

**T.C.
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ANESTEZİYOLOJİ VE REANİMASYON ANABİLİM DALI**

**VENTİLE EDİLEN RATLARDA İNTRAABDOMİNAL BASINÇ ARTIŞINA BAĞLI
GELİŞEN AKCİĞER HASARINI ÖNLEMEDE MEDİKAL OZONUN ETKİSİ**

**THE EFFECTIVITY OF MEDICAL OZONE ON PREVENTING LUNG
INJURY RELATED TO INCREASED INTRAABDOMINAL PRESSURE IN
VENTILATED RATS**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Şahin ÖMÜR

TRABZON - 2014

**T.C.
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ANESTEZİYOLOJİ VE REANİMASYON ANABİLİM DALI**

**VENTİLE EDİLEN RATLARDA İNTRAABDOMİNAL BASINÇ ARTIŞINA BAĞLI
GELİŞEN AKCİĞER HASARINI ÖNLEMEDE MEDİKAL OZONUN ETKİSİ**

**THE EFFECTIVITY OF MEDICAL OZONE ON PREVENTING LUNG
INJURY RELATED TO INCREASED INTRAABDOMINAL PRESSURE IN
VENTILATED RATS**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Şahin ÖMÜR

**TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Şükran GEZE**

TRABZON - 2014

ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım K.T.Ü. Tıp Fakültesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon AD Başkanı **Prof. Dr. Ahmet EROĞLU'na**, **Prof. Dr. İbrahim ÖZEN'e**, **Prof. Dr. Nesrin ERCEYES'e**, **Prof. Dr. Ahmet Can ŞENEL'e**, **Prof. Dr. Erdem Nail DUMAN'a**, **Doç. Dr. Hülya ULUSOY'a**, **Doç. Dr. Engin ERTÜRK'e**, **Doç. Dr. Bahanur ÇEKİÇ'e**, **Yrd. Doç. Dr. Davut DOHMAN'a**, **Yrd. Doç. Dr. Mehmet Salih ÇOLAK'a**, **Yrd. Doç. Dr. Müge KOŞUCU'ya**, **Öğrt. Gör. Dr. Ahmet BEŞİR'e** ve **Öğrt. Gör. Dr. Dilek KUTANİS'e**;

Ayrıca tezimin her aşamasında ve ihtisasım süresince sabır ve hoş görüşle, bilgi ve becerisini benimle paylaşan tez hocam **Doç. Dr. Şükran GEZE'ye**;

Tez çalışmamın histopatolojik incelemesinde bilgi ve yardımlarını esirgemeyen **Prof. Dr. Esin YULUĞ'a**;

Yoğun çalışma temposunda beraber çalıştığım dostluk ve yardımlarını esirgemeyen tüm asistan arkadaşlarıma ve tüm çalışma arkadaşlarıma;

Her zaman yanımda olan ve beni bu süreçte daima sabırla destekleyen aileme;

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Şahin ÖMÜR

Trabzon, 2014

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖNSÖZ.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
TABLolar DİZİNİ.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
RESİMLER DİZİNİ.....	vii
KISALTMALAR.....	viii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Pnömooperitonyum.....	3
2.1.1. Pnömooperitonyumun Sistemik Etkileri.....	3
2.1.2. Pnömooperitonyumun Solunum Sistemine Etkileri.....	3
2.2. İskemi-Reperfüzyon Hasarı.....	4
2.2.1. İskemi-Reperfüzyon Hasarında Serbest Radikallerin Rolü.....	6
2.2.2. Antioksidan Sistemler.....	6
2.2.3. İskemi-Reperfüzyon Hasarının Akciğerdeki Etkileri.....	7
2.2.4. İskemi Reperfüzyon Hasarının Belirlenmesi.....	8
2.3. Medikal Ozon.....	9
2.3.1. Medikal Ozonun Özellikleri.....	9
2.3.2. Medikal Ozonun Etki Mekanizması.....	9
2.3.3. Medikal Ozon Tedavisinin Klinik Uygulamaları.....	11
2.3.4. Medikal Ozon Tedavisinin Yan Etki ve Kontrendikasyonları.....	11
3. MATERYAL VE METOD.....	12
3.1. Gruplar.....	13
3.2. Anestezi ve Deneysel Prosedür.....	14
3.3. Biyokimyasal Parametrelerin Ölçülmesi.....	16
3.3.1. İskemi Modifiye Albumin (İMA) Düzeyinin Belirlenmesi.....	16
3.3.2. Doku Malondialdehit (MDA) Düzeyinin Belirlenmesi.....	16
3.4. Doku Örneklerinin Histopatolojik İncelemesi.....	18
3.4.1. Doku Örneklerinin Hazırlanması ve Değerlendirilmesi.....	18

3.5. İstatistiksel Analiz	19
4. BULGULAR	20
4.1. Biyokimyasal Parametrelerin Değerlendirilmesi	20
4.1.1. Plazma İMA Sonuçları	20
4.1.2. Akciğer Doku MDA Sonuçları	21
4.2. Histopatolojik Sonuçların Değerlendirilmesi	22
4.2.1. Alveolar Yapıda Bozulma	26
4.2.2. Vasküler Konjesyon	27
4.2.3. Hemoraji	28
4.2.5. İnflamatuvar Hücre İnfiltrasyonu	31
5. TARTIŞMA	33
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	39
7. ÖZET	41
8. SUMMARY	42
9. KAYNAKLAR	43

TABLULAR DİZİNİ

	Sayfa No
Tablo 1. Akciğer Hasarının Mikroskopik Skorlama Kriterleri	18
Tablo 2. Plazma İMA Değerleri.....	20
Tablo 3. Akciğer Doku MDA Değerleri	21
Tablo 4. Akciğer Histopatolojik İncelenmesinde Hasar Skorlaması	26
Tablo 5. Alveolar Yapıda Bozulma	26
Tablo 6. Vasküler Konjesyon	27
Tablo 7. Hemoraji	28
Tablo 8. Alveolar Ödem	30
Tablo 9. İnflamatuvar Hücre İnfiltrasyonu	31

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No
Şekil 1. Hücre Zedelenmesinde Sitoplazmik Kalsiyum Artışının Kaynakları ve Sonuçları	5
Şekil 2. Süperoksit Radikalleri Oluşturan Oksijen Metabolitleri	6
Şekil 3. Ozon Tedavisinin Etkileri.....	11
Şekil 4. Akciğer MDA Doku Standart Grafiği	17
Şekil 5. Grupların Ortalama Plazma İMA Değerleri (p<0,05).	21
Şekil 6. Grupların Ortalama Akciğer MDA Değerleri. (p= 0,125).....	22
Şekil 7. Grupların Alveolar Yapıda Bozulma Açısından Ortalama Hasar Düzeyleri	27
Şekil 8. Grupların Vasküler Konjesyon Açısından Ortalama Hasar Düzeyleri.....	28
Şekil 9. Grupların Hemoraji Açısından Ortalama Hasar Düzeyleri	29
Şekil 10. Grupların Alveolar Ödem Açısından Ortalama Hasar Düzeyleri.....	30
Şekil 11. Grupların İnflamatuvar Hücre İnfiltrasyonu Açısından Ortalama Hasar Düzeyleri	32

RESİMLER DİZİNİ

	Sayfa No
Resim 1. Ratların Cinsi	13
Resim 2. Ratların Ventile Edilmesi	14
Resim 3. Ratlara Pnömooperitonyum Uygulanması.....	15
Resim 4. Grup I'e Ait Akciğer Dokularında Normal Alveolar Yapı (▲) İzlendi (H&E X200).	23
Resim 5. Grup II'ye Ait Akciğer Dokusunda Yaygın İnteralveolar Ödem (*), İnteralveolar Hemoraji (↑) ve Alveolar Yapıda Bozulma İzlendi (▲) (H&E X200).	24
Resim 6. Grup III'e Ait Akciğer Dokusunda Normal Alveolar Yapı (▲) ve Orta Derecede İnteralveolar Ödem (Yıldız) İzlendi (H&E X200)	25

KISALTMALAR

AA	: Araşidonik Asit
ARDS	: Akut Sıkıntılı Solunum Sendromu
ATP	: Adenozin Trifosfat
CO₂	: Karbondioksit
DTT	: Dithiothreitol
EDTA	: Etilendiamintetrasetik Asit
GSH/GSSH	: İndirgenmiş Glutatyon/ Yükseltgenmiş Glutatyon
HNE	: 4- Hidroksinonenal
H&E	: Hematoksilen- Eozin
İAB	: İntra Abdominal Basınç
İL-1β	: İnterlökin- 1 β
İMA	: İskemi Modifiye Albümin
İR	: İskemi Reperfüzyon
KCl	: Potasyum Klorür
LOP	: Lipid Oksidasyon Ürünleri
MDA	: Malonildialdehit
MPO	: Myeloperoksidaz Aktivitesi
MV	: Mekanik Ventilator
NaCl	: Sodyum Klorür
NEC	: Nekrotizan Enterokolit
N₂O₂	: Nitrojen Dioksit
O₂	: Oksijen
PAF	: Trombosit Aktive Edici Faktör
PMN	: Polimorf Nüveli Nötrofil
PP	: Pnömooperitonyum
ROT	: Reaktif Oksijen Türevleri
SOD	: Süperoksit Dismutaz

SOR	: Serbest Oksijen Radikalleri
TBA	: Tiyobarbitürük Asit
TGF	: Transforme Edici Büyüme Faktörü
TNF-α	: Tümör Nekroz Faktör Alfa
Tx	: Tromboksan

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Laparoskopik yöntemler günümüzde her yaş grubunda ve birçok cerrahi girişimde yaygın olarak kullanılmaktadır. Minimal invaziv olarak düşünülen laparoskopik yöntemlerin avantajlarının yanısıra dezavantajları da vardır. Laparoskopik cerrahi için oluşturulan pnömoperitonyum (PP)'un intraabdominal basınç (İAB) artışına ve dolayısıyla özellikle abdominal organların hipoperfüzyonuna neden olabildiği gerek deneysel gerekse klinik çalışmalarla ortaya konulmuştur (1-3). PP'un sona erdirilmesi sonucu iskemik kalmış olan organlarda reperfüzyon sağlanır. Bu reperfüzyon dönemi süresince iskemik dokulardan salınan önemli doku mediyatörleri aracılığıyla serbest oksijen radikalleri (SOR)'nin ortaya çıktığı bilinmektedir. Sonuçta laparoskopik girişimler için oluşturulan PP organ ve dokularda iskemi-reperfüzyon (İR) yaralanması modeline neden olabilmektedir (2, 4, 5). İR'a bağlı hasar intraabdominal organların yanısıra akciğer gibi uzak organ hasarına da neden olabilir. Ayrıca İAB artışı akciğer kompliyansında azalmaya, gaz embolisine ve CO₂ emilimindeki artış gibi sorunlarla akciğerde hasarın artmasına katkıda bulunur (6).

İR'a bağlı gelişen oksidatif hasarı önlemek için pek çok çalışmalar yapılmış, özellikle antioksidanların etkisi araştırılmıştır. Bu hasarı önlemede son yıllarda medikal ozon kullanımı ile ilgili çalışmalar mevcuttur (7, 8). Ozon (O₃), aktiflenmiş oksijenin üç atomlu halidir. Medikal uygulamalarda, O₂/O₃ karışım şeklinde kullanılır ve medikal ozon adını alır. Medikal ozon (O₃) tedavisi antioksidan, antiinflamatuvar, antimikrobiyal etkileri nedeniyle tıpta tedavi amacıyla geniş alanda kullanılmaktadır (9). Farmakolojik ilaçlarla tedaviden farklı olarak ozon tedavisi ilaç-reseptör ilişkisi ile değil, vücudun kendi güçlü potansiyelleri olan antioksidan ve antiinflamatuvar yolları kullanarak vücudu hastalıklar karşısında güçlendiren bir tedavi yöntemidir (10, 11). Ozonun tedavi edici etkisi özellikle reaktif oksijen ürünleri, hidrojen peroksit ve lipid oksidasyon ürünü üzerinden olmaktadır (12).

Bu çalışmada, ventile edilen ratlarda, PP'a bağlı İAB artışı sonucunda gelişen akciğer hasarını önlemede medikal ozonun etkisi; plazma İMA (İskemi Modifiye Albümin) ve doku MDA (Malonildialdehit) ölçümleri ile akciğer dokusunun histopatolojik incelemesi yapılarak araştırıldı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Pnömooperitonyum

Laparoskopik cerrahi için oluşturulan PP sonrasında artan İAB en çok kardiyovasküler sistem, solunum sistemi ve intraabdominal organları (özellikle splanknik organları) etkiler.

2.1.1. Pnömooperitonyumun Sistemik Etkileri

Önceleri laparoskopik cerrahi ile cerrahi stres cevabının daha düşük olacağına inanılıyordu ancak zaman içinde öyle olmadığını gösteren çalışmalar yapıldı. Laparoskopik ameliyatlardan sonra ölçülen kan kortizol seviyesi aynı ameliyatın açık olarak yapıldığında ölçülen değerlerden daha yüksek bulunmuştur (13). Endokrin balans açısından açık cerrahi ile laparoskopik cerrahinin en büyük farkı stres ilişkili hormonların laparoskopik cerrahiden sonra hızla normale dönmesidir. İmmun supresyon da laparoskopik cerrahide açık cerrahiye göre daha azdır. Sitokin seviyelerinin laparoskopik cerrahiden sonra daha hızlı olarak normale döndüğü yapılan araştırmalarla ortaya konmuştur (14).

2.1.2. Pnömooperitonyumun Solunum Sistemine Etkileri

Genel anestezinin, fonksiyonel rezidüel kapasite ve akciğer kompliyansında azalma, fizyolojik ölü boşlukta artma, hipoksik pulmoner vazokonstriksiyonun depresyonu gibi pulmoner etkilerine ek olarak, PP'da artmış İAB'a ve hiperkarbiye bağlı olarak hem ameliyat esnasında hem de ameliyat sonrası dönemde akciğer işlevlerini ve gaz alışverişini etkiler (15).

PP'un solunum sistemine genel etkileri gaz embolisi, akciğer kompliyansının azalması, venöz dönüşün düşmesi ve karbondioksit emilimindeki artma şeklinde özetlenebilir (16). Bu etkiler, İAB artışı sonucu diafragma hareketlerinde azalma ve diafragmanın yukarı doğru yer değiştirmesiyle başlar. Bunun sonucunda akciğerden bağımsız ayrıcalıklı ventilasyon meydana gelir. Bu durum pozitif basınçlı ventilasyon esnasında ve trendelenburg pozisyonunda iyice artar. Fonksiyonel rezüdiel kapasitenin kapanma kapasitesinin altına düşmesiyle küçük hava yollarında kollaps olur ve bu da atelektaziye yol açar. Atelektazi sonucu pulmoner şantlar oluşur ve böylece hipoksemi gelişir (17,18).

2.2. İskemi-Reperfüzyon Hasarı

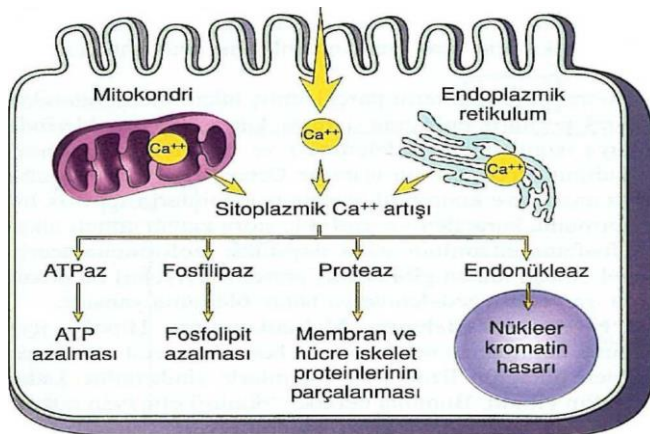
Bir organı besleyen bir veya daha fazla sayıdaki arterde kan akımının kısmen veya tamamen kesilmesi sonucu oluşan tablo iskemi; kan akımının yeniden sağlanması ise reperfüzyon olarak tanımlanır. Bir doku iskemik kalırsa besin maddeleri ve oksijen o dokuya ulaşamadığı ve metabolizma artıklarını uzaklaştıramadığı için; iskeminin oluş hızına, tıkanmanın derecesine, dokunun duyarlılığına ve kollateral dolaşımın yeterliliğine bağlı olarak değişen şiddette doku hasarı gelişir (19).

İskemiye uğrayan bölgedeki hücre veya dokular aerobik metabolizmayı sürdüremedikleri için gerekli enerjiyi anaerobik metabolizma yoluyla sağlamaya çalışırlar. Ancak doku perfüzyonu olmadığı için anaerobik metabolizma sonucu oluşan metabolitler birikir. Eğer reperfüzyon olur, kan akımı normale döner ve buradaki metabolitlerin oksidasyonu sonucu oluşan maddeler dolaşıma karışırsa tüm vücuda yayılır ve hasar oluşturur. Reperfüzyonla birlikte oluşan hasarın büyüklüğü, iskemi süresi ve şiddeti ile doğru orantılıdır. İskemik dokuda reperfüzyon oluşmazsa hücrede öldürücü iskemik hasar gelişir fakat yüksek düzeylerde serbest radikaller oluşmaz (16). Deneysel çalışmalarla reperfüzyon ile oluşan hasarın iskemi ile ortaya çıkan hasardan daha fazla olduğu gösterilmiştir (20). Yapılan çalışmalarda reperfüzyon hasarında 2 evre ortaya konmuştur. Reperfüzyon sonrası ilk 1,5–2 saatlik süreci kapsayan başlangıç evresinde temel patolojik ajan, ortamın tekrar oksijenasyonu sonucu oluşan ROT (reaktif oksijen türevleri)'dir. Reperfüzyon sonrası 6. saat ile 2 gün arasındaki dönem geç evre olarak adlandırılmıştır ve

bu süreçteki reperfüzyon hasarından humoral ve hücresele inflamatuvar ajanlar sorumlu tutulmaktadır (21).

İskemi sonrası oluşan hipoksidede hücre içi oksijen azlığı nedeniyle aerobik solunum aksar ve mitokondrideki oksidatif fosforilasyon engellenir. Sonuçta ATP (Adenozin trifosfat) üretimi azalır yada tamamen sona erer. ATP kaybı sonucu ATPaz aktivitesi de azalacağından hücre zarında bulunan aktif sodyum pompası yetersiz kalır ve beraberinde hücre içinde sodyum birikimi olur. Hücre içi potasyum hücre dışına atılır ardından su hücre içine girer ve hücresele şişme meydana gelir (22).

ATP bağımlı çalışan bir başka pompa da ekstrasellüler ve intrasellüler kalsiyumu dengelemekle görevli kalsiyum pompasıdır. Bu pompaların yetersiz kalması sonucu hücre içi kalsiyum artışı ile proteolitik enzimler ve fosfolipazlar aktive olurlar. Fosfolipazların aktivasyonu sonucu oluşan araşidonik asit (AA) direkt etkiyle mitokondriyal enzimleri inhibe eder ve serbest radikal oluşumunu artırır. Hücrenin enerji metabolizması glikoza bağımlı hale geldiğinden glikojen depoları hızla azalır. Artan glikolizle beraber fosfat esterlerinin hidrolizi ile laktik asit ve inorganik fosfatlar birikir ve hücre içi pH düşer. Anaerobik glikoliz sonucu meydana gelen asidoz, karbondioksit birikimiyle oluşan karbonik asit ile daha da derinleşir. Sonrasında ribozomların granüllü endoplazmik retikulumdan ayrılması sonucu protein sentezi azalır. Hipoksi devam ederse membran geçirgenliği artar, organeller su alarak şişer ve sonuçta hücrede belirgin şişme meydana gelir. İskemi bundan sonra da devam ederse geri dönüşümsüz hücre zedelenmesi başlar (22).

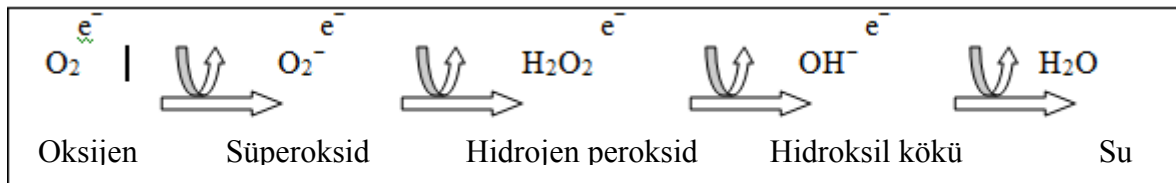


Şekil 1. Hücre Zedelenmesinde Sitoplazmik Kalsiyum Artışının Kaynakları ve Sonuçları, (22).

2.2.1. İskemi-Reperfüzyon Hasarında Serbest Radikallerin Rolü

Serbest radikaller, dış yörüngelerinde çiftleşmemiş tek bir elektron bulunan, kolayca organik ve inorganik kimyasallarla reaksiyona giren, hücrelerde oluştuğunda özellikle nükleik asitler ve membran proteinlerini parçalayan, etkileştikleri molekülleri serbest radikallere dönüştüren ve böylece hasar zincirini ilerleterek yayan kimyasal türevlerdir (22).

Canlılar için hayati önemi olan bir molekül olan ve hücrede enerji üretim süreçlerinde kullanılan oksijenden oluşan radikaller biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikallerdir. Bunların en önemlileri süperoksit anyonu, hidrojen peroksit ve hidroksil radikalleridir (23).



Şekil 2. Süperoksit Radikalleri Oluşturan Oksijen Metabolitleri

Normal metabolizma koşullarında SOR çok az miktarlarda meydana gelir ve vücuttaki antioksidan sistemler tarafından etkisiz hale getirilir. İskemi sonrası reperfüzyon safhasında oluşan SOR düzeyi, vücuttaki dengeyi serbest radikal lehine bozduğundan lokal ve sistemik etki oluşmasına neden olur.

İskemi döneminde dokuda birikmiş olan ksantin oksidaz, reperfüzyonla beraber sunulan oksijeni kullanarak hipoksantini ürik asite çevirir ve bu reaksiyon esnasında bol miktarda SOR oluşumuna neden olur. Reperfüzyon döneminde nötrofil infiltrasyonu, kompleman sisteminin aktivasyonu, AA metabolizması, kalsiyum aracılı proteazların aktivasyonu gibi pek çok olay da serbest radikal oluşumunu artırarak hasara katkıda bulunmaktadır.

2.2.2. Antioksidan Sistemler

Vücutta, SOR oluşumunu ve vücuda verdikleri zararı engelleyen savunma sistemleri vardır ve antioksidanlar olarak adlandırılırlar. Antioksidanlar fonksiyonlarına göre radikal

oluşumunu önleyen (Süper Oksit Dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz vb.) ve oluşan radikallerin dokudaki etkilerini önleyen (E vitamini, seruloplazmin, transferin, albümin, ubikinon, retinoik asit, β karoten, glutatyon, ürat vb.) antioksidanlar olarak iki kategoride incelenebildiği gibi enzim ve enzim olmayanlar, endojen ve ekzojen, intraselüler ve ekstraselüler antioksidanlar olarak da sınıflandırılabilirler (24).

Antioksidanlar etki mekanizmalarını serbest radikalleri tutarak, daha zayıf yeni bir moleküle çevirerek, serbest radikal ile etkileşip aktivitelerini azaltarak, serbest radikalleri kendilerine bağlayıp reaksiyon zincirini kırarak ya da onarım yaparak gösterirler (25).

2.2.3. İskemi-Reperfüzyon Hasarının Akciğerdeki Etkileri

Hipoksemi, pulmoner hipertansiyon, azalmış akciğer kompliyansı ve nonhidrostatik pulmoner ödem, İR sonucu oluşan akciğer hasarının birer bulgusu olarak ortaya çıkmakta ve klinik olarak tamamen subklinik seyreden geçici bir durumdan, akut sıkıntılı solunum sendromu (ARDS)' na kadar gidebilen ciddi bir tabloya yol açabilmektedir. Moleküler olarak, İR hasarı sonrası vücutta lokal ve sistemik inflamatuvar bir yanıt ortaya çıkmakta ve buna bağlı plazmada artmış proinflamatuvar ajanlarla birlikte (sitokinler, AA deriveleri, trombosit aktive edici faktör, kompleman), artmış SOR ve nötrofil infiltrasyonu, oluşan uzak organ hasarında rol oynamaktadır (26). Akciğerde bu hasarın oluşum mekanizması: "washout fenomeni"; reperfüzyonla sistemik dolaşıma katılan kimyasal mediyatörler ve mikroembolilerle açıklanır (27). İskemi ile birlikte tümör nekroz faktör alfa (TNF- α), interlökin-1- β (IL-1 β) artışı ve polimorf nüveli nötrofil (PMN) aktivasyonu ile karakterize inflamatuvar yanıt, bu hasarda en önemli rolü oynamaktadır (28). Reperfüzyonun hemen başında artan SOR' nin hasarı daha da artırdığı bilinmektedir (29).

Artan SOR ile birlikte, plazmada bulunan proinflamatuvar ajanlardan kompleman (özellikle C3a, C5a ve C5b-9), selektin, sitokinler (IL-6 ve 8), trombosit aktive edici faktör(PAF), tromboksan (Tx) ve lökotrienler (özellikle LTB4) akciğerdeki hasarı daha da artırır(30).

Sonuç olarak; İR hasarı, pulmoner vazokonstrüksiyon, pulmoner hipertansiyon ve alveoler membran geçirgenliğinde artışla pulmoner ödeme neden olur (31).

2.2.4. İskemi Reperfüzyon Hasarının Belirlenmesi

Yapılan çalışmalarda hasar sırasında oluşan ürünlerin ölçülmesi, antioksidan miktarlarındaki azalış veya onların metabolitlerindeki artışın değerlendirilmesi ile İR hasarının oluşup oluşmadığı, eğer oluştuysa şiddetinin anlaşılması sağlanmaya çalışılmıştır. İR hasarının göstergesi olan bu belirteçlerden bazıları MDA, İMA, MPO (myeloperoksidaz) aktivitesi, GSH/GSSH (İndirgenmiş glutatyon/ Yükseltgenmiş glutatyon) oranı, Süper Oksit Dismutaz (SOD) aktivitesi, Katalaz aktivitesi, Hidroperoksidaz düzeyi, Tiyobarbitürik asit (TBA) miktarıdır.

Malondialdehid (MDA)

Serbest radikallerin en önemli hasarlarından biri olan lipid peroksidasyonu, malondealdehit (MDA) ve 4-hidroksinonenal (HNE) gibi oldukça toksik ürünler oluşmasına neden olur. MDA, oldukça reaktif bir aldehit türevidir ve proteinlerin serbest amino grupları, fosfolipidler veya nükleik asitlerle reaksiyona girerek biyolojik moleküllerde yapısal modifikasyonlara neden olur. Membranların yapıları bozulur, geçirgenlikleri değişir, iyon transportu ve enzimatik aktiviteler gibi fonksiyonlar etkilenir (32).

İskemi Modifiye Albumin (İMA)

İnsan serum albumini N terminal bölgesi kobalt, bakır ve nikel gibi transisyon metallerinin bağlandığı bölgedir. Hipoksi, asidoz ve serbest radikal oluşumu gibi iskeminin patofizyolojik olayları sonucu geçiş metalleri için bağlama kapasitesinin azalması ile İMA oluşmaktadır (33). Yapılan çalışmalarda miyokard iskemisi, çizgili kas iskemisi, akut mezenterik iskemisi, pulmoner emboli ve felç gibi çeşitli iskemik olayların erken dönemlerinden itibaren tespit edilebildiği, nekroz öncesi erken bir belirteç olabileceği bildirilmiştir (34,35).

2.3. Medikal Ozon

2.3.1. Medikal Ozonun Özellikleri

Normal atmosferdeki oksijenin çok daha fazla enerji yüklü şekli olan ozon, üç oksijen atomundan oluşur. Renksiz ve keskin kokulu olan ozon, çok reaktif olması nedeniyle canlılar için toksiktir. Özellikle göz ve akciğerde, sıcaklık, konsantrasyon, nem ve maruz kalınan süreye göre iritasyon ve hasar oluşturabilir. Ozon, diğer gazlar (O₂, CO₂) gibi suda çözünebilir. Oksijene göre 1,6 kat daha yoğun olan ozonun suda çözünürlüğü 10 kat daha fazladır (36).

Medikal ozon, saf oksijen ve saf ozonun belirli oranlarda karıştırılmasıyla elde edilir. Medikal ozon hazırlanırken karışımdaki oksijen %95'den az, ozon %5'ten fazla olmamalıdır. Bu karışımda ozon molekülü sabit bir molekül olmadığından kullanılacağı ortamda jeneratör yardımıyla taze üretilir ve anında kullanılır. Normal atmosfer havasının bu karışıma girmesi engellenmelidir çünkü ozon çok reaktif olduğundan hava ile teması sonucu toksik bir gaz olan nitrojen dioksit (N₂O₂) oluşabilmektedir (10).

Medikal ozonun yarı ömrü cam enjektörde yaklaşık 45 dakika iken plastikte yaklaşık 30 dakikadır. Medikal ozon kararlı bir molekül olsa ve uygun bir farmakolojik preparat haline getirilebilseydi birçok hastalığın tedavisinde daha etkin kullanılabilirdi.

Medikal ozon kimyasal yapısı itibarıyla radikal özelliği taşımamakla beraber, florin ve persülfattan sonra, bilinen üçüncü en güçlü oksidan maddedir (10).

2.3.2. Medikal Ozonun Etki Mekanizması

Medikal ozon tedavisi belirli miktarda medikal ozonun vücut boşluklarına ya da dolaşım sistemine uygulanmasıdır. Medikal ozon intravenöz, intramuskuler, intraartiküler, intraplevral, intrarektal ve intradiskal uygulanabildiği gibi topikal de uygulanabilir (10). İlk olarak Wolff tarafından 1974 yılında tarif edilen major hemoterapi modelinde; bir miktar kan (50–270 ml) vücut dışına alınarak, ozona dayanıklı bir şişede 5-10 dakika medikal ozonla temas ettikten sonra tekrar aynı kişiye geri verilir (ototransfüzyon) (36).

Major hemoterapi modelinde medikal ozon kan ile karıştırıldığında plazmada hızla çözünür ve bir kısmı plazmada bulunan antioksidanlarla reaksiyona girerek bunların

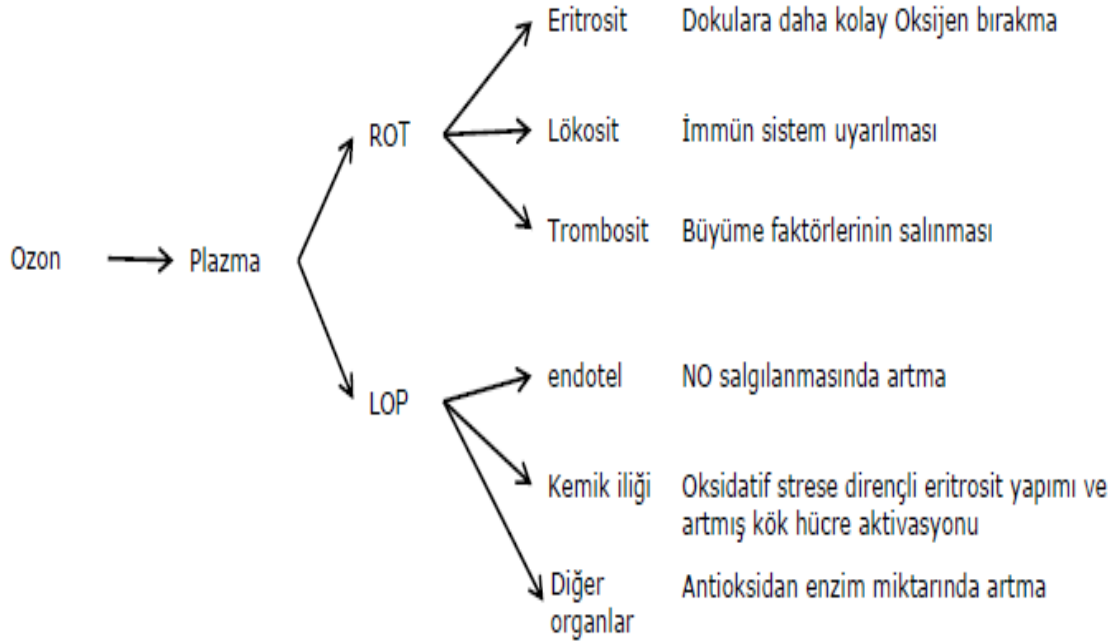
miktarını azaltır. Bu reaksiyonlar sırasında reaktif oksijen türevleri (ROT) oluşur fakat bu radikallerin yarı ömrü çok kısa olduğu için daha karışım hastaya verilmeden bunlar ortadan kalkarak yerlerini lipid oksidasyon ürünleri (LOP)' ne bırakırlar. LOP büyük oranda eritrosit membranlarının oksidasyonu ile meydana gelir ve reaksiyonlar sırasında ortaya çıkan hidrojen peroksit, molekül yapısı itibariyle radikal olmayan oksitleyici bir moleküldür (10, 12).

Yarı ömrü çok kısa olan ROT' nin aksine yarı ömürleri saatlere varabilen LOP ozonun gecikmiş etkilerinden sorumlu tutulmaktadır. İkincil haberci gibi davrandığı kabul edilen hidrojen peroksit, eritrositlerde 2,3-difosfogliserat düzeyini artırarak hemoglobin-oksijen ayrışma eğrisinin sağa kaymasına ve böylece oksijenin dokulara daha kolay verilmesine neden olur. Ayrıca lökosit ve endotelial hücreleri etkileyerek interferon, interlökin ve transforme edici büyüme faktörü (TGF) yapımını tetikler (37).

Medikal ozon karışımındaki ozon, oksijenden farklı olarak biyomoleküller ile reaksiyona girer. Bu bileşikler (çoklu doymamış yağ asitleri, antioksidanlar, karbonhidratlar, proteinler) ozon karşısında elektron donörü gibi davranarak oksitlenirler ve süperoksit, hidrojen peroksit ve hipoklorik asit gibi ROT oluşur (36).

Sonuç olarak medikal ozon vücutta geçici oksidatif stres meydana getirir. Bu nedenle medikal ozonun dozu fizyolojik mekanizmaları aktive edecek kadar yeterli, ancak hücre içi antioksidan sistemleri tamamen azaltacak ve hasara sebep olacak kadar çok olmamalıdır.

Ozonlanmış kanın vücuda verilmesi ile oluşan terapötik etkileri Şekil 3'de gösterilmiştir (12).



Şekil 3. Ozon Tedavisinin Etkileri (12).

2.3.3. Medikal Ozon Tedavisinin Klinik Uygulamaları

Medikal ozonun özellikle inflamatuvar sürecin yoğun olduğu ve immün sistemin ön planda yer aldığı fizyopatolojik durumlarda tedavi edici etkisi şaşırtıcıdır. Yara iyileşmesinde, iskemik hastalıklarda, basit diş ve ağız enfeksiyonlarından hepatitlere kadar uzanan çeşitli enfeksiyon hastalıklarında etkin olarak uygulanmaktadır (36).

Ayrıca medikal ozonun kullanım alanları arasında arteriyel dolaşım bozuklukları, bazı karsinomlar, hiperlipidemi, romatizmal eklem iltihapları, lomber disk hernisi, postmenopozal osteoporoz vb. sayılabilir.

2.3.4. Medikal Ozon Tedavisinin Yan Etki ve Kontrendikasyonları

Ozon tedavisinin yan etkileri daha çok uygulama hatalarına bağlı lokal komplikasyonlardır. Glukoz 6 fosfat dehidrogenaz enzim eksikliği olan hastalarda, hamilelikte, hipertiroidide, ozona reaksiyon gösteren astım hastalarında, kanama bozukluğu olan ve anstabil kardiyovasküler hastalığı olanlarda medikal ozon uygulanması sakıncalı olabilir (36).

3. MATERYAL VE METOD

Bu deneysel alışma Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakóltesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon Anabilim Dalı tarafından planlanıp, Histoloji-Embriyoloji ve Tıbbi Biyokimya Anabilim dallarının katkılarıyla yapılmıştır. Çalışmada kullanılacak olan hayvanlar Karadeniz Teknik Üniversitesi Deneysel Hayvan Araştırma Merkezi'nden temin edildi. Deneysel alışma; Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakóltesi Cerrahi Araştırma Laboratuvarı'nda nem ve sıcaklığı kontrol edilebilen bir ortamda (ortam ısısı 20-26 santigrad derece olacak şekilde ve 12 saat gece, 12 saat g¼nd¼z olan ritimde) ¼zel olarak hazırlanmış tel kafesler içerisinde yem ve su ihtiyaçları serbest olarak sağlanarak barındırılan, ağırlıkları 250-300 gram aralığında 18 adet sprague-dawley cinsi sağlıklı, dişi ratlar kullanılarak yapıldı. T¼m ratların bakımı, 'Deneysel Hayvanlarının Bakım Prensipleri'ne ve 'Laboratuvar Hayvanlarının Bakımı ve Kullanımı için Klavuz' prosed¼r¼ne uygun olarak yapıldı. Bu deneysel çalışmada, 'Deneysel ve Diğer Bilimsel Amaçlar İçin Kullanılan Deneysel Hayvanlarının Korunması, Deneysel Hayvanlarının retim Yerleri İle Deneysel Yapacak Olan Laboratuvarların Kuruluř, alışma, Denetleme, Usul Ve Esaslarına Dair Y¼netmelik'e ve 5199 sayılı Hayvanları Koruma Kanunu'na uyuldu. Çalışma protokol¼ ve deneysel metod Karadeniz Teknik Üniversitesi Etik Kurul tarafından 2013/33 protokol numarası ile onaylanmıştır.



Resim 1. Ratların Cinsi (Sprague-Dawley)

3.1. Gruplar

Çalışmada 3 grup oluşturuldu. Her grupta randomize seçilmiş 6 rat olmak üzere toplam 18 rat çalışmaya dahil edildi ve gruplar şöyle belirlendi:

Grup I (Kontrol Grubu): Steril şartlarda ratlara intraperitoneal anestezi uygulandıktan sonra, trakeostomi açılarak mekanik ventilatöre bağlandı. Her bir rata volüm kontrollü modda tidal volümü 9 mL/kg, frekansı 70/dk., inspiyum/ekspiryum oranı 1:1 ve fraksiyonel inspiratuvar oksijen konsantrasyonu (FiO₂) 1.0 olacak şekilde mekanik ventilasyon uygulandı. Bu gruptaki ratlara PP uygulanmadı sadece trakeostomi açılarak mekanik ventilatör (MV)'e bağlandı. Diğer gruplarla standardizasyonu sağlamak amacıyla 120 dakika boyunca MV'e bağlı kaldılar. Bu sürenin sonunda dokuları alınan ratlar kurban edildi

Grup II (Pnömooperitonyum Grubu): Steril şartlarda ratlara intraperitoneal anestezi uygulandıktan sonra, trakeostomi açılarak mekanik ventilatöre bağlandı. Her bir rata volüm kontrollü modda tidal volümü 9 mL/kg, frekansı 70/dk., inspiyum/ekspiryum oranı 1:1 ve fraksiyonel inspiratuvar oksijen konsantrasyonu (FiO₂) 1.0 olacak şekilde mekanik ventilasyon uygulandı. 30 dakika sonra ratların karnına perkütan olarak yerleştirilen 18x1.3x45 mm'lik yeşil anjiokater aracılığıyla, otomatik laparoflatör ile 0.1-0.2 L/dakika hızında olacak şekildeki CO₂ insuflasyonu ile 12 mmHg İAB yüksekliği oluşturuldu. 60

dakikalık PP sonrası 30 dakika reperfüzyona izin verildi. 120 dakika boyunca MV'e bağlı kalan ratların bu sürenin sonunda dokuları alınarak sakrifiye edildi.

Grup III (Medikal Ozon Grubu): Steril şartlarda ratlara intraperitoneal anestezi uygulandıktan sonra, trakeostomi açılarak mekanik ventilatöre bağlandı. Her bir rata volüm kontrollü modda tidal volümü 9 mL/kg, frekansı 70/dk., inspiryum/ekspiryum oranı 1:1 ve fraksiyonel inspiratuvar oksijen konsantrasyonu (FiO₂) 1.0 olacak şekilde mekanik ventilasyon uygulandı. Ozona dayanıklı enjektörle 1 mg/ kg'dan medikal ozonun intraperitoneal uygulanmasından 30 dakika sonra ratların karnına perkütan olarak yerleştirilen 18x1.3x45 mm'lik yeşil anjiokater aracılığıyla, otomatik laparoflatör ile 0.1-0.2 L/dakika hızında olacak şekildeki CO₂ insuflasyonu ile 12 mmHg İAB yüksekliği oluşturuldu. 60 dakikalık PP sonrası 30 dakika reperfüzyona izin verildi. Grup II'den farklı olarak PP'dan 30 dakika önce medikal ozon uygulanan ve 120 dakika boyunca mekanik ventilatöre bağlı kalan ratlar bu sürenin sonunda dokuları alınarak sakrifiye edildi.



Resim 2. Ratların Ventile Edilmesi

3.2. Anestezi ve Deneysel Prosedür

Deney, Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Cerrahi Araştırma Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi. Deneysel çalışmanın birinci aşamasında, ratlara deneysel prosedür için anestezi olarak intraperitoneal yolla 50 mg/ kg ketamin (Ketalar®, Pfizer İlaçları Ltd. Şti, İstanbul) ve 10 mg/kg xylazine (Rompun®, Bayer Türk Kimya Sanayi Ltd. Şti, İstanbul) verildi. Başlangıç dozunun 1/3'ü 30 dakika aralarla idame olarak tekrarlandı. Cerrahi düzeyde anestezi uygulanmasını takiben ratların boyun bölgesi traş

edildikten sonra betadin solüsyonu ile temizlenerek 16 G intraket ile trakeostomi açıldı ve 3-0 prolen kullanılarak tesbit edildi. Her bir rata volüm kontrollü modda tidal volümü 9 mL/kg, frekansı 70/dk., inspiyum/ekspiryum oranı 1:1 ve fraksiyonel inspiyatuar oksijen konsantrasyonu (FiO₂) 1.0 olacak şekilde mekanik ventilasyon uygulandı. Solunum sayısı istirahattaki erişkin ratların solunum sayıları örnek alınarak belirlendi. Cerrahi tahtasında tespit edilmiş hayvanların kuyruk venleri eksplore edildi ve kuyruk cildindeki keratinize doku bistüri ile kürete edildikten sonra kuyruk 40°C sıcak su içinde 2 dakika bekletildi. Sıcak tatbiki ile dilate edilen kuyruk venleri 24 G sarı intraket ile kateterize edildi ve 2 ml/kg/ saat %0,9'luk serum fizyolojik infüze edildi.

120 dakikanın sonunda anestezi düzeyi yeterli olan ratların cerrahi olarak batınları ve toraksları açılarak abdominal aortadan İMA çalışılması için 2 ml kan ile doku MDA ve histopatolojik inceleme için sağ akciğer orta lobu alındı. Çıkarılan sağ akciğer orta lobu yağ ve kandan %0.09'luk izotonik solüsyonla nazikçe temizlendikten sonra 2'ye bölünerek bir yarısı %10 formaldehid içeren solüsyon ile fikse edilerek histopatolojik incelemeye gönderilirken diğer yarısı biyokimyasal tetkik için (doku MDA) ependorf tüp içine koyuldu ve -80°C'de saklandı. Biyokimyasal tetkik (plazma İMA) için kan numuneleri alınır alınmaz EDTA (Etilendiamintetrasetik Asit)'li tüplere koyuldu ve ılımlı bir hızla alt üst edilip 10dk/3000 devirde santrifüj ile plazma eldesi sağlandı. Elde edilen serum her bir rat için, bir adet ependorf tüpe konularak -80°C'de saklandı.

İşlemler sonrasında kansızlaştırma işlemi yapılarak ratlar sakrifiye edildi.



Resim 3. Ratlara Pnömooperitonyum Uygulanması

3.3. Biyokimyasal Parametrelerin Ölçülmesi

3.3.1. İskemi Modifiye Albumin (İMA) Düzeyinin Belirlenmesi

İMA seviyelerini belirlemek için albumin kobalt bağlama testinden faydalanıldı ve albumine kobaltın azalan bağlanma kapasitesi, David Bar ve arkadaşları (34) tarafından geliştirilen hızlı ve kolometrik tayin metoduyla değerlendirildi. Bu yöntemde 200 µL serumlar cam tüplere koyulup, üzerlerine % 0,1'lik 50 µL Kobalt Klorür ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, Sigma) eklenerek hafifçe karıştırıldıktan sonra yeterli kobalt albumin bağlanması sağlanması amacıyla 10 dakika beklendi. Renklendirici ajan olarak 50 µL 1,5 mg/ mL'lik Dithiothreitol (DTT, Sigma) eklendi. 2 dakika beklendikten sonra % 0,9'luk NaCl'den 1 mL kobalt ve albumin arasında meydana gelen bağlanmayı durdurmak amacıyla eklenerek reaksiyon durduruldu. Her bir numune için numune körü yapıldı. DTT eklenen aşamada 50 µL 1,5 mg/mL'lik DTT yerine 50 µL distile su konarak DTT' süz serum kobalt körü hazırlandı. Numune absorbansları spektrofotometrede (Shimadzu UV 1601, Japonya) 470 nm ölçüldü. DTT'li örneklerdeki renk oluşumu kör tüplerindeki renk oluşumuyla karşılaştırılarak sonuçlar ABSU absorbans ünitesi cinsinden rapor edildi (34).

3.3.2. Doku Malondialdehit (MDA) Düzeyinin Belirlenmesi

Akciğer doku MDA düzeyi Mihara ve Uchiyama tarafından geliştirilen metod ile tayin edildi (38). Bu metodun esası, MDA'in asidik ortamda TBA (Merck) ile oluşturduğu rengin 532 nm'deki absorbansının ölçülmesine dayanmaktadır.

Dokuların yaklaşık 50-60 mg'lık kısmı 2mL %1,15'lik Potasyum klorür (KCl, Merck) (0.5 mL/L Triton X-100 içeren) çözeltisi içinde homojenize edildi. Homojenatlar 3000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenerek (Eppendorf Centrifuge 5810, Almanya) elde edilen süpernatantlarda ilgili ölçümler yapıldı.

Malondialdehit Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler

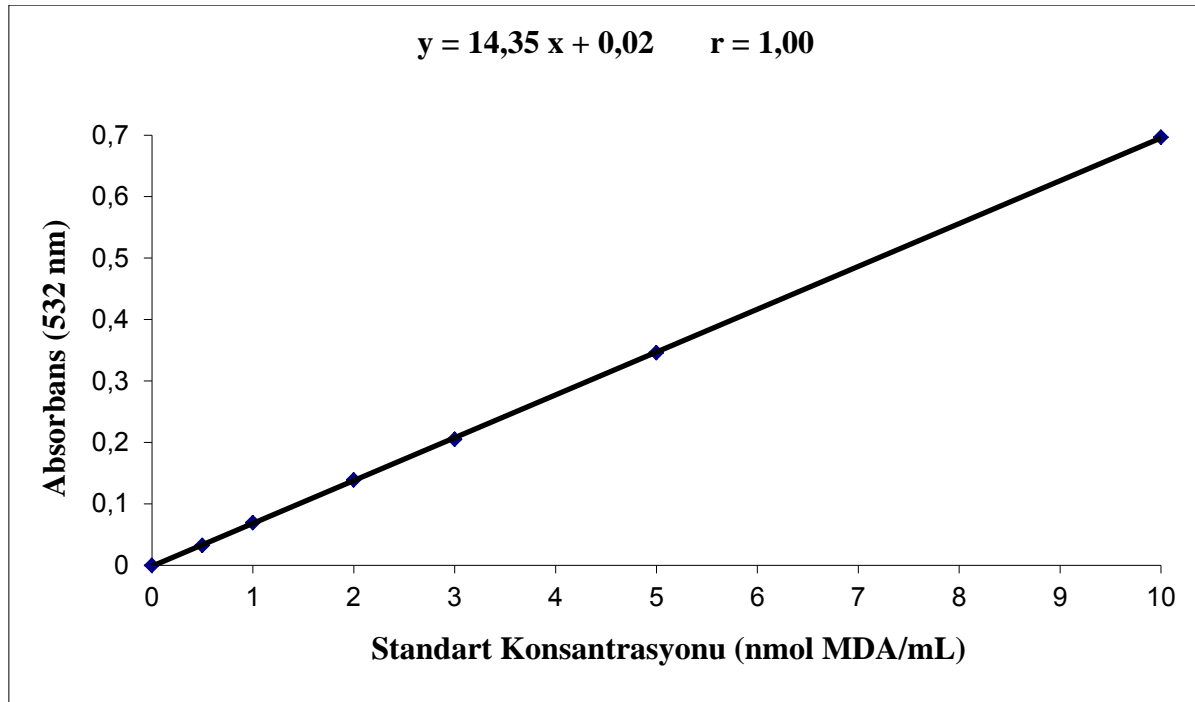
Doku homojenizasyon tamponu: 1,15 g KCl hassas terazide tartıldı ve son hacim distile su ile 1 L'ye tamamlandı. Oluşan çözeltinin üzerine 0,5 mL Triton X-100 eklendi.

%1'lik Fosforik Asit (H₃PO₄) çözeltisi: Bir miktar saf su üzerine 2.94 mL %85'lik H₃PO₄ (Merck) alındı ve son hacim distile su ile 250 mL'ye tamamlandı.

Tiyobarbitürik asit çözeltisi: 0,67 g TBA tartıldı, 50 mL distile ve 50 mL asetik asit ilave edilerek magnetik bar yardımıyla karıştırılıp çözüldü.

Standart çözeltiler: 43 µL 0,01 M HCl alındı ve 50 ml saf suya eklendi. Üzerine 82,5 µL 1,1,3,3 tetrametoksipropan çözeltisi eklendi ve 50°C'de 1 saat inkübe edildi. Bu şekilde hazırladığımız ana stok çözeltisinden çeşitli oranlarda dilüsyonlar yapılarak 50, 40, 30, 20, 10 ve 5 nmol/ mL'lik standart çözeltiler hazırlandı.

0,5 mL doku homojenatı, 3 mL H₃PO₄ ve 1 mL TBA eklenerek reaksiyon karışımı hazırlandı ve vortekslendi (IKA vortex GENIUS 3, Almanya). Ardından 100°C'de 45 dakika etüvde (Gallenkamp, Amerika) inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra tüpler 4000 rpm' de 10 dakika santrifüj edildi. Her numunenin süpernatanından 300'er µL pleyte yüklendikten sonra 532 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüm yapıldı. Sonuçlar ise nmol/ g doku olarak Şekil 4'teki grafikten faydalanılarak hesaplandı.



Şekil 4. Akciğer MDA Doku Standart Grafiği

3.4. Doku Örneklerinin Histopatolojik İncelemesi

3.4.1. Doku Örneklerinin Hazırlanması ve Değerlendirilmesi

Çalışma sonunda her bir gruba ait ratların sağ akciğeri çıkarıldı. Dokuların aynı bölümlerinden alınan doku örnekleri histopatolojik değerlendirme yapılması için %10'luk formaldehit solüsyonunda 72 saat tespit edildi. Tespit edilen doku parçaları %70, %90, %96 ve %100'lük dereceli alkol serilerinden geçirilerek dehidrate edildi. Daha sonra ksilen solüsyonundan geçirilerek şeffaflaştırıldı. Dokuların parafin blokları hazırlandı ve tam otomatik mikrotom (Leica RM 2255, Tokyo, Japan) ile 5 mikrometre (μm) kalınlığında kesitler alındı. Kesitler deparafinize edildi. Hematoksilen-eozin (H&E) ile boyandı. Işık mikroskopik (Olympus BX 51; Olympus Optical Co, Ltd, Tokyo, Japan) olarak değerlendirildi. Histopatolojik değerlendirme çalışma gruplarından habersiz bu konuda deneyimli bir histolog (E.Y.) tarafından yapıldı.

Akciğer dokularına ait hasar skorlamasında her bir gruba ait akciğer preparatında, yüksek büyütmede (400X) 5 farklı alan aşağıda tanımlanan kriterlere göre yarıkantitatif olarak değerlendirildi

Akciğer dokularının değerlendirilmesinde her bir gruba ait akciğer preparatı genel histolojik yapı açısından değerlendirildi ve gözlenen histopatolojik bulgular ışığında yüksek büyütmede (400X) 5 farklı alan, alveolar yapıda bozulma, vasküler konjesyon, hemoraji, inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve alveolar ödem açısından yarıkantitatif olarak değerlendirildi. Değerlendirmede 0: Hiç yok; 1: Hafif; 2: Orta ve 3: Şiddetli olarak değerlendirildi (39).

Tablo 1. Akciğer Hasarının Mikroskopik Skorlama Kriterleri

Grade	Histopatolojik Görünüş
Grade 0	Normal akciğer morfolojisi
Grade 1	Hafif
Grade 2	Orta
Grade 3	Şiddetli

3.5. İstatistiksel Analiz

Oluşturduğumuz İR modelinde yapılan çalışmalar sonucu elde edilen biyokimyasal parametreler ve histopatolojik olarak puanlanmış doku hasar skorları “SPSS 13.0.1 for Windows” paket programı kullanılarak incelendi (Lisans No: 9069727).

Üç grubun ölçümsel biyokimyasal verilerinin karşılaştırılmasında Kruskal Wallis Testi, ikili karşılaştırmalarda Bonferonni düzeltmeli Mann Whitney U testi kullanıldı. Ölçümle elde edilen verilerin aritmetik ortalama değerleri, minimum ve maksimum değerleri ve standart sapmaları hesaplandı. Anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ ve post hoc karşılaştırmalarda $p < 0.016$ ($p < 0.05 / 3$ karşılaştırma sayısı) olarak alındı.

4. BULGULAR

4.1. Biyokimyasal Parametrelerin Değerlendirilmesi

4.1.1. Plazma İMA Sonuçları

Her 3 gruba ait plazma İMA değerleri Tablo 2 ve Şekil 5'te sunulmuştur.

Yapılan plazma İMA değerleri karşılaştırmasında;

Grup I (Kontrol Grubu) ile Grup II (PP Grubu) karşılaştırıldığında Grup II'de İMA düzeyi anlamlı yüksek tespit edildi ($p=0.004$).

Grup II ile grup III (Medikal Ozon Grubu) karşılaştırıldığında, Grup III'te İMA düzeyi anlamlı düşük tespit edildi ($p=0.004$).

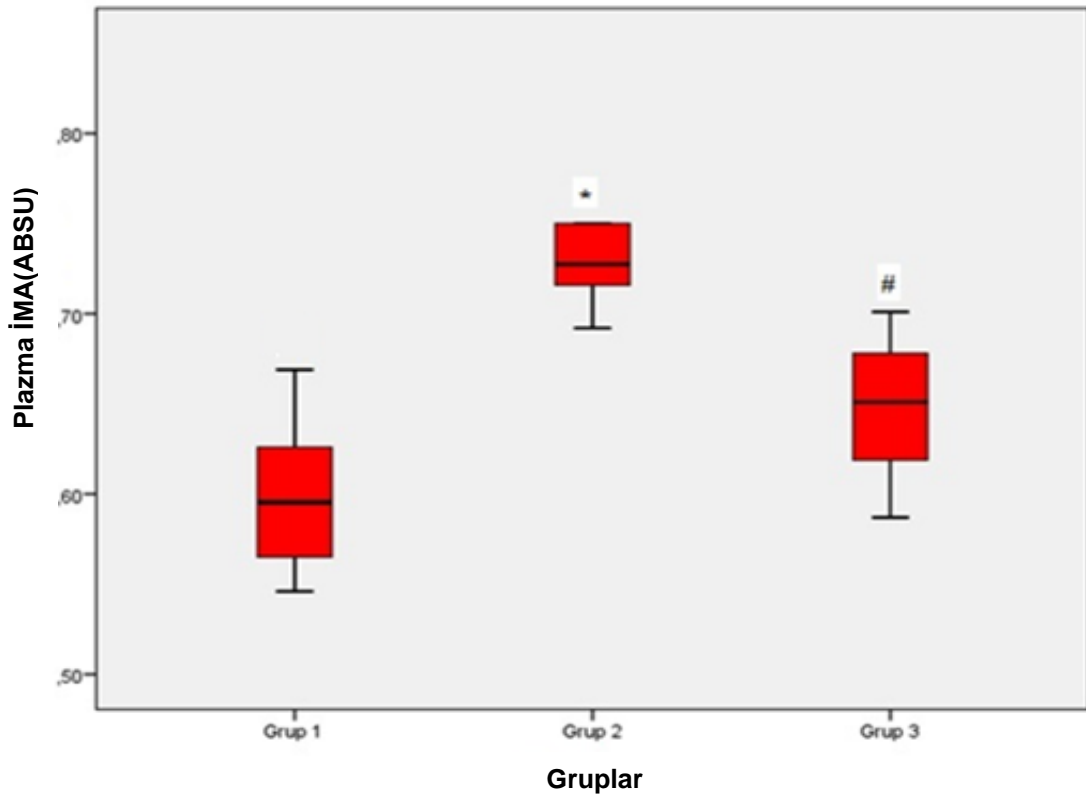
Grup I ile Grup III karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı fark bulunamadı ($p=0.055$).

Tablo 2. Plazma İMA Değerleri

	Grup I (Ort ± SS)	Grup II (Ort ± SS)	Grup III (Ort ± SS)
İMA	$0,65 \pm 0,044$	$0,83 \pm 0,038 *$	$0,61 \pm 0,041 \#$

*: $p=0.004$; Grup I ve Grup II karşılaştırıldığında

#: $p=0.006$; Grup II ve Grup III karşılaştırıldığında



Şekil 5. Grupların Ortalama Plazma İMA Değerleri ($p < 0.05$).

*: $p = 0.004$; Grup I ve Grup II karşılaştırıldığında

#: $p = 0.006$; Grup II ve Grup III karşılaştırıldığında

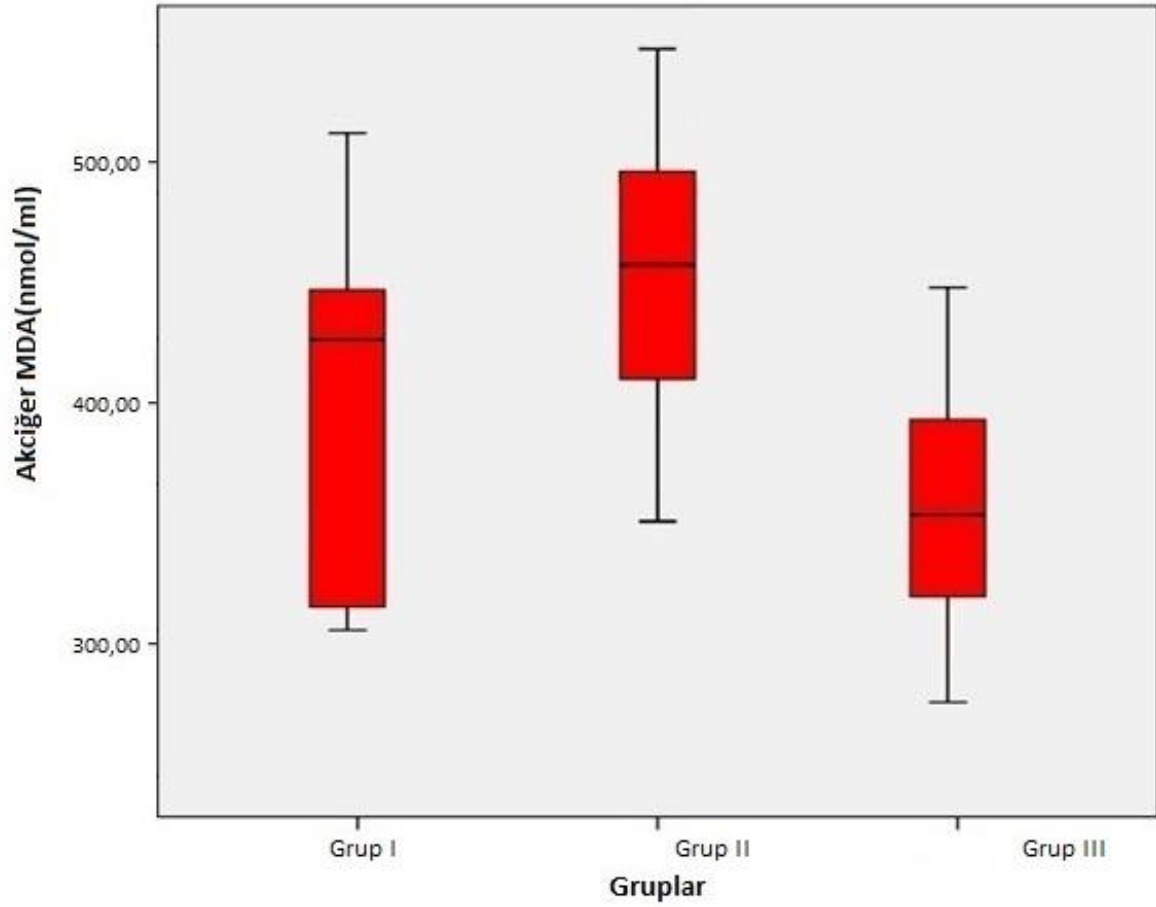
4.1.2. Akciğer Doku MDA Sonuçları

Her 3 gruba ait Akciğer MDA değerleri Tablo 3 ve Şekil 6'da sunulmuştur.

Tablo 3. Akciğer Doku MDA Değerleri

	Grup I (Ort \pm SS)	Grup II (Ort \pm SS)	Grup III (Ort \pm SS)
MDA	409,4 \pm 82,9	456,3 \pm 75,7	363,8 \pm 58,7

Akciğer dokusu MDA ölçümleri sonucunda, gruplar arası karşılaştırmada anlamlı fark bulunamadı ($p = 0.125$).

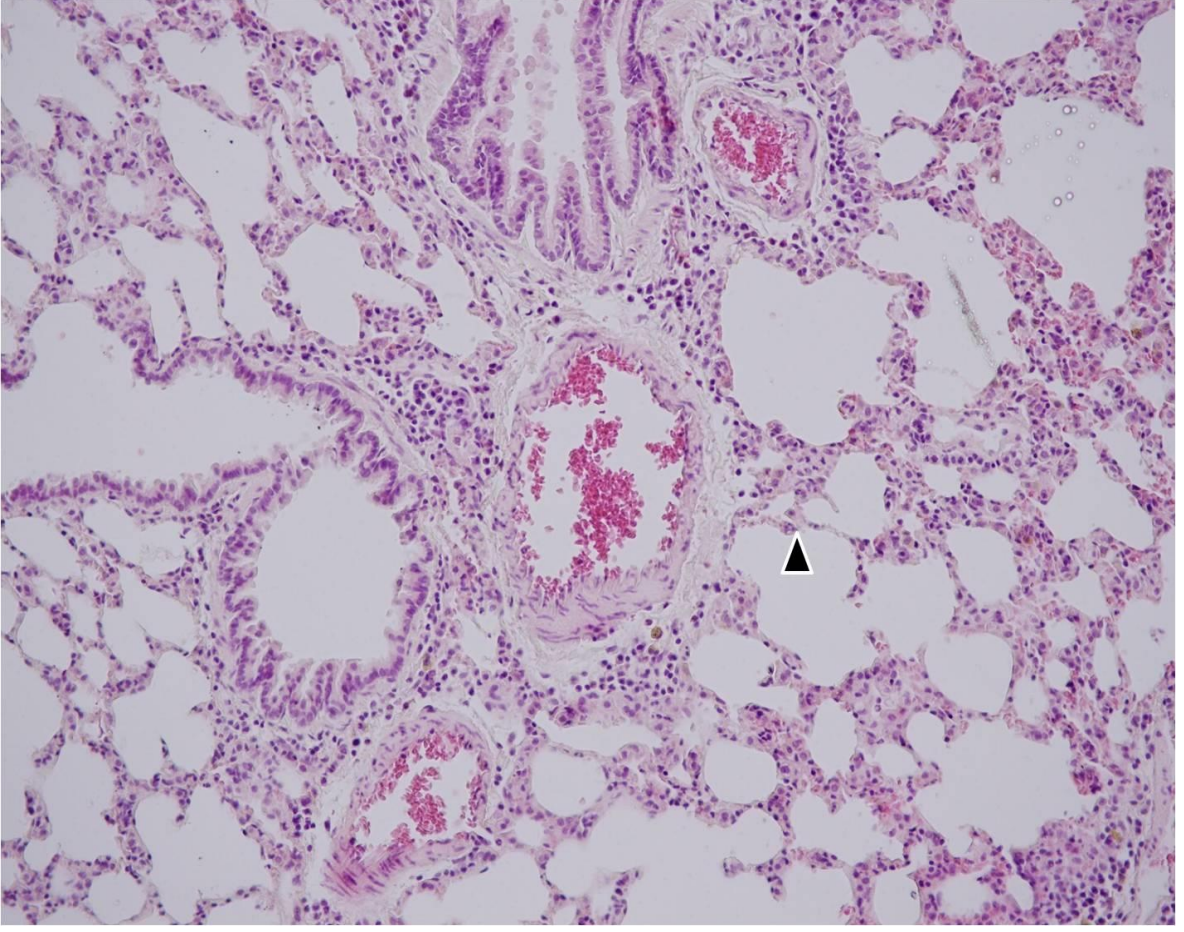


Şekil 6. Grupların Ortalama Akciğer MDA Değerleri ($p= 0.125$).

4.2. Histopatolojik Sonuçların Değerlendirilmesi

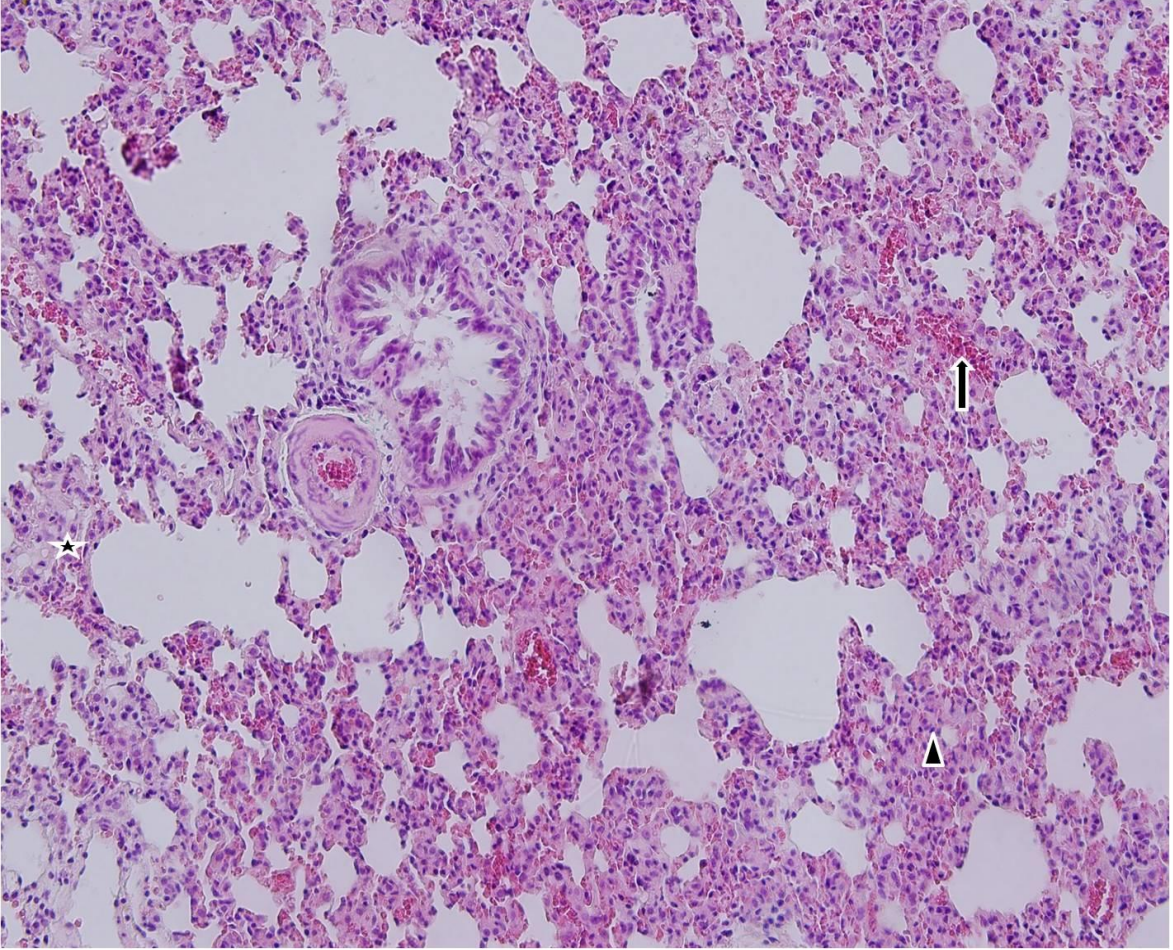
Gruplara ait akciğer dokularının ışık mikroskopik değerlendirmesinde;

Grup I (Kontrol Grubu)'e ait akciğer dokuları normal akciğer histolojik yapısı gösteriyordu (Resim 4).



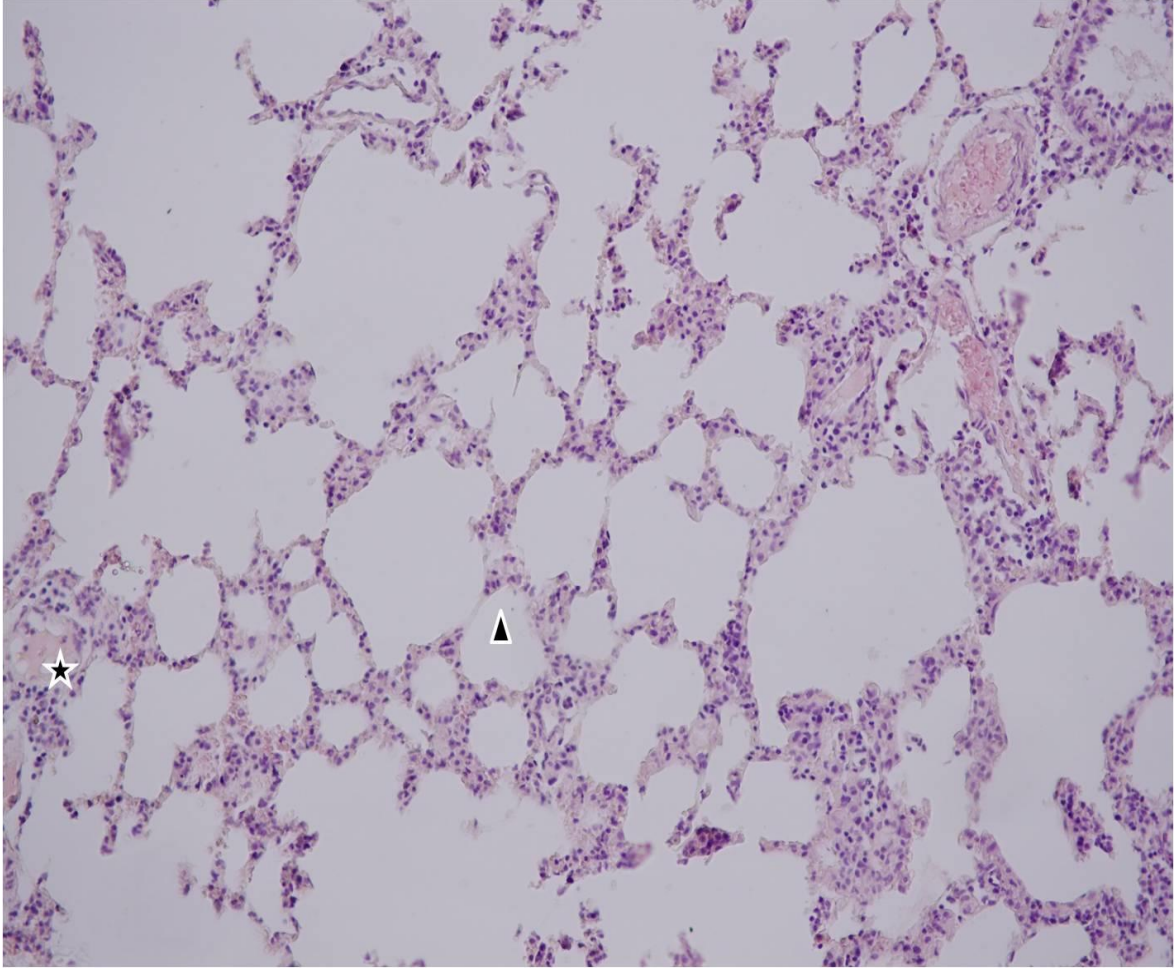
Resim 4. Grup I'e Ait Akciğer Dokularında Normal Alveolar Yapı (▲) İzlendi (H&E X200).

Grup II (PP Grubu)'ye ait akciğer dokularında orta ve şiddetli derecede interalveolar hemoraji, alveolar yapıda dejenerasyon, interalveolar ödem ve lökosit infiltrasyonu izlendi (Resim 5).



Resim 5. Grup II'ye Ait Akciğer Dokusunda Yaygın İnteralveolar Ödem (*), İnteralveolar Hemoraji (↑) ve Alveolar Yapıda Bozulma İzlendi (▲) (H&E X200).

Grup III (Medikal Ozon Grubu)'e ait akciğer dokuları genel olarak normal akciğer alveolar yapısı gösteriyordu. Bu gruba ait preparatlarda yer yer az miktarda interalveolar ödeme rastlandı (Resim 6).



Resim 6. Grup III'e Ait Akciğer Dokusunda Normal Alveolar Yapı (▲) ve Orta Derecede İnteralveolar Ödem (Yıldız) İzlendi (H&E X200)

Gruplara ait H&E ile boyalı akciğer doku preparatları ışık mikroskopik olarak değerlendirildi ve her bir gruba ait preparatlar hasar skorlaması yapılarak sayısal değerlere dönüştürüldü.

Tablo 4. Akciğer Histopatolojik İncelenmesinde Hasar Skorlaması

GRUP	Alveolar Yapıda Bozulma	Vasküler Konjesyon	Hemoraji	Alveolar Ödem	İnflamatuvar Hücre İnfiltrasyonu
G1-1	0	1	0	0	0
G1-2	0	2	0	0	0
G1-3	0	1	1	1	0
G1-4	1	0	0	0	0
G1-5	0	1	0	1	1
G1-6	0	0	0	0	0
G2-1	2	3	3	2	3
G2-2	3	3	3	2	3
G2-3	3	3	3	1	2
G2-4	3	2	3	1	3
G2-5	3	3	3	2	2
G2-6	2	3	3	1	1
G3-1	0	1	0	1	0
G3-2	0	1	0	0	0
G3-3	0	1	0	2	0
G3-4	0	1	0	1	0
G3-5	1	1	1	2	1
G3-6	0	1	0	1	0

Akciğer dokusuna ait histopatolojik sonuçları istatistiksel olarak incelendiğinde;

4.2.1. Alveolar Yapıda Bozulma

Her 3 gruba ait alveolar yapıda bozulma değerleri Tablo 5 ve Şekil 7’de sunulmuştur.

Tablo 5. Alveolar Yapıda Bozulma

	Grup I (Ort ± SS)	Grup II (Ort ± SS)	Grup III (Ort ± SS)
Alveolar Yapıda Bozulma	0,17 ± 0,41	2,67 ± 0,52 *	0,17 ± 0,41 #

*: **p=0.002**; Grup I ve Grup II karşılaştırıldığında

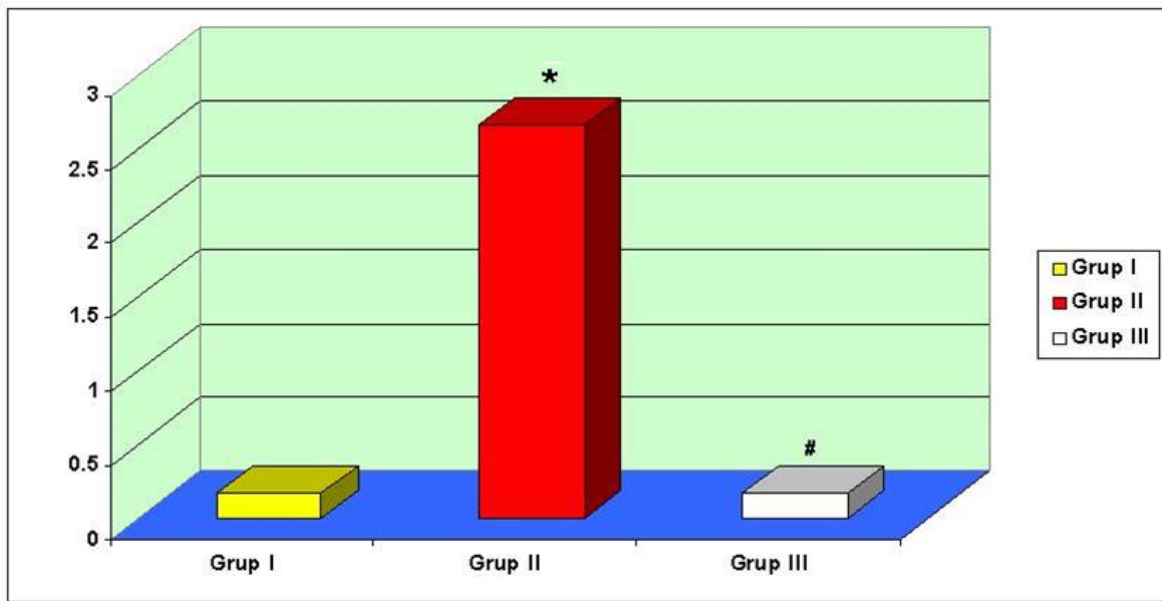
#: **p=0.002**; Grup II ve Grup III karşılaştırıldığında

Grup I (Kontrol) ve Grup II (PP) karşılaştırıldığında Grup II’de hasar skoru düzeyi Grup I’e göre anlamlı yüksek tespit edildi (p=0.002).

Grup I ve Grup III (Medikal Ozon Grubu) karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı fark bulunamadı ($p=1.000$).

Grup II ve Grup III karşılaştırıldığında Grup II'de hasar skoru düzeyi Grup III'e göre anlamlı yüksek tespit edildi ($p=0.002$).

Her üç gruba ait alveolar yapıda bozulma hasar skorlarının incelenmesi sonucunda ortalama değerlerin karşılaştırılması Şekil 7'de gösterilmiştir.



Şekil 7. Grupların Alveolar Yapıda Bozulma Açısından Ortalama Hasar Düzeyleri

*: $p=0.002$; Grup I ve Grup II karşılaştırıldığında

#: $p=0.002$; Grup II ve Grup III karşılaştırıldığında

4.2.2. Vasküler Konjesyon

Her 3 gruba ait vasküler konjesyon hasar skoru değerleri Tablo 6 ve Şekil 8'de sunulmuştur.

Tablo 6. Vasküler Konjesyon

	Grup I (Ort ± SS)	Grup II (Ort ± SS)	Grup III (Ort ± SS)
Vasküler Konjesyon	$0,83 \pm 0,75$	$2,83 \pm 0,41$ *	$1,00 \pm 0,00$ #

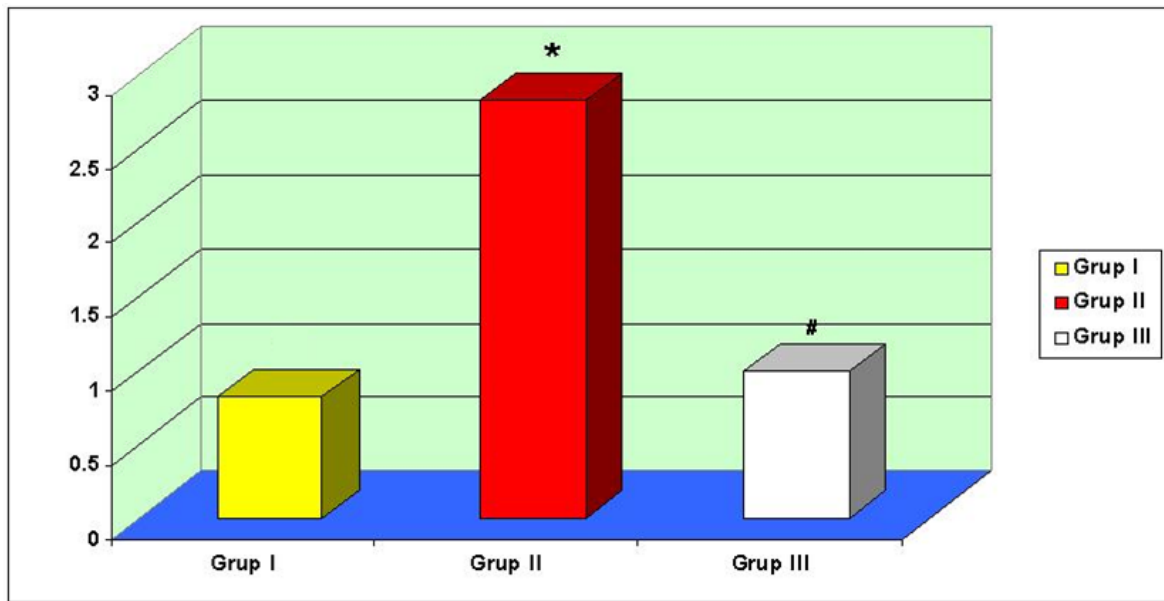
*: $p=0.003$; Grup I ve Grup II karşılaştırıldığında

#: $p=0.001$; Grup II ve Grup III karşılaştırıldığında

Grup I (Kontrol) ve Grup II (PP) karşılaştırıldığında Grup II' de hasar skoru düzeyi Grup I' e göre anlamlı yüksek tespit edildi ($p=0.003$).

Grup I ve Grup III(Medikal Ozon Grubu) karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı fark bulunamadı ($p=0.527$).

Grup II ve Grup III karşılaştırıldığında Grup II'de hasar skoru düzeyi Grup III'e göre anlamlı yüksek tespit edildi ($p=0.001$).



Şekil 8. Grupların Vasküler Konjesyon Açısından Ortalama Hasar Düzeyleri

*: $p=0.003$; Grup I ve Grup II karşılaştırıldığında

#: $p=0.001$; Grup II ve Grup III karşılaştırıldığında

4.2.3. Hemoraji

Her 3 gruba ait hemoraji hasar skoru değerleri Tablo 7 ve Şekil 9'da sunulmuştur.

Tablo 7. Hemoraji

	Grup I (Ort ± SS)	Grup II (Ort ± SS)	Grup III (Ort ± SS)
Hemoraji	$0,17 \pm 0,41$	$3,00 \pm 0,00$ *	$0,17 \pm 0,41$ #

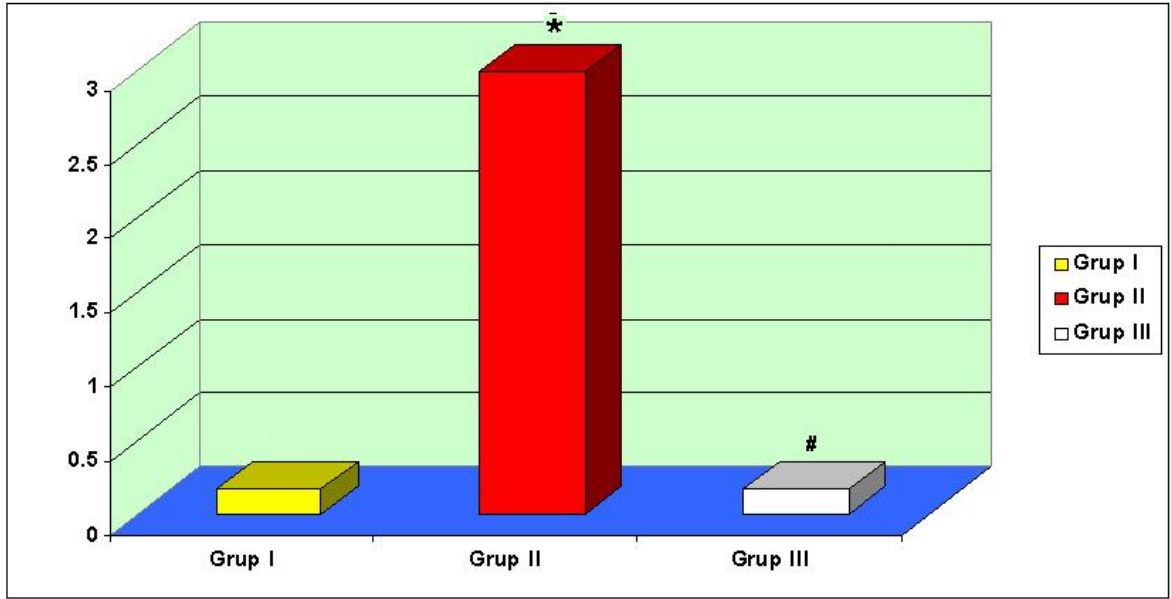
*: $p=0.001$; Grup I ve Grup II karşılaştırıldığında

#: $p=0.001$; Grup II ve Grup III karşılaştırıldığında

Grup I (Kontrol) ve Grup II (PP) karşılaştırıldığında Grup II'de hasar skoru düzeyi Grup I' e göre anlamlı yüksek tespit edildi ($p=0.001$).

Grup I ve Grup III (Medikal Ozon Grubu) karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı fark bulunamadı ($p=1.000$).

Grup II ve Grup III karşılaştırıldığında Grup II'de hasar skoru düzeyi Grup III'e göre anlamlı yüksek tespit edildi ($p=0.001$).



Şekil 9. Grupların Hemoraji Açısından Ortalama Hasar Düzeyleri

*: $p=0.001$; Grup I ve Grup II karşılaştırıldığında

#: $p=0.001$; Grup II ve Grup III karşılaştırıldığında

4.2.4. Alveolar Ödem

Her 3 gruba ait alveolar ödem hasar skoru değerleri Tablo 8 ve Şekil 10'da sunulmuştur.

Tablo 8. Alveolar Ödem

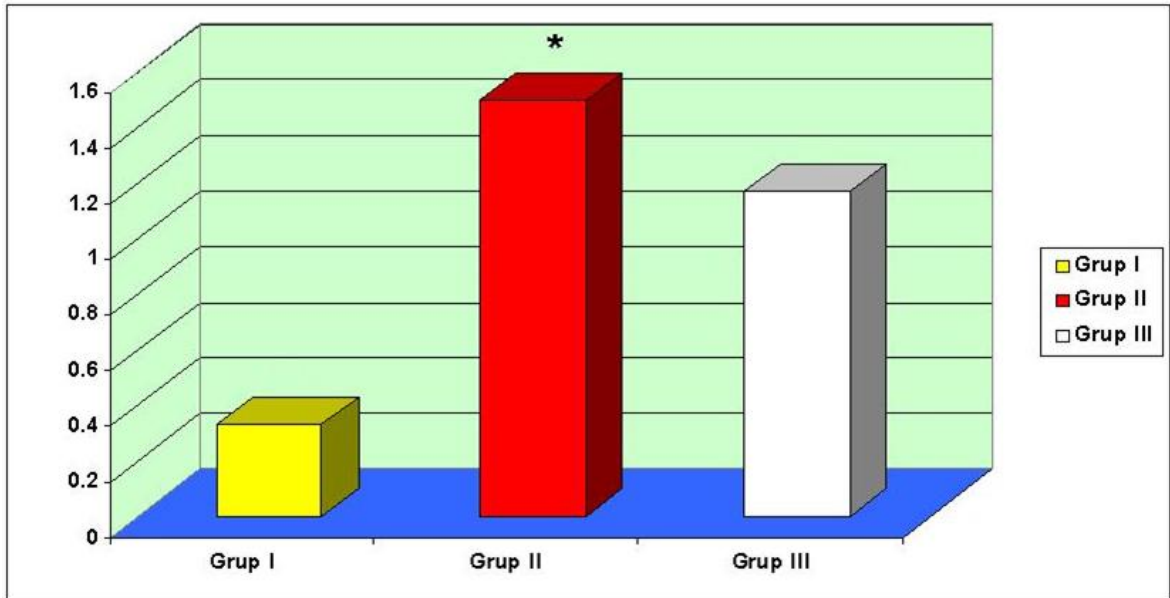
	Grup I (Ort ± SS)	Grup II (Ort ± SS)	Grup III (Ort ± SS)
Alveolar Ödem	<i>0,33 ± 0,51</i>	<i>1,50 ± 0,55 *</i>	<i>1,17 ± 0,75</i>

*: **p= 0.011**; Grup I ve Grup II karşılaştırıldığında

Grup I (Kontrol) ve Grup II (PP) karşılaştırıldığında Grup II'de hasar skoru düzeyi Grup I'e göre anlamlı yüksek tespit edildi (p=0.011).

Grup I ve Grup III (Medikal Ozon Grubu) karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı fark bulunamadı (p=0.057).

Grup II ve Grup III karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı fark bulunamadı (p=0.423).



Şekil 10. Grupların Alveolar Ödem Açısından Ortalama Hasar Düzeyleri

*: **p= 0.011**; Grup I ve Grup II karşılaştırıldığında

4.2.5. İnflamatuvar Hücre İnfiltrasyonu

Her 3 gruba ait inflamatuvar hücre infiltrasyonu hasar skoru değerleri Tablo 9 ve Şekil 11’de sunulmuştur.

Tablo 9. İnflamatuvar Hücre İnfiltrasyonu

	Grup I (Ort ± SS)	Grup II (Ort ± SS)	Grup III (Ort ± SS)
İnflamatuvar Hücre İnfiltrasyonu	<i>0,17 ± 0,41</i>	<i>2,33 ± 0,82 *</i>	<i>0,17 ± 0,41 #</i>

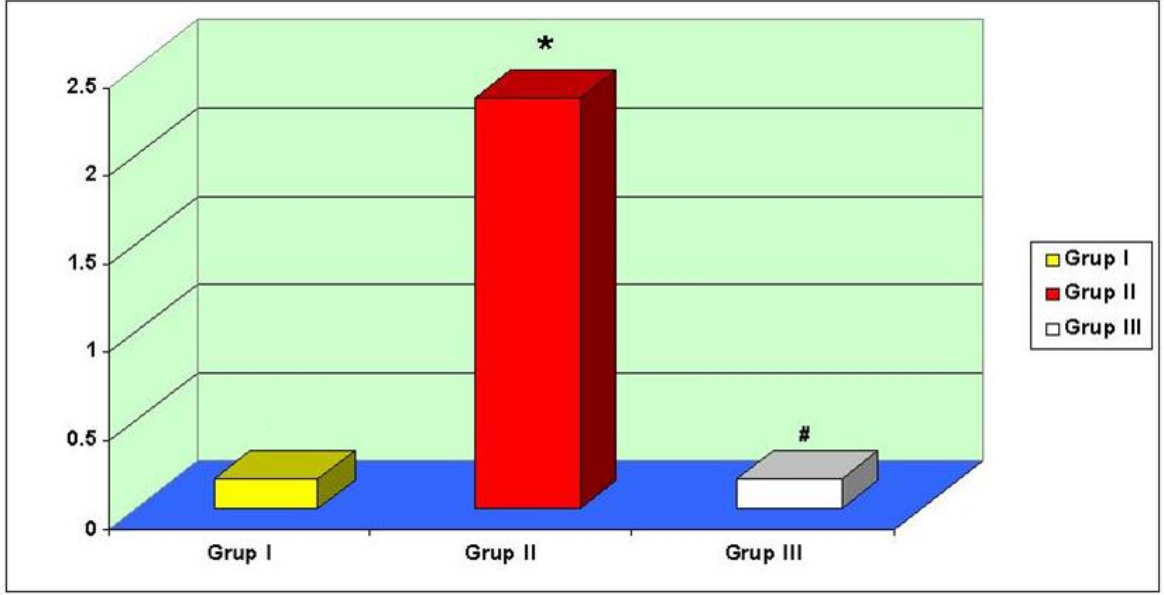
*: **p=0.003**; Grup I ve Grup II karşılaştırıldığında

#: **p=0.003**; Grup II ve Grup III karşılaştırıldığında

Grup I (Kontrol) ve Grup II (PP) karşılaştırıldığında Grup II’de hasar skoru düzeyi Grup I’ e göre anlamlı yüksek tespit edildi (p=0.003).

Grup I ve Grup III (Medikal Ozon Grubu) karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı fark bulunamadı (p=0.408).

Grup II ve Grup III karşılaştırıldığında Grup II’de hasar skoru düzeyi Grup III’e göre anlamlı yüksek tespit edildi (p=0.003).



Şekil 11. Grupların İnflamatuvar Hücre İnfiltrasyonu Açısından Ortalama Hasar Düzeyleri

*: $p=0.003$; Grup I ve Grup II karşılaştırıldığında
 #: $p=0.003$; Grup II ve Grup III karşılaştırıldığında

5. TARTIŞMA

Laparoskopik girişimlerde görüş alanı PP oluşturularak sağlanır. PP'a bağlı oluşan İAB artışının derecesi ve süresiyle orantılı olarak intraabdominal organlar başta olmak üzere akciğer gibi uzak organlarda da İR hasarı gelişebilir (3, 4, 40). Bu deneysel çalışmada PP nedeniyle oluşan İAB artışı sonrası akciğerde gelişen İR'a bağlı oksidatif hasarı önlemede medikal ozonun etkisi; biyokimyasal olarak plazma İMA ile akciğer doku MDA çalışılarak ve ilgili organın histopatolojik incelemesi ile araştırıldı. Çalışmamız sonucu ventile edilen ratlara PP' dan 30 dakika önce intraperitoneal olarak verilen medikal ozonun; CO2 ile 60 dakika PP oluşturulduktan sonra, desuflasyonu takiben 30. dakikadan sonra bakılan plazma İMA düzeyini düşürdüğü ve akciğer dokusunun histopatolojik incelemesinde oksidatif hasarı önlediği gösterildi.

PP'a bağlı İAB artışı nedeniyle oluşan İR hasarı pek çok çalışmada farklı biyokimyasal parametrelerle incelenmiştir. Bu çalışmada İR sonra oksidatif stres ve hasarın bir göstergesi olarak ABD Food and Drug Administration (FDA) kuruluşu tarafından miyokardiyal iskeminin tanısında kullanılabilecek testler listesine konulan İMA seviyeleri analiz edilmiştir (41-43). Normal olarak insan albümini serum içinde kobalt ve bakır gibi metal iyonlarını bağlar. İskemi, hipoksi, asidoz, SOR ve sodyum-kalsiyum pompasının bozulması gibi hücrel değişimler albüminde N-terminal bölgeyi etkileyen modifikasyonlara neden olur. Albüminin N-terminal bölgesindeki bir veya daha fazla aminoasidin N-asetilasyon veya delesyon yoluyla gelişen modifikasyonu azalmış kobalt bağlanmasından sorumludur. Vücudun herhangi bir bölgesinde iskeminin başlamasından kısa bir süre sonra normalde açığa çıkan ve ortamdaki indirgeyici ajanlarla okside olan bakır iyonları N-terminal bölgeye sıkıca bağlanarak albümin tarafından temizlenir. Sonuçta oluşan bu yeni moleküle İMA denilmektedir. Bu nedenle, İMA seviyesi oksidatif hasarının bir belirteci olarak plazma içinde ölçülebilir (44, 45). Bizim çalışmamızda, plazma İMA

seviyesi sadece PP oluşturulan ratlarda kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek ölçüldü ve akciğerin histopatolojik incelemesi ile uyumluydu.

İR hasarında başka bir biyokimyasal belirteç MDA'dır. MDA, lipid peroksidasyonu yıkım ürünüdür ve reperfüzyon doku yaralanmasının önemli bir göstergesidir. Reperfüzyon hasarını konu alan çalışmalarda oksidatif stresi göstermede kullanılan biyokimyasal parametrelerden birisidir (40, 46, 47). Aran ve arkadaşları yaptıkları klinik çalışmada laparoskopik cerrahi geçiren 33 hastada PP'a bağlı oksidatif hasarı insuflasyondan 30 dakika sonra serum oksidatif stres markır düzeylerine bakarak incelemişler. İMA'nın İAB artışına bağlı İR hasarında diğer oksidatif stres markırlarından (MDA, TAS, TOS, OSI) daha sensitif olduğunu göstermişler (47). Bizim çalışmamızda akciğer MDA düzeyi; PP grubunda kontrol grubuna göre yüksek, medikal ozon grubunda ise PP grubuna göre düşük ölçüldü. Fakat istatistiksel olarak gruplar arasında anlamlı fark tespit edilmedi. Bu sonuçlar bize İMA'in İR hasarının gösterilmesinde erken dönemde MDA'dan daha hassas bir belirteç olabileceğini düşündürdü.

PP'a bağlı İAB artışı nedeniyle oluşan İR sonrası gelişen oksidatif hasarın araştırıldığı birçok çalışmada, deneysel İR hasar modelini oluşturmak için farklı basınç ve İR süreleri uygulanmıştır.

Sare ve arkadaşları PP'a bağlı oksidatif hasarı, ratlarda farklı İAB'larda PP oluşturarak akciğer ve karaciğer dokularında katalaz, SOD ve MDA düzeylerini ölçerek değerlendirmişlerdir. Sonuç olarak ratlarda PP nedeniyle oluşan İAB artışının, serbest radikal oluşumunu ve lipid peroksidasyonunu basınç değişikliğine bağlı olarak etkilediğini göstermişlerdir (48). Eleftheriadis ve arkadaşları ise 60 dakika 15 mmHg İAB ile PP uygulamasını takiben, bağırsak, karaciğer, dalak ve akciğerlerin kan akımının belirgin olarak azaldığını ve desüflasyon sonrası serbest oksijen radikal üretiminin arttığını ve bakteriyel translokasyona yol açtığını göstermişlerdir (3). Bir başka deneysel çalışmada ise Kontoulis ve arkadaşları 1 ve 3 saat süreli PP olmak üzere 2 grup oluşturdukları ve gruplardaki hayvanların yarısına 30 dakika reperfüzyon, diğer yarısına da 8 saat reperfüzyon uyguladıkları çalışmalarında, PP süresi arttıkça oksidatif hasarın arttığını biyokimyasal (doku ve plazma MDA, MPO, IL-6, TNF- α) ve histopatolojik olarak göstermişlerdir (46). Biz çalışmamızda farklı İAB ile ilgili hasar riskini azaltmak için, PP ve medikal ozon gruplarında 12 mmHg basıncı muhafaza ettik. 12 mmHg İAB'la 60 dakikalık PP sonrasında ratlar 30 dakika reperfüzyona bırakıldı. Reperfüzyondan sonra

alınan kan ve doku örneklerinin incelenmesi ile sadece PP oluşturulan grupta kontrol grubuna göre plazma İMA değerinin anlamlı yüksek olması ve akciğer dokusundaki anlamlı histopatolojik değişiklikler ile oksidatif hasar gösterildi.

Çeşitli maddeler PP'a bağlı İAB artışı sonucu oluşan oksidatif hasarı önleme etkileri yönünden incelenmiştir. Geze ve arkadaşları ratlarda deksmedetomidinin İAB artışına bağlı akciğerde gelişen İR hasarında koruyucu etkilerini araştırdıkları çalışmalarında; sadece PP oluşturulan grupta plazma İMA düzeyindeki anlamlı artış ve histopatolojik inceleme ile doku hasarını tespit etmiş, PP'dan önce intraperitoneal deksmedetomidin uygulanan grupta plazma İMA düzeyinin PP grubuna göre anlamlı düşüşü ile de deksmedetomidinin oksidatif hasara karşı önleyici etkisi gösterilmiştir (40). Karapolat ve arkadaşları rat akciğerinde İAB artışına bağlı gelişen pulmoner komplikasyonları önlemeyle ilgili çalışmalarında ise 7 gün boyunca ratlara mide lavajı ile antioksidan, antiinflamatuvar özelliği olan erdostein verdikten sonra oluşturdukları PP sonrası desuflasyonu takiben 3. saatte alınan akciğer dokusu değerlendirildiğinde erdosteinin İAB artışına bağlı gelişen akciğer doku hasarını önlediği gösterilmiştir (49). Hirata ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada da akciğer transplantasyonundaki soğuk iskemiye bağlı reperfüzyon hasarını önlemede koruyucu solüsyon içine magnezyum eklenmesinin yararlı olduğunu tespit etmişler ve magnezyumun hem biyokimyasal hem de histopatolojik olarak İR hasarını önlediği gösterilmiştir (50). Mohsenin sağlıklı gönüllüler üzerinde lipid peroksidasyonu ve oksidan stres altında akciğerdeki anti-elastaz aktivitesi üzerine antioksidanların etkisi ile ilgili yaptığı çalışmada E+C vitaminlerinin birlikte verilmesinin, inhale NO₂ ile oksidan strese maruz bırakılan akciğerlerde lipid peroksidasyon inhibisyonuna yol açtığını göstermiştir (51). Çay ve arkadaşları PP'dan 5 dakika ve desuflasyondan hemen önce verilen melatoninin, intraabdominal dokulardaki oksidatif hasarı önlediğini göstermişler (52). Petros ve arkadaşları İAB artışı nedeniyle oluşan oksidatif hasarı önlemede mesnayı kullanmışlar ve splenik organlarda oksidatif hasarı önlediğini göstermişler (53).

Biz çalışmamızda İR ilişkili oksidatif hasar üzerine etkisini göstermede ülkemizde ve dünyada kullanımı artan bir tedavi şekli olması nedeni ile çok sayıda deneysel ve klinik çalışma yapılan medikal ozonu tercih ettik. Medikal ozonun bu etkilerini birden çok mekanizmayla meydana getirdiği gösterilmiştir. İlk etkilerinden biri, eritrositlerdeki 2,3-difosfogliserat düzeyini artırma yolu ile hemoglobin-oksijen ayrışma eğrisinin sağa

kaymasına ve böylece oksijenin dokulara daha kolay bırakmasına neden olmasıdır (54). Medikal ozona maruz kalınması doza bağımlı olarak trombosit fonksiyonlarının artışına neden olmakta ve aktive olmuş trombositler büyüme faktörlerini açığa çıkararak iskemili hastalarda iyileşmeye olumlu etkileri olduğu gösterilmiştir (55). Ayrıca oksidatif stres oluşturularak medikal ozonun etkilerinin araştırıldığı bir çok çalışmada SOD, katalaz ve glutatyon peroksidaz gibi antioksidan enzim düzeylerinin arttırdığı ve MDA düzeylerini azalttığı ve sonuçta dokuları İR hasarından koruduğu gösterilmiştir (8, 54, 56-59).

Yapılan çalışmalar incelendiğinde iskemik hastalıklarda ve İR hasarını düzeltmedeki etkinliği birçok çalışmada araştırılan medikal ozonun laparoskopik İR hasarı modelinde araştırılmadığını tespit ettik.

Chen ve arkadaşları, böbrek İR hasarında medikal ozonun etkisini inceledikleri çalışmada, ratlara 45 dakika iskemi uyguladıktan sonra 24, 48, 72. saatlerde MDA düzeyini ve doku histopatolojisini incelemişler. Sonuçta ozonun böbrek dokusunda antioksidan enzim düzeyini arttırdığını, MDA düzeyini azalttığını ve reperfüzyon hasarından koruduğunu göstermişler (8). Öztosun ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada da ratlarda renal İR hasarı oluşturulmuş. 1 saatlik iskemiden sonra 6 saat reperfüzyona bırakılan ratlarda; medikal ozon tedavisi uygulanan grupta doku oksidatif stres parametrelerinin azaldığı, antioksidan enzim parametrelerinin arttığı ve histopatolojik incelemede hasarın minimal olduğu gösterilmiştir (7). Demirbağ ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada ise yüksek doz asetaminofen ile nefrotoksisite oluşturulmuş ratları 48 saat takip etmişler. Takipte doku MDA, SOD ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) aktiviteleri ölçülmüş ve medikal ozon verilen grupta, MDA düzeyinin anlamlı azaldığı, SOD ve GSH-Px aktivitelerinin arttığı ve renal histolojinin normalleştiği gösterilmiş (60). Aslan ve arkadaşlarının over İR hasarında intraperitoneal verilen medikal ozonun etkisini araştırdıkları deneysel çalışmada; overler 2 saatlik torsiyon sonrası 2 saatte detorsiyon halde bırakıldıktan sonra çıkarılmış. Çıkarılan over dokusunun histopatolojik incelemesi ve MDA ölçümleri sonucunda; ozon verilen grupta torsiyon-detorsiyon grubuna göre histopatolojik olarak over ve paraoveryan intersitisyel ödem, overyan konjesyonun daha az olduğu, MDA değerinin anlamlı olarak azalmış olduğu ve sonuçta over torsiyonu sonrası meydana gelen İR hasarında intraabdominal medikal ozon uygulamasının histolojik ve biyokimyasal parametrelere olumlu etkisi olduğunu tespit etmişler (58). Güven ve arkadaşlarının özefagus yanığı oluşturulmuş ratlarda intraperitoneal verilen medikal

ozonun etkisini araştırdıkları deneysel çalışmada; ratlar 48 saat takip edildikten sonra stenoz indeksi, histopatolojik hasar skoru, biyokimyasal olarakta oksidatif stres ve antioksidan enzimlere etkisi açısından incelenmiş. Çalışma sonucunda, stenoz indeksi ve histopatolojik hasar skorunun medikal ozon verilen grupta verilmeyen gruba göre anlamlı derecede duşuk olduğu, ayrıca tedavi edilen grupta SOD ve glutatyon peroksidaz gibi antioksidan enzimlerin tedavisiz gruba göre yüksek olduğu, MDA düzeyinin ise anlamlı derecede duşuk olduğu izlenmiş ve sonuç olarak ozon tedavisinin fibrozis gelişimini azalttığı, antioksidan kapasiteyi arttırdığı ve oksidatif stresi azalttığı deneysel olarak gösterilmiştir (57). Başka bir çalışmalarında ise deneysel nekrotizan enterokolit (NEC) oluşturulmuş ratlarda intraperitoneal verilen medikal ozonun etkisi incelenmiş. Deneysel NEC oluşturulduktan sonra 3 gün takip edilen ratlar biokimyasal ve histopatolojik olarak incelenmiş. Sonuç olarak medikal ozonun antioksidan kapasiteyi arttırdığı, oksidatif stresi azalttığı bu çalışmalarında da gösterilmiş olup ayrıca histopatolojik hasar skorunun medikal ozon tedavisi yapılan grupta anlamlı olarak duşuk olduğu izlenmiştir (56). Bizim alışmamızda da histopatolojik incelemede medikal ozon verilen grupta PP grubuna göre akciğer dokularının genel olarak normal akciğer alveolar yapısında olması ve hasar skorunun duşuk tespit edilmesi ile medikal ozon tedavisinin İR ilişkili oksidatif hasarı önlediği gösterildi. Ancak doku MDA analizinde medikal ozon verilen gruptaki luimsel azalmanın anlamlı olmaması; MDA'nın tedaviye geç yanıt vermesine ve reperfüzyon süresine bağlı olabileceği duşunldu.

Bizim alışmamızda, akciğer dokusu alveolar yapıda bozulma, vasküler konjesyon, hemoraji, alveolar ödem ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu yönünden histopatolojik olarak değerlendirilerek skorlandı. Histopatolojik inceleme sonucunda; PP grubunda akciğer dokularında orta ve şiddetli derecede interalveolar hemoraji, alveolar yapıda dejenerasyon, interalveolar ödem ile lökosit infiltrasyonu izlendi ve kontrol grubuna göre hasar skorları anlamlı olarak yüksekti. Medikal ozon grubunda ise akciğer dokuları genel olarak normal akciğer alveolar yapısı gösteriyordu ve kontrol grubu ile arasında anlamlı fark tespit edilmedi. Bu sonuçlara göre medikal ozon, PP grubunda akciğerde histopatolojik olarak gösterilen tüm iskemik değişiklikleri önlemiş ve istatistiksel olarak kontrol grubu ile aynı noktaya getirmiştir.

Sonuç olarak bizim çalışmamız da, PP'a bağlı İAB artışı sonrası gelişen İR ilişkili oksidatif hasarı önlemede medikal ozon uygulamasının plazma İMA seviyelerini

düşürdüğü, akciğer dokusunda histopatolojik olarak hasarı önlediği gösterildi. Ülkemizde ve dünyada klinik olarak kullanılan medikal ozonun laporoskopik prosedürlerde oksidatif hasarı önlemede kullanılabileceği düşüncesindeyiz. Bu durum farklı parametreler kullanılarak deneysel ve klinik çalışmalarla desteklenmelidir.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Biz bu çalışmada deneysel laparoskopi modelinde 12 mmHg basınç ile oluşturulan PP sonrası İAB artışına bağlı akciğerdeki İR hasarını; kan İMA düzeyi ve histopatolojik parametrelerle inceledik. Medikal ozonun bu hasarı önleyici etkisini akciğer doku MDA ölçümü ve histopatolojik inceleme ile araştırdık.

Sonuçlar aşağıdaki şekilde özetlenebilir:

1. Grup II (PP Grubu)'de oksidatif hasar parametrelerinden İMA diğer gruplara göre anlamlı yüksek bulundu. Grup I (Kontrol Grubu) ile Grup III (Medikal Ozon Grubu) arasında anlamlı fark yoktu.
2. Grup II'de akciğer dokusunda yaygın interalveolar ödem, interalveolar hemoraji ve alveolar yapıda bozulma izlendi.
3. Grup III'te İMA değerleri Grup II'ye göre anlamlı düşük bulundu ve Grup I (kontrol) ile anlamlı fark tespit edilemedi.
4. Grup III'te akciğer dokusu normale yakın görünümde idi. Grup I ile anlamlı fark tespit edilemedi.
5. Akciğer dokusunda yapılan MDA ölçümlerinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte Grup II'deki MDA değeri Grup I ve Grup III'e göre yüksek değerlerdeydi.
6. Her bir gruba ait preparatlar, ilgili doku için tanımlanan hasar skorlaması yapılarak sayısal değerlere dönüştürüldü ve en yüksek hasar değerlerinin Grup II'de olduğu görüldü. Medikal ozon verilen grupta ise bu değerlerin anlamlı düştüğü ve normal akciğer dokusu skorlarında olduğu görüldü.

Sonuç olarak çalışmamızda PP sonrası İAB artışına bağlı akciğerlerde İR hasarı meydana geldiğini ve medikal ozonun bu hasarı önlediğini tespit ettik. Çalışmamızın sonuçları doğrultusunda medikal ozonun İR hasarını önlemede kullanılabileceği

düşüncesindeyiz. Bu durum farklı parametreler kullanılarak deneysel ve klinik çalışmalarla desteklenmelidir.

7. ÖZET

VENTİLE EDİLEN RATLARDA İNTRAABDOMİNAL BASINÇ ARTIŞINA BAĞLI GELİŞEN AKCİĞER HASARINI ÖNLEMEDE MEDİKAL OZONUN ETKİSİ

Laparoskopik prosedürlerde oluşturulan pnömoperitonyum (PP) sonucu meydana gelen intraabdominal basınç (İAB) artışının splanknik organlarda İR hasarına neden olabildiği deneysel ve klinik çalışmalarla gösterilmiştir. İR'a bağlı hasar intraabdominal organların yanısıra akciğer gibi uzak organ hasarına da neden olabilir. PP'a bağlı İAB artışı nedeniyle oluşan İR hasarını önlemede pek çok madde kullanılmıştır. Bu çalışmada ventile edilen ratlarda PP sonrası oluşan akciğer hasarını önlemede medikal ozonun etkisi araştırıldı.

250–300 gr ağırlığında Spraque-Dawley cinsi 18 adet dişi rat, rastgele şekilde her grupta 6 rat olmak üzere 3 gruba ayrıldı. Uygun anesteziyi takiben tüm ratlara trakeostomi açıldı ve mekanik ventilatöre bağlandı. Grup I (Kontrol Grubu): PP oluşturulmadan sadece ventile edildi. Grup II (Pnömoperitonyum grubu): 12 mmHg basınç ile 60 dakika PP oluşturuldu. Grup III (Medikal Ozon Grubu): 12 mmHg basınç ile 60 dakika PP oluşturuldu. PP oluşturmadan 30 dakika önce intraperitoneal olarak 1 mg/kg medikal ozon verildi. Her bir gruptaki ratlar 60 dakika PP sonrası 30 dakika reperfüzyona bırakıldı. 120 dk'lık PP'dan sonra kan ve doku örnekleri alındı. Plazmada iskemi modifiye albumin (İMA), akciğer dokusunda malondialdehit (MDA) düzeyi ölçüldü ve dokular histopatolojik olarak incelendi.

Plazmada çalışılan İMA düzeyleri incelendiğinde; Grup II'de diğer gruplara göre anlamlı yüksek bulunurken, Grup I ve Grup III arasında anlamlı fark yoktu. Bakılan doku MDA düzeylerinde anlamlı değişiklik gözlenmedi. Histopatolojik incelemede ise Grup II'ye ait akciğer dokularında orta ve şiddetli derecede interalveolar hemoraji, alveolar yapıda dejenerasyon, interalveolar ödem ve lökosit infiltrasyonu izlendi. Medikal ozon verilen grupta; akciğer dokusunda İR hasarına ilişkin bu değişikliklerin neredeyse tamamen önlendiği, yer yer az miktarda interalveolar ödem dışında normal akciğer dokusu görüntüsünde olduğu tespit edildi.

Sonuç olarak bu çalışmada PP sonrası İAB artışına bağlı akciğer dokusunda İR hasarı meydana geldiği, medikal ozon verilerek İMA seviyelerinin düştüğü ve akciğer dokusunun histopatolojik incelemesi ile bozulma bulgularının önlendiği gösterilmiştir.

8. SUMMARY

THE EFFECTIVITY OF MEDICAL OZONE ON PREVENTING LUNG INJURY RELATED TO INCREASED INTRAABDOMINAL PRESSURE IN VENTILATED RATS

Experimental and clinical studies demonstrated that laparoscopic procedures may result with ischemia-reperfusion (IR) injury in splanchnic organs due to PP dependent intraabdominal pressure increase. Ischemia-reperfusion injury influences not only intra-abdominal organs, but also distant organs, such as lung. Many substances have been used to prevent the IR injury secondary to PP induced increased IAP. In this study, we investigated the effect of medical ozone on preventing lung injury after pneumoperitoneum (PP) in ventilated rats.

Eighteen Sprague Dawley rats with body weight of 250-300 g were randomly divided into 3 groups with 6 rats in each group. Following anesthesia induction, all rats were tracheostomized and mechanically ventilated.

Group 1 (Control Group): rats were ventilated without inducing pneumoperitoneum. Group 2 (Pneumoperitoneum Group): Pneumoperitoneum was induced for 60 minutes at pressure of 12 mmHg. Group 3 (Medical Ozone Group): Pneumoperitoneum was induced for 60 minutes at pressure of 12 mmHg. Medical ozone was administered at dose of 1 mg/kg via intraperitoneal route 30 minutes before pneumoperitoneum was induced. All rats of three groups were reperused for 30 minutes following 60-minute pneumoperitoneum. Blood and tissue specimens were taken following 120-minute pneumoperitoneum. Ischemia modified albumin (IMA) level was measured in plasma sample, while malondialdehyde levels were determined in lung, and histopathological examination performed for tissue specimens.

When plasma IMA levels were assessed, Group 2 had significantly higher values in comparison with other groups, and there was no significant difference between Group 1 and Group 3. Also no significant difference observed for tissue MDA levels. On histopathologic examination, moderate to severe interalveolar hemorrhage, alveolar degeneration, interalveolar edema and leukocyte infiltration were observed in pulmonary tissues of Group II. In Medical Ozone Group, it was observed that ischemia/reperfusion-related changes were almost totally prevented in pulmonary tissue, and lung tissue had normal appearance, except non-diffuse mild interalveolar edema.

In conclusion, this study demonstrated that ischemia-reperfusion injury occurs in lung tissue secondary to PP depended intra-abdominal pressure increase and medical ozone decreases IMA levels and prevents histopathological findings in lung tissue.

9. KAYNAKLAR

1. Rosin D, Brassesco O, Varela J, Saber AA, You S, Rosenthal RJ, Cohn SM. Low-pressure laparoscopy may ameliorate intracranial hypertension and renal hypoperfusion. *J Laparoendosc Adv Surg Tech A*. 2002; 12(1):15-9.
2. Schafer M, Krahenbuhl L. Effect of laparoscopy on intra-abdominal blood flow. *Surgery*. 2001; 129:385-9.
3. Eleftheriadis E, Kotzampassi K, Papanotas K, Heliadis N, Sarris K. Gut ischemia, oxidative stress and bacterial translocation in elevated abdominal pressure in rats. *World J Surg*. 1996; 20(1): 11-6.
4. Polat C, Yilmaz S, Serteser M, Koken T, Kahraman A, Dilek ON. The effect of different intraabdominal pressures on lipid peroxidation and protein oxidation status during laparoscopic cholecystectomy. *Surg Endosc*. 2003; 17(11): 1719-22.
5. Bentes de Souza AM, Wang CC, Chu CY, Lam PM, Rogers MS. The effect of intra abdominal pressure on the generation of 8-iso prostaglandin F_{2α} during laparoscopy in rabbits. *Hum Reprod*. 2003; 18(10): 2181-8.
6. Hasson HM, Galanopoulos C, Langerman A. Ischemic necrosis of small bowel following laparoscopic surgery. *JLS*. 2004; 8(2):159-63.
7. Öztosun M, Akgül EÖ, Çakır E et al. The Effects of Medical Ozone Therapy on Renal Ischemia/Reperfusion Injury. *Renal Failure* 2012; 34(7): 921–5.
8. Chen H, Xing B, Liu X, Zhan B, Zhou J, Zhu H, et al. Ozone oxidative preconditioning protects the rat kidney from reperfusion injury: the role of nitric oxide. *J Surg Res*. 2008; 149(2): 285-95.
9. Bocci V. Physical-chemical properties of ozone. Natural production of ozone. The toxicology of ozone. In: *Ozone. A new medical drug*. Dordrecht: Springer; 2005, pp. 5-8.
10. Bocci VA. Scientific and medical aspects of ozone therapy. State of the art. *Arch Med Res*. 2006; 37(4): 425-35.

11. Re L, Mawsouf MN, Menendez S, Leon OS, Sanchez GM, Hernandez F. Ozone therapy: clinical and basic evidence of its therapeutic potential. *Arch Med Res.* 2008; 39(1): 17-26.
12. Bocci V. How does ozone act? How and why can We avoid ozone toxicity? In: Bocci V, editor. *Ozone. A new medical drug.* Dordrecht: Springer; 2005, pp. 19-28.
13. Ozawa A, Konishi F, Nagai H, et al: Cytokine and hormonal responses in laparoscopic-assisted colectomy and conventional open colectomy. *Surg Today.* 2000; 30(2): 107-11.
14. Burpee SE, Kurian M, Murakeme Y; et al: The metabolic and immune response to Laparoscopic versus open liver resection. *Surg edosc.* 2002; 16(6): 899-904.
15. Wilson CW, Benumof JL. Respiratory physiology and Respiratory function during anesthesia. In: Miller RD (ed) *Anesthesia* 6th edition. NewYork: Churchill-Livingstone; 2005, pp. 679-722.
16. Paller MS. The cell biology of reperfusion injury in the kidney. *J Invest Med.* 1994; 42(4): 632-9.
17. Iwanaka T, Uchida H, Kawashima H, Nishi A, Kudou S, Saitama S. R. Complications of Laparoscopic Surgery in Neonates and Small Infants. *Journal of Pediatric Surgery* 2004; 39(12): 1838-41.
18. Bozkurt P, Kaya G, Yeker Y, Tunali Y, Altıntaş F. The cardiorespiratory effects of laparoscopic procedures in infants. *Anaesthesia.* 1999; 54(9): 831-4.
19. Champe P. C. *Biokimya, Nobel Kitapevi, Ankara, 1997, s. 95.*
20. Collard CD, Gelman S. Pathophysiology, clinical manifestations and preventations of ischemia-reperfusion injury. *Anesthesiology.* 2001; 94(6): 1133-8.
21. Lentsch AB, Atsushi K, Yoshidome H et al. Inflammatory mechanisms and therapeutic strategies for warm hepatic ischemia/reperfusion injury. *Hepatology.* 2000; 32(2): 169–73.
22. Kumar V, Cotran R, Robbins SL. *Basic Pathology.* 6th edition. Philadelphia: W. B. Saunders; 2000, pp. 6-10.
23. Burçak G, Andican G. Oksidatif DNA Hasarı ve Yaşlanma. *Cerrahpaşa J Med.* 2004; 35(4): 159-69.
24. Gutteridge JMC. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem.* 1995; 41(12 Pt 2): 1819-28.

25. Somuncu S, Cakmak M, Dikmen G, et al: Ischemia-reperfusion injury of rabbit ovary and protective effect of trapidil. An experimental study. *Pediatr Surg Int.* 2008; 24(3): 315-8.
26. Nakamura T, Vollmar B, Winning J, Ueda M, Menger MD, Schäfers HJ. Heparin and the nonanticoagulant N-acetyl heparin attenuate capillary no-reflow after normothermic ischemia of the lung. *Ann Thorac Surg.* 2001; 72(4): 1183-8.
27. Goldman G, Welbourn R, Klausner JM, Kobzik L, Valeri CR, Shepro D. Mast cells and leukotrienes mediate neutrophil sequestration and lung edema after remote ischemia in rodents. *Surgery.* 1992; 112(3): 578-86.
28. Tsereteli Z, Terry ML, et al: Prospective randomized clinical trial comparing nitrous oxide and carbon dioxide pneumoperitoneum for laparoscopic surgery. *J Am Coll Surg.* 2002; 195(2): 173-9.
29. Groeneveld AB, Raijmakers PG, Rauwerda JA, Hack CE. The inflammatory response to vascular surgery-associated ischaemia and reperfusion in man: effect on postoperative pulmonary function. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 1997; 14(5): 351-9.
30. Klausner JM, Paterson IS, Kobzik L, Valeri CR, Shepro D, Hechtman HB. Oxygen free radicals mediate ischemia-induced lung injury. *Surgery.* 1989; 105(2 Pt 1): 192-9.
31. Kyriakides C, Austen WG Jr, Wang Y, Favuzza J, Moore FD Jr, Hechtman HB. Neutrophil mediated remote organ injury after lower torso ischemia and reperfusion is selectin and complement dependent. *J Trauma.* 2000; 48(1): 32-8.
32. Aviram, M. Malondialdehyde affects the physico-chemical and biological characteristics of oxidized low density lipoprotein. *Atherosclerosis.* 1990; 84(2-3): 141-3.
33. Sadler PJ, Tucker A, Viles JH. Involvement of a lysine residue in the N-terminal Ni²⁺, and Cu²⁺ binding site of serum albumins. Comparison with Co²⁺, Cd²⁺, Al³⁺. *Eur J Biochem.* 1994; 220(1): 193-200.
34. Bar D, Lau E, Winkler JV. A novel assay for cobalt-albumin binding and its potential as a marker for myocardial ischemia-a preliminary report. *J Emerg Med.* 2000; 19(4): 311-5.
35. Köksal H, Kurban S, Şahin M. Laparoskopik kolesistektomi süresince splanknik sahadaki hemodinamik değişikliklerin değerlendirilmesinde iskemi modifiye albuminin rolü. *Ulusal Cerrahi Dergisi* 2010; 26(2): 91-4.
36. Özler M: The use of ozone gas for Medical Purposes. *TAF Prev Med Bull.* 2009; 8(1): 59-64
37. Di Paolo N, Bocci V, Gaggiotti E. Ozone therapy. *Int J Artif Organs.* 2004; 27(3): 168-75.

38. Uchiyama M, Mihara M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Analytical Biochem.* 1978; 86(1): 271-8.
39. Tekinbaş C, Ulusoy H, Yulug E, Alver A, Erol MM, Yenilmez E, Geze Ş, Topbaş M. One-lung Ventilation: For How Long? *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2007; 134(2): 405-10.
40. Geze S, Cekic B, Imamoglu M, Yoruk MF et al. Use of Dexmedetomidine to Prevent Pulmonary Injury After Pneumoperitoneum in Ventilated Rats. *Surg Laparosc Endosc Percutan Tech.* 2012; 22(5): 447-53.
41. Sinha MK, Roy D, Gaze DC, Collinson PO, Kaski JC. Role of "Ischemia modified albumin", a new biochemical marker of myocardial ischaemia, in the early diagnosis of acute coronary syndromes. *Emerg Med J.* 2004; 21(1): 29-34.
42. Sinha MK, Gaze DC, Tippins JR, Collinson PO, Kaski JC. Ischemia modified albumin is a sensitive marker of myocardial ischemia after percutaneous coronary intervention. *Circulation.* 2003; 107(19): 2403-5.
43. Erturk E, Cekic B, Geze S, Kosucu M, Coskun I, Eroglu A, Ulusoy H, Mentese A, Karahan C, Kerimoglu S. Comparison of the effect of propofol and N-acetyl cysteine in preventing ischaemia-reperfusion injury. *Eur J Anaesthesiol.* 2009; 26(4): 279-84.
44. Bar D, Curtis G, Rao N, Bampos N, Lau E. Characterization of the Co(2+) and Ni(2+) binding amino-acid residues of the N-terminus of human albumin. An insight into the mechanism of a new assay for myocardial ischemia. *Eur J Biochem.* 2001; 268(1): 42-7.
45. Roy D, Quiles J, Gaze DC, Collinson P, Kaski JC, Baxter GF. Role of reactive oxygen species on the formation of the novel diagnostic marker ischaemia modified albumin. *Heart.* 2006; 92(1): 113-4.
46. Kontoulis TM, Pissas DG, Pavlidis TE, Pissas GG, Lalountas MA, Koliakos G, Topouridou K, Sakantamis AK. The Oxidative Effect of Prolonged CO(2) Pneumoperitoneum A Comparative Study in Rats. *J Surg Res.* 2012; 175(2): 259-64.
47. Aran T, Unsal MA, Guven S, Kart C, Cetin EC, Alver A. Carbon dioxide pneumoperitoneum induces systemic oxidative stress: a clinical study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2012; 161(1): 80-3.
48. Sare M, Hamamcı D, Yılmaz I, Birincioğlu M, Mentese BB, Özmen M, Yeşilada Ö. Effects of carbon dioxide pneumoperitoneum on free radical formation in lung and liver tissues. *Surg Endosc.* 2002; 16(1): 188-92.
49. Karapolat S, Gezer S, Yildirim U, Dumlu T, Karapolat B, Ozaydin I, Yasar M, Iskender A, Kandis H, Saritas A. Prevention of Pulmonary Complications of Pneumoperitoneum in Rats. *J Cardiothoracic Surg.* 2011; 6: 14.

50. Hirata T, Fukuse T, Ishikawa S, Miyahara R, Wada H. Addition of ATP and MgCl₂ to the preservation solution attenuates lung reperfusion injury following cold ischemia. *Respiration*. 2001; 68(3): 292-8.
51. Mohsenin V. Lipid peroxidation and antielastase activity in the lung under oxidant stress: role of antioxidant defenses. *J Appl Physiol* (1985). 1991; 70(4): 1456-62.
52. Çay A, İmamoğlu M, Ünsal MA, Aydın S, Alver A, Akyol A, Sarihan H. Does Anti-Oxidant Prophylaxis with Melatonin Prevent Adverse Outcomes Related to Increased Oxidative Stress Caused by Laparoscopy in Experimental Rat Model? *J Surg Res*. 2006; 135(1): 2-8.
53. Ypsilantis P, Tentes I, Anagnostopoulos K, Kortsaris A, Simopoulos C. Mesna protects splanchnic organs from oxidative stress induced by pneumoperitoneum. *Surg Endosc*. 2009;23(3):583–9.
54. Bocci V. *Ozone a new medical drug*. Dordrecht: Springer; 2005, pp. 75-85.
55. 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
56. Guven A, Gundogdu G, Sadir S, Topal T, Erdogan E, Korkmaz A, Surer İ, Oztur H. Medical ozone therapy reduces oxidative stress and intestinal damage in a experimental model of necrotizing enterocolitis in rats. *J Ped Surg*. 2009; 44(9): 1730-35.
57. Guven A, Gundogdu G, Sadir S, Topal T, Erdogan E, Korkmaz A, Surer İ, Oztur H. The efficacy of ozone therapy in experimental caustic esophageal burn. *J Ped Surg*. 2008; 43(9): 1679-84.
58. Aslan MK, Boybeyi Ö, Şenyücel MF, Ayva Ş, Kısa Ü, Aksoy N, Soyer T, Cesur Ö, Çakmak M. Protective effect of intraperitoneal ozone application in experimental ovarian ischemia/reperfusion injury. *J Pediatric Surg*. 2012; 47(9): 1730-4.
59. Özler M, Ersöz N, Özerhan İH, Harlak A, Sadır S, Topal T, Öter Ş, Korkmaz A. Sıçanlarda oluşturulmuş peritoneal adezyon üzerine ozon tedavisinin etkisi. *TAF Prev Med Bull*. 2009; 8(1): 59-64.
60. Demirbağ S, Uysal B, Güven A et al. Effects of medical ozone therapy on acetaminophen-induced nephrotoxicity in rats. *Renal Failure*. 2010; 32(4): 493–7.