindedir. "ROS her zaman zararlıdır" hipotezi yerine artık immün cevapta ve konak savunmasında önemli olan mediyatörler olduğu ve sinyal iletiminin düzenlenmesinde görevleri olduğu bilinmektedir (2, 24).

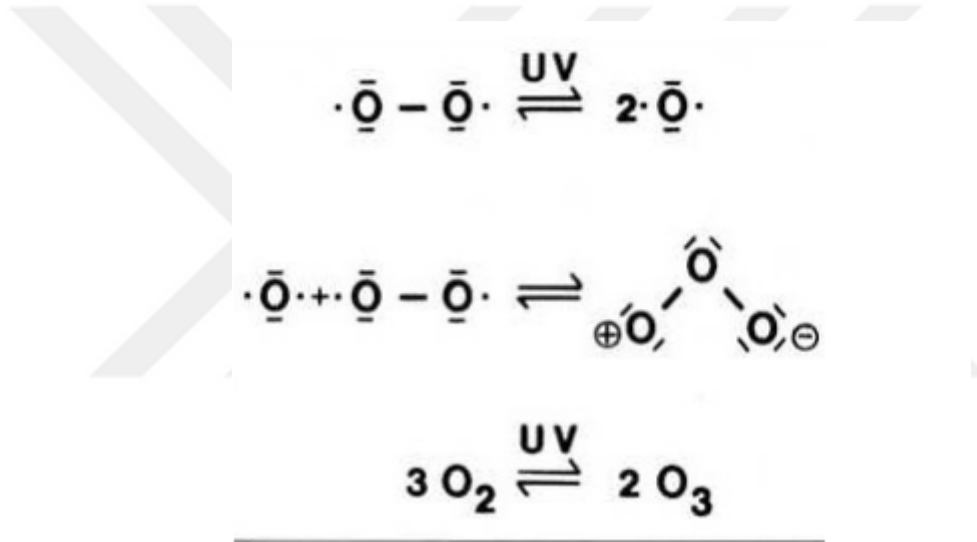
Çalışmamızda ozonun oksidan fonksiyonunu ve vücuda girişinden itibaren oksitleyici özelliğinin antioksidan moleküller üzerinde nasıl etkilere sebep olduğunu araştırmayı amaçladık. Bu amaçla katılımcılardan ozonlu tedavi öncesinde ve tedavi sonrasında aldığımız kanlarda oksidan/antioksidan moleküllerin düzeylerindeki değişimleri değerlendirdik.

1. GENEL BİLGİLER

1.1. OZON TEDAVİSİ

1.1.1. OZON NEDİR?

Ozon üç oksijen atomundan oluşan gaz halinde bir moleküldür. Doğada stratosferde (yer yüzeyinden 25–30 km yükseklikte) UV dalgaların (<185nm) etkisiyle oksijen molekülleri parçalanır ve yüksek derecede reaktif oksijen atomu oluşur. Chapman teorisine göre oluşan bu moleküller endotermik reaksiyona girerek üç atomlu ozon gazını oluştururlar (Şekil 1–1). Ayrıca yıldırım düşmesi gibi doğal olaylar sırasında da atmosferdeki oksijenin katalizlenmesi sonucu ozon gazı oluşur (1).



Şekil 1-1: Ozonosferdeki ozon oluşumu ve çözülümü

Oksijen molekülü kararlı halde iken, ozon (O₃) kararsızdır ve yaklaşık 20 dakika içerisinde oksijene dönüşebilir. Ozondan bu şekilde oksijen gazı oluşurken serbest kalan atom ise ortamdaki diğer moleküllere bağlanarak medikalde fayda sağlayan yapıları oluşturur (2).

Ozon, oksijen gazından daha ağır, açık mavi renkli ve keskin kokulu bir gazdır. Stratosfer tabakası içinde gaz halde 1–10 ppm konsantrasyonda bulunmaktadır (3). Diğer gazlar (O₂, CO₂) gibi suda çözünebilir. Oksijene göre 1,6 kat daha yoğun olduğu ve suda çözünürlüğünün 10 kat (100 mL suda 49 mL O₃, 0,02 M, 0°C’de) daha fazla olduğu bilinir. Spontan yıkılır yarı ömrü 20 °C’ de 40 dakikadır ancak -111.9 °C altında

likit olarak depo edilebilir. Saf suda hemen çözünerek O₂ gazı oluşturmaya rağmen, biyolojik sıvılarda organik ve inorganik moleküllerle reaksiyona girerek serbest radikallerin oluşumuna neden olur (4). Dolayısı ile hemoterapi esnasında uygulanan ozon/oksijen karışımındaki ozon, afinite sırasına göre plazmada bulunan çoklu doymamış yağ asitleriyle, antioksidan bileşiklerle ve sistein gibi sülfhidril (SH) grubu içeren tiyoller ile reaksiyona girer (2).

1.1.2. OZONUN KLASİK UYGULAMA TARİHÇESİ

Ozon gazını Alman kimyacı Christian Friedrich Schönbein (1799-1868) 1839 yılında keşfetmiştir (5). Keşfinden sonraki ilk yıllarda sadece dezenfeksiyon amacıyla kullanılmıştır. Örneğin 1860 yılında Monako şehrinin su arıtma tesisi ozon ile dezenfekte edilmiştir. Ozonun bu dezenfekte edici etkisi güçlü oksidasyon özelliğinden kaynaklanmaktadır. Sadece virüs ve bakteriler değil tüm mikroorganizmalar ve toksinlerini okside edebilir. Ozon, kimyasal reaksiyonlarla kimyasal atıkları, aromatik bileşikler, fenoller, pestisidleri ve deterjanları da nötralize edebilme yeteneğine sahiptir (6).

İlk ozon jeneratörü Werner von Siemens tarafından Almanya'da 1857'de geliştirilmiştir (7) ve terapötik olarak ilk kullanımı kanın saflaştırılması için C. Lender tarafından 1870'de (8) uygulanmıştır. Ozon tedavisinin klasik uygulaması 1974 yılında Wolff tarafından tarif edilmiştir. Wolff, ilk kez tedavide ozon kullanarak Birinci Dünya Savaşı sırasında Alman askerlerinde gangren ve benzeri ciddi yaralanmaları tedavi etmiştir (9). Bu yöntemde; bir miktar kan (50–270 ml), ozona dayanıklı antikoagülanlı bir şişede 5-10 dakika muhafaza edilir. Kan, oksijen/ozon karışımıyla temas ettikten sonra aynı kişiye geri verilir (ototransfüzyon)(2,10). Bu uygulama şekli majör otohemoterapi olarak adlandırılır (11).

Dr. Erwin Payr (1871-1946) 1932'de geçirdiği bir hastalık nedeni ile kendi bedeninde ozon tedavisini denemiştir. Bilimsel bir toplantıda ozonun tedavi edici bir ajan olarak gündeme alındığı ilk önemli organizasyon ise 1935 yılında Berlin'de toplanan 59. Alman Cerrahi Birliği toplantısı olup, burada Dr. Erwin Payr

“Cerrahi’de Ozon Uygulamaları” başlığı altında kendi vakalarından oluşan derleme türünde bir sunum yapmıştır. 1950 yılında E.A.Fisch (1899–1966) ozon tedavisini dış hekimliği alanında uygulamıştır. Laboratuvar ekipmanı için ilk kez ozon kullanımı ise Fish tarafından gerçekleştirilmiştir. Joachim Hänslar (1908–1981) Hans Wolff ile birlikte 1972 yılında Tıbbi Ozon Derneği’ni kurmuştur. 1993 yılında bu kuruluşun adı “Hastalıkların Önlenmesi ve Tedavisinde Ozon Uygulamaları Tıp Derneği” olarak değiştirilmiştir. Bu tarihten sonra 80’li yıllara kadar, ozon tedavisini ferdi olarak uygulayan çeşitli hekimler ve araştırmacılar bulunmaktadır. 1980’li yıllardan itibaren medikal amaçla ozon kullanımına yönelik bilimsel çalışmalar artış göstermiştir (12).

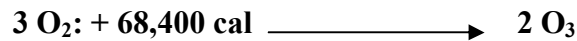
1.1.3. TIBBİ AMAÇLI OZON GAZI OLUŞTURULMASI

Ozon oluşturma metodları UV radyasyon, elektrik deşarjı ve elektrokimyasal işlemler kullanılarak gerçekleştirilir. Endüstriyel ozon direkt olarak havadan elde edilirken medikal ozon saf oksijen kullanılarak oluşturulur.

İlk ozon jeneratörü Werner von Siemens tarafından keşfedilmiştir. 1896’da Nikola Tesla, ozon jeneratörünün patentini almış, 1900’de Tesla Ozon Şirketini kurmuş ve Tesla ünitelerini tıbbi kullanıma sunmuştur.

Medikal alanda ozon; uygun konsantrasyonda ve uygun uygulama süresi belirlenerek terapötik bir ajan olarak kullanılmaktadır.

Oksijen atomlarının medikal ozon jeneratörleri ile yüksek oranda voltajdan geçmesi (yüksek voltaj gradiyenti, 4000-14000V) ile oluşturulmaktadır (13).



Düşük frekans voltajda plazmik deşarjlı tıbbi ozon jeneratörünün ilkesi Şekil 1-2’de açıklanmaktadır. Burada tıbbi ozon seri bağlanmış iki yüksek voltaj tüpünden geçmektedir. Tüpler de yaklaşık 4000 ile 9000 V arasında değişen voltaja bağlıdır.

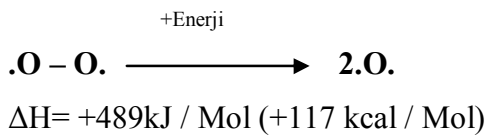
Enerji O₂ moleküllerinin oksijen atomlarına ayrışmasını sağlar. Atomlar var olan bir O₂ molekülüyle birleşerek O₃ molekülünü oluşturur. Fazla veya kullanılmayan ozon katalitik yolla yeniden oksijene dönüştürülür (12).

Tıbbi ozon teknik ozonun tersine, saf tıbbi oksijenden hazırlanır. Normal atmosfer havasının bu karışıma girmemesi gerekir. Çünkü ozon, havadaki NO₂ ile reaksiyona girerek toksik bir gaz olan nitrojen dioksit (N₂O₂)'i oluşturabilmektedir. Endüstriyel ozon için ise hava gazı kullanılabilir.

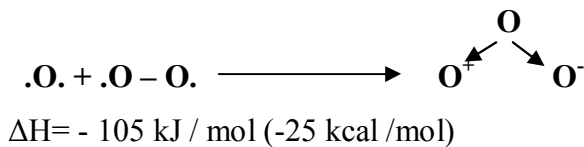
İstenen doz ve konsantrasyonda ozon/oksijen karışımı elde edilebilir. Konsantrasyon oranları, ozon/oksijen karışım oranlarına göre (%0.05 O₃-%5 O₃) 1-100 mikrogram/mililitre arasında değişir. Ozon molekülü sabit olmadığı için tıbbi biçimi her zaman taze olarak çalışma yerinde hazırlanır ve anında uygulanır (12). Ozonun saf olarak verilmesi oldukça tehlikeli olduğundan tedavi öncesinde mutlaka belli oranda oksijenle karıştırılmalıdır. Karışım içerisinde oksijen %95'den az ozon %5'ten fazla olmamalıdır. Ayrıca emboliye neden olmaması için ozon gaz olarak doğrudan damar içerisine verilmemeli, dışarıda kan ile iyice karıştırdıktan sonra infüzyon yapılmalıdır. Ozon ile temasta mutlaka ozona dayanıklı malzemenin (paslanmaz çelik, nötral cam ve teflon) kullanılması gerekir (2).

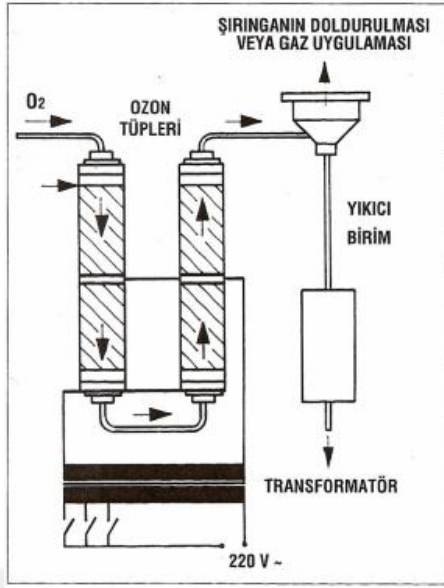
Ozon oluşturma işlemi sırasında aşağıdaki basamaklar gerçekleşir (12) (Bkz Şekil 1-2, Resim 1-1):

1. Oksijen molekülünün bir kısmı elektrikle muamele sonucunda ayrı ayrı oksijen atomlarına ayrışır:



2. Enerji yüklü atomlar bir başka oksijen molekülüyle reaksiyona girer, enerjilerini yitirir ve O₃ oluştururlar:





Şekil 1-2: Bir tıbbi ozon jeneratörünün işleyiş ilkesi



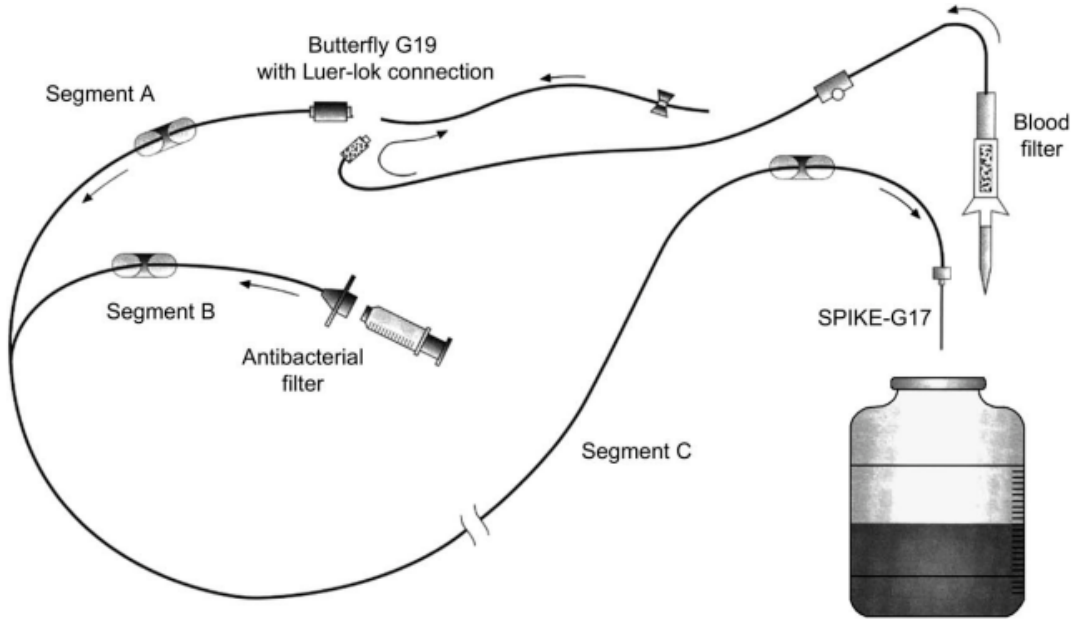
Resim 1-1: Ozon jeneratörü

1.1.4. OZON TEDAVİ YÖNTEMİ

Ozon tedavisi belirli bir miktarda oksijen/ozon karışımının vücut boşluklarına ya da dolaşım sistemine uygulanmasıdır; bu karışım intravenöz, intramuskuler, intraartiküler, intraplevral, intrarektal ve intradiskal uygulanabildiği gibi topikal de uygulanabilir (2).

Yapılan çalışmalarda ozonun terapötik konsantrasyonu 10-80 $\mu\text{g/ml}$ olarak belirlenmiştir. Bu ozon konsantrasyonu Rice-Evans'ın tarif ettiği total antioksidan kapasiteyi %25'den fazla düşürmediği gibi azalan antioksidanlar 20 dakika sonra eski haline gelmektedir (14,15). Son dekatta yapılan bazı çalışmalara göre; her bir mL kanda 10-80 $\mu\text{g/mL}$ aralıktaki ozon konsantrasyonlarının güvenilir olduğu tespit edilmiştir. 10 $\mu\text{g/mL}$ 'nin altındaki ozon konsantrasyonlarının suda çözünen güçlü antioksidanlarla hızlıca etkisi azaltılırken, 80 $\mu\text{g/mL}$ 'nin üzerinde olan seviyelerde ise vücuttaki antioksidan kapasiteyi aşır eritrositlere hasar verebileceği ve istenmeyen aşırı miktarda lipid oksidasyon ürünlerinin (LOP) oluşacağı belirtilmiştir (16,17).

Otohemoterapinin etkili olabilmesi için 2.5-4L kanın 30–60 gün içerisinde ozonlanması gerekir (18). Hastanın vücut ağırlığına göre önceden belirlenen miktarda (200–270 mL) G19 kelebek iğne ile antekubital venden kan alınır, vakumla cam şişe içerisine çekilir. Kan ile eşit hacimdeki ozon-oksijen gaz karışımı şişeye eklenerek karıştırılır. Ozonlama sırasında ozona dirençli cam şişe kullanılmalıdır, plastik kesinlikle kullanılmamalıdır. Çünkü plastik torba içine verilen ozon, kanın fitalat ve plastik mikropartiküllerle kontamine olmasına neden olur. Ozonlu gaz, farklı bir segmentten şişe içerisine aktarılır (Bkz. Şekil 1–3). Kan + ozonlu gaz 5 – 10 dakika boyunca köpük oluşumundan kaçınarak hafifçe karıştırılır. Karıştırma olayından sonra ozonlanmış kan 15 dakika içerisinde donöre tekrar verilir.



Şekil 1–3: Vakum altında ozona dayanıklı bir cam şişe ile ozonlu otohemoterapi gerçekleştirmek için gerekli bileşenlerin şematik çizimi (2)

1.1.4.1. Medikal Ozon Uygulama Biçimleri

1.1.4.1.1. Sistemik uygulama biçimleri

1.1.4.1.1.a. Major Otohemoterapi

Son 10 yılda MAH düşük riskli ozon uygulamalarının en önemli biçimi haline gelmiştir. “Ozon+kan” reaksiyonu hastanın vücudu dışında gerçekleşmekte; bundan sonra hastanın “kendi kanı” aktif alyuvar hücreleri ile re-infüzyona sokulmakta ve immuno-kompetan hücreler aktive olmaktadır.

Bu tedavide ilke olarak yalnızca tek kullanımlık steril malzeme kullanılır. Uygulama kapalı, basıncı alınmış bir sistem içinde yapılır. Ozonla çalışırken hijyenik anlamda hatasız yöntem kullanılmasına ek olarak, her zaman özel ozona dirençli malzeme kullanılmalıdır. Hastanın 50–100 ml kanı alınır, organizma dışında tam olarak doğru dozda ozon ile zenginleştirilir. Ozon/oksijen karışımı, kandan son derece ince kabarcıklar biçiminde geçirilir. Kan hastaya olağan biçimde, yani transfüzyon işlemlerinde tıbbi olarak önerilen hız olan dakikada 60–90 damla şeklinde verilir.

Major otohemoterapinin en önemli endikasyonları; arteriyel dolaşım bozuklukları, enfeksiyonlar, bağışıklık yetersizliğinden kaynaklanan hastalıklar, kanser hastalarının ek tedavisi, romatizmal hastalıklar ve eklem iltihaplarıdır (12,18–21).

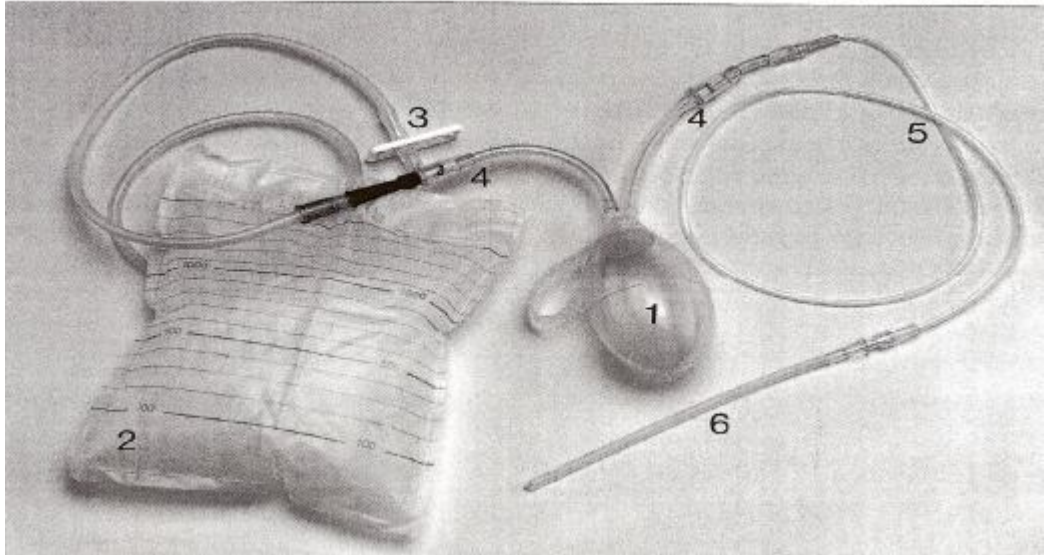
1.1.4.1.1.b. Minör Terapi

Ozonun bir diğer uygulama şekli olan minör hemoterapide ise hastadan alınan 5 ml kan ile aynı miktarda 80–100 µl/ml konsantrasyonundaki oksijen/ozon karışımı bir dakika inkübe edilir. Bu süre zarfında ozonun, yine aynı şekilde önce kanda çözünüp sonra da biyolojik moleküller ile reaksiyona girmesi beklenir. Sonrasında bu kan, gluteus kasına yavaşça enjekte edilir. Bu uygulama sonrasında kas içine enjekte edilen kanın doku derinliklerine ilerlerken pıhtılaşmasına rağmen hastalardan çok azı hafif şişme ve ağrıdan yakınmaktadır. Bu işlem esnasında anesteziye gerek yoktur. Tartışmalı olmakla birlikte, bu uygulamanın immünmodülatör bir etkisinin olduğu iddia edilmekte ve etki mekanizması şu şekilde açıklanmaktadır: Enjeksiyon yerinde hafif derecede steril inflamasyon meydana gelmekte, bölgeye nötrofil ve monositler gelerek

denatüre proteinleri ve parçalanmış eritrositleri fagosite etmektedir. Eğer kan içinde HCV, HBV ve HIV gibi virüsler var ise ozon 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 (18).

1.1.4.1.1.c. Rektal O₃/O₂ insüflasyonu

En eski sistemik ve lokal uygulama yollarından biri, ozon gazının rektal uygulanmasıdır (22). Sistemik etkileri açısından MAH'ye gerçek bir alternatif oluşturmuştur. Bu yöntemle yaklaşık 10–12 insüflasyonluk bir dizinin uygulanmasını takiben MAH'ın sonuçlarına benzer bir metabolik değişim (ATP artışı ve 2,3-Difosfogliserat (2,3-DPG)) elde edilir. Rektal insüflasyon, katetere bağlı ozona dirençli şırınga yardımıyla veya bir ozon konteyneri ile silikon doz çantası kullanılarak gerçekleştirilir. Kural olarak 150–300 mL ozon/oksijen karışımı tatbik edilir. Kapatma musluğu bulunan konteyner doğrudan jeneratörden doldurulur ve doz çantasına bağlıdır. 150 mL hacmi olan doz çantası bir tüp sistemi aracılığıyla katetere de bağlıdır. Doz çantasına giden ve gelen her iki hat açılmayan musluklarla emniyet altına alınmıştır (Bkz. Resim 1–2)



Resim 1–2: Belirli dozda O₃/O₂ karışımının rektal irigasyonu için kullanılan ekipman: 1. Doz balonu, 2. Ozon rezerv konteyneri, 3. Kapama musluğu, 4. Açma musluğu, 5. Bağlantı tüpü (Luer/Luer lock), 6. Kateter (sonda) (23).

Ampirik açıdan rektal insüflasyonun en fazla kanıtlanan endikasyonları; sistemik olarak MAH'de, özellikle de intravenöz reinfüzyonun damarların uygun olmaması nedeniyle uygulanamadığı yaşlı hastalar; topikal olarak bağırsaklarda proktit ve kolit gibi patolojik durumlar ve çocuklarda bir enfeksiyonun diğerini izlediği, bağışıklık sisteminde zaafiyet olan pediatrik enfeksiyonlardır (19,23,24).

1.1.4.1.2. Topikal Uygulamalar

1.1.4.1.2.a. Düşük basınçlı ozon gazı uygulaması

Düşük basınç terimi normal atmosfer basıncının altındaki değerler için kullanılmaktadır. Lokal olarak sınırlı yaralarda, ozon gazının düşük atmosferik basınçta ve bir emme kabı altında sürekli akışının olumlu etkisi daha önce yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (12). Burada ozon/oksijen karışımı plastik kap biçimindeki cihazdan sürekli olarak tedavi edilecek bölgeye akıtılır. Bölge daha önce suyla ıslatılır, O₃ geri çekilir ve kataliz aracılığıyla yeniden O₂'ye dönüştürülür. Basınç hastanın kendisini en az rahatsız hisseceği şekilde ayarlanır.

Basınç kişiye göre ayarlanabilir ve hastanın ihtiyaçlarını, lezyonun ciddiyetini esas alır. Uygulamanın özellikle dekübitis, radyasyon tahribatında ve fistüllerde yararlı olduğu bilinmektedir (12).

1.1.4.1.2.b. Transkutanöz ozon imersiyonu

Varis ülserleri ve geniş alana yayılan enfekte olmuş yaraların tedavisinde ozona dirençli plastik çanta ve/veya torbaların kullanılması pratik olmaktadır. Hem çanta hem torbalara uygun bir bağlantı parçası ve açma/kapama muslukları takılmıştır. Yara işlem öncesinde bol suyla yıkanır. Plastik çanta yara üzerine dikkatle yerleştirilir. Bir bandaj yardımı ile gaz kaçağı önlenir. Hava, önce açma/kapama musluğu kullanılarak çantadan çıkarılır ve belirlenmiş konsantrasyondaki ozon/oksijen karışımı ile doldurulur. Ülser veya yara bölgesinin 15 dakika boyunca karışım ile temas etmesi yeterlidir. Kalan atık ozon katalizör kullanılarak oksijene dönüştürülür ve solunum yoluyla ilgili her türlü sorun elimine edilmiş olunur (12,18,19).

1.1.4.1.2.c. Ozonize su uygulaması

Ozonize su yeni veya yakın zamanda yapılmış cerrahi müdahaleler de dahil olmak üzere enfekte olmuş her türlü yaraya karşı topikal uygulama için endikedir.

Ozonize su kompresler biçiminde uygulanabilir. Ozonize H₂O kompresleri, özellikle ödem oluşumu gibi inflamatuvar süreçlerin başlangıç aşamalarında, hızlı ve önemli ölçüde ağrı gidericidir. Lokal O₃ uygulaması hücrel metabolizmayı aktive eder, ATP'de artış sağlar ve lezyonun en yakınında olup da henüz üremeye yatkınlığını koruyan hücrelerin yeniden polarize olmalarına katkıda bulunur (12,18,19).

Kural olarak ozonize su çift damıtılmış sudan taze olarak hazırlanır. Bu suyun ml'si azami 20 µg ozon absorbe eder, oda sıcaklığında yarı ömrü yaklaşık 10 saattir. +4°C'de bu süre 5 güne çıkar, yani ozonize suyun evde kullanılması da mümkündür. Ozonize su tamamen güvenli bir maddedir. Pratik olarak herhangi bir gaz açığa çıkarmadığı için havaya ozon karışmaz. Bu tedavinin en önemli endikasyonları; yeni yaralar, enfekte yaralar, mantar enfeksiyonları, liken veya küfler, zona, herpes zoster, otitis eksternadır (21).

1.1.4.1.2.d. Topikal rektal insüflasyon

Sistemik etkisine ek olarak rektal ozon/oksijen gaz insüflasyonun lokal etkisinde kolit ve proktit tedavisinde önemli yer tutmaktadır (19,23).

1.1.4.1.2.e. İntraartiküler ozon enjeksiyonu

İntraartiküler ozon enjeksiyonunun başta diz ve omuz eklemleri olmak üzere akut ve kronik ağrılı eklem rahatsızlıklarında yararlı ve etkin olduğu kanıtlanmıştır.

En önemli endikasyonları; gonartrozis, akut omuz eklemleri sorunu, kısmi sınırlı hareket fonksiyonu, kronik omuz eklemi hastalıkları, ağrılı hareketlerin tedavisidir (24,25).

1.1.4.1.3. Ozonize edilmiş zeytinyağı

Doğrudan uygulanan ozonla karşılaştırıldığında, mantar ve bakteri öldürücü etkisi daha yavaş fakat uzun sürelidir. Mikroorganizmaların ozonize suda inaktivasyonu birkaç saniye iken, ozonize zeytinyağında içerdiği peroksidik ürünler nedeniyle aynı etki birkaç saat içinde gerçekleşir. Mantar ve bakteri öldürücü etkisi nedeniyle ozonize zeytinyağı başta yaygın fungoid/mikoid deri enfeksiyonları olmak üzere lezyonların lokal dezenfeksiyonu ve iyileştirilmesi için kullanılmaktadır (12,19,24).

1.1.4.2 Medikal Ozonun Etkisi

1–100 µg/ml konsantrasyon aralığındaki en saf oksijen ve en saf ozon karışımı olan medikal ozon, fizyolojik koşullarda yüksek derecede seçici reaktivite gösteren bir terapi ajanıdır.

Sistemik uygulamada medikal ozonun etkileri:

a. Alyuvar hücreleri

1. Reolojik özelliklerin gelişmesi.
2. RBC metabolizmasının aktivasyonu (2,3-DPG ve ATP artışı).
3. HbO₂/Hb dengesinin sağa kayması.
4. O₂ dağıtımında gelişim.

b. İmmüno-kompleman hücreler

1. Mononükleer hücrelerin ılımlı aktivasyonu.
2. Sitokinlerin serbest kalması (IL-1, IL-2, IFN-γ, TNF-α, TGF-β vb)

Lokal uygulamada medikal ozonun etkileri:

1. Antimikrobiyal etki.
2. Yaraları etkin ve hızlı temizleme etkisi.
3. Yara iyileştirmede gelişme ve hızlanma sağlaması.
4. Etkin bir bağışıklık sistemi harekete geçiricisidir (6,26)

1.1.4.3. Medikal ozon tedavisinin klinik endikasyonları

Ozonlu otohemoterapinin kullanıldığı 5 ana alan vardır ki bunlar; infeksiyöz hastalıklar, vaskular bozukluklar, immün sistemin baskılanması, dejeneratif hastalıklar ve ortopedik patolojilerdir (27).

1.1.4.3.a. Enfeksiyöz Hastalıklarda: Dezenfektan etkisi ve immün sistemi aktive etmesinin dışında savaş yaraları, anaerobik infeksiyonlar, ülserler ve yanıklarda da ozonlanmış bidistile su ve ozonlu yağ kullanılır. Apse, anal fissür, yatak yarası, fistül, mantar hastalıkları, gingivitis, osteomyelit, sinüzit, stomatit, vulvovajinit, iyileşmeyen bozuk yaralarda antibiyotiklere dirençli veya anaerobik bakterileri öldürmek için ozonlanmış solüsyonlar temizleyici etki ve güçlü dezenfektan olarak görev yaparlar (12). Son zamanlarda tedavide tıbbi maliyetlerin yükselmesi ve antibiyotiklere dirençli enfeksiyonların ortaya çıkmasıyla ozon tedavisinin ise çok ucuz olması ve kendisine karşı direnç gelişmemesiyle dikkatleri üzerine çekmiştir (27).

1.1.4.3.b. Vaskular Bozukluklarda: Oksijen dağılımının artması ve büyüme hormonunun daha fazla salınmasıyla birlikte iskemiyi azaltarak ve yara iyileşmesini artırarak faydalı etkileri olduğu görülmüştür. Kronik alt ekstremitelerde, şiddetli Raynaud's sendromunda, serebral ve kalp damar bozukluklarında ozonun etkisinin olduğu birkaç raporda sunulmuştur (28,29). Bunun mekanizması şöyle bildirilmiştir; eritrositlerdeki 2,3-DPG miktarı artarak oksihemoglobin disosiasyon eğrisini sağa kaydırır ve böylece periferde hipoksik dokulara O₂ dağıtımını artırır. Endotel hücrelerle yapılmış bir çalışmada ozona maruz kalan bu hücrelerde NO salınımının yüksek seviyede arttığı belirtilmiştir. Bu çalışmada NO'nin hem vazodilatasyonu sağladığı hem de ekstremitelerde iskemisi olan hastalardaki spontan ağrıyı aniden kestiği belirtilmiştir. Üstelik henüz tam olarak netleşme de iskemik alanlarda neoangiogeneze olduğu da iddia edilmektedir (23). Ekstremitelerde iskemisi olan hastalara ozon verildikten sonra ülserleşmiş dokuların iyileştiği gözlenmiştir. Bu da ozonlanmış heparinli kandaki plateletlerin Platelet Derive Büyüme Faktörü (PDGF) ve Değiştirici Büyüme Faktörü (TGF β1) salınmasına bağlanmıştır (29).

1.1.4.3.c. Baskılanmış İmmün Sistemde: Kronik viral hastalıklarda (30) ve kemoterapi yada radyoterapi sonrası kanserli hastalarda (31) baskılanmış immünsistemin tekrar aktifleştirilmesi için ozonlanmış otohemoterapi yapılmaktadır. Bununla ilgili sadece birkaç anekdot belirtilmiş olup kontrollerle yapılmış bir klinik çalışma mevcut değildir (31). Bu yaklaşım en çok da az terapötik avantajı olan, yaşam kalitesini kötüleştiren kemoterapi alan yaşlı hastalara cazip gelmektedir. Fakat immün sistemi tekrar aktifleştirmek için ne kadar ototransfüzyona ihtiyaç duyulduğu bilinmemektedir. Çünkü *ex vivo* olarak uyarılan mononükleer hücrelerin, vücuda verildikten sonra lenfoid dokulardaki baskılanmış lenfositlerin ne kadarını uyardığı net olarak bilinmemektedir. Yaklaşık 50 tedavi (her haftada 2 tedavi, toplam 6 ay tedavi) ancak 3×10^{10} hücreyi uyarabilmektedir (27).

1.1.4.3.d. Dejeneratif Hastalıklarda: Aşırı ve kronik oksidatif hasardan kaynaklanan kalıcı oksidatif stresle baş etmek için kısa süreli ozonlanmış hemoterapi uygulanması antioksidan/oksidan dengesinin tekrar oluşmasını sağlayabilir. Bitkiler (32,33), bakteriler (34), memeli hücresi (35), ratlar (36) ve insanlarda (37) yapılan çalışmalara göre bu canlılara verilen yüksek basınçlı O_2 ve düşük düzeyde O_3 , antioksidan yapıdaki enzimleri upregüle eder. Antioksidan savunmanın gelişmesiyle senil demans, Parkinson hastalığı, optik sinir disfonksiyonları ve makülopati gibi yaşlılığa bağlı oksidatif hasarla oluşan hastalıklarda faydalı olacağı bildirilmiştir (38). Orta seviyedeki ve tekrarlı ozon tedavisinin süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (KAT), glutasyon peroksidaz (GSH Px) enzimlerini artırdığı artık açıkça bilinmektedir. Kardiyak infarktüs, nörodejeneratif hastalıklar, HIV enfeksiyonu (30), makülopati gibi durumlarda yapılan MAH sonrasında eritrositlerde GSH Px, glukoz 6-fosfat dehidrogenaz (G6PDH), SOD gibi enzimlerde artış olduğu gözlenmiştir (27).

1.1.4.3.e. Ortopedik Hastalıklarda: Akut yada kronik eklem hastalıklarında (39), disk hernilerinde (40,41) dokulara küçük hacimlerde O_2 - O_3 verilmesine dayanan bir tedavi yöntemidir. Özellikle de artropati tedavi esnasında birkaç saniyelik acı olsa da yan etkilerinin olmadığı bildirilmiştir. Bunun yanında hastaların çoğunda ağrı kesici etki gösterdiği, dekonjesyon yaptığı, ödemin çekildiği ve hareketlilikte artış olduğu ifade edilmiştir.

Bir savunmaya göre (42) ozon, vücuttaki antioksidanları uyararak reaktif oksijen türlerini nötralize ettiği gibi sitokin antagonistlerinin ve/veya IL-10, TGFβ1 gibi immünsüpresif sitokinlerin salınmasını sağlar. İntradiskal ozon uygulamasında dejenere hücrelerin çekirdeklerinden kaynaklanan proteoglikanların yıkılmasını da artırarak hem ağrıya sebep olan herni materyalinin daha kolay reabsorbe olmasını hem de ağrının azaltılmasını gerçekleştirir (27).

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 makuler dejenerasyon, 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 (43,44).

Martinez-Sanchez ve ark. diyabetik ayak gelişmiş hastalarda yaptıkları çalışmada ozon tedavisinin etkinliğini değerlendirmişlerdir (45). 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. Ayrıca çeşitli derecelerde artrit ve artroz vakaları ile romatizmal hastalıkları da kapsayan ortopedik hastalıklarda da faydalı etkiler olduğunu rapor eden araştırmalar dikkat çekmektedir. Bir çalışmada lomber disk hernisi olan hastalara oksijen/ozon karışımı disk içine enjeksiyonla uygulanmış ve gerek hasta memnuniyeti gerekse medikal olarak yapılan değerlendirmede bu tedavinin yararlı olduğu görülmüştür (45).

Yine 2011 yılında yapılan bir çalışmada 8 hafta boyunca diyabetik ayak ülseri olan hastalara yapılan ozon tedavisinin etkin olduğu bildirilmiştir. Toplam 61 kişinin dahil olduğu bu çalışmada plaseboya karşın ozon tedavisinin etkisi gözlemlenmiş ve ozonlu tedavi alanlarda yara kapanmasında anlamlı fark olduğu rapor edilmiştir (46).

Tablo 1-1'de ozonun spesifik etkileri temelinde endikasyonları gösterilmektedir (27).

Tablo 1–1: Tıbbi ozonun spesifik (tıbbi ve fizyolojik) etkileri ve endikasyonları

Endikasyonlar	Etki mekanizması
Arteriyel dolaşım bozuklukları	Eritrosit metabolizması aktivasyonu O ₂ 'nin serbest kalma etkisi
Yüzeysel ülserler ve deri lezonları	Dezenfeksiyon Yara iyileştirme özelliği
Patolojik bağırsak sorunları (kolit, proktit, fistüller)	Dezenfeksiyon İmmüno-aktivasyon Anti-enflamatuvar etki
Enfeksiyonlar ve virüs kaynaklı hastalıklar	İmmüno-modülasyon
Karsinojenik durumlarda ek tedavi	İmmüno-aktivasyon
Geriatrik sorunlar	O ₂ 'nin serbest kalma etkisi İmmüno-aktivasyon Enzim aktivasyonu
Romatizmal hastalıklar (enflamatuvar durumlar, dejeneratif durumlar)	Anti-enflamatuvar etki Anti-oksidatif kapasitenin aktivasyonu İmmüno-modülasyon
Diş hekimliği	Dezenfeksiyon Yara iyileştirme özelliği

1.1.4.4. Medikal ozon tedavisinin yan etki ve kontrendikasyonları

Etkinin ortaya çıkması için ozon ile başlayan reaksiyonlarda oluşan SOR düzeyleri dikkatlice ayarlanmalıdır. Aksi takdirde yüksek düzeyde oluşan SOR, tüm biyomolekülleri oksitleyerek hücrel lipit, protein ve DNA'da ciddi hasarlara neden olabilir. Bu hasar ortamdaki demir (Fe⁺⁺) iyonu ile ozonla muamele sonucu oluşan H₂O₂'nin reaksiyona girmesi sonucu ortaya çıkan ve son derece toksik bir radikal olan hidroksil iyonundan kaynaklanır. İkincisi ise süperoksit radikalının nitrik oksit ile birleşmesi sonucu oluşan peroksinitrittir ve bu yapı tüm makromolekülleri hasarlayabilir. Buda gösteriyor ki ozondan beklenen yarar tamamen doz bağımlıdır. Bu nedenle ozon daima terapötik aralıkta kullanılmalı ve hücre içine ulaşmasına izin verilmemelidir (47).

Ozon tedavisinin direkt yan etkisi neredeyse yok denecek kadar azdır. Ancak uygulama hatalarından kaynaklanan yan etkilere rastlanılmıştır. Bu hatalar; ozona dayanıklı malzemelerin kullanılmaması, topikal uygulamaların kuru yüzeylere yapılması, yara tedavilerinde kullanılacak olan torbaların uygun boyutta kullanılmaması gibi nedenlerden kaynaklanmaktadır. En önemlisi ise intraarteriyel ya da intravenöz direkt gaz uygulaması ile emboliye sebep olarak ölüme yol açmasıdır (48).

Bazı durumlarda ozon terapisi uygulanması sakıncalı olabilir. Bu durumlar; G6PDH enzim eksikliği, özellikle erken dönem olmak üzere hamilelik, anjiyotensin çevirici enzim (ACE) inhibitörü tedavisi görenler, hipertiroidi, kanama bozukluğu, kontrol altına alınamayan kardiyovasküler hastalıklar ve ozona reaksiyon gösteren astım hastaları olarak sıralanabilir (49).

Atmosferde yüksek oranda ozon bulunması ise sağlık için oldukça zararlıdır. NO₂, asitli bileşikler, CO gibi moleküllerin olduğu ozonlu hava solunduğunda ozonun toksikolojik etkileri daha da fazla olacaktır. Çünkü solunum yolları mukozasında tampon çok zayıf, antioksidanlar ise az miktardadır (50). Ozonun bizzat sebep olduğu yan etkilerin yanı sıra, ABD popülasyonunun %40'ında görülen bronşiyal hastalıkları alevlendirerek ölüme de yol açtığı söylenmektedir (51). Troposferdeki anormal ozon konsantrasyonları ve sürekli olarak yüksek derecede toksik moleküllerin üretimi sonucu akciğer ve diğer vital organlarda hasarlar oluşmaktadır. Gohil (52) farelerle yaptığı çalışmalarda ozona yüksek maruziyetin nasıl etkilere sebep olduğunu göstermiştir. Farelere ardarda 3 gece boyunca 8'er saat, hava yoluyla uygulanan 1,0 ppm miktarındaki ozon gazı farelerde pek çok mekanizmada değişikliklere yol açmıştır. Bunlar; substans P, nitrik oksit (53), IL-1 β, IL-8 ve TNFα gibi proinflamatuvar sitokinler ve bazı pulmoner proteinlerde artış; yağ asitleriyle ilişkili; ve sitokrom P450 ailesinin de bulunduğu karbonhidrat metabolizmasıyla ilişkili hepatik enzimlerde azalma gibi etkilerdir (48). Ozonun atmosferdeki dozunun 10,0 ppm den fazla olduğu durumda ise 4 saat içinde öldürebileceğini ratlar üzerinde kanıtlamışlardır (54,55).

US Clean Air Act havada bulunan ozonun en fazla 0.06 ppm (120 µg/m³) olabileceğini aksi takdirde sağlığı bozacağını bildirmiştir. Bazı çalışmalarda çevredeki

ozon miktarının en fazla 90 ± 10 ppb olması gerektiğini ancak şehirleşmenin olduğu yüksek hava kirliliği olan bölgelerde bu rakamın 800'ü aştığı gösterilmiştir (56).

Pryor (1995)'un yaptığı bir çalışmada inhalasyonla alınan ozonun hücrelerin içine girmediği, alveolar sıvıdaki antioksidanları oksitlediği ve sürfaktanın yapısında bulunan PUFA'larla reaksiyona girerek hidrojen peroksitlerin ve çok sayıda çeşitli LOP'ların oluştuğunu bildiren bir rapor yayımlamışlardır. Hatta alveoloepitelyal sıvının yapısında bol miktarda bulunan kolesterol, ozonla etkileştikten sonra 3β -hidroksi-5-oks-5,6-sekokolestan-6-al adı verilen oksisterollere dönüşür. Bu molekülün Alzheimer hastalığına ve ateroskleroza sebep olduğu kanıtlanmıştır (57).

Solunan havada artan O_3 konsantrasyonuna bağlı olarak organizmada ortaya çıkan toksik durumlar Tablo 1-2'de gösterilmiştir (21,49).

Tablo 1-2: Solunan havadaki ozon gazı konsantrasyonu ile artan toksik etkiler

Havadaki O_3 konsantrasyonu (ppm)	Toksik etki
0.1	Üst hava yollarında irritasyon ve salgı artışı
1.0-2.0	Rinit, öksürük, baş ağrısı, bazen öğürme ve bulantı
2.0-5.0 (10-20 dk)	İlerleyici dispne, bronşiyal spazmi retrosternal ağrı
5.0 (60 dk)	Akut pulmoner ödem ve bazen respiratuvar paralizi
10.0	4 saat içinde ölüm
50.0	Dakikalar içinde ölüm

1.2. SERBEST RADİKALLER VE REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİ

Doğal olarak oluşan serbest radikaller, oksijen yada nitrojenle ilişkili eşleşmemiş elektronlar sebebiyle oluşur. Bunun klasik örnekleri; O_2^- (süperoksit anyonu), HO^\cdot (hidroksil radikali), ve $\cdot NO$ (nitrik oksit)'tir. Bu moleküller, hücre içerisinde bulunan metallere, oksidantlarla, redükantlarla girdikleri reaksiyonlar sonucu sadece bir kısmı serbest radikal olan çeşitli moleküllerin oluşumuna yol açarlar. Örneğin; $\cdot NO$, oksidatif geçiş metalleri ile formasyonu sonucu NO^+ (nitrozonyum iyonu), O_2^- ile interaksyonuyla $ONOO^-$ (peroksinitrit) gibi radikaller oluşturur.

Çeşitli patolojik ve non-patolojik süreçlerin başlatıcısı, ara basamaklarda olaylara dahil olan yada son ürün olan serbest radikaller, organizmada aerobik solunum sırasında mitokondride ve fagositlerde solunum patlaması gibi fizyolojik olaylarda da ortaya çıkar.

ROS ve reaktif nitrojen türleri (RNS)'nin major fonksiyonları, immünolojik savunma sisteminin sağlanmasıdır. Makrofajlar ve nötrofillerde teşekkül ederek bakterisidal, antiviral, anti tümör ajanlar olarak kritik rolleri vardır. RNS'nin bir diğer önemli görevi cGMP oluşumunu sağlayarak kan damarlarının basıncının ayarlanmasıdır (58).

1.2.1. Hücre içi mesajcılar olarak ROS ve RNS

Her geçen gün ROS ve RNS'nin ekstraselüler ligandlar ile hücre içi cevap oluşmasını sağladığı ve yaşamsal etkilerinin olduğu hakkında çok sayıda data bildirilmektedir. Serbest radikallerinin katıldığı hücre içi olayları 5 ayrı kategoride sınıflandırabiliriz;

1. Sitokin, büyüme faktörü ve hormon aktivasyonu ve sekresyonu
2. İyon transportu
3. Transkripsiyon
4. Nöromodülasyon
5. Apoptozis

Serbest radikaller ve bunlardan türeyen moleküllerin hücre fonksiyonundaki önemli rolleri Tablo 1-3'te gösterilmiştir (58).

Tablo 1-3: Serbest radikallerinin hücre fonksiyonlarındaki önemli rolleri

HücreFonksiyonu	Reaktif türler	Etki	Hücre/doku Tipi
Sitokin, büyüme hormonu, hormon aktivitesi ve sekresyonu	ROS	PDGF ilişkili tirozin fosforilasyonu, MAP kinaz aktivasyonu ve kemotaksis	VSMC
	ROS	Doku faktör protein ekspresyonu	Endotelial hücreler
	RNS, ROS	Sitokin-indüklenmiş siklooksijenaz-2 ekspresyonu	Mezenşiyal hücreler
	RNS	İnterlökin-1 protein ekspresyonu	Epitelial hücreler
	ROS	Makrofaj inflamatuvar proteini 1a mRNA indüksiyonu	Makrofajlar
	RNS, ROS	Kaşeksiye bağlı kas yıkımı	İskelet kası
	RNS	İnt-γ bağımlı VCAM-1, IL-1 bağımlı ICAM-1 uyarılması	VSMC
	ROS	TNFα ilişkili hap27 fosforilasyonu	Meme dokusu
	ROS	8-epi PGF _{2α} uyarılması	Monositler
	ROS	Lizofosfatidik asitle uyarılmış MAP kinaz aktivitesi	Epitelial hücreler
	ROS, RNS	MAP kinaz uyarılması	Çeşitli hücreler
	ROS, RNS	Tirozin fosforilasyonu	Fibroblastlar, lenfositler
	RNS	Siklooksijenaz aktivasyonu	Makrofajlar
	RNS	Nöroepinefrinle uyarılmış prostasiklin salınımı	Hipotalamus
	ROS	GMP140 ekspresyonu ve nötrofil adherensi	Endotelialyum
	ROS	TNFα ile uyarılmış, MCP-1 ve CSF-1 ekspresyonu	Mezenşiyal hücreler
	ROS	Protein kinaz c aktivitesi	Epidermal hücreler
	ROS, RNS	Renin salınımı	Böbrek
	ROS	EGF-1'de TGF-β indüksiyonu	Osteoblastlar

Sitokin, büyüme hormonu, hormon aktivitesi ve sekresyonu (Devamı)	ROS	Phorbol'le uyarılmış TNF- α , IL-1, IL-8 ekspresyonu	Monositler
	RNS	IgE bağlı sitokin üretimi	Keratinositler
	ROS	Histamin salınımı	Mast hücreleri
	ROS	Alloantijen'le uyarılmış T hücre aktivasyonu	Lenfositler
	RNS	PIP ₂ hidrolizi ve hücre içi Ca ⁺² salınımı	NIH-3T3 hücreleri
	ROS	TNF- α ve β FGF-uyarılmış c-fos ve c-jun ekspresyonu	Kondrositler
	RNS	Serotonin transportunda adenosin regülasyonu	RBL 2H3
	RNS	PDGF ile uyarılmış PGE ₂ salınımı	NIH-3T3 hücreleri
	RNS	Karbakol'ün negatif kronotropik etkisi	Kardiyak myositler
	RNS	İnsülin salınımıyla IL-1 β inhibisyonu	Adacık hücreleri
	ROS	Isı şok cevabı	Epitelyal hücreler
	ROS	Protein fosfataz aktivitesinin TNF/IL-1 inhibisyonu	fibroblastlar
	ROS	Hücre proliferasyonu	Böbrek hücreleri
	RNS	Lüteinleştirici hormon saliverici hormon sekresyonu	İn vivo, ex vivo
İyon transportu	RNS	Ca ⁺² bağımlı K ⁺ kanal aktivasyonu	İn vitro ve aort
	ROS	γ -ışınlarıyla uyarılmış K ⁺ kanalları	Salgı yapmayan hücreler
	RNS	CFTR Cl ⁻ aktivasyonu	T hücreleri
	ROS	Cl ⁻ kanalının G protein ilişkili inhibisyonu	Pariyetal hücreler
	RNS	Ca ⁺ kanal inhibisyonu	Ventriküler miyositler
	ROS	Riyanodin reseptörü	Sarkoplazma
			Devamı arkada

Transkripsiyon	RNS	Fe taşıyıcı proteinin İRE'ye bağlanması	Makrofajlar
	ROS	AP-1 bölgesine fos ve jun bağlanması	İn vitro
	ROS, RNS	NF-κB aktivasyonu	Lenfositler
	ROS	Hipoksiyle uyarılmış protein-1'in DNA'ya bağlanması	İn vitro
	ROS, RNS	OksiR, FNR aktivasyonu	Bakteri
	RNS	CREB aktivitesi	PC12 hücreleri
	ROS	TTF-1 aktivitesi	İn vitro
	ROS	NF1, USF, p53 aktivitesi	İn vitro
Nöromodülasyon	RNS	Kasılma ve L tipi Ca ⁺² akışı	Kardiyak myositler
	RNS	Işıklı uyarılmış faz ile biyolojik saatin başlaması	Suprakaryamatik nükleus
	RNS	Sinaptik bağlantıların formasyonu	Olfaktör reseptör nöronları
	RNS	Uzun süreli potansiyel artış	Hipokampus
	RNS	NMDA reseptör aktivitesi	Kortikal nöronlar
	RNS	Kalsiyumdan bağımsız sinaptik vezikül salınımı	Hipokampal sinaptozomlar
	RNS	Glutamat aktivasyonu	Serebellum
Apoptozis	ROS	Apoptozis ile ilişkili Down sendromu	Kortikal nöronlar
	ROS, RNS	Apoptozis için ana sinyaller	Çeşitli hücreler

VSMC: Vaskular düz kas hücreleri, **RBL:** Rat bazofilik hücreleri, **PC12:** Rat Feokromostoma hücreleri

ROS ve RNS'nin yukarıdaki tabloya göre davranışlarına birkaç örnek verecek olursak;

- Vaskular düz kas hücrelerinde yapılan bir çalışma, ROS moleküllerinin büyüme fonksiyonları üzerine etkisini iyi bir şekilde betimlemiştir. Burada PDGF'nin vaskular düz kas hücreleri üzerindeki reseptörlerine bağlandığı ve serbest radikal oluşumunu artırdığı gözlenmiştir. Ortama eklenen PDGF sonrasında hücre içi ROS miktarında artış olduğu belirtilmiştir. Antioksidan olan katalaz ve glutatyonun hücre içi seviyesinin artırılması, hücre içinde ROS oluşumunu önlediği bildirilmiştir. Ancak bu durumda serbest radikal yakalayıcıları PDGF ile indüklenen tirozin fosforilasyonunu, Mitojen-aktif Protein Kinaz (MAPK)

stimulasyonunu, DNA sentezini ve kemotaksisi de önlemiş olurlar. Böylece reseptörüne bağlanan PDGF, intraselüler ROS oluşumunu tetikliyor (59).

- Demir metabolizmasının düzenlenmesinde RNS'nin görevi ise şöyle bilinmektedir. NO sentaz ile oluşturulan RNS, akonitaz kümesine bağlanır. Bağlanma ile akonitaz enzimi, ferritinin mRNA translasyonunu inhibe eden bir RNA bağlayıcı protein olarak görev yapar (60).
- Damar düz kas hücrelerindeki iyon kanallarında Ca^{+2} bağımlı K^+ kanallarının eksojen yada endojen NO ile regüle edildiği bildirilmiştir (61).
- Sinir sisteminde sistein-NO (nitrosotiyol-RNSO)'un oluşumu ile Ca^{+2} bağımsız sinaptik veziküllerde, bir seri protein-protein etkileşimlerinin başlaması ile füzyonlar oluştuğu bildirilmiştir (62).

1.2.2. Reaktif Oksijen Türleri

Doğada sık bulunan oksidan ajanlardan bir kısmı şunlardır;

1. Radikal olanlar

- a. Süperoksid anyon radikali ($O_2^{\cdot-}$)
- b. Hidroksil (HO^{\cdot})
- c. Peroksil ($ROOH^{\cdot}$)
- d. Alkoksil (RO^{\cdot})
- e. Nitrik Oksit (NO)

2. Radikal Olmayanlar

- a. Azot Dioksit (NO_2)
- b. Hidrojen Peroksit (H_2O_2)
- c. Singlet Oksijen ($^{\cdot}O_2$)
- d. Ozon (O_3)
- e. Hipoklorik Asit (HOCl)
- f. Lipit Hidroperoksid (LOOH)
- g. Peroksinitrit ($ONOO^{\cdot}$) (63)

1.2.2.1.a. Süperoksid Radikali (O₂⁻)

Zayıf reaktif bir serbest radikal olan süperoksid anyonu moleküler oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucu meydana gelir. Süperoksid oluşumu özellikle mitokondri iç zarındaki solunum zincirinde elektrondan zengin aerobik ortamda spontan olarak gerçekleşir.

İki molekül süperoksit molekülü SOD tarafından hızla hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşür.

Organizmanın uzun süreli korumasız kalması bu maddelerin düşük konsantrasyonlarında bile biyolojik açıdan önemli moleküllerin tahribatı ile sonuçlanır ve DNA'da mutasyon ve doku hasarına yol açar.

Süperoksid radikali açığa çıktığı hücre bölümünden daha uzak yerlere diffüze olabilir. Ancak bu diffüzyon hücre içindeki SOD enziminin yüksek konsantrasyonu nedeniyle sınırlıdır (64,65).

1.2.2.1.b. Hidrojen Peroksid (H₂O₂)

Bütün elektronları çiftleşmiş olduğu için H₂O₂ gerçek bir serbest radikal değildir. Ancak; demir, bakır ve mangan gibi geçiş metalleri ile reaksiyona girerek hidroksil radikali oluşumuna yol açabildiğinden dolayı önemli bir oksidandır. Bu metallerin varlığında en önemli ROS olan hidroksil radikalının oluşumunu sağlar. Hidrojen peroksid DNA hasarı yapıcı etkisini hidroksil radikali aracılığı ile gösterir. Diğer önemli bir görevi de intraselüler sinyal molekülü olarak rol almasıdır.

Hidrojen peroksid oluşuktan sonra katalaz, glutatyon peroksidaz ve peroksiredoksinler adında üç enzim sistemi tarafından uzaklaştırılır (64,66).

1.2.2.1.c. Hidroksil Radikali (OH[·])

Biyolojik sistemlerde bulunan potansiyel olarak en güçlü oksidandır. Yarı ömrü çok kısa ve reaktivitesi çok yüksek olduğu için komşu moleküllerle hızla reaksiyona girer. Oluşması için ortamda geçiş metalleri gereklidir (64).

Hidroksil radikalının en önemli özelliği hücre membranlarına yakın oluştuğu zaman membran fosfolipidlerinin yağ asidi yan zincirlerine etki ile serbest radikal zincir reaksiyonunu başlatabilmesidir. Hidroksil radikali canlı hücrelerde bulunan bütün moleküllerle reaksiyona girebilmektedir (66). Lipit peroksidasyonunu başlatabilir, DNA iplikçiklerinde kırılmalara neden olabilir ve ayırım yapmadan hemen her organik molekülü okside edebilir (67).

1.2.2.1.d. Singlet Oksijen (¹O₂)

Enerji absorpsiyonu ile oksijenin paylaşılmamış dış elektronları değişerek aynı veya farklı orbitale yerleşebilirler. Uyarılmış haldeki bu oksijene singlet oksijen denir.

Karotenler, bilirubin, histidin, methionin, 2–5-difenilfuran, 1,4-diazbisikloalefan singlet oksijeni ortamdaki temizlerler (68).

Singlet oksijen DNA, RNA, proteinler, lipitler ve sterollerini kapsayan çok sayıda biyolojik hedeflerle reaksiyona girerek hücrede zararlı etkilere sebep olur (69).

1.2.2.1.e. Perhidroksil radikali (H₂O[·])

Düşük pH'da daha reaktif olan O₂^{-·} radikali protonlanarak kendisinden daha kuvvetli bir oksidan olan perhidroksil radikalini oluşturur (70).

1.2.2.1.f. Nitrik oksit (NO)

Renksiz ve son derece toksik bir gaz olan NO 20–30 saniyelik yarı ömre sahip bir serbest radikaldir. Yüzsüz ve lipofilik özellikte bir molekül olması sebebiyle membranlardan kolaylıkla geçebilir. Nitrik oksit pek çok biyomolekülle zayıf reaktivite göstermesine rağmen, diğer serbest radikallerle olan reaksiyonları oldukça

hızlıdır. Düşük konsantrasyonlardaki NO, vücutta düz kasların gevşemesinden, nöronal fonksiyonların düzenlenmesine; yara iyileşmesinden, enfeksiyonlara karşı immün yanıtın sağlanmasına kadar pek çok önemli fonksiyona sahiptir. Nitrik oksidin bu fonksiyonları fizyolojik homeostazın sürdürülmesi açısından büyük önem taşımaktadır. Bununla birlikte NO'in yüksek konsantrasyonlarda, çeşitli enzimlerin aktivitelerini inhibe ettiği ve lipid peroksidasyonunu indüklediği, antioksidanların azalmasına veya DNA'da mutasyonlara sebep olarak aynı zamanda sitotoksik etkilere sahip olduğu da gösterilmiştir (71).

1.2.2.2.a. İleri Oksidasyon Protein Ürünleri

Proteinler, oksidanlara maruz kaldıklarında birçok kovalent değişikliğe uğrar. Bu değişikliklerden bazıları serbest radikallerin protein molekülü üzerine direkt etkileri sonucu oluşabildiği gibi, bazıları da oksidasyon yan ürünlerinin proteinlere kovalent bağlanması ile meydana gelir. Proteinlerin radikal aracılı hasarı; elektron kaybı, metal iyon katalizli reaksiyonlar, lipidlerin otooksidasyonu ile başlatılabilmektedirler (72).

Protein oksidasyonunun yeni bir belirteci olan ileri oksidasyon protein ürünleri (Advanced Oxidation Protein Products = AOPP) ditirozin içeren çapraz bağlı protein ürünleri olarak tanımlanmaktadır. Bu maddelerin düzeyleri, protein oksidasyonunun göstergesi olan ditirozin ve ileri glikasyon son ürünü olan pentozidin düzeyleri ile korelasyon gösterdiği; fakat, lipid peroksidasyon belirteçleri ile korelasyon göstermediği belirtilmiştir (72–74)

1.2.2.2.b. Lipid Peroksidasyonu

Lipid peroksidasyonu, membranlarda bulunan poliansatüre yağ asitlerinin serbest oksijen radikalleri tarafından peroksitler, alkoller, aldehitler gibi çeşitli ürünlere yıkılması reaksiyonudur. Lipid hidroperoksitleri yıkıldığında çoğu biyolojik olarak aktif olan aldehidler oluşurlar. Bu bileşikler ya hücre düzeyinde metabolize edilirler veya başlangıçtaki etki alanlarından diffuze olup hücrenin diğer bölümlerine hasarı yayarlar, böylece birçok hastalığa ve doku hasarına sebep olurlar.

LDL'lerin oksidasyonla modifikasyonu ve lipid peroksidasyonunun son ürünleri sinyal iletim yollarında modülasyonla çeşitli hücrel işlemlere etki ederler. Oksidize LDL, oksisterol ve 4-hidroksinonenal (4-HNE) geniş çaplı araştırılmış ve hücre ölümlerinden hücrelerin çoğalmasına kadar her alanda görevlerinin olduğu bildirilmiştir (75).

1.2.2.2.c. Lipid peroksidasyonu ve hücre iletişimi

Lipid peroksidasyon, çeşitli kompleks enzimatik ya da non-enzimatik reaksiyonlarla fizyolojik ve patofizyolojik ürünlerin oluşmasını sağlar. PUFA'ların peroksidasyon ürünlerinden reaktif etkili olan aldehitler, 4-hidroksialkenaller olarak bilinirler. Bu aldehitler çeşitli hücre tiplerinde ve organlarda zararlı etkileri olduğu gibi bir o kadar da doz bağımlı, düzenleyici rolleri vardır. Ω -3 ve Ω -6 poliansatüre yağ asitlerinin non-enzimatik oksidasyonları ile 4-hidroksi-2E-heksenal (4-HHE) ve 4-hidroksi-2E-nonenal (4-HNE) oluşurken, enzimatik oksidasyonla ise 4-HNE ve 4-hidroksi-2E,6Z-dodekadienal (4-HDDE) aldehitleri oluşur. 4-HDDE özellikle araşidonik asitten 12-lipoksijenaz (LO) yoluyla üretilirken, 4-HNE ise araşidonik asitin, linoleik asitin ve diğer Ω -6'ların 15-lipoksijenaz yoluyla peroksidasyon ürünüdür (76).

Hücrel iletişim, hücre yüzeyindeki moleküllerin ekspresyonu ile gerçekleşir. Bu iletişimler hücre hücre etkileşimi ya da direkt olarak hücre dışı ortama salınma ile meydana gelir. Birincil mesajcı olan bu stimuluslar kimyasal yapılarda olup biyolojik bilgiler taşırlar. Sinyal üreten hücreler tarafından sentezlenip salınırlar ve sinyal oluşturmak için hedef hücredeki reseptörlerine bağlanarak spesifik cevaplar oluştururlar. Sinyal moleküllerin yapısını proteinler, aminoasitler, steroidler, yağ asitleri ve NO gibi gazlar oluştururlar (75).

1.2.2.2.d. Okside lipidler ile sinyalleşme

Okside LDL'ler (OxLDL), endotelial ve düz kas hücrelerinde cAMP (A-kinaz) ya da inozitol fosfat yolu ile hücre içi iletişim kaskadını başlatarak sitoplazmik kalsiyum seviyelerini artırır (77). Bunun dışında membrana bağlı enzimlerdeki etkisi, protein kinaz c yolundaki elementlerin uyarılması, tirozin fosforilasyonunu indüklemek ve epitelyal growth faktör reseptörünün (EGFR) aktifleşmesidir (78).

OxLDL'nin aterosklerozda gözlenen hücre büyümesine, farklılaşmasına ve proliferatif cevaba neden olan gen ekspresyonunu artırması, nükleer transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu ile gerçekleşir. OxLDL'ler c-Jun NH₂-terminal kinaz (JNK) ve ekstraselüler sinyal düzenleyici yollar (ERK) ile fibroblastlarda, düz kas hücrelerinde ve epitelyal hücrelerdeki Aktivatör Protein-1'in (AP-1) DNA bağlı aktivitesini stimüle eder (79).

Tontonoz ve ark. ve Nagy ve ark., oxLDL'nin reseptörlere bağlanıp Peroksizom Proliferatör Aktive Reseptör (PPAR)'ı aktive ettiğini gösterdiler. Myelositik hücrelerde PPAR:reseptör heterodimer aktivasyonu, yakalayıcı reseptör CD36'nın upregulasyonunu indükler. CD36 ise oxLDL alımını teşvik eder (80,81).

Dahası LDL'deki lipit parçacıklarının oksidatif modifikasyonları, PPAR'ın etkin aktivatörlerinin üretimini sağlar. Böylece yüzeyel bir reseptörün işaretlenmesiyle, nükleer bir reseptör uyarılmış olabilir (80).

OxLDL'ye bağlı biyolojik cevaplar lipit peroksidasyon türevleri ile ilişkilidir. Kalsiyum, trimerik G-proteinleri ve cAMP, fosfolipaz C ve D, protein kinaz C ve MAPK kaskadını kapsayan sinyal yollarına müdahale edebilirler (82).

1.2.2.2.e. Okside steroidler ile sinyalleşme

Düşük dansiteli lipoproteinler içeriğinde hücre ölümünden gen ekspresyonuna kadar varan çeşitli patolojik yollara katılan aldehitlerden ayrı olarak çok sayıda okside lipit ürünleri bulundurur. LDL'nin major komponentlerinin oksidize türevlerinden kolesterol, kolesterol esterleri gibi moleküller, aterosklerotik plaklarda bulunarak patolojiyle ne kadar ilgili olduğunu gösterir (83).

Normokolesterolemik hayvanlarda total plazma kolesterolünün %3-5'i oksisterol iken, hiperkolesterolemik hayvanlarda bu oran %60-70'e kadar çıkabilir. oxLDL'lerden elde edilen oksisteroller alınıp insan promonositlerine ekildiğinde, hücreler gen ekspresyonunda olası etkisi olan fibrojenik sitokin TGF β 1'in üretimini artırır. Bu ihtimal 25-hidroksikolesterol'ün düz kas hücrelerinde fibroblast growth hormonun mRNA transkriptini artırması ile gösterilmiştir (84).

1.2.2.2.f. Lipid peroksidasyon son ürünü olan aldehidler ile sinyalleşme

Lipid peroksidasyonu sonucu oluşan en sitotoksik ürün aldehidlerdir. 4-hidroksialkenaller ise aldehitlerden biyokimyasal aktivitesi olanlardır. Hayvan dokularında hidroksialkenallerin en temsilcisi 4-HNE'dir. Bu aldehit, linoleik asit ve araşidonik asitin oksidasyonundan türer. Bir çalışmada 4-HNE verilen fibroblastların, internükleozomal DNA fragmentleri gözlenerek ve ayırıcı boyama yapılarak, apoptotik ölüme gittikleri belirlendi. Elde edilen bu veriler, lipid-peroksidasyon türevi ürünlerin genleri etkileyerek, programlanmış hücre ölümlerine sebep olduğunu gösterir. 4-HNE bağlı modifikasyonlar, oksidatif strese karşı adaptif koruyucu cevaptan irreversible hücre hasarı ve hücre ölümüne kadar çok sayıda hücrel cevabı uyarır (85).

Yukarıda bahsedilen 25-hidroksikolesterol gibi, uyarılmış lipid peroksidasyon ya da kültür hücrelerine (rat karaciğeri) verilen uyumlu düzeyde 4-HNE de hücrelerde gen ekspresyonunu ve fibrojenik transforming growth hormon sentezini ayrıca kollagen üretimini artırdığı kanıtlanmıştır (86). Hem TGF β 1 hem de kollajen tip 1 genleri promotör bölgelerinde kendi ekspresyonları için AP-1* transkripsiyon faktörünün bağlanmasına uygun konsensus sekansları bulundurur (87). Bu da gen ekspresyonunda aldehitin etkisini gösterir.

Bu koşullara göre aldehitler apoptozisin ateşlenmesini, MAPK yolu ile iletişimi, AP-1 bağlanmasını ve NF-B aktivasyonunun karartılmasını gerçekleştirir. Mitojen aktive protein kinazlar ve çeşitli kaspazlar çok çeşitli hücre tiplerinde strese bağlı

* AP-1; Hücre büyümesinin, farklılaşmasının, proliferasyonunun ve apoptozisinin düzenlenmesinde görevli bir transkripsiyon faktörüdür. Homo- ve heterodimer yapısında olan AP-1, growth hormon, sitokinler ve hücrel stres ile aktiveleşir. Aktifleşme mekanizmasında MAP kinazlar c-jun ve c-fos proteinlerini fosforilleyerek transkripsiyonel aktif hale getirir. Bu proteinler de AP-1 transkripsiyon faktör kompleksi oluşmasını sağlar. Buradan sonra sitokrom c'nin aktiveleşmesiyle apoptozis kaspazı başlar (148). Uchida ve ark. yaptığı bir çalışmaya göre rat KC'inin epitelyal RL34 hücrelerinde, 4-HNE'nin JNK fosforilasyonunu artırdığı gözlemlenmiştir (149). 4-HNE'nin gen modülasyonu yaptığı en çarpıcı kanıtı hücre kültürlerine verilen 4-HNE'nin hücre içine girdikten sonra hızlıca nüklele ile kaplanması ve ardından AP-1 bağlayıcının artmasıdır.

apoptozisi uyarır. 3T3 fibroblastlarda 4-HNE ile oluşan apoptotik cevabın nasıl olduğunu görmek için Kutuk ve ark MAPK ve kaspaz aktivasyon yollarını gözlemlemiştir (75). Buna göre 4-HNE: JNK1/2 ve p38 yolakları ve de ERK1/2'yi uyarak apoptozis için erken aktivasyonu gerçekleştirmiş olur.

1.2.2.2.f.1. Aldehidlerden 4-HNE

4-HNE, Ω -6 PUFA'ların peroksidasyonu ile oluştuğu keşfinden itibaren hidroksialkenaller araştırmalarında hüküm sürdü. Yıllarca sitotoksik oluşu ve hücre sinyalizasyonu hakkında yayınlar yazıldı (79,88,89,90,91). 4-HNE'nin katıldığı hücre sinyalizasyonunu sağlayan yolaklar başlıca c-Jun NH₂-terminal kinase (JNK), p38 mitojen-aktive protein kinazlar (p38 MAPK)'dır (92, 93). 4-HNE bağlı modifikasyonlar, oksidatif strese karşı adaptif koruyucu cevaptan irreversibl hücre hasarı ve hücre ölümüne kadar çok sayıda hücrel cevabı uyandırır. Niki ve ark. nontoksik seviyelerdeki 4-HNE'nin PC12 hücrelerinde NF-E2-ilişkili transkripsiyon faktör-2 (Nrf2)'ün aktivasyonu aracılığıyla antioksidant enzimlerde artış olduğunu göstermiştir. Ancak tersine, Poli ve ark. (94) 4-HNE bağlanmasıyla çeşitli enzimlerin (oksidoredüktazlar, transferazlar, hidrolazlar, liyazlar ve izomerazlar) , membran proteinleri (taşıyıcılar, reseptörler, iyon kanalları) ve iskelet proteinlerini inhibe ya da inaktive ettiğini lileri sürmüştür. Örneğin; 4-HNE'nin tiyoredoksinle modifikasyonu sonucu, tiyoredoksinin antioksidan özelliği azalır ve reaktif oksijen türevleri çoğalır (95). Tiyoredoksinler, ditiyol-disülfit aktif bölgesi bulunduran antioksidan yapıda olan oksidoredüktaz enzimlerdir. Bir diğer örnek, in vitro olarak ortama eklenen 4-HNE'nin glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enziminin lizin rezidüsüne bağlanarak enzimi inaktive eder (96). Bazı çalışmalarda ise ortamdaki 4-HNE'nin direkt olarak kaspaz-3 ile etkileşimi sonucu β -hücrelerin apoptozise gittiği kanıtlanmıştır (97).

4-Hidroksialkenallerde bulunan α,β -ansature karbonil, Michael reaksiyonuna göre nükleofillerle, Schiff baz formasyonuna göre ise proteinler, fosfolipidler, DNA ile reaksiyona girer. Proteinlerdeki histidin, lizin ve sistein 4-HNE ile reaksiyona giren aminoasitlerden olup histidin diğer aminoasit konjugatlarından daha kararlı olur. (98,99). Bacot ve ark.'a göre 4-HNE ve 4-HDDE, membranlardaki etanolamin

fosfolipidlerle ilgili olup, hem membranöz lipidler hem de proteinler (reseptörler, adaptör proteinler, taşıyıcı proteinler, ve kanallar) bu moleküllerin ana hedefidir (100).

HNE ile etkileşime giren hücreler stresle baş edebilmek için çeşitli antioksidan yapıdaki enzimlerinin sentezinde upregulasyon yaparlar, bu enzimler; γ -glutamat sistein ligaz, γ -glutamilttransferaz, γ -glutamil transpeptidaz, hem oksijenaz-1 (HO-1) ve diğer antioksidan enzimlerdir (101).

HNE' yi metabolize eden, oksitleyici etkisini minimize eden enzimler ise glutatyon S-transferazlar, aldoketoredüktazlar, aldoz redüktazlar, aldehid dehidrogenazlar, Sitokrom P450 4A ve β -oksidasyon enzimleridir (102).

1.2.3. Antioksidan Moleküller

Antioksidan moleküller pek çok özelliklerine göre sınıflandırılabilirler. Tablo 1-4'te ise yapılarına, kaynaklarına, çözünürlüklerine, yerleşimlerine göre gruplandırılmışlardır.

Tablo 1-4: Antioksidan moleküllerin sınıflandırılması

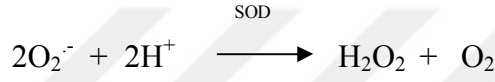
Yapılarına göre	a. Enzim karakterli antioksidanlar
	b. Enzim karakterli olmayan, küçük moleküller
Kaynaklarına göre	a. Organizmaya ait olanlar (endojen antioksidanlar)
	b. Dışardan alınanlar (eksojen antioksidanlar)
Çözünürlüklerine göre	a. Suda çözünenler
	b. Lipitlerle çözünenler
Yerleşimlerine göre	a. Hücre içinde bulunanlar
	b. Plazma ve diğer ekstraselüler sıvılarda bulunanlar

(Yalçın AS. Antioksidanlar. Klinik gelişim 1998'den alınmıştır)

1.2.3.1. Enzim Karakterli Antioksidanlar

1.2.3.1.a. Süperoksid Dismutaz (SOD, EC 1.15.1.1.)

Oksijeni metabolize eden bütün hücrelerde bulunan SOD, süperoksitin H_2O_2 dismutasyonunu katalizleyen bir metalloenzimdir. Bu enzim endotel hücreleri ile düz kas hücreleri arasında bol miktarda bulunan en önemli antioksidan enzimlerden birisidir. Normalde damar duvarında süperoksit radikallerini detoksifiye ederek lipid peroksidasyonunu ve ateroskleroz gelişimini önler. Hücrede serbest oksijen radikalleri oluşurken ilk basamakta $O_2^{\cdot -}$ meydana geldiği ve SOD enzimi bu radikalın dismutasyonunu sağladığı için, hücre içindeki ilk savunma sistemini bu enzim oluşturmaktadır (103).



SOD'un diğer bir görevi de serbest radikalleri inaktive ederek dehidratazları korumasıdır.

Mangan içeren dismutaz (Mn SOD),

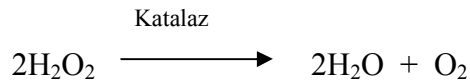
Bakır ve Çinko içeren dismutaz (Cu/Zn SOD),

Ekstrasellüler dismutaz (EC-SOD),

Nikel içeren dismutaz (Ni-SOD) olmak üzere dört çeşit SOD tanımlanmıştır (104).

1.2.3.1.b. Katalaz (KAT, EC 1.11.1.6.)

Katalaz 60 kDa ağırlığında dört aynı yapıda tetrahedral subunitler içeren hem-enzimdir. Süperoksid dismutaz aracılığıyla oluşan hidrojen peroksit bir radikal olmamasına karşın, en reaktif ROS olan HO^{\cdot} radikalının öncüsü olduğu için birçok ROS'dan daha fazla oksidatif hasara neden olur. Katalaz hidrojen peroksiti su ve moleküler oksijene parçalar. Ayrıca, hidrojen peroksitin yanı sıra metil-, etil-hidroperoksitler gibi küçük molekülü lipid hidroperoksitleri de indirger.

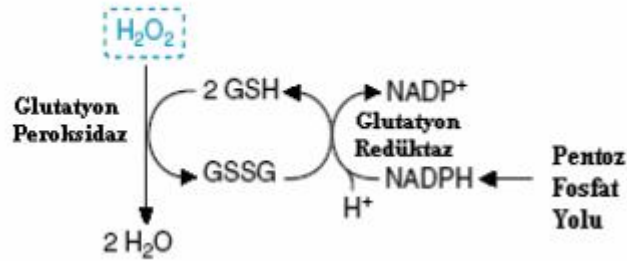
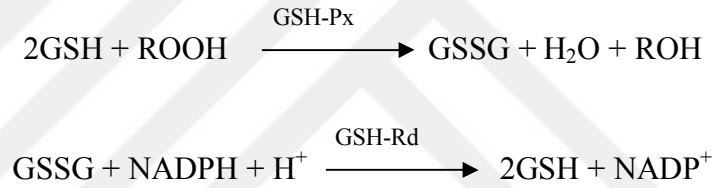


Katalaz, peroksizomlarda yerleşmiş olup kan, kemik iliği, muköz membranlar, karaciğer ve böbrekte yüksek miktarlarda bulunmaktadır (105).

1.2.3.1.c. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px, EC 1.11.1.9.) ve Glutasyon Redüktaz (GSH-Rd, EC 1.6.4.2)

Glutasyon peroksidaz, glutasyon tarafından hidroperoksitlerin (ROOH ve H₂O₂) indirgenmesini sağlayarak, memeli hücrelerini oksidatif hasara karşı koruyan selenyum içeren bir enzimdir (105). GSH-Px, hücrenin mitokondri (%30) ve sitozol (%70) fraksiyonlarında lokalizedir ve yalnızca lipid hidroperoksitlerini metabolize edebilmektedir. Glutasyon peroksidaz eritrositlerde oksidan strese karşı en etkili antioksidandır (106).

Glutasyon redüktaz flavin adenin dinükleotid (FAD) içerir, NADPH'tan bir elektronun GSSG (oksidize glutasyon)'nin disülfid bağlarına aktarılmasını katalizler. Bu nedenle NADPH serbest radikal hasarına karşı gereklidir ve major kaynağı pentoz fosfat yoludur (107). Glutasyonun redoks döngüsü Şekil 4'te gösterilmiştir.



Şekil 1-4: Glutasyon redoks döngüsü

1.2.3.1.d. Glukoz 6 Fosfat Dehidrogenaz (G6PD, EC 1.1.1.49)

Glukoz 6 Fosfat Dehidrogenaz (G6PD), pentoz fosfat yolunun ilk ve hız sınırlayıcı enzimi olup intrasellüler β-nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH)'in da başlıca kaynağıdır. Üretilen NADPH ise serbest radikallerin

detoksifikasyonunda rol oynayan GSH-Px enziminin aktivitesi için gerekli olan indirgenmiş GSH sağlamaktadır.

Diğer taraftan G6PD'nin vasküler endotel hücreler ve düz kas hücrelerinde de serbest radikallere karşı koruyucu olduğu gösterilmiştir. Ayrıca G6PD'nin vasküler endotel hücrelerde NADPH'ı kofaktör olarak kullanan endotel nitrik oksit sentaz (eNOS) enziminin aktivitesi için de gerekli olduğu ve eksikliğinde eNOS'ın yeterli aktivite gösteremeyerek süperoksit radikali üretmeye başladığı ve sonuçta LDL oksidasyonunun tetiklenebileceği bildirilmiştir (107).

1.2.3.1.e. Paraoksonaz (PON-1, EC 3.1.8.1)

Paraoksonaz, adını bir organofosfat olan paration'un vücuttaki aktif metaboliti olan paraoksonu hidrolize etmesinden almıştır. PON lipit peroksidasyonunu azaltır, LDL ve HDL'yi oksidasyondan korur ve bu özelliği ile ateroskleroz riskini de azaltmış olur. Oksidatif stres altında sadece lipoproteinler değil hücrenin yapısındaki lipidler de lipid peroksidasyonuna uğramaktadır. Paraoksonaz lipid peroksidasyonunun ateroskleroz etkilerini nötralize eder, hücre membranlarına koruyucu etki gösterir. LDL oksidasyonu esnasında oluşan okside fosfolipidlerden okside kolesterol esterleri, lizofosfatidilkolinler PON1 enzimindeki serbest sülfidril grubu ile (Sistein 284'deki) etkileşime girer ve enzimin inaktive olmasına yol açarlar.

Enzimin aktivitesi kalsiyuma bağlıdır. Kalsiyum, enzimin hem aktivitesi hem de stabilitesi için gerekmektedir. Direkt olarak katalitik reaksiyonda yer alarak veya aktif alanın uygun konformasyonda tutulmasını sağlayarak aktif alanın korunmasında görev alır.

Paraoksonazın bir özelliği hidrofobik N terminal sinyal peptidi bölgesinin olmasıdır. N terminal bölgesi aracılığıyla HDL'deki fosfolipidlere bağlanır. PON1'in fosfolipidlere bağlanması ve stabilizasyonunda Apo A1 rol oynar.

HDL yapısında bulunan PON1 enzimi, Minimal Modifiye LDL (MM-LDL)'deki aktif lipidleri yıkar ve böylece arter duvarında yer alan hücrelerde inflamatuvar cevap oluşumuna karşı koruyucu etki gösterir.

Paraoksonazın, HDL'yi oksidasyondan koruduğunu gösteren çalışmalarda saflaştırılmış PON1'in HDL'ye eklenmesi ile doza bağımlı olarak oksidasyonun lag fazının uzadığı, HDL'de lipid peroksit ve aldehit birikiminin %95'e kadar azaldığı gösterilmiştir (109).

1.2.3.1.f. Arilesteraz (ArEs, EC 3.1.1.2)

Paraoksonaz ayrıca aktivite polimorfizmi göstermeyen arilesteraz aktivitesine de sahiptir (7). Arilesteraz aktivitesinin, PON1 aktivitesindeki değişikliklerden bağımsız olarak asıl protein konsantrasyonunun bir göstergesi olduğu bildirilmektedir (110).

PON-1, hem paraoksonaz hem de arilesteraz aktivitesine sahip, kalsiyum bağımlı bir ester hidrolazdır. Başlıca karaciğerde sentezlenip dolaşıma salınan serum paraoksonaz-1 (PON-1) enzimi, organofosfatlar, arilesterler ve laktonlar dahil bir çok substrat üzerine hidrolitik etkiye sahip bir proteindir (111).

1.2.3.2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar

1.2.3.2.a. Antioksidan vitaminler

Yağda çözünen vitaminler içerisinde önemli yere sahip vitamin E, özellikle membran ve lipoproteinlerin bileşenleri üzerinde zincir kırıcı antioksidan etkiye sahiptir. α -Tokoferol, vitamin E türevleri içerisinde en aktif bileşiktir ve zincir reaksiyonları ile ilişkili peroksil radikalini temizleyerek lipid peroksidasyonunu engeller (112).

Askorbik asit (vitamin C) glukoz metabolizmasından gelen, suda çözünen vitaminler grubundandır. Askorbik asit, bir elektronunun oksidasyonu sonucu monodehidro askorbil radikaline dönüşürken, reaksiyona girdiği radikali de etkisiz hale getirerek serbest radikallerin organizmaya verdiği zararı engeller (112).

1.2.3.2.b. Karotenoidler

Karotenoidler (β -karoten, Likopen, Zeaksantin, Lutein, Violaksantin), genelde sarı ve turuncu renkli bileşikler olup bazı bakteriler ve alglerde, çoğu zaman ise bitkilerde bulunan pigmentlerdir. Organizmada triplet uyarıcıların zararlı etkilerini baskılama, singlet oksijeni baskılama ve bazı oksijen radikallerini temizleme gibi koruyucu etkilere sahiptir. Karotenoidler lipit membranlara lokalize olarak membranların oksidatif strese karşı hassasiyetini azaltır (113).

1.2.3.2.c. Glutasyon (GSH)

Glutasyon glutamik asit, sistein ve glisinden oluşan bir tripeptit olup antioksidan ve indirgeyici bir ajandır. Organizmada temel olarak peroksidaz aracılı peroksitlerin katabolize edilmesi, hücreyel tiyol ve redoks potansiyelinin düzenlenmesi, bir nörotransmitter veya immünofarmakolojik tiyol görevi üstlenerek endokrin ve immün sistem arasındaki etkileşimin sağlaması, redoksa duyarlı transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonunun artırılarak strese cevabın aktivasyonu gibi görevler üstlenir (114).

1.2.3.2.d. Ürik asit (Ürat)

Ürik asit ksantin oksidazın oksipürinleri (ksantin, hipoksantin gibi) oksitlemesi ile oluşur. İnsanda pürin metabolizmasının son ürünüdür. Fizyolojik koşullarda singlet oksijen, hipoklorit ve hidroksil radikali gibi reaktif bileşikleri baskılar; fakat süperoksit radikali ile doğrudan reaksiyona girmez. Ürik asidin antioksidan etkili olduğunun göstergesi peroksit kaynaklı lipit peroksidasyonuna karşı koruyucu olmasıdır (115).

1.2.3.2.e. Bilirubin

Hem katabolizmasının son ürünü olan bilirubin aynı zamanda singlet oksijen, peroksinitrit ve hipokloröz asit gibi reaktif oksijen ve nitrojen türevlerini baskılar; bununla birlikte peroksil radikallerine karşı hidrojen donörü olarak davranarak lipit peroksidasyonunun zincir devam ettirici radikalini de etkisiz hale getirir (114).

1.2.3.2.f. Melatonin

Hidroksil radikali, hidrojen peroksit, peroksil radikali, singlet oksijen, nitrik oksit ve peroksinitrit anyonu gibi reaktif türlerin temizlenmesinde veya baskılanmasında etkilidir (114).

1.2.3.2.g. Seruloplazmin

Plazmada bakır taşıyan seruloplazmin, demir metabolizmasında da rol oynamaktadır. Seruloplazmin ferooksidaz aktivitesine sahiptir. İki değerlikli ferro demiri, üç değerlikli ferri demire oksitler. Seruloplazminin ferooksidaz aktivitesi demir iyonuna bağlı lipid peroksidasyonunu inhibe eder. Seruloplazminin antioksidan aktivitesi: ferooksidaz aktivitesi, askorbat oksidaz aktivitesi, oksijen radikali temizleyici aktivitesi ve GSH-bağımlı perooksidaz aktivitesi şeklinde dört farklı yolla gerçekleşir (116).

1.2.3.2.h. Transferrin

Transferrin plazmada bulunan demir bağlayıcı bir glikoproteindir ve demirin uyardığı serbest radikal oluşumunu önleyen bir antioksidandır (114).

1.2.3.2.i. Ferritin

Dolaşımdaki serbest demiri bağlayarak serbest radikal reaksiyonlarına kolayca girmesini önleyen bir proteindir (114).

1.2.3.2.j. Tiyol grubu içeren moleküller

Tiyol terimi -SH grubu içeren bileşikler gösterir. Plazma tiyolleri, fizyolojik olaylar üzerinde prooksidan veya antioksidan etkilere sahiptir; ama genel olarak antioksidan olarak kabul edilirler. Tiyollerin anti- veya prooksidan etki gösterip göstermeyeceği oksidan stres, fizyolojik koşullar ve sülfür içeren aminoasitlerin ortamdaki konsantrasyon düzeyi tarafından belirlenir. Plazmada bulunan antioksidanlar içerisinde, tiyol gruplarının en yüksek konsantrasyona sahip olması, erişkinlerde plazma protein seviyelerinin yüksek olmasıyla açıklanmaktadır. Plazmada bulunan tiyol gruplarının başlıca kaynağı, redükte glutatyonun yanı sıra, başta albümin

olmak üzere protein yapılarında bulunan sistein ve metiyonin amino asitleridir. Bu tiyollerdeki -SH grubunun oksidatif strese karşı koruyucu öneminin olduğuna inanılır. Tiyoller, Cu^{+2} veya Fe^{+3} 'i direkt olarak radikalleri tutabilen Cu^{+1} ve Fe^{+2} 'ye kendileri disülfite okside olarak indirgeyebilir. Bu indirgenmiş metal iyonları bir süperoksitle reaksiyona girerek yine yükseltgenebilir. Plazma tiyol düzeylerinin tayini, proteinlerin ROS aracılı oksidasyondan ne denli etkilendiklerini göstermesi bakımından önem taşımaktadır (117).

1.2.3.3. Total Antioksidan Durum

Antioksidan kapasite biyolojik sistemlerdeki dört genel antioksidan kaynağını açıkça ortaya koymaktadır.

1. Enzimler: (örneğin, SOD, GPx ve katalaz)
2. Büyük moleküller: (albumin, seruloplazmin, ferritin ve diğer proteinler)
3. Küçük moleküller: (askorbik asit, glutatyon, ürik asit, tokoferol, karotenoidler, polifenoller, kateşinler)
4. Bazı hormonlar: (östrojen, anjiyotensin, melatonin vs.)

Antioksidan kapasite (AK) ölçümü plazma ve vücut sıvılarında bulunan bütün antioksidanların kümülatif etkisini yansıtmaktadır. Böylece ölçülebilen antioksidanların ayrı ayrı toplamından daha bütün bir değerdir. Bilinen ve bilinmeyen antioksidan kapasiteyi ve sinerjik etkileşimi ölçtüğünden dolayı in vivo oksidanlar ve antioksidanlar arasındaki hassas dengeyi kavramayı sağlar. Plazma AK ölçümü insanlarda fizyolojik, çevresel ve beslenme faktörlerinin redoks durumunu değerlendirmeye yardım eder. Plazma antioksidan kapasitesinin tespiti in vivo oksidatif durumun değiştiği durumları ayırt etmeye yarar (ROS'a maruz kalma ve antioksidan alımı).

Bitkisel antioksidan alımı veya antioksidandan zengin yiyeceklerin alımından sonra plazma antioksidan kapasitedeki değişiklikler besinsel bileşimlerin biyoyararlanımı ve absorpsiyonu hakkında bilgi sağlayabilir.

Hücrelerin AK'si başlıca enzim sistemini yansıtırken, plazma AK'si ise diyetel orjinli küçük molekül ağırlıklı antioksidanları yansıtır. Plazma AK hem radikal fazla yüklenimini hem de diyetel antioksidan alımını düzenler ve tek seçilmiş antioksidan konsantrasyonuna göre in vivo oksidasyon ürünleri ve antioksidanlar arasındaki dengeyi daha fazla temsil ettiği kabul edilmektedir.

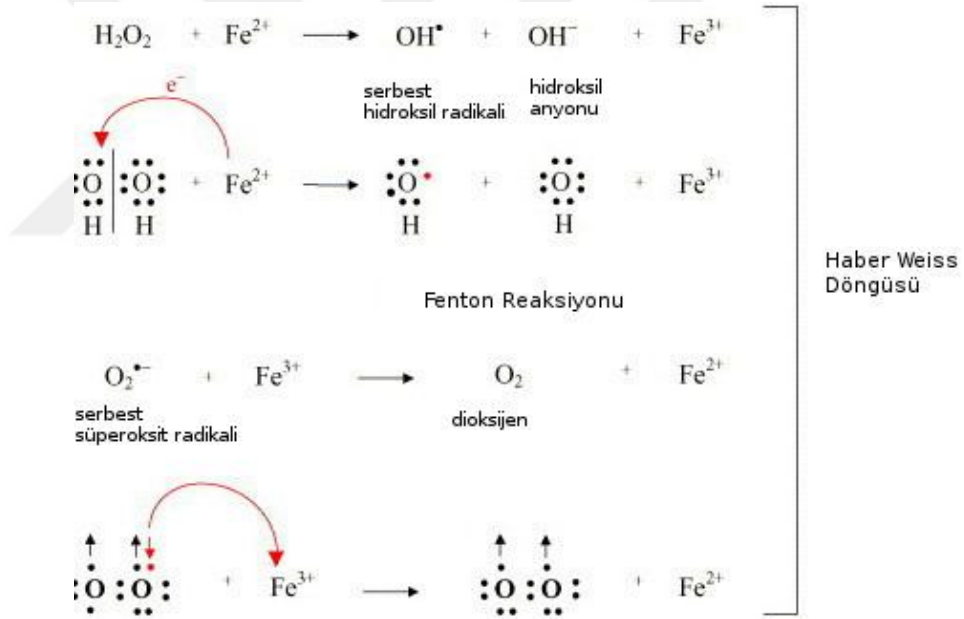
Geleneksel AK ölçümleri primer olarak plazmadaki sıvı kompartmanın antioksidan kapasitesini ölçmektedir. Bu nedenle askorbik asit, ürik asit ve protein tiyoller gibi suda çözünen antioksidanlar bu ölçümü etkiler. Fakat tokoferol ve karetenoidler gibi yağda çözünen antioksidanlar küçük bir role sahiptir (114).



1.3. OZONUN VE SEBEP OLDUĞU OKSİDATİF STRESİN ETKİLERİ

Ozon, radikal özellik taşımasına karşın, florin ve persülfattan sonra, bilinen üçüncü en güçlü oksidan maddedir (6).

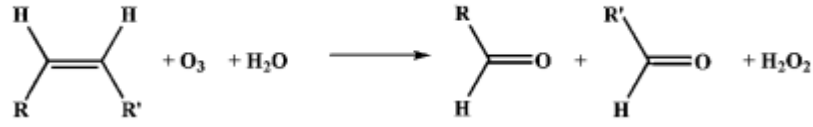
Major ototerapide ozon kana karıştıktan sonra vücut sıvıları ile etkileşerek PUFA, askorbik asit, ürik asit ve –SH içeren sistein, redükte glutatyon, albumin gibi tiyol bileşikleri ile reaksiyona girer. Transferrin ve seruloplazmin gibi proteinler de geçiş metallerini (Fe^{++} ve Cu^{++}) şelatlayarak oksidan reaksiyonları söndürdükleri için antioksidan gibi davranırlar. Yeteri kadar şelatlama olmadığında ise ortamda bu metaller birikecektir ve bu durumdan kaçınılmalıdır çünkü hidrojen peroksit, metaller varlığında Fenton; O_2^- varlığında ise Haber Weiss reaksiyonuna girerek OH^\cdot oluşturur:



Şekil 1–5: Fenton ve Haber Weiss reaksiyonları

(<http://dx.doi.org/10.1016/j.agee.2004.10.022>'dan alınmıştır)

Kullanılan ozonun dozuna bağlı olarak karbonhidratlar, enzimler, DNA ve RNA yapıları da etkilenebilir. Tüm bu bileşikler elektron alıcısı olarak davranır ve aşağıdaki şekilde olduğu gibi oksidasyona uğrar:



Her bir reaksiyon sonucunda 1 mol hidrojen peroksit ve de 2 mol lipid hidroperoksit oluşur. Non-iyonize oksidan hidrojen peroksit, temel ROS molekülü olup ozonun bazı biyolojik ve terapötik cevabının habercisidir.

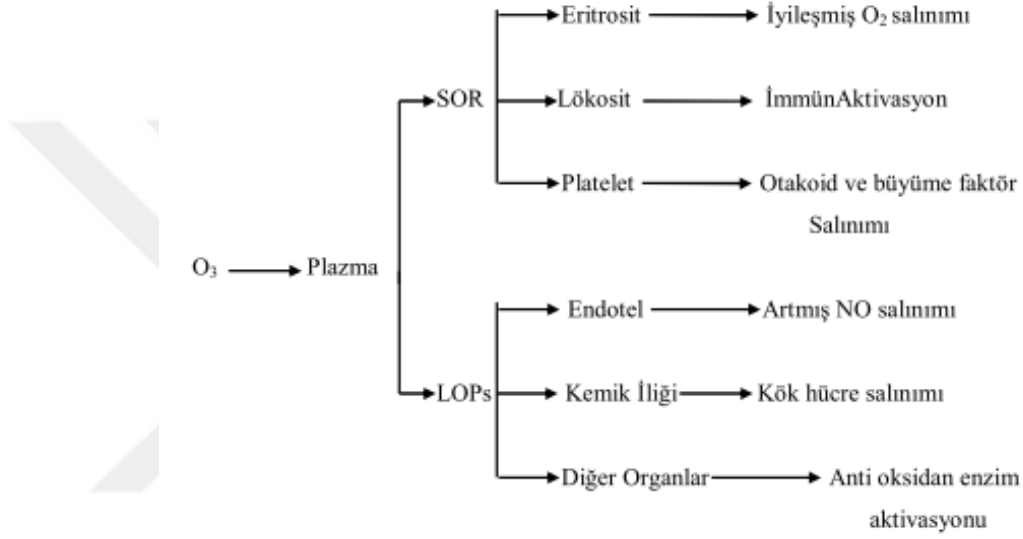
“ROS her zaman zararlıdır” hipotezi yerine artık immün cevapta ve konak savunmasında önemli olan medyatörler olduğu ve sinyal iletiminin düzenlenmesinde görevleri olduğu bilinmektedir. Hidrojen peroksit, en iyi bilinen ROS olup genel kabul görmüş, ana hücre içi sinyal moleküllerindedir (118).

ROS’un 1 saniyeden daha az ömrü ($<10^{-9}$ saniye) olmasına rağmen çok önemli bazı hücre bileşenlerine zarar verebilir, bunu aşmak için doğru ozon miktarı kullanılmalıdır [ozon konsantrasyonu ($\mu\text{g/mL}$)/ kan mL (1:1)]. Şu noktaya dikkat etmek gerekir ki aşırı miktarda ROS oluşması peroksinitrit ve hipoklorit anyon gibi diğer toksik bileşiklerin oluşmasına yol açar. Plazmada fazla miktarda bulunduğu, hidrojen peroksiti eritrositler kütleli olarak ortamdaki süpürürler. Bu esnada acilen glutatyon, oksidize forma dönüşür. Hücre, GSH/GSSG oranına çok duyarlı olduğu için hemen GSH Redüktaz enzimi elektron donörleri olan askorbat veya redükte NADPH varlığında, GSSG’yi redüktleyerek dengeyi tekrar kurar. Okside olmuş NADP ise Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz’ın anahtar rol oynadığı pentoz fosfat yoluyla redüktlenir.

Ozon, plazmada hızlıca H_2O_2 oluşturur ve bu H_2O_2 albumine bağlı PUFA ile reaksiyona girerek LOP oluşturur. Oluşan H_2O_2 ölçülemeyecek kadar hızlı bir şekilde antioksidanlar tarafından redükte edilir veya hücreler içerisine kolayca nüfuz eder. Her ne kadar hücre zarı H_2O_2 geçişi için bir engel olmasa da hücre içi-hücre dışı alışverişi stabil hale geçtiğinde plazma konsantrasyonu hücre içine göre 10 kat daha fazladır. Normotansif bireylerin plazmasında H_2O_2 konsantrasyonu $2,5 \mu\text{M}$ iken hücre içinde yaklaşık $0,25 \mu\text{M}$ miktardadır (119). Ancak ozonlama boyunca $0,5-0,7 \mu\text{M}$ konsantrasyonlara kadar çıkabilir ki bu düzey H_2O_2 ile sinyalleşmenin sağlanması için gereklidir. Hem idrarda hem de ekshale havada görüldüğü üzere aynı anda çok yerde

H₂O₂'e rastlanılır. Fakat lokal konsantrasyonuna ve hücre tipine bağlı olarak ya hücre proliferasyonunu ya da hücre ölümünü indükler.

H₂O₂ ve ardından oluşan LOP, vücut içerisinde kan hücreleri ile birlikte diğer organları hedef alıp, bu yapılar üzerinde kontrollü oksidatif stres oluşturarak Şekil 6'da da görüldüğü üzere hücrelerin fonksiyonları ve yapılarında değişikliğe yol açarlar (120).



Şekil 1-6: ROS ve LOP'un hücre içindeki etkileri

Plazmada mevcut olan albumine bağlı PUFA'ların peroksidasyonunu LOP oluşumu takip eder. Bu ürünler lipoperoksitler, alkoksil radikalleri, lipohidroperoksitler, F₂-izoprostanlar ve alkenallerden; 4-HNE, akrolein ve malonildialdehit olarak sınıflandırılır. Serbest radikallerin ve aldehitlerin tahrip ediciliği bir gerçektir fakat doğru ve uygun ozon doz kullanılarak bu moleküllerin düşük konsantrasyonlarda tutulması sağlanır. Aldehitler arasında 4-HNE nicel olarak en önemlidir. Amfipatik bir molekül olduğu için albumin, enzimler, glutatyon, karnozin ve fosfolipidler gibi çeşitli bileşiklerle reaksiyona girer. 4-HNE için vücutta reseptör bulunmamasına karşın, 70'den fazla hedefe bağlanarak yıkıcı etki göstermektedir. Neyseki intraselüler GSH konsantrasyonlarının yeterince yüksek miktarda olmasıyla hücrenel komponentler HNE'ye karşı korunur ya da enzimler aracılığıyla HNE, moleküllerden ayrılır (118). Son yapılan çalışmalar (121) oluşan bu aldehidlerin

özellikle 4-HNE' nin çoklu doymamış yağ asitlerini taşıyan albüminlere bağlandığı ve zararsız hale getirildiği yönündedir. Böylelikle kanın ex vivo ozonizasyonu sonrası alıcıya geri verilmesi vasküler sisteme hasar vermemektedir (1).

Yapılan bir çalışmada 4-HNE verilen fibroblastların, internükleozomal DNA fragmentleri gözlenerek ve ayırıcı boyama yapılarak, apoptotik ölüme gittikleri belirlenmiştir. Elde edilen bu veriler, lipid-peroksidasyon türevi ürünlerin genleri etkileyerek, programlanmış hücre ölümlerine sebep olduğunu göstermiştir (122).

4-hidroksialkenallerde bulunan α,β -ansature karbonil, Michael reaksiyonuna göre nükleofillerle, Schiff baz formasyonuna göre ise proteinler, fosfolipidler ve DNA ile reaksiyona girer. Proteinlerdeki histidin, lizin ve sistein 4-HNE ile reaksiyona giren aminoasitlerden olup histidin 4-HNE'ye diğer aminoasit konjugatlarından daha kararlı reaksiyon verir (75). Bacot ve ark.(100)'a göre 4-HNE ve 4-HDDE, membranlardaki etanolamin fosfolipidlerle ilgilidir ve hem membranöz lipidler hem de proteinler (reseptörler, adaptör proteinler, taşıyıcı proteinler ve kanallar) bu moleküllerin ana hedefidir (76).

4-HNE'nin katıldığı hücre sinyalizasyonunu sağlayan yollar; c-Jun NH₂-terminal kinaz (JNK), p38 mitojen-aktive protein kinazlar (p38 MAPK), hücre döngü regülatörleri, ve protein kinaz- β ve δ 'dır. 4-HNE bağlı modifikasyonlar, oksidatif strese karşı adaptif koruyucu cevaptan irreversibl hücre hasarı ve hücre ölümüne kadar çok sayıda hücre sel cevabı uyarır. Piga ve ark. nontoksik seviyelerdeki 4-HNE'nin PC12 hücrelerinde Nrf2'nin aktivasyonu aracılığıyla antioksidant enzimlerde artış olduğunu göstermiştir (123). Bazı çalışmalarda ise ortamdaki 4-HNE'nin direkt olarak kaspaz-3 ile etkileşimi sonucu β -hücrelerinin apoptozise gittiği kanıtlanmıştır (122).

HNE ile etkileşime giren hücreler stresle baş edebilmek için çeşitli antioksidan yapıdaki enzimlerinin sentezinde upregulasyon yaparlar, bu enzimler; γ -glutamat sistein ligaz, γ -glutamiltransferaz, γ -glutamil transpeptidaz, hem oksijenaz-1 ve diğer antioksidan enzimlerdir (124).

Pecorelli ve ark (2013) ozonlanmış serumun endotelyumda nasıl etki gösterdiğini amaçlayan bir çalışma yapmışlar ve burada ozonun Nrf2 reseptörünün aktivasyonunu artırarak HO-1 enziminin upregüle olduğunu yayınlamışlardır. Aynı çalışmada seruma direkt olarak eklenen H₂O₂ ya da 4-HNE'nin de HO-1 artışına neden olduğunu gözlemlemişlerdir. Ve buna dayarak ozonun etkin olabilmesi için oksidan ürünlerden H₂O₂, 4-HNE gibi yapıların ortamda oluşması gerektiğini bildirmişlerdir (125).

Vaskular düz kas hücrelerinde yapılan bir çalışma, ROS moleküllerinin büyüme fonksiyonları üzerine etkisini iyi bir şekilde betimlemiştir. Burada PDGF'nin vaskular düz kas hücreleri üzerindeki reseptörlerine bağlandığı ve serbest radikal oluşumunu artırdığı gözlenmiştir. Ortama eklenen PDGF sonrasında hücre içi ROS miktarında artış olduğu belirtilmiştir. Antioksidan olan katalaz ve glutatyonun hücre içi seviyesinin artırılması hücre içinde ROS oluşumunu önlemiştir. Ancak bu durumda serbest radikal yakalayıcıları PDGF ile indüklenen tirozin fosforilasyonunu, MAP kinaz stimülasyonunu, DNA sentezini ve kemotaksisi de önlemiş olurlar. Bu da gösterir ki reseptörüne bağlanan PDGF, intraselüler ROS oluşumunu tetiklemiştir (59).

Ozonun bir diğer önemli biyolojik etkisi, fazlasıyla oluşan oksidatif strese vücudun adaptasyonunun indüklenmesidir. Bunu da ancak hormesis etkisi olarak yorumlayabiliriz. Hormesis; yüksek düzeylerde zararlı olan bir ajana düşük düzeylerde maruziyetin, faydalı etkisi olarak tanımlanmaktadır. Hastalara düşük dozda ozonlanmış otohemoterapi uygulandığında bazı antioksidan enzimlerin (SOD, GSH-Px, GSH-Rd ve G6PDH) sentezlenmesini arttırır. Ozonlanmış eritrositlerde glikoliz de artarak daha fazla ATP üretimi ve 2,3 difosfogliserat oluşumu meydana gelir. Bu da Hb-O₂ disosiyasyon eğrisini sağa kaydırarak periferlerdeki tıkanmış arter bölgesindeki dokulara daha fazla O₂ dağıtılmasını sağlar (48).

LOPs nedeni ile artan, oksidatif stres proteinlerinden biri olan HO-1 enzimi önemli koruyuculardan bir tanesidir. Hem grubu taşıyan moleküllerin yıkımı sırasında CO ve bilirubinin ortaya çıkmasına neden olur (20).

Bilirubin bilinen en güçlü lipofilik endojen antioksidanlardandır. Bu özelliği Gilbert Sendromlu hastaların genel olarak sağlıklı ve uzun bir ömür sürmelerinin açıklaması olarak da kabul edilmiştir. Ayrıca yeni doğanın fizyolojik sarılığında, ortaya çıkan bilirubin, bebeğin büyük bir strese maruz kaldığı dönemde önemli bir koruyucu olarak görev yapar. CO ise NO'e benzer şekilde cGMP aracılı vazodilatasyona yardımcı olur. Hem yıkılması sonucu ortaya çıkan Fe^{++} ferritin ile bağlanır. HO-1 enzimi akut bir oksidatif stresten sonra hücreleri koruyan en önemli enzimlerden biri kabul edilmektedir. Önceleri bu enzimin sadece eritrositlerde görev aldığı düşünülürken şimdi tüm hücrelerin içerisinde yapısal olarak olduğu ve hem grubu içeren onlarca yapısal proteinin yıkımında görev aldığı bilinmektedir. Tedavi boyunca LOPs kemik iliğinin mikro çevresinde metalloproteinaz (MP) salınımını aktive edebilir. Özellikle MP-9 aktivasyonu ile yaşamsal kök hücrelerin dolaşıma geçmesine yardımcı olabilir. Bu hücreler dolaşıma geçtikten sonra travma, iskemi veya dejenerasyonun olduğu bölgeye çekilir. Böyle bir durumun ileri çalışmalarla ortaya konması kök hücre tedavisinde ucuz, güvenilir ve son derece efektif bir alan ortaya koyabilir (20).

Ozon tedavisi ile sağlanan akut oksidan stres ve oluşturulan efektif biyolojik yanıtlar yaşlanma, kronik enfeksiyonlar, diyabet, ateroskleroz, kronik yaralar, dejeneratif süreçler ve kanserdeki kronik oksidatif stresi "tedavi edici şok" özelliği sayesinde homeostatik yöne çevirebilir (49).

Babacan (126) ise ozonun kandaki farklı bir etkisinden bahsetmektedir; çoğu kez metal paralar gibi birbirine yapışık hareket eden alyuvarlar, O_3 ile karşılaşınca ayrılır, şekil değiştirir, düzenli sıralar halinde daha hızlı hareket etmeye başlarlar. Yüzeyleri genişlediğinden fazla miktarda oksijen alan alyuvarlar vücudun ihtiyacı olan bölgesine hızla ulaşabilmektedir (126).

Kandaki eritrositler H_2O_2 'yi yok edebilmek için GSH'ı GSSG'ye çevirir. Hücre GSH/GSSG oranına çok duyarlıdır ve bu oranı eski seviyesine getirmek için ya GSSG'yi hücre dışına atar ya da NADPH ve askorbatı harcayarak glutatyon redüktaz ile indirger. Oksidize NADP anahtar enzimin G6PDH olan pentoz fosfat yolunda indirgenir. Ozonterapi sonrasında ATP üretimindeki artışın nedeni aktive olan bu pentoz fosfat yolundan mı yoksa fosfofruktokinaz enzim aktivitesindeki artıştan mı

kaynaklandığı halen tartışmalıdır ancak eritrosit içinde pH'daki düşme sonucu (Bohr etkisi) ya da 2,3-difosfoglisierattaki artış neticesinde oksijen-hemoglobin disosiyasyon eğrisi sağa kayar ve hemoglobinden dokulara oksijen geçişi kolaylaşır (118). Bu, özellikle de iskemik dokulara oksijen taşınmasını ozonun kolaylaştırdığının kanıtıdır (20).

Kan ile ozon karıştıktan sonra bol miktarda oluşan oksijen, çözülmüş olarak ekstraselüler sıvı ve eritrosit içi sıvı arasında denge oluşturur. Daha sonra hemoglobine bağlanır, kandaki oksijen parsiyel basıncı 40'tan 400 mm Hg'a kadar yükselir. Ozon gazı hızlıca moleküllerle etkileşerek radikaller oluşturur. Ortaya çıkan oksijen radikalleri plazmadaki çift bağdan zengin moleküllerle (özellikle sülfidril gruplarıyla) reaksiyona girerek hidrojen peroksit oluşumuna neden olur. Hidrojen peroksit organizmada bilinen en önemli ikincil habercilerden bir tanesidir. H_2O_2 'nin ömrü yaklaşık birkaç dakika olup ortamdaki antioksidanlar ile nötralize edilir. Ancak bu süre boyunca plazmadaki ve hücre zarlarındaki lipidlerle reaksiyon oluşturarak LOP oluşumuna neden olurlar. LOP'ler ikincil mesajcılar olarak görev yapıp vücuttaki çok sayıda metabolik yolda role sahiptir. Buradan yola çıkarak biz de çalışmamızda ozon-kan karışımının vücutta antioksidan ve oksidan durum üzerine kısa sürede etkisini gözlemlemeyi amaçladık.

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. MATERYAL

Etik kurul

Çalışmanın Helsinki deklarasyonuna ve etik kurallara uygunluğu Aralık 2011 tarihindeki **2011/12/139 sayılı** karara göre Ankara Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi tarafından onaylanmıştır.

2.1.1. Ozon uygulaması ve Örneklerin hazırlanması

Ozon tedavisi almak için Mayıs-Eylül 2012 tarihleri arasında Medizone Sağlık Hizmetleri Ozon Tedavi Merkezi'ne başvuran hastalardan, 35 gönüllü çalışmaya dahil edildi. Çalışma grubuna alınan kişilerin anamnezleri alındı ve bilgilendirme formları dolduruldu. Hastaların yaşları $42,37 \pm 13,96$ idi ve % 68,5'i kadın idi.

Hastalar 10 dakika boyunca oturur pozisyonda dinlendikten sonra antekubital venden "tedavi öncesi kanı" BD marka vakumlu düz tüplere alındı. Major otohemoterapi için hastadan yaklaşık 100 mL kan alınıp sitratlı torbada biriktirildi. Aynı torbaya 100 mL (kan ile eşit hacimde) 10–20 µg/mL yoğunlukta ozon/oksijen gazı (Evozone Basic Plus, ALMANYA) ilave edildi ve 5 dakika boyunca kan ile ozonun karışması sağlandı. "Ozon + kan" karışımı dakikada 60–90 damla hızında donöre transfüze edildi. Kanın tamamı verildikten 10 dakika sonra diğer koldan "tedavi sonrası kanı" biyokimya tüplerine alındı.

Örnekler tüp içerisinde pıhtılaştıktan sonra soğutmalı santrifüjde 1500g'de 10 dakika santrifüj edilip 2 saat içerisinde biyokimya laboratuvarında çalışıldı.

Hem tedavi öncesi hem de tedavi sonrası örnekleri aynı anda çalışılarak aynı kalibrasyonda değerlendirmeler yapıldı. Çalışılan testler ise AOPP (İleri Oksidize Protein Ürünleri), İMA (İskemi Modifiye Albumin), TAS (Total Antioksidan Durum), TOS (Total Oksidan Durum), TTL (Total Tiyol Seviyeleri), ARES (Ariesteraz Enzimi), PON (Paraoksonaz Enzimi), SPON (Stimüle Paraoksonaz Enzimi)'dur.

2.1.2. Kimyasallar

Kullanılan bütün kimyasallar analitik saflıkta olup Sigmadan sağlanmıştır. Çözeltilerin hazırlanmasında Tip 1 derecede saf su kullanılmıştır.

2.1.3. Kullanılan cihazlar

Ozon gazı Evozone Basic Plus (ALMANYA) ile oluşturuldu.

Reaktifler, Mettler Toledo ML 204/01 (İSVİÇRE) hassas terazisi ile tartılmıştır.

Manyetik karıştırıcı olarak IKA RCT basic (ALMANYA) kullanılmıştır.

Tamponların pH'ları İNOLAB pH730 (ALMANYA) pHmetre ile ölçülmüştür.

AOPP ve İMA testlerinin analizleri spektrofotometre cihazı (Shimadzu UV-1800, JAPONYA) ile yapılmıştır.

Otomatize edilen TTL, TAS, TOS, PON, SPON, ARES testleri ise spektrofotometrik otomatik analizör ile (cobas 6000 c501, ROCHE, JAPONYA) çalışılmıştır.

2.2. METODLAR

2.2.1. İleri Oksidize Protein Ürünleri (AOPP)

Bu test, hastalıkla ilişkili oksidatif stresin yeni bir belirteçidir. Lipidlerin tersine, proteinlerin oksidanlarla reaksiyonu yaygın olarak çalışılmamıştır. Oksidatif stres sonrası proteinlerde disülfid yapıların oluşmasıyla agregasyonlar meydana gelir. AOPP'ler ise ditrozin içeren çapraz bağların olduğu protein ürünlerdir. Buna bağlı olarak AOPP'ler, lipid oksidasyon ürünleri yerine oksidatif stresin daha iyi belirteçleridir.

AOPP Tayini Witko-Sarsat ve ark (127) tarafından geliştirilen spektrofotometrik metodla gerçekleştirildi.

Çözeltiler:

- Fosfat tamponu (PBS pH 7,4)
- Kloramin-T standartları (10–200 µmol/L)
- Asetik asit
- Potasyum iyodür (KI 1.16 mol/L)

Çalışma:

Fosfat tamponu ile dilüe (1:5) edilen serumun ve kloramin-T içeren standart çözeltilerin (0- 200 µmol/L) 400 µL'sine 200 µL Asetik asit ve 100 µL 1.16 mol/L KI ilave edildi. Reaksiyon tamamlandıktan sonra absorbanslar spektrofotometrede 340 nm dalga boyunda ölçüldü. AOPP düzeyleri, kloramin-T ekivalentlerine göre µmol/L olarak belirlendi.

2.2.2. İskemi Modifiye Albumin (İMA)

Plazmanın antioksidan kapasitesinin önemli bir bölümünü üre, ürik asit ve en çok da albumin oluşturur. İnsan serum albumini *invivo* hipoksi, asidoz, serbest radikal hasarı sonucu değişikliğe uğramaktadır. Oksidatif bir durumda albuminin –SH grupları oksidasyona uğrar ve oksidasyona karşı plazmadaki ana sakrifikasyon molekülü olup lipoproteinleri hasardan korur. Okside olan albuminler de plazma konsantrasyonları değişmeyecek şekilde hızlıca ortamdan uzaklaştırılır. Normal insan serum albumininde hidroksil radikalının etkisiyle N-Terminal bölgesinde yapısal değişiklik meydana gelir ve bu durumda iskemi modifiye albumin olarak isimlendirilen yapıyı oluşturur. N-terminal bölgesi yapısal olarak değişikliğe uğramış İMA'nın normal insan serum albuminin aksine serbest metalleri bağlama kapasitesi çok düşüktür (128).

İMA tayininde Bar- Or ve arkadaşları tarafından geliştirilen yöntem kullanıldı.

Albumin kobalt bağlama testi olarak adlandırılan test; serum albumini ile geçiş metali olan kobaltın bağlanması esasına dayanır (129).

Çözeltiler:

- NaCl (9 g/ L)
- Kobalt(II) klorür heksahidrat (CoCl₂.6H₂O, 1 g/L)
- Dithiothreitol (DTT, 1,5 g/L)

Prensip:

Alınan serum örneğine kobalt eklendi. Eklenen kobalt normal albumine ve daha az olmak üzere İMA'ya N-terminal amino bölgesinden bağlanır. Serumdaki bağlanamayan İMA spektrofotometrik yöntemle ölçüldü. Bu ölçümü yapabilmek için serbest kobaltla reaksiyona giren ve renk değişikliğine yol açan Dithiothretiol (DTT) ortama eklendi. DTT albumine bağlanmış kobaltla reaksiyona giremez ve ortamdaki bağlanamayan serbest kobalt miktarı İMA değerini yansıtır.

Çalışma:

	Örnek	Kör
Serum	200 µL	-
Tip I Su	-	200 µL
Albümin Standartı	-	-
CoCl₂	50 µL	50 µL
	37 °C'de 10 dakika inkübe edildi.	
DTT	50 µL	50 µL
	37 °C'de 2 dakika inkübe edildi.	
NaCl	500 µL	500 µL

Numune tüplerinin absorbansı, kör tüpüne karşı 470nm dalga boyunda ölçüldü ve standart eğrisine göre numunelerin değerleri ABSU (absorbans ünite) olarak verildi.

2.2.3. Total Oksidan Durum (TOS)

Metabolik ve fizyolojik işlemlerde ROS oluşup zararlı etkileri enzimatik yada non-enzimatik antioksidan sistemlerle nötralize edilir. Bazı durumlarda oksidanlarda artış, antioksidanlarda azalış olması engellenemez. Oksidatif/antioksidatif dengenin oksidatif duruma doğru kaymasına neden olur (130). TOS in vivo total oksidan durumun belirteçidir.

Reaktifler:

- Reaktif 1 (Tampon)
- Reaktif 2 (Prokromojen solüsyonu)
- Standard 1 (0,0 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2\text{Equiv./L}$)
- Standard 2 (20 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2\text{Equiv./L}$)

Prensip:

Kanda mevcut bulunan oksidan moleküller, ferröz iyon-o-dianisidin kompleksini ferrik olarak oksitler. Ferrik iyon, asidik ortamda xylenol orange ile renkli bir kompleks oluşturdu. Rengin yoğunluğu spektrofotometrik olarak ölçülüp serumdaki total oksidan miktarı ile ilişkilendirildi. Test, H_2O_2 'ye göre kalibre edilir ve sonuçlar $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2\text{Equiv/L}$ olarak değerlendirildi.

Çalışma:

Numuneler Erel (2005) (131) tarafından geliştirilen tam otomatik kolorimetrik yöntemle otomatik analizörde çalışıldı ve 20 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2\text{ Equiv./L}$ 'ye göre kalibre edildi.

2.2.4. Total Antioksidan Durum (TAS)

Plazmadaki total antioksidanların varlığını gösteren bir analizdir. Antioksidan kapasite ölçümü plazma ve vücut sıvılarında bulunan bütün antioksidanların kümülatif etkisini yansıtmaktadır. Böylece ölçülebilen antioksidanların ayrı ayrı toplamından daha bütün bir değerdir. Bilinen ve bilinmeyen antioksidan kapasiteyi ve sinerjik

etkileşimi ölçtüğünden dolayı in vivo oksidanlar ve antioksidanlar arasındaki hassas dengeyi kavramayı sağlar.

Reaktifler:

Reaktifler ticari kit olup Rel Assay, TÜRKİYE firmasından temin edilmiştir.

- Reaktif 1: Asetat tamponu
- Reaktif 2: Renkli ABTS radikali solüsyonu
- Standard 1 (0,0 mmolTrolox Equiv./L) (deiyonize su)
- Standard 2 (1,0 mmolTrolox Equiv./L)

Prensip:

Serum içerisinde mevcut olan antioksidanlar koyu yeşil renkli ABTS radikalini (2,2-azinobis- 3-etil-benzothiazolin-6-sülfonik asit) indirgeyerek renksiz olan redükte ABTS formuna dönüştürür. Serumdaki Total Antioksidan Durumun düzeyine göre değişen absorbans miktarı 660 nm’de ölçüldü.

Çalışma:

Numuneler Erel (132) yöntemine göre ve otomatik analizörde çalışıldı ve E vitamini analogu olan 1,0 mmol Trolox Equiv./L ‘ye göre kalibre edildi.

2.2.5. Oksidatif Stres İndeksi (OSİ)

Plazmadaki pro-oksidanlar ile antioksidanlar arasındaki dinamik dengeyi gösterebilecek bir analizdir. Oksidatif stresin derecesini gösteren bir indikatör olup TOS seviyesinin TAS seviyesine oranının yüzdesidir. $[(TOS, \mu\text{mol total peroksit /L}) / (TAS, \text{mmol trolöks ekivalan/L})] * 100$
(133)

2.2.6. Total Tiyol Düzeyleri (TTL)

Tiyol (-SH) grupları, reaktif oksijen türlerinin zararlı etkilerine karşı önemli bir koruyucudur. Serbest radikallerin proteinlerdeki tiyol gruplarının oksidasyonuna yol açtığı gösterilmiştir. -SH gruplarının disüfitlere ve oksiasitler gibi diğer oksitlenmiş türevlere dönüşümü, radikal araçlı protein oksidasyonunun en erken gözlenebilen belirtisidir.

Reaktifler:

- Reaktif 1 (R1) ; Tris tamponu
- Reaktif 2 (R2) ; DTNB çözeltisi
- Standard (Std) ; 200 µM GSH

Prensip:

Serumlardaki tiyol konsantrasyonları Ellman tarafından belirlenen, Hu tarafından geliştirilen yöntemle ölçüldü. Metod serbest tiyol gruplarının 5,5-ditiyo bis(2-nitrobenzoik asit) (DTNB) ile oksitlenmesi sırasında oluşan koyu sarı renkli 5-tiyo-2-nitrobenzoik asit (TNB)'in renk şiddetinin 412 nm dalga boyunda ölçülmesi esasına dayanır ($\epsilon_{412} = 13,600M^{-1}cm^{-1}$) (134).

Çalışma:

Erel tarafından geliştirilen ve uzun süre stabil olan ticari kitlerle çalışılmıştır. Otomatik analizöre uyarlanan test 200 µM redükte glutatyon ile kalibre edilmiştir.

2.2.7. Arilesteraz (ARES)

Paraoksonaz ve Arilesteraz yalnızca lipoprotein kaynaklı peroksitleri (kolesterol linoleat hidroperoksitleri) hidroliz etmekle kalmaz, bunun yanısıra hidrojen peroksiti (H_2O_2) de hidroliz eder. PON1, doymamış yağ asitlerinin hidroperoksi türevlerini elimine ederek, kısmen okside olmuş fosfolipidleri de metabolize eder. Dolayısıyla aslında PON- 1 vücuttaki pek çok türde oksidan ile ilişkilidir.

Reaktifler:

Reaktifler ticari kit olarak temin edilmiştir.

- Diluent Solüsyonu
- Reaktif 1
- Deiyonize su
- Reaktif 2
- Reaktif 3

Prensip:

PON-1 enzim grubunda bulunan arilesteraz enzimi, fenil asetatı fenol ve asetik asit olarak ürüne çevirir. Oluşan fenol, oksidatif olarak 4-aminoantipirin ve potasyum ferrisiyanide bağlanarak renkli bir bileşik oluşturur. Fenil asetatın nonenzimatik olarak hidroliz oranı kör kullanılarak total hızdan çıkarıldı. Renkli bileşiğin molar absorptivitesi $4000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ dir. 1 ünite arilesteraz aktivitesi, 37°C 'de 1 dakikada 1 mmol fenil asetatın hidrolize edilmesine eşittir. Serum ARES aktivitesi kU/L olarak ifade edildi (135).

Çalışma:

Molar absorptivite kat sayısı kullanılarak kinetik ölçüme göre konsantrasyonlar belirlendi.

2.2.8. Paraoksonaz (PON)

Paraoksonaz, HDL ile ilişkili bir enzim olup oksidatif modifikasyonlara karşı lipoproteinleri koruyarak antiaterojenik ve antioksidan fonksiyonları vardır. Bununla birlikte parokson gibi organofosfatları ve yağ asitlerinin aromatik karboksilik asit esterlerinin hidrolizini de katalizler.

Reaktifler:

Reaktifler ticari olarak temin edilmiştir.

- Reaktif 1 (Tris Tamponu)
- Reaktif 2 (Substrat Solüsyonu)

Prensip:

Eckerson (136) yöntemine göre çalışıldı. Birinci reaktifte tris tamponu ve PON-1 enzimi için kofaktör olan kalsiyum iyonu bulunur. İkinci reaktif ise yeni geliştirilmiş olup stabil substrat solüsyonu içerir. Örnek, reaktif 1 ile karıştırılır ve sonra karışıma reaktif 2 eklendi. Paraoksondan p-nitrofenol oluşumunun absorpsiyonu lineer bir artış gösterdi ve kinetik olarak ölçüldü. Paraoksonun nonenzimatik olarak kendiliğinden hidroliz oranı kör kullanılarak total hızdan çıkarıldı. P-nitrofenol'ün molar absorptivitesi 18,290 M⁻¹ cm⁻¹ dir. 1 ünite paraoksonaz aktivitesi, 37 °C'de 1 dakikada 1 mol paraoksonun hidrolize edilmesine eşittir. Serum PON aktivitesi U/L olarak ifade edildi.

Çalışma:

Eckerson (1983) yöntemine göre, Erel tarafından geliştirilmiş uzun süre stabil reaktifler kullanıldı. Molar absorptivite katsayısı kullanarak kinetik ölçüme göre konsantrasyonlar belirlendi (136).

2.2.9. Stimüle Paraoksonaz (SPON)

PON ölçümü için kullanılan solüsyonlarının aynısı kullanıldı fakat substrat solüsyonunda fazladan 1M NaCl vardı. PON ölçümü ile aynı ölçüm yöntemi uygulanıldı. Bu şekilde NaCl-stimüle paraoksonaz aktiviteleri tespit edildi.

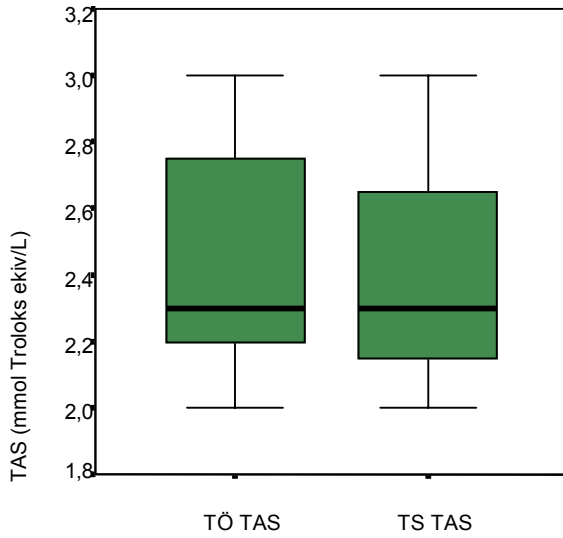
2.3. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME

İstatistik analizleri SPSS 11.5 programı (SPSS Inc., Software Chicago, IL, USA) kullanılarak yapıldı. Tedavi öncesi ve sonrası grupların normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov Smirnov testi ile incelendi. Tüm değişkenlerin normal dağılıma uygun olmasına göre veriler, *Paired samples t* testi ile analiz edildi. Seanslara göre ayırdığımız gruplar ANOVA (One-way analysis of variance) testi ve *Tukey* testi ile incelendi. Çalışmada elde edilen veriler Ortalama±SD olarak verildi. Sonuçlar % 95 güven aralığında, anlamlılık $p < 0,05$ düzeyinde değerlendirildi.

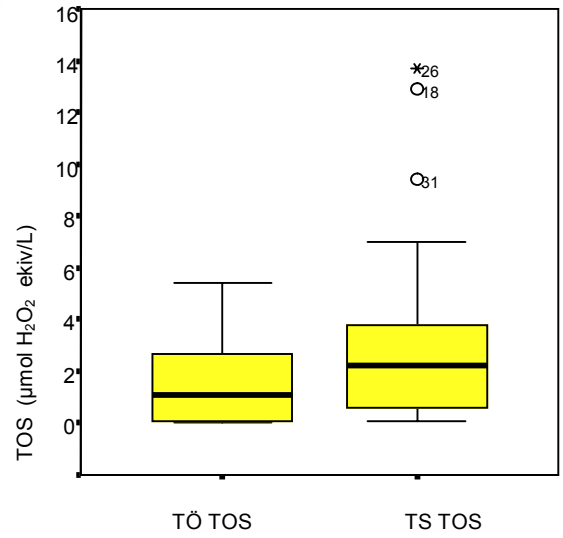
3. BULGULAR

Çalışmamıza katılan 35 hastanın yaş ortalaması $42,37 \pm 13,96$ idi. Katılımcıların % 68,5'i kadın olup yaş ortalaması $44,13 \pm 16,37$ idi. Erkeklerin yaş ortalaması ise $38,55 \pm 4,80$ idi. Bu kişilerin %37'si ise sigara kullanıyordu. Katılımcılardan % 63'ünün (22 kişi) tedavi için hiçbir şikayeti olmamasına karşın, diğerleri romatizmal hastalıklar (4 kişi), tiroidit (2 kişi), hiperkolesterolemi (2 kişi), hipertansiyon (2 kişi), bel fıtığı (1 kişi), flebit (1 kişi) ve kronik yorgunluk (1 kişi) gibi çeşitli nedenlerle ozon tedavisi alıyordu.

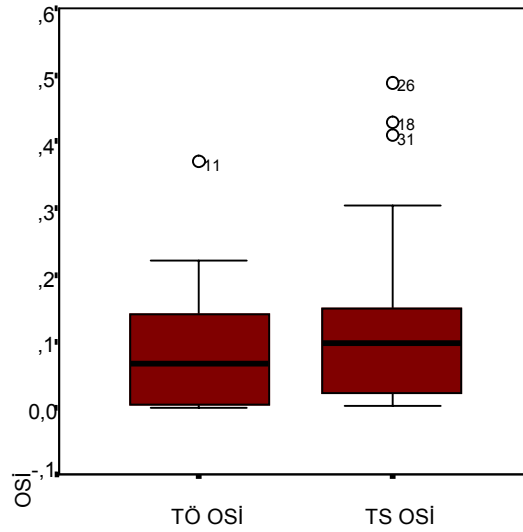
Tedavi öncesi ve sonrasında elde ettiğimiz serumlarda parametreler çalışıldı. Buna göre; total antioksidan durumu göstermek için ölçtüğümüz TAS, total oksidan durumu analiz etmek için ölçtüğümüz TOS ve her ikisinin denge durumunu gösteren OSİ değerlerinin ozona bağlı değişikliklerinin şekilleri ve tablosu aşağıda verilmiştir.



Şekil 3-1: Ozon tedavisi öncesi ve sonrası TAS Boxplot grafiği



Şekil 3-2: Ozon tedavisi öncesi ve sonrası TOS Boxplot grafiği



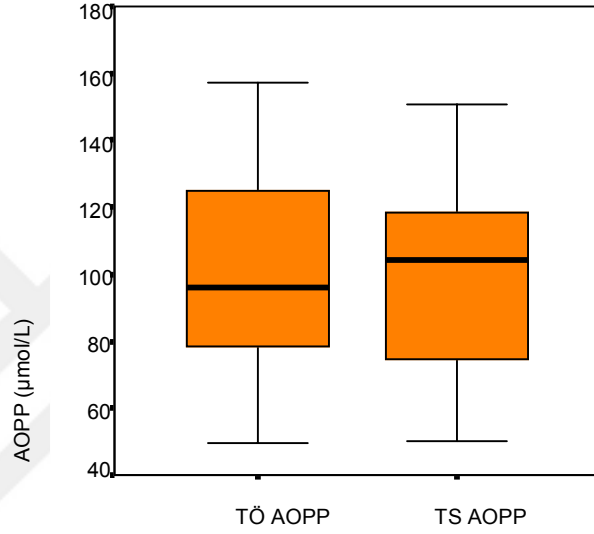
Şekil 3–3: Ozon tedavisi öncesi ve sonrası OSİ Boxplot grafiği

Tablo 3–1: Tedavi öncesi ve sonrasında TAS, TOS, OSİ ortalamaları \pm SD ve anlam düzeyi

	Tedavi öncesi (n=35)	Tedavi sonrası (n=35)	Anlam düzeyi (p)
TAS mmol Troloks ekiv/L	2,417 \pm 0,29	2,371 \pm 0,29	0,047
TOS μ mol H ₂ O ₂ ekiv/L	1,65 \pm 1,72	2,96 \pm 3,4	0,019
OSİ (TOS/TAS)*100	0,081 \pm 0,089	0,12 \pm 0,11	0,108

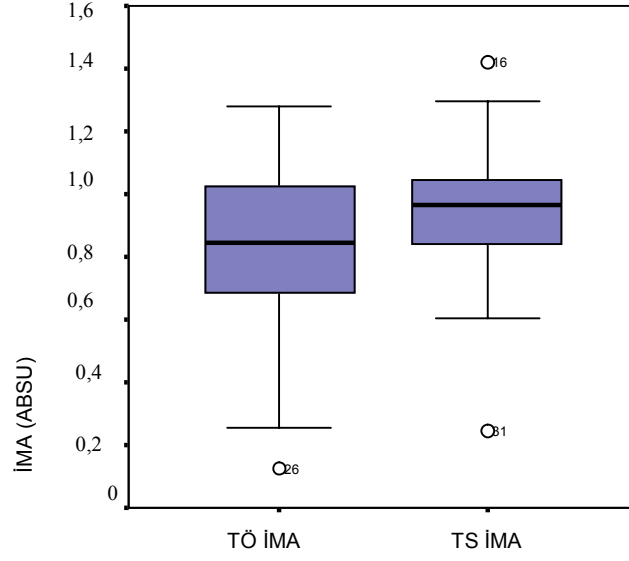
Yapılan istatistik analizine göre tedavi öncesi antioksidan durumun belirteci olan TAS değerleri 2,417 \pm 0,295 mmol Troloks ekiv/L iken, tedavi sonrasında 2,371 \pm 0,29 mmol Troloks ekiv/L'ne düştü. Bu azalma istatistiksel olarak anlamlıdır (p=0,047)(Tablo 4). Yine tedavi öncesi oksidan durumu gösteren TOS değerleri 1,65 \pm 1,72 μ mol H₂O₂ ekiv/L iken, ozonla muamele sonrasında 2,96 \pm 3,4 μ mol H₂O₂ ekiv/L seviyelerine yükseldi. Bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü (p=0,019) (Tablo 4). Antioksidan durum ile oksidan durum arasındaki dengeyi gösteren OSİ'nin tedavi öncesinde 0,081 \pm 0,089 olan düzeylerinin, tedavi sonrasında 0,12 \pm 0,127 olarak arttığı görüldü. Ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildi (p=0,108).

Ozon tedavisinin, protein oksidasyonu belirteci AOPP üzerine etkisi incelendi. Buna göre tedavi öncesindeki AOPP değerleri $101,35 \pm 28,18$ $\mu\text{mol/L}$ olarak ölçüldü. Ozonla tedavi sonrasında ise $99,39 \pm 27,07$ olarak ölçüldü (Şekil 7-4). AOPP değerlerinde ozon sonrasında hafif azalış olsa da bu azalışın istatistiksel bir anlamı olmadığı görüldü ($p=0,533$) (Tablo 3-2).



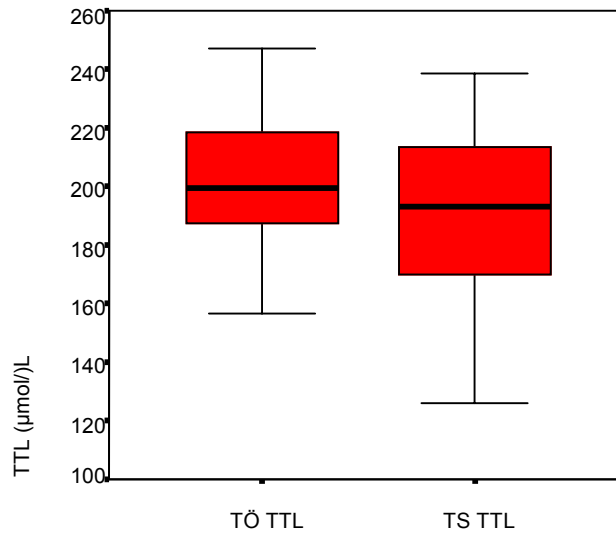
Şekil 3-4: Ozon tedavisi öncesi ve sonrası AOPP grafiği

Oksidatif durumlarda fonksiyonu değişen albumini İMA parametresi ile değerlendirdik Buna göre; tedavi öncesinde hastalardan alınan örneklerde İMA $0,815 \pm 0,27$ ABSU iken, ozon tedavisi alan hastaların İMA değerleri $0,943 \pm 0,22$ ABSU'ya yükseldi. Bu fark istatistiksel olarak da anlamlı idi ($p=0,005$) (Tablo: 3-2)



Şekil 3-5: Ozon tedavisi öncesi ve sonrası İMA grafiği

Ozon gibi önemli bir oksidan molekülün antioksidan moleküllere etkisini araştırmak için çalıştığımız TTL testi, tedavi öncesinde $200,25 \pm 23,09 \mu\text{mol/L}$ iken tedavi sonrasında $190,94 \pm 29,26 \mu\text{mol/L}$ seviyesine düştü, bu fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($p=0,021$)(Tablo 3-2).



Şekil 3-6: Ozon tedavisi öncesi ve sonrası TTL grafiği

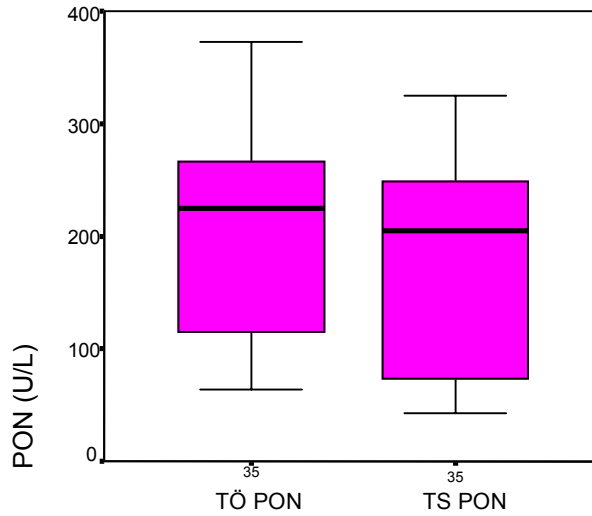
Aşağıda Tablo 3-2’de AOPP, İMA ve TTL’nin tedavi öncesinde ve sonrasında ortalamaları ve bu ortalamaların anlam düzeyi gösterilmiştir. Buna göre AOPP’de anlam farkı olmamasına karşın, İMA ve TTL’de ortalamaların farkı anlamlıydı.

Tablo 3–2: Tedavi öncesi ve sonrasında AOPP, İMA, TTL ortalamaları \pm SD ve anlam düzeyi

	Tedavi öncesi (n=35)	Tedavi sonrası (n=35)	Anlam düzeyi (p)
AOPP $\mu\text{mol/L}$	101 \pm 28	98 \pm 27	0,533
İMA ABSU	0,815 \pm 0,27	0,943 \pm 0,22	0,005
TTL $\mu\text{mol/L}$	200 \pm 23	186 \pm 29	0,021

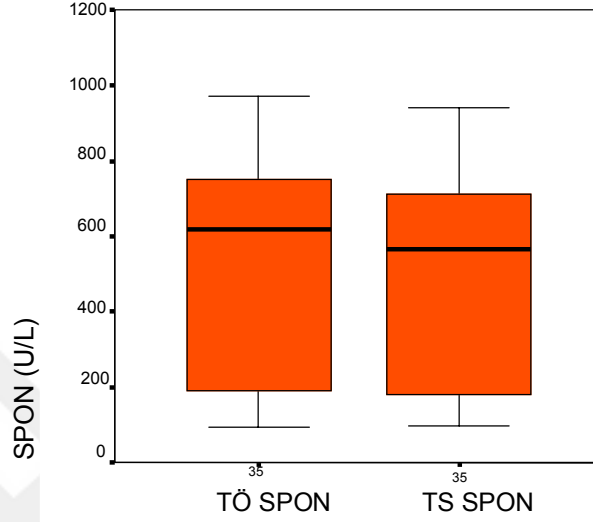
Antioksidan enzimlerden PON, SPON ve ARES parametreleri tedavi öncesi ve sonrası serumlarıyla çalışıldı, sonuçlar aşağıda gösterildiği üzere istatistiksel olarak değerlendirildi.

Elde edilen verilere göre ozon tedavisi almadan önceki duruma ait serum örneklerinde PON seviyesi 196,2 \pm 95,7 iken ozon tedavisi sonrasında 170,2 \pm 93,9 seviyesine düştü. Bu düşüş istatistiksel olarak da anlamlıydı ($p < 0,0001$) (Tablo 6).



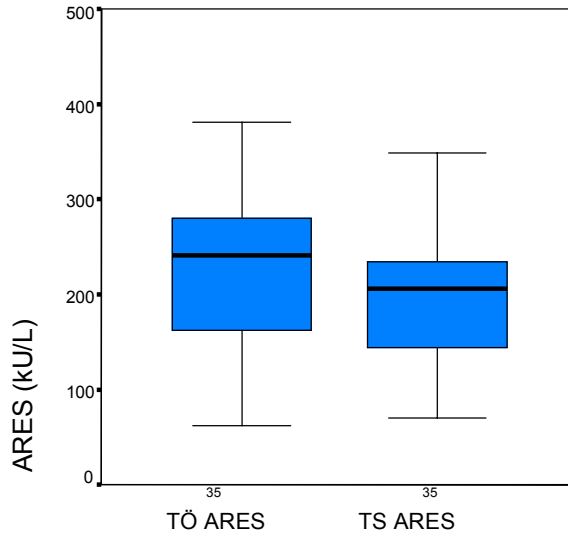
Şekil 3–7: Tedavi öncesi ve sonrası PON seviyeleri

SPON değişimlerine baktığımızda ise tedavi almadan önce $502,8 \pm 305,3$ olan durum ozonla muamele sonrasında hastalardaki SPON seviyesi $469,2 \pm 281,4$ U/L'ye kadar azalış gösterdi. İstatistiksel olarak değerlendirdiğimizde azalışın anlamlı olduğu görüldü ($p < 0,0001$) (Tablo 6).



Şekil 3–8: Tedavi öncesi ve sonrası SPON seviyeleri

Bir diğer PON–1 yapısında bulunan ve antioksidan fonksiyonları olan ve ARES enzimi, tedavi öncesindeki $226,9 \pm 80,77$ kU/L'den tedavi sonrasında $197,5 \pm 69,02$ kU/L seviyelerine düşmüş olup istatistiksel olarak da anlamlıydı ($p < 0,0001$) (Tablo 3–3).



Şekil 3–9: Tedavi öncesi ve sonrası SPON seviyeleri

PON, SPON ve ARES'in tedavi öncesi ve sonrasında ortalamaları ile bu ortalamalar arasındaki anlam farkları aşağıdaki tablolarda belirtilmiştir.

Tablo 3–3: Tedavi öncesi ve sonrasında AOPP, İMA, TTL ortalamaları±SD ve anlam düzeyi

	Tedavi öncesi (n=35)	Tedavi sonrası (n=35)	Anlam düzeyi (p)
PON (U/L)	196±95	170±93	<0,0001
SPON (U/L)	503±305	469±281	<0,0001
ARES (kU/L)	227±80	197±69	<0,0001

Seans Sayısının Tedaviye Etkisi

Katılımcılar seans sayısına göre “ilk kez”, “2–10 seans arası” ve “10 seans sonrası” olmak üzere 3 gruba ayrıldı

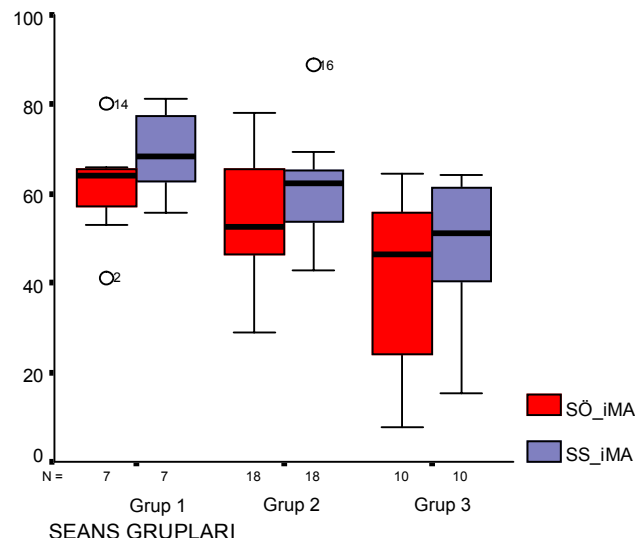
- Katılımcılardan 7'si ilk kez ozon tedavisi aldı (Grup 1).
- 18'i tedavi sürecinde olup her 3 günde bir ozon tedavisi alıyordu (Grup 2).
- 3 günde 1 ozon tedavisi alarak 10 seansı tamamladıktan sonra ayda 1 kez ozon tedavisi alan kişi sayısı ise 10'du (Grup 3).

Çalıştığımız parametreleri hastaların aldığı seans sayısına göre değerlendirdiğimizde sadece İMA'da anlamlı bir fark görüldü. ANOVA ile yaptığımız analizde hem seans uygulamadan öncekilerde ($p=0,017$) hem de seans uygulandıktan sonrakilerde ($p=0,005$) gruplar arasında İMA değerlerinde anlamlı fark vardı. Buna göre seans sayıları değiştikçe, İMA seviyelerinde de değişiklikler olmuştur. Bu değişiklik tedavi öncesindeki İMA'larda da tedavi sonrasındaki İMA'larda da farklıydı. Diğer testlerde ise artış ya da azalışta seansların önemli bir etkisi yoktu (Tablo 3–4).

Tablo 3–4: Testlerin tedavi öncesi ile sonrasına göre ANOVA analizi

ANOVA			
	Gruplar arası	(Ortalama) ²	Anlam Farkı (p)
Seans öncesi	AOPP	220	0,769
Seans sonrası		821	0,336
Seans öncesi	İMA	1088	0,017
Seans sonrası		893	0,005
Seans öncesi	TTL	1332	0,079
Seans sonrası		1459	0,184

* p < 0,05 seviyesinde ortalama farkları önemlidir.



Şekil 3–10: Seans sayısının İMA'ya etkisi

Yaptığımız varyans analizine göre seanslar arasında İMA testine göre anlam farklılığı olduğu görüldü. Farkın hangi seans grupları arasında olduğu Tukey testi ile değerlendirildi. Bu yöntemle göre, 10 seansdan fazla ozon tedavisi alanlarda ilk kez alanlara göre (p=0,018) ve de 2–10 seans alanlara göre (p=0,075) seans öncesi İMA seviyesi istatistiksel olarak önemli derecede düşük bulundu (Tablo 3–5). Bununla birlikte yine 10'dan fazla ozon seansına katılanların seans sonrası İMA seviyeleri de ilk kez ozon tedavisi alanlara göre (p=0,004) ve 2–10 seans arası ozon tedavisi alanlara göre istatistiksel olarak önemli derecede (p<0,05) düşük bulundu (Tablo 3–5).

Tablo 3–5: Seansların tedavi öncesi ve sonrasına etkisini gösteren Tukey analizi

Çoklu Karşılaştırma (Tukey testi)				
Değişken	Seans Ö Grup	Seans S Grup	Ortalama Farkı (A-B)	Anlam Düzeyi (p)
Seans öncesi İMA	1	2	8,18	0,464
		3	21,93	0,018
	2	1	-8,18	0,464
		3	13,75	0,075
	3	1	-21,93	0,018
		2	-13,75	0,075
Seans sonrası İMA	1	2	8,93	0,228
		3	20,34	0,004
	2	1	-8,93	0,228
		3	11,41	0,054
	3	1	-20,34	0,004
		2	-11,41	0,054

* $p < 0,05$ seviyesinde ortalama farkları önemlidir.

4. TARTIŞMA

Ozon (O₃) kararsız yapılı bir moleküldür ve yaklaşık 20 dakika içerisinde daha kararlı olan oksijene dönüşebilir. Saf suda hemen çözünerek O₂ gazı oluşturmaya rağmen, biyolojik sıvılarda organik ve inorganik moleküllerle reaksiyona girerek serbest radikallerin oluşumuna neden olur (137).

Sıvılardaki çözünürlüğü oldukça fazla olan ozonun bir kısmı plazmada bulunan antioksidanlar ile reaksiyona girerek bunların miktarını azaltır. Bu anlık olaylar sırasında çeşitli ROS da oluşabilmektedir. Bu radikallerin yarı ömrü çok kısa olduğu için, kan daha hastaya geri verilemeden, yani ototransfüzyon esnasında önce ortadan kaldırılarak yerlerini lipid oksidasyon ürünlerine bırakırlar.

MAH esnasında uygulanan ozon/oksijen karışımındaki ozon, afinite 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, hidrojen peroksit ve hipoklorik asit gibi ROS oluşur. Bu reaksiyonlardan en önemlisi doymamış yağ asitlerinin oksidasyonudur. Lipid oksidasyon ürünlerinin yarı ömürleri saatlere varabilmektedir. ROS'un ömrü ise çok kısa olmasına rağmen LOP oluşumuna neden olduğu için ozonun gecikmiş etkilerinden de sorumlu tutulmaktadır. Uzun yarı ömürlerinden dolayı bu ürünler ototransfüzyon yoluyla dokulara ulaşarak buralarda çeşitli biyolojik etkiler gösterirler (48).

Otohemoterapi uygulamaları sırasında plazmada çözünen ozon burada bulunan antioksidanlar (bilirubin, askorbik asit, SH grubu taşıyan glutatyon ve albumin) ile reaksiyona girerek konsantrasyonlarını azaltmaktadır (138). Diğer taraftan, MAH sonucu ortaya çıkan ROS artışı ve antioksidanların azalması geçici bir durumdur. Bocci ve ark. yaptıkları çalışmada değişik dozlarda (20, 40, 60, 80 µg/ml) ozon uygulanmış kanlarda dozla doğru orantılı olarak glutatyon ve total antioksidan seviyesinde azalma, lipid peroksidasyonu ve okside glutatyon düzeyinde artma olduğunu göstermiş, uygulamanın 20 dakika sonrasında ise antioksidan düzeylerinin eski haline döndüğünü tespit etmişlerdir (21). Antioksidanlar çok hızlı bir şekilde

tükense de dehidroaskorbat, GSSG, α -tokoferil radikali ve lipoat döngüleri sayesinde tekrar normal konsantrasyonlarına dönebilirler (48).

Tedavi esnasında plazmada konsantrasyonu artan hidrojen peroksit kolayca hücrelerin içine diffüze olur. H_2O_2 her ne kadar hücre içine fazla miktarda girmiş olsa da; burada var olan serbest GSH, GSH-Px ve katalaz yoluyla redükte edilerek ancak birkaç mikromol konsantrasyonda kalır (139).

Oksidan moleküllerin hücrelerde SOD, GSH-Px, GSH-Rd ve katalaz gibi antioksidan nitelikli enzimlerde upregulasyon yaptığı belirtilmiştir. Bu olaylar LOP moleküllerinin hücre çekirdeğine girip promotorları aktivasyon/inaktivasyon yapmaları halinde gerçekleşmektedir. Zhang ve ark, HNE moleküllerinin glutamat sistein ligaz ekspresyonunu indükleyerek hücre içerisinde antioksidan savunmada önemli bir role sahip olan glutamati arttırdığını göstermişlerdir (140).

Önemli bir haberci olan H_2O_2 , kandaki mononükleer hücrelerin sitoplazmasına girerek sisteinli yapıları oksitler ve tirozin kinazı aktifleştirir. Bu yolla transkripsiyon faktörlerinden NF κ B faktörünü fosforilleyerek p50+p65 adlı heterodimer yapısının salınımını sağlar (2). Bu kompleks, nükleusa doğru hareket eder ve çok sayıda protein sentezinden sorumlu olan yüzlerce genin aktivitesini başlatır. Hücre tipine göre apoptozisten hücre ölümüne kadar çok sayıda fonksiyon gösterirler. İddiaya göre infeksiyöz hastalıklar, vaskular bozukluklar, immün sistemin baskılanması, dejeneratif hastalıklar, ortopedik patolojiler vb gibi durumlarda ozon, tedavi edici özelliğini yukarıda bahsedilen etkileri gerçekleştirerek sağlar (30).

Bocci'ye göre ozon tedavisi süresince LOP, akut oksidatif stresör olarak davranarak kemik iliğinde metalloproteinazların salınmasına neden olur. Metalloproteinazlardan özellikle MP-9, yaşamsal kök hücrelerinin dolaşıma geçmesini sağlar. Bu hücreler dolaşıma katıldığında ise travma ya da iskemik dejenerasyonun olduğu hasarlı bölgelerde görev alır (2).

Ancak tüm bu reaksiyonların oluşabilmesi için ozonun yeterli miktarda oksidan molekülleri üretmesi gerekir.

Yaptığımız çalışmaya göre ozon tedavisi yapıldıktan sonraki 10. dakikada alınan numunelerdeki total oksidan durumun (TOS) tedavi öncesine göre anlamlı düzeyde artması, ozonun oksidan yapılı olduğunu ve vücuttaki molekülleri oksitleyebildiğini göstermiştir. Bununla beraber serumda mevcut antioksidan miktarını gösteren TAS, tedavi sonrasında anlamlı düzeyde azalmıştır. Ozonun ilk olarak kanla muamelesinde oluşan H_2O_2 , hızlıca ortamdan uzaklaştırılmaya çalışılır. Bunu gerçekleştirebilecek yetenekte olan moleküller ise antioksidanlardır. H_2O_2 , plazmada bulunan albumin, ürik asit, bilirubin, glutatyon, α -lipoat, α -tokoferol, askorbat gibi moleküller aracılığıyla H_2O 'ya dönüştürülür. Her ne kadar in vivo ortamda yüksek miktarda antioksidan moleküller olsa da ozon, TAS seviyesini anlamlı düzeyde düşürmüştür. Tedavi sonrasındaki TOS düzeyindeki anlamlı artış ise ozonla oluşan ROS ve devamındaki LOP oluşumunun göstergesidir. Bu artış, ozonun fonksiyon göstermesi için gereklidir. Bocci'ye göre ozon ile oksidan moleküllere maruz kalmak, SOD, GSH-Rd, GSH-Px, katalaz gibi hücrelerin antioksidan savunmasını sağlayan enzimlerin upregülasyonunu uyarır. Ayrıca yaşlanma, kronik enfeksiyonlar, diyabet, ateroskleroz ve kanser gibi kronik oksidatif strese sebep olan durumlarda ozon ile aniden oksidasyonun artması ve antioksidanların azalmasına bağlı terapotik şok, bozulmuş oksidatif stres dengesinin tekrar kurulmasını sağlar (2).

Plazmadaki antioksidanlardan miktar olarak en fazla olanı albumindir. Plazmadaki moleküllerin büyük çoğunluğunu protein, protein yapıların ise %60'ını albumin oluşturur. Dolayısıyla albumin, vücuttaki en önemli antioksidandır denilebilir. Bir çok çalışmada primer olarak Kobalt, Bakır ve Nikel gibi metallerin albuminin amino terminali tarafından doğrudan bağlanabildiği gösterilmiştir (141). Ortamda reaktif oksijen türlerinin (H_2O_2 , OH^- , $\cdot O_2$) olması halinde ise albuminin N-terminal bölgesi bir takım biyokimyasal değişimlere uğramaktadır. Oluşan bu yeni yapı İMA olarak adlandırılır. İMA'nın serbest metallere olan bağlanma kapasitesi normal serum albuminine göre oldukça düşüktür (142). Oksidan molekül olan ozon ortamda yeterince ROS oluşmasını sağlamaktadır. Yaptığımız çalışmada ozon, tedavi sonrasında İMA seviyesini önemli derecede artırmıştır. Bunun anlamı albuminler, ozon tedavisinde oluşturulan serbest radikallerden etkilenip fonksiyonlarında azalma göstermişlerdir. Artan İMA seviyeleri, plazmada oksidan bir durum olduğunu ifade etmektedir. Ozonun da etkisini göstermesi, süper oksit radikallerini oluşturmasıyla başlar.

Tiyol grupları, reaktif oksijen türlerinin zararlı etkilerine karşı önemli bir koruyucudur. Tiyollerin plazmada yüksek düzeyde olması; glutatyonun yanı sıra, başta albümin olmak üzere, plazma proteinlerinde bulunan sistein ve metiyonine bağlıdır. Serbest radikallerin proteinlerdeki tiyol gruplarının oksidasyonuna yol açtığı gösterilmiştir. –SH gruplarının disüflitlere ve oksiasitler gibi diğer oksitlenmiş türevlere dönüşümü, radikal araçlı protein oksidasyonunun en erken gözlenebilen belirtisidir (143). Plazma tiyol düzeylerinin tayini, proteinlerin ROS aracılı oksidasyondan ne denli etkilendiklerini göstermesi bakımından önem taşımaktadır (117). Ozon ise, radikal özellik taşımasına karşın, florin ve persülfattan sonra, bilinen en güçlü üçüncü oksidan maddedir. Çalışmamızda oksidan olan bu molekülün kanla etkileşimi sonrasında TTL seviyelerini anlamlı düzeyde azalttığını gözlemledik. Plazmada bol miktarda bulunan total tiyol molekülleri oksitleyici ozonun oluşturduğu serbest radikalleri ortamdaki süpürmek için sülfid yapılarını kullanarak disülfid forma dönüşmüştür.

Proteinler, oksidanlara maruz kaldıklarında birçok kovalent değişikliğe uğrar. Bu değişikliklerden bazıları serbest radikallerin protein molekülü üzerine direkt etkileri sonucu oluşabildiği gibi, bazıları da oksidasyon yan ürünlerinin proteinlere kovalent bağlanması ile meydana gelir. Oksidatif stres sonrası proteinlerde disülfid yapıların oluşmasıyla agregasyonlar oluşur. AOPP'ler oksitlenme ile meydana gelen ditrozin içeren çapraz bağların olduğu protein ürünleri olup lipid oksidasyon ürünlerine kıyasla oksidatif stresin daha iyi belirteçleridir (72). Bu durum; ROS ile mücadelede proteinlerin fonksiyonlarının değiştiği gibi denatürasyona da uğrayabildiklerini göstermektedir. Yaptığımız çalışmada tedavi sonrasında artan İMA ve azalan TTL konsantrasyonları protein yapıların fonksiyonlarının azaldığını belirtir. Çalışmamıza, ozon tedavisinin ileri oksidasyonla fonksiyonu bozulan proteinleri denatüre edip etmediğini görmek için AOPP'yi de ekledik. Buna göre tedavi sonrasında AOPP düzeylerinde artış olsa da, istatistiksel olarak anlamlı değildir. Bu da okside olan proteinlerin denatüre olmadığını, irreversibl olarak oksitlenmediğini, antioksidanlar aracılığıyla tekrar redüktlenebileceğini gösterir.

Oksidanlara karşı savunma yalnızca moleküller ile değil enzimlerle de gerçekleşir. Paraoksonaz, paraoksonazın sodyumla stimülasyonu ile değerlendirilen

uyarılmış paraoksonaz ve arilesteraz, serumdaki fonksiyonları az bilinen antioksidanlardır. Bu enzimlerin genellikle okside LDL ve HDL ile olan ilişkileri bilinir ve bu konular hakkında onlarca yayın yazılmıştır. Bu yayınların konusu PON1'in lipit peroksidasyonunu azalttığı, LDL ve HDL'yi oksidasyondan koruduğu ve bu özelliği ile ateroskleroz riskini de azalttığı yönündedir (144,145). Ancak oksidatif stres altında sadece lipoproteinler değil, hücrenin yapısındaki lipidler de lipid peroksidasyonuna uğramaktadır. Ozonun vücuttaki moleküllerle reaksiyonu sonrasında oluşan H₂O₂ ve LOP ileri dönemde diğer moleküllerin denatürasyonuna ve hatta hücre ölümlerine neden olmaktadır. Bu nedenle özellikle okside lipidlerle mücadele eden antioksidanların önemi çoktur.

Yaptığımız çalışmada görevleri az bilinen bu antioksidan enzimlerin ozon verilmesi gibi akut bir durumda ne denli etkilendiğini inceledik. Tedaviden yaklaşık 10 dakika sonrasında alınan kanda enzimlerin aktivitesinin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldığını gözlemledik. Bazı çalışmalarda oksidatif streste oksidan moleküllerin PON1 enzimindeki sülfidril grupları ile etkileşime girerek enzimin inaktive olmasına yol açtığı bildirilmiştir (146). Çalışmamızda oksidan ajan olan ozonun neden olduğu enzim aktivitesindeki azalmanın sebebinin enzimlere antioksidan görevi veren sülfidril gruplarının yapısındaki değişmeler nedeniyle olduğunu düşündük. Ancak bu inaktivasyonlar, oksitleme ile olan terapötik şok için önemli ve gereklidir.

Çalışmamızın bir başka kolu da seanslara bağlı olarak varyansların incelenmesiydi. İlk kez ozon tedavisi alanlarda, 2–10 seans arası ozon tedavisi alanlarda ve 10+ ozon tedavisi alanlarda hem seans öncesindeki hem de seans sonrasındaki varyanslar istatistiksel olarak analiz edildi. Elde ettiğimiz bulgulara göre; 10 seanstan daha fazla tedavi alanlarda tedavi öncesinde de, tedavi sonrasında da İMA seviyeleri diğer seans sayılarına göre anlamlı düzeyde düşüktü. İMA, oksitlenmiş ve fonksiyonu bozulmuş albumin olup katılımcılarda ozon tedavileri boyunca seviyeleri artmıştır. Ancak 10 seans sonrasında ise İMA seviyeleri düşüşe geçmiştir. Esasen ozon tedavisin amacı periyodik seanslarla vücudu oksidan moleküllerle tanıştırmak ve “hormesis” adı verilen gerçekte toksin olan bir molekülün, toksik olmayan dozda kullanılmasıyla olumlu reaksiyon gösterecek şekilde organizmanın uyartılmasını sağlamaktır. 10 seanstan sonrasında anlamlı düzeyde İMA düşüklüğü de, ilk seanslarda

artış olmasına rağmen, zamanla vücutta antioksidan yapıların stimüle olarak ve albuminleri oksidan moleküllerden korumasına bağlı olarak azalması şeklinde açıklanmıştır.

Sonuç olarak ozonun moleküler, fizyolojik ve klinik etkilerinin ortaya çıkması için serbest radikallerin oluşturulması gerekir. Artık "ROS her zaman zararlıdır" hipotezi yerine immün cevapta, konak savunmasında önemli medyatörler olduğu; sinyal iletiminin düzenlenmesinde görevlerinin olduğu bilinmektedir. Hidrojen peroksit, en iyi bilinen ROS olup genel kabul görmüş, ana hücre içi sinyal moleküllerindedir. H₂O₂ düşük dozda olduğunda yukarıda sayılan etkileri gösterebilmektedir ancak yüksek dozda olması halinde ise hücre ölümlerine ya da karsinogeneze sebep olabilir. Antioksidan moleküllerin plazmadaki zararlı seviyedeki yüksek ROS konsantrasyonlarını aşağı çekerken, kendi konsantrasyonları da düşmektedir. Fakat H₂O₂ ve LOP sekonder mesajcılar olarak hücre zarından kolaylıkla geçip, antioksidan enzimlerin upregulasyonunu sağlar. Ozon tedavisi ile sağlanan bu akut oksidan stres ile oluşturulan efektif biyolojik yanıtlar yaşlanma, kronik enfeksiyonlar, diyabet, ateroskleroz, kronik yaralar, dejeneratif süreçler ve kanserdeki kronik oksidatif stresi "tedavi edici şok" özelliği sayesinde homeostatik yöne çevirebilir. Burada önemli olan az fakat yeterli miktarda doz maruziyetidir. Modern tıbbın kurucularından Paracelsus'un (1493–1541) dediği gibi "Herşeyde zehir vardır ve hiçbirşey zehirsiz değildir. Bir şeyi, zehir yada ilaç yapan onun dozudur" (147).

5. KAYNAKLAR

1. http://en.wikipedia.org/wiki/Ozone_layer , Ozone Layer, 10.05.2013
2. Bocci V. Scientific and medical aspects of ozone therapy. state of the art. Archives of Medical Research. 2006;37:425–435.
3. Azarpazhooh A, Limeback H. The application of ozone in dentistry: A systematic review of literature. Journal of Dentistry, 2008; 36: 104–16.
4. Heng S, Yeung KL, Djafer M, Schrotter J.C. A novel membrane reactor for ozone water treatment. J Membr Sci, 2007;289: 67–75.
5. Loncar M, Stipetic D., Matosevic Z., Ozone Application in Dentistry. Archives of Medical Research 2009; 40: 136–7.
6. Bocci V. Ozone as Janus: this controversial gas can be either toxic or medically useful. Mediators Inflamm. 2004;13(1):3–11.
7. http://www.siemens.com/history/pool/perseunlichkeiten/gruendergeneration/werner_von_siemens_en.pdf, Werner von Siemens, 10.05.2013
8. <http://ozofresh.co.uk/the-ozone-timeline-the-full-history-of-ozone.html>, The Full History of ozone, 10.05.2013
9. Baysan A, Whiley RA, Lynch E. Antimicrobial effect of a novel ozone-generating device on micro-organisms associated with primary root carious lesions in vitro. Caries Res 2000; 34: 498–501.
10. Wolff HH. Die Behandlung peripherer Durchblutungsstörungen mit Ozon. Erfahr-Heilkd. 1974;23:181–184.
11. 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.
12. Viebahn-Haensler R. Ozonun Tıpta Kullanımı. 4. Baskı, İstanbul, Yelken Basım, 2006.
13. Edward L. Ozone: The revolution in dentistry., Quintessence Publishing Co. Ltd; London, 2004.
14. Rice-Evans C, Miller NJ. Total antioxidant status in plasma and body fluids. Methods Enzymol. 1994;234:279–93.
15. 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.
16. Bocci V. Oxygen-ozone therapy: a critical evaluation. Springer, 2002.p.1-8
17. 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.
18. Velio Alvaro Bocci. Scientific and Medical Aspects of Ozone Therapy. State of the Art, Archives of Medical Research. 37 (2006) 425–435
19. Rilling S. The basic clinical applications of ozone therapy. Ozonachrichten 1985;4:7–17.
20. Di Paolo N, Bocci V, Garosi G, Borrelli E, Bravi A, Bruci A, Aldinucci C, Capotondo L. Extracorporeal blood oxygenation and ozonation (EBOO) in man. Int J Artif Organs 2000;23:131–41
21. Bocci V, Aldinucci C. Biochemical modifications induced in human blood by oxygenation-ozonation. J Biochem Mol Toxicol. 2006;20(3):133–8
22. Görgü N, Tavşan Böbrek Dokusunda ESWL İle İndüklenen Oksidatif Hasar Üzerine Antioksidan (Taurin) ve Ozon Terapi Etkilerinin Biyokimyasal Ve

Histomorfometrik Karşılaştırılması, Uzmanlık Tezi, Kırıkkale, 2011

23. Rakovsky S ve Zaikov G, Application Of Ozone In Medicine, Chemistry & Chemical Technology, 2009 Vol. 3, No. 3
24. Sagai M ve Bocci V. Mechanisms of Action Involved in Ozone Therapy: Is healing induced via a mild oxidative stress? Medical Gas Research 2011, 1:29
25. Ramirez D, González R, Merino N, Rodriguez S, Ancheta O. Inhibitory effects of Spirulina in zymosan-induced arthritis in mice. Mediators Inflamm 2002;11:75–79.
26. Güler Ö. Alt Ekstremitenin Kronik İskemik Hastalıklarında Ozon Tedavisi, Lumbal Sempatik Sinir Bloğu ve Lumbal Sempatik Sinir Bloğu ile Birlikte Ozon Tedavisinin Karşılaştırılması, Uzmanlık Tezi, Sivas, 2008
27. Bocci V. Biological and clinical effects of ozone. Has ozone therapy a future in medicine. British Journal of Biomedical Science. 1999;56:270–279
28. Rokitansky O, Rokitansky A, Steiner J, ve ark. Ozontherapie bei peripheren, arteriellen. Durchblutungsstörungen: klinik, biochemische und blutgasanalytische untersuchungen. In: Wasser, IOA, ed. Ozon-Weltkongress. Berlin. 1981:53–75
29. Valacchi G, Bocci V. Studies on the biological effects of ozone: 10. Release of factors from ozonated human platelets. Mediators Inflamm. 1999;8(4–5):205–9.
30. Bocci V. A reasonable Approach for the Treatment of HIV Infection in the Early Phase with Ozonotherapy (Autohaemotherapy). How 'Inflammatory' cytokines may have A therapeutic Role Mediators of Inflammation. 1994,3, 315–321
31. Bocci V. Ozonotherapy as a Possible Biological Response Modifier in Cancer Forsch Komplementärmed 1998;5:54–60
32. Sharma Y.K, Léon J, Raskin I, Davis K.R, Ozone-induced responses in Arabidopsis thaliana: the role of salicylic acid in the accumulation of defense-related transcripts and induced resistance, Proc Natl Acad Sci USA. 1996 May 14; 93(10): 5099–5104.
33. Sandermann H, Ernst D, Heller W, Langebartels C, Ozone: an abiotic elicitor of plant defence reactions, Trends in Plant Science, Volume 3, Number 2, February 1998, pp.47–50(4)
34. Christman MF, Morgan RW, Jacobson FS, Ames BN, Positive control of a regulon for defenses against oxidative stress and some heat-shock proteins in Salmonella typhimurium. Cell. 1985 Jul;41(3):753–62
35. Spitz DR, Dewey WC, Li GC, Hydrogen peroxide or heat shock induces resistance to hydrogen peroxide in Chinese hamster fibroblasts. J Cell Physiol. 1987 Jun;131(3):364–73.
36. Rahman I, Clerch LB, Massaro D. Rat lung antioxidant enzyme induction by ozone. Am J Physiol. 1991 Jun;260(6 Pt 1):L412–8.
37. 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 Feb;46(2):150–4.
38. Spector A, Oxidative stress-induced cataract: mechanism of action, Faseb J. 1995 Sep;9(12):1173–82
39. Doğan H, Gonartrozda Ozon Tedavisi, Medikal Ozon Oksijen Derneği www.moder.org.tr, 10.05.2013

40. Wang YM, Cai ZM, Lu YH, Medical ozone injection at lumbar Jiaji (EX-B2) points for 100 cases of lumbar vertebrae disc. *Zhongguo Zhen Jiu*. 2012 Oct;32(10):939–40.
41. Melchionda D, Milillo P, Manente G, Stoppino L, Macarini L. Treatment of radiculopathies: a study of efficacy and tollerability of paravertebral oxygen-ozone injections compared with pharmacological anti-inflammatory treatment. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2012 Jul-Sep;26(3):467–74.
42. Bocci V. Ipotetici meccanismi di azione dell'ozono nel trattamento del conflitto discoradicolare. In: *Lombalgie e lombosciatalgie. Criteri di diagnosi e cura*, edited by F. Ceccherelli and A. Ricciardi. Torino: Edizioni Libreria Cortina, 1998, p. 331–340.
43. Stübinger S, Sader R, Filippi A. The use of ozone in dentistry and maxillofacial surgery: a review. *Quintessence Int* 2006;37:353–359.
44. Nogales CG, Ferrari PH, Kantorovich EO, Lage-Marques JL. Ozone therapy in medicine and dentistry. *J Contemp Dent Pract* 2008;9:75–84.
45. Martínez-Sánchez G, Al-Dalain SM, Menéndez SRL, Giuliani A, Candelario-Jalil E, Alvarez H, Fernández-Montequín JI ve ark. Therapeutic efficacy of ozone in patients with diabetic foot. *Eur J Pharmacol* 2005;523:151–61.
46. 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 Dec;13(12):1255–60.
47. 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
48. Bocci V. Is it true that ozone is always toxic? The end of a dogma *Toxicology and Applied Pharmacology* 216 (2006) 493– 504
49. Bocci V. *Ozone a new medical drug*. Dordrecht, Springer, 2005.
50. Bocci, *Physical-Chemical Properties of Ozone. Natural Production of Ozone. The Toxicology of Ozone. Ozone a New Medical Drug*, Springer,2011 10.1007/978-90-481-9234-2_1
51. Ruidavets JB, Cournot M, Cassadou S, Giroux M, Meybeck M, Ferrieres J. Ozone air pollution is associated with acute myocardial infarction. *Circulation*. 2005.111, 563–569
52. Gohil K, Cross CE, Last JA. Ozone-induced disruptions of lung transcriptomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2003, 305, 719–728.
53. Fakhrzadeh L, Laskin JD, Laskin DL. Deficiency in inducible nitricoxide synthase protects mice from ozone-induced lung inflammation and tissue injury. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol*. 2002, 26, 413–419.
54. Mehlman MA, Borek C. Toxicity and biochemical mechanisms of ozone. *Environ. Res*. 1987, 42, 36–53.
55. Mustafa MG. Biochemical basis of ozone toxicity. *Free Radical Biol. Med*. 9, 1990, 245–265.
56. U.S. Environmental Protection Agency, USA; 2005
57. Pryor WA, Squadrito GL, Friedman M. The cascade mechanism to explain ozone toxicity: the role of lipid ozonation products. *Free Radical Biol. Med*. 19,1995, 935–941.
58. Lander HM. An essential role for free radicals and derived species in signal transduction. *Faseb J*. 1997 Feb;11(2):118–24.

59. Sundaresan M, Yu ZX, Ferrans VJ, Irani K, Finkel T. Requirement for generation of H₂O₂ for platelet-derived growth factor signal transduction. *Science* 270, 1995, 296–299
60. Weiss C, Coosen B, Doppler W, Fuchs D, Pantopoulos K, Werner-Felmayer C. ve ark. Translational regulation via iron response elements by the nitric oxide/NO-synthase pathway. *EMBO* 3. 1993 ,12. 3651-3657
61. Bolotina VM, Najibi S, Placino JJ, Pagano P, Cohen RA. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle cells. *Nature, London*,368, 1994, 850–853
62. Meffert MK, Calakos NC, Scheller BH, Schulman H. Nitric oxide modulates synaptic vesicle docking/fusion reactions. *Neuron*.16, 1996,1229–1236.
63. Sözmen EY, Onat T, Emerk K, Sözmen ET. Yaşlanma Biyokimyası. İnsan Biyokimyası. Ankara, 2002;667–672.
64. Var A. Kronik böbrek yetmezlikli hastalarda oksidan ve antioksidan sistemlerin incelenmesi. Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Bölümü, Uzmanlık Tezi, Elazığ 1999.
65. Nordberg J, Arnér ES. Reactive oxygen species, antioxidants and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med* 2001;31:1287– 1312.
66. McCord JM. The evolution of free radicals and oxidative stress. *Am J Med* 2000;108:652–659.
67. Liochev SI. Reactive oxygen species and the free radical theory of aging, *Free Radic Biol Med*. 2013 Feb 19. pii: S0891–5849
68. Davies MJ. Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;305:761–770.
69. Packer L, Sies H. Singlet Oxygen, UV-a and Ozone, *Methods in Enzimology*, Academic Pres, Volume 319, 2000
70. Cheeseman KH, Slater TF. An Introduction to Radical Biochemistry. *Br Med Bull* 1993;49:481–493.
71. Garcia X, Stein F. Nitric oxide. *Semin Ped Infect Dis* 2006;17:55–57.
72. Uluçay C. Preeklampside Endotel Disfonksiyonu ve İskemi Modifiye Albümin Düzeyleri, Yüksek Lisans Tezi, Kayseri, 2007.
73. Shacter E. Protein oxidative damage. *Methods Enzymol* 2000; 319: 428–436.
74. Witko-Sarsat V, Friedlander M, Capeillere-Blandin C, Khoa N, Nguyen AT, Zingraff J ve ark. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia, *Kidney International*, Vol. 49 (1996), PP. 1304–1313.
75. Basaga H, Telci D, Kutuk O. Lipid Peroxidation, Gene Expression, and Resveratrol: Implications in Atherosclerosis, *Phytochemicals, Nutrient-Gene Interactions*, CRC Press 2006;61–81.
76. Yael R, Guy C, Ofer S, Shlomo S. Signaling and cytotoxic functions of 4-hydroxyalkenals, *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 2010, 299: E879–E886.
77. Weisser B, Locher R, Mengden T, Vetter W. Oxidation of low density lipoprotein enhances its potential to increase intracellular free calcium concentration in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler. Thromb* 1992, 12:231–236.
78. Suc I, Meilhac OI, Lajoie-Mazenc j, Vandaele G, Jurgens R, Salvayre A ve ark. Activation of EGF receptor by oxidized LDL. *Faseb J*.

- 1998, 12:665–671.
79. Maziere C, Djavaheri M, Mergny V, FreyFressart J, Delattre J, Maziere C. Copper and cell-oxidized low-density lipoprotein induces activator protein 1 in fibroblasts, endothelial and smooth muscle cells. *Febs Letters* 1997, 409:351–356.
 80. Tontonoz P, Nagy L, Alvarez JG, Thomazy VA, Evans RM. PPAR-gamma promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. *Cell* 1998; 93:241–252.
 81. Nagy L, Tontonoz P, Alvarez J, Chen H, Evans RM. Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPAR gamma. *Cell* 1998;93:229–240.
 82. Ross R. Cell biology of atherosclerosis. *Annu. Rev. Physiol* 1995;57:791–804.
 83. Brown AJ, Leong SL, Dean RT, Jessup W. 7-Hydroperoxycholesterol and its products in oxidized low density lipoprotein and human atherosclerotic plaque. *J. Lipid Res.* 1997;38:1730–1745.
 84. Kraemer R, Pomerantz KB, Joseph-Silverstein J, Hajjar DP. Induction of basic fibroblast growth factor mRNA and protein synthesis in smooth muscle cells by cholesteryl ester enrichment and 25-hydroxycholesterol. *J. Biol. Chem.* 1993; 268:8040–8045.
 85. Kutuk O, Adli M, Poli G, Basaga H. Resveratrol protects against 4-HNE induced oxidative stress and apoptosis in Swiss 3T3 fibroblasts. *Biofactors* 2004;20:1–10.
 86. Parola M, Pinzani M, Casini A, Albano E, Poli G, Gentilini A ve ark. Stimulation of lipid peroxidation or 4-hydroxynonenal treatment increases procollagen alpha 1 gene expression in human liver fat-storing cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1993;194:1044–1050.
 87. Kim SJ, Denhez F, Kim KY, Holt JT, Sporn MB, Roberts AB. Activation of the second promoter of the transforming growth factor-beta 1 gene by transforming growth factor-beta 1 and phorbol ester occurs through the same target sequences. *J. Biol. Chem* 1989; 264:19373–19378.
 88. Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic. Biol. Med.* 1991;11:81–128.
 89. Dianzani MU. 4-Hydroxynonenal and cell signalling. *Free Radic. Res.*1998;28:553–560.
 90. Smith RG, Henry YK, Mattson MP, Appel SH. Presence of 4-hydroxynonenal in cerebrospinal fluid of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* 1998;44:696–699.
 91. Jin Y, Barbara F. Depletion of Glutathione Induces 4-Hydroxynonenal Protein Adducts and Hydroxyurea Teratogenicity in the Organogenesis Stage Mouse Embryo, *The Journal Of Pharmacology And Experimental Therapeutics*, 2006;319:613–621,
 92. Meeusen T, Mertens I, De Loof A, Schoofs L. G protein-coupled receptors in invertebrates: a state of the art. *International Review of Cytology A Survey of Cell Biology*, 2003; Vol 230 230:189
 93. Ruef J, Moser M, Kubler W, Bode C. Induction of endothelin-1 expression by oxidative stress in vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc. Pathol.*

- 2001;10:311–315.
94. Poli G, Schaur RJ. 4-Hydroxynonenal in the pathomechanisms of oxidative stress. *IUBMB Life* 2000; 50, 315–321.
 95. Go YM, Halvey PJ, Hansen JM, Reed M, Pohl J, Jones DP. Reactive aldehyde modification of thioredoxin–1 activates early steps of inflammation and cell adhesion. *Am J Pathol* 2007;171: 1670–1681.
 96. Szweda LI, Uchida K, Tsai L, Stadtman ER. Inactivation of glucose 6-phosphate dehydrogenase by 4-hydroxy–2-nonenal. Selective modification of an active-site lysine. *J Biol Chem* 1993;268: 3342–3347.
 97. Finkelstein EI, Ruben J, Koot CW, Hristova M, van der Vliet A. Regulation of constitutive neutrophil apoptosis by the α , β -unsaturated aldehydes acrolein and 4-hydroxynonenal. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 289: L1019–L1028, 2005.
 98. Petersen DR, Doorn JA. Reactions of 4-hydroxynonenal with proteins and cellular targets. *Free Radic Biol Med* 37: 937–945, 2004.
 99. Schaur RJ. Basic aspects of the biochemical reactivity of 4-hydroxynonenal. *Mol Aspects Med* 24: 149–159, 2003
 100. Bacot S, Bernoud-Hubac N, Baddas N, Chantegrel B, Deshayes C, Doutheau A, Lagarde M, Guichardant M. Covalent binding of hydroxy-alkenals 4-HDDE, 4-HHE, and 4-HNE to ethanolamine phospholipid subclasses. *J Lipid Res* 44: 917–926, 2003.
 101. Yang Y, Sharma A, Sharma R, Patrick B, Singhal SS, Zimniak P ve ark. Cells preconditioned with mild transient UVA irradiation acquire resistance to oxidative stress and UVA-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 278, 41380–41388;2003.
 102. Zhang H, Liu H, Iles KE, Liu RM, Postlethwait EM, Laperche Y ve ark. 4-hydroxynonenal induces rat gamma-glutamyl transpeptidase through mitogen-activated protein kinase-mediated electrophile response element/nuclear factor erythroid 2-related factor 2 signaling. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2006;34, 174–181.
 103. Halliwell B. Reactive oxygen species in living system: source, biochemistry and role in human disease. *Am J Med* 1991; 91:14–21.
 104. http://en.wikipedia.org/wiki/Superoxide_dismutase
 105. Bruce AF, Crapo JD. Biology of disease; free radicals and tissue injury. *Lab Invest* 1982; 47: 412–426.
 106. Poranen AK, Ekblad U, Uotila P, Ahotupa M. Lipid peroxidation and antioxidant in normal and preeclamptic pregnancies. *Placenta* 1996; 17(7): 401–405.
 107. Antmen ŞE. Beta Talasemide Oksidatif Stres, Yüksek Lisans Tezi, Adana, 2005
Xia L, Björnstedt M, Nordman T, Eriksson L.C, Olsson J.M. Reduction of ubiquinone by lipoamide dehydrogenase. An antioxidant regenerating pathway. *Eur. J. Biochem.* 2001; 268:1486– 1490
 108. Mackness B. PONs and Atherosclerosis, *The Paraoxonases: Their Role in Disease Development and Xenobiotic Metabolism, Proteins And Cell Regulation*, Springer, Volume 6, 2006
 109. Mackness B. Durrington PN, Mackness MI. Human serum paraoxonase. *Gen Pharmacol* 1998; 31: 329–336

111. Yıldırım A, Aslan Ş, Ocak T, Yıldırım S, Kara F, Şahin YN. Travmalı Hastalarda Serum Paraoksonaz/Arilesteraz Aktiviteleri ve Malondialdehit Düzeyleri, *The Eurasian Journal of Medicine*, Araştırma Yazısı, 2007
112. Burtis CA, Ashwood ER. Vitaminler. Aslan D. Eds. *Klinik Kimyada Temel İlkeler*. Ankara: Palme Yayınları, 2005: 548–550,332–333,578–601.
113. Nijveldt RJ, Noad E, Hoarn DEC, Boelens PG, Norren K, Leeuwen PAM. Flavonoids: a review of probable mechanism of action and potential applications. *Am J Clin Nutr*. 2001;74:418–425
114. Onat T, Erk K. Sözman Y.E. *İnsan Biyokimyası*. Ankara: Palme Yayıncılık. 2002: 135,535–536.
115. Becker MA, Roessler BJ, Hyperuricemia and Gout. In Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, New York: 7th Ed. McGraw-Hill,1995:1655–1677
116. Daimon M, Hama K, Susa S, Kimura M, Yamatani K, Ohnuma H ve ark. Hyperglycemia is a factor for an increase in serum ceruloplasmin in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 1998;21:1525–1528
117. Özşahin EA, Yazıcı C, Köse K, Utaş C, Tokgöz B. Hemodiyaliz Hastalarında Plazma Malondialdehit Ve Tiyol Seviyeleri, *Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi (E.Ü.Journal of Health Sciences)* 2004;13(2) 8–14,
118. Bocci V, Borrelli E, Travagli V, Zanardi I. The Ozone Paradox: Ozone Is a Strong Oxidant as Well as a Medical Drug *Med Res Rev*. 2009 Jul;29(4):646–82. doi: 10.1002/med.20150. Review
119. Halliwell B, Clement MV, Long LH. Hydrogen peroxide in the human body. *FEBS Lett* 2000;486:10–13
120. Ardanaz N, Pagano PJ. Hydrogen peroxide as a paracrine vascular mediator: Regulation and signaling leading to dysfunction. *Exp Biol Med* 2006;231:237–251.
121. Toyokuni S, Yamada S, Kashima M, Ihara Y, Yamada Y, Tanaka T ve ark. Serum 4-hydroxy-2-nonenal-modified albumin is elevated in patients with type 2 diabetes mellitus. *Antioxid Redox Signal* 2000;2:681–685.
122. Finkelstein EI, Ruben J, Koot CW, Hristova M, van der Vliet A. Regulation of constitutive neutrophil apoptosis by the α , β -unsaturated aldehydes acrolein and 4-hydroxynonenal. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 289: L1019–L1028, 2005.
123. Piga R, Saito Y, Yoshida Y, Niki E. Cytotoxic effects of various stressors on PC12 cells: Involvement of oxidative stress and effect of antioxidants, *NeuroToxicology* 28;2007;67–75
124. Yang Y, Sharma A, Sharma R, Patrick B, Singhal SS, Zimniak P ve ark. Cells preconditioned with mild transient UVA irradiation acquire resistance to oxidative stress and UVA-induced apoptosis. *J. Biol. Chem*. 2003;278, 41380–41388.
125. Pecorelli A, Bocci V, Acquaviva A, Belmonte G, Gardi C, Virgili F ve ark. NRF2 activation is involved in ozonated human serum upregulation of HO-1 in endothelial cells *Toxicol Appl Pharmacol*. 2013 Feb 15;267(1):30–40. doi: 10.1016/j.taap.2012.12.001. Epub 2012 Dec 16.
126. Babacan A. Ozon, Ozonterapi ve Klinik Kullanımı, *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 2008;28(Suppl):S245-S247

127. Witko-Sarsat V, Friedlander M, Capeillere-Blandin C, Nguyen Khoa T. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int* 1996; 49: 1304–1313
128. Bhagavan NV, Lai EM, Rios P. Evaluation of Human Serum Albumin Cobalt Binding Assay for the Assessment of Myocardial Ischemia and Myocardial Infarction. *Clin Chem*. 2003; 49:4, 581–585.
129. Bar-Or, Lau E, Winkler JV. A novel marker for cobalt-albumin binding and its potential as a marker for myocardial ischemia-a preliminary report *J Emerg Med* 2000; 19: 311–315.
130. Halliwell B, Gutteridge JMC, editors. *Free radicals in biology and medicine*. Third ed. Oxford: Oxford Science Publications; 2000. p. 617–24.
131. Erel Ö. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status, *Clinical Biochemistry* 38 (2005) 1103–1111
132. Erel Ö. A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions, *Clinical Biochemistry* 37 (2004) 112–119
133. Kosecik M, Erel O, Sevinc E, Selek S. Increased oxidative stress in children exposed to passive smoking. *Int J Cardiol* 2005;100:61–64.
134. Hu ML, Louie S, Cross CE, Motchnik P, Halliwell B. Antioxidant protection against hypochlorous acid in human plasma. *J Lab Clin Med* 1993; 121: 257–262
135. Haagen L, Brock A. A new automated method for phenotyping arylesterase E.C.3.1.1.2.) based upon inhibition of enzymatic hydrolysis of 4-nitrophenyl acetate by phenyl acetate. *Eur J. Clin Chem Clin Biochem*. 1992;30:391–5.
136. Eckerson HW, Wyte MC, La Du BN. The human serum paraoxonase/arylesterase polymorphism. *Am J Hum Genet*. 1983;35:1126–38
137. Heng S, Yeung KL, Djafer M, Schrotter J-C. A novel membrane reactor for ozone water treatment. *J Membr Sci* 2007;289: 67–75
138. Travagli V, Zanardi I, Silvietti A, Bocci V. A physicochemical investigation on the effects of ozone on blood. *Int J Biol Macromol* 2007;41:504–511.
139. Bocci V, Aldinucci C. The use of hydrogen peroxide as a medical drug. *Riv. Ital. Ossigeno-Ozonoter*. 2005,4, 30–39.
140. Zhang H, Liu H, Iles KE, Liu RM, Postlethwait EM, Laperche Y, Forman HI: 4-hydroxynonenal induces rat gamma-glutamyl transpeptidase through mitogen-activated protein kinase-mediated electrophile response element/nuclear factor erythroid 2-related factor 2 signaling. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2006, 34: 174–181.
141. Gallisteo ML, Mateo PL, Sanchez-Ruiz JM. Kinetic study on the irreversible denaturation of yeast phosphoglycerate kinase. *Biochemistry*. 1991;30:2061–2066.
142. Çetinkaya Y. Koroner Arter Hastalığı Tanısında Efor Testi ve İskemi-Modifiye Albuminin Birlikte Kullanımı, *Tıpta Uzmanlık Tezi, Kayseri–2006*
143. Netto LES, Kowaltowski AJ, Castillo RF, Vercesi AE. Thiol enzymes protecting mitochondria against oxidative damage. *Methods Enzymol* 2002; 348: 260–270.

144. Cao H. Paraoxonase protection of LDL against peroxidation. *J Lipid Res.* 1999.40;133–139
145. Harel M, Aharoni A, Gaidukov L. ve ark. Structure and evolution of the serum paraoxonase family of detoxifying and anti-atherosclerotic enzymes. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2004; 11, 412–419
146. Öztürk H, Diabetes Mellitus’da Paraoksonaz Aktivitesi Ve Aopp Düzeyleri, Tıpta Uzmanlık Tezi, İstanbul, 2008
147. <http://en.wikipedia.org/wiki/Paracelsus>
148. Keklikoğlu N. c-Fos Gene and Fos Proteins. *Cerrahpaşa J Med.* 2004; 35.
149. Uchida K, Shiraishi M, Naito Y, Torii Y, Nakamura Y, Osawa T. Activation of Stress Signaling Pathways by the End Product of Lipid Peroxidation 4-hydroxy-2-nonenal is a potential inducer of intracellular peroxide production the journal of biological chemistry, *The Journal of Biological Chemistry*, January 22, 1999, 274, 2234–2242.



ÖZGEÇMİŞ

Semra IŞIKOĞLU, 1984 yılında Ankara’da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Ankara’da tamamladı. 2002 yılında başladığı Gazi Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümündeki eğitimini 2006 yılında tamamladı. Tıpta Uzmanlık Sınavı’nı kazanarak 2009 yılından beri Ankara Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi Biyokimya Bölümü’nde uzmanlık eğitimi devam etmektedir.

