



T.C.

ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**DENEYSEL ARTRİTTE OZON UYGULAMASININ ETKİSİ**

HAZIRLAYAN

Kübra MAZLUM

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Mustafa EDREMİTLİOĞLU

FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

ÇANAKKALE-2019



T.C.

ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

## DENEYSEL ARTRİTTE OZON UYGULAMASININ ETKİSİ

HAZIRLAYAN  
Kübra MAZLUM

TEZ DANIŞMANI  
Prof. Dr. Mustafa EDREMİTLİOĞLU

FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

ÇANAKKALE-2019

Bu Tez Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri  
Koordinasyon Birimince Desteklenmiştir. Proje no: TSA-2018-1128

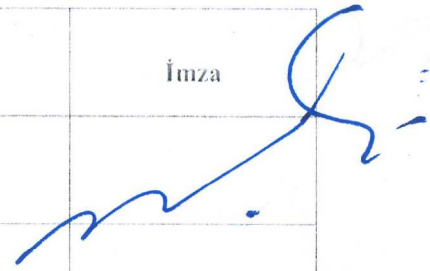

## TEZ ONAY FORMU

Kurum Adı : Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Program Adı : Fizyoloji  
Programın Seviyesi : Yüksek Lisans (x) Doktora ( )  
Anabilim Dalı : Fizyoloji Anabilim Dalı  
Tez Sahibi Adı ve Soyadı: Kübra MAZLUM  
Tez Başlığı : Deneysel Artritte Ozon Uygulamasının Etkisi  
Sınav Yeri : ÇOMÜDAM Konferans Salonu

Sınav Tarihi : 29.08.2019

Yukarıda tanıtımı yapılan tez, Tez Sınav Jürisi tarafından okunmuş, kapsam ve kalite yönünden başarılı bulunarak Yüksek Lisans/Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

### Tez Sınav Jürisi

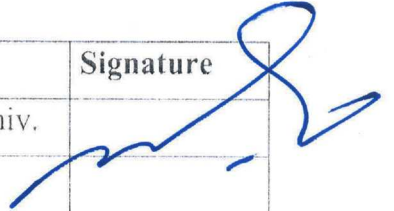


Danışman (Ünvan ve Adı)	Kurumu	İmza
Prof. Dr. Mustafa EDREMİTLİOĞLU	Çanakkale Onsekiz Mart Üniv.	
<b>Sınav Jüri Üyeleri (Unvan ve Adları)</b>		
Prof. Dr. Metehan UZUN	Çanakkale Onsekiz Mart Üniv.	
Dr. Öğr. Üyesi Oğuzhan KORKUT	Balıkesir Üniversitesi	

Tez sınav jürisi tarafından başarılı olarak kabul edilen Yüksek Lisans/Doktora Tezi Enstitü Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun ...../...../..... tarih ve ..... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

## THESIS APPROVAL FORM

Institute Name : Çanakkale Onsekiz Mart University Institute of Health Sciences  
Programme Name : Physiology  
Programme Level : Master of Science (x) Doctor of Philosophy ()  
Department : Physiology  
Student Name and Surname: Kübra MAZLUM  
Title of the Thesis : Effect of Ozone Administration in Experimental Arthritis  
Examination Place : ÇOMÜDAM Konferans Salonu  
Examination Date : 29.08.2019

We have investigated the present thesis in regard to content and quality and have approved as a Master of Science / Doctor of Philosophy Thesis.

Supervisor (Title and Name)	Institution	Signature
Prof. Dr. Mustafa EDREMİTLİOĞLU	Çanakkale Onsekiz Mart Üniv.	
<b>Members of Examination Jury (Titles and Names)</b>		
Prof. Dr. Metehan UZUN	Çanakkale Onsekiz Mart Üniv.	
Dr. Öğr. Üyesi Oğuzhan KORKUT	Balıkesir Üniversitesi	

The above examination jury decision has been approved by Administrative Board of Health Science Institute, Çanakkale Onsekiz Mart University, with decision dated ..... and numbered .....

## BEYAN FORMU

Bu tezin kendi çalışmam olduğunu, planlanmasından yazımına hiçbir aşamasında etik dışı davranışımın olmadığını, tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları kaynaklar listesine aldığımı, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarımı ihlal edici bir davranışımın olmadığını, Yükseköğretim Kurulu Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesi, Madde 8’de belirtilen ve ayrıntılı olarak tanımlanan etiğe aykırı eylemleri (intihal, sahtecilik, çarpıtma, tekrar yayım, dilimleme, haksız yazarlık ve diğer etik ihlali türleri) yapmadığımı onurumla beyan ederim.

**Tarih:**

**Tez Sahibi Adı ve Soyadı:** Kübra MAZLUM

**İmza:**



## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi birikiminden ve deneyimlerinden yararlandığım, tez konumun belirlenmesi, tezimin hazırlanması ve yazım aşamalarında büyük yardım ve katkıları olan, her konuda yardımlarını esirgemeyen, tüm yönleriyle kendime örnek aldığım saygıdeğer danışman hocam Prof. Dr. Mustafa EDREMITLİOĞLU'na

Yüksek lisans eğitimi süresince bilgi birikimlerinden yararlandığım, verdiği destek ve katkılarından dolayı Fizyoloji Anabilim Dalı'ndaki hocam Prof. Dr. Metehan UZUN'a

Tezim süresince klinik çalışmalarda yardımını ve desteğini esirgemeyen tezimin yazım sürecinde ise gerek bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım sevgili hocam Dr. Öğr. Üyesi Coşkun ZATERİ'ye,

Tezimdeki çalışmada histopatolojik incelemesinde bilgi birikimlerini esirgemeyen değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Başak BÜYÜK'e ve deneysel çalışmam süresinde yardımlarını esirgemeyen Vet. Hekim Sait ELMAS'a ve Arş. Gör. Mehmet Akif OVALI'ya,

Tezimin biyokimyasal analizlerin yapılmasında rehberlik eden değerli hocam Biyokimya A. D. Öğretim Üyesi Dr. Öğr. Üyesi Hakan TÜRKON' a,

Tezimin en başından en sonuna kadar yazım, klinik çalışma, malzemeler, biyokimyasal analizler, istatistik analizlerinde ve alkali komet yönteminin bütün aşamalarında desteğini ve bilgisini esirgemeyen, tecrübelerinden yararlanıp bana yol gösteren sevgili Öğr. Gör. Pınar YÜKSEL'e,

Her zaman maddi ve manevi yanımda olup, hiçbir zaman desteklerini esirgemeyen, varlıklarıyla mutlu olmamı sağlayan ve her kararımı hoşgörüyü karşılayıp yol gösteren sevgili babam Ramazan MAZLUM ve canım annem Nevize MAZLUM'a ve çalışmamda da grafik konusunda bana destek olan sevgili ikizim Mustafa MAZLUM'a,

Bu Tez Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimince Desteklenmiştir. Proje no: TSA-2018-1128,

Teşekkürlerimi sunarım.

## ÖZET

Bu çalışmada, deneysel artrit sıçan modelinde 20-50 µg/ml yoğunluğunda ozonun rektal yolla uygulanmasının romatoid artrit (RA)'da tedavi edici bir etki oluşturup oluşturmadığı ve DNA hasarına neden olup olmadığı incelenmiştir. Bu amaçla Wistar Albino sıçanlarda Complete Freud Adjuvant (CFA) ile artrit oluşturuldu. Artrit geliştikten sonra hayvanların bir kısmına birinci hafta 0,5 mg/kg, ikinci ve üçüncü hafta 1,25 mg/kg yoğunluğunda ve 5 ml gaz hacminde rektal yolla ozon uygulandı. Ozon uygulanmayan diğer hayvanlara ise rektal stres yaşatıldı. Bu süre boyunca tüm hayvanların görsel skorlama, pençe çap ve ağırlık ölçümü yapıldı. Çalışmanın sonunda hayvanlar sakrifiye edilip, doku ve kan örnekleri alındı. Alınan kan örneklerinden alkali komet yöntemiyle DNA hasarı, sedimentasyon, TAS ve TOS analizleri yapıldı. Dokular ise histopatolojik olarak hücresel infiltrasyon ve kemik rezorpsiyonu açısından incelendi. Çalışma sonuçlarına göre ozon uygulamasına bağlı olarak; görsel skorlamada hastalığın klinik seyrinde anlamlı bir değişiklik meydana gelmedi. Hücresel infiltrasyon ve kemik rezorpsiyonunda anlamlı bir iyileşme göstermedi. Rektal ozon uygulaması artrite bağlı olarak artmış olan sedimentasyon değerlerinde belirgin bir şekilde azalma gösterdi. Artrite bağlı olarak artmış olan DNA hasarında ozon uygulaması ilave bir artış oluşturmadı. Ozon uygulaması TOS değerlerinde beklenilenin aksine anlamlı azalma meydana getirirken, TAS değerlerini artırdı. Sonuç olarak: RA'da rektal ozon uygulamasının tedavi edici bir etkisi gözlenmedi.

**Anahtar Sözcükler:** Romatoid artrit, Ozon, DNA hasarı, Komet yöntemi, TAS ve TOS.

## ABSTRACT

### Effect of Ozone Administration in Experimental Arthritis

In this study, we investigated whether rectal administration of ozone at a concentration of 20-50 µg/ml in experimental arthritis rat model has a therapeutic effect on RA and causes DNA damage. For this purpose, arthritis was created by Complete Freund Adjuvant (CFA) in Wistar Albino rats. After the development of arthritis, some animals were treated with rectal ozone at a concentration of 0,5 mg/kg in the first week, a density of 1.25 mg / kg and a volume of 5 ml in the second and third weeks. Other animals without ozone were subjected to rectal stress. Visual scoring, paw diameter and weight measurement of all animals were performed during this period. At the end of the study, the animals were sacrificed and tissue and blood samples were taken. DNA damage, sedimentation, TAS and TOS analyzes were performed by alkaline comet method. Tissues were examined histopathologically for cellular infiltration and bone resorption. According to the results of the study; There was no significant change in the clinical course of the disease in visual scoring. There was no significant improvement in cellular infiltration and bone resorption. Rectal ozone application significantly decreased sedimentation values due to arthritis. Ozone application did not cause an additional increase in DNA damage due to arthritis. Ozone administration resulted in significant decrease in TOS values contrary to expectations and increased TAS values. Conclusion: Rectal ozone application didn't have a therapeutic effect in RA.

**Key Words:** Rheumatoid arthritis, ozone, DNA damage, comet assay, TAC and TOS.



## İÇİNDEKİLER

<b>ÖZET .....</b>	<b>VII</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>VIII</b>
<b>KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ.....</b>	<b>XII</b>
<b>TABLolar LİSTESİ.....</b>	<b>XIV</b>
<b>ŞEKİL LİSTESİ.....</b>	<b>XV</b>
<b>RESİM LİSTESİ.....</b>	<b>XVI</b>
<b>1. GİRİŞ VE AMAÇ.....</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER.....</b>	<b>3</b>
2. 1. Romatoid Artrit .....	3
2.1.1. Romatoid Artrit Epidemiyolojisi .....	3
2.1.2. Romatoid Artrit Etiyolojisi .....	5
2.1.3. Romatoid Artritin Patofizyolojisi .....	9
2.1.4. Romatoid Artritin Klinik Özellikleri .....	13
2.1.5. Romatoid Artritte Tedavi Yaklaşımları .....	15
2.2. Ozon .....	16
2.2.1. Ozon.....	16
2.2.2. Medikal Ozon .....	17
2.2.3. Medikal Ozon Uygulamasının Tarihçesi .....	19
2.2.4. Medikal Ozon Uygulamasının Etki Mekanizması.....	20
2.2.5. Medikal Ozonun Uygulama Yöntemleri.....	24
2.2.6. Medikal Ozonun Klinik Uygulamaları .....	28
2.2.7. Medikal Ozon Uygulamasının Kontrendikasyonları ve Yan Etkileri.....	29
2.3. DNA Hasarı ve Mekanizmaları .....	30
2.3.1. Endojen DNA Hasarları.....	31
2.3.2. Çevresel Sorunlardan Kaynaklanan Hasarlar .....	36
2.4. DNA Onarımı ve Önemi .....	39
2.4.1. DNA'nın Doğrudan Onarımı .....	40
2.4.2 Baz Onarımı Reaksiyonu .....	40
2.4.3. Nükleotid Eksizyon Onarım Mekanizması (NER).....	42
2.4.4. Çift Zincir Kırıklarının Onarımı (Rekombinasyon Onarım) .....	42
2.4.5 Yanlış Eşleşme Onarımı ( MMR).....	43
2.4.6. SOS Onarımı.....	44

2.4.7. Çapraz Bağların Onarımı .....	44
2.5. DNA Hasarı Tespit Yöntemleri .....	45
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM.....</b>	<b>50</b>
3.1. Araştırmanın Türü .....	50
3.2. Hayvan Materyali ve Deney Ortamı.....	50
3.3. Araştırma Gruplarının Oluşturulması.....	50
3.4. Etik .....	50
3.5. Gereçler .....	51
3.5.1 Kullanılan Kimyasal Malzemeler .....	51
3.5.2. Kullanılan Araç ve Gereçler .....	52
3.5.3. Kullanılan Çözeltiler.....	53
3.6. Veri Toplama Yöntemi.....	55
3.6.1. Artrit Oluşturulması.....	55
3.6.2. Görsel Artrit Skorlaması.....	55
3.6.3. Pençe Ölçümü .....	56
3.6.4. Ağırlık Ölçümü .....	56
3.6.5. Ozon Uygulaması .....	56
3.6.6. Kan Örneklerinin Alınması.....	57
3.6.7. Alkali Komet Analizi.....	57
3.6.8. Serumda TAS-TOS Miktarının Ölçümü.....	60
3.6.9. Histopatolojik İnceleme .....	60
3.6.10. Westerngren Yöntemiyle Sedimentasyon Ölçümü.....	61
3.6.11. İstatistiksel Analiz.....	62
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>63</b>
4.1. Deneklerin Canlı Ağırlıkları.....	63
4.2. Deneklerin Pençe Ölçümündeki Değişiklikler .....	64
4.3. Klinik Görsel Artrit Skorundaki Değişimler .....	65
4.4. Hücrel İnfiltrasyon Değerlerindeki Değişiklikler .....	66
4.5. Kemik Rezorpsiyonu Üzerindeki Değişiklikler .....	67
4.6. Medikal Ozon Uygulamasının Sedimentasyon Düzeyine Etkisi .....	68
4.7. DNA Hasarındaki Değişiklikler .....	69
4.8. Total Oksidan Kapasite (TOS)'deki Değişiklikler .....	71
4.9. Total Antioksidan Kapasite (TAS)'daki Değişiklikler.....	72
4.10. Oksidatif Stres İndeksi (OSI)'nin Değerlendirilmesi .....	73

<b>5. TARTIŞMA .....</b>	<b>74</b>
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....</b>	<b>80</b>
<b>7. KAYNAKLAR .....</b>	<b>81</b>
<b>8. EKLER.....</b>	<b>89</b>
8.1. Etik Kurul Formu .....	89
8.2. Spiralli Tez Kontrol Formu .....	90
8.3. Spiralli/Ciltli Tez Yazım Kontrol Listesi .....	91
8.4. Özgeçmiş .....	92



## KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

kg	: Kilogram
g	: Gram
l	: Litre
LOPs	: Lipid oxidation products
ml	: Mililitre
$\mu$ l	: Mikrolitre
$\mu$ g	: Mikrogram
$^{\circ}$ C	: Derece santigrat
O <sub>3</sub>	: Ozon
O <sub>2</sub>	: Oksijen
d-H <sub>2</sub> O	: Deiyonize su
ACPA	: Anti siklik strülin peptid antikorları
ANA	: Anti-nükleer antikör
ACR	: American College of Radiology
CAT	: Catalaz
CFA	: Complete Freud's Adjuvant
CO	: Karbon monoksit
CRP	: C-Reaktif Protein
DMARD	: Disease modifying anti-rheumatic drugs
DNA	: Deoksiribonükeik asit
GSH	: Glutatyon
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	: Hidrojen peroksit
HLA	: Human leukocyte antigen
HO-1	: Hem-oksijenaz-1
IR	: İyonize radyasyon
IL	: İnterlökin
IFN- $\gamma$	: İnterferon-gama
LMA	: Düşük erime dereceli agar
MS	: Multitipl skleroz

MHC	: Major Histokompatibilite kompleks
PUFA	: Polyunsaturated fatty acid
PTPN22	: Protein tirozin fosfataz 22
RA	: Romatoid artrit
RF	: Romatoid faktör
TAC	: Total antioxidant capacity
TGF $\beta$ -1	: Transforming growth factor beta-1
TOS	: Total oxidant status
TNF- $\alpha$	: Tümör nekroz faktör-alfa
UV	: Ultraviyole
VEGF	: Vasküler endotelial büyüme faktörü
% DNAt	: % DNA in tail (Kuyruğu oluşturan DNA yüzdesi)
$\mu$ M	: Mikromolar
mM	: Milimolar
M	: Molar

## TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1.	MOHT'nin endikasyonları ve tedavi yaklaşımı	26
Tablo 2.	Gruplara ait ağırlık verileri	63
Tablo 3.	Grupların pençe çap ölçümlerine ait veriler	64



## ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.	ACPA cevabının olgunlaşması	11
Şekil 2.	RA'da kemik kaybı mekanizması	12
Şekil 3.	İnsan kanının oksijen-ozona maruz kalması sırasında ortaya çıkan ana biyolojik etkilerin bir özeti.	23
Şekil 4.	Sitozin ve adenin deaminasyonu	32
Şekil 5.	Metilasyon sonucu bazı DNA bazları	33
Şekil 6.	Adenin depürinasyon	34
Şekil 7.	Oksijen radikalleriyle 8-OHdG'nin oluşumu	35
Şekil 8.	Oksidasyona uğramış bazı DNA bazları	35
Şekil 9.	Uzun ve kısa yamalı BER mekanizmaları	42
Şekil 10.	Periferik kan mononükleer hücrelerinin ayrıştırılması	58
Şekil 11.	Grupların çalışma süresince görsel skorlamasının karşılaştırılması	65
Şekil 12.	Grupların histopatolojik incelemede hücrel infiltrasyon değerlerinin karşılaştırılması	66
Şekil 13.	Grupların histopatolojik incelemede kemik rezorpsiyonu değerlerinin karşılaştırılması	67
Şekil 14.	Grupların sedimentasyon düzeylerinin karşılaştırılması	68
Şekil 15.	Grupların mononükleer hücre DNA hasarlarının karşılaştırılması	69
Şekil 16.	Grupların TOS karşılaştırılması	71
Şekil 17.	Grupların total antioksidan kapasitesinin karşılaştırılması	72
Şekil 18.	Grupların TOS düzeylerinin TAS düzeylerine oranının yüzde derecesi olarak ifade edilen OSİ değerlerinin karşılaştırılması	73

## RESİM LİSTESİ

Resim 1.	Kuğu boynu ve düğme iliği deformitesi	14
Resim 2.	33 nolu deneğin mononükleer hücrelerin alkali komet yöntemi jel görüntüsü	48
Resim 3.	A) Klinik skorlamada sağ ve sol arka puanlaması 4 olarak değerlendirilen arka pençe örneği B) Klinik skorlama ile sağ ön pençe 3 ve sol ön pençe 4 olarak değerlendirilen pençe görüntüleri	56
Resim 4.	A) Dokuların bloklama işleminden örnekler, B) Kesiti alınan 35 numaralı deneğin sağ ön bilek örneğinin hematoxilen ve eozin boyama sonrası lam üzerindeki görüntüsü	60
Resim 5.	Westerngren yöntemiyle yapılan sedim ölçümünden bir örnek görüntü	62
Resim 6.	Mononükleer hücrelerin komet yöntemiyle elde edilen jel görüntüleri.	70



## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

RA en sık görülen inflamatuvar eklem hastalığı olarak, dünya nüfusunun %1'ini etkilemekte olup; sinoviyal eklemleri hedefleyen, kalıcı yüksek dereceli sistemik inflamasyon ile karakterize olan ve eklem dışı bulgulara yol açan kronik otoimmün bir hastalıktır (Özsoy ve ark., 2006; Lazzerini ve ark., 2016).

Hastalığın başlatılması, T ve B lenfositlerinin düzensizliğini içerir ve bu da lenfositlerin kendi kendine toleransı bozar ve yine kendi kendine antijenlere karşı bağışıklık yanıt oluşturur (Liu ve ark., 2015).

Tedavide kullanılan çoğu ajanların etki mekanizması tam olarak bilinmediğinden tedavi büyük oranda yanıtsız kalmaktadır. Tedavi edici girişimlerin hiç birinin tam iyileşme sağlamaması nedeniyle uygulanan tedaviler hastalığın belirti ve bulgularını rahatlatmaya yönelik palyatif tedaviler olarak değerlendirilmektedir (Harris ve ark., 2006). Romatoid artrit tedavisi için elverişli biyolojik ajanlara rağmen, tüm hastalar bu terapilere uyum gösteremeyip, yanıt veremeyebilir. Bu uygulamaların belirli bir etkisi olsa da, sınırlamaları olduğundan dolayı farklı tedavi mekanizmalarına sahip yeni ajanlara olan ihtiyaç vardır (Liu ve ark., 2015).

Ozon uygulaması tamamlayıcı tedavi yöntemidir ve birçok hastalığın tedavisinde yaklaşık 30 yıldır yaygın olarak kullanılmaktadır. Literatürde O<sub>3</sub> tedavisi ile ilgili çalışmalar, inflamatuvar süreçlerin ön planda olduğu hastalıklar üzerinde sıklıkla karşımıza çıkmaktadır. Eklem hastalıkları, O<sub>3</sub> tedavisi kullanılarak RA da dahil olmak üzere umut verici bazı sonuçlar göstermiştir. Bununla birlikte, O<sub>3</sub> tedavisiyle ilgili pek çok soru vardır; etkinliği, terapötik mekanizmaları ve optimal konsantrasyonları gibi. Bu faktörler O<sub>3</sub> tedavisinin geniş klinik kullanımını büyük ölçüde sınırlandırmaktadır (Ma ve ark., 2010; Chen ve ark., 2013; Kaya ve ark., 2017).

Henüz belirlenmiş bir tedavi yöntemi bulunmamasından ve O<sub>3</sub> tedavisinin DNA hasarına neden olduğunun bilinmesinin yanı sıra oksidan/antioksidan kapasiteye etkilerinden dolayı yine de bir tedavi yöntemi olabileceğini düşündürmektedir. Bunun sebebi ise O<sub>3</sub>, yüksek dozlarda uygulandığında toksiktir, daha düşük dozlarda ise anti-inflamatuvar ve anti-oksidan sistemleri aktive eder, kanla karşılaştığında, hızla çözünür ve afinite düzeninde, sistein gibi sülfhidril grubu (SH) taşıyan doymamış yağ asitleri, antioksidanlar ve tiyol bileşikleri ile reaksiyona girer. Bu reaksiyon sonucunda serbest oksijen radikalleri ve lipit oksidasyon ürünleri (LOP) üretilir. Reaksiyonun devamında

lökosit ve endotel hücrelerinde interlökin, interferon ve büyüme faktörlerinin salgılanmasını sağlar. Böylece immün sisteminin düzenlenmesinde yer alır (Kaya ve ark., 2017). Ozon uygulamasının immün sistem üzerindeki bu etkilerinden dolayı geliştirilen deneysel artrit modelinde DNA hasarı inceledik.

Yapılan çalışmada:

1- Yalnızca artritli sıçan ve ozon uygulanan artritli sıçan grupları ile sağlıklı sıçanların, pençe ölçümü ve görsel artrit skorunun kıyaslanması,

2- Yalnızca artritli sıçan ve ozon uygulanan artritli sıçan grupları ile sağlıklı sıçanlardan elde edilen kan örneklerinden TAS-TOS, sedimentasyon ve comet assay ile DNA hasarı analizlerinin değerlendirilmesi,

3- Yalnızca artritli sıçan ve ozon uygulanan artritli sıçan grupları ile sağlıklı sıçanlardan elde edilen kemik ve eklem dokularında hücreyel infiltrasyon ve kemik rezorbsiyonunun değerlendirilmesi.

## **2. GENEL BİLGİLER**

### **2. 1. Romatoid Artrit**

RA ilerleyici eklem hasarı, ağrı, yorgunluk, hareketlilikte azalma ve günlük yaşam aktivitelerini gerçekleştirilmede zorluğa yol açmanın yanı sıra erken ölümlere neden olan, sistemik, otoimmün, yangısal bir hastalıktır. Dünya nüfusunun % 0.5-1'ini etkilemesi ve en sık karşılaşılan artrit tipi olması, RA'nın önemini daha da artırmaktadır. Hastalığın etkisi, aile hayatı, sosyal ilişkiler, iş hayatı gibi yaşamın tüm alanlarında görülebilir (Altan ve ark., 2004; Mateen ve ark., 2016).

RA dolaşım ve solunum sistemleri, göz, tiroid bezi gibi birçok farklı dokuyu etkilemesiyle birlikte tipik olarak küçük ve orta büyüklükteki eklemlerin simetrik olarak tutulumuna neden olur. Romatoid artrit'te birincil lezyon sinovittir; burada bağışıklık hücreleri sinoviyumu istila eder ve buna bağlı olarak meydana gelen yangısal 'pannus' oluşumuna yol açar. Normal sinovyal sıvıda mononükleer hücre varken, romatoid artritli sinovyal sıvıda baskın hücre, polimorfonükleer lökositler (PML)'dir. Polimorfonükleer lökositlerde, fagositoz esnasında süperoksit anyonlar meydana gelmekte ve bu anyonlar, bağ dokuları üzerinde hasar oluşturmaktadır. Sinoviyumdaki hiperplazi, etkilenen dokuda kıkırdak yıkımına, kemik erozyonuna ve sonuçta eklem fonksiyon kaybına neden olmaktadır (Akdoğan ve ark., 1998; Burmester ve Bijlsma, 2012; Chen ve ark., 2013; Heluany ve ark., 2018).

RA'nın seyri, yıkıcı olmasına rağmen oldukça değişken olabilmekte ve bazı hastalarda çok az eklem hasarının eşlik ettiği kısa süreli, ılımlı, çok az eklem tutulduğu bir hastalık olabilirken bazı hastalarda da belirgin fonksiyonel yetersizlik ile birlikte şiddetli, ilerleyici hastalık olabilmektedir (Harris ve ark., 2006). Sistemik tutulum, solunum, kardiyovasküler ve hematopoietik sistemlerde de ayrıca hasar oluşturabilir ve yaşam beklentisinde yaklaşık 7 yıllık bir azalmaya neden olur.

#### **2.1.1. Romatoid Artrit Epidemiyolojisi**

RA en sık görülen yangısal eklem hastalığı olarak, genel popülasyona göre 3 ila 18 yıl arasında yaşam beklentisinde azalma ile bilinir ve dünya nüfusunun % 1'ini etkilemektedir (Harris ve ark., 2006).

RA'da coğrafi yerleşim ve ırk etkili değildir; dünyanın hemen her bölgesinde görülmesine, dünyada prevalansı sabit olmasına rağmen bazı istisnalar vardır. Bunlardan bazıları: Çin'de RA görülmesi nispeten daha az iken (yaklaşık % 0.3) Kuzey Amerika'da Pima Kızılderilileri'nde (yaklaşık % 5) olduğu gibi önemli ölçüde yüksektir (Harris ve ark., 2006). ABD ve Kanada'da kadınlarda romatoid artrit prevalansı % civarında ve erkeklerden 3-4 kat daha fazladır. 847 Aborjinler üzerinde yapılan çalışmada, hiç romatoid artrit vakası görülmediği ileri sürülmüştür. İsveç, Goteborg'da sadece 79 yaşındaki belli bir popülasyonda yapılan çalışmada romatoid artrit prevalansı % 10 bulunmuştur. İnsidans oranları her iki cinste yaşla beraber artış göstermekte ve 35 yaşın altındaki popülasyonda % 0,3 iken; 65 yaş üzerinde % 10 olarak tespit edilmiştir (Özsoy ve ark., 2006).

RA bölgesel çeşitliliğe sahip olmasıyla beraber, Avrupa ve Kuzey Amerika'daki yetişkinleri yaklaşık olarak % 0,5-1 oranında etkilemekte; Güney Avrupa ülkeleri için yaygınlık Kuzey Avrupa'ya göre daha düşük ve en yüksek oranlar Kuzey Amerika'da bulunmaktadır. Asya çalışmalarında ise, her 10<sup>3</sup> insan için % 2,8 ila 3,5 vaka arasında hastalık kaydedilirken, Afrika'nın bazı kırsal bölgelerinde hastalıkla karşılaşmadığı bildirilmiştir. Bazı yerli Amerikalı kabilelerde % 5'e kadar insanların hastalıktan etkilendiği söz konusudur.

Ülkemizde RA epidemiyolojisi ile ilgili veriler oldukça kısıtlı olmakla birlikte Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Romatoloji Bilim Dalı tarafından İzmir Narlıdere ve Balçova Bölgesinde 2835 kişiyle yapılan bir çalışmada 20 yaş üzeri nüfusta romatoid artrit sıklığı % 0.5 olarak bulunmuştur. Yaş ve cinsiyete göre düzeltme yapıldığında genel prevalans % 0.36 olarak bildirilmiştir. Bu durum, Yunanistan ve İtalya gibi Akdeniz ülkelerinin oranlarına benzemektedir (Akar ve ark., 2004).

Yapılan çalışmalarda aile içinde farklı bireylerde RA tutulmalarının olduğu saptanmıştır. Bir hastanın birinci dereceden akrabasının tanıya sahip olma ihtimali, hastalığın genel popülasyona göre görülme sıklığının 2-10 katıdır ve en çok etkilenen vakalarda akrabalar arasında görülme ihtimali oldukça yüksektir (Burmester ve Bijlsma, 2012).

### 2.1.2. Romatoid Artrit Etiyolojisi

Hastalığın etiyolojisi hakkında çeşitli görüşlerin olması, romatoid artritte rol oynayan pek çok mekanizma olduğu halde nedeni henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Romatoid artrit muhtemel nedenleri arasında, bazı genetik faktörlerin hastalık ile ilişkili olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Genetik olmayan faktörler artrit oluşumunu tetikleyen başlangıç uyarısını (artritogenik uyarı) yaparken, genetik faktörler hastalığın görünüşünü belirlemektedir (Özsoy ve ark., 2006; Espina ve ark., 2019).

Plazma protein faktörleri 1960'larda, 1970'lerde ise prostaglandin ve lökotrien çalışmaları ve daha sonraki yıllarda sitokinler üzerinde yapılan çalışmalar hastalığın etiopatogenezi hakkında anlaşılır açıklamalar ortaya koymamış ve serbest radikallerin romatoid artrit patogenezi üzerindeki etkilerinin araştırılması ise son yıllarda devam etmektedir (Akdoğan ve ark., 1998).

#### 2.1.2.1. Genetik Faktörler

RA'da genetik faktörlerin hastalığa yatkınlığın yaklaşık % 60'ını oluşturduğu; kalıcı ve yıkıcı artrit sorumlu olduğu düşünülmektedir (Raslan ve ark., 2016). Major histocompatibility complex (MHC) bölgelerinde bulunan genler tarafından kodlanan moleküller insan lökosit antijenleri (human leukocyte antigen; HLA) olarak adlandırılmış ve benzer şekilde 1970'li yıllarda Dr. Mc Dewitt ve arkadaşları da yaptıkları araştırmalarda aynı gen kompleksine ulaşmış ve immün yanıt sorumlu olduğunu düşündükleri bu genlere immün yanıt genleri (immune response genes; IR) adını vermişlerdir. İlk çalışmalardan yaklaşık 35-40 yıl sonra Dr. Snell ve ekibi MHC genleri ve bunların kodladığı moleküllerin gerçek fonksiyonlarını tam olarak tanımlamıştır (Yalçın, 2013).

MHC, organizmanın en polimorfik genlerinin bulunduğu bölgedir. İnsanda 6. kromozomun kısa kolunda yerleşen yaklaşık 4000 kilobazlık bir gen bileşimidir. Bu genler tüm insan genomunun % 0,1'ini ve fonksiyonu tanımlanmış genlerin de % 0,6'sını oluştururlar. Görevleri MHC moleküllerini kodlamaktır (Yalçın, 2013).

MHC üç ana bölümden meydana gelir. Bunlar sentromerden telomere doğru MHC Class II, MHC Class III ve MHC Class I lokuslarıdır. MHC Class II'de HLA DP, DM, DQ, DR ve TAP moleküllerini kodlayan genler yer alır. Bunlardan HLA DP, DQ ve

DR, antijen sunumundan sorumlu molekülleri kodlar. MHC Class III bölgesinde ise HLA molekülleri kodlanmaz, ancak inflamasyonda son derece önemli olan tumor necrosis factor (TNF), kompleman 2 ve 4 (C2, 4), ısı şok proteini-70 (HSP-70) ve lenfotoksin (LT) kodlanır (Trowsdale, 2011; Schulze ve Wucherpfenning 2012; Yalçın 2013,). 1978 yılında yapılan bir çalışmada ise, HLA-DR ve RA arasında bir genetik bağlantı tespit edilmiştir (Özsoy ve ark., 2006).

Son zamanlarda tanımlanan ve RA gelişimine yatkınlığa neden olan gen, kromozom 1p13 üzerindeki protein tirozin fosfataz 22 (PTPN22) genidir. En güçlü genetik ilişki kromozom 6 üzerindeki HLA-DRB1 lokusu [paylaşılan epitop (SE)] ve PTPN22'dir. Bu gen, T hücresi aktivasyonunun ve T hücresi gelişiminin bir negatif kontrolü olarak önemli olan lenfosit spesifik fosfatazı (Lyp) kodlar. Spontan T hücresi aktivasyonunun T hücre reseptörleri ile ilişkili kinazların ve bunların substratlarının defosforilasyonu ve inaktivasyonu ile önlenmesinde potansiyel rolü vardır (Raslan ve ark., 2016).

Sınıf II majör doku uyum kompleksi alleli olan HLA-DR4 (DRβ1\*0401) ve ilişkili allellerin RA için temel genetik risk faktörleri olduğu bilinmektedir (Harris ve ark., 2006). Yapılan bir çalışmada HLA-DR4 RA hastalarında % 70 oranında pozitif iken kontrol hasta grubunda % 28 oranında pozitif olarak bulunmuş ve sonuç olarak HLA-DR4 pozitif kişilerde romatoid artrit oluşumu için relatif riskin 4-5 kat daha fazla olduğu belirtilmiştir. Romatoid artrite yatkınlık epitopu glutamin-lösin-arjinin-alanin-alanin (QKRAA)'dir, burada bazı DR 1β-zincirlerine ilave olarak DR 4 ve DR 14'de bir sıra bulunur. HLA-DR4-DR14 veya DR1 bulunan bazı hastalarda epstein-bar virüs (EBV) epitoplarının T hücrelerince tanınmasının, "moleküler taklit" yoluyla masum hücreler tarafından immün cevaba neden olabilmektedir. DRB1 molekülleri yüksek derecede immünojenik olmasına rağmen, RA ile ilişkili DRB1 allellerindeki peptidler T-hücre cevabı başlatmakta başarısızdırlar (Harris ve ark., 2006). Yapılan yeni çalışmalarda HLA ve romatoid artrit ilişkisinin hastalığın ilerlemesi, sinovit oluşturmasından çok, hastalığın şiddeti ve kronikleşme eğilimi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Özsoy ve ark., 2006).

Bazı toplumlarda HLA-DR4 ilişkili epitoplar ile RA arasında belirgin bir ilişki görünmemektedir. Örneğin; Afrika kökenli Amerikalı RA hastalarının yaklaşık % 75'inde bu genetik öge yoktur. Ayrıca İspanyol ve İtalyan hastalarda HLA-DR10,

Şili'lilerde HLA-DR9 ve Arap soyunda HLA-DR3 ile bir ilişki saptanmıştır (Harris ve ark., 2006). HLA allellerinde bu kadar çok çeşitlilik olması, başta otoimmün ve enfeksiyöz hastalıklara yatkınlık ya da direnç oluşturmada ve uygulanan tedavilerin başarısını engellemede engel olmaktadır (Yalçın, 2013).

Romatoid artrit hastalığının oluşumunda birçok genetik faktörün rol oynadığı düşünülmektedir. Monozigotik ikizlerde romatoid artrit oluşması riski, akrabalık ilişkisi olmayanlara göre 12-65 kat daha fazla; genlerinin % 50 kadarını paylaşan dizigotik ikizlerde sadece 2-17 kat risk söz konusudur. Bu fark romatoid artrit oluşumunda genetik faktöre işaret etmektedir (Özsoy ve ark., 2006). İkizler arasında hastalığa karşı aynı derecede yatkınlık genetik olarak tam karşılamadığından bu durum genetik dışında farklı nedenlerin etiyopatogeneizde rol oynadığını göstermektedir. Romatoid artrit için en yüksek riskin, ilişkili olduğu bilinen HLA-DRB1 alleli olan ikizlerde gösterilmiş olmasıdır (Harris ve ark., 2006).

HLA genlerinin RA'ya genetik yatkınlığın bir kısmını etkilediği düşünülmekte; bu durumda HLA dışındaki genlerde etkilidir. Bunlar, T hücrelerinde antijen reseptörünün ekspresyonunu ve immünoglobulinin iki zincirini kontrol eden genlerdir (Harris ve ark., 2006).

#### **2.1.2.2. Çevresel Faktörler**

Genetik risk faktörleri RA'nın insidansını tam olarak belirleyemediğinden, hastalığın etiolojisinde çevresel faktörlerin de etkili olduğu düşünülmektedir. Afrika'da iklim ve kentleşmenin, benzer genetik yapısı olan gruplarda RA'nın insidans ve şiddeti üzerine belirgin etkileri olan faktörlerin epidemiyolojik çalışmaları mevcuttur (Harris ve ark., 2006).

Tüm etkili olabilecek çevresel tetikleyiciler arasında RA oluşumu ile kesin olarak ilişkili olan tek faktör sigara içilmesidir (Harris ve ark., 2006). Birkaç yıl sigara içmek hastalık riskini artırken, farklı hastalıklarla da ilişkilendirilebilir. Bu risk paket/yıl sayısı ile değişebilir. Önemli olan, sigara içiminde antisiklik sitrülin peptid antikorları (ACPA)-negatif değil, ACPA-pozitifdir; bu durumda sigara kullanımı RA için bir risk faktörüdür. Bu risk, SE [shared epitop (paylaşılan epitop)] allellerinin varlığında birleşik risk faktörlerinin etkisinin arttığını göstermektedir (Burmester ve Bijlsma, 2012).



Sitrullinasyon, DNA-kodlu amino asit argininini sitriline dönüştüren peptidil-arginin deiminaz (PAD) enziminin aracılık ettiği reaksiyondur. Bu posttranslasyonel onarım hem fizyolojik hem de patolojik durumlarda gerçekleşmektedir (Derksen ve ark., 2017). Yapılan çalışmalarda sigara dumanının protein sitrullinasyonunun uyarılmasında rol oynayabileceği ileri sürülmüştür. Sitrülinli proteinlerin sigara içen kişilerden elde edilen bronko alveoler lavaj sıvısında sigara içmeyenlere göre fazla olması bu durumu desteklemektedir. Bu nedenle sigara içilmesi, apoptozisi ve henüz bilinmeyen bir mekanizma ile immün yanıtı uyaran alveolar hücrelerde sitrülünlenmeyi tetikleyebilmekte; ancak bu cevaba bağlı olarak RA'nın eklemleri nasıl ve niçin hedef aldığı ve neden bilinmediğini anlamak için farklı çevresel faktörler de gerekmektedir (Burmester ve Bijlsma, 2012).

Sağlık çalışmanı olan 377,841 kadında, yaş, ırk, eğitim, üreme durumuna göre yapılan bir çalışmada, sigara içme süresi hem RA hem de seropozitif RA riskinde anlamlı artış göstermiş ve romatoid faktör (RF) arasında da ilişki saptanmıştır. Buna ek olarak kafeinsiz kahve tüketimi RA başlaması ile aynı yönde artış gösterirken, çay içimi ile hastalık başlangıcı arasında ters etki gözlenmiştir (Harris ve ark., 2006; Burmester ve Bijlsma, 2012).

Birçok hastalıkta olduğu gibi, düşük eğitim düzeyine sahip RA'lı hastalarda, morbidite ve mortalite artışı vardır. Hollanda'da RA'lı genç kadınlarda yapılan bir araştırmada, orta ve düşük düzeyde eğitimi olanlar, eğitim düzeyi yüksek olanlarla kıyaslandığında, grupların belirti süreleri eşit olmasına rağmen başlangıç hasarlarının daha fazla ve işlevsel skorlarının daha kötü olduğu bulunmuştur (Harris ve ark., 2006; Burmester ve Bijlsma, 2012). Bunun sonucunda eğitim düzeyi yüksek olan hastalarda, hastalığın iyileşmesinde artış ve ilerlemesinde de yavaşlama söz konusu iken eğitim seviyesi düşük veya orta olan hastalarda, hastalığın prognozunda veya iyileşmesinde bir gelişme görülmemiştir. Hastalara verilen eğitimlerin daha sonra evde rahatlıkla yapılabileceği, verilen bilgi ve egzersiz eğitimiyle kendi kişisel yöntemini kullanma ve planlarını yapma konusunda uzun süreli bir tedavi oluşturabilmesi ve iyileşmenin kolaylaştırılabilmesi için eğitim düzeyi önemli bir ölçüttür (Manning ve ark., 2014).

### **2.1.2.3. Cinsiyet ve Hormonal Faktörler**

Hastalık kadınları erkeklerden 2-3 kat daha fazla etkilemekte ve her yaşta ortaya çıkmaktadır (Aletaha ve Smolen, 2018). Bu farkın nedeni belli değildir ancak kadın



hormonlarının immün sistem üzerindeki uyarıcı etkisi olduğu düşünülmektedir (Özsoy ve ark., 2006).

Günümüze kadar yapılan çalışmalarda, gebeliğin inflamatuvar artrit şiddetini azalttığı vurgulanmıştır (Jethwa ve ark., 2018). Duyarlı kadınlarda gebelik sona erdikten sonra izlenen artmış risk hormonal değişimlere veya fetusun paternal HLA antijenlerine bağlı olabilir. Doğum sonrasındaki artmış risk, emzirme döneminde artmış olan prolaktin hormonunun etkisi ile de açıklanmaktadır. Bu durum proinflamatuvar bir hormon olan prolaktinin artmış seviyesine veya prolaktine karşı artmış yanıtı bağlı olabileceği düşünülmektedir (Özsoy ve ark., 2006).

Hastalık aktivitesi ve ilgili skorlama sistemlerinin nesnel belirteçleri kullanılarak yapılan prospektif çalışmaların sistematik analizi, RA'lı hastaların % 60'ının hamilelik döneminde iyileştiğini ve doğum sonrası % 47 oranında tekrar geliştiği göstermiştir (Jethwa ve ark., 2018).

Çocuk sahibi olmamanın RA için risk faktörü olduğu gösterilmiştir. Çocuk sahibi olmayan ve oral kontraseptif kullanmayan kadınların, doğum yapmış ve oral kontraseptif kullanan kadınlara göre dört kat artmış risk taşıdıkları saptanmıştır. Bu durumdan dolayı östrojen içeren oral kontraseptifler hastalığın başlangıcını ya da seyirini etkilediğinden östrojen hormonun hastalık patogenezinde rolü olduğunu düşündürmektedir. Ancak bu çalışmaların aksine; bir başka çalışmada RA'lı hastalarda oral kontraseptif kullanımının ve gebeliğin etkisi, radyolojik kötüleşme ve fonksiyonel kısıtlılık açısından, Amerika Radyoloji Derneği (American College of Radiology (ACR)) kriterlerine göre yeni RA tanısı konulan 132 kadın hastanın 12 yıl boyunca takip edilmesiyle oluşmuştur. Her ne kadar birden fazla gebeliği olan hastalar ve uzun dönem oral kontraseptif kullananlarda daha az radyolojik eklem hasarı, daha iyi durumda olsa da oral kontraseptif kullanımı ve gebelikten sonraki dönemde RA sonucunu etkilemediği gösterilmiştir (Özsoy ve ark., 2006).

### **2.1.3. Romatoid Artritin Patofizyolojisi**

RA'nın ayırt edici özelliklerinden biri, bağışıklık hücrelerinin sürekli olarak eklemlere yerleşmesinden kaynaklı kalıcı sinovittir. Bu ortamda, T hücreleri, B hücreleri ve diğer doğal efektör hücreler ile birlikte, proinflamatuvar sitokinlerin üretimini tetikleyen ve böylece yerleşik fibroblast benzeri sinoviyositlerin aktivasyonunu uyaran, kıkırdak ve kemik hasarına katkıda bulunan karmaşık bir ağ

oluşur (Chen ve ark., 2016). Sinoviyumu kaplayan hücrelerin hipertrofi ve hiperplazisi, inflamatuvar hücre infiltrasyonu, pannus oluşumu, mikrovasküler hasar ve tromboz gibi fokal veya kesitsel damarsal değişiklikleri; ödem ve küçük kan damarları etrafında pıhtılar halinde toplanmış olan mononükleer hücre infiltrasyonu ile karşımıza çıkmaktadır (Çetinkaya, 2009; Wua ve ark., 2016).

Homolog bir glikoprotein dimeri olan vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), sinovyal dokularda anjiyogenezi tetikler ve pannus oluşumunda etkili olmasının yanı sıra yaralanma, onarım, inflamasyon ve RA gelişiminde rol oynamaktadır. VEGF'nin, iki reseptörü olan sFlt-1 ve sFlk-1'e bağlanması VEGF'nin üretimini uyarır, böylece anjiyogenezi aktive eder. sFlt-1, proinflamatuvar sitokinlerin üretimini tetikleyerek romatoid inflamasyona katkıda bulunabilir (Wua ve ark., 2016).

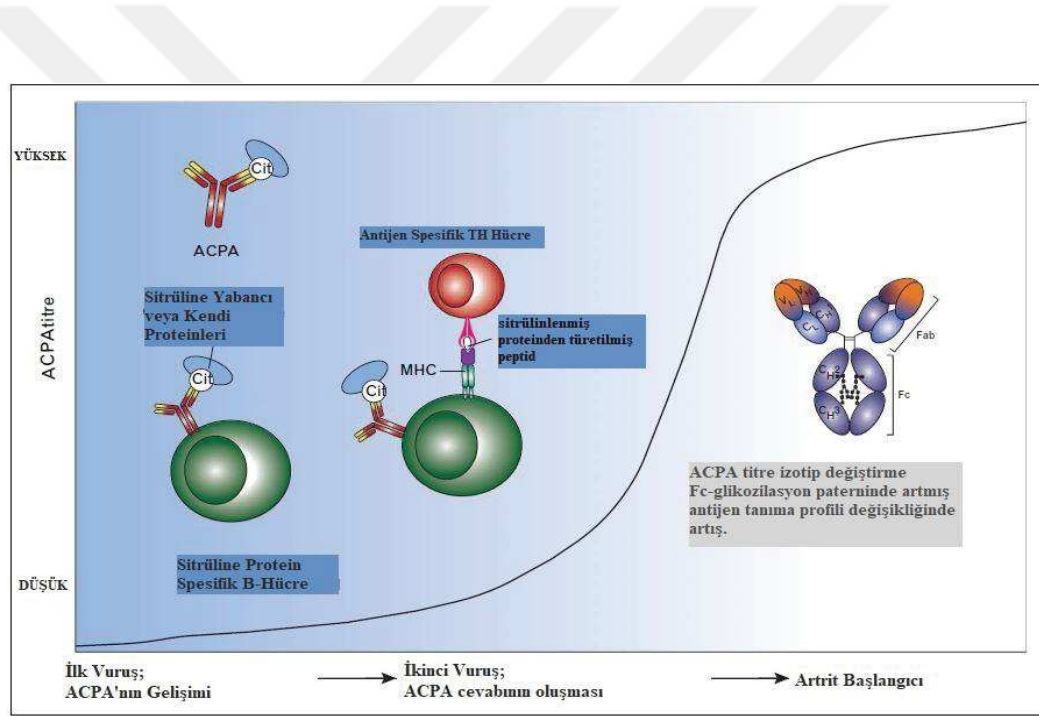
Otoimmünite, RA patogenezinde önemli olabilir. Etkilenen hastaların kanındaki insan IgG'sinin RF olarak bilinen; Fc-bölümünü hedefleyen otoantikörlerin farkedilmesiyle ortaya çıkmıştır. Romatoid faktör, IgG'nin Fc bölgesine ve bazen IgM'ye karşı yöneltilmiş bir antikördür, immün kompleksleri çökertir ve kompleman fiksasyonu ile kemotaksis yoluyla iltihaplı reaksiyonları başlatır (Wahba ve ark., 2015).

Hastalarda en çok IgM-RF olarak bulunan, ancak alt gruplarında IgG-RF ve IgA-RF'a da görülen RF'lerin, eklemlerde kompleman sistemini harekete geçiren bağışıklık komplekslerinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Romatoid faktörlerin varlığı, vasküler geçirgenliğin artışına ve immün-komponent efektör hücrelerini eklemlere yönlendiren kemotaktik faktörlerin salınmasına yol açar. Ancak, sadece RF'nin olması artrit gelişimini başlatmak için yeterli değildir; romatoid faktör aynı zamanda bulaşıcı hastalıklarda, RA dışındaki otoimmün hastalıklarda ve sağlıklı, çoğunlukla yaşlı bireylerin % 15'inde bulunur. Böylece, RF'nin duyarlılığı ve spesifikliğı, çalışılan popülasyona göre sırasıyla % 60-70 ve % 50-90'dır ve hastalık etiolojisindeki rolleri henüz bilinmemektedir. Bu eksikliğıne rağmen, RF varlığı 1987 yılında ACR tarafından RA için yedi tanı ölçütünden biri olmuştur (Burmester ve Bijlsma, 2012).

Hastalığın ilerleyişi sinovyal membran hiperplazisi, artmış vaskülarite ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu ile ayrılır; özellikle CD4 + T-lenfositleri hücre kaynaklı immün yanıtların başlıca düzenleyicileridir.

Romatoid artrit daha önce tanımlanamayan artritik bir antijenin neden olduğu düşünülürken, son zamanlarda sitrülünlenmiş protein, insan kıkırdak glikoproteini ve ağır zincir bağlayıcı protein dahil olmak üzere olası endojen antijen tanımlanmıştır (Wahba ve ark., 2015).

ACPA tanımlanmasının RA'nın anlaşılmasında önemli etkisi olmuştur. Romatoid artrit hastalarının ilk kez aminoasit arjininin modifiye edilmiş bir formu olan sitrülünü içeren peptitleri ve proteinleri hedefleyen otoantikörler ürettiği 1990'ların sonlarında tarif edilmiştir. Sitrulinasyon, protein-bağlı arjininin, peptidil arjinin deiminaz (PAD) enzimlerinin aracılık ettiği sitrülün kalıntılarına çevrilmesinin bir modifikasyonudur ve ACPA tarafından tanınan antijenlerin oluşturulması için gereklidir.



**Şekil 1.** ACPA cevabının olgunlaşması. Fab, fragman antijen bağlanması; Fc, kristalleştirilebilir parça; MHC, majör doku uyumluluğu kompleksi; TH, T yardımcı hücre (Dekkers ve ark., 2016).

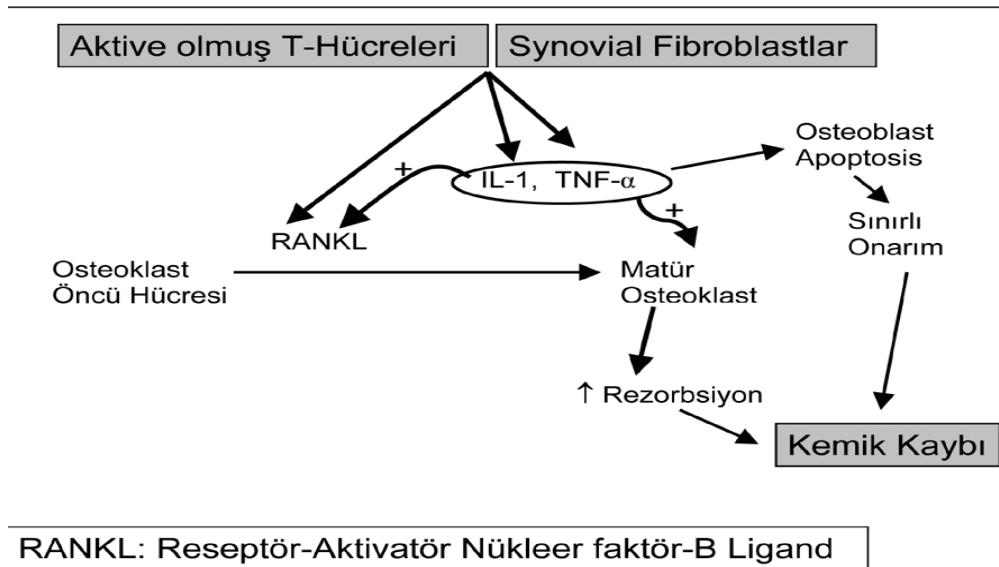
Sitrülinli proteinlere karşı reaktif antikörler, RA'nın tanınma döneminde mevcuttur. Çevresel tetikleyiciler ve epigenetik değişken olayların ACPA'nın gelişiminde ilk unsur olduğu düşünülmektedir. Enfeksiyon gibi ikinci bir etken ACPA yanıtının daha belirgin olmasını tetikler. Hastalık oluşuktan sonra, ACPA yanıtı genellikle standart bir şekilde artar, daha fazla izotip kullanır, farklı bir glikozilasyon

paternine ve çeşitli sitrülin proteinlere karşı artan bir antijen tanıma özelliğine sahip olur (Dekkers ve ark., 2016).

Antijen ile aktive edilen CD4 + T hücreleri, hücre yüzey teması yoluyla B hücrelerini, RF ve anti-nükleer antikor (ANA) dahil olmak üzere immünoglobulinleri üretmek için özellikli farklılaşma kümeleriyle bağlanma yoluyla uyarır.

Antijen ile aktive edilen CD4 + T hücreleri ayrıca sitokinler interlökin (IL)-1, IL-6, IL-10 ve tümör nekroz faktörü-alfa (TNF- $\alpha$ ) üretmek ve matriks metalloproteinazları (MMP) salgılamak için monositleri, makrofajları ve sinoviyal fibroblastları uyarır, uyarılan sitokinler ve MMP'ler herhangi bir ekstraselüler matriks proteinini bozabilen geniş bir endonükleaz ailesidir. Bunlara ek olarak, C-reaktif protein (CRP), inflamatuvar reaksiyonlarda makrofajlardan ve T hücrelerinden IL-6 salgılamasının ardından artış görülmekte ve dolayısıyla RA'daki serum seviyesinin de yükselmesine neden olmaktadır.

Reaksiyonun devamında kalıcı inflamasyon meydana gelmesi, kollajen ve proteoglikanların oksidatif ve proteolitik parçalanması yoluyla kıkırdak ve kemiğin tahrip olmasına neden olur. İnflamatuvar hücreler, miyeloperoksidaz (MPO) bakımından zengindir ve bu nedenle RA'daki sinovyal sıvıda ve kanda yüksek oranlarda bulunur (Wahba ve ark., 2015).



Şekil 2. Romatoid artritte kemik kaybı mekanizması.

IL-6 ve IL-1 $\beta$  dahil olmak üzere sitokinler, otoimmün bozuklukların patogenezinde katkıda bulunan proinflamatuvar etkilere sahiptir. Aynı zamanda IL-6, saf T hücrelerinin, ileri besleme mekanizmasında; hızlı ve etkin bir kontrol yapılmasını ve inflamatuvar cevabının artışına neden olan IL-17 üreten T-yardımcı hücrelerinin (Th17 hücreleri) farklılaşmasını uyarır. Th17 hücreleri, RA ve multipl skleroz (MS) gibi otoimmün bozuklukların gelişiminde rol oynamaktadır. Otoimmün bozukluklarda, IL-17, nötrofilleri ve makrofajları aktive eden, proinflamatuvar kemokinlerin ve sitokinlerin ekspresyonunu destekleyen sinyal iletimi yoluyla doku yangısına aracılık eder (Jahagirdar ve ark., 2017).

B-lenfositlerinin poliklonal bir aktivatörü olan EBV, RA patogenezinde dolaylı olarak suçlanmıştır. Romatoid artrit hastalarından alınan boğaz çalkalama suyunun incelemelerinde yüksek oranda EBV içeriği bulunmuştur. Ayrıca kontrol hastaları ile karşılaştırıldığında RA hastalarında, virüs tarafından enfekte edilmiş çok sayıda B-lenfosit, EBV antijenlerine karşı gelişmiş fazla miktarda antikor ve anormal EBV-spesifik sitotoksik T hücre yanıtı gözlenmiş ve RA hastalarında T hücrelerinin EBV ile enfekte B hücrelerini temizlenmesinde sorun olduğu tespit edilmiştir.

Yapılan bir çalışmada, romatoid artrit hastalarında periferik kanda real-time PCR'la yapılan incelemede artmış EBV olduğu saptanmıştır (Harris ve ark., 2006).

#### **2.1.4. Romatoid Artritin Klinik Özellikleri**

Romatoid artrit eklem şişliği, eklem hassasiyeti ve hasarı ile öne çıkan, ciddi sakatlık ve erken ölümlere yol açan kronik bir inflamatuvar hastalık olmasıyla beraber değişken hastalık tipi başlangıcı ve hastalık seyri bulunan bir patolojidir (Burmester ve Bijlsma, 2012; Aletaha ve ark., 2014).

Otoimmün reaksiyonlar, genel sistemik ve eklemdaki inflamatuvar hastalığın yıkıcı olarak ilerlemesine neden olurken, konvansiyonel radyografi veya farklı görüntüleme teknikleriyle görselleştirilebilecek yapısal değişiklikler, RA'yı diğer artritik bozukluklardan ayırt etse de, eklem hasarı hastalığın çok erken evrelerinde nadiren görülür, zaman geçtikçe belirgin hale gelir (Aletaha ve ark., 2014). Tek bir klinik bulgu veya test sonucunun belirtisi, RA'yı diğer eklem hastalıklarından ayırt etmemekte ve RA'nın ayırt edici özelliği olan sinovitin patolojik özellikleri yeterli olmamaktadır (Burmester ve Bijlsma, 2012). Bazı hastalar ateş, poliartrit ve ekstra-

eklem bulgusu ile başlayan akut bir hastalığa sahipken, bazıları daha kademeli ve sinsi bir başlangıç göstermektedir; ikinci durum daha yaygındır. Tipik eklem belirtileri ağrı, sertlik ve şişliği içerir, ilgili eklemlerin kızarıklığı ve sıcaklığı daha az görülmektedir. Hastaların çok az bir kısmı, aniden ve poliartikuler başlangıç tarif etmekte ve bu durum palindromik (yayılan) romatizma ile karıştırılmaktadır (Burmester ve Bijlsma, 2012).

RA'da ilk olarak tutulan eklemler sıklıkla metakarpofalangeal (MKF) eklemler, proksimal interfalangeal eklemler (PİF), metatarsofalangeal eklemler ve el bilekleridir. Parmakların ulnar deviasyonu, MKF eklemlerin subluksasyonu ve PIF eklemlerin hiper ekstansiyonu (kuğu boynu deformitesi) ya da hiperfleksiyonu (düğme iliği deformitesi) gibi deformiteler saptanabilir.



**Resim 1.** Kuğu boynu ve düğme iliği deformitesi

(<https://www.romatizmahastaliklari.com/tr/icerik/5/romatoid-artrit>)

Büyük eklemler genellikle küçük eklemlerden sonra tutulmakta; bunun sebebi muhtemelen büyük eklemlerde (servikal, torakal, lomber ve sakral omurlar, omuz, kalça, dizler) sinovit, küçük eklemlere göre daha uzun süre yanıtızsız kalmasıdır. Romatoid sinovitin eklemler üzerine etkisi, altta yatan hastalığın şiddeti, süresi ve kişinin eklemlerine verdiği yük ile ilgilidir (Harris ve ark., 2006).

RA'lı hastaların % 50'sinde hastalık süresince herhangi bir zamanda, eklem dışı bulgular ortaya çıkabilir. Deri, hemapoietik, karaciğer, akciğer, kalp, göz, nörolojik durumlar, kas, böbrek ve damar rahatsızlıkları hastalığın gidişatını olumsuz etkileyen durumlardır (Burmester ve Bijlsma, 2012).

RA'yı tanımlamak için yaygın olarak kullanılan sınıflandırma kriterleri, 1987 ACR kriterleridir (Aletaha ve ark., 2014). Bu kriterler yedi başlıktan oluşmaktadır;

- 1) Sabah tutukluğu,
- 2) Üç veya daha fazla eklem tutulumu,



- 3) El eklemlerinde artrit,
- 4) Romatoid nodüller,
- 5) Simetrik artrit,
- 6) Pozitif serum romatoid faktör,
- 7) Radyolojik değişikliklerdir.

Kriterlere göre bir hastanın RA'lı olduğunu söyleyebilmek için yedi kriterden en az dördü bulunmalı; bu dört kriter en az altı haftadır mevcut olmalıdır (Harris ve ark., 2006).

### **2.1.5. Romatoid Artritte Tedavi Yaklaşımları**

Otoimmün hastalıkların tedavisi otoimmünite uyarısının baskılanması, düzenleyici mekanizmaların aktive edilmesi veya efektör mekanizmaların inhibisyonuna dayanır (Harris ve ark., 2006). Anti-inflamatuar yollar ve inflamasyonun azalması, RA'lı hastalar için uzun süreli hastalık kontrolü sağlaması nedeniyle önemli bir tedavi seçeneğidir (Chen ve ark., 2018). Romatoid artrit tedavisi için birçok yeni biyolojik ajan geliştirilmekte; özellikle, yeni sitokin antagonistleri, IL-6, IL-12/IL-23, IL-17 ve GM-CSFR'yi bloke edenler dahildir (Burmester ve Bijlsma, 2012).

Erken hastalığı modifiye eden antiromatizmal ilaçlar (DMARD) tedavisi daha yüksek klinik yanıt oranları, daha az sakatlık ve daha az eroziv hasar oluşumuna neden olmaktadır (Ma ve ark., 2010). Günümüzde hastalığın tedavisinde sentetik DMARD'larda geleneksel olarak; Metotraksat, Sulfasalazin, Leflunomid, Hidroksiklorakin kullanılmaktadır. Biyolojik DMARD'larda ise; Etanercept, Infliximab, Adalimumab, Golimumab, Certolizumab, Tocilizumab, Sarilumab, Rituximab, Abatacept kullanılmaktadır. Modern tedavilerle amaç, hastaların RA için 1987 kriterlerinde yer alan kronik, aşındırıcı hastalık durumuna gelmelerini önlemektir (Aletaha ve ark., 2014).

Etkili tedavi yöntemleri kullanılması ile hastalığın iyileşmesi veya düşük hastalık aktivitesi, hastaların yaklaşık % 75-80'inde görülebilir. Bununla birlikte, sanayileşmiş ülkelerdeki hastaların yaklaşık % 20 ila 25'i ve daha az sayıda akraba bulunduran ülkelerdeki hastaların çoğu, düşük hastalık aktivitesi değerine ulaşmamaktadır (Aletaha ve Smolen, 2018).

Romatoid artrit tedavisi henüz mümkün olmamasına rağmen, modern tedavi yaklaşımları hastalık kontrolünü sağlayabilir (Aletaha ve Smolen, 2018). Uygulanan tedaviler arasında ilaç tedavisi, olog hematopoietik kök hücre transplantasyonu, gen terapisi, immünolojik temizleme, ileri cerrahi tedavi ve diğer adjuvan tedaviler bulunmaktadır. Bu tedavilerin belirli bir etkisi olsa da sınırlamaları da söz konusudur. Ozon (O<sub>3</sub>) tedavisi ise bu alanda denenmeye başlanmış yeni bir tamamlayıcı tedavi yöntemidir (Chen ve ark., 2013).

2005 yılında Chang ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada; ozonun RA'da iyileşme yeteneğinin olup olmadığını araştırmak için, in vitro ve in vivo deneyler yapılmış; birincil kültürden RA fibroblastlarını saflaştırılmış ve ozon uygulaması sonrasında, TNF-a, IL-1b ve IL-6'nın üretimini RA-sinovyal fibroblast hücreleri ile gözle görülür şekilde azalttığını bildirmişlerdir. Buna ek olarak; RA'nın inflamatuvar reaksiyonunu toksisite veya yan etkiler olmadan hafifletilebileceğini söylemişlerdir.

Ozon uygulamasının, oksidatif ön koşullandırma veya sonlandırma işleminin sıçanlarda adjuvan artrit ile ilişkili antioksidan/oksidan dengesizliğini etkili bir şekilde iyileştirdiği sonucuna vardıklarını ve bu sonuçların romatoid artritte tamamlayıcı bir tıbbi tedavi yöntemi olarak ozon uygulaması kullanımının olumlu sonuçlarından dolayı desteklediklerini Mawsouf ve arkadaşlarının 2011 yılında yaptıkları çalışmada bildirmişleridir.

Ozon tedavisinin romatoid artritte biyokimyasal ve klinik düzeylerde faydasını doğrulamak için literatürde daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. Yapılan bu çalışmaların olumlu sonuçlarından yola çıkarak ozon uygulamasının RA'da tamamlayıcı tıbbi yaklaşım olabileceğini ve hastalar üzerinde ağrıların ve şişliklerin azaltılması, hareket kısıtlılığının önlenmesi gibi etkiler sağlayacağına inanmaktayız.

## **2.2. Ozon**

### **2.2.1. Ozon**

Ozon (O<sub>3</sub>) dairesel üç oksijen atomundan oluşan, kararsız, depolanamayan, çok açık mavi renkli, keskin kokulu ve havadan daha ağır bir gazdır (Babuçcu, 2011). Oksijen bir elektrik deşarjına veya UV radyasyonuna maruz kaldığında, yüksek oranda reaktif doğal bir gaz molekülü olan O<sub>3</sub> oluşur (Salem ve ark., 2015).



Ozon, oksijenden 1.6 kat daha yoğun, 48 moleküler ağırlığında, literatürde geniş bir değişkenlik belirtilmesine rağmen keskin bir kokusu olan mavimsi renge sahip bir gazdır. Suda çözünürlüğü, oksijenden yaklaşık on kat daha yüksektir (100 mL'de 49 mL, 0.02 M) (Bocci ve ark., 2009). Herhangi bir gaz gibi ozon da Henry yasalarına göre sıcaklık, basınç ve ozon konsantrasyonu ile ilgili olarak saf suda fiziksel olarak çözünebilmektedir (Bocci, 2006a). Ozon radikal bir molekül olmamakla birlikte, flor ve persülfattan sonra en güçlü üçüncü oksidandır ( $E^\circ = 5.12.076 \text{ V}$ ) ve 20°C'de 40 dakikalık bir yarı ömre sahip olduğu için depolanamayan ve bir kerede kullanılması gereken dengesiz bir gazdır (Kaya ve ark., 2017).

Atmosferdeki ozonun % 90'ına yakını, yer yüzeyinden yaklaşık 20–50 km yüksekte bulunan stratosfer tabakası içinde yer alır ve atmosferik oksijen moleküllerini Chapman teorisi ile uyumlu olarak iki yüksek reaktif oksijen atomuna bölerek UV ışınımı (<183 nm) ile sürekli olarak üretilir. Endotermik bir reaksiyonla, bu atomların her biri, triatomik ozonu oluşturmak için bozulmamış oksijene birleşir. Aynı zamanda atmosferik oksijenden ozon oluşumunu katalize eden yıldırımın elektriksel deşarjı sırasında üretilir. Geri kalan % 10'luk ozon miktarı ise atmosferin 10–15 km'ler arasındaki troposfer tabakası içinde bulunmaktadır (Bocci ve ark., 2009; Babuçcu, 2011).

Ozon tartışmalı bir gazdır, çünkü tehlikeli B ve C ultraviyole ışınlarını absorbe ederek stratosferde çok faydalı olmasına rağmen, troposferdeki pulmoner sistem için özellikle zehirli monoksit (CO), azot dioksit ( $\text{N}_2\text{O}_2$ ) ve asit izleri ile karıştırılmış kirli hava meydana gelir (Bocci ve ark., 2006).

### 2.2.2. Medikal Ozon

Tamamlayıcı bir tıp yaklaşımı olarak ozon tedavisi, 40 yıldan fazla süredir bilinmektedir. Son on yılda oksijen-ozon tedavisi yavaş yavaş yaygınlaşmakta ve günümüzde birçok ülkede kullanılmaktadır. Bu durum, bilimsel çalışmaların insan kanı ve biyolojik sıvılarla temas ettiğinde ozonun etki mekanizmasının açıklanmasından sonra ortaya çıkmıştır (Mawsouf ve ark., 2011; Bocci ve ark., 2011). Ozonun tıbbi jeneratörü, reaksiyona göre yüksek voltaj gradyanından (5-13 mV) geçen saf oksijenden ozon üretmektedir:



Sonuç olarak, her zaman % 95'ten az oksijen ve % 5'ten fazla ozon içermeyen bir gaz karışımı toplanır. Hava bu reaksiyonda hariç tutulmalıdır. Çünkü havanın varlığı durumunda ozonun yanı sıra toksik  $N_2O_2$  oluşur. Endüstriyel ozon havadan üretilir ancak tıbbi ozonun sadece tıbbi oksijen kullanılarak üretilmesi gerekir, aksi takdirde ozon üretimiyle eşzamanlı olarak nitrik dioksit ( $NO_2$ ) oluşması toksik etkileri meydana getirecektir (Bocci 2006a; Bocci ve ark., 2009).

Ozonu tıpta kullanabilmemiz için ozon cihazlarının ozon üreten kısımlarının çelik (V4A kalitesinde), özel olarak alüminyum, seramik, cam ya da teflon (PTFE) gibi reaksiyona girmeyen maddelerden yapılması gerekir. Ozon vermek için ise kullanılan materyallerin cam, polietilen, polipropilen veya teflon olması önerilmektedir (Babuçcu, 2011).

Ozon, doğada bulunan zehirli bir gazdır, ancak uygun şekillerde uygulanırsa güvenli bir terapötik ajan olarak kullanılabilir. Antioksidan savunma sisteminin iyileştirilmesi, bağışıklık sisteminin aktif hale getirilmesi ve büyüme faktörlerinin salınımının artırılması gibi özellikler, ozon tedavisinin etki mekanizmaları olarak kabul edilir. Son zamanlarda, bu tedavinin enfeksiyonlara karşı etkisi, bazı hayvan deneylerinde uygulanmış olup ve dahil olan mekanizmaların toll benzeri reseptör (toll-like reseptör (TLR)) 4'ün aracılığıyla ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Ozon tedavisi, oksidatif stresi, temel olarak hücrenin antioksidan sistemini uyararak düzenler. Özellikle, tekrarlanan rektal ozon uygulaması, oksidatif strese karşı duyarsızlaşmaya ve serbest radikallerin etkili olduğu hepatoselüler hasarı önleyen oksidatif uyarıya yol açabilir (Chen ve ark., 2016; Salem ve ark., 2016).

Literatürde  $O_3$  tedavisi ile ilgili çalışmalar, yangısal süreçlerin ön planda olduğu hastalıklar üzerinde yoğunlaşmaktadır (Diaz-Llera ve ark., 2002; Mawsouf ve ark., 2011; Kaya ve ark., 2017). Ozon tedavisiyle ilgili etkinlik, terapötik mekanizmalar ve optimal konsantrasyonlar gibi pek çok soru belirsizliğini korumaktadır. Bu faktörler  $O_3$  tedavisinin geniş klinik kullanımını büyük ölçüde sınırlandırmaktadır (Chen ve ark., 2013).

İnsan kanının oksijen ve ozon karışımına maruz bırakılması, maruz kalma süreleri ve konsantrasyonların uygun olması koşuluyla, kan için toksik değildir. Optimum

konsantrasyon 10 ila 80 µg/ml arasında değişmektedir. Bununla birlikte, 70 µg/ml konsantrasyonunun en güvenli olduğu düşünülmektedir (Salem ve ark., 2015).

### 2.2.3. Medikal Ozon Uygulamasının Tarihçesi

Alman Kimyacı Christian Friedrich Schopen, 1839'da "elektrik kokusu" olan keskin bir gazın ortaya çıktığını fark etti. Yunan diline göre, "ozon" olarak nitelendirmiştir.

Ozon güçlü bir bakteri öldürücü gaz olarak tanımlanmış ve 1. Dünya Savaşı sırasında, A. Wolff tarafından Clostridium anaerobik enfeksiyonları nedeniyle gaz halindeki kangrenden etkilenen Alman askerlerini tedavi etmek için kullanılmıştır. İki öncü çalışmasında Stoker, Queen Alexandria Askeri Hastanesi'nde ozonla başarılı bir şekilde tedavi edilen ilk 21 tıbbi vakayı bildirmiştir. 1936'da Fransız doktor Dr. Po Aubourg, oksijen-ozon karışımının rektuma doğrudan verilmesiyle kronik kolit ve rektal fistülleri başarılı bir şekilde tedavi ettiğini bildirmiştir (Bocci ve ark., 2009).

İlk tıbbi ozon jeneratörü fizikçi Joachim Hansler (1908-1981) tarafından icat edildikten sonra, Dr Hans Wolff (1927–1980), O<sub>3</sub> gazını tedavi için kullanabilmek için, ozona dirençli bir cam şişede bulunan kana vererek, ozonlanmış otohemoterapiyi (O<sub>3</sub>-AHT) geliştirmenin yollarını aramıştır (Bocci ve ark., 2009). Ozon terapisi Rokitansky (1977) ve Werkmeister'in (1981) kronik yaraların tedavisinde ozonu kullanmaya başlaması ile yeni bir ivme kazanmıştır (Babuçcu, 2011).

Ozon tedavisi 1970 yılında Almanya'da doğmuştur ancak ozonun nasıl hareket ettiğini bilinmeden, deneysel olarak gerçekleştirilmiştir. Ozon en reaktif oksidanlardan biri olduğundan ( $E^{\circ} = + 2.076V$ ), terapötik olarak nasıl faydalı olabileceğini anlamının zor olacağı düşünülmüştür (Bocci ve ark., 2011). Dikkatli bir şekilde yapılan ozon tedavisinin, SOD, GSH-peroksidazlar, redüktazlar ve transferazlar ve glikoz-6- fosfat dehidrojenaz gibi antioksidan enzimleri yeniden düzenleyerek, bu anormal durumu düzeltebileceğini gösterilmiştir. İlk olarak 1996'da SOD için gösterilen bu sonuç, insan kanının güçlü antioksidan kapasitesine karşı iyi kalibre edilmiş ozonun kesin dozlarıyla uyarılan küçük ve akut oksidatif streslerin tekrarlanmasından kaynaklanmaktadır (Bocci ve ark., 2007).

Ozon tedavisinin ülkemizde 2014 yılında T.C. Resmi Gazetede yayımlanarak yürürlüğe giren Sağlık Bakanlığı Geleneksel ve Tamamlayıcı Tıp Uygulamaları Yönetmeliği ile, sertifikalı hekimler tarafından yapılabilmesinin yolu açılmıştır. Bu yönetmeliğe göre, bir ozon jeneratörü ve sensörü aracılığı ile, ozon-oksijen karışımının sistemik veya lokal uygulaması yapılabilmektedir (Kesikburun ve Yaşar, 2017).

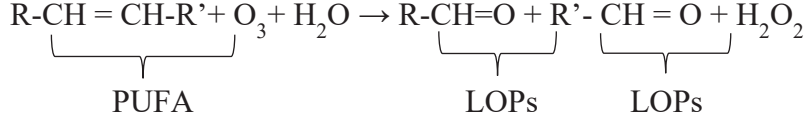
#### **2.2.4. Medikal Ozon Uygulamasının Etki Mekanizması**

Ozon, saf suda diğer gazlar gibi Henry kanununa göre çözünür. Çözünmesi ısıya, basınca ve konsantrasyonuna bağlıdır. Biyolojik sıvılarda ise ozonun Henry yasalarına uymadığı bilinmekte ve ozon, oksijenden farklı olarak hızlıca biyomoleküller ile reaksiyona girmektedir (Bocci, 2006b). Bir dezenfektan, oksijen donörü, immünomodülatör, paradoksal antioksidan enzim indükleyicisi, metabolik güçlendirici, endotelial nitrik oksit sentezin bir indükleyicisi ve muhtemelen neovaskülarizasyon ve doku rekonstrüksiyonuna sahip bir kök hücre aktivatörü olarak görev yapabilir (Özler ve ark., 2009; Salem ve ark., 2015).

Ozonlama süreci, iki fazda etki eden reaktif oksijen türevleri (ROT) ve LOP oluşumu ile karakterize edilir. Bu işlem, ex vivo (bir cam şişede toplanan kanda) veya in vivo (intramüsküler ozon enjeksiyonundan sonra) gerçekleşir, kanla temas eden ozon dozunun çoğu, kısmen suda çözünür antioksidanlar tarafından azaltılır ve kan hücrelerine zarar vermeden önce antioksidan ve süpürücü sistemler tarafından kontrol edilen lipid peroksidleri ve diğer biyoaktif molekülleri içeren ROT'a dönüşür. Ancak ROT hemen etkilenir ve yok olurken (erken ve kısa etkili haberciler), LOP dolaşım yoluyla dokular boyunca dağılır ve sonunda hücre reseptörlerine sadece birkaç molekül bağlanır ve sürecin devamında farmakodinamikleri, potansiyel toksisitelerini en aza indirmeye, geç ve uzun ömürlü haberciler olmalarına izin verir (Di Paolo ve ark., 2005; Bocci, 2006a).

Uygulama sonrasında tercihen ozon, çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA), askorbik ve ürik asitler gibi antioksidanlar, sistein gibi -SH gruplarına sahip tiyol bileşikler, düşük glutatyon (GSH) ve albümin ile reaksiyona girer. Ozon dozuna bağlı olarak karbonhidratlar, enzimler, DNA ve RNA da etkilenebilir ve tüm bu bileşikler ozonla karşılaştığında elektron donörü gibi davranarak oksitlenirler (Bocci, 2006a, Özler ve ark., 2009). Bunun sonucunda süperoksit ( $O_2^-$ ), hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ve

hipoklorik asit gibi ROT oluşur. Bu reaksiyonlardan en önemlisi PUFA oksidasyonudur. Ana reaksiyon aşağıdaki gibidir;

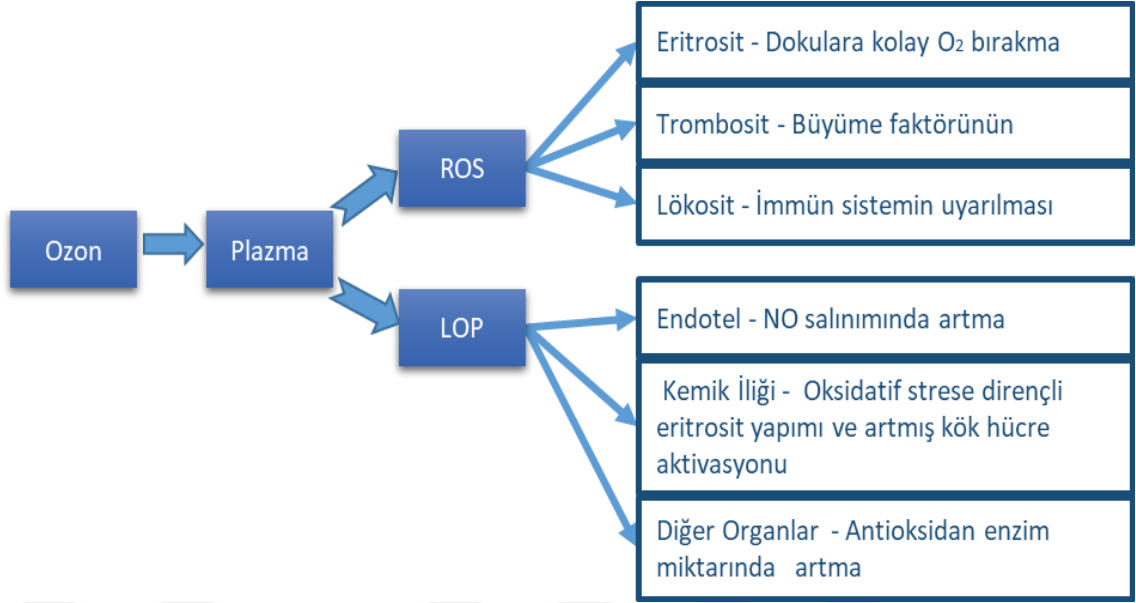


Bu reaksiyon bir mol hidrojen peroksit ile iki mol LOP'un eş zamanlı oluşumunu gösterir. Yüksek ozon çözünürlüğü ve reaktivite sayesinde, bu reaksiyon 30-50 sn'de tamamlanır ve ozon plazmada çözünen oksijen olarak, hemoglobin tamamen doymuş iken verilir. Bu aşamada, ozon reaksiyonları tarafından üretilen iki önemli haberci, PUFA peroksidasyonunun son ürünleri olarak hidrojen peroksit ve aldehitlerdir. Ürik asitin bir kısmı allantoin okside edilir ve atılır. Diğer kısmı ise; dehidroaskorbat ve bir GSH disülfid izi, tioredoksin, E vitamini ve NADPH ile elektronun yeterli olduğu bir bölümünün etkisiyle birkaç dakika içinde normal değerlerine geri döner (Bocci 2006a; Bocci ve ark., 2014).

Temel ROT molekülü, çeşitli biyolojik ve terapötik etkilerin ortaya çıkmasından sorumlu olan bir ozon habercisi olarak görev yapabilen, radikal olmayan bir oksidan olan hidrojen peroksittir. Reaksiyon zincirinde hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), eritrositlerde, önemli miktarda ATP ve 2,3-difosfogliserat artışına neden olur ve buna bağlı olarak da oksihemoglobin sigmoid eğrisi sağa kayar ve özellikle iskemik dokularda oksijen salınımını artırır. Çok sayıda eritrosit nedeniyle, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hızla GSH ile suya indirgenir. Değiştirilmiş azaltılmış GSH/GSSG (glutasyon/okside edilmiş formundan serbest glutasyon) oranı, bazı glutasyon disülfidlerini sıkıştırarak veya askorbik asit ya da tioredoksine rağmen GSH redüktaz yoluyla indirgeyerek hızlı bir şekilde düzeltilir. Ayrıca, glikoz-6 fosfat dehidrogenaz'ın (G6PDH) aktivasyonu, mevcut olan enerjiyi azaltarak glikolizi aktive etmesini sağlar; lökosit ve endotel hücrelerinde, nötrofil fagositik aktivitesi artar. Lenfositlere ve monositlere giren hidrojen peroksit, transkripsiyon faktörü NF-κB'nin geri kalan kısmındaki trimerik bileşenlerden biri olan IκB'nin fosforilasyonu ile bir tirozin kinazı aktive eder. Fosforlanmış IκB serbestleşir ve proteazomda parçalanır. Kalan heterodimer p50-p65, çekirdeğe

dönüşür ve küçük bir gamma (g)-interferon ve IL-8 salınımına yol açan çeşitli genleri aktive eder. Reaktif oksijen moleküllerinin lökositlere olan etkisine bakıldığında sitokin uyarısı vardır, bu sitokinlerden bazıları; TNF-a, IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, TGF-b'dir. Hafif bağışıklık arttırıcı etki ozonlanmış lökositlerle sınırlı kalmamaktadır. Trombositlerde büyüme faktörlerinin serbest kalmasını kolaylaştırır; makrofajlar ve solunum epitel hücreleri gibi diğer hücre tiplerinde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pro-oksidan etkisine adapte olarak antioksidan sistemlerinin hücre aktivasyonunu, sitokin salgılanmasını ve uzun süreli verimliliğini uyarır. Bu hücrese tepkiler, uygun maruz kalma süreleri ve ozon dozları kullanıldığında uygun şekilde ayarlanabilen geçici ve akut bir oksidatif stres olayından kaynaklanmaktadır. Bu nedenle ozon, tanımlanmış bir terapötik aralıkta bir ilaç gibi hareket edebilir. Böylece immün sisteminin düzenlenmesinde rol oynar. Yüksek dozlarda uygulandığında, ozon toksiktir, daha düşük dozlarda ise anti-inflamatuar ve antioksidan sistemleri aktive eder (Di Paolo ve ark., 2005; Bocci 2006a; Bocci ve ark., 2014; Dıraçoğlu, 2015; Kaya ve ark., 2017).

LOP üretimi, plazmada bulunan PUFA'nın peroksidasyonunu takip eder: heterojendir ve lipoperoksit (LOO) olarak sınıflandırılabilir, alkoksil radikalleri (LO), lipohidroperoksitler (LOOH), izoprostanlar ve bunların arasında 4-hidroksi-2,3 trans nonenal (HNE) ve malonildialdehit (MDA) bulunmaktadır. Bunlar in vitro olarak ROT'dan çok daha stabildirler, ama neyse ki kan reinfüzyonu üzerine vücut sıvıları, atılım (idrar ve safra yoluyla) ve GSH-transferaz (GSH-Tr) ve aldehit dehidrojenazlar tarafından metabolizmada belirgin bir dilüsyona uğrarlar bu da metabolizmanın canlı organizmaların ROT- (ve ozonun) biyomoleküllere bağlı hasarına verdiği temel tepkilerdir (Di Paolo ve ark., 2005; Bocci, 2006a).



**Şekil 3.** İnsan kanının oksijen-ozona maruz kalması sırasında ortaya çıkan ana biyolojik etkilerin bir özeti (Bocci, 2006b)

Yapılan çalışmalarda ozonun terapötik konsantrasyonu 10-80 µg/ml olarak belirlenmiştir. Bu ozon konsantrasyonu Rice-Evans'ın tarif ettiği total antioksidan kapasiteyi % 25'ten fazla düşürmediği gibi azalan antioksidanlar 20 dakika sonra eski haline gelmektedir. Plazmanın sahip olduğu geniş antioksidan kapasite ve eritrositlerdeki antioksidan enzimler nedeniyle, kan ozon toksisitesine karşı en dirençli dokudur (Travagli ve ark., 2007; Özler ve ark., 2009).

Ozon uygulaması ile hem oksijenaz-1 (HO-1) enziminin de uyarıldığı bildirilmiştir. Bu enzimin artışından gerek ROT gerekse eritrosit hemolizi sorumlu olabilir. HO-1, hem halkasının yıkım yolunda görev alan mikrozomal bir enzimdir ve HO-1'in eşzamanlı uyarılmasıyla desteklendiği varsayılmıştır, çünkü bu enzim H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ultraviyole ışınımı, ROT ve hem tarafından uyarılmaktadır. Bu enzim hem molekülünü biliverdin ve CO parçalar. Yine HO-1'in yanında ısı şok protein-70'in de arttığı gösterilmiştir (Bocci ve ark., 2007).

Terapötik aralık içinde, eritrosit membranında lipid peroksidasyonunun meydana gelmediği gösterilmiştir. Oluşan potansiyel lipid peroksit, peroksiroksinler ve GSH peroksidazlar yoluyla hızla hidroperoksite indirgenir. Bu nedenle, kanın kan fazı ile gaz fazıyla karıştırılmasından 5 dakikadan daha kısa bir süre içinde, ozon tamamen



reaktif olmuş ve tipik ROT olarak 40 µm'den fazla H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (80 mg/ml ozon konsantrasyonu durumunda) ve tipik LOP olarak 1-3µm alken üretmiştir. Kan hücrelerinin plazma ve intrasellüler sıvıları arasında oluşan H<sub>2</sub>O gradyanı oldukça geçiştir, çünkü H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hücre zarından kolayca geçer, ancak hücre içi konsantrasyonu, hücre dışı konsantrasyonunun % 10'undan fazla değildir, bunun da sebebi hızla bol miktarda GSH ve tioredoksin ile suya indirgenmesidir. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in hücre içi yarı ömrü 10–30 sn civarındadır ve plazmada 1 dakikadan azdır. Hücre içi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kan hücrelerinde aşağıdaki biyokimyasal yolları aktive eder: (1) 2,3-difosfoglisaratın artışı nedeniyle, oksihemoglobin eğrisi sağa kayar ve eritrositler hipoksik dokuya daha fazla oksijen verebilir. (2) lenfositlerde NF-κB'nin aktivasyonu, birkaç sitokin sentezinin artırdığı için hafif bir bağışıklık uyarımı ile sonuçlanır; ve (3) iyileşme sürecini teşvik etmek için yararlı görünen trombosit büyüme faktörlerinin serbest bırakılmasıdır.

Daha sonra, ozonlanmış kanın infüzyonu sırasında, herhangi bir serbest alkenal, böbrek ve karaciğerde safra ya da idrar yoluyla detoksifiye edilir ya da atılır (Bocci ve ark., 2012).

### **2.2.5. Medikal Ozonun Uygulama Yöntemleri**

İnsan kanının oksijen ve ozon karışımına maruz bırakılması maruz kalma süreleri ve konsantrasyonların uygun olması koşuluyla, kan için toksik etki oluşturmaz. Aslında optimum konsantrasyon 10 ila 80 µg/ml arasında değişmektedir. Bununla birlikte, 70 µg/ml konsantrasyonunun en güvenli doz olduğu bildirilmiştir (Bocci, 2006b; Salem ve ark., 2015). Eşik kavramı fizyolojik olarak önemlidir ve çoğu durumda ml kan başına 10µg/ml gazın altındaki bir ozon dozunun biyolojik olarak etkisiz olduğu anlamına gelir. Bunun altındaki ozon dozları plazma antioksidanları tarafından tamamen nötralize edilirken, terapötik dozdan (ml kan başına 10-80 µg) daha yüksek bir dozun toksik etki yaratacağından dolayı kullanımı tavsiye edilmemektedir. Terapötik dozlar uygulama yolları ve uygulama bölgelerine göre değişiklik göstermektedir (Kesikburun ve ark., 2017; Bocci, 2006b). Ozon uygulamalarına ilk bakışta, her hastalıkta kullanılabileceği düşünülse de aslında tedavi amacına uygun olarak doz ve süresinin planlanması sanıldığı kadar kolay değildir. Açıkçası, bugün farklı patolojiler, evreleri ve hastanın durumu için en uygun yöntemi seçebilmek mümkündür (Kesikburun ve ark., 2017; Bocci ve ark., 2009). Uygulamada



önemli noktalardan biri de, gaz karışımının her zaman % 95'ten az oksijen içermemesi nedeniyle oksijen embolizmini tetikleme riski nedeniyle intravenöz bir gaz halinde enjekte edilmemesi gerektiğidir (Bocci, 2006a).

Medikal ozon tedavisinde birçok uygulama yöntemi mevcuttur. Fakat kullanımı sınırlı ve riskli olmasından dolayı en fazla tercih edilen yöntemler: Major otohemoterapi (MOTH), minör otohemoterapi (MİTH) ve rektal infüzyon (RI) en sık kullanılanlardır.

#### **2.2.5.1. Majör Otohemoterapi (MOTH)**

MOTH en sık tercih edilen uygulama yöntemlerinden biridir. Hastanın damarından alınan bir miktar kanın (100 ml'den 225 ml'ye kadar) ozona dayanıklı şişe içinde uygun ozon/oksijen karışımı (ozon en çok % 5, oksijen en az % 95) ile muamele edildikten sonra aynı damardan geri verilmesi esasına dayanır. Tüm tedavilerin temel uygulama yöntemidir (Bocci ve ark., 2011).

Şimdiye kadar, en optimal yaklaşım MOTH olmuştur, çünkü hastanın vücut ağırlığına dayanarak, % 3.8 sodyum sitrat veya heparin ilave edilmiş önceden belirlenmiş bir kan hacmine eşit miktarda gaza maruz kalabilir, ozon konsantrasyonu hassas bir şekilde ozon dirençli, kullanılıp atılan 500 mL'lik bir cam şişe kullanılarak vakum altında belirlenir. Köpüklenmeyi önlemek için hafifçe karıştırılarak, kanın ozonlanması 5-10 dakika içinde tamamlanır ve ozonlanmış kan, uygun kan tüpü ile uygun bir serum aracılığıyla 15 dakika içinde donöre verilir. Bu basit ve ucuz uygulama yöntemi, geleneksel tıp tarafından tanımlanan yöntemlerden daha üstün olup, kronik iskemide iyileştirici sonuçlar vermiştir. Aynı zamanda kronik enfeksiyon hastalıklarında ve muhtemelen otoimmün hastalıklarda destekleyici bir yardımcıdır. (Bocci, 2006a; Bocci ve ark., 2011a; Bocci ve ark., 2011b).

Klinik uygulamaya gelince, ozonlanmış otohemoterapi, bazı yaşa bağımlı maküler dejenerasyonlarla (maküler dejenerasyon, kuru form) ilişkili vasküler hastalıkları (örneğin felç, periferik arteriyel ve kronik kalp hastalığı) tedavi etmek için özellikle uygundur. VEGF, retinanın iskemik hastalıklarında damar geçirgenliği ve anormal anjiogenezin mediyatörüdür. VEGF, vasküler endotel tarafından bölgesel hipoksi, TGF- $\beta$ , fibroblast büyüme faktörü, inflamatuvar sitokinler ve glikolizasyon son ürünlerinin uyarısına bağlı olarak salgılanır. Kronik bulaşıcı hastalıklarda, diyabet ve

kanserde yararlı bir destekleyici tedavi olabilir, fakat tamamen iyileştirici değildir (Bocci ve ark., 2011b).

**Tablo 1.** MOHT'nin endikasyonları ve tedavi yaklaşımı (Viebahn-Hansler ve ark., 2012).

<b>O<sub>3</sub> Konsantrasyonu</b>			
<b>Endikasyonlar</b>	<b>O<sub>3</sub> Hacmi</b>	<b>Tedavi Sıklığı</b>	
<b>Arteriyel Dolaşım Hastalıklarında</b>			
Serebral ve Periferik Evre II	15-20 µg/ml	50ml	Haftada iki kez
	20-30 µg/ml	50-100ml	İlk günde bir kez, sonrasında haftada iki kez
Evre III ve IV			
<b>İmmün Sistem ve Oksidatif Stresin Düzenlenmesinde</b>			
Canlandırma, Genel İmmün Yetmezliği ve Enfeksiyon Önleme	20-25 µg/ml	50ml	Haftada iki kez
<b>Virüs Kaynaklı Hastalıklar</b>			
Hepatit Akut Evre	30(max. 40) µg/ml	50-100ml	Başlangıçta günlük, daha sonra azaltılır
Kronik Evre(B/C)	10-20 µg/ml	50-100ml	Haftada iki kez, sonra haftada 1 ve ayda 2 kez şeklinde devam edilir
<b>Tamamlayıcı Onkolojide</b>			
Kemoterapi ve/veya Radyasyonun yan etkilerinin önlenmesi	10-15 µg/ml	50ml	Haftada iki-üç kez
<b>İnflamatuvar Süreçlerde ise,</b>			
RA Akut Evre	30-35 µg/ml	50(100)ml	Günlük
Diyabetik Anjiyopati	20-25 µg/ml	50ml	Haftada iki kez, devamında ayda iki kez

### 2.2.5.2. Minör Otohemoterapi (MİTH)

Hastadan alınan 5 ml kanın eşit hacim gaz karışımıyla (genellikle % 95 O<sub>2</sub>, % 5 O<sub>3</sub>), ozon yoğunluğu 80-100 µg/ml aralığında olacak şekilde, ozona dayanıklı enjektör içinde kuvvetli bir şekilde karıştırılarak elde edilir (Bocci ve ark., 2011a). Köpük dahil olmak üzere hafifçe oksitlenmiş kan, herhangi bir anesteziye gerek olmadan ve elde edilen ozonlu kan bekletilmeden gluteus kasına enjekte edilir. Bu yöntem uygulanırken az miktarda da olsa hemoliz riski (% 1-2) mevcuttur. MİTH uygulanan gluteal kasta “Hem” molekülünün açığa çıkması HO-1 (heme-oksijenaz 1) sentezini uyarır. Kolay uygulanan MİTH ucuz, güvenli ve iyi tolere edilen bir yöntemdir.

Özellikle spesifik olmayan bir immünomodülatör yaklaşım olarak, son 20 yılda, herpetik enfeksiyonlarda faydalı kronik enfeksiyon hastalıklarında MOHT desteklemek amacıyla kullanımı yaygındır (Bocci ve ark., 2011a; Bocci ve ark., 2011b).

### **2.2.5.3. Rektal İnfüzyon (RI)**

Ozon uygulamada farklı bir yöntem de bir O<sub>2</sub>-O<sub>3</sub> gaz karışımının rektum içine verilmesidir. Günümüzde, birçok hastalığı tedavi etmek için önerilmiştir (Bocci ve ark., 2012).

O<sub>3</sub> konsantrasyonunda 5 ila 35µl/ml'den fazla olmayan dozlarda rektum/kolon içine 200-250 ml gaz hacminin infüzyonu tam olarak yapılabilir, ancak etkili O<sub>3</sub> dozu olası şişkinlik ve daha fazla veya daha az miktarda lümen içeriğinin varlığı nedeniyle belirlenemeyebilir. Oksijenin doğal taşıyıcı olduğunu ancak reaktif gazın ozon olduğunu ve rektum lümeni içinde çok hızlı bir şekilde hidrojen peroksit ve çeşitli lipohidroperoksitler ve alkenaller ürettiğini açıklanmıştır (Bocci ve ark., 2011d). Bu uygulama yönteminde, dozun önemli bir bölümünün dışkı maddesi tarafından emilip etkisini kaybedeceği açıktır. Kalan O<sub>3</sub> dozu çözülür ve mukozayı kaplayan glikokaliks ve mukoproteinlerden oluşan tabakada nötr bir hal alır. Ozon anında ve tam olarak mukoza içerisindeki bileşiklerle reaksiyona girer, ancak sadece LOP'lerin bir kısmı mukoza tarafından emilir ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tamamen azalır. Batı ülkelerinde birçok hasta bu yola itiraz etse de Küba'da bu yolla tedavi gören çok sayıda hasta vardır. Bu hızlı ve ucuz prosedürde her zaman O<sub>3</sub> konsantrasyonu 50 mg/ml olan 200 ml O<sub>2</sub>-O<sub>3</sub> karışımının uygulanması benimsenmiştir (Bocci ve ark., 2012).

Bu uygulama yöntemlerin yanı sıra, parenteral olarak; intravenöz, intra-arteriyel, intramüsküler, subkutan, intraperitoneal, intraplevral, intraartiküler, periartiküler, miyofasiyal, intradiskal, nazal, tubal, oral, vajinal, üretral ve mesane içi, deri, dış için uygulama yöntemleri söz konusudur (Bocci, 2006a). Bahsedilen uygulamalarla birlikte, burun, tüp, ağız, vajinal, veziküler, plevral ve periton boşluğunun infüzyonunun kontrollü uygulama yöntemleri olduğu kanıtlanmıştır (Smith ve ark., 2017).

### 2.2.6. Medikal Ozonun Klinik Uygulamaları

Oksijen ve ozonun bir gaz karışımı olarak uygulanan ozon tedavisi klinik kullanımı sistematik olarak kardiyovasküler, kronik deri ülserleri, peritonit, enfekte olmuş yaralar, iskemik hastalıklar ve eklem problemleri, deri altı doku, periferik vasküler hastalık, nörolojik, baş ve boyun, ortopedik, gastrointestinal ve genitoüriner olarak düzenlenebilir (Salem ve ark., 2016; Smith ve ark., 2017).

T.C. Resmi Gazetede yayımlanan Geleneksel ve Tamamlayıcı Tıp Uygulamaları Yönetmeliği, 27.10.2014 tarihli ve 29158 sayılı maddesinde;

- Kas iskelet sistemi yaralanmaları – Eklem, tendon ve ligaman yaralanmaları
- Nöropatik ağrı
- Vertebral disk patolojilerine bağlı yansıyan ağrı
- Revaskülarizasyon şansı olmayan kritik iskemili ekstremite yaralanmaları
- Enfekte diyabetik yara
- Myofasial ağrı, fibromiyalji
- Diyabetik yaralar
- Gingivit, periodontitis hastalıkları için ozon tedavisinin uygulanabileceği

belirtilmiştir.

Belirtilen hastalık/patolojilerle ilişkilendirilebilecek durumlarda devam eden tedavileri desteklemek amacıyla literatürlerde de belirtildiği üzere ozon tedavisi, dekompresyon hastalığı, CO ve duman zehirlenmesi gibi akciğer ve solunum yolu hastalıklarında; ağır kan kaybı, anemi, kronik ülserler, osteoradionekroz, refrakter osteomyelit ve nekrotizan fasilit ile komplike olan periferik arter hastalıklarında, protrüzyon lomber intervertebral disk, travma ve refrakter ülserler, viral hepatit ve diğer hastalıkların tedavisinde klinik olarak kullanılır. Romatoid artrit da dahil olmak üzere eklem hastalıklarında O<sub>3</sub> tedavisi kullanılarak umut verici sonuçlara ulaşılmıştır (Bocci ve ark., 2011; Chen ve ark., 2013).

Ozon tedavisi bahsedilen etkilerle birlikte çok sayıda yararlı biyolojik yanıt ortaya çıkarabilir ve muhtemelen yaşlanma, kronik enfeksiyonlar, ateroskleroz, dejeneratif süreçler ve kanser nedeniyle kronik oksidatif stresi tersine çevirebilir. Gerçekten de,

ozon tedavisi, homeostazisi düzeltebilen, atoksik fakat gerçek bir “terapötik şok” olarak yorumlanır (Bocci ve ark., 2006).

Bu endikasyonlar yukarıda belirtilen sistemlerle ilgili spesifik patolojiler için yürütülen insan klinik deneylerinin bir ürünüdür. Doğrudan O<sub>3</sub> tedavisinin desteklenmemesine rağmen, mevcut Gıda ve İlaç İdaresi düzenlemeleri, güvenliğini ve etkinliğini kanıtladığı durumlarda ozon kullanımını kısıtlanamaz (Smith ve ark., 2017).

### **2.2.7. Medikal Ozon Uygulamasının Kontrendikasyonları ve Yan Etkileri**

Ozon uygulamasının yan etkisi yok denecek kadar azdır. Şimdiye kadar literatürlerde bildirilen yan etkiler uygulama hatalarına bağlı lokal komplikasyonlardır. En sık rastlanılan yan etki hemolizdir, teröpatik dozlarda dahi bu oran % 0,4 ile 1,2 arasında tanımlanmıştır. Aynı zamanda bu miktarda bir hemolizin ortama HO-1 vermesinden dolayı yararlı ve istenilen bir şey olduğu da savunulmaktadır (Kutlubay ve ark., 2010, Babuçcu, 2011).

Ancak günümüzde ozon terapinin yan etkilerini ve bunların mekanizmasını açıklayacak çalışmalara ihtiyaç vardır.

#### **2.2.7.1. Medikal Ozon Uygulamasının Yapılmaması Gereken Durumlar**

Ozon uygulamasının gaz formunda damar içine enjeksiyonu hava embolisi sonucu ölümlerle sonuçlanabileceğinden yapılmamaktadır (Bocci ve ark., 2011). Ozon uygulaması, glikoz-6-fosfat dehidrojenaz enzimi eksikliği (favizm, iyilik hali), erken gebelik (ilk üç ayı), Basedow Graves tipi hipertiroidi vakaları, anjiyotensin dönüştürücü enzim tedavisi (maling hipertansiyon), masif kanamalı hastalar, kontrol edilemeyen kardiyovasküler hastalıklar, ağır trombositopeni (<50000/mm<sup>3</sup>) varlığında ve ozona tepki gösteren astım gibi durumlarda yapılmamalıdır (T.C. Resmi Gazete, 27 Ekim 2014, sayı: 29158; Ek-3; Kaya ve ark., 2017).

#### **2.2.7.2. Belirtilen Komplikasyonlar**

Literatürlerde günümüze kadar medikal ozon uygulaması sonrasında beş hasta kaybının gerçekleştiği ve bu vakaların dört tanesinin 1984 yılında uygulaması yasaklanmış olan doğrudan intravenöz uygulamadan kaynaklandığı, diğerinin ise MOTH olduğu belirtilmektedir. Otopside ölüm nedeni olarak gaz embolisi

bildirilmiştir ve otopsi sırasında dolaşım sistemi ve kalpte önemli miktarda gaz bulunduğu belirtilmiştir (Babuçcu 2011; Bocci ve ark., 2011e).

### 2.3. DNA Hasarı ve Mekanizmaları

Genetik bilginin nesilden nesile sağlıklı olarak aktarılabilmesi için DNA yapısının korunması son derece önemlidir. DNA, 5'-3' fosfodiester bağlarıyla kovalent olarak birbiriyle birleşmiş pek çok monodeoksiribonükleotid içeren bir polideoksiribonükleotiddir. Tek zincirli DNA içeren birkaç virüs dışında DNA, iki zincirin birbiri etrafında çiftli sarmal meydana getirecek şekilde dönmesiyle oluşan çift-zincirli bir moleküldür. DNA'nın fonksiyonu bazlar üzerindeki polar gruplara bağlıdır. Bu gruplar arasında spesifik olarak oluşan hidrojen bağları çift sarmal DNA'yı oluştururlar. Adenin-timin arasında iki, guanin-sitozin arasında üç hidrojen bağı oluşmaktadır. Bazlar merkezinde yer almakta, DNA'nın iskeletini ise şeker-fosfatlar oluşturmaktadır. DNA dayanıklı bir molekül değildir, fizyolojik koşullarda hücre başına oluşan günlük yaklaşık olarak 20.000-70.000 hasara karşı duyarlıdır (Harvey ve ark., 2014; Dinçer ve Kankaya, 2009; Paşaoğlu, 2017; Alnajjar ve Sweasy, 2019).

İnsan genomik DNA'sının bütünlüğü çevresel faktörlerin etkisiyle sürekli olarak tehdit altındadır. DNA replikasyonu ve DNA rekombinasyonu gibi hücresel olaylar sırasında da endojen olarak DNA'nın yapısında değişiklikler oluşabilir. Genetik materyalin moleküler bütünlüğünde ekzojen veya endojen faktörlerin etkisiyle meydana gelen tüm değişiklikler "DNA hasarı" olarak adlandırılır (Kulaksız ve Sancar, 2007). DNA hasarı normal DNA metabolizması sırasında spontan veya bazı çevresel faktörlerin etkisiyle oluşmaktadır. Hasar, normal DNA'nın kimyasal ve fiziksel yapısındaki bir değişimdir (Paşaoğlu, 2017). DNA hasarına oksidatif stres, telomer erozyonu, onkojenik mutasyonlar, genotoksik stres ve metabolik stres dahil olmak üzere çeşitli endojen veya ekzojen baskılar neden olabilir (Shimizu ve ark., 2014). Ek olarak, DNA sürekli olarak nükleotid bazlarının kaybına veya değişimine yol açan çevresel saldırılara maruz kalmaktadır. Hasar verici etkenler nitroz asit gibi kimyasallar, UV ışın gibi DNA'daki iki pirimidini birleştiren radyasyon veya çift-zincir kırıklarına neden olan yüksek-enerji radyasyonu olabilir. Hasar tamir edilmezse, mutasyona uğramış hücrelerin proliferasyonu üzerindeki kontrolün kaybıyla kansere sebep olabilecek kadar sonuçlar doğuran mutasyonlar oluşur (Harvey ve ark., 2014).

Oksidasyon, tanımlanmış 100'den fazla farklı okside lezyon ile en baskın DNA hasarı sebebidir. En bol miktarda okside olmuş lezyon 8-oksoguanindir. Kanser hücreleri, günde hücre başına 105 frekansta 8-oksoguanin biriktirir. Hasarlı DNA birikimini önlemek için hücrede spesifik lezyon tiplerini hedef alan çeşitli onarım yolları kullanılır. Bu nedenle, DNA onarımındaki bir eksiklik, bir mutasyona ve genomik dengesizliğe yol açar (Alnajjar ve Sweasy, 2019).

### **2.3.1. Endojen DNA Hasarları**

Endojen sebepler organizmada süregelen oksidasyon veya redüksiyon reaksiyonları ile oluşurlar. DNA replikasyonu ve DNA rekombinasyonu gibi hücresel olaylar sırasında da endojen olarak DNA'nın yapısında değişiklikler oluşabilir. DNA hasarlarının oluşumunda yer alan endojen reaksiyonlar; oksidasyon, metilasyon, depürinasyon ve deaminasyon reaksiyonlarıdır (Kulaksız ve Sancar, 2007; Paşaoğlu, 2017).

#### **2.3.1.1. DNA Replikasyonu Sırasında Ortaya Çıkan Yanlış Eşleşmeler**

DNA'nın temel bir işlevi olan kendini kopyalamasına replikasyon denir. Replikasyon genetik devamlılığın sağlanması için doğru bir biçimde gerçekleşmelidir. Replikasyonun ilk evresi; başlangıç noktalarının tayini, ikinci evre; ana çift DNA sarmalının replike olabilmesi için birbirinden ayrılması, üçüncü evre ise; replikasyon çatalının oluşumudur. Replikasyon sonrası ana DNA molekülü ile tüm nükleotid dizisi tamamen aynı olan DNA molekülü ortaya çıkar. Böylece DNA'da taşınan genetik bilgi her replikasyon olayı ile sürekli olarak aktarılmış olur (Harvey ve ark.,2014).

Hatalı DNA replikasyonu, genetik mutasyonların ortaya çıkmasına neden olduğu için DNA replikasyonu kesin olmalıdır. DNA replikasyonu sırasındaki hatalarla endojen olarak üretilen DNA hasarına sıklıkla replikasyon stresi denir ve özellikle replikasyon çatalının ilerlemesinin yavaş veya problemlili olduğu genomik bölgeleri etkiler, ancak DNA replikasyon stresinin neden olduğu DNA hasar kontrol noktasının aktivasyonu sonucu hücreler apoptoza yönlendirir. DNA hasarının hücre döngüsü sırasındaki kontrol noktalarında saptanması, apoptozu tetikleyerek hücrelerin malign dönüşümüne bariyer oluşturmaktadır. Nitekim DNA hasar kontrol noktalarına prekanseröz lezyonlarda sıklıkla rastlanmaktadır. Buna karşılık olarak DNA hasarı kontrol noktası ortadan kalktığında, replikasyon hatasına sahip hücreler mitozu ilerler



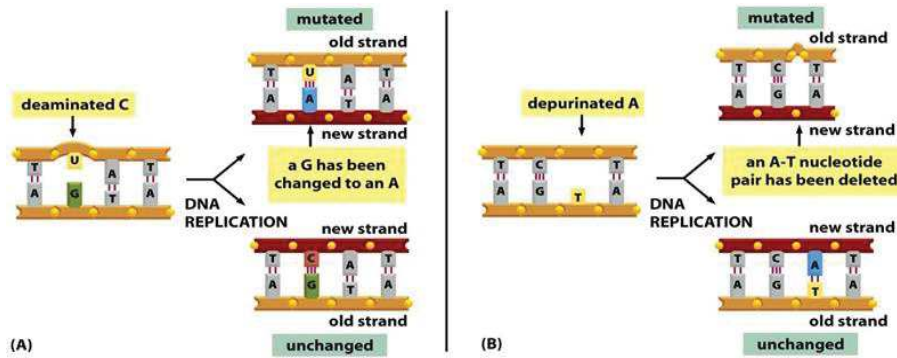
ve muhtemelen ultra ince köprülerin neden olduğu kromozomal anormalliklere neden olur. Bu hücreler malign ilerlemeye katkıda bulunan genomik dengesizliği gösterir (Mazouzi ve ark., 2014; Kitao ve ark., 2017).

### 2.3.1.2. DNA'da Bulunan Kararsızlıklar Sonucu Oluşan Hasarlar Bazların Deaminasyonu

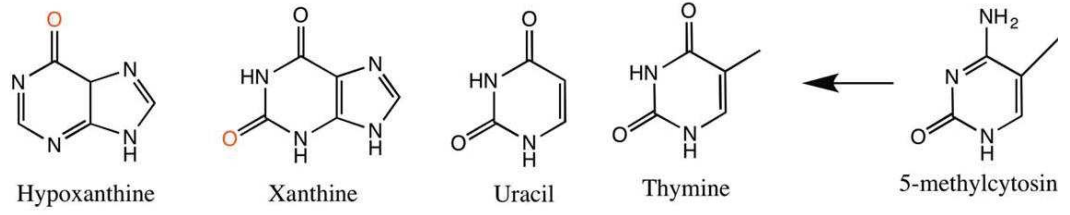
Bazlar genel olarak pürin ve pirimidin olarak ikiye ayrılırken; pürin bazlarından adenin (A) ve guanin (G), pirimidinlerden sitozin (S) hem DNA hem RNA yapısında yer alır. Pirimidinlerden timin (T) DNA yapısında bulunurken, RNA'da bunun yerine urasil (U) yer alır. DNA'nın çift sarmal yapısında birbirine antiparalel yönde uzanan iki uzun DNA zinciri bazlar arasında kurulan hidrojen (H) bağları ile bir arada tutulurken; A=T arasında iki, G≡S arasında üç H bağı oluşur (Çakır ve Paşaoğlu, 2017).

Deaminasyon; adenin ve sitozindeki bir amino grubunun keto grubuna dönüşmesidir. Sonuçta sitozin urasile ve adenin hipoksantine dönüştürülür ve replikasyon sırasında her iki molekülün de baz eşleşme özellikleri değişmiş olur. Deaminasyon spontan olarak ya da nitroz asit gibi kimyasal mutajenlerle muamele sonucu da oluşabilir (Klung ve Cummings, 2003).

Sitozin normal şartlar altında guanin ile eşleşir. Adeninle eşleşen urasile dönüştükten sonra, orijinal G≡S çifti A=U çiftine ve bir replikasyon döngüsünden sonra da bir A=T çiftine dönüşür. Adenin deamine edildiğinde, oluşan hipoksantin normalde sitozinle eşleştiğinden, orijinal bir A=T çifti bir G≡S çiftine dönüşür (Klung ve Cummings, 2003).





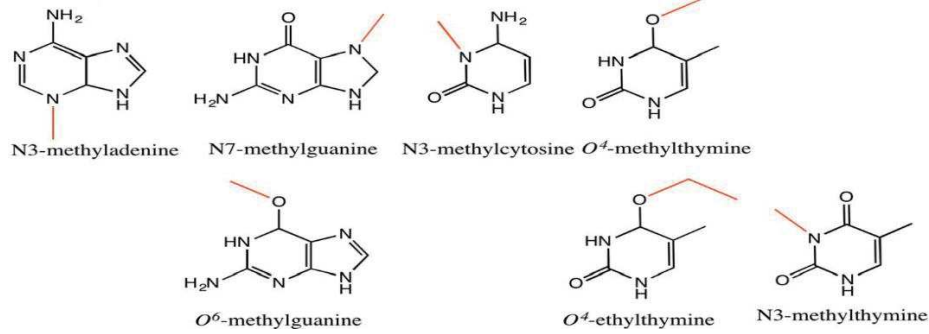


**Şekil 4.** Sitozin ve adenin deaminasyonu

### Metilasyon

DNA metilasyonu, pek çok tür için genomun yapısal bütünlüğüne ve uygun düzenlenmesine yardımcı olan önemli bir DNA modifikasyonu olarak kabul edilir. Sitozinin beşinci pozisyonunda (5mC) DNA metilasyonu, gen ekspresyonunun kontrolü yoluyla, memeli gelişimi, hücre kimliğinin farklılaşması ve korunmasında önemli rolleri olan stabil bir epigenetik işlemdir. Omurgalılarda tipik olarak CpG (C;sitozin-P;fosfat-G;Guanin) bölgelerine DNA metiltransferaz enzimi ile bir metil grubunun bağlanması neticesinde gerçekleşir. Metil grubu DNA'nın sitozin bazının pirimidin halkasının 5 numaralı karbonuna eklenir ve yalnızca G tarafından takip edilen S bazını etkiler. Neticede 5 metil sitozin oluşur ve burada metil vericisi olarak yine S-Adenozil Metiyonin görev yapar (İzmirli ve ark., 2012; Bewick ve ark., 2017;

Kim ve Costello, 2017).

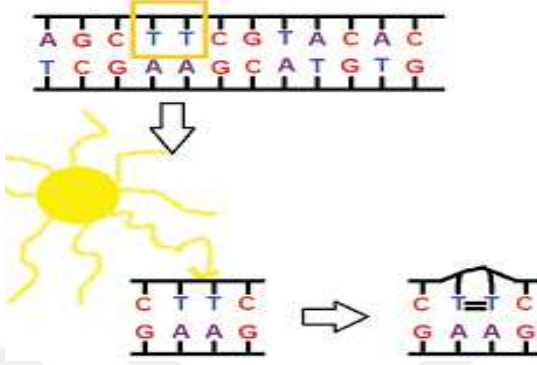


**Şekil 5.** Metilasyon sonucu bazı DNA bazları.

### Depürinasyon ve Depirimidinasyon

DNA yapısında bulunan pürin ve pirimidin bazların termal dayanıklılığına bağlı olarak hidrolitik baz kaybı olur ve sonuçta pürin veya pirimidinleri uzaklaştırılmış bölgeler oluşur. Baz kaybı replikasyonu etkileyebileceği gibi pürin veya pirimidinleri uzaklaştırılmış bölgede 3' fosfodiester bağının kolayca hidroliz olması sonucunda

zincir kırıkları da meydana gelir. Pirimidin nükleotidleri, pürin nükleotidlerinden daha karardır. Fakat inflamatuvar dokularda aşırı olarak üretilen NO, 5-metil sitozinin deaminasyonuna ve DNA zincir kırıklarına yol açtığı bildirilmiştir (Walker 1995; Dinçer ve Akçay, 2000).



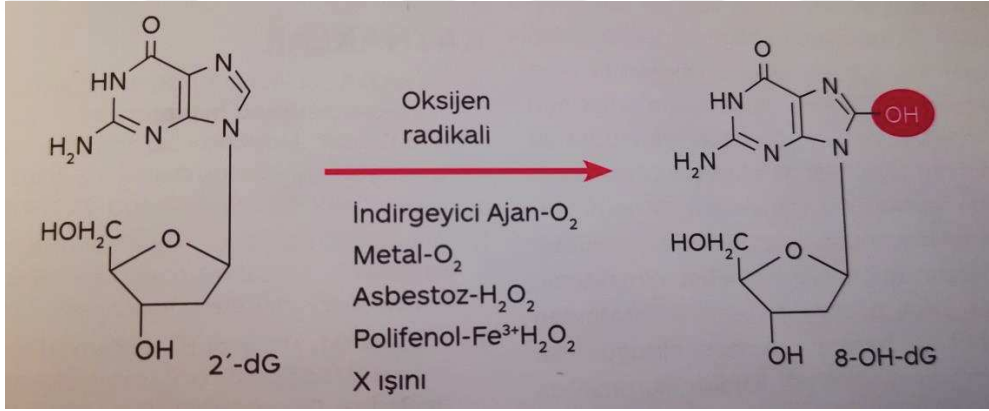
Şekil 6. Adenin depürinasyon.

### 2.3.1.3. Oksidatif Hasar

Endojen DNA hasarının büyük kısmı, sırasıyla hücrelerde doğal olarak bulunan su ve ROT hidrolitik ve oksidatif reaksiyonlarda bulunan kimyasal olarak aktif DNA'dan kaynaklanmaktadır. Oksidatif DNA hasarı, normal metabolizma sırasında bazı tepkime basamaklarında oluşan oksijen radikalleri tarafından endojen olarak oluşturulabildiği gibi iyonizan radyasyon ve çeşitli kimyasallar gibi ekzojen faktörler tarafından da meydana getirilmektedir. Vücutta doğal metabolik yollarla oluşan serbest radikaller normalde radikal parçalayan antioksidan sistemlerle ortadan kaldırılmaktadır. Ancak çeşitli sebeplerle ROT artması ve antioksidan mekanizmaların yetersiz kalması sonucu oksidatif stres adı verilen patolojik olay meydana gelir. Oksidatif stres, ROT üretimi ile hücresel antioksidan savunmaları arasındaki dengesizlikten kaynaklanır ve kanser dahil birçok insan hastalığının patogeneziye katkıda bulunur. Normal oksijen metabolizması, yangı, kirlilik, iyonlaştırıcı radyasyon ve ultraviyole ışık gibi çok sayıda çevresel etkiye maruz kalma hücre içinde fazla ROT oluşumuna neden olur. ROT, nükleik asit dahil olmak üzere hücresel bileşenlere zarar verir, böylece DNA bazlı lezyonları ve iplik kopmalarını indükler (Dinçer ve Kankaya, 2009; Çakır ve Paşaoğlu, 2017; Lee ve ark., 2017; Chatterje ve Walker, 2017).

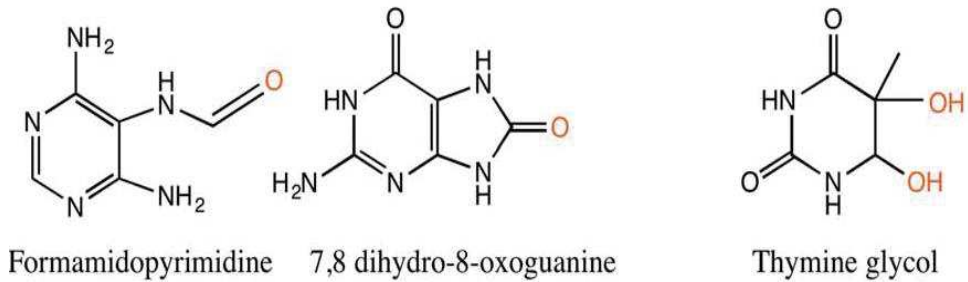
Oksidasyon, tanımlanmış 100'den fazla farklı okside lezyon ile en baskın DNA hasarı nedenidir. Guanin, DNA bileşenleri içerisinde en düşük iyonizasyon

potansiyeline sahip olan ve oksidasyona en yatkın olan bazdır.  $\text{Cu}^{+2}$  iyonları DNA’da G-C’den zengin bölgelerde yüksek oranda bulunduğu için oksidatif hasara en fazla maruz kalmasının sebebi de budur. OH’in, guanin molekülünde 8. karbon atomuna atakları sonucu oksidasyona yol açar. Değişikliğe uğrayan DNA’nın oksidatif hasarı sonucunda modifiye bir baz olan 8-OHdG (8-hidroksi-2’-deoksiguanozin) oluşur. Oksidatif DNA hasarının en duyarlı göstergesi 8-OHdG’dir. DNA replikasyonu sırasında G-C’den A-T’ye dönüşüme neden olarak mutasyona olan hassasiyeti artırır. En yaygın ölçülen baz hasarı 8-OHdG olup oksidatif DNA hasarının belirteci olarak kabul edilir (McDorman ve ark., 2005; Atmaca ve Aksoy, 2009; Çakır ve Paşaoğlu, 2017).



**Şekil 7.** Oksijen radikalleriyle 8-OHdG’nin oluşumu (Çakır ve Paşaoğlu, 2017).

Farklı bir oksidasyon (hidroksilasyon) ürünü olan timin glikol hücre içinde oluştuğundan 24 saat sonra kandan temizlenerek idrara geçer. İdrarda bulunan deoksitimin glikol diyet kaynaklı değildir. İdrar timin glikol düzeyi de oksidatif DNA hasarının göstergesi olarak değerlendirilir ( Dinçer ve Akçay, 2000).



**Şekil 8.** Oksidasyona uğramış bazı DNA bazları (Chatterjee ve Walker, 2017).

Kanser hücreleri, günde hücre başına 105 frekansta 8-oksoguanin biriktirir. Hasarlı DNA birikimini önlemek için hücrede spesifik lezyon tiplerini hedef alan çeşitli onarım yolları kullanılır. Bu nedenle, DNA onarımındaki bir eksiklik, bir mutator fenotipine ve genomik dengesizliğe yol açar (Alnajjar, 2019). Farklı radikal metabolitlerin DNA hasarına neden oluş mekanizmaları da farklıdır. Süperoksit anyonu ve dismutasyonu ile oluşan  $H_2O_2$  doğrudan DNA ile eşleşerek baz oksidasyonuna ve zincir kırıklarına yol açmaktadır. Geçiş metal iyonlarının varlığında Fenton reaksiyonu ile aktif bir serbest radikal olan OH radikali DNA hasarı oluşturmaktadır. Singlet oksijen, guanine spesifik olarak bağlanarak hasar meydana getirmektedir (Çakır ve Paşaoğlu, 2017; Alnajjar, 2019).

### **2.3.2. Çevresel Sorunlardan Kaynaklanan Hasarlar**

DNA hasarı normal DNA metabolizması sırasında spontan veya bazı çevresel faktörlerin etkisiyle oluşmaktadır. DNA hasarına yol açan çevresel faktörler, fiziksel ve kimyasal ajanlardır.

240-400 nm dalga boyunda olan UV ışınları DNA üzerinde belirli bir hasara neden olur. UV radyasyon ışınlarından UV-C ve UV-B ışınları, DNA ile şiddetle absorbe edilir. Nükleik asit bazlarının UV ışığı absorpsiyonu sonucu kimyasal değişiklikler meydana gelmektedir. Bir hücrenin UV ışınlarına maruz kalması, iki bitişik pirimidinin genellikle timinler olmak üzere kovalent olarak bağlanmasına neden olur ve bir dimer yapısı meydana gelir. Bu timin dimerleri, DNA polimerazın DNA zincirini, dimer oluşum bölgesinin ilerisine doğru replike etmesini engeller. DNA ile ve diğer moleküllerle girilen reaksiyonlar sonucu pirimidin dimerleri (T-T, T-C) oluştururlar. Sonuçta DNA replikasyon ve transkripsiyonu engellenmiş olur. UV radyasyon DNA-protein ve daha az olmak üzere DNA-DNA çapraz bağlarının oluşumuna da neden olur. Buna ek olarak UV'ye maruz kalan DNA'larda zincir kırıklarının meydana geldiği de bilinmektedir (Diñer ve Akçay, 2000, Lippincott, 2014, Çakır ve Paşaoğlu, 2017).

İyonize radyasyonun (IR) DNA üzerine etkisi doğrudan veya dolaylı yolla olabilir. Doğrudan etki radyasyon enerjisinin direk DNA ile etkileşimi sonucu oluşurken, dolaylı etki radyasyonla açığa çıkan enerji ile uyarılan moleküllerin DNA ile etkileşimi sonucu meydana gelir. IR etkisiyle, DNA'yı çevreleyen suyun O-H

bağlarının hidrolitik ayrılması sonucu oluşan OH radikali DNA ile etkileşir. IR veren gamma ışınları ve X ışınlarının, biyolojik moleküllerle reaksiyonu sonucu baz kaybı, baz hasarı ve zincir kırıkları oluşur. Tek veya çift zincir kırıkları, normal DNA metabolizmasında topoizomerazlar, nükleazlar, replikasyon çatalı, onarım işlemleri esnasında nadir görülürler. IR esnasında kromozom kayıplarıyla birlikte baz delesyonları görülür ve zincirler arası çapraz bağlar ve DNA-protein arası çapraz bağlar meydana gelir (Çakır ve Paşaoğlu, 2017). IR sonucu doymuş halkalı baz türevleri oluşur. Bunların en önemlileri timin glikol, metil tartranil üre, 5-OH hidantoin, 5-OH metil urasil, 8-OH guanin, 4,6 diamino 5-formamido pirimidindir (Dinçer ve Akçay, 2000; Çakır ve Paşaoğlu, 2017).

Günümüzde yaygın klinik kullanımı olan alkilasyon ajanları (örn. Metilasyon ajanları, kloroetilasyon ajanları) DNA, RNA ve protein gibi hücrel moleküllere alkil grupları transfer ederek biyolojik etkilerini ortaya koymaktadırlar. Bu ajanlar; DNA omurgası içindeki fosfodiester gruplarının oksijeni ile birlikte, nükleik asitlerin nitrojen ve oksijeni içeren nükleofilik bölgeleriyle reaksiyona girerler. Metilasyon ve kloroetilasyon ajanlarının her ikisi de bir unimoleküler nükleofilik substitüsyon reaksiyonu (NS1 reaksiyonu) aracılığıyla hücrel makromoleküllere zarar verir ve bu nedenden dolayı DNA'daki oksijen atomlarına doğru güçlü bir elektrofilik afiniteye sahiptirler. DNA'daki nükleotidlere alkilleyici ajanların bağlanmasıyla DNA'nın yapısı ve işlevi bozulur. Bu alkilleyici ajanlardan ikisi olan metilasyon ve kloroetilasyon ajanlarının kimyasal bir reaksiyon ile DNA'daki oksijen atomlarına bağlanırlar. Bu bağlanma nükleotidin pek çok pozisyonunda gerçekleşmekle birlikte en mutajenik lezyona sebep olan pozisyon, guanin bazının O6 pozisyonudur. Alkilleyici ajanların guanin bazının O6 pozisyonuna bağlanmasıyla oluşan O6-MeG eklentisi eğer tamir edilmezse hücrenin ilk replikasyonu sonucunda alkillenmiş guanin bazının karşısına tamamlayıcı baz olarak timin geçmesine neden olur. Sisplatin ve alkilleyici ajanlar gibi kemoterapötik ilaçlar DNA'da çift zincir kırıklarına ve zincir içi çapraz bağların oluşumuna neden olmaktadır (Müftüoğlu, 2003; Kurtoğlu ve Tekedereli, 2015; Şen ve ark., 2017).

Ozonun vücuda verilmesi ile oluşan reaksiyonlardan veya oksijenli bimoleküllerden kaynaklanan serbest radikaller ozonun etkilerine aracılık edebilir. Ozon gazı kanla temas etmesinden hemen sonra plazmada erir ve kan hücrelerinin

zarlarındaki doymamış yağ asitleri ile reaksiyona girip onları oksitlerken aynı zamanda da en fazla H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> olmak üzere birçok ROT meydana gelir. Temel ROT molekülü, çeşitli biyolojik ve terapötik etkilerin ortaya çıkmasından sorumlu olan bir ozon habercisi olarak görev yapabilen, radikal olmayan oksidan hidrojen peroksittir. ROT'lar, fizyolojik miktarlarda, sinyal iletiminin düzenleyicileri olarak görev yaparlar, savunma ve bağışıklık yanıtlarının önemli araçlarıdır. ROT plazmada çok hızlı bir şekilde oluşur ve ortamdaki antioksidan kapasite % 5 ila 25 kadar azalır. Ancak bu etki geçicidir ve 15-20 dakika içerisinde bir toparlanma olur. Bu sırada bir miktar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hücre içine girmiş ve birçok metabolik reaksiyonu uyarmaya başlamıştır. Hücre içine giren H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> antioksidanlar tarafından nötralize edilir (Bocci, 2006a; Babuçu, 2011).

ROT'un RA dahil birçok hastalığın patofizyolojisine dahil olduğunu gösterilmiştir. Bunlar eklem dokularında lipidlere, proteinlere ve DNA'ya zarar verme potansiyeline sahip yüksek oranda reaktif kimyasal türlerdir. Normal koşullar altında ROS üretimi, vücutta bulunan çeşitli antioksidan savunma sistemi tarafından kontrol edilir. Enzimatik olmayan antioksidan savunma, A ve C vitaminlerini, düşük GSH içerirken, enzimatik antioksidan, SOD, CAT, GPx, glutatyon redüktaz (GR) ve glutathione-S-transferaz (GST) içerir. Artan kimyasal reaksiyon veya yetersiz antioksidan savunma sistemi nedeniyle oksidanlar ve antioksidanlar arasındaki dengesizlik oksidatif strese neden olur. Bu ROT uygun şekilde vücuttan uzaklaştırılmazsa biyolojik makromoleküllerde hasar meydana getirebilir (Mateen ve ark., 2016).

Oksidatif hasara en duyarlı yapılar lipit membranlar olmakla birlikte, biyolojik yapıların çoğu özellikle DNA oksidatif strese bağlı hasar oluşumuna yatkındır. Ozon kararsız yapıda bir gazdır ve oldukça yüksek oksitleme gücüne sahiptir. Hızla oksijen molekülüne ve atomuna ayrılmaktadır. Ozon yukarıda bahsedilen antioksidanlarca etkisizleştirilse de bir kısmı plazmada bulunan PUFA ile etkileşime girerek LOP'lar ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'i meydana getirir. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, radikal olmamakla birlikte oksidan olan veya kolaylıkla oksidan moleküle dönüşebilen bir yapıdadır ve birçok oksidanın aksine hücre membranından kolaylıkla geçer ve burada metal iyonlarıyla etkileşime girerek (fenton reaksiyonunda olduğu gibi) oluşturduğu OH' radikali, DNA'da bulunan guaninin bazının 4, 5 ve 8. karbonu ile reaksiyona girebilmektedir. 8. karbonuna bağlanmak ve



bazı okside etmek suretiyle guanini 8-hidroksideoguanozin'e (8-OHdG) dönüştürür. Bu dönüşüm normal şartlarda DNA onarım mekanizmalarınca algılanır ve bu modifiye baz replikasyon öncesinde DNA'dan uzaklaştırılır. Meydana gelen metabolit 8-OHdG şeklinde dolaşıma verilir. Eğer modifikasyona uğrayan baz DNA yapısından uzaklaştırılmazsa replikasyon sonucu G-C eşleşmesi yerini A-T eşleşmesine bırakarak kalıcı mutasyon meydana getirir. Bu ozonun DNA da oluşturduğu hasarlardan yalnızca biri olup buna ek olarak farklı mekanizmalar aracılığıyla DNA'da tek ve çift zincir kırıklarına, DNA-protein çarpaz bağlanmalarına, abazik bölgeler oluşumuna ve DNA yapısında bulunan şekerin modifikasyonuna neden olabilir. Ozonun DNA meydana getirdiği bahsedilen hasarlar RA'da görülmektedir. Literatürde de belirtilen pek çok çalışmada RA'lı hastalarda oksidatif stresin ve oksidatif stres kaynaklı DNA hasarının artabildiği, hastaların antioksidan düzeylerinin azalabildiği ve hastalığın kanser riskinde artışa neden olabildiği bilinmektedir.

#### **2.4. DNA Onarımı ve Önemi**

Genetik bilginin nesilden nesile sağlıklı olarak aktarılabilmesi için DNA yapısının korunması son derece önemlidir. Genomik DNA'nın bütünlüğü, farklı DNA hasarlarına neden olan ultraviyole, X-ışınları, kimyasal bileşikler gibi çevresel ajanlar ile sürekli tehdit altındadır. DNA'nın fonksiyonu bazlar üzerindeki polar gruplara bağlıdır. Bu gruplar arasında spesifik olarak oluşan hidrojen bağları çift sarmal DNA'yı oluştururlar. DNA bazlarının polar gruplarında oluşan kimyasal değişiklikler replikasyon sırasında yanlış eşleşmeye ve sonuçta mutasyona neden olur. Deoksiriboz fosfat iskeletinde meydana gelen kopmalar ise replikasyonu bloke etmenin yanı sıra aşırı miktarlarda oluştuğunda hücre ölümüne yol açmaktadır (Müftüoğlu, 2003; Dinçer ve Kankaya, 2009).

Her bir insan hücresinin DNA'sında günde yaklaşık olarak  $10^4$  adet kodlanmayan veya yanlış kodlamaya neden olan hasar meydana gelmektedir. DNA üzerinde oluşan hasarları onaran spesifik onarım sistemleri mevcuttur. DNA onarım kapasitesini aşan düzeyde hasar oluştuğunda veya DNA onarım sistemleri kalıtsal ya da edinsel olarak defektif ise DNA hasarı kısa dönemde deoksiribonükleotid trifosfat havuzunun miktar ve bileşiminde değişikliklere, replikasyonun durmasına, transkripsiyon ve protein sentezinin inhibisyonuna, proteolitik aktivitenin indüksiyonuna; uzun vadede ise mutasyona ve kromozom anomalilerine sebep olmaktadır. DNA hasarı düşük

seviyede ise DNA onarım mekanizmaları tarafından verimli bir şekilde onarılır. Ağır hasarlar apoptotik mekanizmaları uyararak hücre ölümüne sebep olur. Orta dereceli hasarlar çoğunlukla mutasyonla sonuçlanırlar.

DNA onarım sistemlerinin insanlar için en önemli rolü ise genetik hastalıklara ve kansere yol açan genetik hasara karşı koyma potansiyelidir (Dinçer ve Kankaya, 2009; Şen ve ark., 2017).

Hücreler genomik bütünlüğü korumak amacıyla içi içe geçmiş, karmaşık, bir dizi DNA onarım mekanizmalarına sahiptirler. DNA onarımı nükleazlar, helikazlar, polimerazlar, topoizomerazlar, rekombinazlar, ligazlar, glikozilazlar, demetilazlar, kinazlar ve fosfatazların kimyasal olarak modifiye edilmiş enzimatik aktivitelerine göre gerçekleştirilmektedir. Hücre içinde; DNA onarım yolları beş kategoriye ayrılabilir: doğrudan onarım, baz eksizyon onarımı, nükleotit eksizyon onarımı, çift sarmal kopma onarımı ve ara parçalar arası çapraz bağların onarımı. (Sancar ve ark., 2004; Kulaksız ve Sancar, 2007; Kurtoğlu ve Tekedereli, 2015).

#### **2.4.1. DNA'nın Doğrudan Onarımı**

Organizmaların çoğunda iki doğrudan onarım mekanizması vardır: UV ile indüklenen pirimidinin foto-geri dönüşümü, DNA fotolizasyonu ile azalır ve O6-metil grubunun, metilguanin DNA metil transferazı ile DNA'da O6-metilguaninden çıkarılmasıdır. Fotolizasyon, onarım sistemi bakterilerde, mantarlarda, bitkilerde ve çoğu omurgalıda bulunmasına karşın, insan dahil pek çok ökaryotik türde olmamasından dolayı evrensel bir onarım sistemi değildir, metilguanin DNA metiltransferaz doğada neredeyse evrensel bir dağılıma sahiptir (Sancar ve ark., 2004; Kurtoğlu ve Tekedereli, 2015).

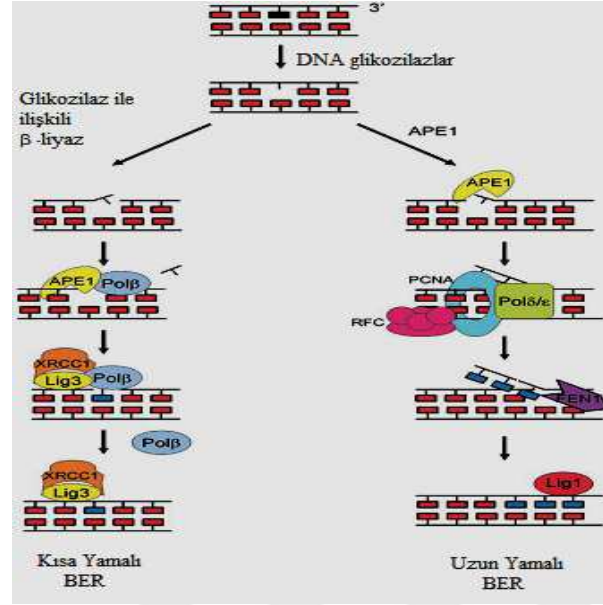
#### **2.4.2 Baz Onarımı Reaksiyonu**

Alkilasyonun, deaminasyonun, oksidasyonun ve DNA replikasyon hatalarının neden olduğu küçük DNA modifikasyonları önemli DNA tamir süreçlerinden birisi olan BER ile tamir edilmektedir. BER yolağı, küçük sarmal bozulmalarına neden olan endojen DNA lezyonlarının çıkarılmasında ana mekanizmadır. BER, bakterilerden insanlara gelişim sırasında büyük ölçüde korunmaktadır. DNA'da bir abazik (AP) bölgesi oluşturmak için hedef bazı serbest bırakan bir DNA glikozilaz ile başlatılır. AP bölgeleri ayrıca doğrudan hasarlı bir ürün olabilir. Oksitlenmiş/indirgenmiş



bazları, alkillenmiş (genellikle metile edilmiş) bazları, deaminlenmiş bazları (örneğin, urasil, ksantin) veya baz uyumsuzluklarını tanıyan DNA glikozilazları vardır. DNA glikozilazları, sadece DNA lezyonunu gideren tek işlevlidir veya ilişkili bir AP-liyaz aktivitesine sahiptir (Slupphaug ve ark., 2003; Sancar ve ark., 2004; Dizdaroğlu, 2015; Kurtoğlu ve Tekedereli, 2015).

BER'de, kısa yamalı (short-patch) BER (SP-BER) ve uzun-yamalı (long-patch) BER (LP-BER) olmak üzere iki ayrı alt yolak bulunur. Kısa yolakta tek nükleotid değişimi gerçekleşirken, uzun yolakta 2-8 arası nükleotidin kesip-çıkarılması gerçekleşir. Her ikisinde de ilk basamakta tamir, hataya spesifik tek fonksiyonlu (urasil-DNA glikozilaz ve N-metilpürin-DNA glikozilaz gibi) ya da birden fazla fonksiyona sahip DNA glikozilazlar (8-oksoguanin DNA glikozilaz vs) tarafından başlatılır ve bu enzimler AP bölgesi oluşturmak ve bazı serbest bırakmak için modifiye baz ve şeker arasındaki N-glikozidik bağın hidrolize edilmesini katalizler. AP bölge, radyasyon ve kimyasallar tarafından da spontan olarak da oluşabilmektedir. Sonrasında ise LP-BER'de APE1 endonükleaz veya SP-BER'de ise glikozilaz ile bağlantılı  $\beta$ -liyaz tarafından bu bölgede bir çentik oluşturularak AP bölgesine komşu bir 3'-OH ucu sunulmaktadır. Oluşturulan boşluklar, SP-BER yolağında DNA polimeraz  $\beta$  tarafından, LP-BER alt yolağında Pol  $\beta$ , Pol  $\epsilon$  veya Pol  $\delta$  tarafından doldurulur. Ligasyon işlemi, kısa yamalı BER alt yolağında XRCC1 ve Ligaz III kompleksi tarafından gerçekleştirilirken, uzun yamalı BER alt yolağında Ligaz I tarafından gerçekleştirilir (Slupphaug ve ark., 2003; Sancar ve ark., 2004; Kurtoğlu ve Tekedereli, 2015).



**Şekil 9.** Uzun ve kısa yamalı BER mekanizmaları (Kurtoğlu ve Tekedereli, 2015).

### 2.4.3. Nükleotid Eksizyon Onarım Mekanizması (NER)

Nükleotid eksizyon onarım (NER) mekanizması UV ışığın neden olduğu deri kanserinden sorumlu, DNA hasarlarının onarımını sağlayan en önemli mekanizmadır ve prokaryotlardan yüksek ökaryotlara kadar korunur. NER sisteminin en önemli özelliği, geniş substrat özelliğidir: NER, çift zincir DNA'nın normal heliks yapısını bozan, UV kaynaklı pirimidin dimerleri veya çoğunlukla mutajenik kimyasalların ve kemoterapötik ajanların oluşturduğu DNA lezyonlarını eksize edebilir (Sancar ve ark., 2007; Morita ve ark., 2010; Kurtoğlu ve Tekedereli 2015).

Eksizyon onarım mekanizması genel olarak sırasıyla; hasarın tanınması, çift yönlü kesme (dual insizyon), hasarı içeren oligonükleotid parçanın kesip çıkartılarak (eksizyon) uzaklaştırılması, tamir bölgesinde oluşan boşluğun DNA polimeraz tarafından doldurulması, ve son olarak oluşan çentiğin ligasyonu ile DNA çift zincirinin bütünlüğünün tamamlanması basamaklarından oluşmaktadır. Bu basamaklar arasında hasarın tanınması basamağı en önemli basamağı olarak görülmektedir (Sancar ve ark., 2007).

### 2.4.4. Çift Zincir Kırıklarının Onarımı (Rekombinasyon Onarım)

DNA çift sarmal kırılmaları (DSB'ler), DNA'da genetik bilgi kaybına ve kromozomal kararsızlıklara neden olan en önemli lezyonlardır. DSB'lere iyonlaştırıcı radyasyon, ROT, nükleaz fonksiyon bozukluğu veya replikasyon çatalının çökmesi

neden olabilir. Tamir edilemeyen çift zincir kırıkları hücre ölümüne neden olduğundan dolayı çift zincir kırıklarının tamiri önemlidir (Slupphaug ve ark., 2003; Morita ve ark., 2010).

DSB'lerin onarımı iki majör mekanizma ile sağlanmaktadır; homolog rekombinasyon (HR) ve homolog olmayan uç birleştirme (NHEJ)'dir. HR, doğru yoldur ve hasar görmemiş homolog DNA'yı onarım için bir şablon olarak kullanır. Homolog olmayan uç birleştirme, iki DSB ucunu doğrudan birbirine bağlar ve verimli olmasına rağmen, ligasyon bölgelerinde genetik bilgi kaybına eğilimlidir (Morita ve ark., 2010). HR, kopma onarımı, DNA replikasyonunu takiben, genellikle kardeş kromatitlerden, sağlam bir homolog sekans ile yönlendirilir. HR, bölünen hücrelerde, hücre döngüsünün S, G2/M fazlarında gerçekleşmekte ve replikasyon çatalının korunması, telomer bakımı ve mayoz I'de kromozom dağılımının korunmasında

önemli yere sahiptir. NHEJ, bu hücre döngüsü boyunca oluşabilir; ancak, en çok G1'de aktiftir. NHEJ, çift zincir kırık uçları modifiye ederek birbirine bağlar fakat bu tamir sistemi ile hasarlanmamış DNA kalıbına ihtiyaç duyulmaksızın hataya meyilli olarak, birkaç nükleotid kaybı ile DNA onarımı gerçekleşir (Hakem, 2008; Morita ve ark., 2010).

#### **2.4.5 Yanlış Eşleşme Onarımı (MMR)**

Yanlış eşleşme onarımı (mismatch repair (MMR)), DNA replikasyonu ve rekombinasyonu sırasında ortaya çıkan baz-baz uyumsuzluklarını ve ekleme-silme döngülerini (IDLs) ortadan kaldıran ve *E.coli*'den insanlara kadar oldukça korunan bir onarım mekanizmasıdır. MMR sistemi, küçük tek zincir DNA halkalarının ve yanlış eşleşmenin replikasyon sonrası tamirinden sorumludur (Onur ve ark., 2009; Şen ve ark., 2017).

Ökaryotlardaki bilinen sekiz MSH (MutS homolog) polipeptidinden insanlar, baz uyuşmazlıklarını ve bir ila iki nükleotit IDL'yi, MutSb heterodimerini (MSH2 / MSH3) ve büyük IDL'leri tanımak için MutSa heterodimerini (MSH2 / MSH6) kullanırlar; Kanonik insan MMR yolu MutS ve MutL olarak adlandırılan iki büyük protein kompleksi tarafından yürütülür. MutS uyuşmazlığın tanımlanmasından sorumlu iken MutL hatanın giderilmesini sağlar. *E. Coli* DNA'sında, (5') GATC dizisindeki adeninler özel bir metilaz olan "Dam Metilaz" tarafından metillenmiştir. Ancak, yeni sentezlenen zincir birkaç dakikalık bir gecikme ile metillenir ve bu zaman sürecinde

yeni zincirdeki hatalı eşleşen bazlar mutS tarafından tanınır. Sırayla mutL ve mutH bir kompleks oluşturmak üzere sisteme katılırlar ve DNA boyunca çift yönlü olarak metillenmemiş bir GATC buluncaya kadar hareket ederler. MutH'deki endonükleaz fonksiyonu metil grubunun karşısında metillenmemiş zincire bir çentik atmak üzere aktive olur. Metillenmemiş zincir, ekzonükleaz I, SSB ve uvrD helikaz'ın birlikte hareketi ile uzaklaştırılır. DNA polimeraz III doğru DNA zincirini tekrar oluşturur ve ligasyon ile onarım sona erer (Debeleç-Bütüner ve Kantarcı, 2006, Şen ve ark., 2017; Chatterje ve Walker, 2017).

Kromatin modifikasyonlarının yakın zamanda MMR proteinlerinin DNA lezyonuna erişme ve onarımı başlatma yolunu açtığı gösterilmiştir (Şen ve ark., 2017, Chatterje ve Walker, 2017).

#### **2.4.6. SOS Onarımı**

SOS onarımı UV'ye maruz kalmanın neden olduğu hücrel stres tepkisini tanımlamak için kullanılmıştır. Bu onarımda LexA represör proteininin düzenlediği 40'tan fazla gen SOS regülasyonunun bir parçası olarak DNA hasarına yanıt olarak indüklenir. DNA'daki hasar tam olarak onarılamadıysa ya da diğer onarım mekanizmaları işe yaramadıysa SOS yanıtı oluşur.

DNA onarım genleri ile LexA'nın erken indüksiyonu hasar onarıldıktan sonra SOS genlerinin hızla bastırılmasını sağlayan bir düzenleme mekanizması da içerir. Bu onarımda diğer onarımlardan farklı olarak DNA'da ligasyonu gerektirecek bir boşluk oluşturulmaz ve hataya rağmen DNA polimerazın replikasyon işlemine devam etmesi sağlanır (Şen ve ark., 2017).

#### **2.4.7. Çapraz Bağların Onarımı**

Zincirler arası çapraz bağlar (ICL'ler), DNA sarmalının her iki şeridini kovalent olarak bağlayarak, iplikçiklerin ayrılmasını ve dolayısıyla transkripsiyon ve replikasyonları önler. Bu modifikasyon hücrel DNA onarımı sistemlerine benzersiz bir zorluk teşkil etmektedir, çünkü hasar görmemiş bir şablon onarım sentezi sırasında hali hazırda temin edilememektedir. Onarılmamışsa, ICL'ler DNA replikasyonunu ve transkripsiyonunu bloke eder (Sancar ve ark., 2004; Smeaton ve ark., 2008).

## 2.5. DNA Hasarı Tespit Yöntemleri

DNA molekülünün hasar görmesi, kopmalar, baz değişimleri veya ekler ve çapraz bağlar şeklinde, hücrelerin genotoksinlere maruz kalmasının sonucudur ve bu nedenle bireylerde ölçümü hasar belirteci olarak kullanılmaktadır. Genotoksisite, fiziksel ya da kimyasal ajanlarla genetik materyalde oluşan hasardır. Bu hasarlar; tek zincir kırıkları (SSB), çift zincir kırıkları (DSB), alkali labil bölgeler (ALS) ve DNA ürünleridir. Genetik materyalde oluşan hasarlar tamir edilemediğinde DNA sekans değişiklikleri, kromozom aberasyonları ile sonuçlanabilen tek veya birden fazla nükleotid değişiklikleri ve bunların sonucu olarak da rekombinasyon, mutasyon, doku hasarı, yaşlanma, kanser oluşabilmektedir. Mutasyonlar sıklıkla gen fonksiyonlarında değişiklik ya da kayıpla sonuçlanabilmektedir (Bedir ve ark., 2004; Azqueta ve ark., 2017).

Çeşitli DNA lezyonlarının ölçümünde birtakım analitik teknikler; immunokimyasal teknikler, kapiller elektroforez, tek hücre jel elektroforezi (Comet testi), <sup>32</sup>P post labeling ölçüm teknikleri, alkalın elusyon testi ve kromatografik teknikler (HPLC-ECD, GC-MS, LC-MS, LC-MS-MS) kullanılmaktadır. Genel olarak kütle spektrometrenin (MS) kullanılmadığı teknikler hasar sonucu şekillenen 20'den fazla lezyonlu DNA ürünleri arasında sadece birini (8-OHdG) ölçebilirler ve bu molekülün kimyasal yapısı ve iyon değerleriyle ilgili bilgiler sağlanamaz (Atmaca ve Aksoy, 2009; Dizdaroğlu ve ark., 2015).

En yaygın kullanılan teknik, DNA'nın nükleozidlere enzimatik hidrolizinin ardından 8-OHdG formunu ölçen yüksek basınçlı sıvı kromatografisi - elektrokimyasal detektör (HPLC-ECD) olmuştur; DNA'daki enzim hidrolizini takiben oluşan 8-OHGua ve 8-OHdG nükleozidlerini ölçer. Bu metod ile 8-OHdG 20 fmol (femtomol)'e kadar ölçülebilmektedir. Çalışmaların bu nükleozidlerin ölçümü üzerinde yoğunlaşmasının nedeni ise mutajenik özelliklerinin olduğunun bilinmesidir. Ölçümlerde yanlış bir sonuca gitmemek için sadece 8-OHdG değil bu iki ürünün miktarlarının birlikte değerlendirilmesi gerekmektedir (Atmaca ve Aksoy, 2009; Dizdaroğlu ve ark., 2015).

Floresan in situ hibridizasyon (FISH) ve kromozomal anomalileri saptamak ve sorgulamak için sitogenetik ve DNA bazlı yöntemlerin bir kombinasyonunu kullanan karşılaştırmalı genomik hibridizasyon (CGH) gibi erken moleküler sitogenetik

teknolojileri ortaya çıkmıştır. Bu metotlar, G-bantlı kromozomların mikroskop analizi ile tespit edilemeyen dengesizlikleri belirleme yeteneklerinden dolayı Giemsa bantlama (G-bantlama) üzerinde ya dengesizlikler çok küçük olduğundan ya da sadece bantlama modellerine dayanarak fark edilemediklerinden bir avantaja sahiptir. FISH ve erken kromozomal CGH yöntemlerinin her ikisi de, bir DNA ve metafaz kromozomlarının bir kombinasyonunun kullanımına dayandırılmıştır (Martin ve Warburton, 2015).

Mikronükleus (MN)'lar hücrenin mitoz bölünmesi sırasında ortaya çıkan, esas çekirdeğe dahil olmayan, tam kromozom veya asentrik kromozom fragmanlarından köken alan oluşumlar olarak tanımlanmaktadır. Yaygın olarak in vitro ve in vivo genotoksisite araştırmaları için kabul edilen MN testi, genomik hasarın hassas bir markerini sağlar. İn vivo mikronükleus tahlili, diğer genotoksisite tahlilleri gibi sınırlamalara sahiptir, yani tahlil, farklı etki tarzlarına sahip tüm genotoksik kimyasalları tespit edememektedir. Bununla birlikte, mikronükleus deneyi, aynı zamanda risk değerlendirmesi için, mutajenitenin iki ana uç noktasından biri olan kromozomal anormalliklerin indüklenmesini değerlendirmek için en güvenilir in vivo deney olarak en yaygın şekilde kullanılmaktadır. Ayrıca sitogenetik harabiyetin tespitinde, kromozom analizine göre kolay uygulanabilmesi, daha fazla sayıda hücre sayılması ve istatistiksel yönden daha anlamlı sonuçlar elde edilmesi gibi avantajları sayesinde yaygın kullanım alanı bulan bir tekniktir (Şekeroğlu ve Atlı-Şekeroğlu, 2011; Karaman ve ark., 2011; Hayashi, 2016).

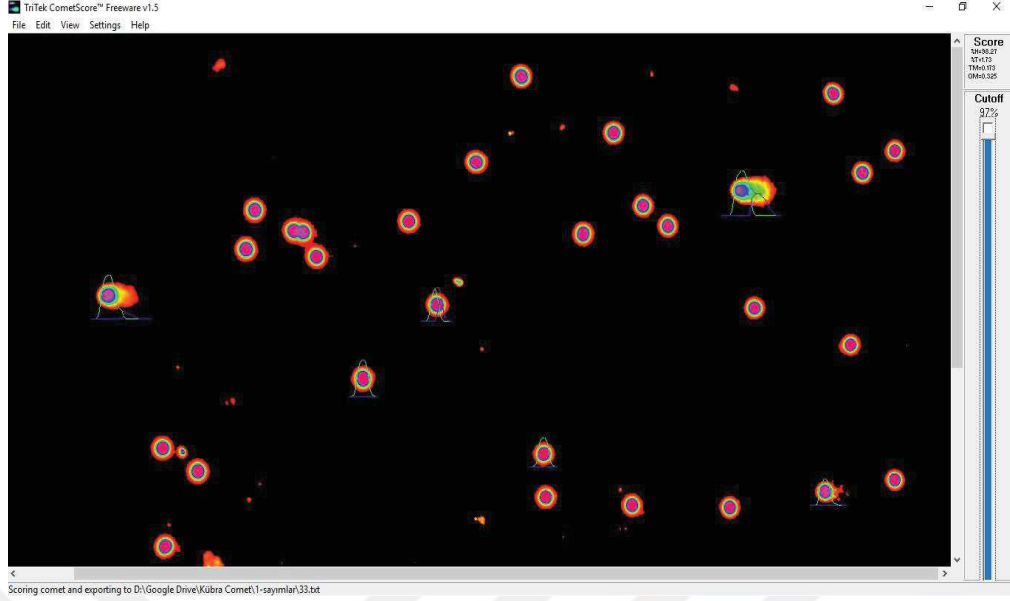
“Tek hücreli jel elektroforez testi” (SCGE) olarak da bilinen alkali komet yöntemi, Singh ve ark., tarafından, tek hücre düzeyinde DNA hasarını tespit etmek veya tek bir hücrede tamir etmek için kullanılan alkali şartlar (pH>13) altında elektroforezi içeren mikrojel tekniği kullanılarak uygulanmıştır. Diğer genotoksisite tayin yöntemleri ile karşılaştırıldığında; düşük düzeylerde DNA hasarlarının saptanabilmesindeki yüksek sensitivitesi, tek hücre düzeyinde çalışılabilir olması, kısa sürede ve kolay uygulanabilirliği ve düşük maliyeti bu yöntemin avantajlarından. Bu nedenlerden dolayı, alkali komet yöntemi, fiziksel ve kimyasal ajanların neden olduğu DNA hasarını çevresel izleme ve tıbbi araştırmalar dahil olmak üzere birçok çalışmada değerlendirmek için kullanılmıştır (Bedir ve ark., 2004; Karaman ve ark., 2011; Majtnerova ve Rousar, 2018).



Alkali komet yönteminin ana avantajı, DNA şeridinin kopması ve bazı baz modifikasyonlarını hücrelerin radyoaktif etiketlenmesi yerine boyalar kullanılarak ölçülebilmesidir. Bu yöntem, nükleoidler (süper sargılı hücresel genomik DNA) gerektirir, ancak proliferatif (çoğalan) hücreleri değil ve bu nedenle test, farklılaşmış hücreler de dahil olmak üzere tek hücreli bir süspansiyonun elde edilebildiği herhangi bir hücre çizgisine veya dokuya uygulanabilir. Çok çeşitli *in vivo*, *in vitro* ve *ex vivo* uygulamalarda kullanılabilir (Koppen ve ark., 2017).

Alkali komet yönteminin prosedürü sırasıyla; analiz edilen hücrelerin bir mikroskop lamı üzerine sabitlenmesi, hücre lizisi ve doğrudan elektrik akımında agaroz jel elektroforezi içerir. Son olarak da DNA lekeli ve görsellerinin gözlenmesidir. DNA iplik kopmaları varsa, alkali komet jelde gözlenir. Jel elektroforez ve floresan mikroskopisini birleştiren deney, hücrelerin bir cam slayt veya plastik film üzerine ince bir agaroz tabakasına gömülür ve daha sonra deterjan ve 2.5 M NaCl içeren bir çözelti içinde çözülür. Bir sonraki adımda, immobilize edilmiş hücreler, lizis işlemine duyarlı kalan bazı nükleer proteinlere bağlı DNA'dan oluşan sözde nükleotitleri üretmek için deterjanlar ve yüksek iyonik mukavemet ile parçalanır. Slaytlar daha sonra elektroforez işleminden geçirilir: elektrik alanı altında DNA, nükleotitten anot içerisine göç eder ve bir floresan boya ile boyandıktan sonra kuyruklu yıldız kuyruğuna benzeyen bir elektroforetik iz oluşturur (Dusinska ve Collins, 2008; Afanasieva ve Sivolob, 2018; Majtnerova ve Rousar, 2018).

Alkali kometler görsel analizde, kuyruklu yıldızlar kuyruk şekli ve büyüklüğüne göre sınıf 0, 1, 2, 3 veya 4 olarak sınıflandırılır ve 100 kuyruklu yıldız için toplam puan hesaplanır. Bilgisayarlı görüntü analizinde ise Programlar comet başını kuyruktan ayırt edebilecek ve kuyruk uzunluğu, baş ve kuyruktaki floresan yüzdesi, kuyruk momenti gibi çeşitli parametreleri belirleyebilecek şekilde tasarlanmıştır. Kuyruktaki % DNA floresanı, DNA zincir kırığı sıklığı ile doğru orantılıdır. Kuyruk momenti kuyruk uzunluğu ve göreceli kuyruk yoğunluğunu içeren formüllerle hesaplanan bir parametredir (Dinçer ve Kankaya, 2009; Koppen ve ark., 2017).



**Resim 2.** Ozon+Artrit grubundan bir deneğin mononükleer hücrelerin alkali komet yöntemi jel görüntüsü.

Lenfositlerdeki DNA hasarının ölçülmesi, bireyin kanser ve diğer kronik hastalıklar riskini değerlendirmenin bir yolu olabilir. (Collins ve ark., 2014).

Romatoid artrit, eklemlerde ve diğer organlarda, özellikle sinoviyal membranlarda ve eklem yapılarında kronik inflamasyona neden olabilen otoimmün bir hastalıktır. Etiyolojisinin bilinmemesi ve henüz kesin bir tedavi yönteminin bulunmaması, var olan tedavilerin ise her hasta için ulaşılabilir olmaması ve beklenen iyileşmeyi göstermemesi sebebiyle bu patolojiyle karşı karşıya kalan hastalar alternatif bir tedavi yöntemi arama eğilimdedirler. Günümüzde oldukça yaygın bir şekilde kullanılmaya başlanan O<sub>3</sub> uygulaması, vücuttaki etkileri henüz kesin olarak bilinmemesi ve güvenilirliği kanıtlanmamış olmasına rağmen RA'de hastalara bir tamamlayıcı tedavi olanağı sunmaktadır. Ozon yüksek oksitleme gücüne sahip bir oksidandır ve ozon terapisinin temeli ozonun bu özelliğine dayandırılmaktadır. Ancak ozonun güçlü bir oksidan olduğu ve oluşturduğu lipid peroksidasyon ürünleri ile hidrojen peroksitin DNA hasarına yol açabileceği göz ardı edilmemelidir. Romatoid artritli hastalarda oksidatif stresin ve oksidatif stres kaynaklı DNA hasarının artabildiği, hastaların antioksidan düzeylerinin azalabildiği ve hastalığın kanser riskinde artışa neden olabildiği bilinmektedir. Bunun yanında RA'nın antioksidan/oksidan dengenin bozulmasıyla oluştuğu kabul edilirse de ozon



uygulamasının antioksidan kapasiteyi artırdığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Yüksel, 2017).

Yapılan bu çalışmanın amacı CFA ile oluşturulan RA'lı sıçan modelinde, günümüzde yaygın bir şekilde kullanılmaya başlanan tamamlayıcı tedavi yöntemi olan medikal O<sub>3</sub> uygulamasının artrit klinik ve histopatolojik skorlarına; TAS, TOS ve sedimentasyon tayini gibi biyokimyasal değerlerine ve alkali komet yöntemiyle DNA'da meydana gelen hasarı değerlendirmektir.



### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Araştırmanın Türü

Bu tez çalışması Deneysel (Profilaktik önlemlere veya Teröpatik önlemlere yönelik müdahale çalışmaları) tipte bir epidemiyolojik araştırmadır.

#### 3.2. Hayvan Materyali ve Deney Ortamı

Bu çalışmada, Wistar albino türü 5-6 aylık 150-200 g ağırlığında 60 adet dişi sıçan kullanıldı. Çalışma için vücut ağırlıklarına göre, her biri 20'şer adet hayvandan oluşan 3 grup oluşturuldu. Deney süresince hayvanlar 12 saat gece 12 saat gündüz döngüsünde,  $22\pm 2$  °C'lik ortam ısısına sahip oda koşullarında barındırıldı. Deney hayvanlarının beslenmesi için standart yem ve musluk suyu verildi.

#### 3.3. Araştırma Gruplarının Oluşturulması

Sıçanlar her bir grupta 20 adet olacak şekilde üç gruba ayrıldı. Grupların oluşturulması esnasında sıçanlar rastgele seçildi.

**Grup 1 (Kontrol, n=20):** Grupta yer alan hayvanlara rektal ozon tedavisi prosedüründe yer alan uygulama yöntemiyle aynı olacak şekilde rektal stres yaşatıldı.

**Grup 2 (Artrit, n=20):** Bu gruba artrit modeli oluşturmak için ısı ile öldürülmüş mikobakterium tüberkülozis H37Ra içeren CFA kullanıldı. Artrit oluşturulacak sıçanlara 10 mg/ml yoğunlukta CFA'nın 100 µl'si kuyruk dibinden deri içine enjekte edilerek artrit tetiklendi ve bugün çalışmanın 0. günü olarak kabul edildi.

**Grup 3 (Artrit+Ozon, n=20):** Bu grubunda yer alan sıçanlara artrit tetiklenmesinden sonraki 16. günde rektal yolla ozon uygulanmaya başlandı. İlk hafta hayvanlara 0,5 mg/kg dozda (çalışmanın 16-20. günü), ikinci (çalışmanın 23-27. günleri) ve üçüncü (çalışmanın 30-34. günü) haftalarda ise 1,25 mg/kg dozda ozon uygulandı. Ozon, ilk hafta 20 µg/ml, ikinci ve üçüncü haftalarda 50 µg/ml yoğunlukta kullanıldı.

#### 3.4. Etik

Bu çalışma Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezinde, Tıp Fakültesi Fizyoloji laboratuvarı, Tıbbi Biyoloji laboratuvarı ve Tıp Fakültesi Hastanesi Patoloji laboratuvarında yapıldı. Proje Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu tarafından

incelendi ve etik kurul yönergelerine uygun görülerek onaylandı (Etik Kurul Karar No: 2017/03-27, 2017/04-10).

### 3.5. Gereçler

#### 3.5.1 Kullanılan Kimyasal Malzemeler

SYBR-Gold nükleik asit jel boyası	(İnvitrogen, S11494)
Tripan mavisi	(İnvitrogen, 15250)
Ficoll	(Ge Healthcare, 17-5442-02)
DMSO	(Merck, 1.16743.1000)
EDTA	(Sigma, E5134)
Ultra saf tris	(İnvitrogen, 15504-020-T)
NaOH	(Merck, 106498)
NaCl	(Applichem, A2942)
N-Lauryl sarcosine sodyum tuzu	(Merck, 814715)
PBS	(Sigma, d5652)
HCl	(Merck, 1.00314.2500)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	(Merck, 108600)
Ethanol	(Merck, M100983.2511)
LMA	(İnvitrogen, 16520050)
NMA	(İnvitrogen)
Triton X-100	(Sigma, 9002-93-1)
TE-buffer	(Fluka, 93283)
Total antioxidant capacity (TAC) Activity Colorimetric Assay Kit	
Total Oxidant Status (TOS) Rel assay Kit	
Freund's Incomplete Adjuvant (10 mL)	
Mycobacterium Tuberculosis H37 Ra, Complete Adjuvant in Oil,	
Deksametazon (Dekort)	

### 3.5.2. Kullanılan Araç ve Gereçler

Yatay elektroforez tankı	(Thermo scientific owl, easy cast)
Güç kaynağı	(Thermo scientific owl, OSP300-2Q)
Soğutmalı santrifüj	(Hettich Universal 320R)
Normal santrifüj	(Nüve)
Floresan mikroskobu	(Zeiss Axioskop)
Işık mikroskobu	(Zeiss)
Yazılım	(Komet 5, Kinetic Imaging Ltd, Liverpool, / Comet Score 15, Tritex Corp., ABD)
Absorbance mikro plate okuyucu	(ELx808IU)
Microplate strip washer	(ELx50)
Dijital hassas terazi	(Sartorius)
Manyetik karıştırıcı	(Isıticılı)
Manyetik balık	(Büyük, küçük, orta boy)
Vorteks	
Distile su cihazı	
Deiyonize su cihazı	(Sartorius)
Ozon jeneratörü	(Turkozone Blue)
Su banyosu	
Buzdolabı	(+4°C)
Derin dondurucu	(-20°C)
Derin dondurucu	(-40°C)
Eppendorf tüpleri	(2 ml)
Falcon tüpü	(15 ml)
Vakumlu jelli tüp	[BD vacuteiner (8,5 ml)]
Lökosept tüpü	(14 ml)
Lateks free enjektör	(20 ml)
Plastik patör pipet	(3 ml)
Ayarlanabilir mikro pipetler	[Eppendorf, Thermo (0-10µl; 20-200µl; 100-1000µl)]

Pipet uçları	[Capp (0,1-10µl; 20-200µl; 100-1000µl)] (24x50-20x20)
Lamel	(Lamtek)
Buzlu, rodajlı lam	(İsotherm)
Hemositometre	(İsolab)
Lam saklama kutusu	[İsolab (1000, 800, 500 ml'lik)]
Beherler	[İsolab (1000, 500, 250, 50, 25 ml'lik)]
Mezür	[İsolab (1000, 500, 250,100, 50ml'lik)]
Erlen	(İsolab)
Dikey cam şaleler	
Nitril eldiven	(1 ml, 5 ml)
Disposable enjektörler	(100 ml)
Tartım kabı	(BEL Engineering)
Sedim tüpü ve pipeti	
Sedim Rack	(0-100 mm)
Dijital Kaliper	(Stainless Hardened)
Tartı	(Dikomsan)
Wistar Albino sıçan	(ÇOMÜ DAM)

### 3.5.3. Kullanılan Çözeltiler

#### 3.5.3.1. Fosfat Tampon Çözeltisi

Sigma d5652 markalı  $Ca^{+2}$  ve  $Mg^{+2}$  içermeyen kimyasaldan 4,8 g 500 ml d-H<sub>2</sub>O içerisinde çözülerek hazırlandı. Hazırlanan çözelti +4 °C'de muhafaza edildi. Haftalık olarak hazırlandı.

#### 3.5.3.2. Lizing Çözeltisi

2,5 M NaCl, 10 mM Tris, 100 mM EDTA, 200 mM NaOH ve 750 ml d-H<sub>2</sub>O ile hazırlanan karışıma % 1 sodyum lauril sarkosin ilave edildi. Kimyasalların manyetik karıştırıcı yardımıyla çözümleri sağlandıktan sonra stok liziz çözeltinin pH'sı 10'a ayarlandı, hacmi 890 ml'ye tamamlandı. Hazırlanan stok çözelti oda sıcaklığında saklandı. İki haftada bir tazelenildi. Kullanılacağı zaman % 1 Triton-X 100 ve % 10 DMSO ilave edilerek soğuk olarak kullanıldı.

### 3.5.3.3. Elektroforez Çözeltisi

#### Stok NaOH 10 mM

40 g NaOH ve 100 ml d-H<sub>2</sub>O ile hazırlandı. Hazırlanan stok +4 °C'de muhafaza edildi. Stok haftalık olarak hazırlandı.

#### Stok EDTA 200 mM

3,7 g EDTA ve 50 ml d-H<sub>2</sub>O ile hazırlandı. Hazırlanan stok +4 °C'de muhafaza edildi. İki haftada bir stok yenilendi.

Elektroforez çözeltisi kullanılacağı gün taze olarak hazırlandı ve soğuk olarak kullanıldı. 1500 ml elektroforez çözeltisi 7,5 ml EDTA stok çözeltisi, 45 ml NaOH stok çözeltisi ve 1447,5 ml d-H<sub>2</sub>O ile hazırlandı. Çözeltinin pH'sı 13,1'den büyük olacak şekilde ayarlandı.

### 3.5.3.4. Nötralizasyon Çözeltisi

48,456 g tris ve 1000 ml d-H<sub>2</sub>O ile hazırlanan 0,4 M nötralizasyon çözeltisinin pH'sı HCl ile 7,5'e ayarlandı. Çözelti oda sıcaklığında saklandı ve oda sıcaklığında kullanıldı. İki haftada bir yeni çözelti hazırlandı.

### 3.5.3.5. Sybr-Gold Çözeltisi

İnvitrogen S11494 markalı kimyasalın stok çözeltisinin 1 µl'si 10 ml TE-buffer ile seyreltilerek ara stok hazırlandı. Ara stok çözeltisi +4 °C'de muhafaza edildi. Oda sıcaklığında kullanıldı.

### 3.5.3.6. Düşük Erime Noktalı Agar ( LMA)

375 mg LMA 50 ml PBS içinde mikrodalga fırın yardımıyla tamamen çözdürülerek hazırlandı. % 0,75'lik agar sıcakken ependorf tüplere paylaştırıldı ve +4 °C'de muhafaza edildi.

### 3.5.3.7. Normal Erime Noktalı Agar (NMA)

500 mg NMA 50 ml d-H<sub>2</sub>O içinde mikrodalga fırın yardımıyla tamamen çözdürülerek hazırlandı. % 1'lik agar sıcak olarak, methanolden geçirilmiş rodajlı lamaların kaplanması için kullanıldı.

### **3.6. Veri Toplama Yöntemi**

#### **3.6.1. Artrit Oluşturulması**

Deneysel artrit modeli oluşturmak için ısı ile öldürülmüş mikobakterium tüberkülozis H37Ra içeren CFA kullanıldı. Artrit oluşturulacak sıçanlara 10 mg/ml yoğunlukta CFA'nın 100 µl'si kuyruk dibinden deri içine enjekte edilerek artrit tetiklendi ve o gün çalışmanın 0. günü olarak kabul edildi (Newbould, 1963, Vijayalakshmi ve ark., 1996).

#### **3.6.2. Görsel Artrit Skorlaması**

Çalışma süresince artrit klinik şiddeti ile ozon ve uygulamasının artrit klinik şiddetine olan etkisi, "görsel hastalık şiddeti skorlama" yöntemi kullanılarak belirlendi. Çalışmanın sıfırinci gününden çalışmanın sonuna kadar ozon uygulamasının her seans başı ve sonunda olmak üzere tüm gruplarda yer alan hayvanların her pençesi incelendi ve 0-4 arasında puanlandırıldı. Maksimum puan 16 olacak şekilde, her hayvan için artrit klinik şiddeti, pençelerin aldığı puanların toplanmasıyla elde edildi. Puanlama kriterleri şu şekilde belirlendi:

0= şişlik veya kızarıklık yok;

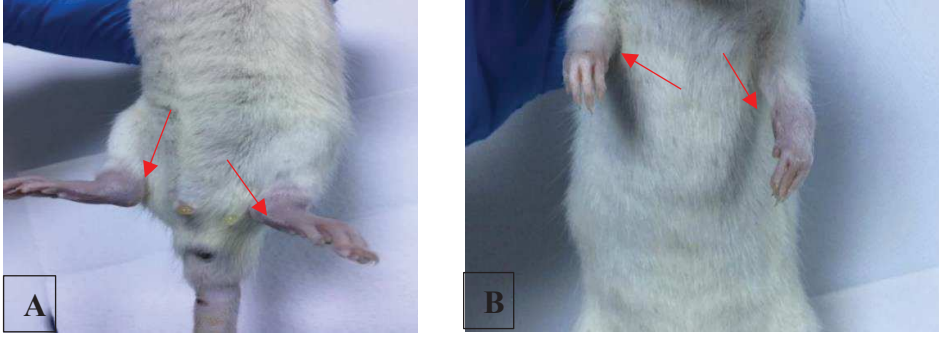
1= ayak bileği eklemi veya tarsal kemiklerle sınırlı hafif kızarıklık ve şişlik;

2= ayak bileğinden tarsallara doğru hafif şişlik ve kızarıklık;

3= ayak bileğinden metatarsal eklemlere doğru ılıman şişlik ve kızarıklık;

4= ayak bileği, ayak ve parmakları kapsayacak şekilde şiddetli şişlik ve kızarıklık veya ekstremitenin ankilozu (Snekhalatha ve ark., 2012).

Çalışma süresince tüm skorlamalar fizik tedavi uzmanınca, kör bakış açısıyla, gerçekleştirildi.



**Resim 3.** A) Klinik skorlamada sağ ve sol arka pençesi 4 olarak değerlendirilen arka pençe örneği B) Klinik skorlama ile sağ ön pençe 3 ve sol ön pençe 4 olarak değerlendirilen pençe görüntüleri.

### 3.6.3. Pençe Ölçümü

Çalışmada yer alan hayvanların pençe çaplarının ölçümünde dijital kumpas kullanıldı. Çalışma başında ve sonunda tüm grupların pençe çapları ölçüldü. Kontrol ve artrit grubundaki hayvanların haftada bir; O<sub>3</sub> grubundaki hayvanların ise O<sub>3</sub> uygulama seanslarının başında ve sonunda pençe çapları ölçüldü.

### 3.6.4. Ağırlık Ölçümü

Çalışmada yer alan hayvanların ağırlık ölçüm haftada bir kez yapıldı ve bir önceki haftaya göre kıyaslandı. Ağırlık ölçümlerinde % 20'lik bir düşüş olan hayvanlar çalışmadan çıkarıldı.

### 3.6.5. Ozon Uygulaması

Artrit+ozon grubunda yer alan sıçanlara artrit tetiklenmesinden sonraki 16. günde (hastalığın belirtilerinin gözlemlendiği gün) rektal yolla ozon uygulanmaya başlandı. Çalışma süresince her bir uygulama için gaz hacmi 5 ml olarak belirlendi. Ozon uygulamalarına haftada beş gün olmak üzere üç hafta devam edildi. İlk hafta hayvanlara 0,5 mg/kg dozda (çalışmanın 16-20. günü), ikinci (çalışmanın 23-27. günleri) ve üçüncü (çalışmanın 30-34. günü) haftalarda ise 1,25 mg/kg dozda ozon uygulandı. Çalışma boyunca rektal yolla uygulanan gaz hacmi (5 ml) sabit tutuldu. Ozon ise ilk hafta 20 µg/ml, ikinci ve üçüncü haftalarda 50 µg/ml yoğunlukta kullanıldı.



### **3.6.6. Kan Örneklerinin Alınması**

Çalışmanın sonunda hayvanlar 100 mg/kg ketamine hidroklorid ve 10 mg/kg ksilazin anestezisi altındayken kalplerinden tek kullanımlık enjektör aracılığıyla kan alınarak sakrifiye edildiler. Alınan kan örneklerinin 3 ml'si alkali komet analizi için % 3,8'lik sodyum sitrat içeren tüplere alındı ve aynı gün içerisinde ÇOMÜ Tıbbi Biyoloji Laboratuvarında alkali komet yöntemiyle çalışıldı. Alınan kanların 1 ml'si sedimentasyon tayini için kullanılırken bir kısmı da serum separatör tüpe alınarak santrifüjlendi ve serumları biyokimyasal analizlerde kullanmak üzere -80°C'da çalışma gününe kadar saklandı.

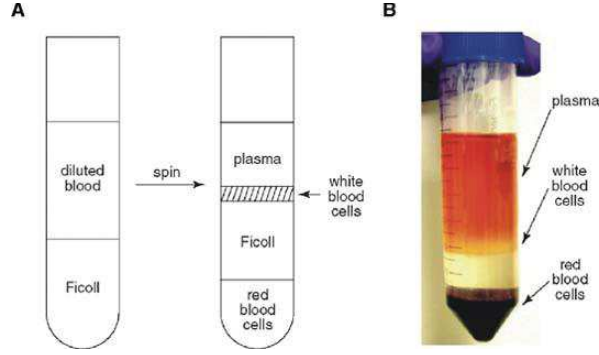
### **3.6.7. Alkali Komet Analizi**

#### **3.6.7.1. Lamların Hazırlanması**

Lamlar NMA ile kaplanmadan önce metanolle yıkandı ve kurutuldu. Ardından mikrodalga fırın yardımıyla hazırlanan sıcak % 1'lik NMA çözeltisine, lamlar batırılarak ince tabaka halinde agarla kaplandı. Lamların arka yüzleri ıslak kağıt havluyla silinerek tek yüzlerinde agar kalması sağlandı. Kaplanan lamlar oda sıcaklığında bir gün kurutularak çalışma için hazır hale getirildi ve lam saklama kutusunda saklandı. İki haftada bir yeni agar kaplı lam hazırlandı.

#### **3.6.7.2. Periferel Kan Mononükleer Hücrelerinin Ayırıştırılması**

Lökosit ayırma tüpüne oda sıcaklığında 3 ml ficol eklendi. 2500 rpm'de 30 saniye santrifüjlenerek ficolün seperatörün altına inmesi sağlandı. Santrifüj sonrası tüpe pastör pipet yardımıya 3ml kan konuldu. Tüm örnekler hazır olduktan sonra tüpler dengeli şekilde santrifüje yerleştirildi ve 2500 rpm'de 15 dakika santrifüjlendi. İşlem sonu periferel kan mononükleer hücrelerinin (PBMC) yer aldığı zon pastör pipet yardımıyla başka bir falkon tüpe aktarıldı. Üzerine 7 ml soğuk PBS eklendi ve homojen karışım sağlandıktan sonra 1300 rpm'de 10 dakika santrifüjlendi. Santrifüj bitince süpernatant uzaklaştırılıp, üzerine 3 ml soğuk PBS eklenerek yıkama işlemi üç kez tekrarlandı. Ayırıştırma işlemi süresince, hücrelerin canlılıklarını kaybetmemesi için, tüpler buz üzerinde tutuldu. Pozitif kontrol olarak 50 µM'lık H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> çözeltisi kullanıldı.



**Şekil 10.** Periferel kan mononükleer hücrelerinin ayrıştırılması.

### 3.6.7.3. Tripan Mavisı Testı

Kısa dönemde oluşan sitotoksik etkileri incelemek ve değerlendirme esasındaki ölü hücreleri saptamak için tripan mavisı testi yapıldı. Test için, mononükleer hücre süspansiyonundan ve % 0,4'lük tripan mavisinden 10 µl boş mikrotüpe konuldu, homojen olarak karıştırıldı. Boyanın etki etmesi için 2 dakika beklendi. Karışımın 10 µl'si üzerine lam kapatılmış hemositometrenin sayım alanına damlatıldı. Sayım alanı 20X büyütmede ışık mikroskopunda değerlendirildi. Sayım alanındaki dört büyük karedeki ölü (mavi renk) ve canlı (parlak görünen) hücreler sayıldı. İşlem tüm örnekler için yapıldı. Sayım sonunda canlı hücre yüzdesi ve mililitredeki canlı hücre sayısı hesaplandı. Canlılık oranın % 95 olduğu verisine ulaşıldı ve hücre yoğunluğu alkali komet yöntemi için  $1 \times 10^5$  hücre/ml olacak şekilde ayarlandı.

### 3.6.7.4. Mononükleer Hücrelerin Lama Yayılması

Önceden hazırlanmış ve ependorf tüp içinde  $+4^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edilen LMA sıcak suda sıvı hale getirildi.  $+37^{\circ}\text{C}$ 'deki su banyosuna konularak sıcaklığı dengelendi. Boş ependorf tüpe 140 µl LMA ve 40 µl mononükleer hücre süspansiyonundan konularak homojen olarak karıştırıldı. Karışımdan 70'er µl, önceden NMA kaplanmış lamın iki ucuna yavaşça damlatıldı, damlaların üzerine 20X20'lik lamel kapatılarak yayılmaları sağlandı. Lamalar 5 dakika  $+4^{\circ}\text{C}$  bekletilerek agarın katılaşması sağlandı ve sonra lameller lamaların üzerinden agarı bozmayacak şekilde yavaşça alındı.

### **3.6.7.5. Mononükleer Hücrelerin Lizizi**

Lamlar taze hazırlanmış ve soğutulmuş liziz çözeltisi içeren, alüminyum kaplanmış cam şalelere yerleştirildi ve +4 °C'deki buzdolabında 60 dakika bekletildi. Hidrojen peroksitle muamele edilmiş hücrelerin yayıldığı lam liziz çözeltisi içeren petri kabında 60 dakika bekletildi.

### **3.6.7.6. Elektroforez**

Yatay elektroforez tankı, lambası çıkartılmış buzdolabına konularak soğutuldu. Lamlar tanka birbirine temas edecek şekilde yerleştirildi. Taze hazırlanıp soğutulmuş elektroforez çözeltisi lamları kaydırmayacak şekilde yavaşça tanka boşaltıldı. DNA'nın çift zincirli yapıdan tek zincirli yapıya dönüşmesi için lamlar tank içerisindeki soğuk alkali (pH ≥ 13,1) elektroforez tamponunda 20 dakika bekletildi. Süre bitiminde 300 mA, 25 V'luk elektriksel alanda 20 dakika yürütme işlemi gerçekleştirildi. İşlemin tamamı soğuk ve karanlık ortamda yapıldı.

### **3.6.7.7. Nötralizasyon**

Bir pens yardımıyla tanktan çıkarılan lamlar cam şaleye alındı. Oluşan kimyasal reaksiyonu sabitlemek, fazla tuz ve deterjanı uzaklaştırmak amacıyla lamlar pH'sı 7,5 olan nötralizasyon tamponunda 15 dakika karanlıkta, oda sıcaklığında bekletildi. Süre bitiminde lamlar distile suyla yıkandı.

### **3.6.7.8. Fiksasyon**

Lamlar -20°C'de soğutulmuş saf etanol içeren şalelerde 10 dakika tutularak fikse edildi ve kağıt havlu üzerinde hücre gömülü yüzleri dışarı bakacak şekilde bir gece kurutuldu. Ertesi gün lam saklama kutularına kaldırıldı.

### **3.6.7.9. Boyama**

Lam üzerinde hücrelerin gömülü olduğu her iki kismada 50 µl SYBR-Gold ara stok çözeltisinden damlatıldı. Boyanmanın tam olarak gerçekleşmesi için 3 dakika beklendi. Fazla boyadan arındırılmak için, piset yardımıyla, musluk suyuyla yıkandı.

### **3.6.7.10. Fotoğraf Kaydetme**

Floresan mikroskopunda 10x büyütmede görüntülenen kometlerin fotoğrafları çekildi ve "bmp" formatında kaydedildi. Çekim lam başından sonuna kadarki alanın

orta hattından ilerlenerek hücrelerin gömülü olduğu her iki alandan da ardışık şekilde, toplamda en az 6 fotoğraf (hücrelerin gömülü alanlarının başlangıç ve bitiş kısımları hariç tutularak) olacak şekilde yapıldı.

### 3.6.7.11. Değerlendirme

Fotoğraflar bilgisayar ortamında Tritek CometScore Freeware 1.5v analiz programıyla değerlendirildi. Tüm örneklerden en az 100 komet manuel işaretlenerek skorlandı. Skorlama esnasında hidrojen peroksitle muamele edilen örneklerden ise 50 hücre skorlandı. Ölçülen % DNAt, DNA hasarının göstergesi olarak kabul edildi.

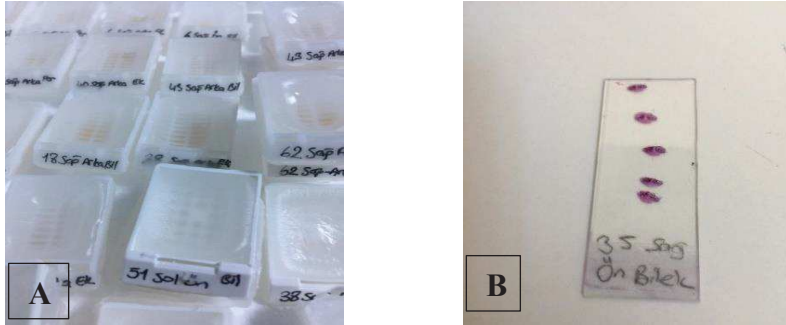
### 3.6.8. Serumda TAS-TOS Miktarının Ölçümü

Serum TAS-TOS miktarları ticari kitlerle (Rel Assay Diagnostics), kolorimetrik olarak belirlendi. Analizler aşamasında üreticinin direktiflerine bağlı kalındı.

### 3.6.9. Histopatolojik İnceleme

Çalışmanın sonunda anestezi altındaki hayvanlardan kan alım işlemi tamamlandıktan sonra hayvanların tüm pençeleri çıkartılıp histopatolojik inceleme için % 10 tamponlu nötral formalin çözeltisine konuldu.

Artrit oluşturulan hayvanlara ozon uygulamasının, hücresel infiltrasyon ve kemik rezorbsiyonuna etkisi histopatolojik incelemeyle değerlendirildi. Bu amaçla çalışma sonunda farelerin nötral formalin çözeltisine konulan pençeleri tespit aşamasından sonra (15-20 gün) % 15 EDTA çözeltisi içerisinde (4 gün) dekalsifiye edildi, dehidratasyon ve parafinle bloklama işlemlerinden sonra 5 µm kalınlığında seri kesitler alındı. Alınan kesitler hematoksilin ve eozin ile boyandı, inceleme işlemi ışık mikroskopuyla yapıldı.



**Resim 4:** A) Dokuların bloklama işleminden örnekler, B) Kesiti alınan 35 numaralı deneğin sağ ön bilek örneğinin hematoksilin ve eozin boyama sonrası lam üzerindeki görüntüsü.

İncelemede her kesit hücrel infiltrasyon ve kemik erozyonu bakımından ayrı ayrı değerlendirilip, 0- 5 arası puanlandı. Değerlendirmede herhangi bir değişiklik gözlenmeyen dokular “0” olarak kaydedildi. Elde edilen sonuçların toplamı her hayvan için artrit mikroskobik şiddetinin göstergesi olarak kabul edildi. Kemik rezorpsiyonu için sadece sıçanların arka bacakları değerlendirmeye dahil edildi ve verilebilecek maksimum skor 10 olarak belirlendi. Hücrel infiltrasyonu skoru içinse her hayvanın bütün pençeleri değerlendirildi ve maksimum skor 20 olarak belirlendi. Skorlama kriterleri aşağıda belirtilmiştir:

Hücrel infiltrasyon:

- 1= periartiküler dokuda hafif inflamatuvar hücre infiltrasyonu;
- 2= ılımlı infiltrasyon;
- 3= orta düzey infiltrasyon ve orta düzey ödem;
- 4= belirgin ödem ve belirgin infiltrasyon;
- 5= şiddetli ödem ve şiddetli infiltrasyon.

Kemik rezorpsiyonu:

- 0=normal kemik;
- 1= hafif (Distal tibianın trabeküler veya kortikal bölgesinde, düşük büyütme kolayca görülmeyen, küçük rezorpsiyon bölgeleri ve çok nadir osteoklast);
- 2= ılımlı (distal tibianın trabeküler veya kortikal bölgesinde, düşük büyütme kolayca görülmeyen, pek çok alanda rezorpsiyon bölgeleri ve daha fazla osteoklast);
- 3= orta düzey (kortekste tam kat defektler olmaksızın, medullar trabeküler ve kortikal kemikte belirgin rezorpsiyon; medullar trabekülde bir miktar kayıp; düşük büyütmede belirgin lezyon; daha fazla osteoklast);
- 4= belirgin (kortikal kemikte tam kat kayıp; distal tibiada medullar kemikte belirgin kayıp; çok sayıda osteoklast; küçük tarsal kemiklerde rezorpsiyon yok);
- 5= şiddetli (kortikal kemikte tam kat kayıp; distal tibiada medullar kemik kaybı; çok sayıda osteoklast; küçük tarsal kemiklerde rezorpsiyon).

### **3.6.10. Westergren Yöntemiyle Sedimentasyon Ölçümü**

Çalışmanın sonunda alınan kanların 1 ml'si sodyum sitratlı ESR/VSG sedimentasyon tüpünün içine enjektör aracılığıyla alındı. Kanın sodyum sitratla karışmasını sağlamak amacıyla tüp alt üst edildi ve sedimentasyon askısı üzerine yerleştirildi. Üzeri numaralandırılan sedimentasyon pipetleri yavaş hareketle 0

hızasına gelene kadar tüpün içine batırıldı. ilk pipetin batırıldığı saat not edildi ve sonrasında 30 ve 60 dakikalardaki çökme hızları kaydedildi.



**Resim 5.** Westergren yöntemiyle yapılan sedim ölçümünden bir örnek görüntü.

### **3.6.11. İstatistiksel Analiz**

Araştırmanın verileri SPSS 20.0 istatistik programına aktarılmış olup veri kontrolü ve analizi bu programda yapıldı. Sayımla belirtilen değişkenlerin gösterilmesinde sayılar, ölçümle belirtilen değişkenlerin gösterilmesinde ortalama, standart sapma ve minimum-maksimum değerler kullanıldı.

İstatistiksel karşılaştırmalarda İki Ortalama Arasındaki Farkın nemlilik testi, İki Eş Arasındaki Farkın nemlilik testi, Mann-Whitney U testi ve Kruskal Wallis testi kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık için  $p < 0,05$  kabul edildi.

#### 4. BULGULAR

Bu çalışmada; grup 1 (kontrol), grup 2 (artrit) ve grup 3 (artrit+ozon) olmak üzere 3 farklı grup oluşturuldu. Çalışma süresince toplam 60 hayvan kullanıldı. Çalışmanın ilk gününde tüm grupların pençe ölçümü ve ağırlığı ölçüldükten sonra; grup 2 ve grup 3'e protokolde belirtildiği doz ve yoğunlukta CFA enjeksiyonu yapıldı ve enjeksiyonun 16. gününde grup 3'e ozon uygulanmaya başladı. Çalışmanın sonunda ise kan ve doku örneklerinden hedeflenen histopatolojik, biyokimyasal ve hematolojik analizler yapıldı.

##### 4.1. Deneklerin Canlı Ağırlıkları

Tüm gruplarda yer alan sıçanların çalışmanın başı (0. gün) ve sonunda (34. gün) ağırlıklarını içeren tablo 2 aşağıda yer almakta olup; grup içinde ve gruplar arasında ağırlık bakımında anlamlı farklılık tespit edilmemiştir.

**Tablo 2.** Gruplara ait ağırlık verileri (g).

<b>Grup</b>	<b>0. gün</b>	<b>34. gün</b>
Kontrol	192,77±6,76	222,5±5,84
Artrit	176,52±4,81	194,61±12,08
Artrit+Ozon	192,61±3,47	194,51±7,33

#### 4.2. Deneklerin Pençe Ölçümündeki Değişiklikler

Tüm gruplarda yer alan sıçanların çalışmanın başı (0. gün) ve sonunda (34. gün) pençe çapı ölçümlerini içerir tablo 3 aşağıda yer almaktadır. Artrit grubunda yer alan sıçanların pençe çaplarının çalışma başı ve çalışma sonu ölçümleri arasındaki fark anlamlı bulundu. Aynı şekilde artrit+ozon grubundaki sıçanlarında çalışma başı ve çalışma sonu ölçümleri arasındaki fark anlamlı bulundu. Ancak kontrol grubunda yer alan sıçanların çalışma başı ve sonu pençe çap ölçümleri arasındaki fark anlamlı bulunmadı (Tablo 3).

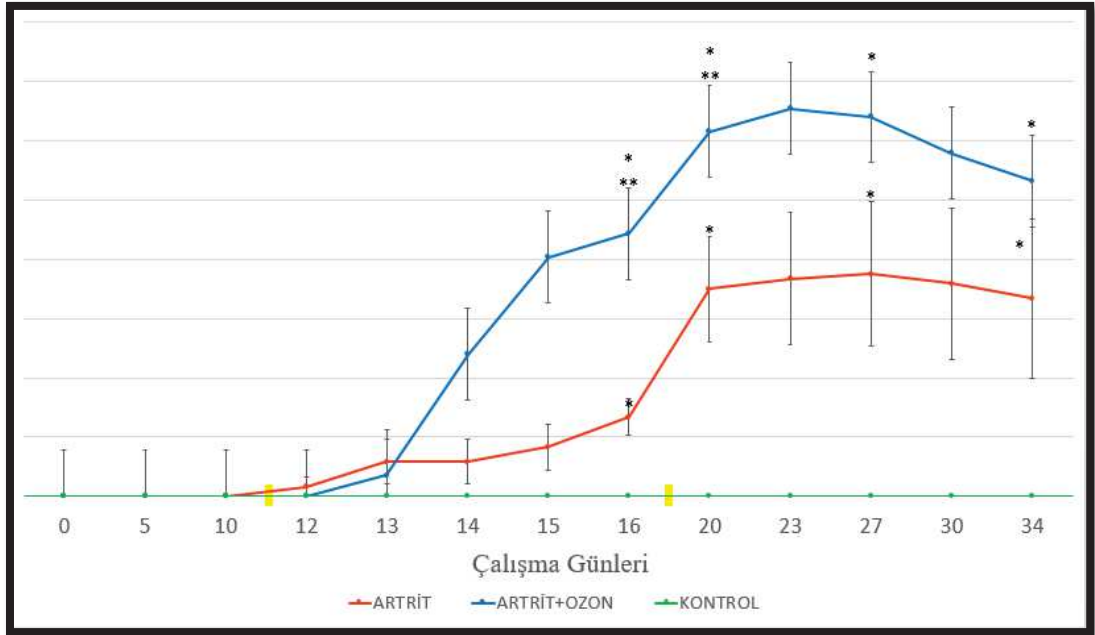
**Tablo 3.** Grupların pençe çap ölçümlerine ait veriler (mm). (\*:  $p < 0,05$  Kontrol grubuna göre kıyaslama)

Grup	Sağ Arka		Sol Arka	
	0.gün	34. gün	0. gün	34.gün
Kontrol	5,66 ± 0,86	5,91 ± 0,18	5,71 ± 0,11	5,89 ± 0,11
Artrit	5,77 ± 0,11	7,32 ± 0,73*	5,56 ± 0,15	7,29 ± 0,59*
Artrit+Ozon	5,54 ± 0,09	8,41 ± 0,18*	5,53 ± 0,08	8,42 ± 0,22*



### 4.3. Klinik Görsel Artrit Skorundaki Değişimler

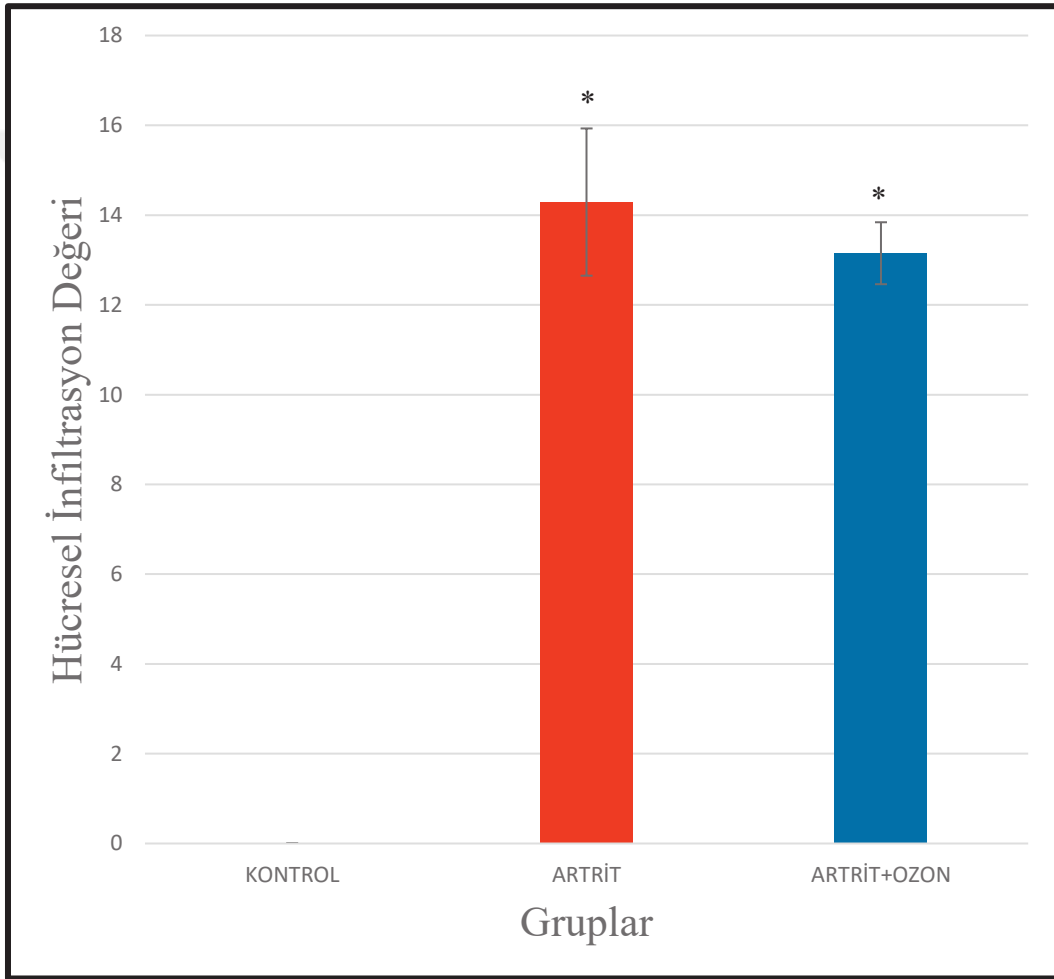
Kontrol, artrit ve artrit+ozon gruplarının çalışma süresince görsel skorlaması Fizik Tedavi Uzmanınca yapıldı. Ozon uygulamasına başlanılan 16. günde kontrol ( $00\pm00$ ), artrit [ $2,67\pm0,61$ ] ve ozon [ $8,86\pm1,30$ ] grupları arasında görsel artrit skorları anlamlı olarak farklılık bulundu. 20. günde kontrol ( $00\pm00$ ), artrit [ $7\pm1,77$ ] ve ozon [ $12,29\pm1,18$ ] grupları arasında görsel artrit skor anlamlı olarak farklı bulundu. 27. günde kontrol grubuna ( $00\pm00$ ) göre; artrit [ $7,5\pm2,44$ ] ve ozon [ $12,79\pm0,70$ ] grupları arasında görsel artrit skor anlamlılığı devam ederken; artrit ve artrit+ozon grubu arasında anlamlılık kayboldu. Aynı şekilde 34. günde de kontrol grubuna ( $00\pm00$ ) göre; artrit [ $6,67\pm2,67$ ] ve artrit+ozon [ $10,64\pm1,28$ ] grupları arasında görsel artrit skor anlamlılığı devam ederken; artrit ve artrit+ozon grubu arasında anlamlı bir farklılık bulunmadı (Şekil 11).



Şekil 11. Grupların çalışma süresince görsel skorlamasının karşılaştırılması. (\*:  $p<0,05$  kontrol grubuna göre; \*\*:  $p<0,05$  artrit grubuna göre kıyaslama)

#### 4.4. Hücresel İnfiltrasyon Değerlerindeki Değişiklikler

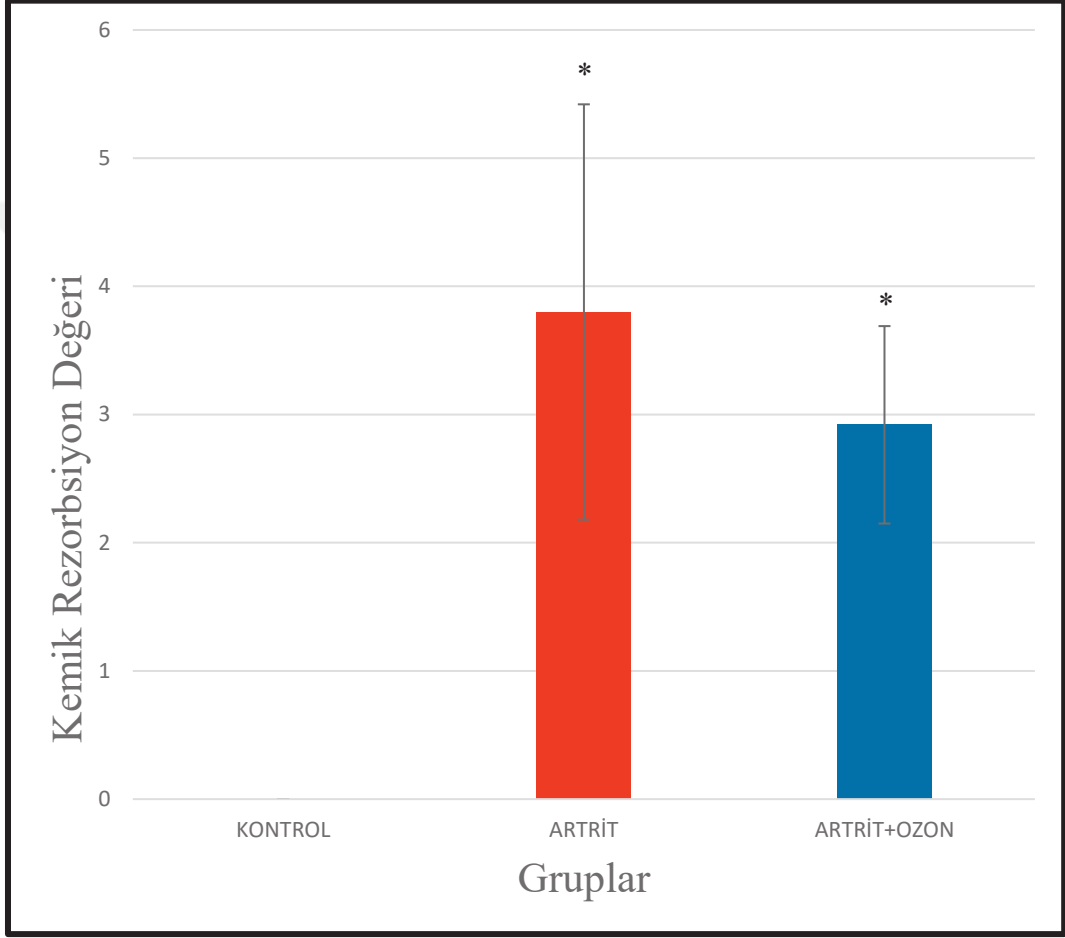
Kontrol, artrit ve artrit+ozon gruplarından çalışmanın sonunda elde edilen pençe ve bilek eklemlerinin histopatolojik incelemesi sonucunda hücresel infiltrasyon değerleri artrit grubunda  $14,29 \pm 1,64$ , artrit+ozon grubunda  $13,15 \pm 0,69$  bulundu. Artrit grubuyla artrit+ozon grubu kıyaslandığında anlamlı olarak farklılık gözlemlenmedi (Şekil 12).



Şekil 12. Grupların hücresel infiltrasyon değerlerinin karşılaştırılması. (\*:  $p < 0,05$ ; kontrol grubuna göre kıyaslama)

#### 4.5. Kemik Rezorpsiyonu Üzerindeki Değişiklikler

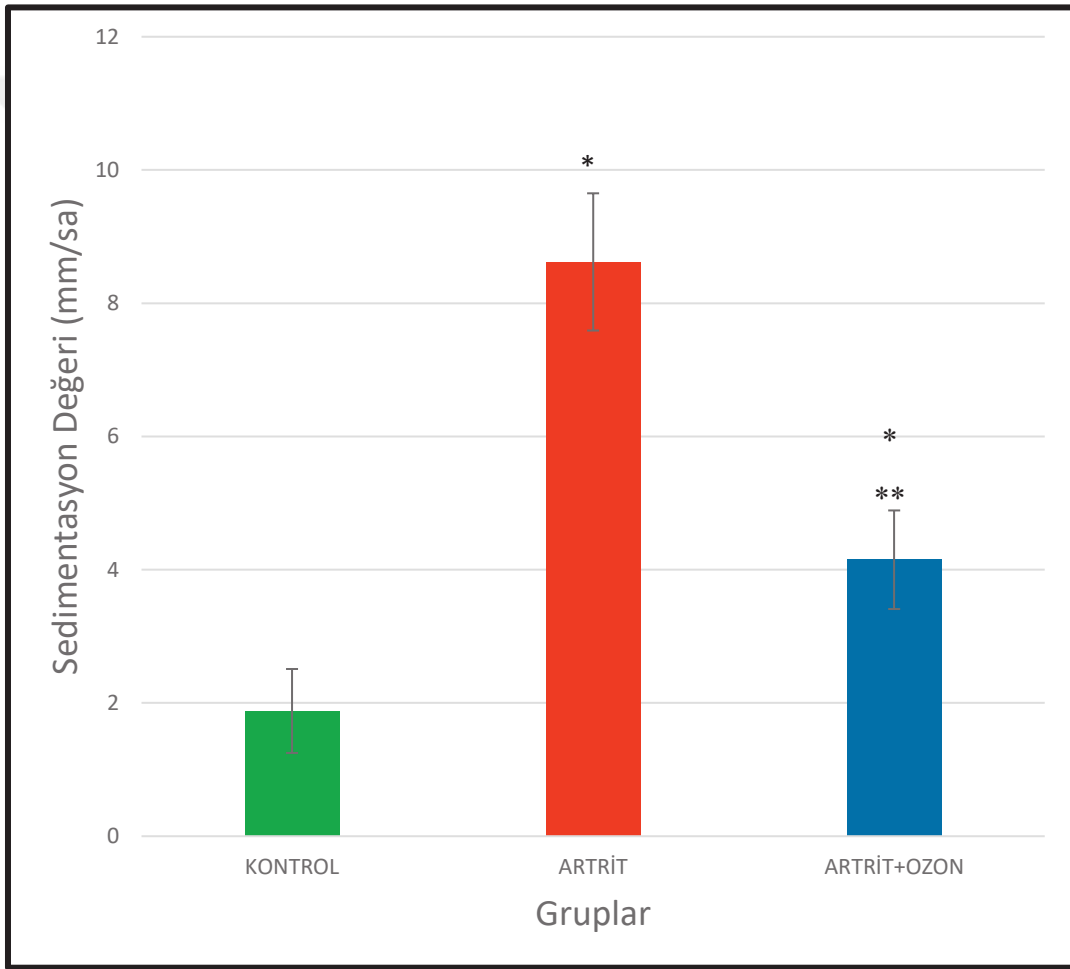
Kontrol, artrit ve artrit+ozon gruplarından çalışmanın sonunda elde edilen ön ve arka bacak kemiklerinin histopatolojik incelemesi sonucunda kemik rezorpsiyon değerleri artrit grubunda  $3,80 \pm 1,62$  ve artrit+ozon grubunda ise  $2,92 \pm 0,77$  bulundu. Artrit grubu ile artrit+ozon grubu kıyaslandığında anlamlı olarak farklılık gözlemlenmedi (Şekil 13).



Şekil 13. Grupların kemik rezorpsiyonu değerlerinin karşılaştırılması. (\*:  $p < 0,05$ ; kontrol grubuna göre kıyaslama)

#### 4.6. Medikal Ozon Uygulamasının Sedimentasyon Düzeyine Etkisi

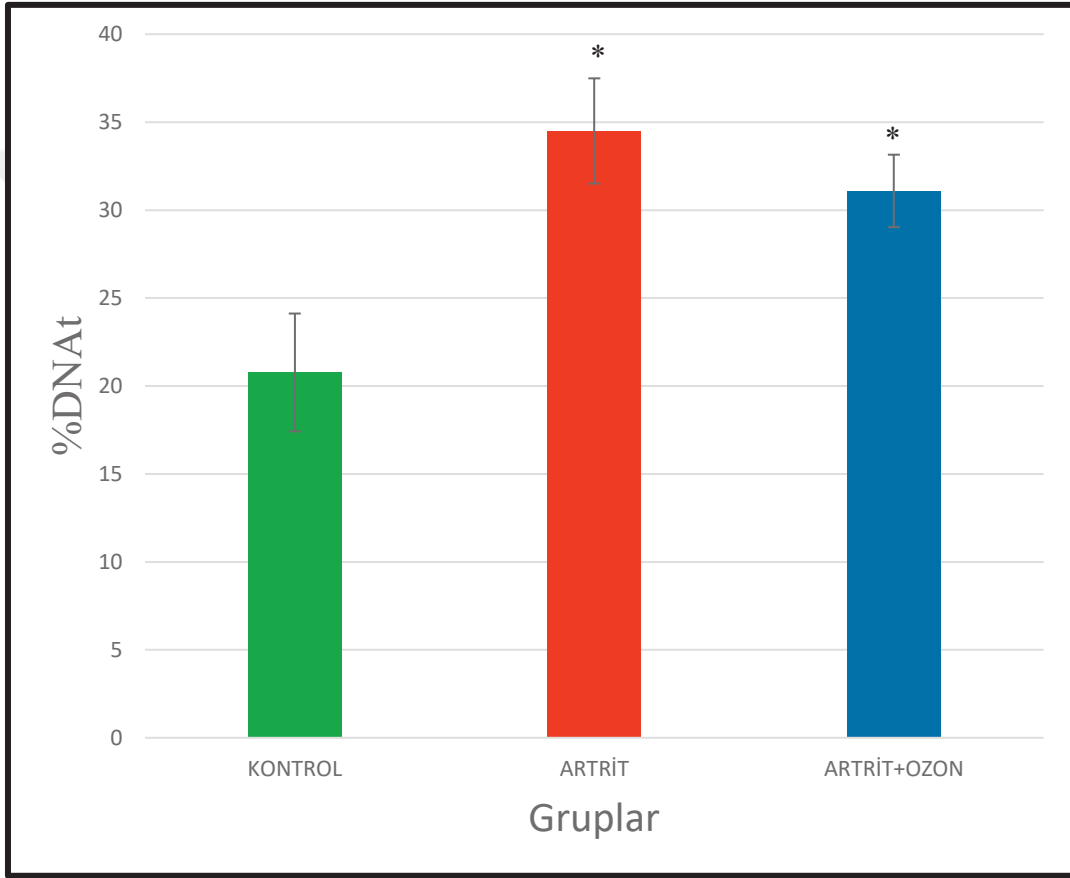
Kontrol, artrit ve artrit+ozon gruplarından çalışmanın sonunda elde edilen kan örneklerinden sedimentasyon değeri kontrol grubunda  $18,8\pm0,06$  mm/1 saat, artrit grubunda  $86,2\pm0,10$  mm/1 saat ve artrit+ozon grubunda ise  $41,5\pm0,07$  mm/1 saat olarak bulundu. Artrit grubunun, kontrol ve artrit+ozon grubuyla kıyaslandığında anlamlı farklılık gözlemlendi. Yapılan analize göre grupların karşılaştırılmasında anlamlı sonuçlar elde edildi (Şekil 14).



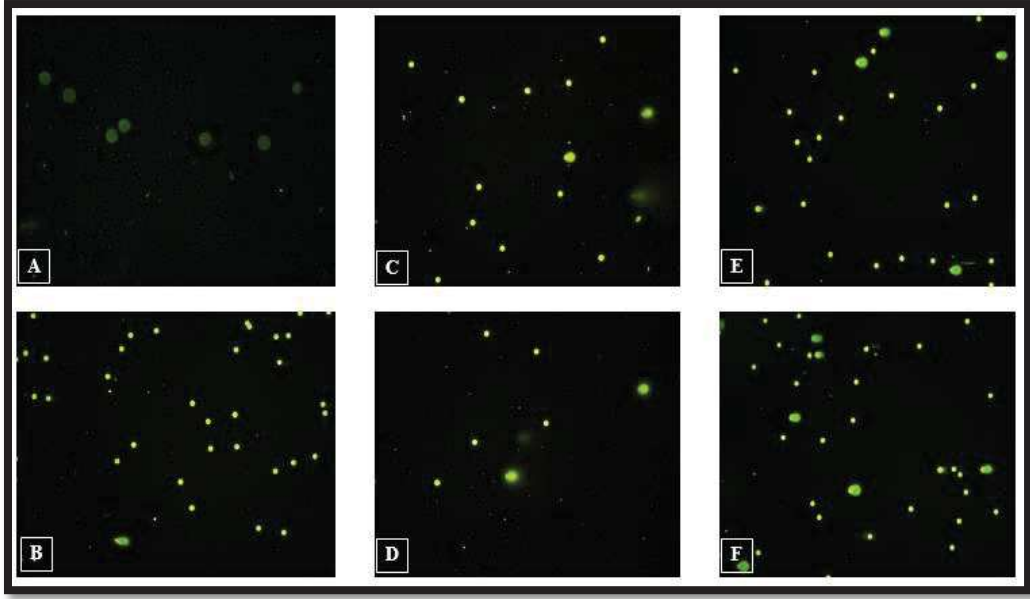
Şekil 14. Grupların sedimentasyon düzeylerinin karşılaştırılması. (\*:  $p<0,05$ ; kontrol grubuna göre; \*\*:  $p<0,05$  artrit grubuna göre kıyaslama)

#### 4.7. DNA Hasarındaki Değişiklikler

Kontrol, artrit ve artrit+ozon gruplarından elde edilen kan mononükleer hücrelerinin komet görüntülerinin analiz edilmesi neticesinde % DNAt değeri kontrol grubunda  $20,77 \pm 3,35$ , artrit grubunda  $34,5 \pm 2,99$  ve artrit+ozon grubunda  $31,09 \pm 2,06$  bulundu. Gruplar karşılaştırıldığında ise artrit ve artrit+ozon gruplarında kontrol grubuna kıyasla anlamlı farklılık gözlenirken; artrit ve artrit+ozon grupları arasında anlamlı farklılık gözlenmedi (Şekil 15).



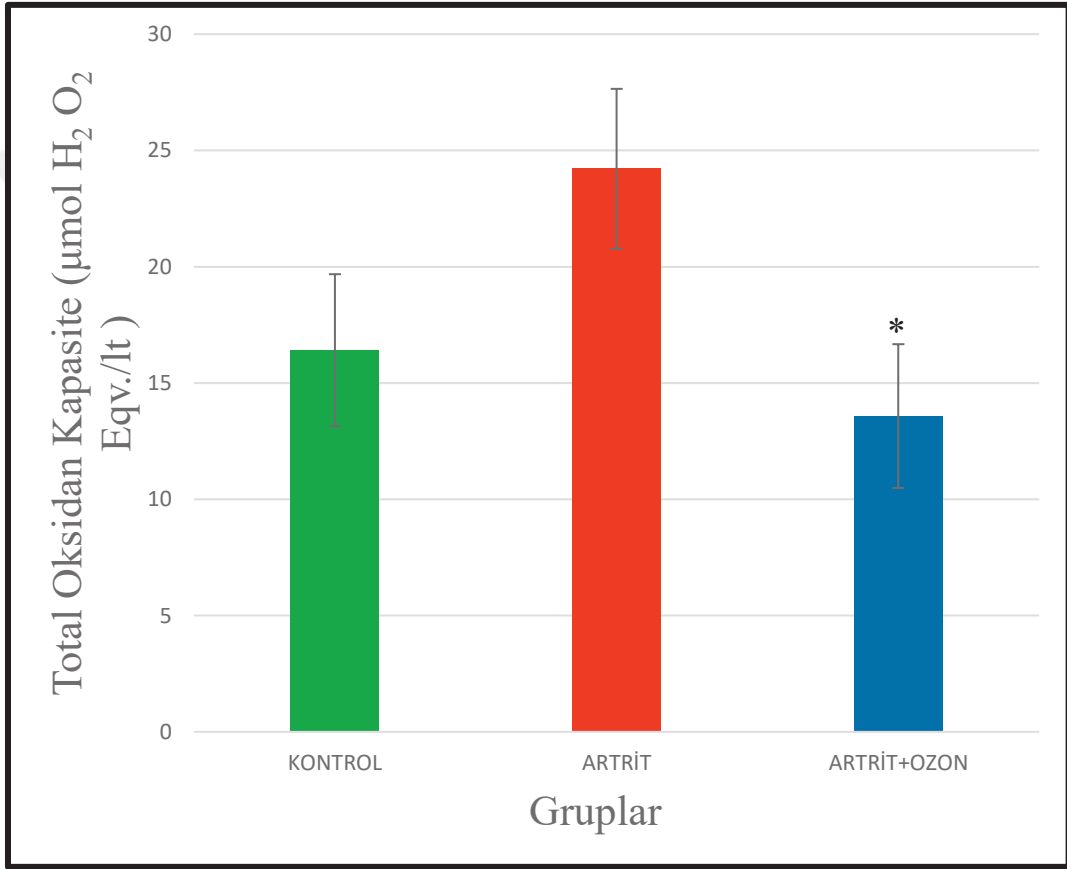
**Şekil 15.** Grupların mononükleer hücre DNA hasarlarının karşılaştırması. % DNAt: Kuyruğu oluşturan DNA yüzdesi. (\*:  $p < 0,05$ ; kontrol grubuna göre kıyaslama)



**Resim 6.** A, B: Kontrol grubunda yer alan; C, D: Artrit grubunda yer alan; E, F: Artrit+ozon grubunda yer alan deneklerin mononükleer hücrelerin komet yöntemiyle elde edilen jel görüntüleri.

#### 4.8. Total Oksidan Kapasite (TOS)'deki Değişiklikler

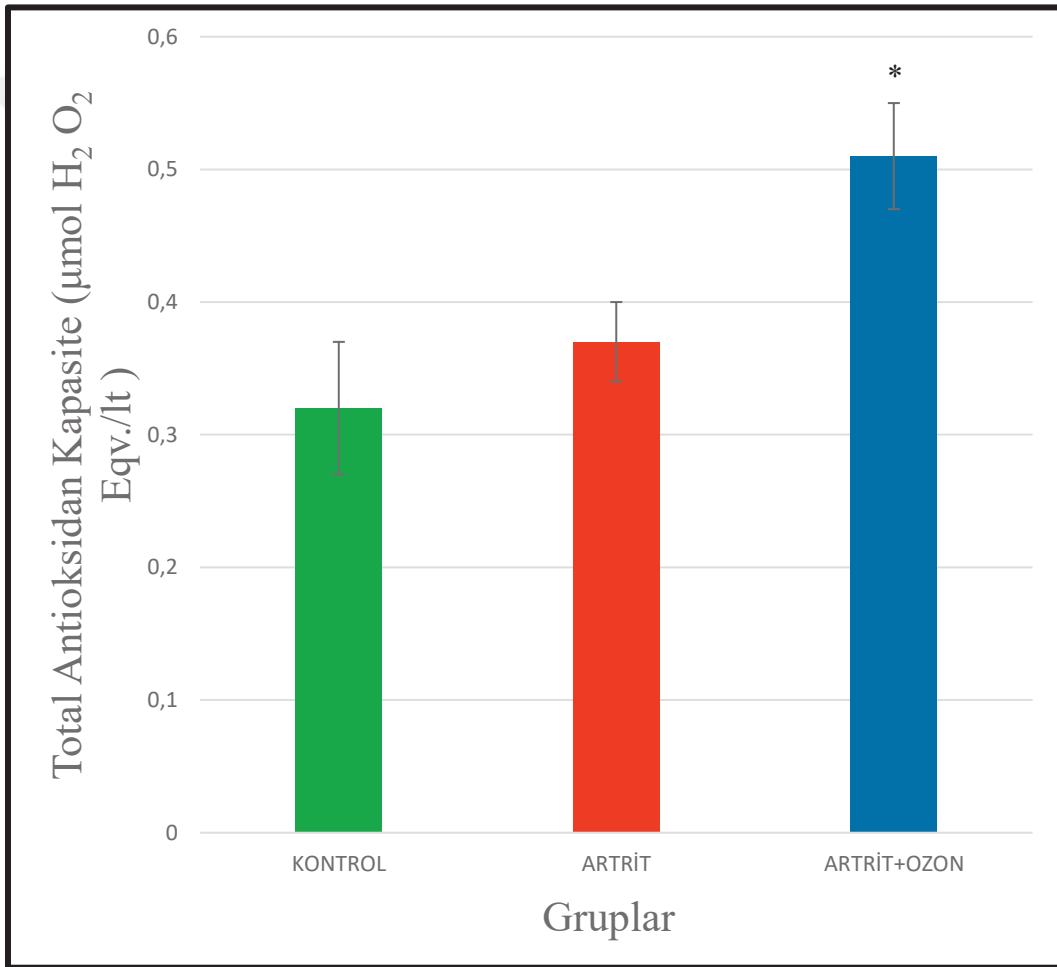
Kontrol, artrit ve artrit+ozon gruplarından elde edilen kan serumlarında ELISA yöntemiyle ölçülen total oksidan kapasite ( $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$  Eqv./lt) kontrol grubunda  $16,41\pm 3,27$ , artrit grubunda  $24,21\pm 3,44$  ve artrit+ozon grubunda  $13,58\pm 3,09$  bulundu. Kontrol grubu ile artrit ve artrit+ozon grubunun karşılaştırılmasından anlamlı sonuçlar elde edilmezken; artrit grubu ile artrit+ozon grubu arasında anlamlı bir farklılık ortaya çıktı (Şekil 16).



Şekil 16. Grupların total oksidan kapasitelerinin (TOS) karşılaştırılması. (\*:  $p<0,05$ ; kontrol grubuna göre kıyaslama)

#### 4.9. Total Antioksidan Kapasite (TAS)'daki Değişiklikler

Kontrol, artrit ve artrit+ozon gruplarının kan serumlarında ELISA yöntemiyle total antioksidan kapasitelerinin ( $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ Eqv./lt}$ ) ölçümü sonucunda elde edilen değerler kontrol grubunda  $0,32\pm0,05$ , artrit grubunda  $0,37\pm0,36$ , artrit+ozon grubunda  $0,51\pm0,04$  olarak bulundu. Artrit grubunun TAS değeri kontrol ve artrit+ozon grubunun TAS değerlerinden farklı bulunmazken; artrit+ozon grubunun TAS değeri kontrol grubundan anlamlı olarak farklı bulundu (Şekil 17).

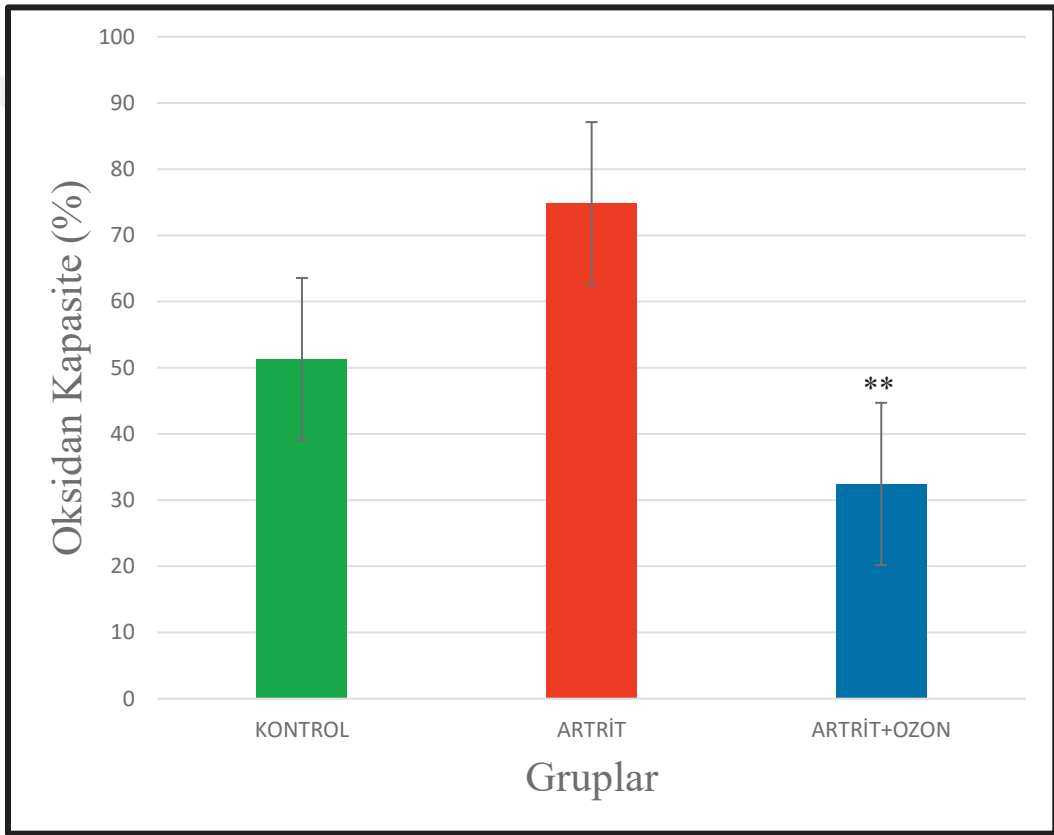


Şekil 17. Grupların total antioksidan kapasitesinin karşılaştırılması. (\*:  $p<0,05$ ; kontrol grubuna göre kıyaslama)



#### 4.10. Oksidatif Stres İndeksi (OSI)'nin Değerlendirilmesi

TOS düzeylerinin TAS düzeylerine oranının yüzde derecesi olarak ifade edilen OSI değerleri analiz edildiğinde kontrol grubu  $51,29 \pm 15,37$  (18,24-115-28), artrit grubu  $74,84 \pm 19,03$  (22,55-172,06), artrit+ozon grubu  $32,43 \pm 11,18$  (7,5-161,18) sonuçları bulundu. Kontrol grubu ile artrit ve artrit+ozon grubunun karşılaştırılmasından anlamlı sonuçlar elde edilmezken; artrit grubu ile artrit+ozon grubu arasındaki fark anlamlı bulundu (Şekil 18).



**Şekil 18.** Grupların TOS düzeylerinin TAS düzeylerine oranının yüzde derecesi olarak ifade edilen OSI değerlerinin karşılaştırılması. (\*\*:  $p < 0,05$  artrit grubuna göre kıyaslama)

## 5. TARTIŞMA

Çalışmamızın temel bulguları, yardımcı tedavi yöntemi olarak kullanılan medikal ozon uygulamasının RA'da görsel klinik skorlamada RA'nın şiddetini artırması, mononükleer kan hücrelerinde DNA hasarında ilave bir hasara neden olmaması ve oksidan hasarı azaltırken antioksidan savunma sistemini güçlendirmesidir.

Biz bu çalışmada sıçanlarda artrit oluşturmak için adjuvan ile uyarılan artrit modelini kullandık. Adjuvan ile uyarılan artrit hayvan modellerinde, RA patogenezinin araştırılmasında ve yeni tedavi yöntemlerinin faydalarının görülmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Kullandığımız yöntem, sinovyal hücrelerin anormal üremesiyle birlikte lokal infiltrasyon ile başlayan ve kıkırdak hasarı ile kronikleşen ve sıkça kullanılan bir RA modelidir (Mateen ve ark., 2016; Riveiro-Naveira ve ark., 2016).

Deneysel artrit modellerinin her birinin avantajları ve dezavantajları olsa da hastalığın uyarılmasında ve kalıcılığında, hümmoral ve hücre aracılı bağışıklığı incelemede en uygun yöntem Complete Freud Adjuvant (CFA)'dır. Bu yöntemde RA gelişimi, kullanılan hayvanın cinsiyetine, uygulama yoluna ve bölgesine, Mycobacterium türlerine ve aşılama sayısına ve aralığına göre değişebilir. Complete Freud Adjuvant artrit modelinin avantajlarından bazıları RA gelişim süresinin kısa olması ve kolay ölçümlerle analiz edilebilmesidir. Adjuvanın neden olduğu artrit modelinin; pannus oluşumu, kıkırdak ve kemik erozyonu, iltihaplanma ve hücre infiltrasyonu gibi patolojik özellikleriyle insan RA'sına benzediği gösterilmiştir (Snehalatha ve ark., 2012; Gomes ve ark., 2013; Gou ve ark., 2018; Grötsch ve ark., 2019). Complete Freud Adjuvant kaynaklı artrit üç aşamada sınıflandırılmıştır; ilk faz; 0 ila 10 gün süren akut ve bağışıklık hücreleri tarafından histamin, serotonin ve prostaglandinin salınması fakat sinovyal inflamasyonun ortaya çıkmadığı uyarılma fazı, ardından ikinci faz; 11-28 gün süren erken sinovit olan ve genellikle çalışmaların başlatıldığı kronik dönem; son olarak; sinovit, infiltrasyon, kıkırdak ve kemik erozyonu eşliğinde ortaya çıkan antiinflatuar dengenin bozulmasıyla oluşan geç sinovit dönemidir (Hasan ve ark., 2018; Saleem ve ark., 2019). İnsan RA'sında da benzer mekanizma söz konusudur; sinovyal zardaki iltihap,

yerel eklem yapılarını tahrip eden pannus oluşumuna yol açmaktadır (Heluany ve ark., 2018).

Çalışmamızda ozonu 20-50 µg/ml dozunda rektal yolla uyguladık. Ozon uygulamasının başka yöntemleri de olmasına karşın literatürde rektal uygulama en yaygın kullanılan yöntemlerden biridir (Bocci ve ark., 2011; Bocci ve ark., 2012; Chen ve ark., 2016). Vücuttaki ROS mekanizmasında rolü olan O<sub>3</sub> gazının rektal uygulamasında, rektum lümeni içinde çok hızlı bir şekilde hidrojen peroksit ve çeşitli lipohidroperoksitler ve alkenaller ürettiği açıklanmıştır. Bunlardan dolayı rektal uygulama kullanılan çalışmalarda ozon gazının optimal şekilde etki ettiği birçok çalışmada gösterilmiştir (Bocci ve ark., 2011d; Mawsouf ve ark., 2011). Nitekim bizim çalışmamızda da ozon uygulanan grupta değerlendirdiğimiz parametrelerde diğer gruplarla farklılıklar saptanması rektal uygulamanın deneklerimizde etkili olduğunu göstermektedir.

Alkali komet yöntemi DNA tek zincir kırıklarını ve DNA'daki abazik bölgeleri tespit edebilen oldukça duyarlı ve güvenilirliği yüksek olan genotoksisite testlerindedir. Analiz sonucu elde edilen % DNAt değeri kırık ya da abazik bölgelerin DNA'da bulunması halinde, sağlam DNA'nın % kaçının kırık ya da abazik bölge olduğunu göstermesi bakımından oldukça objektif olması ve jelin boyanması sonrası oluşabilecek art defektleri ölçüm sonucuna diğer analizlere göre daha az yansıtması nedeniyle en güvenilir parametre olarak görülmektedir (Dusinska ve Collins 2008; Lovell ve Omori 2008; Yüksel, 2017).

Ozon uygulanan ve uygulanmayan artritli sıçan gruplarında pençe çap ölçümünde, ödem oluşumu nedeniyle çalışma sonuna kadar belirgin bir artış gözlenmiştir. Ayrıca ozon uygulanan artritli hayvanların pençe çaplarının uygulanmayan hayvanlara göre istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır. Bununla birlikte eritrosit sedimentasyon hızının (ESR) seviyesi ozon uygulanan sıçanlarda artrit grubuna göre anlamlı olarak daha düşüktü. Halbu ki ESR yangının şiddetiyle orantılı olarak artmakta ve vücuttaki yangı düzeyinin belirlenmesinde bir yöntem olarak kullanılmaktadır. Chen ve ark., (2013) yapmış oldukları çalışmada RA hastalarının % 50'sinde serum ve sinovyal sıvıda TNF-a seviyesinin arttığını göstermiş, yüksek TNF-α seviyesi olan hastalarda daha hızlı ESR olduğunu söylemişlerdir. Gohil ve ark., (2017) çalışmada

ise benzer sonuçlara ulaşılmış; CFA ile oluşturdukları artrit modelinde ESR ve CRP seviyelerinin kontrole göre daha hızlı; RA'nın şiddeti ve ilerlemesiyle aynı yönde olduğunu söylemişler. Çalışmamızda görsel klinik skorlama ve pençe çap ölçümünde ozon ile artrit grupları arasında anlamlı bir fark gözlenmesine rağmen ESR seviyesinde azalma olması çalışmamızın ilginç sonuçlarından biridir. Bu durum RA'lı sıçanlarda ozon uygulamasıyla vücutta süregelen inflamasyonun azalmaya başladığını ifade etmektedir. Yangı şiddetinin azalmasına rağmen klinik skorlamanın buna eşlik etmemesi, ozon tedavisi süresinin, bizim kullandığımız modelde yeterli olmadığını göstermektedir. Eğer daha uzun tedavi protokolleri uygulanırsa ozon uygulamasının klinik görünümde de iyileşmelere neden olması beklenebilir.

Ozon uygulanan grupta klinik görünümle ESR arasındaki uyumsuzluğa benzer bir sonuç histopatolojik skorlamada da gözlenmiştir. Çalışmamızda histopatolojik olarak değerlendirilen kemik rezorbsiyonunda, artrit oluşturulan ve ozon uygulanan artritli sıçan grupları arasında anlamlı bir farklılık bulunmazken, klinik görsel skorlamada pençe şişliğini artırdığı gözlemlendi. Romatoid artritte, iltihaplı sinovyum, eklemlerde bulunan kıkırdak ve kemiğe doğru genişler; bu da kemiğin geri dönüşümsüz aşınmasına ve sakatlanmaya ve eklem yapısının kaybına neden olabilir. Romatoid artrit hastalarda üç farklı kemik hasarı mevcuttur: (1) iltihaplı sinovyum ile doğrudan temas halinde olan eklem kenarlarında lokal kemik erozyonları, (2) iltihaplı eklemlere bitişik periartiküler kemik kaybı ve (3) sistemik osteopeni veya osteoporoz. Hasarların tümünde yüksek osteoklast farklılaşması ve bastırılmış osteoblast aktivitesi aracılık etmektedir. Romatoid artritteki artmış osteoklast aktivitesinin nedenleri çok yönlüdür ve hücrel etkilerden proinflamatuvar sitokinlere ve otoantikorlara kadar uzanır (Harre ve Schett, 2017). Biz çalışmamızda RA patogenezinde, kıkırdak ve kemik yıkımında rol oynayan sitokinlerin düzeylerinin ozon uygulamasıyla nasıl değiştiğini incelemedik. Klinik skorlamanın histopatolojik görünümle uyumsuzluğunun belirlenmesi için hastalık sürecinde rol oynayan sitokinlerin ozon uygulanmasından nasıl etkilendiğini inceleyen ilave çalışmalara gerek vardır.

Çalışmamızın alkali komet analizi sonuçlarına göre kontrol grubunda yer alan sıçanların %DNA<sub>T</sub> değerleri ile artrit grubundaki sıçanların %DNA<sub>T</sub> değerleri arasında anlamlı farklılık bulunurken; ozon uygulamasının DNA hasarı üzerine artrit grubuna ek olarak olumlu ya da olumsuz herhangi bir etkisi gözlenmedi. Yani ozon uygulaması

RA'da saptanan DNA hasarını azaltma ya da artırma şeklinde bir etki göstermedi. Diaz-Llera ve ark., (2002) çalışmalarında ozonun genotoksik etkilerine dair sonuçları, O<sub>3</sub>'ün in vitro insan periferal lökositlerinde DNA hasarını indüklediğini, DNA hasarının DNA iplikçik kopmaları tarafından baskılanmasının muhtemel olduğu ve esas olarak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oluşumuna aracılık ettiğini göstermişlerdir. Diaz-Llera ve ark., (2009) yaptıkları başka bir çalışmada, rektal ozon uygulanan sıçanlarda uygulamadan sonraki ilk 24 saatte lökosit ve kolorektal hücrelerde komet uzunluğunda anlamlı bir artış olduğunu; bununla birlikte 24-72 saat arasında da komet uzunluklarında azalma olduğunu saptamışlardır. Ancak komet uzunluğunun yine de kontrol hücrelerinin düzeyine düşmediğini belirtmişlerdir. Biz çalışmamızda son ozon uygulamasından sonraki 24. saatte komet analizini yaptık. Bundan dolayı ozon uygulamasının komet uzunluğunda artışa yol açması Diaz-Llera ve ark. (2009)'nın çalışmasıyla uyumludur. Fakat artrit oluşturulan ve ozon uygulanmayan grupta da komet uzunluğunun fazla oluşu DNA'daki hasarın ozon uygulanmasından ziyade artrit nedeniyle oluştuğunu göstermektedir. Bu nedenle destekleyici bir tedavi olarak ozon uygulamasının DNA hasarında ek bir artışa neden olmadığını söylemek mümkündür.

Romatoid artrit, kanser, osteoartrit, osteoporoz ve ateroskleroz gibi günümüzde oldukça sık görülen hastalıkların önemli bir nedeni olan oksidatif stres, vücudun oksidan yükü ile antioksidan kaynağı arasındaki dengenin bozulmasıyla ortaya çıktığı ileri sürülmektedir. Yoğun oksidatif stresin, iltihabı artırması, apoptotik hücre ölümünü indüklemesi ve immünolojik toleransı düşürmesi sebebiyle otoimmün hastalıkların patogeneğinde rol oynadığı birçok kaynak tarafından belirtilmiştir (Fernandez ve ark., 2016, Lazzerini ve ark., 2016). Literatürde pek çok bulgu, RA gibi kronik hastaların eklemlerindeki yüksek ROS seviyelerinin ve oksidatif hasarın hastalığın ilerlemesinde önemli rolü olduğunu desteklemektedirler. Çalışmamızda ELISA yöntemiyle değerlendirmiş olduğumuz TAS ve TOS sonuçlarına bakıldığında ozon uygulamasının her ikisi üzerinde de anlamlı değişiklikler yaptığı açıkça görülebilir. Vücuttaki TOS ve TAS değerleri ozon uygulamasından hemen sonra doğrudan kanda ölçülmesi zordur; ozon vücuda verildiğinde yarılanma ömrü kısa olduğundan etkinliğini doğrudan belirlemek mümkün değildir. Bu nedenle, kan ozonlama ile biyolojik uyumun değerlendirilmesinde yararlı olan taşıyıcı markerler, biyomolekül hasarının göstergesinde ve plazma antioksidanlarının onarılmasında rol

almaktadır. Vücuttaki oksidan hasarın göstergesi olarak belirlenen TOS'un ozon uygulamasıyla belirgin olarak azaldığını saptadık. Bunun yanı sıra ozon uygulamasının, vücudun antioksidan savunma sisteminin göstergesi olarak ölçülen TAS'ı ise anlamlı olarak arttırdığını belirledik. TAS ve TOS aktivitelerinin beraber değerlendirilmesiyle elde edilen oksidatif stres indeksi bu sonuçlara uygun olarak ozon uygulanan grupta anlamlı olarak düşük bulundu. Çalışmamızın sonuçları Fernandez ve ark., (2016) çalışmalarında medikal ozonun, RA'lı hastalarda MTX'in tedavi edici etkinliğini artırdığını gösterdikleri çalışmalarıyla uyumludur. Yapılan farklı çalışmalarda O<sub>3</sub>'un bağışıklık yanıtı (anti-CCP) ve oksidatif stresi azaltılmasının yanı sıra klinik durumunda iyileşme gösterilmiştir. Ozon tarafından oksidatif stresin azaltılmasıyla eklem kıkırdağında hasara neden olabilen ROS konsantrasyonlarını düşürmektedir (Fernandez ve ark., 2016). Farklı çalışmalarda da benzer sonuçlara ulaşılmıştır; Uğuz ve ark., (2016) çalışmasında O<sub>3</sub> uygulamasının deneysel böbrek yaralanmasında nitro-oksidatif stresle beraber patolojik bulguların da şiddetini azalttığını belirtmişlerdir. Seven ve ark., (2008), RA tanısı yeni konmuş ve tedavi olarak sadece NSAID alan RA'lı hastalarla yaptıkları çalışmalarının sinovyal sıvı ile ilgili bulgularında, lipid peroksidasyon, protein ve DNA oksidasyon belirteçleri ile gösterilen oksidatif stresin artmış olduğunu belirtmişlerdir. Hemshekhar ve ark. (2017) deneysel artritte inflamatuvar ve oksidatif stres üzerine yaptıkları çalışmada, moleküler inflamasyon ve oksidatif stresin klinik ve histolojik skorları, artrit yapısı özellikleri ve moleküler belirteçlerin deneklerin sakrifikasyon ve ölçüm günlerinde anlamlı bir farklılık göstermediğini belirtmişlerdir. Biz de çalışmamızda artrit oksidan hasarı arttırdığını saptadık. Bu artışın ozon uygulamasıyla önlendiğini ve antioksidan kapasitesinin güçlendiğini belirledik. Buna karşın ozon uygulamasının oksidan hasarı arttırdığına ilişkin çalışmalar da bulunmaktadır. Di Paolo ve ark., (2005) yaptıkları ozon tedavisinin klinik araştırmaları çalışmasında tam kan örneklerinin farklı konsantrasyonlarda ozonlanması sonucu; hem plazma hem de tam kan numunelerinde TAS değerinin zamana ve konsantrasyona bağlı olarak azaldığını göstermişlerdir. Fakat bu çalışmada ozon uygulaması tek bir kere yapılmış olup, hemen sonrasında oluşan oksidan hasar tespit edilmiştir. Biz çalışmamızda ozon uygulamasını üç hafta boyunca devam ettirdik. Bu durumda tekrarlayan ozon uygulamalarının antioksidan kapasiteyi güçlendirerek oksidan hasarı azalttığını

söylemek mümkündür. Biz araştırmamızda ozon uygulamasının antioksidan kapasiteyi hangi hücre içi yolakları kullanarak artırdığına ilişkin bir çalışma yapmadık. Delgado-Roche ve ark. (2017) ozon çalışmalarında, multitipl skleroz hastalarının mononükleer hücrelerinde  $N_2F_2$  fosforilasyonu ile birlikte CK2 ekspresyonunu arttırdığını; bu bulguların ozonun antioksidan ve antiinflamatuvar etkilerinin kısmen de olsa Nrf2 fosforilasyonunun ve aktivasyonunun indüksiyonu ile ilişkili olabileceğini göstermişlerdir. Ozon uygulamasının antioksidan savunma sistemini hangi mekanizmalarla arttırdığına ilişkin ilave çalışmalara gerek vardır.



## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Deneysel RA üzerinde ozon uygulamasının etkilerine baktığımızda; kullandığımız modeldeki O<sub>3</sub> dozu için; O<sub>3</sub>'nun rektal yolla verilmesinin herhangi bir sakıncası olmadığı ifade edilebilir. Ozon uygulamasının mononükleer kan hücrelerinde DNA hasarında RA'ya ilave bir hasar oluşturmadığını; RA'lı ve O<sub>3</sub> uygulanan grupların klinik görünümünde anlamlı bir fark olmadığı söylenebilir. Bununla birlikte RA'daki ESR seviyesi yangının şiddetiyle aynı yönde artarken, O<sub>3</sub> uygulanan gruplarda ESR seviyesinin düşüşü göze çarpmıştır. Vücuttaki oksidan hasarın göstergesi olarak belirlenen TOS'un ozon uygulamasıyla belirgin olarak azaldığını; bunun yanı sıra vücudun antioksidan savunma sisteminin göstergesi olarak ölçülen TAS'ı ise anlamlı olarak arttırdığını belirledik. Çalışmamızda başka bir parametre olan kemik rezorbsiyonunda, artrit oluşturulan ve ozon uygulanan artritli sıçan grupları arasında anlamlı bir farklılık bulunmazken, bu durumu klinik görsel skorlamada pençe çap ölçümüyle de destekledik.

Çalışmamızın sonucuna göre eğer daha uzun tedavi protokolleri uygulanırsa ozon uygulamasının klinik görünümde iyileşmelere neden olması beklenmektedir. Konu ile ilgili çalışmaların yeterli ve açıklayıcı olmaması, farklı ozon dozlarının ortaya çıkarabileceği etkilerin bilinmemesi nedeniyle bu konuyla ilgili farklı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.



## 7. KAYNAKLAR

Afanasieva K, Sivolob A. Physical principles and new applications of comet assay. *Biophysical Chemistry*. 2018; 238;1-7.

Akar S, Birlik M, Gurler O, Sari I, Onen F, Manisali M, Tirpan K, Demir T, Meral M, Akkoc N. The Prevalence Of Rheumatoid Arthritis İn An Urban Population Of Izmir-Turkey. *Clin Exp Rheumatol*. 2004;22(4): 416-20.

Akdoğan M, Akku S, Akku F, Koyu A. Romatoid artrit ve osteoartrozlu hastalarda eritrosit süperoksit dismutaz, glutasyon peroksidaz ve katalaz enzim düzeyleri. *Van Tıp Dergisi*, 1998; 5(2): 66-71.

Aletaha D, Alasti F, Smolen JS. Rheumatoid factor determines structural progression of rheumatoid arthritis dependent and independent of disease activity. *Clinical and Epidemiological Research*. 2013; 72(6): 875-880.

Aletaha D, Smolen JS. Diagnosis and management of rheumatoid arthritis. *JAMA*. 2018; 320(13): 1360-1372.

Alnajjar KS, Sweasy JB. A New perspective on oxidation of DNA repair proteins and cancer. *DNA Repair*. 2019; 1568-7864 (18); 30306-9.

Altan L, Bingöl Ü, Sağırkaya Z, Sarandöl A, Yurtkuran M. Romatoid artritli hastalarda anksiyete ve depresyon. *Romatizma*. 2004; 19 (1); 6-13.

Atmaca E, Aksoy A. Oksidatif DNA hasarı ve kromatografik yöntemlerle tespit edilmesi. *YYU Veteriner Fakültesi Dergisi*. 2009; 20(2): 79-83.

Azqueta A, Rundén-Pran E, Elje E, Nicolaisen B, Berg KH, Smeringaiova I, Jirsova K, Collins AR. The comet assay applied to cells of the eye. *Mutagenesis*. 2018; 33(1): 21-24.

Babuççu O. OzonTerapi: Mit ve gerçek ozone therapy. *Plastik Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Dergisi*. 2011; 19 (3), 105-112.

Bedir A, Bilgici B, Yurdakul Z, Gürsel BŞ, Alvur M. DNA hasarı analizinde  $\mu$ -FADU ve COMET yöntemlerinin karşılaştırılması. *Türk Klinik Biyokimya Dergisi*. 2004; 2(3): 97-103.

Bewick A, Vogel K, Moore A, Schmitz R. Evolution of DNA methylation across insects. *MBE Advance Access*. 2017; 1; 34(3); 654-665.

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 Inflammation*. 2007; 1-6.

Bocci V, Borrelli E, Travagli V, Zanardi L. The ozone paradox: Ozone is a strong oxidant as well as a medical drug. *Medicinal Research Reviews*. 2009; 29(4), 646-682.

Bocci V, Zanardi I, Travagli V. A New Therapeutic Agent in Vascular Diseases. *Am J Cardiovasc Drugs* 2011a; 11(2): 73-82.

Bocci V, Zanardi I, Borrelli E, Travagli V. Reliable and effective oxygen-ozone therapy at a crossroads with ozonated saline infusion and ozone rectal insufflation. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2012; 64(4): 482-489.

Bocci V, Zanardi I, Huijberts MSP, Travagli V. An integrated medical treatment for type-2 diabetes. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*. 2014; 8(1): 57-61.

Bocci V, Zanardi I, Huijberts MSP, Travagli V. Diabetes and chronic oxidative stress. A perspective based on the possible usefulness of ozone therapy. *Diabetes and Metabolic Syndrome: Clinical Research and Reviews*. 2011e; 5: 45-49.

Bocci V, Zanardi I, Travagli V. Important details to be clarified about the effect of rectal ozone on the portal vein oxygenation. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 2011d; 72(2): 350-351.

Bocci V, Zanardi I, Travagli V. Oxygen/ozone as a medical gas mixture. A critical evaluation of the various methods clarifies positive and negative aspects. *Medical Gas Research*. 2011b; 1-6.

Bocci V. Is it true that ozone is always toxic? The end of a dogma. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2006b; 216: 493-504.

Bocci V. Scientific and medical aspects of ozone therapy. State of the art. *Archives of Medical Research*. 2006a; 37: 425-435.

Bocci V. Tropospheric ozone toxicity vs. usefulness of ozone therapy. *Archives of Medical Research*. 2007; 38: 265-267.

Bocci VA, Zanardi I, Travagli V. Ozone acting on human blood yields a hormetic dose-response relationship. *Journal of Translational Medicine*. 2011c; 9:1-11.

Burmester GR, Bijlsma JWJ. *EULAR Textbook on Rheumatic Diseases, Introductory aspects of rheumatoid arthritis*. 2012; 2th edition, London UK, p:3-83.

Chang JDS, Lu HS, Chang YS. Ameliorative effect of ozone on cytokine production in mice injected with human rheumatoid arthritis synovial fibroblast cells. *Rheumatol Int*. 2005; 2; 142-151.

Chatterjee N, Walker GC. *Mechanisms of DNA damage, repair and mutagenesis. Environmental and Molecular Mutagenesis*. 2017.

Chen H, Yu B, Lu C, Lin Q. The Effect of intra-articular injection of different concentrations of ozone on the level of TNF- $\alpha$ , TNF-R1, and TNF-R2 in rats with rheumatoid arthritis. *Rheumatol International*. 2013; 33(5): 1223-1227.

Chen Z, Liu X, Yu G, Chen H, Wang L, Wang Z, Qiu T, Weng X. Ozone therapy ameliorates tubulointerstitial inflammation by regulating TLR4 in adenine-induced CKD rats. *Renal Failure*. 2016; 38(5): 822-830.

Collins A, Koppen G, Valdiglesias V, Dusinska M, Kruszewski M, Moller P, Rojas E, Dhawan A, Benzie I j, Coskun E, Moretti M, Speit G, Bonassi S. The comet assay as a tool for human biomonitoring studies: The ComNet project. *Mutation Research*. 2014; 759: 27-39.

Çakır DÜ, Paşaoğlu H (Ed.). *Temel/Klinik biyokimya*. Ankara: Pelikan Yayınevi, 2017.

Debeleş-Bütüner B, Kantarcı G. Mutasyon, DNA hasarı, onarım mekanizmaları ve kanserle ilişkisi. *Ankara Eczacılık Fakültesi Dergisi*. 2006; 35 (2) 149 - 170.

Dekkers JJ, Toes REM, Huizinga TWJ, Van Der Woude D. The role of anticitrullinated protein antibodies in the early stages of rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol*. 2016; 28(3): 275-281.

Delgado-roche L, Riera-romo M, Mestab F, Hernández-Matosc Y, Barriosd JM, Martínez-Sánchez G, Al-Dalaien SM. Medical ozone promotes Nrf2 phosphorylation reducing oxidative stress and pro-inflammatory cytokines in multiple sclerosis patients. *European Journal of Pharmacology*. 2017; 811: 148-154.

Derksen VFAM, Huizinga TWJ, van der Woude D. The role of autoantibodies in the pathophysiology of rheumatoid arthritis. *Semin Immunopathol*. 2017; 39(4): 437-446.

Diraçoğlu D. Ozone–oxygen therapies in musculoskeletal diseases. *Türkiye Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon Dergisi*. 2016; 62(2):183-191.

Di Paolo N, Bocci V, Gaggiotti E. Ozone therapy. *The International Journal of Artificial Organs*. 2004; 27: 168-175.

Di Paolo N, Gaggiotti E, Galli F. Extracorporeal blood oxygenation and ozonation : clinical and biological implications of ozone therapy. *Redox Report*. 2005; 1-3.

Diaz-Llera S, González-Hernandez Y, Gonzalez Mesa JE, Martinez-Sanchez G, Re L. Induction of DNA primary damage in peripheral blood leukocytes and exfoliated colorectal epithelial cells in rats treated with ozone. *International Journal of Ozone Therapy*. 2009; 8: 217-221.

Diaz-Llera S, González-Hernández Y, Prieto-González EA, Azoy A. Genotoxic effect of ozone in human peripheral blood leukocytes. *Mutation Research*. 2002; 517: 13-20.

Dinçer Y, Akçay T. DNA hasarı. *Türk Biyokimya Dergisi*. 2000; 25 (2).

Dinçer Y, Kankaya S. DNA hasarının belirlenmesinde comet assay. *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 2010;30(4), 1365-73.

Dizdaroglu M, Coskun E, Jaruga P. Measurement of oxidatively induced DNA damage and its repair, by mass spectrometric techniques. *Free Radical Research*. 2015; 49(5): 525-548.

Dizdaroglu M. Oxidatively induced DNA damage and its repair in cancer. *Mutation Research*. 2015; 763: 212-245.

DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annual Review of Biochemistry*. 2004; 73: 39-85.

Dusinska M, R. Collins AR. The comet assay in human biomonitoring: Gene-environment. interactions. *Mutagenesis*. 2008; 23: 191-205.

Espina MT, Gabarrini G, Harmsen HJM, Westra J, Winkelhoff AJ, Dijk JM. Talk to your gut: the oral-gut microbiome axis and its immunomodulatory role in the etiology of rheumatoid arthritis. *FEMS Microbiol Review*. 2019; 1; 43(1); 1-18.

Gohil P, Patel V, Deshpande S, Chorawala M. Anti-arthritic activity of cell wall content of *Lactobacillus plantarum* in Freund's adjuvant-induced arthritic rats: involvement of cellular inflammatory mediators and other biomarkers. *Inflammopharmacology*. 2018; 26(1): 171-181.

Gou K, Zeng R, Ren X, Dou QL, Yang QB, Qu Y. PT graphical abstract. *European Federation of Immunological Societies. Immunology Letters*. 2018; 0165-2478(18); 30427-9.

Grotsch B, Bozec A, Schett G. In vivo models of rheumatoid arthritis. *Bone Research Protocols, Methods in Molecular Biology*. 2019; 1914: 269-280.

Habiba HU, Alamgeer H, Shahzad M, Jahan S, Niazi ZR, Bukhari IA, Assiri AM, Riaz H. Inhibitory effects of *Clematis orientalis* aqueous ethanol extract and fractions on inflammatory markers in complete Freund's adjuvant-induced arthritis in Sprague-Dawley rats. *Inflammopharmacology*. 2019; 27(4); 781-797.

Hakem R. DNA-damage repair; the good, the bad, and the ugly. *The European Molecular Biology Organization Journal*. 2008; 27: 589-605.

Harris ED, Budd RC, Genovese MC, Firestein GS, (Eds). *Kelly's textbook of rheumatology. Kelly's Romatoloji, 7. Baskı, Araslı T, Öncü Basımevi, Ankara, 2006: 996-1100.*

Harvey RA, Champe PC, Ferrier DR, (Eds). *From Lippincott's illustrated reviews series: biochemistry, 5. Baskı, Ulukaya E, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2014.*

Hayashi M. The micronucleus test-most widely used in vivo genotoxicity test. *Genes and Environment*. 2016;38(1):4-9.

Heluany CS, Kupa L de VK, Viana MN, Fernandes CM, Farsky SHP. Hydroquinone exposure worsens the symptomatology of rheumatoid arthritis. *Chemico-Biological Interactions*. 2018; 291: 120-127.

Hemsherkar M, Anaparti V, Hitchon C, Mookherjee N. Buprenorphine alters inflammatory and oxidative stress molecular markers in arthritis. *Mediators of Inflammation*. 2017.

İzmirli M, Tufan T, Alptekin D. DNA metilasyonu. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*. 2012; 21(4), 274-282.

Jahagirdar R, Attwell S, Marusic S, Bendele A, Shenoy N, McLure KG, Gilham D, Norek K, Hansen HC, Yu R, Tobin J, Wagner GS, Young PR, Wong NCW, Kulikowski E. RVX-297, a BET bromodomain inhibitor, has therapeutic effects in preclinical models of acute inflammation and autoimmune disease. *Molecular Pharmacology*. 2017; mol.117.110379.

Jethwa H, Lam S, Smith C, Giles I. Does rheumatoid arthritis really improve during pregnancy? A systematic review and metaanalysis. *J Rheumatol*. 2018; jrheum.180226.

Karaman A, Binici DN, Melikoğlu MA. Comet assay and analysis of micronucleus formation in patients with rheumatoid arthritis. *Mutation Research* 721 (2011) 1–5.

Kaya A, Sönmez M, Kar T, Aptullah HMD, Yıldırım Y, Müftüoğlu T, Ünal MH. Efficiency of ozone therapy in a rat model of experimental uveitis. *Ocular Immunology and Inflammation*. 2017; 25(5): 695-700.

Kesikburun S, Yaşar E. Ozon tedavisi. *TOTBID Dergisi*. 2017; 16(3): 196-202.

Kim M, Costello J. DNA methylation: an epigenetic mark of cellular memory. *Experimental & Molecular Medicine*. 2017; 49: 322-8.

Kitao H, Iimori M, Kataoka Y, Wakasa T, Tokunaga E, Saeki H, Oki E, Maehara Y. DNA replication stress and cancer chemotherapy. *Wiley Cancer Science*. 2017; (November): 1-8.

Klug WS, Cummings MR. *Genetik kavramlar*. 2003. 6. Baskı, Öner C, Palme Yayıncılık.

Koppen G, Azqueta A, Pourrut B, Brunborg G, Collins AR, Langie SAS. The next three decades of the comet assay: A report of the 11th international comet assay workshop. *Mutagenesis*. 2017; 32(3): 397-408.

Kulaksız G, Sancar A. Nükleotid eksizyon onarımı ve kanser. *Türk Biyokimya Dergisi*. 2007; 32 (3); 104–111.

Kurtoğlu EL, Tekedereli İ. DNA onarım mekanizmaları. *Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi*. 2015; 4(3).

Kutlubay UZ, Engin UB, Serdaroğlu PS, Tüzün PY. Dermatolojide ozon tedavisi. *Dermatoz*. 2010; 1(4): 209-216.

Lazzerini PE, Capecchi PL, Laghi-Pasini F. Systemic inflammation and arrhythmic risk: Lessons from rheumatoid arthritis. *European Heart Journal*. 2016; 38(22): 1717-1727.

Lee H, Bose A, Lee C, Opresko PL, Myong S. Molecular mechanisms by which oxidative DNA damage promotes telomerase activity. *Nucleic Acids Research*. 2017; 1-14.

Lin B, Zhang H, Zhao XX, Rahman K, Wang Y, Ma XQ, Zheng CJ, Zhang QY, Han T, Qin LP. Inhibitory effects of the root extract of *Litsea cubeba* (lour.) pers. on adjuvant arthritis in rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 2013; 147(2): 327-334.

Lin B, Zhao Y, Han P, Yue W, Ma X, Rahman K, Zheng C, Qin L, Han T. Anti-arthritic activity of *Xanthium strumarium* L. Extract on complete Freund's adjuvant induced arthritis in rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 2014; 155(1): 248-255.

Liu J, Guiadeen D, Krikorian A, Gao X, Wang J, Boga SB, Alhassan AB, Yu Y, Vaccaro H, Liu S, Yang C, Wu H, Cooper A, Man J, Kaptein A, Maloney K, Hornak V, Gao YD, Fischmann TO, Raaijmakers H, Vu-Pham D, Presland J, Mansueto M, Xu Z, Leccese E, Zhang-Hoover J, Knemeyer I, Garlisi CG, Bays N, Stivers P, Brandish P, Hicks A, Kim R, Kozlowski JA. Discovery of 8-Amino-imidazo[1,5-a] pyrazines as Reversible BTK inhibitors for the treatment of rheumatoid arthritis. *ACS Med Chem Letters*. 2015; 7(2): 198-203.

Lovell DP, Omori T. Statistical issues in the use of the comet assay. *Mutagenesis*. 2008; 23: 171-182.

Ma MHY, Kingsley GH, Scott DL. A systematic comparison of combination DMARD therapy and tumour necrosis inhibitor therapy with methotrexate in patients with early rheumatoid arthritis. *Rheumatology*. 2010; 49(1): 91-98.

Majtnerová P, Roušar T. An overview of apoptosis assays detecting DNA fragmentation. *Molecular Biology Reports*. 2018; 45(5): 1469-1478.



Manning VL, Hurley M V, Scott DL, Coker B, Choy E. Education, Self-Management, and upper extremity exercise training in people with rheumatoid arthritis: A randomized controlled trial. *Arthritis Care & Research*. 2014; 66(2): 217-227.

Martin CL, Warburton D. Detection of chromosomal aberrations in clinical practice: From karyotype to genome sequence. *GG16CH07-Martin ARI*. 2015; 16(1): 309-326.

Mateen S, Moin S, Khan AQ, Zafar A, Fatima N. Increased reactive oxygen species formation and oxidative stress in rheumatoid arthritis. *PLoS One*. 2016; 11(4):1-15.

Mawsouf MN, El-Sawalhi MM, Martínez-Sánchez G, Darwish HA, Shaheen AA, Re L. Effect of ozone therapy on redox status in experimentally induced arthritis. *Int J Ozone Ther*. 2011; 9(1): 7-13.

Mazouzi A, Velimezi G, Loizou J. DNA replication stress: Causes, resolution and disease. *Experimental Cell Research*. 2014; 329: 85-93.

McDorman KS, Pachkowski BF, Nakamura J, Wolf DC, Swenberg JA. Oxidative DNA damage from potassium bromate exposure in Long-Evans rats is not enhanced by a mixture of drinking water disinfection by-products. *Chemico-Biological Interactions*. 2005; 107–117.

Morita R, Nakane S, Shimada A, Inoue M, Iino H, Wakamatsu T, Fukui F, Nakagawa N, Masui R, Kuramitsu S. Molecular mechanisms of the whole DNA repair system: A comparison of bacterial and eukaryotic systems. *Journal of Nucleic Acid*. 2010.

Müftüoğlu M. DNA tamiri ve erken yaşlanma sendromları. *Türk Biyokimya Dergisi*. 2003; 28 (1); 20-24.

Newbould BB. Chemotherapy of arthritis induced in rats by mycobacterial adjuvant. *Brit. J. Pharmacol*. 1963; 21, 127-136.

Onur E, Tuğrul B, Bozyiğit F. DNA hasarı ve onarım mekanizmaları. *Türk Klinik Biyokimya Dergisi* 2009; 7(2): 61-70

Özler M, Öter Ş, Korkmaz A. Ozon gazının tıbbi amaçlı kullanılması. *TAF Preventive Medicine Bulletin*. 2009; 8(1): 59-64.

Özsoy MH, Altinel L, Başarıır K, Çavuşoğlu AT, Dinçel VE. Romatoid artritte eklem hastalığının patogenezi. *TOTBİD (Türk Ortopedi ve Travmatoloji Birliği Derneği) Dergisi*. 2006: 3-4.

Raslan HM, Attia HR, Salama I, Ibrahim MH, Hassan EM, El Hussieny MS, El Menyawi MM, Amr KS. Association of PTPN22 1858C→T polymorphism, HLA-DRB1 shared epitope and autoantibodies with rheumatoid arthritis. *Rheumatol International*. 2016; 36(8): 1167-1175.

Riveiro-naveira RR, Valca MN, Almonte-becerril M, Vaamonde-García C, Loureiro J, Hermida-Carballo L, López-Peláez E, Blanco FJ, López-Armada MJ. Resveratrol lowers synovial hyperplasia, inflammatory markers and oxidative damage in an acute antigen-induced arthritis model. *Rheumatology Advance Access*. 2016; 55(10): 1889-900

Saleem A, Saleem M, Furqan M, Muhammad A, Shah S. *Moringa rivae* leaf extracts attenuate Complete Freund's adjuvant-induced arthritis in Wistar rats via modulation of inflammatory and oxidative stress biomarkers. *Inflammopharmacology*. 2019.

Salem EA, Salem NA, Hellstrom WJ. Therapeutic effect of ozone and rutin on adriamycin- induced testicular toxicity in an experimental rat model. *First International Journal of Andrology* 2016; 1-7.

Salem NA, Assaf N, Ismail MF, Khadrawy YA, Samy M. Ozone therapy in Ethidium Bromide-induced demyelination in rats: Possible protective effect. *Cell Mol Neurobiol.* 2016; 36(6): 943-954.

Sancar A, Lindsey-Boltz LA, Ünsal-Kaçmaz K, Linn S. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annual Review of Biochemistry.* 2004; 73: 39-85.

Schulze MSED, Wucherpfennig KW. The mechanism of HLA-DM induced peptide exchange in the MHC class II antigen presentation pathway. *Current Opinion in Immunology.* 2012; 24(1): 105-111.

Seven A, Güzel S, Aslan M, Hamuryudan V. Lipid, protein, DNA oxidation and antioxidant status in rheumatoid arthritis. *Clinical Biochemistry.* 2008; 41: 538-543.

Shimizu I, Yoshida Y, Suda M, Minamino T. Review DNA damage response and metabolic disease. *Cell Metabolism.* 2014; ;20(6); 967-77.

Slupphaug G, Kavli B, Krokan HE. The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage. *Mutation Research.* 2003; 531(1-2); 231–51

Smeaton MB, Hlavin EM, Mason TMG, Noronha AM, Wilds CJ, Miller PS. Distortion-dependent unhooking of interstrand cross-links in mammalian cell extracts. *Biochemistry.* 2008; 47: 9920-9930.

Smith N, Wilson A, Gandhi J, Vatsia S, Khan S. Ozone therapy: An overview of pharmacodynamics, current research, and clinical utility. *Med Gas Research.* 2017; 7(3): 212.

Snehalatha U, Anburajan M, Venkatraman M, Menaka M. Evaluation of complete Freund's adjuvant-induced arthritis in a Wistar rat model. *Zeitschrift für Rheumatologie.* 2013; 72; 375-382.

León Fernández OS, Viebahn-Haensler R, Cabreja GL, Espinosa IS, Matos YH, Roche LD, Santos BT, Oru GT, Polo Vega JC. Medical ozone increases methotrexate clinical response and improves cellular redox balance in patients with rheumatoid arthritis. *European Journal of Pharmacology.* 2016; 789: 313-318.

Şekeroğlu V, Atlı-Şekeroğlu Z. Genotoksik hasarın belirlenmesinde mikronükleus testi. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi.* 2011; 68(4): 241-52.

Şen M, Ay U, Tüzün E, Küçükali Cİ. Nörodejeneratif hastalıklara DNA onarım mekanizmalarının rolü. *Deneysel Tıp Dergisi.* 2017; 7(13), s: 47-58.

T.C. Resmi Gazete, geleneksel ve tamamlayıcı tıp uygulamaları yönetmeliği, 27 Ekim 2014, Sayı: 29158.

Travagli V, Zanardi I, Bernini P, Nepi S, Tenori L, Bocci V. Effects of ozone blood treatment on the metabolite profile of human blood. *International Journal of Toxicology.* 2010; 29(2):165-174.



Travagli V, Zanardi L, Silvietti A, Bocci V. A physicochemical investigation on the effects of ozone on blood. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2007; 41: 504-511.

Trowsdale J. The MHC, disease and selection. *Immunology Letters*. 2011; 137(1-2): 1-8.

Uğuz S, Demirer Z, Uysal B, Alp BF, Malkoc E, Guragac A, Turker T, Ateş F, Karademir K, Ozcan A, Yildirim I, Korkmaz A, Guven A. Medical ozone therapy reduces shock wave therapy-induced renal injury. *Renal Failure*. 2016; 38(6): 974-81

Viebahn-Hänsler R, Fernández OS, Fahmy Z. Ozone in medicine: The low-dose ozone concept-guidelines and treatment strategies. *Ozone: Science and Engineering*, 34: 408–424.

Vijayalakshmi T, Muthulakshmi V, Sachdananda P. Effect of the Milk Extract of *Semecarpus anacardium* Nut on Adjuvant Arthritis A Dose-Dependent Study in Wistar Albino Rats. *Gen. Pharmac.* 1996; 27 (7); 1223-1226.

Wahba MGF, Messiha BAS, Abo-saif AA. Protective effects of fenofibrate and resveratrol in an aggressive model of rheumatoid arthritis in rats. *Pharmaceutical Biology*. 2016; 0209(May).

Walker GC. SOS regulated proteins in translesion DNA synthesis and mutagenesis. *TIBS* 20-October 1995.

Wua S, Li Y, Li Y, Yao L Lin T, Jiang S, Shen H, Xia L, Lu J. Interleukin-35 attenuates collagen-induced arthritis through suppression of vascular endothelial growth factor and its receptors. *Int Immunopharmacol*. 2016; 34: 71-77.

Yalçın B. Major doku uygunluk kompleksi (MHC) molekülleri: Genel özellikleri ve hastalıklarla ilişkisi. *Türkderm Deri Hastalıkları ve Frengi Arşiv Dergisi*. 2013; 47 (EK.1);12-17.

Yüksel P. Romatoid artritli hastalardan elde edilen kan örneklerine ozon uygulamasının DNA hasarına etkisi. 2017, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek lisans tezi, 89 sayfa, Çanakkale, (Prof. Dr. Mustafa EDREMITLİOĞLU)

## 8. EKLER

### 8.1. Etik Kurul Formu




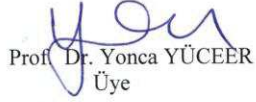
T.C.  
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ  
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

#### HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURUL KARARI

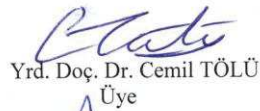
TOPLANTI TARİHİ	:27.03.2017
TOPLANTI SAYISI	:2017/04
DOSYA KAYIT NUMARASI	:2017/10062
KARAR NUMARASI	:2017/04-10
YARDIMCI ARAŞTIRMACILAR	:Kübra MAZLUM, Yrd. Doç. Dr. Hakan TÜRKÖN, :Yrd. Doç. Dr. Coşkun ZATERİ, Doç. Dr. Nihal :KILINÇ, Pınar YÜKSEL, Ufuk DEMİR
HAYVAN TÜRÜ VE SAYISI	:Wistar albino cinsi sıçan-60 adet

Prof. Dr. Mustafa EDREMİTLİOĞLU, tarafından Etik Kurulumuza sunulan "Deneysel Artritte Steroid Ve Ozon Uygulamasının Etkilerinin Karşılaştırılması" başlıklı proje Hayvan Deneylerine ilişkin mevzuatın emirleri doğrultusunda incelenerek, ilgili mevzuat hükümleri çerçevesinde Hayvan Deneyleri Etiği açısından uygun olduğuna; oybirliği ile karar verilmiştir.

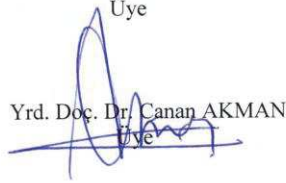
  
Prof. Dr. Ali İŞMEN  
Üye  
(Başkan)

  
Prof. Dr. Yonca YÜCEER  
Üye

Doç. Dr. Murat TOSUNOĞLU  
Üye  
(Görevli-İzinli)

  
Yrd. Doç. Dr. Cemil TÖLÜ  
Üye

  
Yrd. Doç. Dr. Başak BÜYÜK  
Üye

  
Yrd. Doç. Dr. Canan AKMAN  
Üye

  
Vet. Hek. Saif ELMAS  
Üye

Tayfun TAŞBİLEK  
Sivil Üye



Erdoğan GÜRSEL  
Sivil Üye



**Ek.9.****SPİRALLİ TEZ KONTROL FORMU**

	<b>Evet</b>	<b>Hayır</b>
1) Amblem renkli ve 2x2 cm boyutunda olmalıdır.	✓	
2) Kapakta sadece başlık bold ve 14 punto, diğer yazılar normal renkte ve 12 punto yazılmalıdır.	✓	
3) Tez savunma sınavında kabul edilmiş tezler için, tezin sırtı tez yazım kılavuzuna uygun olarak düzenlenmiş olmalıdır.	✓	
4) Kabul edilmiş tez konusu ile tezin baş sayfasındaki tez konusu aynı olmalıdır.	✓	
5) Beyan eksiksiz ve imzalı olarak Tez Yazım Kılavuzundaki gibi konmalıdır.	✓	
6) Özet ve Summary 250'şer kelimeyi aşmamalıdır. (1 sayfa)	✓	
7) Anahtar kelimeler (en fazla) 5 adet olmalıdır.	✓	
8) İngilizce özetin başında konu başlığı yazılmalıdır.	✓	
9) Metin ve kaynakların tümü 1,5 aralıklı olmalıdır.	✓	
10) Tezde yazım karakteri olarak "Times New Roman" kullanılmalıdır.	✓	
11) Web sayfa kaynakları metin içinde de geçmelidir (parantez içinde güncelleme tarihi ile birlikte). Kaynaklar bölümünde de cümlelerin en sonunda Erişim adresi ve Erişim tarihi sırasıyla verilmelidir.	✓	
12) Çalışmanın Etik Kurul onayı, varsa kurum onayı tezin en arkasına konmalıdır.	✓	

Tarih: 07.08/2019 Öğrenci Adı ve Soyadı, Kubra Kozlu İmza	Tarih: 07.08/2019 Danışmanın Adı ve Soyadı, Prof. Dr. Mehmet Kaya İmza
---	---

Edvart Kaya

**ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ**  
**SAGLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ SİRALLI/CİLTLI**  
**TEZ YAZIM KONTROL LİSTESİ**

KONTROL BAŞLIĞI	ÖĞRENCİ	DANIŞMAN
Tez yazımında kullanılan yazı tipi	<input checked="" type="checkbox"/> UYGUN	<input checked="" type="checkbox"/> UYGUN
Sayfa kenar boşlukları	<input checked="" type="checkbox"/> UYGUN	<input checked="" type="checkbox"/> UYGUN
Kapak sayfası düzeni	<input checked="" type="checkbox"/> UYGUN	<input checked="" type="checkbox"/> UYGUN
İç kapak sayfası düzeni	<input checked="" type="checkbox"/> UYGUN	<input checked="" type="checkbox"/> UYGUN
Onay sayfası düzeni	<input checked="" type="checkbox"/> UYGUN	<input checked="" type="checkbox"/> UYGUN
Beyan sayfası içeriği ve düzeni	<input checked="" type="checkbox"/> UYGUN	<input checked="" type="checkbox"/> UYGUN
İçindekiler sayfası düzeni	<input checked="" type="checkbox"/> UYGUN	<input checked="" type="checkbox"/> UYGUN
Teşekkür sayfası	<input checked="" type="checkbox"/> UYGUN	<input checked="" type="checkbox"/> UYGUN
Türkçe özet	<input checked="" type="checkbox"/> UYGUN	<input checked="" type="checkbox"/> UYGUN
İngilizce özet	<input checked="" type="checkbox"/> UYGUN	<input checked="" type="checkbox"/> UYGUN
Simgeler ve kısaltmalar dizini	<input checked="" type="checkbox"/> UYGUN	<input checked="" type="checkbox"/> UYGUN
Şekiller dizini	<input checked="" type="checkbox"/> UYGUN	<input checked="" type="checkbox"/> UYGUN
Tablolar dizini	<input checked="" type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Tezin ön sayfalarının sıralaması	<input checked="" type="checkbox"/> UYGUN	<input checked="" type="checkbox"/> UYGUN
Ön sayfaların numaralandırılması	<input checked="" type="checkbox"/> UYGUN	<input checked="" type="checkbox"/> UYGUN
Sayfalarının numaralandırılması	<input checked="" type="checkbox"/> UYGUN	<input checked="" type="checkbox"/> UYGUN
Başlıklarının numaralandırılması	<input checked="" type="checkbox"/> UYGUN	<input checked="" type="checkbox"/> UYGUN
Şekil, resim ve tablo numaralandırması	<input checked="" type="checkbox"/> UYGUN	<input checked="" type="checkbox"/> UYGUN
Yöntem ve Gereç	<input checked="" type="checkbox"/> UYGUN	<input checked="" type="checkbox"/> UYGUN
Bulgular	<input checked="" type="checkbox"/> UYGUN	<input checked="" type="checkbox"/> UYGUN
Tartışma	<input checked="" type="checkbox"/> UYGUN	<input checked="" type="checkbox"/> UYGUN
Sonuç ve Öneriler	<input checked="" type="checkbox"/> UYGUN	<input checked="" type="checkbox"/> UYGUN
Kaynaklar	<input checked="" type="checkbox"/> UYGUN	<input checked="" type="checkbox"/> UYGUN
Atıflar (alıntı ve göndermeler)	<input checked="" type="checkbox"/> UYGUN	<input checked="" type="checkbox"/> UYGUN
Ekler (etik kurul onayı, vs)	<input checked="" type="checkbox"/> UYGUN	<input checked="" type="checkbox"/> UYGUN
Tez planı	<input checked="" type="checkbox"/> UYGUN	<input checked="" type="checkbox"/> UYGUN
Dil (anlatım, yazım –imla)	<input checked="" type="checkbox"/> UYGUN	<input checked="" type="checkbox"/> UYGUN
Kâğıt ve baskı özelliği	<input checked="" type="checkbox"/> UYGUN	<input checked="" type="checkbox"/> UYGUN
Tezin son şeklinin elektronik kopyası	<input checked="" type="checkbox"/> UYGUN	<input checked="" type="checkbox"/> UYGUN
Tarih: 07.08/20..19	Tarih: 07.08/20..19	
Öğrenci Adı ve Soyadı, Kübra Nurlan İmza	Danışmanın Adı ve Soyadı, Prof. Dr. Mustafa Ednotbeyo İmza	

## 8.4. Özgeçmiş

### Kişisel Bilgiler

<b>Adı</b>	Kübra			<b>Soyadı</b>	MAZLUM
<b>Doğum Yeri</b>	Bilecik	<b>Uyruğu</b>	T.C.	<b>Doğum Tarihi</b>	04.01.1993
<b>E-mail</b>	<a href="mailto:kubra.mazlum.km@gmail.com">kubra.mazlum.km@gmail.com</a>			<b>Tel</b>	507-569-39-70

### Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
<b>Doktora/Uzmanlık</b>		
<b>Yüksek Lisans</b>		
<b>Lisans</b>	Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi	2015

### İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1. Acil Tıp Teknisyeni	Sağlık Bakanlığı	7
2.		-

### Yabancı Dil Sınav Notu#

KPDS	ÜDS	YDS	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE

□ Başarılmış birden fazla sınav varsa, tüm sonuçlar yazılmalıdır □ KPDS: Kamu Personeli Yabancı Dil Sınavı; ÜDS: Üniversitelerarası Kurul Yabancı Dil Sınavı; YDS: Yabancı Dil Sınavı; IELTS: International English Language Testing System; TOEFL IBT: Test of English as a Foreign Language-Internet-Based Test TOEFL PBT: Test of English as a Foreign Language-Paper-Based Test; TOEFL CBT: Test of English as a

Foreign Language-Computer-Based Test; FCE: First Certificate in English; CAE: Certificate in Advanced English; CPE: Certificate of Proficiency in English

**A-Uluslararası ve Ulusal Yayınları/Bildirileri/Diğer:**

**B-Katıldığı Uluslararası ve ulusal konferans ve kongreler:**

**C-Sertifikalar:**

1. İleri Yaşam Desteği Eğitimi
2. Çocuklarda İleri Yaşam Eğitimi
3. Temel Yaşam Desteği Eğitimi
4. Afetlere Müdahale Eğitimi

**D-Ödüller:**