



T.C.

ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**ROMATOİD ARTRİTLİ HASTALARDAN ELDE EDİLEN KAN
ÖRNEKLERİNE OZON UYGULAMASININ DNA HASARINA
ETKİSİ**

Hazırlayan
Pınar YÜKSEL

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Mustafa EDREMİTLİOĞLU

FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

ÇANAKKALE-2017



T.C.
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**ROMATOİD ARTRİTLİ HASTALARDAN ELDE EDİLEN KAN
ÖRNEKLERİNE OZON UYGULAMASININ DNA HASARINA
ETKİSİ**

Hazırlayan
Pınar YÜKSEL

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Mustafa EDREMITLİOĞLU

FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

ÇANAKKALE-2017

Bu Tez Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Koordinasyon Birimince Desteklenmiştir. Proje no: TYL-2015-706

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 : Pınar YÜKSEL
Tez Başlığı : Romatoid Artritli Hastalardan Elde Edilen Kan
Örneğine Ozon Uygulamasının DNA Hasarına Etkisi
Sınav Yeri : Tıp Fakültesi
Sınav Tarihi : 25.01.2017

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

Tez Sınav Jürisi

Danışman (Unvan ve Adı)	Kurumu	İmza
Prof. Dr. Mustafa EDREMİTLİOĞLU	Çanakkale Onsekiz Mart Üniv.	
Sınav Jüri Üyeleri (Unvan ve Adları)		
Prof. Dr. Metehan UZUN	Çanakkale Onsekiz Mart Üniv.	
Prof. Dr. Vural KÜÇÜKATAY	Pamukkale Üniversitesi	

Tez sınav jürisi tarafından başarılı olarak kabul edilen Yüksek Lisans/Doktora Tezi Enstitü Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 21./02./2017 tarih ve 9/3 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: Pınar YÜKSEL


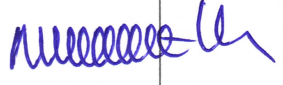
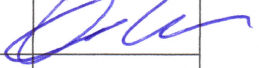
Title of the Thesis : The Effect Of Ozone On DNA Damage Which Applied To The Blood Samples Obtained From Patients With Rheumatoid Arthritis

Examination Place : Faculty of Medicine

Examination Date : 25.01.2017

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 EDREMITLİOĞLU	Çanakkale Onsekiz Mart Üniv.	
Members of Examination Jury (Titles and Names)		
Prof. Dr. Metehan UZUN	Çanakkale Onsekiz Mart Üniv.	
Prof. Dr. Vural KÜÇÜKATAY	Pamukkale Üniversitesi	

The above examination jury decision has been approved by Administrative Board of Health Science Institute, Canakkale Onsekiz Mart University, with decision dated 21/02/2017..... and numbered 9/3.....

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 haklarını 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: 07. 01. 2017

Tez Sahibi Adı ve Soyadı: Pınar YÜKSEL

İmza:



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim boyunca gerek bilgiyi aktarmadaki becerisiyle gerekse akılcı yaklaşımları ve çözüm yöntemleriyle örnek aldığım; tez konumun belirlenmesi, tezimin hazırlanması ve yazımı esnasında yardım ve tecrübelerini esirgemeyen değerli danışman hocam Prof. Dr. Mustafa EDREMİTLİOĞLU'na

Yüksek lisans öğrenimim süresince bilgi birikiminden yararlandığım, ilgi, destek ve katkılarından dolayı Fizyoloji Anabilim Dalı'ndan değerli hocam Prof. Dr. Metehan UZUN'a,

Tezim için gerekli biyolojik materyallerin elde edilmesi aşamasındaki yardımları ile tezimin hazırlanmasındaki diğer aşamalarda bilgi ve tecrübelerini paylaşmaktan çekinmeyen değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Coşkun ZATERİ'ye

Tezimin komet yöntemi aşamasında Tıbbi Biyoloji Laboratuvar imkanlarından faydalanmama müsaade eden sayın hocam Prof. Dr. Mahmut COŞKUN ile komet yönteminin inceliklerini öğretmekten çekinmeyen, her aşamada karşılaşılabilecek olası sorunlar ve çözüm yolları ile ilgili beni aydınlatan sevgili hocalarım Öğr. Gör. Münevver COŞKUN ve Doç. Dr. Akın ÇAYIR'a

Tezimin biyokimyasal analizlerine yardımcı olan ve tezimin yazım aşamasında yaptığı katkılardan dolayı Biyokimya Anabilim Dalı'ndan sayın hocam Doç. Dr. Dilek Ülker ÇAKIR'a ve tezimin istatistiklerin yapılmasında yardımcı olan Halk Sağlığı Anabilim Dalı'ndan sayın hocam Doç. Dr. Coşkun BAKAR'a

Tezimde kullandığım biyolojik materyallerin hazırlanmasının farklı aşamalarında ellerinden geldiğince yardımlarını esirgemeyen Begüm ÇILGIN'a, Cahide ELTAŞ KOYUNCU'ya ve Canan SELÇUK'a

Hayatın iyi ve kötü günlerinde varlıklarıyla bana mutluluk veren, düşüncelerini dile getirmekte sakınca görmeyip her zaman samimi ve dürüst davranan; ne olursa olsun her zaman yanımda olacaklarını bildiğim annem, babam, kardeşlerim ve eşime

Teşekkürlerimi sunarım.


Pınar YÜKSEL

Bu çalışma Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimince desteklenmiştir. Proje No: TYL-2015-706

ÖZET

Bu çalışmada, romatoid artritli (RA) hastaların 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG) düzeyi ile hastalığın deoksiribonükleik asitte (DNA) hasar oluşturup oluşturmadığı, sağlıklı bireylerin kan örneklerine ozon uygulanmasının DNA'da hasar meydana getirip getirmediği ve RA'lı hastalardan elde edilen kan örneklerine ozon uygulanmasının DNA'da hasara neden olup olmadığı incelenmiştir. Bu amaçla RA tanımlı 32 gönüllü ile kontrol grubunda yer alan 31 gönüllü katılımcıdan venöz kan örnekleri alınmıştır. Katılımcıların serum 8-OHdG düzeyleri ticari ELISA kitleriyle ölçülmüştür. Ozonun DNA hasarına etkisini araştırmak için katılımcılardan alınan kan örneklerinin bir kısmı 50 µg/ml yoğunlukta ozon uygulanarak bir kısmıysa ozonlanmadan alkali komet yöntemiyle incelenmiştir. Değerlendirmeler sonucu RA'lı hastaların 8-OHdG düzeyi kontrol grubundan farklı bulunmamıştır ve 8-OHdG düzeyi remisyondaki hastalarda, aktif hastalık dönemindeki hastalardan farklı çıkmamıştır. Komet verilerine göre RA'lı hastalarda DNA hasarında artış saptanmamıştır. Yine komet analizi sonuçlarına göre ne sağlıklı bireylerin ne de RA'lı hastaların kanlarına ozon uygulamasına bağlı DNA hasarında artış meydana gelmemiştir. Sonuç olarak: RA'lı hastalarda 8-OHdG düzeyi ile DNA hasarının artmadığı ve kana doğrudan 50 µg/ml yoğunlukta ozon uygulanmasının DNA'da hasara yol açmadığı gözlenmiştir.

Anahtar sözcükler: Romatoid artrit, ozon, DNA hasarı, komet yöntemi, 8-OHdG.

ABSTRACT

The Effect Of Ozone On DNA Damage Which Applied To The Blood Samples Obtained From Patients With Rheumatoid Arthritis

In this research the level of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) of Rheumatoid Arthritis (RA) patients and whether this illness gives any damage to their deoxyribonucleic acid (DNA) or not, whether ozone treatment to the blood samples of healthy subjects gives any damage to their DNA or not and whether ozone treatment to the blood samples of RA patients gives any damage to their DNA or not has been studied. To this end, venous blood samples of 32 RA diagnosed volunteers and 31 voluntary attendees on control group was taken. Attendees' serum 8-OHdG level was measured using commercial ELISA kits. In order to check the DNA damage of ozone, some of the blood samples taken from attendees was studied giving 50 ug/ml dense ozone and some using alkali comet method without ozoning. After deliberations, 8-OHdG level of RA patients was not found to be different from control group and 8-OHdG level of patients in remission was not any different from actively ill patients. According to the comet data DNA damage increase in RA patients wasn't stated. Again according to the comet analysis results no DNA damage increase was occurred in the blood of neither in RA patients nor healthy subjects because of ozone implementation. Finally: It was seen that 8-OHdG level and DNA damage did not increase in RA patients and 50 ug/ml dense ozone implementation directly to the blood did not cause DNA damage.

Key words: Rheumatoid arthritis, ozone, DNA damage, comet assay, 8-OHdG

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY FORMU	II, III
BEYAN FORMU	IV
TEŞEKKÜR	V
ÖZET	VI
İNGİLİZCE ÖZET	VII
İÇİNDEKİLER	VIII, IX, X, XI
KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ	XII, XIII
TABLolar LİSTESİ	XIV
ŞEKİLLER LİSTESİ	XV
RESİMLER LİSTESİ	XVI
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Romatoid Artrit	2
2.1.1. Romatoid Artrit Epidemiyolojisi	2
2.1.2. Romatoid Artrit Etiyolojisi	3
2.1.2.1. Genetik Faktörler	3
2.1.2.2. Cinsiyet ve Bireysel Faktörler	5
2.1.2.3. Çevresel Faktörler	5
2.1.3. Romatoid Artrit Patofizyolojisi	6
2.1.4. Romatoid Artrit Klinik Özellikleri	9
2.1.5. Tedavi	10
2.2. Ozon	11
2.2.1. Ozonun Tanımı	11
2.2.2. Medikal Ozonun Tanımı	12
2.2.3. Medikal Ozonun Tarihçesi	13
2.2.4. Medikal Ozonun Etki Mekanizması	14
2.2.5. Medikal Ozon Uygulama Yöntemleri	16
2.2.5.1. Majör Otohemoterapi (MOHT)	17

2.2.5.2. Minör Otohemoterapi (MİHT)	18
2.2.5.3. Rektal Ozon Uygulaması	18
2.2.6. Medikal Ozonun Klinik Uygulamaları	19
2.2.7. Medikal Ozon Uygulamasının Kontraendikasyonları ve Yan Etkileri	20
2.2.7.1. Medikal Ozon Uygulamasının Yapılmaması Gereken Durumlar	20
2.2.7.2. Karşılaşılan Komplikasyonlar	20
2.3. DNA Hasarı ve Mekanizmaları	21
2.3.1. Spontan (Endojen) DNA Hasarları	22
2.3.1.1. DNA Replikasyonu Sırasında Ortaya Çıkan Yanlış Eşleşmeler	22
2.3.1.2. DNA'da Var Olan Kararsızlıklar Sonucu Oluşan Hasarlar	23
2.3.1.3. Oksidatif Hasar	25
2.3.2. Çevresel Nedenlerden Kaynaklanan Hasarlar	27
2.4. DNA Onarımı ve Önemi	28
2.4.1. Hasarın Doğrudan Onarımı	28
2.4.2. Baz Eksizyon Onarım Mekanizması (BER)	29
2.4.3. Nükleotid Eksizyon Onarım Mekanizması (NER)	29
2.4.4. Çift Zincir Kırıklarının Onarımı	30
2.4.5. Çapraz Bağların Onarımı	31
2.4.6. Replikasyon Hatalarının Onarımı	31
2.5. DNA Hasarı Tespit Yöntemleri	33
3. GEREÇ VE YÖNTEM	38
3.1. Gereçler	38
3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	38
3.1.2. Kullanılan Araç ve Gereçler	38
3.1.3. Kullanılan Çözeltiler	40
3.1.3.1. Fosfat Tampon Çözeltisi	40
3.1.3.2. Lizing Çözeltisi	40
3.1.3.3. Elektroforez Çözeltisi	40
3.1.3.4. Nötralizasyon Çözeltisi	40
3.1.3.5. SYBR-Gold Çözeltisi	41
3.1.3.6. Düşük Erime Noktalı Agar (LMA)	41
3.1.3.7. Normal Erime Noktalı Agar (NMA)	41

3.2. Yöntem	42
3.2.1. Çalışma Gruplarının Belirlenmesi	42
3.2.1.1. Çalışmaya Dahil Edilme Kriterleri	42
3.2.1.2. Çalışmaya Dahil Edilmeme Kriterleri	43
3.2.1.3. Çalışmadan Çıkarılma Kriterleri	43
3.2.1.4. Hastalık Aktivitesinin Belirlenmesi	43
3.2.2. Kan Örneklerinin Alınması	44
3.2.3. Kan Örneklerinin Ozonlanması	44
3.2.4. Alkali Komet Yöntemi	44
3.2.4.1. Lamların Hazırlanması	44
3.2.4.2. Periferik Kan Mononükleer Hücrelerinin Ayrıştırılması	45
3.2.4.3. Tripkan Mavis Testi	45
3.2.4.4. Mononükleer Hücrelerin Lama Yayılması	46
3.2.4.5. Mononükleer Hücrelerin Lizisi	46
3.2.4.6. Elektroforez	46
3.2.4.7. Nötralizasyon	46
3.2.4.8. Fiksasyon	47
3.2.4.9. Boyama	47
3.2.4.10. Fotoğraf Kaydetme	47
3.2.4.11. Değerlendirme	47
3.2.5. Serumda 8-OHdG Miktarının Ölçümü	49
3.2.6. İstatistiksel Analiz	50
4. BULGULAR	51
4.1. Katılımcıların Demografik Bilgileri ve Bireysel Davranışları	51
4.2. Romatoid Artritli Hastaların DAS28 Değerlerine Göre Dağılımı	51
4.3. Romatoid Artrit ve Oksidatif DNA Hasarı	52
4.4. Hastalık Aktivitesi ve Oksidatif DNA hasarı	53
4.5. Romatoid Artrit ve DNA Hasarı	54
4.6. Hastalık Aktivitesi ve DNA Hasarı	55
4.7. Ozon Uygulamasının DNA Hasarına Etkisi	55
4.8. Romatoid Artritli Hastalardan Elde Edilen Kan Örneklerine Ozon Uygulamasının DNA Hasarına Etkisi	56

4.9. Hasta ve Kontrol Grubunun Ozon Uygulanan Kanlarına Ait Mononükleer Hücrelerin DNA Hasarının Karşılaştırması	58
4.10. Aktif Hastalık Varlığında Ozon Uygulamasının DNA Hasarına Etkisi	59
5. TARTIŞMA	61
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	67
7. KAYNAKLAR	68
8. EKLER	78
8.1. Etik Kurul Kararı	78
8.2. Gönüllü Bilgilendirme/ Onam Formu	79
8.3. Gönüllü Veri Formu	83
8.4. Özgeçmiş	85
8.5. Spiralli Tez Kontrol Formu	87
8.6. Kontrol Listesi	88

KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

kg	: Kilogram
g	: Gram
l	: Litre
LOPs	: Lipid oxidation products
ml	: Mililitre
μ l	: Mikrolitre
μ g	: Mikrogram
$^{\circ}$ C	: Derece santigrat
O ₃	: Ozon
O ₂	: Oksijen
d-H ₂ O	: Deiyonize su
DAS28	: Disease Activity Score 28
DMSO	: Dimetilsülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EDTA	: Etilen diamin tetraasetik asit
GSH	: Glutatyon
PBS	: Fosfat tamponu
PUFA	: Polyunsaturated fatty acid
PDGF	: Platelet derived growth factor
PBMC	: Peripheral blood mononuclear cell
RA	: Romatoid artrit
RPM	: Revolutions per minute
ROT	: Reaktif oksijen türleri
RNT	: Reaktif nitrojen türleri
NaOH	: Sodyum hidroksit
NF- κ B	: Nükleer faktör kapp beta
HCl	: Hidroklorik asit
NaCl	: Sodyum klorür

H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
IR	: İyonize radyasyon
IL	: İnterlökin
INF- γ	: İnterferon gama
LMA	: Düşük erime dereceli agar
NMA	: Normal erime dereceli agar
mM	: Milimolar
μ M	: Mikromolar
M	: Molarite
%DNA _t	: %DNA in tail (Kuyruğu oluşturan DNA yüzdesi)
TGF β -1	: Transforming growth factor beta-1
8-OHdG	: 8-Hidroksi-2'-Deoksiguanozin
TE	: Tris- EDTA

TABLolar LİSTESİ

<u>Tablo</u>		<u>Sayfa</u>
1.	MOHT uygulanan patolojiler ve önerilen ozon konsantrasyonu	17
2.	ELISA standartlarının hazırlanması	49
3.	Hasta ve kontrol grubuna ait demografik bilgiler ve bireysel davranışlar	51

ŞEKİLLER LİSTESİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
1. UV ışını etkisiyle ozonun oluşumu ve parçalanması	11
2. DNA replikasyonu	22
3. Sitozin deaminasyonu	23
4. Adenin depürinasyonu	24
5. Oksidasyona uğramış bazı DNA yapıları	26
6. DNA çift zincir kırıklarının homolog rekombinasyonu	30
7. 50 µl H ₂ O ₂ ile muamele edilmiş mononükleer hücrelerin alkali komet yöntemi jel görüntüsü	36
8. Periferel kan mononükleer hücrelerinin ayrıştırılması	45
9. 8-OHdG ELISA standartlarının hazırlanması	49
10. Hasta ve kontrol grubunun 8-OHdG değerlerinin karşılaştırılması	52
11. Hastalık Aktivitesine göre 8-OHdG değerlerinin karşılaştırılması	53
12. Hasta ve Kontrol grubunun mononükleer hücre DNA hasarlarının karşılaştırılması	54
13. Hastalık Aktivitesine göre %DNA _t değerlerinin karşılaştırılması	55
14. Ozon uygulanmış ve ozon uygulanmamış, kontrol grubuna ait kan örneklerinin mononükleer hücre DNA hasarlarının karşılaştırılması	56
15. Ozon uygulanmış ve ozon uygulamamış, hasta grubuna ait kan örneklerinin mononükleer hücre DNA hasarlarının karşılaştırılması	57
16. Ozon uygulanan kanlara ait mononükleer hücrelerin %DNA _t Değerlerinin karşılaştırılması	58
17. Ozon uygulaması yapılan kan örneklerinden ayrıştırılmış mononükleer hücrelerin %DNA _t değerlerinin DAS28'e göre karşılaştırılması	59

RESİMLER LİSTESİ

<u>Resim</u>		<u>Sayfa</u>
1.	Tritek CometScore Freeware 1.5v bilgisayar programı ana ekran görüntüsü	48
2.	61 numaralı gönüllünün kometlerinin skorlanması esnasında kaydedilen ekran görüntüsü	48
3.	Kontrol grubunda yer alan 37 numaralı gönüllünün ozon uygulanmamış (A) ve ozon uygulanmış (B) kanlarına ait mononükleer hücreler ile aynı tankta yürütülen pozitif kontrol olarak 50 μ M hidrojen peroksit uygulanmış mononükleer hücrelerin komet yöntemiyle elde edilen jel görüntüleri.	60
4.	Hasta grubunda yer alan 53 numaralı gönüllünün ozon uygulanmamış (A) ve ozon uygulanmış (B) kanlarına ait mononükleer hücreler ile aynı tankta yürütülen pozitif kontrol olarak 50 μ M hidrojen peroksit uygulanmış mononükleer hücrelerin komet yöntemiyle elde edilen jel görüntüleri.	60

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kronik hastalıklarda DNA hasarının artabildiğinden yayınlarda sıkça bahsedilmektedir (Bashir ve ark. 1993, Tak ve ark. 2000). RA görülme sıklığı oldukça fazla olan ve yaşam kalitesini son derece azaltan kronik yangısal otoimmün bir hastalıktır. Crohn hastalığı, kronik hepatit, gastrit gibi bazı kronik rahatsızlıklarda DNA hasarındaki artışın kanser riskini arttırdığı öne sürülmektedir (Ohshima ve Bartsch, 1994). RA ile kanser arasındaki ilişkiye ise her ne kadar dikkat çekiliyor olsa da bu bağlantı net olarak kurulamamıştır. Ancak artmış DNA hasarının hastalığın seyrini pek de iyi etkilemediği bilinmektedir (Ekström ve ark. 2003, Filippin ve ark. 2008, Simon ve ark. 2015).

RA tedavisinde çok çeşitli tedaviler kullanılmakla birlikte hastalığın tam olarak tedavisi yapılamamakta, tedavi amaçlı pek çok molekülün araştırılmasına devam edilmektedir. RA tedavisinde yararlı olduğu öne sürülen ajanlardan biri olan ozon (Bocci ve ark., 2011b) reaktif oksijen türlerini (ROT) arttırmak suretiyle etkisini göstermektedir (Bocci 2006a, Bocci ve ark. 2011a, Borrelli ve ark. 2015). Ancak bu etki mekanizması henüz tam olarak ortaya konulamamıştır. Lakin birçok hastalıkta ozon uygulamasının yararlı olduğu bilinmektedir (Bocci ve ark. 2011b, Bocci ve ark. 2011c). ROT'un bilinen en önemli etkilerinden birisi DNA'da baz modifikasyonlarına ve zincir kırıklarına neden olarak DNA'da hasarlar oluşturabilmesidir (Dizdaroğlu 2015). Bu nedenle RA nedeniyle zaten artmış olan bir DNA hasarı varsa ozon tedavisi ile bu hasarın daha da artması mümkün görünmektedir.

Yapılan çalışmada:

- 1- RA'lı hastalarda 8-OHdG düzeyi ve DNA hasarı,
- 2- Sağlıklı insanlardan elde edilen kan örneklerine ozon uygulamasının DNA hasarına etkisi,
- 3- RA'lı hastalardan elde edilen kan örneklerine ozon uygulamasının DNA hasarına etkisi incelenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Romatoid Artrit

RA ilerleyici eklem hasarı, ağrı, yorgunluk, hareket kabiliyetinde azalma ve günlük yaşam aktivitelerini gerçekleştirmede zorluğa yol açmanın yanı sıra erken ölümlere de neden olan, klinik gidişi alevlenme ve kısmi remisyonlarla seyreden, sistemik, otoimmün, yangısal bir hastalıktır. Dünya nüfusunun %0,5-1'ini etkilemesi ve en sık karşılaşılan artrit tipi olması RA'nın önemini arttırmaktadır. Hastalık esasen sinoviyal dokunun inflamasyonu ile karakterizedir. Etkilenen eklemlerde sinoviyal hücrelerin proliferasyonu, yangısal hücrelerin yoğun infiltrasyonu ve proinflamatuvar sitokinlerin seviyelerindeki artış neticesinde eklem şişliği, kemik ve kıkırdak kaybı ile geri dönüşümsüz eklem hasarı gelişmektedir. Hastalık, patofizyolojisinin temelinde olan sistemik kronik inflamasyon nedeniyle, eklemler dışında dolaşım ve solunum sistemleri, göz, tiroid bezi gibi birçok farklı dokuyu da etkileyebilmektedir (Van den Berg 1998, Uhlig ve ark. 1999, Kvien 2004, Knedla ve ark. 2007, Cojocaru ve ark. 2010).

2.1.1. Romatoid Artrit Epidemiyolojisi

RA dünya genelinde hemen hemen tüm toplumlarda görülmektedir ve dünya genelindeki prevalansı %0,5-1 aralığında değişmektedir. Bununla birlikte hastalığın insidansı ve prevalansı zaman içinde toplumlar arasında veya aynı toplumda değişiklik gösterebilmektedir. İnsidans ve prevalans arasındaki farklılıklar nüfusun yaş ortalamasına göre artabilmektedir. RA'lı hastalar uzun süre yaşadıkları için, insidans değişirse hatta azalsa dahi prevalans artabilir veya aynı kalabilir. Dünya Sağlık Örgütü'ne üye altı bölgede yer alan çeşitli ülkelerce 2000-2010 yılları arasında yapılan prevalans çalışmalarının topluca değerlendirilmesinde 2000 yılında hastalıktan etkilenen 2,6 milyon erkek ve 12,21 milyon kadın sayısının 2010 yılında 3,16 milyon ve 14,87 milyona ulaştığı; hastalık prevalansı ise Güneydoğu Asya ülkelerinde %0,37, Doğu Akdeniz ülkelerinde %0,62, düşük ve orta gelirli Avrupa ülkelerinde %1,25, düşük ve orta gelirli Amerika ülkeleri ile Batı Pasifik ülkelerindeyse %0,42 olarak belirlenmiştir. Şehir veya kırsal yaşamın hastalık prevalansını etkilemediği, ancak kadınlarda hastalık prevalansının erkeklerden belirgin olarak daha yüksek olduğu görülmüştür (Kvien 2004, Rudan ve ark. 2015). Ülkemizde yapılan çalışmalarda

hastalık prevalansı İzmir bölgesinde %0,36 Antalya bölgesindeyse %0,38 bulunmuştur (Akar ve ark. 2004, Kaçar ve ark. 2005).

RA insidansı yaşla birlikte artmaktadır. Özellikle 60 yaşlarında en yüksek değere ulaştığı tahmin edilmektedir. Hastalığın görülme sıklığı kadınlarda erkeklerden 3-4 kat daha fazladır. Ancak artan yaşla birlikte kadın erkek arasındaki görülme sıklığındaki fark azalmaktadır. Hastalığın kadınlarda başlama yaşı erkeklerden düşüktür ve hastalık kadınlarda daha şiddetli seyrederek (Kvien ve ark., 2006). RA'nın görülme sıklığı Pima Kızılderilileri (%5,3) ile Chippewa Kızılderilileri (%6,8)'nde en yüksekken, Çin (%0,20) ve Japon (%0,30) nüfusta en düşük değerdedir. Bu farklılıklar her ne kadar genetik faktörlerin hastalığa olan katkısına dikkat çekiyorsa da hastalığın bölgeler arası farklılıkları çevresel etmenlerinde göz önünde bulundurulması gerektiği yönündedir (Gibofsky 2012).

2.1.2. Romatoid Artrit Etiyolojisi

RA'nın etiyojisi hala gizemini korumaktadır. Her ne kadar genetik ve çevresel faktörlerin birlikteliğinin hastalıkta rolü olduğu birçok çalışmada ortaya atılmışsa da hastalığın bütün belirtilerinin ortaya çıkmasında yeterli bulunmamıştır. Bazı çevresel etmenler genetik yatkınlığın olduğu bireylerde hastalığı tetikleyici rol üstlenebileceği gibi çevresel etkenlerin hastalığa yatkınlığı arttırabilmesi söz konusu da olabilmektedir. Ancak bu yönde kesin bir çevresel ajan tanımlanamamıştır (Harris ve ark., 2006).

2.1.2.1. Genetik Faktörler

Birçok genetik faktör RA oluşumunu ve seyrini etkileyebilmektedir. Ancak hastalığın genetik yapısı tam olarak ortaya konulamamıştır. Tek yumurta ikizleriyle yapılan çalışmalarda, ikizlerden birinde hastalık ortaya çıkmışsa diğerinde hastalık riskinin %30-50 arttığı saptanmıştır. Bu bulgu genetik faktörlerin dışında çevresel faktörlerinde hastalık oluşumunda önemli rolü olduğunu göstermektedir. RA'lı bir hastanın çift yumurta ikizlerindeyse bu oran %2-5 gibi nispeten yüksek bir değerdir. Öte yandan bu değer 1. derece akrabalar için saptanan riskten fazla bulunmamıştır (Harris ve ark., 2006).

Altıncı kromozomun kısa kolunda bulunan majör histokompatibilite kompleksi (MHC) lokusu (The MHC sequencing consortium 1999), RA'da genetik yatkınlığın büyük bir kısmından sorumlu tutulmaktadır (Silman ve Pearson, 2002). Antijen sunan hücrelerin yüzeyinde bulunan MHC-II antijenlerinin yapısı RA'ya yatkınlıkta ve hastalık şiddetinde oldukça önemlidir ve genetik etkinin yaklaşık %40'lık kısmını oluşturur (Harris ve ark., 2006). Geniş gen kümelerinden oluşan MHC'nin grup-II genlerinden olan HLA (insan lökosit geni) gen grupları ise RA ile ilişkisi en çok araştırılan genlerdir. Özellikle HLA-DRB1 genindeki varyasyonlar RA'ya yatkınlıkta en büyük katkıya sahiptir ancak henüz hangi varyasyonun yatkınlık sağladığı bilinmemektedir. Bunun aksine HLA-DRB1 geninin birkaç varyasyonu ise hastalık riskini azaltabilmektedir. Fakat bu özel değişikliklerin niçin koruyucu oldukları net değildir (Silman ve Pearson 2002, Bax ve ark. 2011, Viatte ve ark. 2013). HLA-DRB1*04 allel gruplarının (*0401, *0404, *0405, *0408), HLA-DRB1*0101 veya *0102, HLA-DRB1*1402 ve HLA-DRB1*1001 allelerinin ya da bu allellerin birlikteliğinin hastalığa yatkınlıkta ve hastalık şiddeti ile hastalığın eklem dışı tutulumunda etkili olabileceği öne sürülmektedir (Young ve ark. 1984, Reviron ve ark. 2001, Silman ve Pearson 2002, Holoshitz ve ark. 2010). Öte yandan bu allellerin varlığının hastalık şiddeti veya eklem dışı tutulumları etkilemediği yönünde görüşlerde bulunmaktadır (Boki ve ark., 1993). DRB1*1301 gibi bazı allellerinin ise hastalık riskini azalttığı saptanmıştır (Van der Woud ve ark., 2010). HLA-DR4 (HLA-DRB1*04) alleli romatoid faktör (RF) pozitif hastaların %70'inde bulunurken, normal toplumda %30 oranında bulunmaktadır ve HLA-DR4 pozitif bireylerde hastalık riskinin 4-5 kat arttırdığı kabul görmektedir (Harris ve ark., 2006).

Son yıllarda yapılan gen tabanlı çalışmalar MHC lokusunda bulunan non-HLA genleri ile MHC lokusunda bulunmayan non-MHC genlerinin RA ile ilişkisini tespiti yöneliktir. Bu çalışmalarda 100'ün üzerinde non-HLA allelinin RA'ya yatkınlıkta etkili olduğu doğrulanmıştır ve hastalığın kalıtımını kısmen de olsa etkileyen non-MHC genleri tanımlanmıştır (Karlson ve ark., 2016). Özellikle PADI4 (peptidilarginin deaminaz tip-4), PTPN22 (protein tirozin fosfataz nonreseptör tip-22) ve CTLA4 (sitotoksik T lenfosit assosiyasyon antijen-4) non-MHC genleri hastalığa yatkınlıkla ilişkili bulunmuştur (Plenge ve ark. 2005, Holoshitz ve ark. 2010, Viatte ve ark. 2012, Viatte ve ark. 2013). Seropozitiflik durumunda HLA-DRB1 ve PTPN22 genlerinin

birlikteliğininse hastalık riskini arttırdığı belirlenmiştir (Goulielmos ve ark., 2016). Ancak, MHC sınıf II genleriyle kıyaslandığında, bu genlerin hastalığa katkısının daha az olduğu ifade edilmektedir (Harris ve ark., 2006).

2.1.2.2. Cinsiyet ve Bireysel Faktörler

Kadınlarda RA riskinin yüksek oluşu, hastalık oluşumunda hormonların ve gebelik faktörlerinin rolünü aydınlatmaya yönelik çeşitli çalışmalar yapılmasına zemin hazırlamıştır. Ne var ki bu çalışmalardan beklenen sonuçlara ulaşılamamıştır. RA'lı erkeklerde genel olarak testosteron seviyesi düşük olmakla birlikte, kadın seks hormonlarında anlamlı farklılığa rastlanmamıştır. Düzenli oral kontraseptif kullanan kadınlarda, hiç oral kontraseptif kullanmayan ya da hayatının bir döneminde oral kontraseptif kullanmış kadınlara kıyasla, RA riskinin düşük olduğu belirlenmiş ancak bu durum net şekilde açıklanamadığı gibi bu etki teyit edilememiştir (Silman ve Pearson 2002, Kvien ve ark. 2006). Doğum yapan kadınlardaysa hastalık riskinde ilk doğumdan sonra artış meydana gelebilirken, özellikle doğum sonrası emziren kadınlarda risk artışının daha yüksek olduğu saptanmış, bununla birlikte proinflatuar hormon olan prolaktin artışıyla ya da prolaktine karşı oluşan anormal yanıtın ileri gelebileceği ileri sürülmüştür (Silman ve Pearson 2002, Harris ve ark. 2006, Gibofsky 2012).

2.1.2.3. Çevresel Faktörler

Çeşitli çevresel faktörler, bireysel davranışlar ve yaşam tarzları RA'da risk faktörü olarak incelenmiştir. Mevcut verilere göre sigara kullanımı, içilen miktara bağlı olarak, şimdiye kadar belirlenmiş en güçlü çevresel risk faktörüdür. Hastalık riskini %25 oranında arttırdığı tahmin edilmektedir. Özellikle seropozitiflik durumunda riskin daha bariz olduğu saptanmıştır. Düşük eğitim seviyesi, yüksek doğum ağırlığı ve obezite yüksek hastalık riskiyle nispeten daha az ilişkili olup, alkol tüketimi koruyucu etki oluşturabilmektedir. Silika tozu, solvent, hava kirliliği ve UV ışık maruziyeti azda olsa hastalık riskinde artış meydana getirebilmektedir (Kallberg ve ark. 2009, Karlson ve ark. 2016).

Human parvovirus B19, rubella virüs, human retrovirus 5, alfa virüsler, hepatit B virüsü, epstein–barr virüsü, borrelia burgdorferi, mycoplasma, mycobacterium

tuberculosis, escherichia coli, proteus mirabilis, porphyromonas gingivalis gibi mikroorganizmaların genetik yatkınlığı bulunan bireylerde hastalık gelişiminde etkili olabileceğine dair çeşitli bulgular bulunmaktadır. Ancak bu mikroorganizmaların hastalığı tetikleyici olduğu yönünde ki görüşler tartışmalıdır ve tek bir mikroorganizma hastalıktan sorumlu tutulmadığı gibi, spesifik bir etiyolojik ajan da saptanamamıştır (Tobon ve ark., 2010).

2.1.3. Romatoid Artrit Patofizyolojisi

Hastalığın patogenezi tam olarak aydınlatılmamış olmakla birlikte, RA'da ki patolojik değişikliklerin temelini sinoviyumun inflamasyonu oluşturur. Hastalık patogenezinde nötrofiller, fibroblastlar, sinoviyal hücreler, makrofajlar, doğal katil hücreler, dendritik hücreler, T ve B lenfositler gibi immün sistemin birçok hücresi oldukça önemli ve karmaşık etkiler meydana getirmektedir. İmmün sistemin aktivasyonunda ve düzenlenmesinde görevli kompleman sistem proteinleri, sitokinler, büyüme faktörleri, prostaglandinler ve adezyon molekülleri ise hastalığın farklı evrelerinde hastalık gelişimine katkı sağlamaktadır. Tüm bunlara ek olarak kronik inflamasyona bağlı olarak ortaya çıkan oksidatif stresin de hastalık patogenezinde önemli etkileri bulunmaktadır (Tak ve ark. 2000, Lee ve Weinblatt 2001, Hitchon ve El-Gabalawy 2004, Kay ve Calabrese 2004, Khurana ve Berney 2005, Quinonez-Flores ve ark. 2016).

Hastalıkta ilk sinoviyum değişikliğe uğrar ve hastalık ilerledikçe sinoviyal yapıda meydana gelen değişiklikler farklılık gösterir. İlk haftalarda doku ödemi ve fibrin depozitler nedeniyle klinik olarak eklem şişliği ve ağrı ortaya çıkar. Kısa süre içinde, sinoviyumun eklem kavitesine bakan iç yüzeyinde Tip A (makrofaj benzeri sinoviyositler) ve Tip B (fibroblast benzeri sinoviyositler) sinoviyositlerin oluşturduğu 1-2 hücre tabakası derinliğindeki intimal astar bölge 4 ile 10 (bazen 20 hücreden fazla) hücre derinliğine ulaşır ve sinoviyum hiperplastik bir görünüm alır. Bu değişikliklerle eş zamanlı olarak T ve B hücreleri de içeren mononükleer hücrelerin, makrofajların ve plazma hücrelerinin yoğun infiltrasyonu neticesinde sinoviyumun subintimal bölgesinin hücre sayısı ve içeriği değişime uğrar. Kimi zaman B hücreler ve dendritik hücreler, T hücreler ve doku makrofajlarıyla kümeleşerek lenfoid foliküllere benzeyen yapılar meydana getirir. Sinoviyal yüksek damar endotel hücreleri ise hastalığın bu

erken evresinde farklılaşarak, sekonder lenfoid ya da yangılı nonlenfoid dokularda bulunanlara benzer, post kapiller venülleri meydana getirerek dolaşımdaki lökositlerin dokuya geçişini kolaylaştırırlar. Giderek hipertrofik hale gelen sinoviyal doku lokal olarak kemik ve kıkırdak dokulara doğru invaze olmaya başlayan karakteristik pannus yapısını oluşturur. Pannus histolojik olarak sinoviyal dokudan farklı özellikte yapılıdır. Yüksek seviyelerde matris metalloproteinazlar (MMP) üreten mononükleer hücreler ve fibroblast benzeri hücreler içerir. Eklem kıkırdağının, subkondral kemik yapının, tendon ve ligamentlerin aşınmasına neden olur (Lee ve Weinblatt 2001, Kay ve Calabrese 2004, Sweeney ve Firestein 2004, Khurana ve Berney 2005).

Hastalığın merkezinde olan sinoviyal inflamasyonu neyin tetiklediği bilinmemektedir. Antijen bağımlı CD4+ T lenfositlerin aktivasyonu olası ilk patolojik olay olarak değerlendirilmektedir. CD4 +T lenfositler, tip A sinoviyositler, makrofajlar, dendritik hücreler, B lenfositler gibi (HLA-DR) MHC-II pozitif hücreler tarafından kendilerine sunulan ve bugün için tanımlanamamış antijenlerle aktive olmaktadır. Aktive olan yardımcı T lenfositler (CD4+) proliferasyon ve klonal genişleme, sitokin üretimi ve hücre-hücre etkileşimleri gibi farklı süreçlerle RA patogenezinde önemli rol oynar. B lenfositler antijen sunarak T lenfositlerin aktivasyonunu sağlamalarının dışında tümör nekroz faktör alfa (TNF- α) ve lenfotoksin- α gibi sitokinler ile çeşitli kemokinleri sekrete ederler. Bu etkileriyle birlikte lokal immün komplekslerin oluşmasına yol açan hem immünglobulinlerin hem de RF, sitrülünlenmiş peptit (anti-CCP) ve kollajen-II otoantikolarını üreterek RA patogenezindeki inflamatuvar süreçlere katılırlar (Weyand 2000, Panayi 2005, Mauri ve Ehrenstein 2007).

Sitokinler, immün cevapta rol alan hücrelerin etkileşimine yardım eden protein yapıda küçük moleküllerdir. Hücrelerin bölünmesini, farklılaşmasını, kemotaksisini etkiler, birçok proinflamatuvar-antiinflamatuvar olaylarda rol alırlar ve immün sistemi düzenleyici etkiler gösterirler. Fizyolojik koşullarda sitokinlerin üretimi arasında bir denge vardır. RA'da bu denge proinflamatuvar sitokinler lehine bozulmuştur. TNF- α , IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, IL-18, IL-21, IL-23, IL-27, IL-32, IL-33, IFN- γ hastalık patogenezinde rolü olduğu tespit edilen başlıca sitokinlerdir (Brennan ve McInnes 2008, Braun ve Zwerina 2011, Mateen ve ark.

2016a). T ve B hücreler ile yoğun şekilde makrofaj ve fibroblast benzeri sinoviyositler tarafından üretilen sitokinler sinoviyal inflamasyonun genişlemesinde ve sürdürülmesinde etkindirler. Fibroblastların proliferasyonuna, makrofajların aktivasyonuna ve diğer sitokinlerin artışına; sinoviyal dokuda transkripsiyon faktörlerini uyararak eklem hasarında rol alan enzimlerin sentezlerine ve hücre içi yolların aktivasyonuna neden olurlar. Özellikle makrofajlar ve sinoviyal fibroblastlar arasındaki yoğun sitokin trafiğinin kısır döngüsü, RA'da ki sinoviyal inflamasyonun kalıcı olması ile sonuçlanır. (Kay ve Calabrese 2004, Knedla ve ark. 2007, Brennan ve McInnes 2008). İnterlökin-1 ve TNF- α hastalık patogenezinde önemli etkilere sahip ana proinflamatuvar sitokinlerdir. Hastalığın sistemik etkilerinin oluşmasına aracılık ederler. Yangılı sinoviyumdaki birçok hücrenin koordinasyonunu sağlarlar. Ayrıca bu iki sitokinin birbirlerinin üretimini arttırmak gibi özelliği de bulunmaktadır (Kay ve Calabrese, 2004). TNF- α , RA'lı hastaların hem sinoviyal dokusunda hem de sinoviyal sıvılarında bol miktarda bulunur. Ana kaynağı aktive olmuş makrofajlar olmakla birlikte; sinoviyal fibroblastlar, T ve B hücreler, doğal katil hücreler, osteoblast ve osteoklastlar da TNF- α üretebilmektedir. TNF- α diğer proinflamatuvar sitokinlerin üretimini uyarmak, akut faz cevabı oluşturmak, osteoklastları ve kondrositleri aktive ederek kemik rezorpsiyonu ve kırıkta harabiyeti meydana getirmek; endotel hücrelerinin adezyon moleküllerini ve kemokinleri artırarak lökositlerin sinoviyumda birikmesine sebep olmak gibi hastalık patogenezinde çok yönlü etkiler gösterir (Brennan ve McInnes 2008, Braun ve Zwerina 2011). IL-1 esas olarak aktive makrofajlar ve sinoviyal fibroblastlarca üretilir. RA patolojik süreçlerinde TNF- α 'ya benzer özellikler göstermesinin yanı sıra kondrositlerin kırıktağın yeniden yapılanmasındaki etkilerinin kısıtlanmasında da rol oynar (Dayer 2003, Kay ve Calabrese 2004, Braun ve Zwerina 2011).

RA hastalarının eklemlerindeki oksidatif stresin nedeni, sinoviyal kavite üzerindeki artan basınç, kapiller yoğunluğunda azalma, sinoviyal dokunun metabolik olaylarındaki artış ve lokal lökositlerdeki artış gibi faktörlerdir (Tak ve ark. 2000, Harris ve ark. 2006). Bununla birlikte hastalığa bağlı sinoviyal dokuda meydana gelen hasarlar ortamda metal iyonlarını artırarak hücreler için oldukça toksik hidroksil radikalinin (OH \cdot) oluşumunu kolaylaştırır (Filippin ve ark., 2008). Hastalıkta artmış ROT ve reaktif nitrojen türleri (RNT) doğrudan kondrositlere etki ederek kondrosit

ölümüne sebep olabildiği gibi, dolaylı yoldan MMP sekresyonunu arttırarak kıkırdak dokuda hasar oluşturabilirler (Hitchon ve El-Gabalawy 2004, Quinonez-Flores ve ark. 2016). ROT ve RNT eklem dokusunda non-enzimatik olarak protein yapılarında glikozilasyona neden olarak bu yapılara karşı immünglobulinlerin oluşumuna sebebiyet verebilirler ve fagositleri aktivite edebilirler (Tai ve Newkirk 2000, Hitchon ve El-Gabalawy 2004). IL-1 ve TNF- α ile diğer sitokinlerin gen ekspresyonlarını arttırabilirler (Kundu ve ark., 2012). ROT ve RNT doğrudan DNA yapısına zarar verebildiği gibi dolaylı olarak DNA onarım mekanizmalarını bozarak da kalıcı mutasyonlara neden olabilmektedir. Özellikle RA'da apopitozdan sorumlu p53 tümör baskılayıcı gende böyle bir mutasyonun oluşmasına bağlı apopitozdan korunmuş sinoviyal fibroblastların ve lökositlerin varlığı tespit edilmiştir (Firestein ve ark. 1997, Reme ve ark. 1998, Li ve Wan 2013, Quinonez-Flores ve ark. 2016). Bununla birlikte RA'lı hastaların periferal kan lenfositlerinde promutejenik olarak bilinen ve oksidatif stres kaynaklı genotoksite göstergesi olan 8-oxohydrodeoxyguanosine düzeylerinin arttığı belirlenmiştir (Tak ve ark. 2000, Filippin ve ark. 2008).

2.1.4. Romatoid Artrit Klinik Özellikleri

RA genellikle haftalar ve aylar boyunca süren yavaş ve sinsi bir başlangıç gösterir. Hastalık vakaların %55 ile %65'inde bu şekilde başlar. Başlangıç belirtileri sistemik veya eklemde olabilir. Bazı bireylerde yorgunluk, halsizlik ellerde şişlik veya yaygın kas ve eklem ağrısı spesifik olmayan ilk yakınmalar olarak ortaya çıkabilir, eklem tutulumu daha sonra belirginleşir. Asimetrik eklem tutulumu nadirde olsa görülebilir. Hastaların %8 ile %15'inde ise hastalık akut başlangıçlıdır. Sinsi tip başlangıca göre daha az simetrik tutulum vardır ve sistemik komplikasyonlar bu gruptaki hastalarda daha sık görülür (Harris ve ark., 2006).

Hastalıkta ilk tutulan eklemler daha çok metakarpofalangeal eklemler, proksimal interfalangeal eklemler, metatarsfalangeal eklemler ve el bilekleridir. Büyük eklemlerde (servikal omurlar, diz, omuz ve kalça eklemleri) genellikle küçük eklemler tutulduktan sonra belirtiler ortaya çıkmaktadır (Harris ve ark., 2006). Her ne kadar hastalık eklemlerde en büyük hasarı oluşturuyorsa da sistemik kronik inflamasyon birçok hayati organa zarar verebilmekte ve çeşitli komplikasyonlara neden olabilmektedir. Eklem tutulumuna eşlik eden komplikasyonların varlığı ise hem

agresif bir hastalık tablosuna hem de ölüm riskin de artışa sebep olabilmektedir. Deri, göz, hematopoetik sistem, solunum sistemi, sindirim sistemi, sinir sistemi, boşaltım sistemi ve dolaşım sistemi hastalıktan en çok etkilenen sistemlerdir ve sistem tutulumları birliktelikte gösterebilmektedir. Ayrıca, RA'lı hastalarda kanser riskinde de belirgin artış vardır ve özellikle hematolojik kanserler ile akciğer kanserlerindeki risk artışı daha belirgindir (Grassi ve ark. 1998, Khurana ve Berney 2005, Simon ve ark. 2015, Raheel ve ark. 2016).

2.1.5. Tedavi

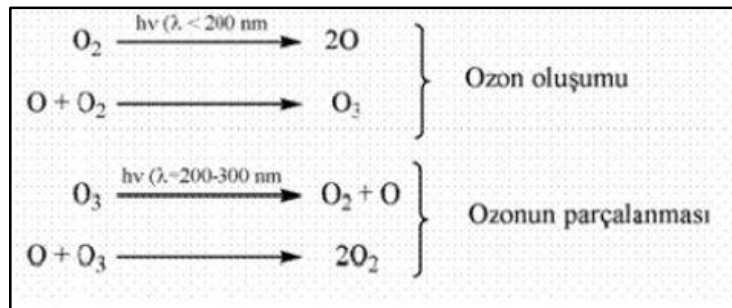
RA tedavisinde amaç eklem yapılarının hasarının önlenmesi ve fonksiyonlarının korunması, yaşam kalitesinin yükseltilmesi, ağrı ve inflamasyonun en aza indirilmesi, komplikasyonların önlenmesidir. Günümüzde hastalığın tedavisinde steroid olmayan antiinflamatuvar ilaçlar (NSAİ), kortikosteroid, geleneksel hastalık modifiye edici anti romatizmal ilaçlar (DMARDs) ve biyolojik ajanlar kullanılmaktadır. He ne kadar son yıllarda IL-1, IL-6 ve TNF- α proinflamatuvar sitokinlerini etkisizleştirmeye yönelik ajanların tedavide kullanılmaya başlanmasıyla tedavide olumlu yönde gelişmeler olmuş olsa da mevcut tedavilerin hiç biri hastalığı tamamen ortadan kaldırmakta yeterli olmamaktadır ve her hasta için hedeflenen remisyon sağlanamamaktadır (Harris ve ark. 2006, Top ve Terekeci 2008).

2.2. Ozon

2.2.1. Ozonun Tanımı

Ozon (O₃) üç oksijen atomundan oluşan, yapısı dolayısıyla oldukça kararsız, gaz olarak depolanması mümkün olmayan (sıvı olarak -111, 9 °C'nin altında depolanabilir), renksiz, keskin kokulu, havadan daha ağır bir gazdır. Flor ve persülfattan sonraki en güçlü oksitleyici ajandır. Oksijenden (O₂) daha yoğundur ve suda çözünürlüğü O₂'den 10 kat fazladır (0 °C'de, 100 ml suda 47 ml ozon çözülebilmektedir). Yarılanma ömrü 20 °C'de 40, 0 °C'de 140 dakikadır (Di Paolo ve ark. 2004, Bocci 2006a, Bocci 2006b, Bocci ve ark. 2009, Schwartz ve Martínez-Sanchez 2012).

Yeryüzünden yaklaşık 20-30 km yüksekte bulunan atmosferin stratosfer tabakası, ozonun doğada en yoğun olduğu yerdir ve burada gazın yoğunluğu 16-20 mg/m³e ulaşabilmektedir. Güneş kaynaklı yüksek enerjili ultraviyole radyasyon ışınları stratosfer tabakasına ulaştığında buradaki O₂ moleküllerini parçalayarak serbest oksijen atomu haline getirirler (Şekil 1). Bu oksijen atomları yine yüksek enerjili ışınlar nedeniyle O₂ molekülleriyle reaksiyona girerek ozonu oluştururlar. Ancak ozon kararsız yapıda bir gaz olduğundan ve ortamdaki yüksek enerjili ışınların sürekliliği nedeniyle hızla oksijen molekülüne ve atomuna ayrılır. Ozonun bu döngüsü sonucu güneşten gelen yüksek enerjili ışınların (UV-C'nin tamamı, UV-B'nin büyük çoğunluğu) soğrularak yeryüzüne ulaşmaları engellenmiş olur. Yeryüzünde oluşan ozon ise 20 µg/m³ lük yoğunluğun altındadır (Di Paolo ve ark., 2004). Bu yoğunluktaki ozon yaşamla bağdaşmakla birlikte, insan kaynaklı olarak ozon yoğunluğunda artış meydana gelmektedir.



Şekil 1. UV ışını etkisiyle ozonun oluşumu ve parçalanması. λ : lamda dalga boyu.(<https://biyosferdekicanlilikindevami.files.wordpress.com/2015/05/ozon1.jpg>)

Yaşadığımız atmosfer tabakası troposferde ozon yoğunluğunun artması hava kirliliği olarak kabul edilir ve insan sağlığı açısından tehlike yaratır. Özellikle akciğerler yapısı gereği ozona karşı oldukça savunmasızdır. Sürekli ozona maruz kalmak akciğerlerde kronik oksidatif stres yaratarak sabit şekilde proinflamatuvar sitokinlerin, ROT ve oldukça toksik olan lipid oksidasyon ürünlerinin (LOPs) oluşumunda büyük çaplı artış meydana getirmektedir. Akciğerlerde başlayan bu lokal inflamasyon zamanla kronikleşip, başka hayati organlarda da kronik inflamasyona sebep olabilmektedir. Ozonun verdiği hasarlar, maruz kalınan yoğunluğa ve süreye, ortamdaki nem oranına (ozon nemli ortamda daha aktiftir) göre değişiklik göstermektedir. Düşük yoğunlukta ozon solunması öksürmeye ve boğazda tahrişe neden olurken; yüksek yoğunlukta ozon solunması bronşiyal mukozada ve pnömosit hücrelerinde hasara neden olup akciğer ödemeine yol açabilmektedir. Ayrıca 0,02 µg/ml yoğunluktaki saf ozonun dört saat solunmasının ölümcül olabileceği belirtilmektedir (Pryor ve ark. 1995, Di Paolo ve ark. 2004, Bocci 2006b, Bocci 2007).

Ozon günümüzde içme sularının sterilizasyonu, tekstil ürünlerinin ağartılması, gıdaların saklanması, temizlik ve dezenfeksiyon sağlamak gibi birçok amaçla ve farklı alanlarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu işlemlerde kullanılan ozon normal soluduğumuz havadan özel olarak geliştirilmiş cihazlarla elde edilir ve *teknik ozon* olarak adlandırılır (Bocci ve ark., 2009).

2.2.2. Medikal Ozonun Tanımı

Medikal diğer bir adıyla tıbbi ozon, endüstriyel amaçlı kullanılan teknik ozondan farklı olarak saf oksijenden elde edilir. Soluduğumuz havanın içeriğinde bulunan nitrojenin nitrik okside dönüşerek toksik etki yaratması nedeniyle medikal ozon elde etmede soluduğumuz hava kullanılmamaktadır (Bocci ve ark., 2009).

Medikal ozon jeneratörleri, saf oksijenden ozon elde etmeye yarayan cihazlardır. Çok çeşitli tip ve özellikte medikal ozon jeneratörü bulunmakla birlikte hepsinin çalışma prensipleri benzerdir. Oksijen geçişi sırasında yüksek voltajlı (5-14 kV) elektrik deşarjları oluşturarak oksijeni ozona dönüştürürler (Bocci ve ark., 2009). Yalnız bu dönüşüm tüm oksijenin ozona dönüşümü şeklinde gerçekleşmez. Saf oksijenin en fazla %5'lik kısmı ozona dönüştürülür. Bu nedenle medikal ozon aslen oksijen/ozon karışımından oluşan bir gazdır. Tıbbi amaçlı kullanılan ozon yoğunluğu

10-80 µg/ml aralığındadır (Bocci 2006a). Uygulanan ozon dozu ise kullanım amacına göre değişmekle birlikte hangi patolojilerde hangi dozda uygulanması gerektiğine dair kabul edilmiş ve görüş birliğine varılmış bir uygulama bulunmamaktadır.

2.2.3. Medikal Ozonun Tarihçesi

Yayınlarda ozondan ilk bahsediliş 1785 yılında Alman fizikçi Martin van Marum'un havadaki bir gazın elektrik akımıyla kıvılcım çıkarıp keskin kokulu ve yüksek okside edici özellikte bir gaza farklılaştığını saptamasıyla başlamıştır. Bunu 1840 yılında Basel Üniversitesi profesörlerinden Christian Friedrich Schönbein'in oksijenden elde ettiği keskin kokulu gaza "ozon" adı vermesi ve bu gazın biyolojik yapılarda çift bağ yapılarına bağlanabildiğini belirtmesi takip etmektedir. 1857 yılında Werner von Siemens'in tasarladığı cihazla (manyetik indüksiyon borusu) içme suyunu arıtılmasıyla ozondan faydalanılmaya başlanmıştır. 1896 yılında patenti Tesla'ya ait ozon gazı üretici sistemin geliştirilmesinden sonra ozonun çeşitli alanlarda kullanımı yaygınlaşmıştır ve 1957 senesinde günümüzde kullanılan medikal ozon jeneratörlerinin gelişimine zemin hazırlayan oksijen/ozon gaz karışımını üreten cihaz Dr. Joachim Hansler tarafından geliştirilmiştir (Schwartz ve Martínez-Sanchez, 2012).

Tıbbi amaçlı ozon kullanımıyla ilgili bilgiler 18.yy'ın ikinci yarısına dayanmakla birlikte ilk kez 1899'da İsviçreli diş hekimi Fisch tarafından lokal olarak dezenfektan amaçlı kullanılmıştır. Bu dönemden sonra ozonun tıbbi kullanımıyla ilgili değişik endikasyonlarla ve farklı dallarda kullanımı yaygınlaşmıştır. Cerrah Erwin Payr'in ozonun tedavi amaçlı kullanımının faydalarını görmesi ve bunu açıklaması; ardından da Fransız Dr. P. Aubourg'un kolit ve fistül tedavisinde ozonu rektal yoldan uygulamaya başlaması takip etmiştir. 1960'lı yıllara gelindiğinde Almanya'da ilk ozon terapi okulu açılarak ve ozonun tedavi amaçlı uygulamasına yönelik hekimlerin yetiştirilmesinin adımları atılmıştır. 1968'de ise günümüzde en yaygın şekilde kullanılan majör otohemoterapi yöntemiyle yoğun şekilde ozon uygulamalarına başlanmıştır (Schwartz ve Martínez-Sanchez, 2012). Geçen zaman içerisinde ozonun tedavi amaçlı kullanımındaki artış özellikle 1980 sonrasında tıbbi amaçlı ozon kullanımına ilişkin yayınlarda artışı da beraberinde getirmiştir.

Günümüzde ise her ne kadar etkili bir tedavi olarak medikal ozon uygulamaları daha gelişmiş ve bilinen duruma gelmişse de; ozon tedavisi, etkinliği ve güvenirliliği

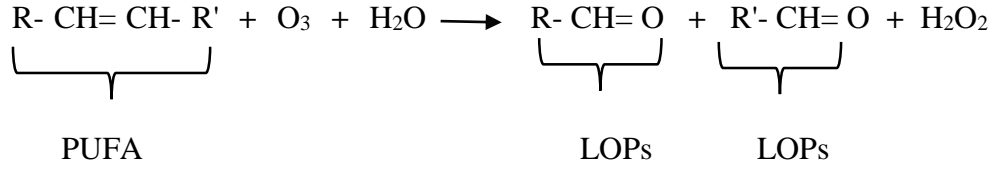
kanıtlanmış bir tedavi yöntemi değildir. Ne var ki Almanya, Rusya, Küba ve İtalya başta olmak üzere çeşitli ülkelerdeki hekimler tarafından gerek tedavi gerekse tıbbın tamamlayıcısı olarak uzun yıllardır farklı dozlar ve yollarla ozon terapisi uygulanmaktadır.

Ülkemizde ise Sağlık Bakanlığının düzenlediği Geleneksel ve Tamamlayıcı Tıp Uygulamaları Yönetmeliği ile ozon uygulaması ve ozonun kullanım alanlarıyla ilgili yasal düzenleme yapılmıştır (T.C. Resmi Gazete, 27 Ekim 2014, sayı: 29158; Ek-3).

2.2.4. Medikal Ozonun Etki Mekanizması

Ozonun saf suda çözünürlüğü diğer gazlarda olduğu gibi sıcaklık, basınç ve yoğunluğuna bağlıdır. Ozon saf suda çözündüğünde başka moleküllerle reaksiyona girebilme özelliğini yitirir. Ancak ozonlu su olarak dezenfektan amaçlı kullanılabilir (Bocci ve ark., 2011a). Öte yandan ozonun, plazma, interstisyel sıvı, lenf sıvısı ve idrar gibi vücut sıvılarında çözünürlüğü saf sudan farklıdır. Ozon gazların çözünme yasasına (Henry yasası) aykırı hareket eder. Biyolojik sıvılarda hızla çözünüp reaksiyona girerek oldukça reaktif olan oksijen atomunu (O[•]) ve oksijen molekülünü oluşturur. Dolayısıyla ozonu bu sıvılarla temas ettikten sonra ozon olarak saptamak mümkün olamamaktadır. Uygulanan gaz karışımının içinde bulunan oksijenin tamamıysa hemoglobine bağlanabilmektedir. Ozon cilt ya da mukozaya penetre olamaz ve hücre içine giremez (Bocci 2006a). Ancak, çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA), askorbik asit ve ürik asit gibi antioksidanlar, albümin, indirgenmiş glutatyon (GSH) ve sistein gibi –SH grubu içeren tiyol birleşikleriyle kolaylıkla; doza bağımlı şekilde karbonhidratlar, enzimler, DNA ve RNA ile tepkimeye girebilmektedir. Tüm bu biyolojik moleküller ozonla girdikleri tepkime sonrası elektron kaybederek okside olurlar (Bocci 2006a, Travagli 2007, Bocci ve ark. 2011a).

Ozon kanla temas ettiğinde ise hızla plazmada çözünür. Çözünme sonrası bir kısmı plazmada bulunan ürik asit, askorbik asit, indirgenmiş glutatyon, sistein ve albümin gibi antioksidan moleküller tarafından saniyeler içinde etkisizleştirilirken; kalan kısmı plazmada bulunan PUFA ile girdiği reaksiyon sonrası hidrojen peroksit (H₂O₂) ve LOPs oluşumuna neden olur (Bocci 2006a, Bocci ve ark. 2011a, Borrelli ve ark. 2015).



Ozonun asıl tedavi edici ve biyolojik etkilerinin girdiği tepkimeler sonucu oluşan H₂O₂ ve LOPs aracılığıyla gerçekleştiği öne sürülmektedir. Hidrojen peroksit hücre membranından geçip hücre içine girdiğinde bir dizi biyokimyasal reaksiyonu uyararak aktive edebilmektedir. Uyardığı biyokimyasal reaksiyonlar etkilediği hücre tipiyle ilişkilidir. Eritrositlerde glikoz 6 fosfat dehidrojenaz enzimini aktive ederek glikolizi uyarırken; ATP ve 2,3-difosfogliserat'ta meydana getirdiği artışa bağlı oksijenin hemoglobinden ayrılmasını kolaylaştırıp dokuların oksijenlenmesini artırır. Lökositlerde, NF-kβ'yı aktive ederek TNF-α, IFN-γ, IL-1, IL-6 ve IL-8 gibi birçok sitokin, akut faz reaktanlarının, granülosit monosit koloni stimulan faktörün (GM-CSF) ve hücre adezyon moleküllerinin sentezini uyarır, nötrofillerin fagositik aktivitesini artırır. Trombositlerde büyüme faktörlerinin (PDGF ve TGFβ-1) üretimini uyarır. Bahsi geçen hücrel yanıtı meydana getiren hücre içi H₂O₂ yoğunluğu (4 μM) oldukça düşük olup, saniyeler içinde glutatyon peroksidaz (GSH-pxs) ve katalaz gibi antioksidan enzimlerce suya dönüştürülür. Benzer şekilde plazmada oluşan ancak hücre içine girmeyen H₂O₂ de kısa bir süre içinde ortamdan uzaklaştırılır (Larini ve Bocci 2005, Bocci ve ark. 2011a, Bocci 2012).

Ozonun neden olduğu çoklu doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucu lipoperoksidaz (LOO^{*}), alkoksi radikali (LO^{*}), lipohidroperoksit (LOOH), isoprostan ve aldehitler gibi lipid peroksidasyon ürünleri açığa çıkar. Oluşan bu ajanlardan organizma için oldukça toksik olan 4-hydroxy-2,3 transnonenal (4-HNE) ve trans-4-hydroxy-2-hexenal (4-HHE)'in ozonun biyolojik etkilerinin oluşmasına aracılık eden ajanlardır (Bocci 2006a, Bocci ve ark. 2011a, Bocci 2012, Borrelli ve ark. 2015). Hidrojen peroksitle kıyaslandığında daha kararlı yapıya sahiptirler. Bu ajanlar albümine bağlanmak suretiyle tüm dokulara taşınabilirler. Hedef hücrelere ulaştıklarında akut oksidatif stres tepkisinin oluşmasında etkin rol oynarlar. Albümine bağlı HNE hedef hücrenin sitoplazmasına ulaştığında albüminden ayrılıp burada bulunan Keap1 (Kelch ECH associating protein 1) -Nrf2 (nuclear factor erythroid 2-

related factor 2) kompleksine bağlanır. Transkripsiyon faktörü olan Nrf2 kompleksten ayrılarak nükleusa geçer. Nrf2, nükleusta bulunan MAF proteiniyle heterodimer oluşturup DNA'da bulunan antioksidan yanıt faktörlerine (ARE ve ya EhRe) bağlanarak; süperoksitdismutaz (SOD), katalaz, GSH redüktaz (GSH-R), GSH peroksidaz (GSH-Px), GSH transferaz (GSH-Tr), ısı şok proteini 70 (HSP70) ve hemoksijenaz-1 (HO-1) gibi antioksidan proteinlerinin sentezini artırır (Sagai ve Bocci 2011, Bocci 2012, Borelli ve ark. 2015).

Bahsi geçen etkiler tedavi edici ozon dozları için geçerlidir. 80 µg/ml yoğunluğun altındaki ozonun toksik etkilerinin ürik asit, albümin, GSH ve askorbik asit gibi plazma antioksidanlarınca kompanse edilebildiği; bu esnada da total antioksidan kapasitede %20'lik bir düşüş yaşandığı ancak bu düşün 30 dakika gibi bir sürede normale döndüğü belirtilmektedir (Larini ve Bocci 2005, Travagli ve ark. 2007, Bocci ve ark. 2011c).

2.2.5. Medikal Ozon Uygulama Yöntemleri

Ozonun tedavi edici, tedavi edici olmayan ve toksik yoğunluğu bulunmaktadır. Ozonun 10-80 µg/ml arasındaki yoğunluğu tedavi edici olarak kabul edilmektedir (Bocci 2012). 5-10 µg/ml yoğunluğun altındaki ozonun var olan antioksidan sistemlerce anında ortamdan uzaklaştırılması (Bocci 2006a), 80 µg/ml ve üzeri yoğunlukta ise antioksidan sistemlerin yetersiz kalması sonucu ozonun toksik etkilerinin organizmaya zarar vermesi nedeniyle kullanımı önerilmemektedir. Tedavi edici ozon dozu hastaya, uygulanacak yöntem ve hedeflenen amaca göre değişmektedir. Bununla birlikte ozon terapisine başlamadan önce ve terapi süresince hastanın pro-oksidan ve antioksidan kapasite durumunun bilinmesinin uygulanacak ozon dozunun belirlenmesinde ve terapinin güvenli olup olmayacağına karar verilmesi bakımından önemli olduğu da belirtilmektedir (Hernandez 2007, Simonetti ve ark. 2014).

Medikal ozon parenteral veya lokal olarak uygulanabilmektedir. Başlıca ozon uygulama yöntemleri: Majör Otohemoterapi (MOHT), Minör Otohemoterapi (MIHT) ve rektal ozon uygulamasıdır.

2.2.5.1. Majör Otohemoterapi (MOHT)

Hastanın vücut ağırlığına bağlı olarak alınan 100-225 ml aralığındaki kanın in vitro ortamda ozonlanmasından sonra hastaya intravenöz yoldan geri verilmesi prensibine dayanır.

Hastadan alınan kan %3,8'lik sodyum sitratla 1: 9 oranında vakumlu cam şişe içinde karıştırılır. Kan miktarı kadar, ozon yoğunluğu 20-80 µg/ml aralığında olacak şekilde, gaz karışımı (%95 O₂, %5 O₃) şişeye ilave edilir. 15-20 dakika sonra transfüzyon işlemine başlanır (Bocci ve ark., 2011a).

MOHT kullanımı en yaygın olan ve birçok patolojik durumda sıklıkla uygulanan ozon uygulama yöntemidir. Avrupa'da son birkaç yılda bir milyona yakın MOHT ile ozon uygulaması yapıldığına yayınlarda sıkça değinilmektedir. Yöntemde kullanılan ozonun yoğunluğu, terapinin sıklığı ve süresi patolojinin çeşidine ve uygulayan merkeze göre değişmekle birlikte ozon uygulamasının haftada iki kez yapılmasının, terapiye düşük dozlarla başlanıp önerilen maksimum doza kademeli olarak çıkılmasının uygun olduğu; ozon konsantrasyonunun 5 µg/ml'den fazla arttırılmaması önerilmektedir (Bocci ve ark. 2011b, Bocci ve ark. 2011c). Tablo 1'de MOHT'nin uygulandığı patolojiler ve kullanımı önerilen ozon yoğunlukları yer almaktadır.

Tablo 1. MOHT uygulanan patolojiler ve önerilen ozon konsantrasyonu (Bocci ve ark. 2011b).

Patoloji	Başlangıç Ozon Yoğunluğu (µg/ml)	Çıkılabilecek Maksimum Ozon Yoğunluk (µg/ml)
Bulaşıcı hastalıklar	20-25	70
Vasküler hastalıklar	20	40-50
Dejeneratif hastalıklar	20	30-40
Solunum sistemi hastalıkları	15	30-40
Otoimmün hastalıklar	20-40	80
Metastatik tümörler	25	70-90

2.2.5.2. Minör Otohemoterapi (MIHT)

Hastadan alınan 5 ml kan eşit hacim gaz karışımıyla (%95 O₂, %5 O₃), ozon yoğunluğu 80-100 µg/ml aralığında olacak şekilde, ozona dayanıklı enjektör içinde kuvvetli şekilde çalkalanıp köpük oluşturularak bekletilmeden hastanın gluteal kasına enjekte edilir. Bu yöntemin bağışıklık yanıtlarını düzenleyici ve çeşitli biyolojik yanıtları aktive edici etki meydana getirdiği düşünülmektedir. Bu etkilerin enjeksiyon bölgesinde, yüksek yoğunlukta ozon uygulanmasına bağlı, oluşan denatüre proteinlerin, parçalanmış eritrositlerin ve apoptoza uğrayan hücrelerin ortamdaki uzaklaştırılması için bölgeye göçe eden nötrofil ve makrofajların steril yangı yanıtı başlatması yoluyla ortaya çıktığı öne sürülmektedir (Bocci 2006a). Kronik enfeksiyon hastalıklarında, özellikle herpes enfeksiyonlarında, MOHT'ye destek amaçlı uygulanması önerilmektedir (Bocci ve ark., 2011a).

2.2.5.3. Rektal Ozon Uygulaması

Uygulama belirli yoğunlukta ozon içeren gaz karışımının belirli hacminin doğrudan rektuma infüzyonu şeklinde yapılmaktadır. Uygun cihaz ve donanımlar sağlanması durumunda hastaların evde de uygulayabileceği bir yöntem olarak nitelendirilmektedir. Ancak, ozonun mutajenik özelliğinden dolayı tekrarlan uygulamaların dikkatli yapılması gerektiği belirtilmekte; uygulanacak ozon dozunun 8 mg'dan (40 µg/ml X 200 ml O₂/O₃ gaz karışımı) düşük olması ve 10-35 µg/ml aralındaki ozon yoğunluğunun kullanılması önerilmektedir (Bocci ve ark., 2013).

Rektal yoldan ozon uygulaması MOHT yönteminden sonra en sık kullanılan ve sistemik etki meydana getirdiği belirtilen ozon uygulama yöntemi olmakla birlikte özellikle venöz girişin zor olması nedeniyle MOHT yönteminin uygulanamayacağı hastalarda da alternatif yöntem olarak uygulanmaktadır. Bağışıklık sistemini düzenleyici ve oksijen metabolizmasını arttırıcı etkiler meydana getirdiği öne sürülmektedir (Luis ve ark., 2015). Öte yandan kolorektal lümende bulunan feçes ve mukopolisakkaritlerin uygulanan ozonu etkisizleştirdiği ve bu bölgedeki sıvılarla girdiği etkileşim nedeniyle rektal mukozadan ozon emiliminin mümkün olmadığı; oluşan peroksidasyon ürünlerinin sadece bazılarının dolaşımda saptanabildiği ve ayrıca etki mekanizmasının henüz tam olarak aydınlatılamamış olması gibi

nedenlerden ötürü pekte tercih edilmemesi gereken bir uygulama olduğu yönünde görüşlerde bulunmaktadır (Bocci 2006a, Bocci ve ark. 2011c, Bocci ve ark. 2013).

Belirtilen ozon uygulama yöntemleri dışında vajinal infüzyon, vücut boşluklarına, deri altına ve kas içine de doğrudan enjeksiyonla ozon uygulaması yapılmaktadır. Ancak ozonun intravenöz ve solunum yoluyla uygulanması yasaklanmıştır (Bocci ve ark. 2011a, Bocci ve ark. 2011c).

2.2.6. Medikal Ozonun Klinik Uygulamaları

27 Ekim 2014 tarih ve 29158 sayılı T.C. Resmi Gazete’de yayınlanarak yürürlüğe giren Geleneksel ve Tamamlayıcı Tıp Uygulamaları Yönetmeliği’nde

- Eklem, tendon ve ligamen yaralanmalarında
- Vertebra ve disk patolojilerine bağlı yansıyan ağrıda
- Myofasial ağrı
- Fibromiyalji
- Enfekte diyabetik yaralar
- Gingivitis, peridontitis
- Nöropatik ağrı
- Vertebral disk patolojilerinde
- Revaskülarizasyon şansı olmayan kritik iskemili ekstremitte yaraları

ve bu belirtilen patolojilerle ilişkili olabilecek alanlarda tedaviyi destekleyici yöntem olarak ozon uygulamasının yapılabileceği belirtilmekle birlikte, yayınlarda ozon uygulamasının multipl skleroz, RA, psoriasis, crohn hastalığı gibi otoimmün hastalıklarda, amfizem, kronik obstrüktif akciğer hastalığı, idyopatik pulmoner fibrosis, akut solunum bozukluğu gibi akciğer hastalıklarında; akne ve atopik dermatit gibi cilt hastalıklarında, ortopedik hastalıklarda, metastatik kanserlerde, kronik yorgunluk sendromunda, ciddi sepsis vakalarında ve çoklu organ yetmezliklerinde, iskemik hastalıklarda, yaşa bağlı maküler dejenerasyonda, lomber ve servikal fitiklarda, vajinal ve rektal bakteriyel, fungal ve viral enfeksiyonlarda, yanıklarda ve diğer birçok patolojide etkili olduğuna dair ifadeler yer almaktadır. Ancak bu bilgilerin çoğu ozon terapisi uygulayan hekimlerin bildirimlerinden ibarettir (Bocci 2006a, Bocci 2006b).

Kontrollü klinik çalışmalar sonucu elde edilen bilimsel veriler kısıtlıdır, bu hastalıkların ozon uygulamasına bağlı iyileştiği yönünde kabul gören bilimsel kanıtlar yetersizdir ve açık değildir.

2.2.7. Medikal Ozon Uygulamasının Kontraendikasyonları ve Yan Etkileri

Yayınlarda ozon uygulamasına bağlı oluşan herhangi bir akut ya da kronik toksik etkilerden bahsedilmemektedir. Ozon uygulaması yapanların olumsuz geribildirim almadıkları ve hastaların ozonu iyi tolere ettiği gibi aslında farazi bilgilerden öteye geçemeyen görüşler, ozon terapisinin olası yan etkilerinin araştırılmasındaki eksikliğe dikkat çekmektedir.

2.2.7.1. Medikal Ozon Uygulamasının Yapılmaması Gereken Durumlar

Ozonun gaz formunda damar içine enjeksiyonu hava embolisi sonucu ölüme yol açabileceğinden yasaklanmıştır. Glukoz 6 fosfat dehidrogenaz enzim eksikliği, Basedow Graves gibi kontrolsüz hipertiroidi vakalarında, masif kanamalı hastalarda, malign hipertansiyon, ağır trombositopeni ($<50000/\text{mm}^3$) varlığında ozon uygulaması yapılmamaktadır (T.C. Resmi Gazete, 27 Ekim 2014, sayı: 29158; Ek-3).

2.2.7.2. Karşılaşılan Komplikasyonlar

Yayınlarda şimdiye kadar ozon uygulamasına bağlı dört hasta kaybının gerçekleştiği ve bunlarında 1984 yılında uygulaması yasaklanan intravenöz ozon uygulamasından kaynaklandığı belirtilmektedir (Bocci ve ark., 2011c).

2.3. DNA Hasarı ve Mekanizmaları

İnsan genomu gelişim, büyüme, metabolizma ve üremenin bütün yönlerini, temel olarak insanın fonksiyonel bir organizma olmasını belirlemek için gerekli olan bilgiyi yapısında bulunduran deoksiribonükleik asitten (DNA) oluşur. İnsan genomu, genetik bilgi birimi olarak nitelenen, yaklaşık 50.000 gen içermektedir. Genler her hücrenin çekirdeğinde kromozom adı verilen yapıları oluşturan DNA'da kodlanmaktadır. Polimerik bir nükleik asit makromolekülü olan DNA, çift zincirli sarmal yapıdadır. Beş karbonlu şeker (deoksiriboz), azot taşıyan bir baz (adenin, timin, sitozin, guanin) ve bir fosfat grubu içeren nükleotidlerin milyonlarcasının polinükleotid zincirleri şeklinde polimerize olmasıyla meydana gelir. Nükleotidler birbirine şeker grupları arasında oluşan 5'-3' fosfodiester bağlarıyla bağlanırken, bazlar karşılıklı olarak hidrojen bağlarıyla bağlanarak çift zincirli yapının sıkı şekilde kenetlenmesini sağlar (Lindhal 1993, Nussbaum ve ark. 2005).

DNA, nükleotid yapısını veya fosfodiester bağlarını bozmaya yönelik genotoksik ajanlar tarafından sürekli saldırıya maruz kalmaktadır ve genetik materyalde oluşan tüm değişiklikler "DNA Hasarı" olarak adlandırılır. Genomda, gün içinde sayısı on binleri bulabilen DNA hasarları oluşmaktadır ve hasarlar baz düzeyinde olabileceği gibi kromozom yapısında ya da kromozom sayısında değişikliğe neden olabilecek kadar kompleks yapıda da olabilmektedir. Normal koşullarda oluşan DNA hasarları, DNA tamir mekanizmalarıyla düzeltilir. Ancak hasar oluşumu, tamir kapasitesini aştığında ya da tamirden sorumlu mekanizmalar aksaklığa uğradığında oluşan hasarlar kalıcı hale gelir. DNA'da meydana gelen hasarlar kalıcı hale geldiğinde mutasyonlara, çeşitli hastalıklara, kansere, hücrelerin fonksiyon kaybına veya hücrelerin ölümüne sebep olabilirler (Lindhal 1993, Sancar ve ark. 2004, Hakem 2008, Jackson ve Bartek 2009).

DNA hasarlarına yol açan olayların bazıları hücre metabolizması sonucu meydana gelirken, bazıları ise dış faktörlerden kaynaklanmaktadır. Güneşten gelen ultraviyole radyasyon, iyonize radyasyon, çeşitli kimyasallar dış etkenler olarak nitelendirilir ve farklı özelliklere sahip bu ajanların meydana getirdikleri DNA hasarları da farklılık gösterir. Olağan hücresel metabolizma sonucu açığa çıkan ROT ve RNT ile DNA'nın kendini eşlemesi sırasında oluşan yanlış baz eşleşmeleriyle kendiliğinden hasar oluşumuna sebebiyet vermektedir (Hakem 2008).

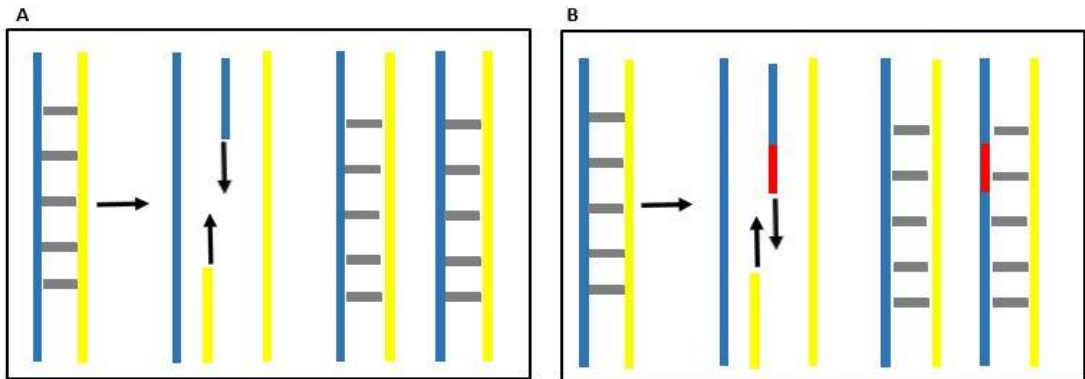
HücreSEL metabolik olayların yol açtığı DNA hasarları, dış etkenlerden kaynaklanan DNA hasarlarından daha fazla olmakla birlikte; oluşan DNA hasarları ya aynıdır, ya da benzer özelliktedir. Çoğu kanser türlerindeyse endojen ve ekzojen kaynaklı DNA hasarlarının birlikteliği söz konusudur (Bont ve Larebeke, 2004).

2.3.1. Spontan (Endojen) DNA Hasarları

HücreSEL olaylar esnasında ortaya çıkan etkenlerden ya da canlılığın devamının sağlanması esnasında gerçekleşen rutin olaylar sonucu oluşan DNA hasarları endojen kaynaklı hasarlardır.

2.3.1.1. DNA Replikasyonu Sırasında Ortaya Çıkan Yanlış Eşleşmeler

DNA'nın tamamen kendine benzer bir DNA meydana getirme işlemi olan replikasyon, normal hücre döngüsünün bir parçasıdır. Replikasyon esnasında DNA çift zinciri açılır ve iki zincirde kendine komplementer bir zincir sentezlediğinde replikasyon tamamlanır. Replikasyon sonrası, ana DNA molekülü ile nukleotid dizisi tamamen aynı olan yeni DNA molekülü ortaya çıkar (Şekil 2). Böylece DNA da taşınan genetik bilgi her replikasyon olayı ile korunarak aktarılır. Ancak bu esnada yanlış baz eklenmeleri meydana gelebilmektedir (Nussbaum ve ark. 2005, Mazouzi ve ark. 2014). Normal şartlarda replikasyon esnasında etkili olan enzimler bu yanlış eklemeyi tanıyarak hatalı bölgeyi düzeltir. Çeşitli nedenlerle hatalar düzeltilemediğindeyse kalıcı mutasyon meydana gelmiş olur ve bir sonraki replikasyonda da hatalı baz kopyalanmasına ve mutasyonun devamlılığına neden olur.



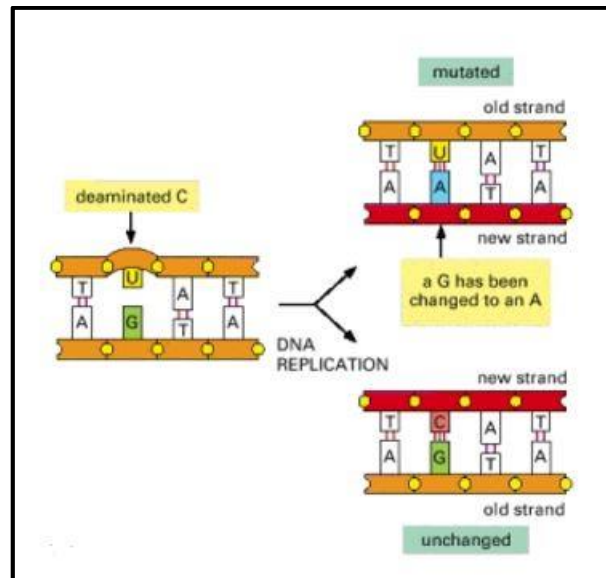
Şekil 2. DNA replikasyonu. A normal replikasyon, B hatalı replikasyon.

2.3.1.2. DNA’da Var Olan Kararsızlıklar Sonucu Oluşan Hasarlar Bazların Deaminasyonu

Bazlar başlıca pürinler ve pirimidinler olarak iki gruba ayrılır. Adenin (A) ve guanin (G) pürin grubuna dahilken; timin, sitozin ve urasil pirimidinler grubunda yer almaktadır. DNA sarmal yapısında adenin ile timin (A=T), guanin ile sitozin (G=C) birbiriyle eşleşmiş halde bulunur. Urasil (U) ise normal şartlarda DNA yapısında bulunmaz (Nussbaum ve ark., 2005).

Deaminasyon, bazların kimyasal yapısında bulunan bir “amin” grubunun hidroliz yoluyla, non-enzimatik olarak, ayrılması olayıdır (Şekil 3). Çift zincirli DNA’da tek zincirli DNA ya oranla daha az deaminasyon meydana gelmektedir (Lindhall 1993).

Adenin, guanin, sitozin ve 5-metilsitozin deaminasyona uğrayan bazlardır. Deaminasyon sonrası sırasıyla hipoksantin, ksantine, urasil ve timin bazlarına dönüşürler. Ksantin, guanin gibi sitozinle bağ kurabilirken; hipoksantin, adeninden farklı olarak, timin yerine guaninle; urasil ise sitozinden farklı olarak, guanin yerine adeninle bağ kurar. Tüm bu hatalar replikasyon esnasında yanlış baz eşleşmelerine neden olarak nükleotid dizilimini değiştirirler ve mutasyona yol açarak genetik bilgede değişiklik meydana getirirler (Akbari 2004).



Şekil 3. Sitozin deaminasyonu

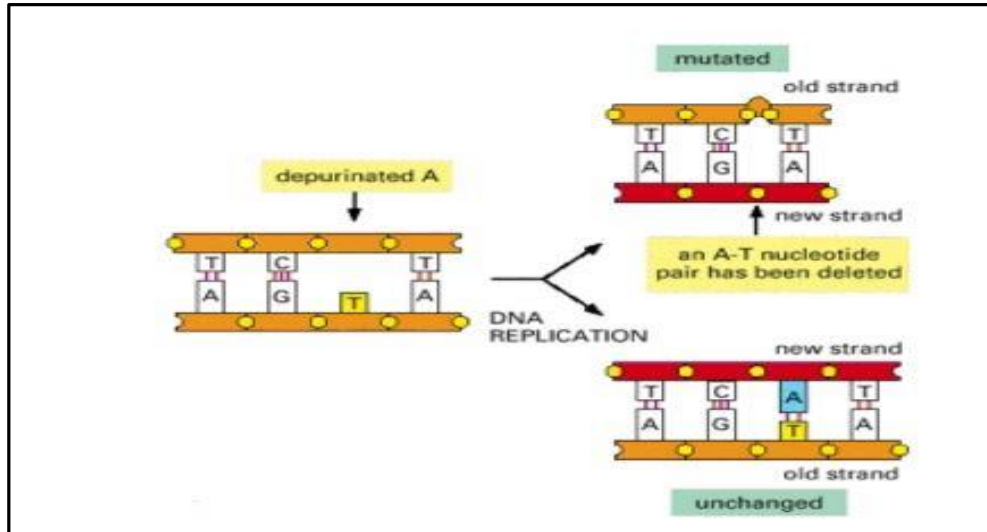
(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26879/figure/A833/?report=objectonly>)

Metilasyon

Sitozin bazının 5' ucuna DNA-metiltransferaz enzimi aracılığıyla metil grubunun eklenmesi işlemidir. Nükleotid dizilerinde sadece guaninden sonra gelen sitozini etkiler. 5-metilsitozin ise kendiliğinden deaminasyona uğrayarak timine dönüşür ve replikasyon sırasında C=G eşleşmesi yerine T=A eşleşmesine sebep olarak nükleotid dizisinde değişikliğe yol açar. Metilsitozinin deaminasyonu, sitozin deaminasyonundan daha siktir (Lindhal 1993, Jakson ve Loeb 2001, Nussbaum ve ark. 2005).

Depürinasyon ve Depirimidinasyon

DNA yapısını oluşturan baz ve şeker grubu arasında glikozit bağları bulunur. Bu bağların hidroliz yoluyla kopması sonucu baz eksilmesi olayına *depürinasyon/depirimidinasyon* adı verilir. Şeker grubu ve pürin bazları (A, G) arasındaki glikozit bağların yıkımı, şeker grubu ve pirimidin bazları (C, T) arasındaki glikozit bağlarının yıkımından daha yaygındır. Glikozit bağların kopması pürin ve pirimidin bazlarının kaybına neden olarak, DNA üzerinde apürinik/apirimidinik (AP) bölgeler meydana getirir (Şekil 4). Oluşan bu değişim ise DNA replikasyonu sırasında yanlış eşleşmelere ve replikasyonun durmasına sebep olabildiği gibi bu abazik bölgeler DNA kırıklarına da zemin hazırlar (Dusinska ve Collins, 2008).



Şekil 4. Adenin depürinasyonu.

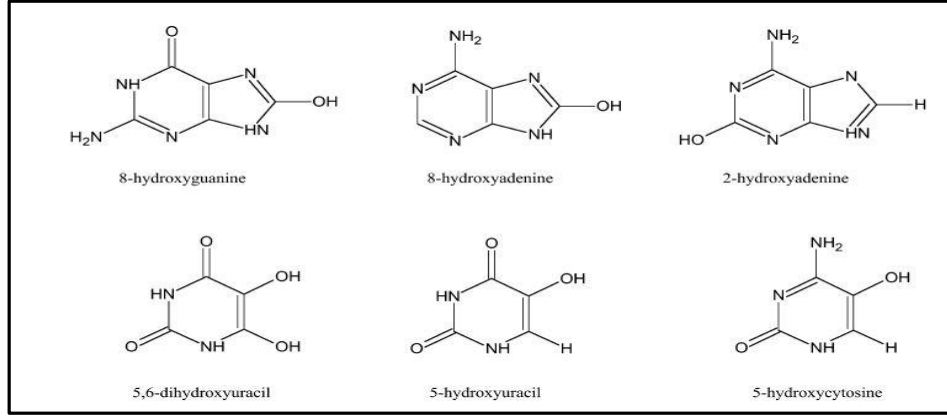
(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26879/figure/A833/?report=objectonly>)

2.3.1.3. Oksidatif Hasar

Hücre metabolik olaylar, biyokimyasal reaksiyonlar, fagositik aktivasyon, inflamasyon ve çevresel faktörler (UV, IR, kimyasallar) sebebiyle canlı organizmada sürekli RNT ile ROT oluşmaktadır. Süperoksit anyonu ($O_2^{\cdot-}$), OH radikali, allosil (RO^{\cdot}), peroksil (RO_2^{\cdot}) ROT'tur. Radikal olmamakla birlikte oksidan olan veya kolaylıkla oksijen radikallerine dönüşebilen, hidrojen peroksit (H_2O_2), singlet oksijen (1O_2) ve ozon (O_3) ROT içinde değerlendirilirler (Bont ve Larabeke 2004, Bocci 2009, Ohnishi ve ark. 2013). Öte yandan, biyolojik sistemlerde ROT oksidan özelliklerini ortadan kaldırmaya yönelik antioksidan sistemler adı verilen savunma mekanizmaları bulunur. Fizyolojik koşullarda oksidan oluşumuyla oksidanların etkisizleştirilmesi dengelenmiş durumdadır.

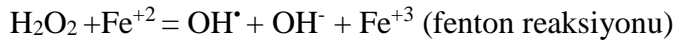
Çeşitli nedenlerle oksidan oluşumuyla, oksidanların etkisizleştirilmesi arasındaki denge oksidanlar lehine bozulursa oksidatif stres meydana gelir ve oksidanlar biyolojik yapılarda direk ya da dolaylı olarak hasar oluşturup, mutasyon ve kansere sebep olabilirler.

Oksidatif hasara en duyarlı yapılar lipit membranlar olmakla birlikte, biyolojik yapıların çoğu özellikle DNA oksidatif strese bağlı hasar oluşumuna yatkındır. Nitekim DNA'da en sık oluşan hasar, oksidatif DNA hasarlarıdır ve oksidanların neden olduğu 100'den fazla oksidatif DNA hasarı tanımlanmıştır. Oksidanlar çeşitli mekanizmalar aracılığıyla DNA'da tek ve çift zincir kırıklarına, DNA-protein çapraz bağlanmalarına, abazik (AP) bölgeler oluşumuna ve DNA yapısında bulunan şeker ve bazların modifikasyonlarına neden olabilirler. Oksidanlar, doğrudan bazları okside ederek modifikasyona neden olabilecekleri gibi; DNA replikasyonu sırasında yada mevcut hasarların onarım aşamasında da baz modifikasyonuna neden olabilmektedir (Bashir ve ark. 1993, Poulsen ve ark. 1998, Benigni ve ark. 2013, Dizdaroğlu 2015).



Şekil 5. Oksidasyona uğramış bazı DNA yapıları (Bont ve larabeke, 2004).

Guanin bazının, OH radikaliyle modifikasyonu en sık rastlanan baz modifikasyonlarından (Şekil 5). OH radikalinin DNA’da hasar oluşturabilmesi için ya DNA’da ya da DNA’ya yakın bir bölgede bulunması gerekir. Ancak OH radikalinin nükleus mebranından kolayca geçip nükleus içine girebilmesi pek mümkün olmamakla birlikte; H₂O₂ nükleus membranından kolaylıkla geçebilmekte ve metal iyonlarıyla etkileşime girerek (fenton reaksiyonları) OH radikallerini oluşturabilmektedir (Bont ve larabeke, 2004).



OH radikali, DNA’da bulunan guaninin 4, 5 ve 8. karbonu ile reaksiyona girebilmektedir. 8. Karbonuna bağlanmak ve bazı okside etmek suretiyle guanini 8-hidroksideoguanozin’e (8-OHdG) dönüştürür. Bu değişim normal şartlarda DNA onarım mekanizmalarınca algılanır ve bu modifiye baz replikasyon öncesinde DNA’dan uzaklaştırılır. Meydana gelen metabolit 8-hidroksideoguanozin (8-OHdG) şeklinde dolaşıma verilir. Dolaşımdaki 8-OHdG oksidatif hasarın doğrudan göstergesidir. Dokuların oksijen tüketimi ile 8-OHdG bazal düzeyi arasında doğrusal bir oran vardır. Organizmada var olan oksidasyonu yansıtır. Ayrıca, ROT oluşumuna neden olan tüm etkenler 8-OHdG oluşumuna da katkıda bulunur. Eğer modifikasyona uğrayan baz DNA yapısından uzaklaştırılmazsa replikasyon sonucu G-C eşleşmesi yerini A-T eşleşmesine bırakarak kalıcı mutasyon meydana getirir (Yokuş ve Çakır 2002, Ohnishi ve ark. 2013, Dizdaroğlu 2015).

2.3.2. Çevresel Nedenlerden Kaynaklanan Hasarlar

DNA, UV veya iyonize ışınlarla maruz kalırsa ve çevrede bulunan kimyasal mutajenlerle reaksiyona girerse, depürinasyon, demetilasyon gibi kendiliğinden kimyasal olaylar meydana gelir ve buda mutasyonlara neden olur. Genellikle düzeltilebilen replikasyon bağımlı DNA değişikliklerinin tersine, fiziksel veya kimyasal ajanlardan kaynaklanan nükleotid değişiklikleri sıklıkla kalıcı mutasyonlara dönüşür (Nussbaum ve ark., 2005).

Ultraviyole (UV) ışını DNA'da doğrudan ya da dolaylı yollarla hasar oluşumuna neden olur. Fotokimyasal reaksiyon sonucu, doğrudan oluşan hasarlarda, baza ulaşan ışının dalga boyu ve bazın absorpsiyon derecesi önemlidir. UV'nin DNA'da oluşturduğu spesifik doğrudan hasar, bitişik yada karşılıklı konumda bulunan pirimidin bazlarının (C ve T) aralarında kovalent bağlarla bağlanmalarına neden olarak pirimidin dimerleri veya komşu iki pirimidin bazının 6 ve 4. karbonları arasında kovalent bağ oluşmasına yol açarak 6-4 fotoürünü (64PPs) olarak adlandırılan yapıyı meydana getirmesidir. En sık T-C dimerleri, nadir olarak da C-C veya T-T dimerleri oluşur. Bu bağlanmalar, replikasyon ve transkripsiyonu bloke eden, DNA'da kıvrılma ve dirsek yapıların oluşum nedenidir. UV ayrıca, hücreler aracılığıyla ROT oluşumunu tetikleyerek de dolaylı olarak oksidatif DNA hasarına yol açabilmektedir (Ikehata ve Ono, 2011).

İyonize radyasyon (IR), doğada bulunan radyoaktif maddelerin ışıması sonucu oluşur. Canlı dokulardaki molekül ve atomlardan elektron kopararak değişiklik meydana getirebilen yüksek enerjili ışınlardır. DNA'da çapraz bağlanmalara, çift zincir kırıklarına, pürin ve pirimidin bazlarının oksidasyonuna ve DNA'da abazik bölgeler (AP) oluşumuna neden olurken, OH radikali oluşumunu tetikleyerek oksidatif DNA hasarı da oluşturabilmektedir (Sutherland ve ark. 2000, Bellon ve ark. 2002).

Kimyasal ajanların oluşturduğu DNA hasarları bir birinden farklı özelliktedir ve DNA'da hasara yol açan birçok kimyasal ajan bulunmaktadır. Örneğin Peroksidler, DNA'da tek zincir kırıkları ve baz modifikasyonları oluştururken; psoralenler DNA çift zinciri arasında çapraz bağlanmalar meydana getirir; alkilleyiciler ise, DNA çapraz bağlanmalarına, DNA kırıklarına ve da DNA üzerinde abazik bölgeler oluşumuna neden olabilirler (Szabo ve Ohshima 1997, Drablos ve ark. 2004, Mouw ve D'Andrea 2014).

2.4. DNA Onarımı ve Önemi

Gün içinde DNA'da sayıları on binleri bulabilen, hem hücrenel olaylardan hem de çevresel etkenlerden kaynaklanan hasarlar oluşmaktadır. DNA'da oluşan hasarlar genetik bilginin nesilden nesle aktarımında eksiklik ya da hata oluşturabileceği gibi, yaşamsal faaliyetlerin devamlılığının sağlanması ve düzenlenmesinde aksaklıklar veya organizmanın ölümüne neden olacak ciddi sonuçlar meydana getirebilir. Bu nedenle DNA'da oluşan hasarların düzeltilmesi, hasar düzeltilemiyorsa mutasyon birikiminin önlenmesi amacıyla hücrelerin programlanmış ölümlerinin gerçekleşmesi gerekmektedir (Tak ve ark., 2000).

Canlı organizmalar, fizyolojik şartlarda oldukça fonksiyonel olan, hem organizma için tehdit oluşturan hücrelerin yok edilmesine hem de DNA hasarlarının düzeltilmesine yönelik çeşitli mekanizmalara sahiptir.

Hasarlı DNA'nın onarımı doğrudan onarım, baz eksizyon onarımı, nükleotid eksizyon onarımı, çift zincir kırıklarının onarımı ve zincirler arası çapraz bağların onarımı şeklinde gerçekleşmekle birlikte, replikasyon hatalarının onarımını da kapsamaktadır (Sancar ve ark. 2004, Hakem 2008).

DNA onarım mekanizmaları, bir birinden farklı hataları tanıma özelliklerine sahiptir ve birçok enzim ile proteinin işi içinde olduğu oldukça karmaşık süreçlerdir. Onarım mekanizmaları tek başlarına etkili olabildikleri gibi, kompleks hasarlarda farklı onarım şekilleri birlikte etki de edebilmektedir.

2.4.1. Hasarın Doğrudan Onarımı

DNA hasarının doğrudan onarımı temel olarak iki şekilde gerçekleşir. UV kaynaklı pirimidin dimerlerinin DNA fotolizaz enzimi aracılığıyla onarımı ki bu insanlarda olmayan bir yoldur. Diğerisi ise alkilleyici kimyasalların neden olduğu 6-metilguaninin, metilguanin DNA metiltransferaz enzimi aracılığıyla onarımıdır. Hatalı bazda bulunan metil grubu enzim yapısında bulunan sistein grubuna aktarılır. Enzim inaktif hale gelirken, bazın onarımı tamamlanmış olur (Sancar ve ark., 2004).

2.4.2. Baz Eksizyon Onarım Mekanizması (BER)

Hatalı bazın DNA yapısından kesilip çıkartılarak uzaklaştırılması işlemidir. Hatalı baza özgün DNA-glikozilaz enzimleri aracılığıyla gerçekleştirilir. DNA tek zincir kırıklarının onarımı, pirimidin dimerleri, metilasyon sonucu oluşan 5-metilsitozin; oksidatif baz modifikasyonu sonucu oluşan 8-HOdG ve diğer okside bazlar, deaminasyon sonucu oluşan urasil ve diğer deamine bazlar ile bunlarla hatalı şekilde eşleşmiş bazların DNA yapısından uzaklaştırılmasında etkilidir. Replikasyon öncesi hatalar düzeltilmediği takdirde, hasar kalıcı hale gelir (Sancar ve ark. 2004, Hakem 2008, Dizdaroğlu 2015). Hatalı baza özgün DNA-glikozilaz enzimi baz ile şeker-fosfat grubu arasındaki glikozid bağı hidrolize eder ve abazik bölgeler oluşturur. Geriye kalan deoksiriboz 5'-AP endonükleaz ile uzaklaştırılır ve oluşan boşluğa uygun nükleotid DNA polimeraz enzimi ile eklenir. DNA ligaz ile kesik uçlar birleştirilerek hata düzeltilir. Bu mekanizmanın kısa yolağıdır ve tek bir nükleotidin düzeltilmesini sağlar. Çeşitli polimeraz tiplerinin, farklı ligazların, replikasyon faktörlerinin ve glikozilazların işin içinde olduğu daha komplike bir yolak daha vardır. Bu yolaksa 2 ile 13 nükleotidlik hatalı bölgelerin düzeltilmesine olanak sağlamaktadır (Sancar ve ark. 2004, Hakem 2008, Dizdaroğlu 2015).

2.4.3. Nükleotid Eksizyon Onarım Mekanizması (NER)

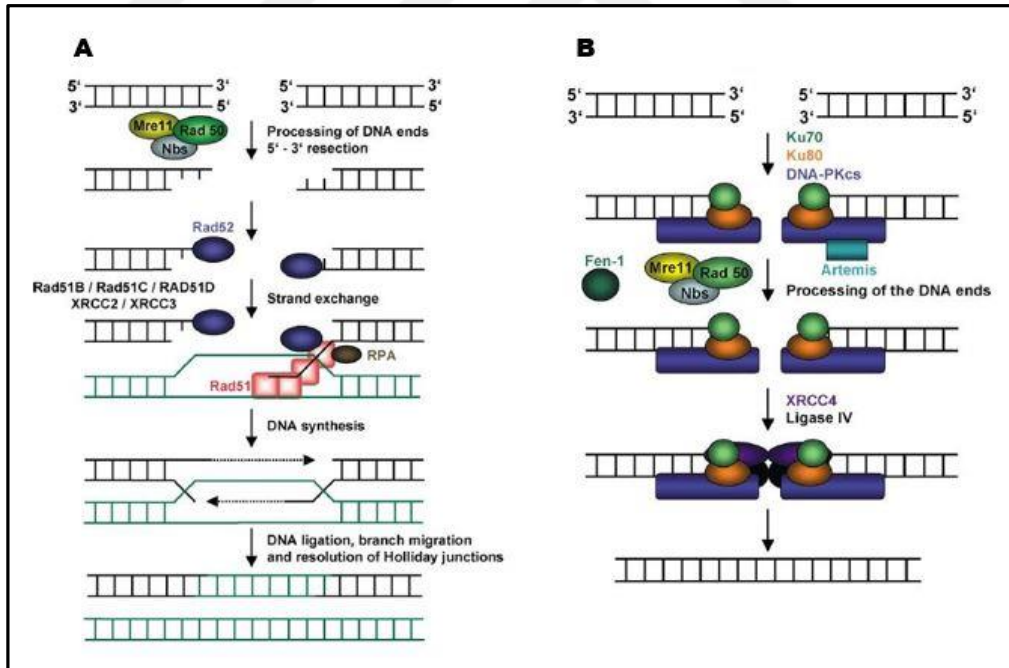
DNA'da oluşan ve daha geniş alanı kapsayan hasarların düzeltildiği onarım mekanizmasıdır. Pirimidin dimerleri, oksidatif hasar sonucu oluşan 8-OHdG'ni, yanlış eşleşmiş bazların ve büyük kimyasal hasarların onarımında etkindir. Hasarlı bölgenin öncesinden ve sonrasında atılan çentiklerle çıkartılan oligonükleotid (yaklaşık 24-32 nükleotid) parçasının içinde hatalı bölge uzaklaştırılır. Oluşan boş alan, sağlam zincirdeki dizilişe göre, DNA polimerazla yeniden sentezlenir, DNA ligaz yardımıyla bölge birleştirilir (Sancar ve ark., 2004).

Hasarlı bölgenin tanınmasıyla başlayıp; hasarın yer aldığı bölgede çift zincir yapısının açılıp, hasarlı bölgenin düzeltilmesine kadar ki işleyiş esnasında 30 dan fazla farklı proteinin görev aldığı tahmin edilmektedir (Sancar ve ark. 2004, Dizdaroğlu 2015).

2.4.4. Çift Zincir Kırıklarının Onarımı

DNA'da oluşan çift zincir kırıklarına, ROT, iyonize radyasyon ve ROT meydana getiren kimyasallar neden olmaktadır. Çift zincir kırıkları, kromozom anomalilerine neden olabilecek ya da hücreyi ölüme sürükleyecek derecede ciddi sonuçlar meydana getirebilmektedir. Çift zincir kırıkları ya homolog rekombinasyonla (HR) ya da kırık uçların homolog olmayan bağlanması (NHEJ) yoluyla onarılır. Hangi yoldan hasarın giderileceği ise hücre döngüsünün hangi evresinde olduğuna bağlıdır (Christmann ve ark. 2003, Dudas ve Chovanec 2004, Matos ve West 2014).

Homolog rekombinasyon, kırık uçların uygun şekilde kesimiyle başlar (Şekil 6A). Daha sonra zincirler homolog olduğu kalıp bölgeye invaze olurlar. Zincirler kalıba uygun şekilde sentezlenip ilerler ve geçici bağlantı şekli oluştururlar. Homolog kalıba göre kırık uçların nükleotid dizisi tamamlandıktan sonra geçici bağlantılar DNA nükleazlar yardımıyla ayrılır ve kırık zincir bölgeleri düzeltilmiş olur (Christmann ve ark. 2003, Dudas ve Chovanec 2004, Matos ve West 2014).



Şekil 6. DNA çift zincir kırıklarının homolog rekombinasyonu. A; kırık uçların homolog olmayan birleştirilmesi B (Christmann ve ark. 2003).

Kırık uçların homolog olmayan bağlanmasında ise, iki kırık ucun bağlanmasında homolog bir kalıba ihtiyaç yoktur. Birleştirme işlemi hasarlı DNA'da ki iki kırık ucun tanınması ve bu terminal bölgelere Ku70/Ku80 heterodimer kompleksinin bağlanmasıyla başlar (Şekil 6B). Bağlanma aşamasından sonra, kompleksin katalitik alt ünitesi (DNA-PKcs) DNA bağımlı protein kinazı (DNA-PK) aktive ederek bölgeye hasar onarımında etkili olacak proteinlerin gelmesini sağlar. Kırık uçların birleştirilmesi tamamlanınca, aynı katalitik alt ünite değişime uğrar ve DNA-PK'yı defosforile ederek inaktif hale getirir (Christmann ve ark. 2003, Dudas ve Chovanec 2004, Matos ve West 2014).

2.4.5. Çapraz Bağların Onarımı

Çapraz bağlar, DNA tek ipliğindeki nükleotidler arasında ya da karşıt iki zincirdeki nükleotidler arasında veya nükleotidle protein arasında oluşan kovalent bağlanmalardır. DNA nükleotid yapısında modifikasyona ya da hasara neden olan çeşitli kimyasallar, kemoterapötik ilaçlar ve hücreyel olaylar sonucu oluşan çeşitli ajanlar çapraz bağların oluşum nedenleridir. Çapraz bağlar, mutasyondan ziyade kromozomların yapısında değişime sebep olmaktadır. Replikasyonun veya transkripsiyonun durmasına ya da hücre ölümüne neden olabilirler (Sancar ve ark. 2004, Noll ve ark. 2006).

DNA'da oluşan çapraz bağların onarımında, tek bir onarım mekanizması yeterli olamamakta, diğer onarım mekanizmalarının birlikteliğini gerektirmektedir. Oluşan çapraz bağın oluşum nedeni ve şekline göre onarımının da değişiklik göstermesinden dolayı genellenebilir bir süreci kapsamamaktadır. Bununla birlikte çoğunlukla nükleotid eksizyon onarım mekanizması ile çift zincir kırıklarının onarımında etkili olan homolog rekombinasyonun birlikte işleyişi söz konusudur (Noll ve ark., 2006).

2.4.6. Replikasyon Hatalarının Onarımı

DNA replikasyonu esnasında, doğru nükleotid eklenmesini sağlayan DNA polimeraz enziminin, hatalı eklediği nükleotidi tanıyıp düzeltme özelliği de vardır. Ancak bu şekilde bile replikasyon kusursuz gerçekleşmemektedir. DNA polimerazın hata okumasından kaçan yanlış eşleşmeler, yanlış eşleşme onarım mekanizması ile

düzeltilir. Bu mekanizma ile replikasyonun doğruluğu yaklaşık 10^3 kez artırılmış olur (Jakson ve Loeb 2001, Fijalkowska ve ark. 2012).

DNA replikasyonu esnasında, kalıp olan zincir geçici olarak dam-metilaz enziminin metillenir. Bu zinciri baz alarak sentezlenen yeni zincir ise gecikmeli olarak metillenir. Bu esnada yanlış eşleme meydana gelmişse hata fark edilir ve bu bölge çeşitli enzimler yardımıyla çıkartılıp, oluşan boşluk doldurulup kapatılır. Bu onarım mekanizması BER ya da NER gibi daha önceden oluşmuş hataları değil, yeni oluşmuş hatayı düzeltmeye yöneliktir. Bu mekanizma ayrıca programlı hücre ölümüyle de ilişkilidir (Stojic ve ark., 2004).



2.5. DNA Hasarı Tespit Yöntemleri

DNA'nın nükleotid dizilerindeki veya düzenlenmesindeki kalıcı değişikliklere mutasyon; DNA'da ve kromozomlarda oluşan tüm hasarlara ise genel bir ifadeyle genotoksisite denilmektedir. Mutasyona neden olan mutajenlerin tümü genotoksik etkiye de sahiptir, ancak genotoksik ajanlar mutajenik karakter taşımayabilmektedir. Öte yandan mutajenler ve genotoksik ajanlar kanserojenik özellikle gösterebilmektedir (Benigni ve ark., 2013). Nitekim kaynağı ne olursa olsun DNA'da meydana gelen hasarların artmış kanser riskini de beraberinde getirebildiği bilinmektedir. Bu nedenle DNA hasarının saptanması, kanser riskinin değerlendirilmesinde ve kronik hastalıklarla birlikte diğer faktörlerin neden olduğu DNA hasarlarına yanıtlardaki değişikliklerin anlaşılmasında önem taşımaktadır (Collins ve ark., 2014).

Günümüze kadar birçok genotoksisite testleri geliştirilmiştir ve bu testlerden:

- Fiziksel, kimyasal ve biyolojik ajanların genotoksik etkilerini belirlemede,
- Yeni ilaçları ve kozmetik ürünlerini test etmede,
- DNA hasarı ile hastalıklar arasındaki olası ilişkinin aydınlatılmasında,
- Kansere duyarlılığın ve takibinin yapılmasında biyolojik izleme olarak yararlanılmaktadır (Valverde ve Rojas 2009, Azqueta ve Collins 2013).

Genotoksisite testleriyle kromozomlarda meydana gelen yapısal ve sayısal değişiklikler, gen düzeyinde oluşan değişiklikler, çift zincir kırıkları, tek zincir kırıkları oksidatif hasar gibi DNA hasarları tespit edilebilmektedir. Ancak bu güne kadar geliştirilmiş genotoksisite testleri, DNA'daki tüm hasarları saptamada tek başına yeterli değildir. Bu nedenle farklı testler birbirlerinin tamamlayıcısı ya da birbirlerine entegre edilerek kullanılabilir (Glei ve ark. 2007, Hovhannisyanyan 2010).

Komet yöntemi (SCGE) ve mikro çekirdek testi (MN) en yaygın kullanılan genotoksik etkileri inceleme testleri olmakla birlikte; klasik sitogenetik testler olan kromozom aberasyon testi (CA) ve floresan in-situ hibridizasyon (FISH) yöntemi de kromozom hasarlarını belirlemede kullanılan genotoksisite testlerindedir (Hovhannisyanyan 2010).

Bu testlerin birbirlerine göre avantajlı ya da dezavantajlı oldukları yönleri ve ya sınırlayıcı özellikleri bulunmaktadır. Örneğin MN ve CA testleri hücrelerin hücre siklusunun belirli bir aşamasında bulunmalarını zorunlu kılar ve kromozom

düzeyindeki hasarları saptamaya elverişli; komet yönteminde hücrelerin, hücre siklusunun belirli bir evresinde bulunması gerekmemektedir ve DNA’da oluşan zincir kırıklarının (tek-çift) sıklığı hakkında bilgi vermektedir. FISH yöntemi ise sadece gen düzeyindeki hasarları aydınlatıcıdır. FISH, araştırılmak istenen bölgeye özgün bir probun (floresan boya işaretli nükleotid dizisi), denatüre edilmiş DNA’nın tek zincirindeki hedef bölgeyle hibrid oluşturması sonucu ilgili bölgenin görüntülenmesi yöntemidir. Farklı renkler oluşturan proplar yardımıyla aynı anda pek çok bölgenin analizini yapmak mümkündür. İnterfaz veya metafazdaki hücrelerin kromozom anomalilerinin (mikrodelesyon) ve spesifik nükleotid dizilerinin (gen mutasyonları) araştırılmasına imkan vermektedir. Kemik iliği, lenfosit, fibroblast, sperm gibi çok farklı hücrelerde ve dokularda güvenilir şekilde uygulanabilmektedir. Ancak diğer kromozom analizlerden farklı olarak sayısal ve yapısal (translokasyon, delesyon, duplikasyon ve inversiyon) anomalilerin tespitine olanak vermemektedir (Eid ve Temtamy, 2013).

Mikro çekirdek (MN) testi, kromozom düzeyindeki DNA hasarlarının tespitinde kullanılan bir tarama testidir. Tam kromozom kayıplarının ve kromozom kırıklarının saptanmasına olanak verir. Kromozomların yapısal ve sayısal anormalliklerinin detaylı analizini mümkün kılmamakta, dolaylı olarak MN’ye neden olan çekirdek kromatin kaybını göstermektedir. Yöntem, hücre bölünmesi sırasında sitokinezin durdurulmasına bağlı olarak, hücre siklusu sonunda çift çekirdekli (binükleat) görünen hücreler arasında, MN bulunduran hücreleri tespit etmeye yöneliktir. MN olarak adlandırılan yapılar, DNA kırıklarından ya da replikasyon hatalarından kaynaklanabilir. Bir veya birkaç kromozom parçaları ya da bütün bir kromozom MN görüntüsü verebilir. Bu yapılar çekirdek bölünmesinden sonra kardeş binükleata dahil olmazlar sitoplazmada ayrı olarak kalırlar veya nükleer bağlantılar ya da nükleer çıkıntılar olarak gözlemlenebilirler (Fenech 2007, Fenech ve Bonassi 2011, Eid ve Temtamy 2013, Speit 2013, Nersesyana ve ark. 2016).

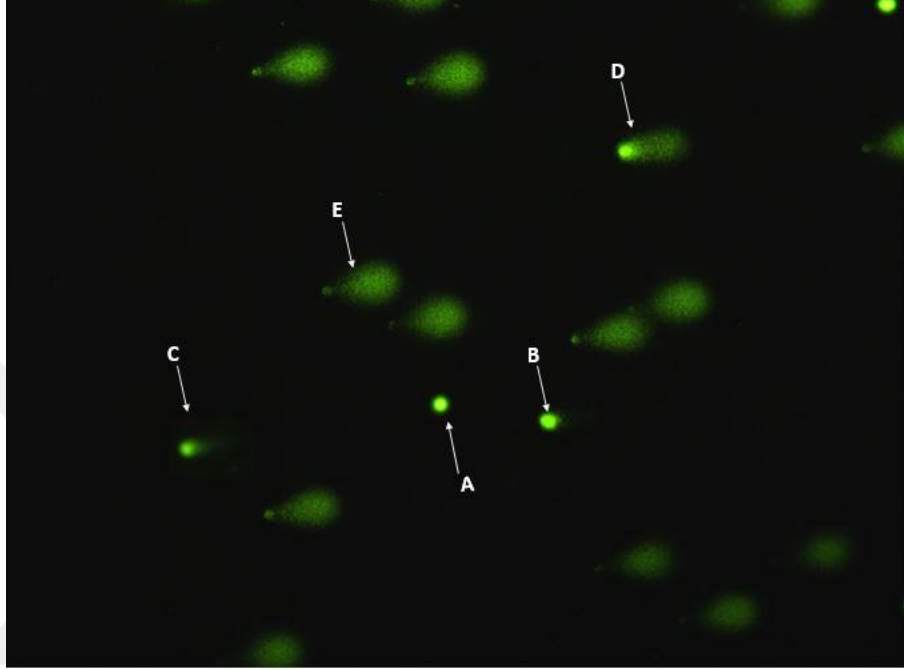
Alkali komet yöntemi, DNA’da oluşan tek zincir kırıkları ile DNA’da ki abazik bölgeler gibi kararsız alkali bölgelerin tespit edilmesine olanak veren oldukça duyarlı, hızlı, çok yönlü, maliyeti düşük; genotoksisitenin belirlenmesinde ve biyolojik izleme olarak yaygın kullanılan, güvenilirliği yüksek DNA hasarı tespit yöntemidir (Collins 2004, Azqueta ve Collins 2013).

Nükleusu olan hemen hemen tüm tip hücrelerin tek tek analizinin yapılmasını mümkün kılması, hücrelerin hücre siklusunun belirli bir aşamasında olmasını gerektirmemesi, birkaç saat içinde sonuç vermesi DNA’da oluşan hasarı saptamada yüksek duyarlılığa sahip oluşu, yöntemde yapılan bazı modifikasyonlarla bazı hasarlarının ve DNA onarım kapasitesinin saptanabilmesine imkan vermesi, elde edilen sonuçların kabul edilebilirliğinin yüksek oluşu gibi nedenler yöntemin avantajlarıdır. Yöntemin uygulanması sırasında olası değişikliklere (ışık, sıcaklık vb.) bağlı oluşan DNA hasarlarına da duyarlı oluşu; DNA’da meydana gelen aslında geçici olabilecek hasarları da saptanması; DNA’da çapraz bağların olması durumunda kuyruğa göç eden DNA miktarında azalma olması gibi faktörler ise yöntemin eksileridir (Dusinska ve Collins 2008, Azqueta ve Collins 2013, Collins ve ark. 2014).

Alkali komet yöntemi, ince agaroz kaplı lam üzerine hücrelerin gömülmesi sonrası hücre membranı ve histonlar gibi yapıların lizisle uzaklaştırılması ardından DNA’nın yüksek alkali inkübasyonu ve elektroforezi sonucu hücrelerin floresan boyamayla görünür hale getirilmesine dayanmaktadır. Floresan boyama sonrası, DNA’da ki hasarın şiddetine göre, kırık bölgelerin göçü nedeniyle hücrelerde kuyruk oluşumu ortaya çıkar ve hücre kuyruklu yıldız benzer bir görünüm alır. DNA’nın sağlam kısmı ise kuyruğa göç etmeyerek baş bölgesinde kalır. Elde edilen görüntülerin görsel veya bilgisayar programıyla analizi ise hücre bazında DNA kırıkları ve kararsız alkali bölgelerin sıklığı hakkında bilgi verir. Görsel analiz için her örnekten 100 hücre sayılır ve sayım aşamasında hücreler baş ve kuyruk görünümüne göre 0-4 arasında derecelendirilir. 0: Hiç yürümenin olmadığı, kuyruk oluşumu gözlenmeyen ve muntazam çekirdekli hücreyi yansıtırken; 4: Oldukça küçük başlı ve uzun kuyruklu bir hücreyi ve 4. dereceden yürümenin gözlendiğini ifade eder. 0 ile 4. derece yürüme arasında kalan kuyruk uzunlukları ve baş görünümleri, 1-2-3 olarak derecelendirilir (Şekil 7). Sayım işlemi bittikten sonra her örnek için aşağıdaki formülde belirtilen şekilde total arbitrary unit (AU_T) hesaplanır ve 0-400 (hepsi sağlam- hepsi zarar görmüş) arası bir değer elde edilir. Elde edilen AU_T değeri örnekteki DNA zincir kırıklarının ve alkali kararsız bölgelerin toplam miktarını yansıtır (Collins ve ark. 1995, Collins 2004, Valencia ve ark. 2011).

$$AU_T = N_0 \times 0 + N_1 \times 1 + N_2 \times 2 + N_3 \times 3 + N_4 \times 4$$

(N_0 : 0 puan alan hücrelerin sayısı; N_1 : 1 puan alan hücrelerin sayısı; N_2 : 2 puan alan hücrelerin sayısı; N_3 : 3 puan alan hücrelerin sayısı; N_4 : 4 puan alan hücrelerin sayısı)



Şekil 7. 50 µl H₂O₂ ile muamele edilmiş mononükleer hücrelerin alkali komet yöntemi jel görüntüsü. A: 0 derece yürüme olan hücre; B: 1. derece yürüme olan hücre; C: 2. derece yürüme olan hücre; D: 3. derece yürüme olan hücre; E: 4. derece yürüme olan hücre.

Bilgisayar programları yardımıyla yapılan analizler ise görsel analize nazaran oldukça zaman alıcı bir analiz yöntemi olmakla birlikte, görsel analize kıyasla daha objektif veriler elde edilmesine ve oldukça farklı parametrelerin ölçümüne olanak vermektedir. Analiz floresan boyama sonrası elde edilen görüntülerin fotoğraflarının programa aktarımıyla başlar. Ardından hücreler kullanılan programa göre ya tek tek manuel olarak işaretlenir ya da program hücreleri otomatik seçer ve işaretler. Hücre başlangıcından sonuna kadar varsa kuyruğun bittiği alanı da kapsayacak şekilde işaretlenir ve hücrenin baş kısmı belirlenir. Bu işlemlerden sonra program işaretli alan içindeki piksel yoğunluğuna göre kuyruğu oluşturan DNA yüzdesi (%DNA_t), kuyruk

momenti ve kuyruk uzunluğu gibi çeşitli parametreleri ölçer. Ölçülen parametrelerden %DNAat zincir kırıklarının ve alkali bölgelerin sıklığını yansıtır. DNA'daki kırık ve alkali bölge ne kadar fazlaysa floresan yoğunluk baş yerine kuyruk bölgesinde olur. %DNAat doz yanıt ilişkisini yansıtmaya bakımından diğer parametrelerden üstündür (Glei ve ark. 2007, Dusinska ve Collins 2008, Azqueta ve Collins 2013, Collins ve ark. 2014, Gyori ve ark. 2014).

RA'ya sebep olan etiyolojik ajan tanımlanamadığı gibi hastalığın patogenezi de tam olarak ortaya konulamamıştır. Mevcut tedavilerse hastalığın seyrini yavaşlatmakta yetersiz kalabilmekte veya tedaviden beklenen sonuçları elde etmek her hasta için mümkün olamamaktadır. Bu durum hastalıktan muzdarip bireyleri farklı arayışlara sevk edebilmektedir. Oldukça popüler olan ozon terapisi, etkinliği ve güvenilirliği kanıtlanmış bir yöntem olmamasına rağmen, RA'lı hastalarında dahil olduğu, oldukça çeşitli hasta gruplarına tedavi ya da tedaviye destek amacıyla uygulanmaktadır. 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 peroksidin DNA hasarına yol açabileceği göz ardı edilmemelidir. Öte yandan RA'lı hastalarda oksidatif stresin ve oksidatif stres kaynaklı DNA hasarının artabildiği, hastaların antioksidan düzeylerinin azalabildiği ve hastalığın kanser riskinde artışa neden olabildiği bilinmektedir. Tüm bunlar göz önünde bulundurulduğunda RA'lı hastalara ozon terapisi uygulanması, umulanın aksine, olumsuz sonuçlar doğurabilir.

Planlanan bu çalışmanın amacı RA'lı hastalarda oksidatif DNA hasarını ve hastalardan alınan kan örneklerine ozon uygulanmasının DNA hasarına neden olup olmadığını incelemeye yöneliktir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. GEREÇLER

3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

8-OHdG ELISA Kiti	Bioassay Technology Laboratory Kit (Cat.No E1436Hu)
Sodyum sitrat	(Medipac)
SYBR-Gold nükleik asit jel boyası	(Invitrogen, S11494)
Tripan mavisi	(Invitrogen, 15250)
Ficoll	(Ge Healthcare, 17-5442-02)
DMSO	(Merck, 1.16743.1000)
EDTA	(Sigma, E5134)
Ultra saf tris	(Invitrogen, 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 ₂ O ₂	(Merck, 108600)
Ethanol	(Merck, M100983.2511)
LMA	(Invitrogen, 16520050)
NMA	(Invitrogen)
Triton X-100	(Sigma, 9002-93-1)
TE-buffer	(Fluka, 93283)

3.1.2. 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 mikroskopu	(Zeiss Axioskop)
Işık mikroskopu	(Zeiss)
Yazılım	(Komet 5, Kinetic Imaging Ltd, Liverpool, UK / Comet Score 15, Tritex Corp., ABD)

Absorbance microplate 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)
Latex free enjektör	(20 ml)
Plastik pastör pipet	(3 ml)
	[Eppendorf, Thermo (0-10µl; 20-200µl;
Ayarlanabilir mikropipetler	100-1000µl)]
	[Capp (0,1-10µl; 20-200µl; 100-
Pipet Uçları	1000µl)]
Lamel	(24x50-20x20)
Buzlu, rodajlı lam	(Lamtek)
Hemositometre	(İsotherm)
Lam saklama kutusu	(İsolab)
Beherler	[İsolab (1000, 800, 500 ml'lik)]
Mezur	[İsola (1000, 500, 250, 50, 25 ml'lik)]
Erlen	[İsolab (1000, 500, 250,100, 50 ml'lik)]
Dikey cam şaleler	(İsolab)
Nitril eldiven	

3.1.3. Kullanılan Çözeltiler

3.1.3.1. Fosfat Tampon Çözeltisi

Sigma d5652 markalı Ca^{+2} ve Mg^{+2} içermeyen kimyasaldan 4,8 g 500 ml d- H_2O içerisinde çözülerek hazırlandı. Hazırlanan çözelti $+4\text{ }^\circ\text{C}$ 'de muhafaza edildi. Haftalık olarak hazırlandı.

3.1.3.2. Lizing Çözeltisi

2,5 M NaCl, 10 mM Tris, 100 mM EDTA, 200 mM NaOH ve 750 ml d- H_2O ile hazırlanan karışıma %1 sodyum lauril sarkosin ilave edildi. Kimyasalların manyetik karıştırıcı yardımıyla çözülmeleri 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.

3.1.3.3. Elektroforez Çözeltisi

10 mM stok NaOH

40 g NaOH ve 100 ml d- H_2O ile hazırlandı. Hazırlanan stok $+4\text{ }^\circ\text{C}$ 'de muhafaza edildi. Stok haftalık olarak hazırlandı.

200 mM Stok EDTA

3,7 g EDTA ve 50 ml d- H_2O ile hazırlandı. Hazırlanan stok $+4\text{ }^\circ\text{C}$ '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_2O ile hazırlandı. Çözeltinin pH'sı 13,1'den büyük olacak şekilde ayarlandı.

3.1.3.4. Nötralizasyon Çözeltisi

48,456 g tris ve 1000 ml d- H_2O 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.

3.1.3.5. 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.

3.1.3.6. Düşük Erime Noktalı Agar (LMA)

375 mg LMA 50 ml PBS içinde mikrodalga fırın yardımıyla tamamen çözdürülerek hazırlandı. %1'lik agar sıcakken ependorf tüplere paylaştırıldı ve +4 °C'de muhafaza edildi.

3.1.3.7. Normal Erime Noktalı Agar (NMA)

500 mg NMA 50 ml d-H₂O içinde mikrodalga fırın yardımıyla tamamen çözdürülerek hazırlandı. %1,25'lik agar sıcak olarak, methanolden geçirilmiş rodajlı lamaların kaplanması için kullanıldı.

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Çalışma Gruplarının Belirlenmesi

Bu tez, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi (ÇOMU) Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanlığının 05.08.2015 tarih ve 13-24 sayılı kararı ve izni ile yürütülmüş; TYL-2015-706 numaralı kod ile Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi kapsamında desteklenmiştir.

Çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Polikliniğince takibi yapılan RA tanılı gönüllü 32 hasta ile yaş ve cinsiyet bakımından RA grubuyla eşleştirilmiş sağlıklı gönüllü 31 kişi ile yapıldı.

Gönüllüler öncelikle çalışma hakkında bilgilendirildi. Gönüllü olarak bu çalışmaya katılmayı kabul edenlere bilgilendirilmiş gönüllü olur formu imzalatıldı. Oluru alınan tüm gönüllüler için demografik veriler, yaşam şekilleri, mevcut sistemik hastalıklar ile RA'lı hastaların kullandığı tedavi ve eklem muayene bulgularını içeren gönüllü veri formu dolduruldu. Form doldurma işleminin ardından deneysel amaçlı analizler için kan örnekleri alındı.

3.2.1.1. Çalışmaya Dahil Edilme Kriterleri

Hasta grubuna dahil edilme kriterleri

- RA tanısı almış olmak
- RA dışında, başka herhangi bir otoimmün hastalığın bulunmaması.
- Sistemik inflamatuvar hastalığın olmaması.
- Herhangi bir kanser tanısı almış olmamak.
- Çalışmaya gönüllü olarak katılıp kan örneği vereceğine dair onay belgesini imzalamış olmak.

Kontrol grubuna dahil edilme kriterleri

- Herhangi bir otoimmün hastalığın olmaması
- Sistemik inflamatuvar hastalığın olmaması.
- Herhangi bir kanser tanısı almış olmamak.
- Çalışmaya gönüllü olarak katılıp kan örneği vereceğine dair onay belgesini imzalamış olmak.

3.2.1.2. Çalışmaya Dahil Edilmeme Kriterleri

Hasta grubuna dahil edilmeme kriterleri

- RA ile birlikte başka herhangi bir otoimmün hastalığın bulunması.
- Sistemik inflamatuvar hastalığın olması.
- Herhangi bir kanser tanısı almış olmak.

Kontrol grubuna dahil edilmeme kriterleri

- Herhangi bir otoimmün hastalığın bulunması.
- Sistemik inflamatuvar hastalığın olması.
- Herhangi bir kanser tanısı almış olmak.

3.2.1.3. Çalışmadan Çıkarılma Kriterleri

Çalışmaya katılmayı başlangıçta kabul etmesine rağmen, kan alımı, olur belgesinin imzalanması veya form doldurma aşamalarının herhangi birinde çalışmaya katılmaktan vazgeçenler ile kan örnekleri alındıktan sonra araştırmaya devam etmek istemeyenler çalışmadan çıkarılmıştır.

3.2.1.4. Hastalık Aktivitesinin Belirlenmesi

Çalışmaya katılan RA'lı hastaların hastalık aktiviteleri Hastalık Aktivite İndeksi [Disease Activity Score (DAS28)] ile belirlendi. DAS28 değerinin hesaplanmasında aşağıdaki formül kullanıldı. Hesaplama için gerekli olan hastaların şiş ve hassas eklem sayıları uzman doktor tarafından yapılan muayeneyle belirlendi ve hastaların aynı dönemde bakılmış CRP (C-reaktif protein) değerleri sistemden elde edildi.

$$\text{DAS28-CRP} = (0,56 \cdot \sqrt{\text{Hassas eklem sayısı}}) + (0,28 \cdot \sqrt{\text{Şiş eklem sayısı}}) + [0,36 \cdot \ln(\text{CRP değeri} + 1)] + (0,014 \cdot \text{hastanın genel sağlık durum puanı}) + 0,96]$$

DAS28-CRP değerinin 2,6'dan düşük çıkması durumunda hastanın remisyonda olduğu kabul edildi. DAS28-CRP değerinin $\geq 2,6$ ve $< 3,2$ olması düşük hastalık aktivitesi; DAS28-CRP değerinin $\geq 3,2$ ve $< 5,1$ bulunması orta hastalık aktivitesi, DAS28-CRP değerinin $\geq 5,1$ olması ise yüksek hastalık aktivitesi olarak değerlendirildi.

3.2.2. Kan Örneklerinin Alınması

Hasta ve sağlıklı gönüllülerin her birinden deneysel amaçlı analizler için steril enjektör yardımıyla 20 ml venöz kan örneği alındı. Alınan kanların 9 ml'si, 1 ml %3,8'lik sodyum sitrat içeren falcon tüpe aktarıldı. 5 ml'lik kısmı ozonlanarak, 5 ml'lik kısmıysa ozonlanmadan aynı gün ÇOMU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Laboratuvarında alkali komet yöntemiyle çalışıldı. Alınan kanların kalan kısımları ise serum ayırmada kullanılan jelli tüplere aktarılarak, 8-OHdG analizinde kullanılacak serumların ayrılması için, ÇOMU Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Biyokimya Laboratuvarına götürüldü. Elde edilen serumlar çalışılıncaya kadar - 40⁰C'ta saklandı.

3.2.3. Kan Örneklerinin Ozonlanması

Sitratlanmış kanın 5 ml'si lateks içermeyen, ozona dayanıklı özel enjektöre alındı. Aynı nitelikteki başka bir enjektöre ise ozon cihazından 50 µg/ml yoğunlukta 5 ml tıbbi ozon gazı alındı. Ozon içeren enjektör ile sitratlanmış kan içeren enjektörler üç yollu musluk yardımıyla birbirine bağlandı ve gazın tamamı kan içeren enjektöre aktarıldı. İşlem tamamlandıktan sonra musluk kapatıldı. Kanla ozonun tam temas edip, gazın iyice çözünebilmesi için enjektör yavaşça alt üst edildi. Ozonlama işleminin tüm basamakları, hasta ve sağlıklı gönüllülerden alınan kanlara aynı şekilde uygulandı. Cihazdan enjektöre alınan gazın dışarı sızmasını önlemek için, dolum sonrası ve musluğa bağlanma aşaması esnasında enjektör ucu yere dik pozisyonda tutuldu. İşlemler seri şekilde gerçekleştirildi. Günde dört gönüllüyle çalışıldı ve kanların ozonlanması aynı anda yapıldı. Ozonlama işleminden 15-20 dakika sonra alkali komet analizine başlandı.

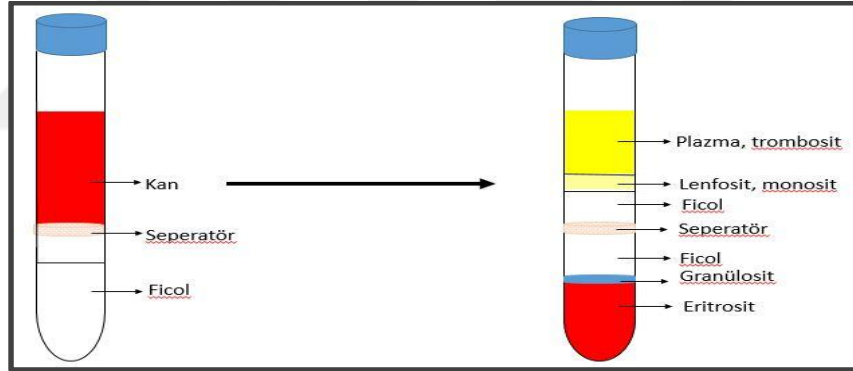
3.2.4. Alkali Komet Yöntemi

3.2.4.1. Lamların Hazırlanması

Lamlar NMA ile kaplanmadan önce metanolla yıkandı ve kurutuldu. Ardından mikrodalga fırın yardımıyla hazırlanan sıcak %1,25'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. İki haftada bir yeni agar kaplı lam hazırlandı.

3.2.4.2. Periferel Kan Mononükleer Hücrelerinin Ayrıştırılması

Lökosit ayırma tüpüne oda sıcaklığında 3 ml ficol eklendi. 2500 rpm’de 30 saniye santrifüjlenerik 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 (Şekil 8) 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. Yıkama işlemi sonunda hemositometre yardımıyla hücre sayımı yapıldı ve hücre yoğunluğu 1×10^5 hücre/ml olacak şekilde ayarlandı. Ayrıştırma işlemi süresince, hücrelerin canlılıklarını kaybetmemesi için, tüpler buz üzerinde tutuldu. Pozitif kontrol olarak 50 μ M’lık H_2O_2 çözeltisi kullanıldı.



Şekil 8. Periferel kan mononükleer hücrelerinin ayrıştırılması.

3.2.4.3. Tripan Mavisi Testi

Kısa dönemde oluşan sitotoksik etkileri incelemek ve değerlendirme esnasındaki ölü hücreleri saptamak için tripan mavisi testi yapıldı. Test için, mononükleer hücre süspansiyonundan ve %0,4’lük tripan mavisinden 10 μ l boş mikrotüpe konuldu, homojen olarak karıştırıldı. Boyanın etki etmesi için 2 dakika beklendi. Karışımın 10 μ l’si üzerine lam kapatılmış hemositometrenin sayım alanına damlatıldı. Sayım alanı 20X büyütmede ışık mikroskobunda 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 oranının %95 olduğu verisine ulaşıldı ve hücre yoğunluğu alkali komet yöntemi için 1×10^5 hücre/ml olacak şekilde ayarlandı.

3.2.4.4. Mononükleer Hücrelerin Lama Yayılması

Önceden hazırlanmış ve ependof tüp içinde $+4$ °C'de muhafaza edilen LMA sıcak suda sıvı hale getirildi. $+37$ °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 $+4$ °C bekletilerek agarın katılaşması sağlandı ve sonra lameller lamaların üzerinden agarı bozmayacak şekilde yavaşça alındı.

3.2.4.5. Mononükleer Hücrelerin Lizizi

Lamalar 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.

3.2.4.6. Elektroforez

Yatay elektroforez tankı, lambası çıkartılmış buzdolabına konularak soğutuldu. Lamalar tanka birbirine temas edecek şekilde yerleştirildi. Taze hazırlanıp soğutulmuş elektroforez çözeltisi lamaları kaydırmayacak şekilde yavaşça tanka boşaltıldı. DNA'nın çift zincirli yapıdan tek zincirli yapıya dönüşmesi için lamalar tank içerisindeki soğuk alkali ($\text{pH} \geq 13,1$) 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.

3.2.4.7. Nötralizasyon

Bir pens yardımıyla tanktan çıkarılan lamalar cam şaleye alındı. Oluşan kimyasal reaksiyonu sabitlemek, fazla tuz ve deterjanı uzaklaştırmak amacıyla lamalar

pH'sı 7,5 olan nötralizasyon tamponunda 15 dakika karanlıkta, oda sıcaklığında bekletildi. Süre bitiminde lamlar distile suyla yıkandı.

3.2.4.8. 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.

3.2.4.9. 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.

3.2.4.10. Fotoğraf kaydetme

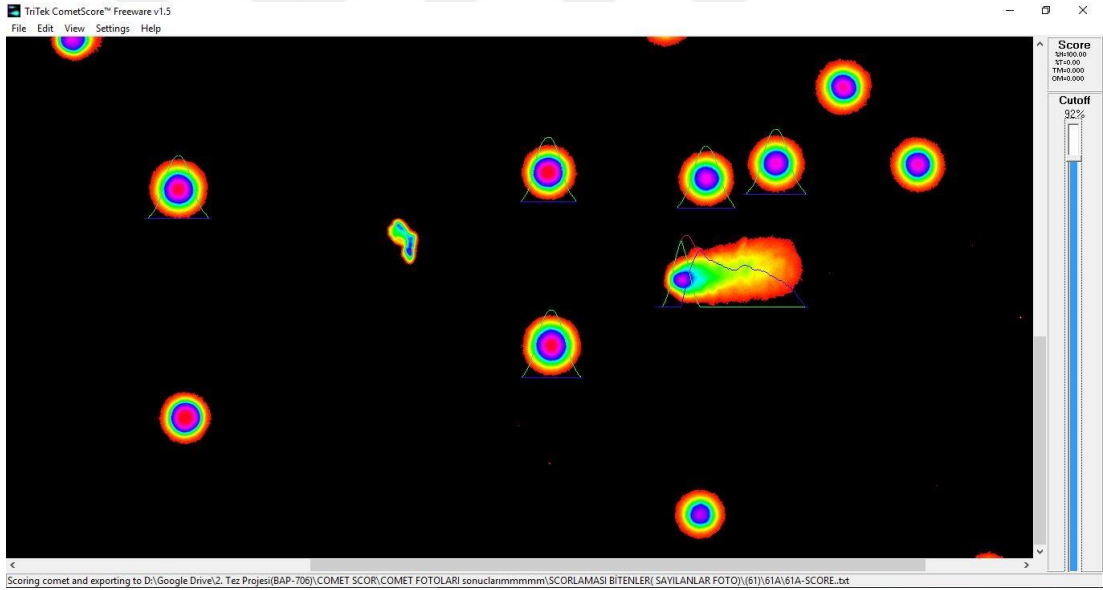
Floresan mikroskobunda 10x büyütmede görüntülenen kometlerin fotoğrafları çekildi ve "bmp" formatında kaydedildi. Çekim lam başından sonuna kadarki alanın orta hattından ilerlenerek hücrelerin gömülü olduğu her iki alandan da ardışık şekilde, toplamda en az 6 fotoğraf (hücrelerin gömülü alanlarının başlangıç ve bitiş kısımları hariç tutularak) olacak şekilde yapıldı.

3.2.4.11. Değerlendirme

Fotoğraflar bilgisayar ortamında Tritex CometScore Freeware 1.5v analiz programıyla değerlendirildi (Resim 1 ve 2). 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.



Resim 1. Tritek CometScore Freeware 1.5v bilgisayar programı ana ekran görüntüsü.



Resim 2. 61 numaralı gönüllünün kometlerinin skorlanması esnasında kaydedilen ekran görüntüsü.

Yöntemin tüm basamakları ve analiz tek bir analist tarafından aynı şekilde gerçekleştirilerek yöntem basamaklarındaki ve skorlamadaki olası değişkenlik en aza indirildi.

3.2.5. Serumda 8-OHdG Miktarının Ölçümü

Oksidatif hasarın göstergesi olan 8-OHdG'nin serumdaki miktarını ölçmek için çalışmada Bioassay Technology Laboratory Kit (Katalog no: E1436Hu) kullanıldı.

Sandwich tipte bir ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) kiti olan Bioassay Technology Laboratory ELISA Kiti ile serumdan 8-OHdG düzeyi Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarında yapıldı.

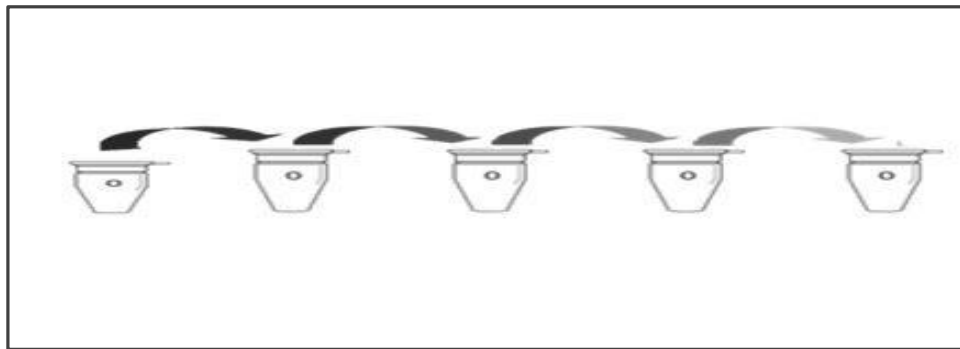
Çalışmaya başlamadan önce -40°C de saklanan örnekler 10-20 dakika oda ısısına gelene kadar bekletildi ve ardından 20 dakika 2000-3000 rpm'de santrifüj edildi.

1-Öncelikle kuyucuklar, 20X yıkama solüsyonu, örnek dilüent antibody diluent, HRP konjugat dilüent, TMB substrat solüsyonu ve stop solüsyonu oda ısısına getirildi.

2-Örnek dilüenti ile standartlar Tablo 2 ve Şekil 9 belirtildiği gibi hazırlandı.

Tablo 2. ELISA standartlarının hazırlanması

Standard Numarası	İçerik	Yoğunluk
5 (S5)	120 μl Original Standard + 120 μl Standard	64 ng/ml
4 (S4)	120 μl S5 + 120 μl Standard diluent	32 ng/ml
3 (S3)	120 μl S4 + 120 μl Standard diluent	16 ng/ml
2 (S2)	120 μl S3 + 120 μl Standard diluent	8 ng/ml
1 (S1)	120 μl S2 + 120 μl Standard diluent	4 ng/ml



Şekil 9: 8-OHdG ELISA standartlarının hazırlanması

Beş tane propilen tüp sırası ile 64 ng/ml, 32 ng/ml, 16 ng/ml, 8 ng/ml ve 4 ng/ml olarak etiketlendi. Yukarıda da görüldüğü gibi 5. standarttan 1. standart kadar standart dilüentle dilüsyonlar yapıldı. Bu işlem son tüpe kadar tekrarlandı.

3-Hazırlanan standartlardan 50 µl daha önceden ticari olarak 8-OHdG ile kaplanmış standart kuyucuklara yüklendi.

4-Örnek kuyucuklarına 40 µl örnek eklenip üzerine 10 µl anti-8-OHDG antibody eklendi. Kör kontrol kuyucuğuna dokunmadan hem örnek kuyucuklarına hem de standart kuyucuklarına 50 µl streptavidin-HRP eklendi. Karıştırıldı ve 37°C de 60 dakika inkübe edilmek üzere plate üzeri plate koruyucu ile örtüldü.

5-Wash buffer ile plaka 5 kez yıkandı. Örnekteki 8-OHdG'ye bağlanmış antikorların kuyucuklardan uzaklaşması sağlandı. Kuyucuklarda bulunan 8-OHdG'ye bağlı olan antikorların ise kuyucuklarda kalması sağlandı.

6-Her bir kuyucuğa önce 50 µl substrat A solüsyonu ve sonra 50 µl substrat B solüsyonu eklendi. Karanlıkta 37°C de 10 dakika plağın üzeri kapatılarak inkübe edildi.

7- Her bir kuyucuğa 50 µl stop solüsyonu eklenerek mavi rengin yeşile dönüşü gözlemlendi.

8- Stop solüsyonunun eklenmesinden sonra 30 dakika içinde 450 nm'de mikroplate okuyucu kullanılarak her bir kuyucuk için absorbanlar OD (Optik dansite) ile saptandı. Örnekteki 8-OHdG konsantrasyonunun tespiti için, hazırlanmış "kalibrasyon eğrisi" kullanıldı. Sonuçlar mililitrede nanogram (ng/mL) olarak ifade edildi.

3.2.6. 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 Önemlilik testi, İki Eş Arasındaki Farkın Önemlilik testi, Mann-Whitney U testi, Ki-Kare testi ve Fisher'in kesin düzeltmesi kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık için $p < 0,05$ kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Katılımcıların Demografik Bilgileri ve Bireysel Davranışları

Çalışmaya katılan RA tanılı gönüllüler ile kontrol grubunda yer alan gönüllülerin vücut kitle indeksleri (VKİ) gönüllü veri formunda yer alan veriler doğrultusunda kilogram cinsinden ağırlığın, metre cinsinden boyun karesine bölümü formülüyle hesaplandı.

Çalışmaya katılan 32 hasta gönüllü ile kontrol grubunda yer alan 31 gönüllünün yaş, cinsiyet ve VKİ'sinin karşılaştırılmasında anlamlı farklılık gözlenmedi. Benzer şekilde hasta ve kontrol grubunda yer alan katılımcıların sigara kullanımı ve egzersiz yapma alışkanlıkları arasında da anlamlı farklılık ortaya çıkmadı (Tablo 3).

Tablo 3. Hasta ve kontrol grubuna ait demografik bilgiler ve bireysel davranışlar.

GRUP	Yaş	VKİ (Kg/m ²)	Cinsiyet		Sigara İçme Durumu		Egzersiz	
			Kadın	Erkek	İçiyor	İçmiyor	Yapıyor	Yapmıyor
Kontrol	46,32±10,62 (30-60)	26,48±3,86 (18,90-35,83)	19	12	11	20	4	27
Hasta	51,44±13,62 (30-84)	27,03±4,36 (18,44-37,18)	25	7	8	24	5	27

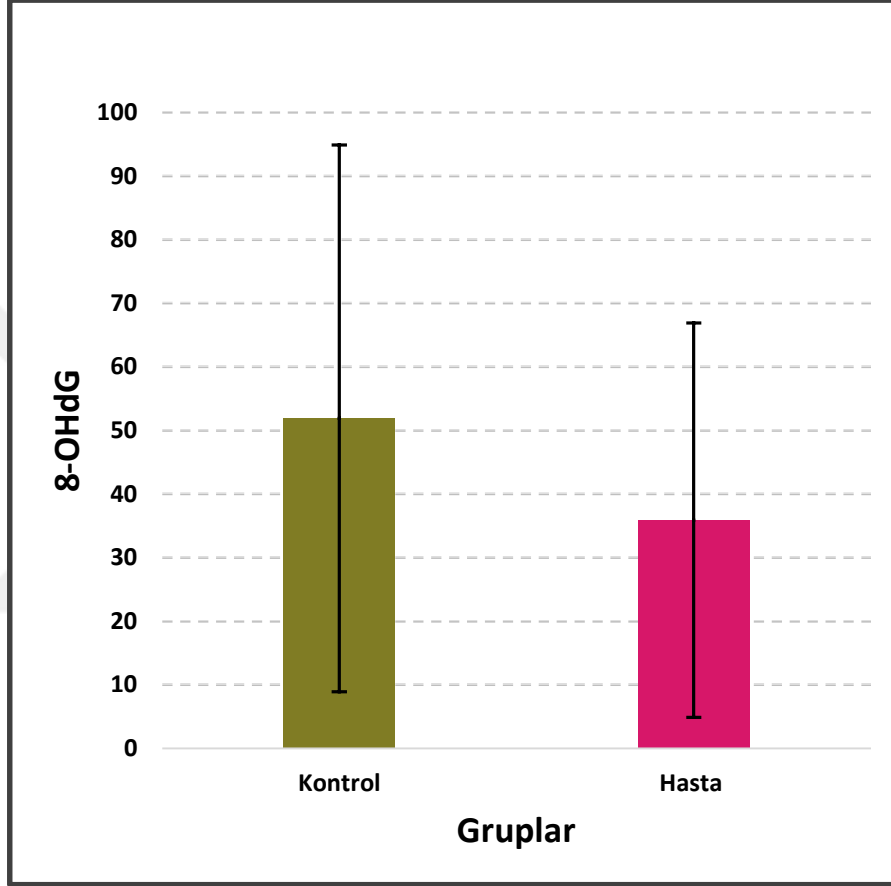
Değerler yaş ve vücut kitle indeksi (VKİ) için ortalama ± standart sapma ve minimum-maksimum; cinsiyet, sigara içme durumu ve egzersiz için kişi sayısı olarak verilmiştir.

4.2. Romatoid Artritli Hastaların DAS28 Değerlerine Göre Dağılımı

Çalışmaya katılan RA'lı hastaların ortalama DAS28 değeri 2,91±1,30 (1,2-7,3) olarak hesaplandı. Hastaların 14'ünün DAS28 değeri <2,6 bulundu ve bu hastalar remisyonda kabul edildi. Hastaların 8'i düşük hastalık aktivitesine (DAS28 değeri ≥2,6 ve < 3,2), 8'i ise orta hastalık aktivitesine sahipti (DAS28 değeri ≥3,2 ve ≤ 5,1). Sadece 2 hastanın hastalık aktivitesi yüksekti (DAS28 değeri > 5,1).

4.3. Romatoid Artrit ve Oksidatif DNA Hasarı

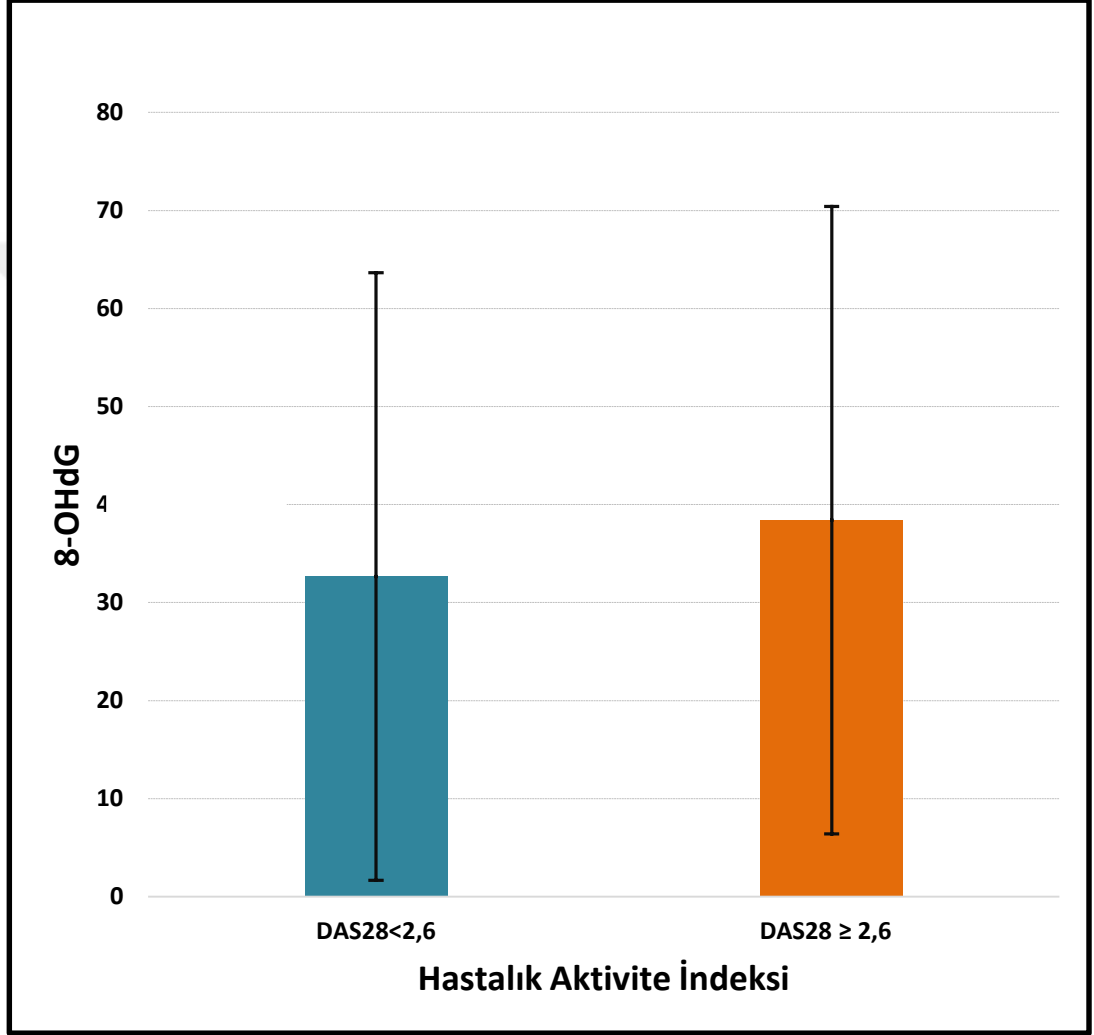
Oksidatif DNA hasarının göstergesi olan 8-OHdG düzeyleri hasta grubunda $35,89 \pm 30,80$ (1,64-112,05), kontrol grubunda ise $51,89 \pm 43,06$ (4,14-199,55) bulundu. Her iki grubun 8-OHdG düzeylerinin karşılaştırılmasında anlamlı farklılık görülmedi (Şekil 10).



Şekil 10. Hasta ve kontrol grubunun 8-OHdG değerlerinin karşılaştırması. 8-OHdG: 8-Hidroksi-2'-Deoksiguanozin. Sütunlar ortalama±standart sapmayı göstermektedir.

4.4. Hastalık Aktivitesi ve Oksidatif DNA hasarı

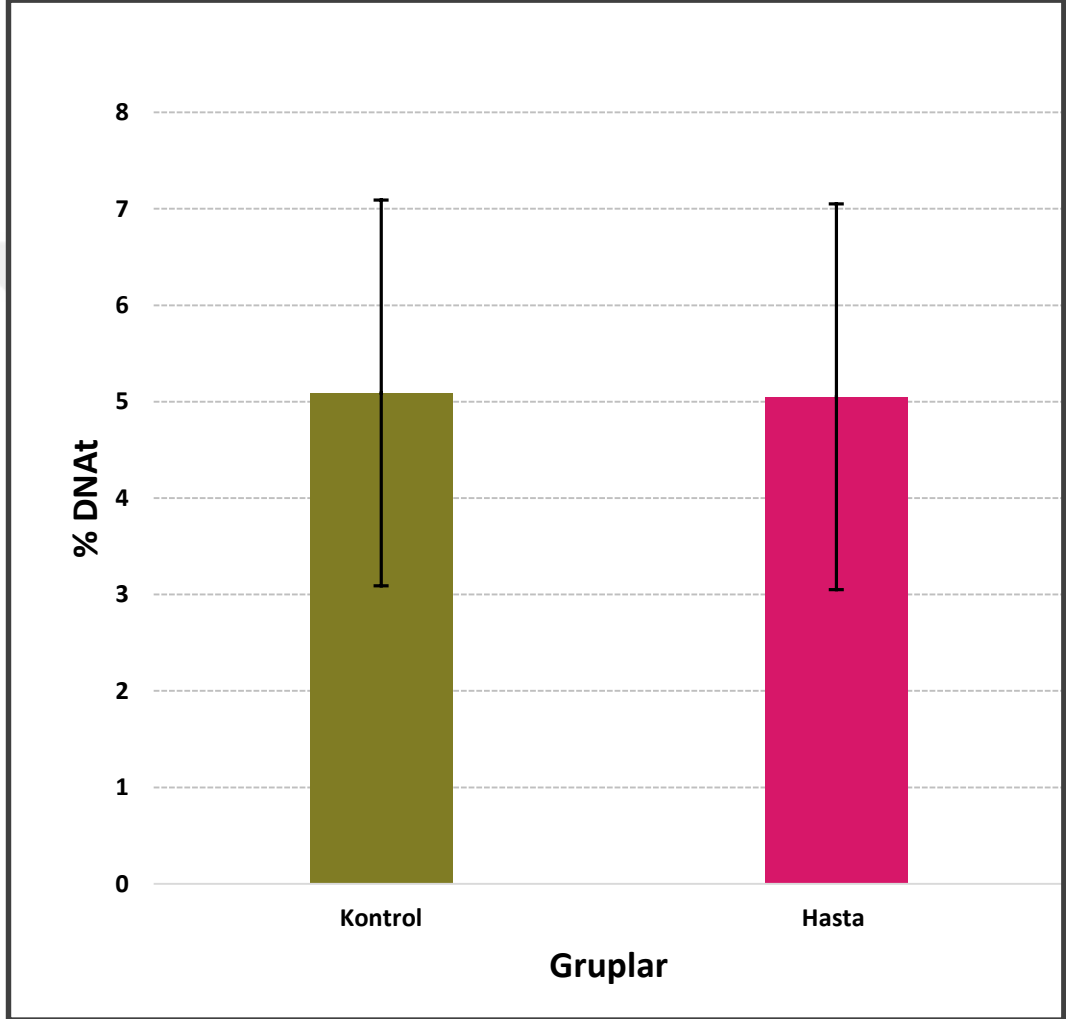
DAS28 değeri 2,6'dan küçük olan ve remisyonda olduğu kabul edilen 14 hasta ile DAS28 değeri 2,6 veya 2,6'dan büyük olan ve aktif hastalık döneminde olduğu kabul edilen 18 hastanın 8-OHdG düzeyleri $[32,66 \pm 30,69 (1,64-111,78)]$ ve $[38,40 \pm 31 (1,70-112,05)]$ arasında anlamlı farklılık gözlenmedi (Şekil 11).



Şekil 11. Hastalık Aktivitesine göre 8-OHdG değerlerinin karşılaştırılması. 8-OHdG: 8-Hidroksi-2'-Deoksiguanozin. DAS28:Hastalık Aktivite İndeksi (Disease Activity Score). Sütunlar ortalama±standart sapmayı göstermektedir.

4.5. Romatoid Artrit ve DNA Hasarı

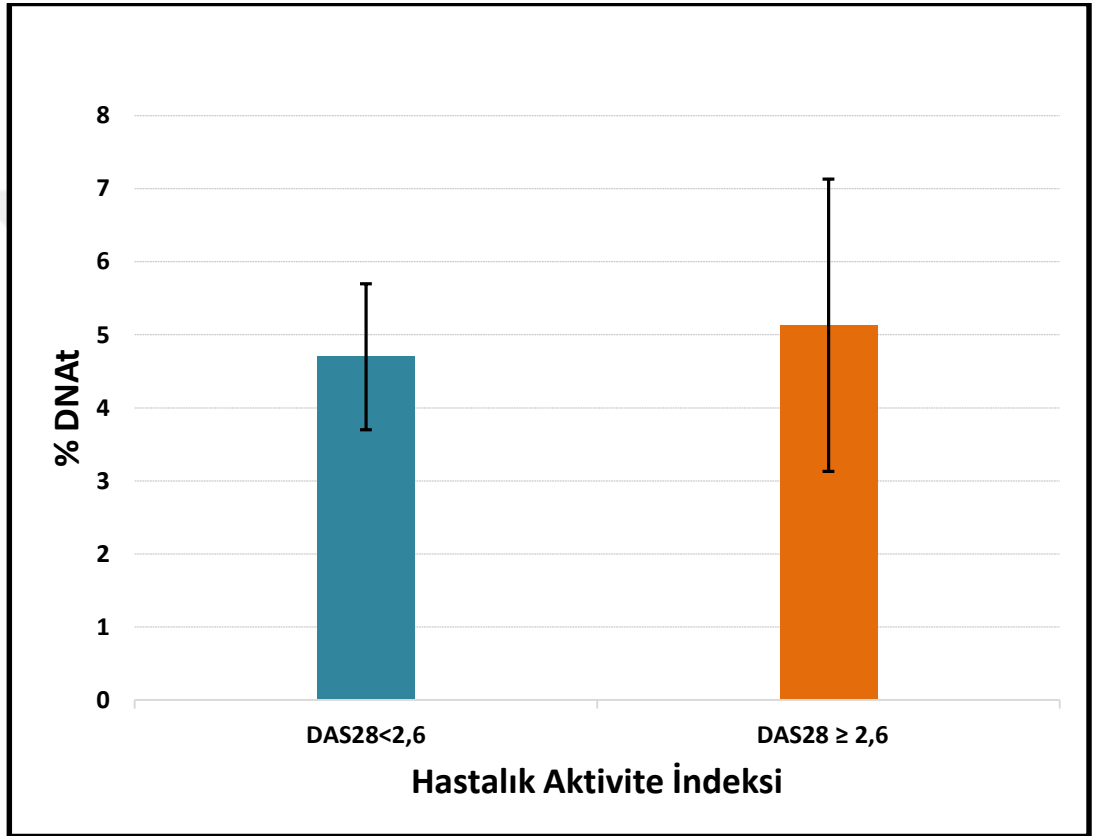
Hasta ve kontrol grubundan elde edilen kan mononükleer hücrelerinin komet görüntülerinin analiz edilmesi neticesinde %DNAt değeri hasta grubunda $5,05 \pm 1,67$ (2,53-11,34), kontrol grubunda ise $5,09 \pm 1,52$ (2,76-10,09) bulundu. İki grubun %DNAt değerlerinin karşılaştırılmasında ise anlamlı farklılık gözlenmedi (Şekil 12).



Şekil 12. Hasta ve Kontrol grubunun mononükleer hücre DNA hasarlarının karşılaştırması. %DNAt: Kuyruğu oluşturan DNA yüzdesi. Sütunlar ortalama±standart sapmayı göstermektedir.

4.6. Hastalık Aktivitesi ve DNA Hasarı

DAS28 değeri 2,6'dan küçük olan remisyondaki hastalar ile aktif hastalık dönemindeki hastaların (DAS28 değeri 2,6 veya 2,6'dan büyük olan hastalar) kan örneklerinden ayrıştırılan mononükleer hücrelerin komet görüntülerinin analiz edilmesi sonucu elde edilen %DNAt değerlerinin [$4,70 \pm 1,35$ (2,53-8,16) ve $5,13 \pm 1,88$ (2,93-11,34)] karşılaştırılmasında anlamlı farklılığa rastlanmadı (Şekil 13).

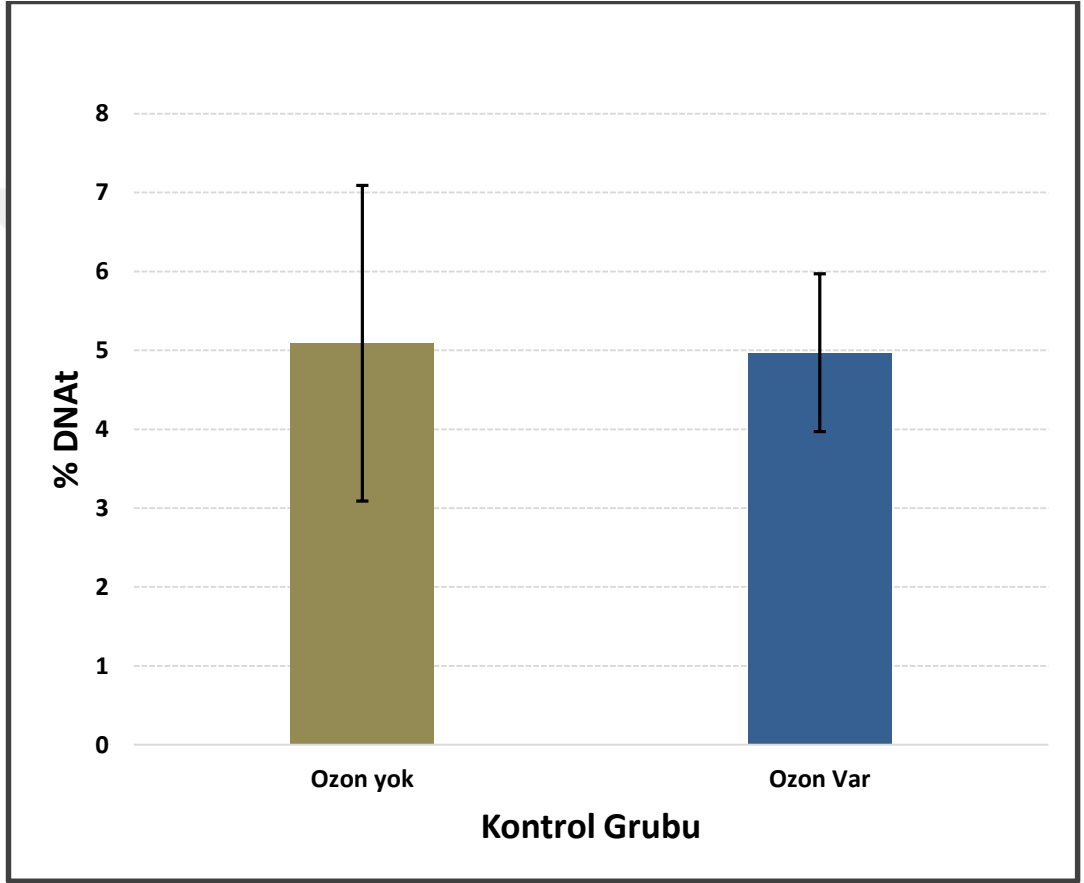


Şekil 13. Hastalık Aktivitesine göre %DNAt değerlerinin karşılaştırılması. %DNAt: Kuyruğu oluşturan DNA yüzdesi. DAS28: Hastalık Aktivite İndeksi (Disease Activity Score). Sütunlar ortalama±standart sapmayı göstermektedir.

4.7. Ozon Uygulamasının DNA Hasarına Etkisi

Ozon uygulamasının DNA hasarına olan etkisini araştırmak için kontrol grubunda yer alan gönüllülerden alınan her kan örneğinin bir kısmı ozonlanmadan bir kısmıysa ozonlanarak alkali komet yöntemiyle çalışıldı.

Ozon uygulaması yapılmayan kan örneklerine ait mononükleer hücrelerin komet görüntülerinin analiz edilmesi sonucu %DNAt $5,09 \pm 1,52$ (2,76-10,09) bulundu. Ozon uygulaması yapılan kan örneklerinden ayrıştırılan mononükleer hücrelerin komet görüntülerinin analiz edilmesiyle elde edilen %DNAt değeri ise $4,97 \pm 1,23$ (2,93-8,81) bulundu. Her iki %DNAt değerinin karşılaştırılmasında ise anlamlı sonuç ortaya çıkmadı (Şekil 14).



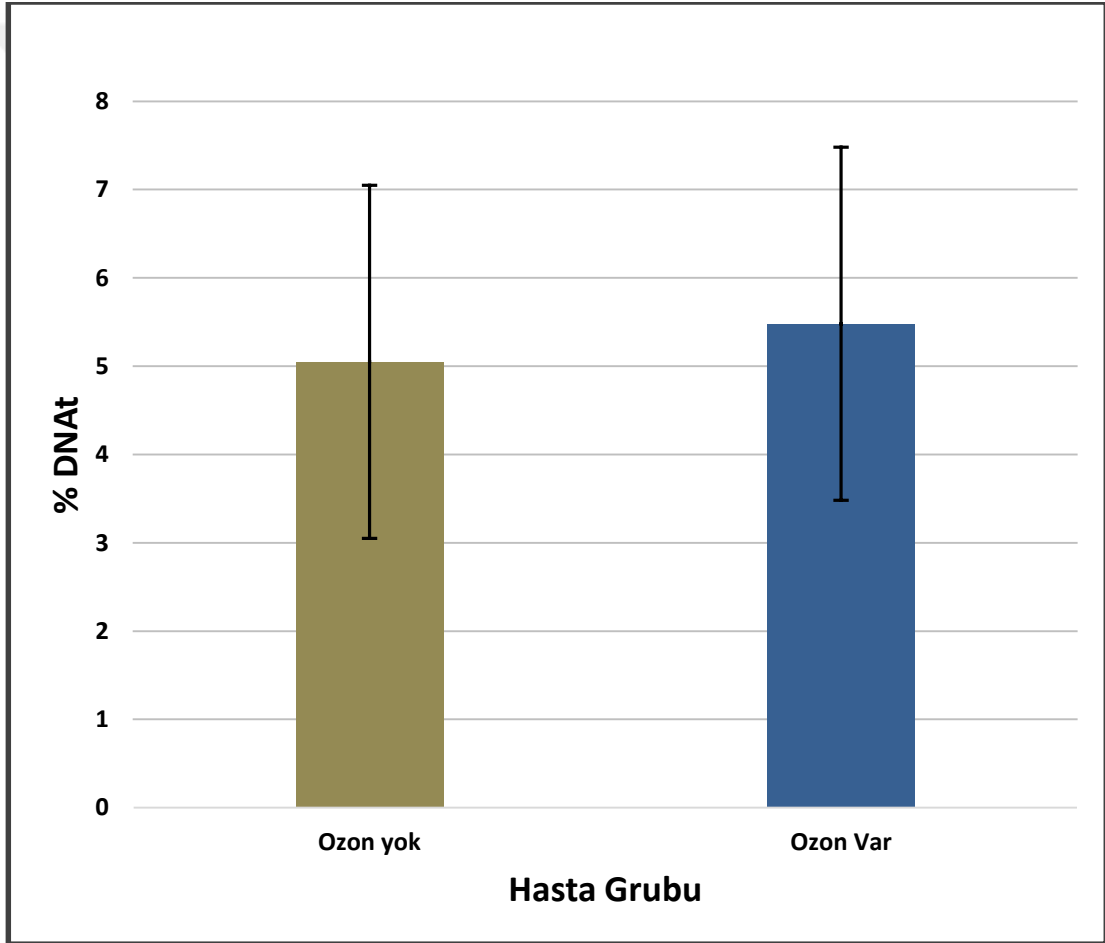
Şekil 14. Ozon uygulanmış ve ozon uygulanmamış, kontrol grubuna ait kan örneklerinin mononükleer hücre DNA hasarlarının karşılaştırması. %DNAt: Kuyruğu oluşturan DNA yüzdesi. Sütunlar ortalama±standart sapmayı göstermektedir.

4.8. Romatoid Artritli Hastalardan Elde Edilen Kan Örneklerine Ozon Uygulamasının DNA Hasarına Etkisi

RA'lı hastalardan elde edilen kan örneklerine ozon uygulamasının DNA hasarına etkisini araştırmak için hasta grubunda yer alan gönüllülerden alınan her kan

örneğinin bir kısmı ozonlanmadan bir kısmıysa ozonlanarak komet yöntemiyle çalışıldı.

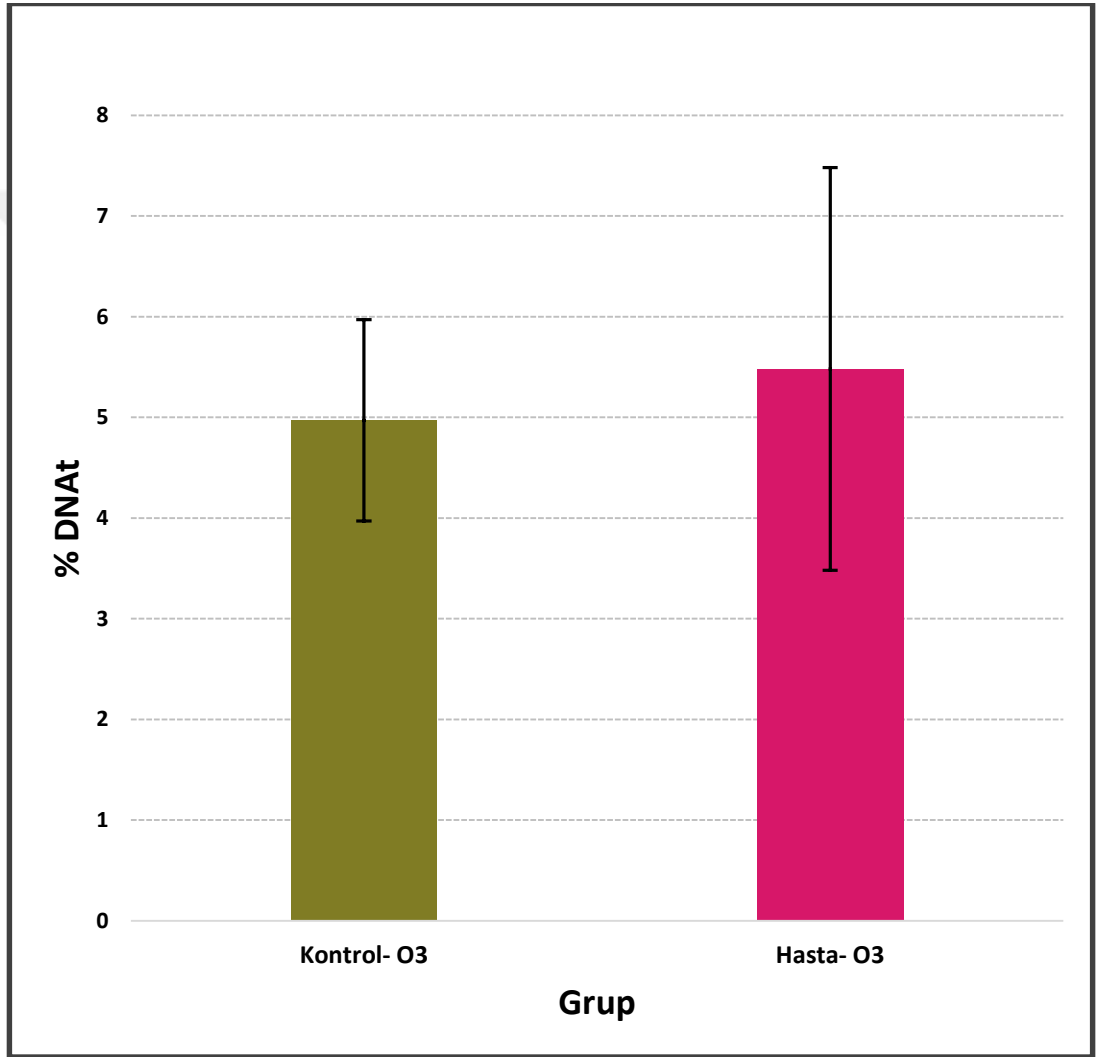
Hasta grubunda yer alan gönüllülere ait ozon uygulanmamış kan örneklerinden ayrıştırılan mononükleer hücrelerin komet görüntülerinin analiz edilmesi sonucu %DNAt $5,05 \pm 1,67$ (2,53-11,34) bulundu. Aynı hastaların ozon uygulaması yapılan kan örneklerinden ayrıştırılan mononükleer hücrelerin komet görüntülerinin analiz edilmesi sonucu %DNAt değeri ise $5,48 \pm 1,85$ (2,78-11,34) bulundu. Ozon uygulaması yapılmamış ve ozon uygulaması yapılmış kanlara ait mononükleer hücrelerin %DNAt değerinin karşılaştırılmasında ise anlamlı farklılık saptanmadı (Şekil 15).



Şekil 15. Ozon uygulanmış ve ozon uygulamamış, hasta grubuna ait kan örneklerinin mononükleer hücre DNA hasarlarının karşılaştırması. %DNAt: Kuyruğu oluşturan DNA yüzdesi. Sütunlar ortalama±standart sapmayı göstermektedir.

4.9. Hasta ve Kontrol Grubunun Ozon Uygulanan Kanlarına Ait Mononükleer Hücrelerin DNA Hasarının Karşılaştırması

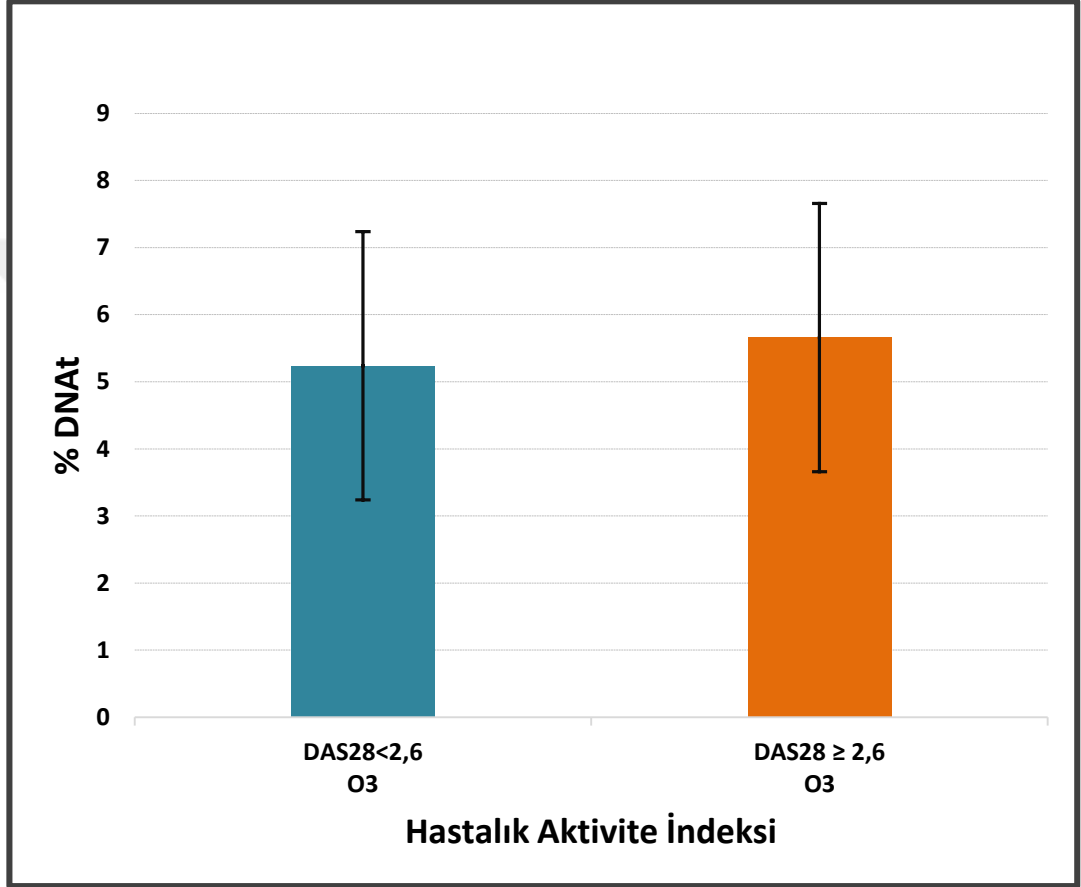
Hasta ve kontrol grubunun ozon uygulaması yapılan kanlarından ayrıştırılan mononükleer hücrelerin komet görüntülerinin analizi sonucu elde edilen %DNAt değerinin $[5,05 \pm 1,67 (2,53-11,34)$ ve $5,09 \pm 1,52 (2,76-10,09)$] karşılaştırmasında anlamlı farklılık saptanmadı (Şekil 16).



Şekil 16. Ozon uygulanan kanlara ait mononükleer hücrelerin %DNAt değerlerinin karşılaştırılması. %DNAt: Kuyruğu oluşturan DNA yüzdesi. Sütunlar ortalama±standart sapmayı göstermektedir.

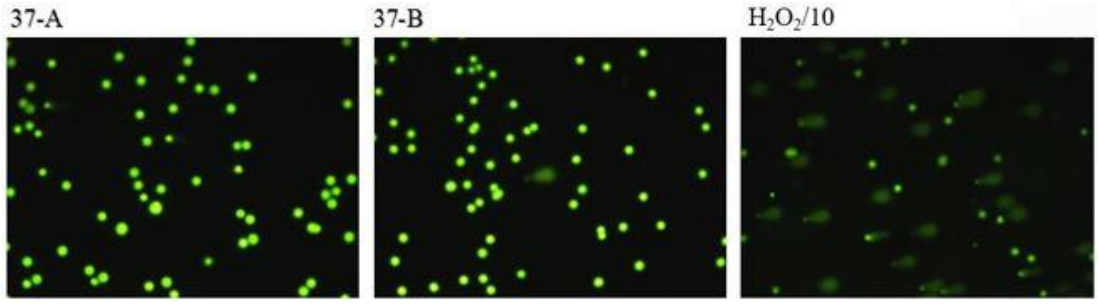
4.10. Aktif Hastalık Varlığında Ozon Uygulamasının DNA Hasarına Etkisi

Remisyonda olan hastalar ile aktif hastalık döneminde olan hastaların ozon uygulaması yapılan kanlarından saflaştırılan mononükleer hücrelerin komet görüntülerinin analizi sonucu elde edilen %DNAt değerlerinin [$5,24 \pm 1,70$ (2,78-8,86) ve $5,66 \pm 1,99$ (3,26-11,34)] karşılaştırılmasında anlamlı farklılık görülmedi (Şekil 17).

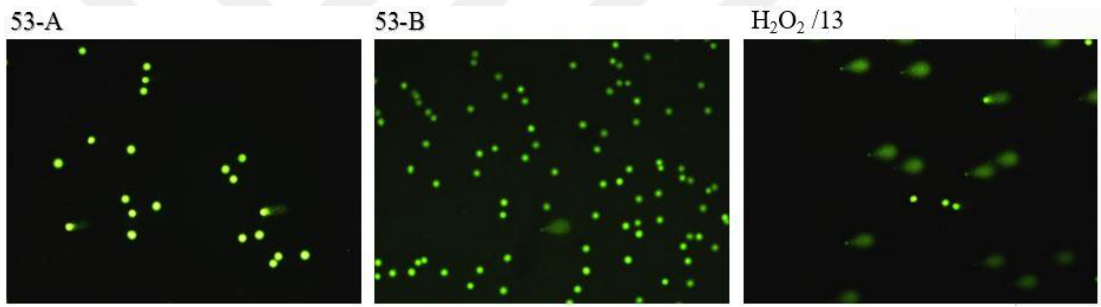


Şekil 17. Ozon uygulaması yapılan kan örneklerinden ayrıştırılmış mononükleer hücrelerin %DNAt değerlerinin DAS28'e göre karşılaştırılması. %DNAt: Kuyruğu oluşturan DNA yüzdesi. DAS28: Hastalık Aktivite İndeksi (Disease Activity Score). Sütunlar ortalama±standart sapmayı göstermektedir.

Kontrol ve hasta grubundan birer gönüllünün ozon uygulanmış ve ozon uygulanmamış kanlarına ait mononükleer hücrelerin komet yöntemiyle elde edilen jel görüntüleri Resim 3 ve Resim 4'te yer almaktadır.



Resim 3. Kontrol grubunda yer alan 37 numaralı gönüllünün ozon uygulanmamış (A) ve ozon uygulanmış (B) kanlarına ait mononükleer hücreler ile aynı tankta yürütülen pozitif kontrol olarak 50 µM hidrojen peroksit uygulanmış mononükleer hücrelerin komet yöntemiyle elde edilen jel görüntüleri.



Resim 4. Hasta grubunda yer alan 53 numaralı gönüllünün ozon uygulanmamış (A) ve ozon uygulanmış (B) kanlarına ait mononükleer hücreler ile aynı tankta yürütülen pozitif kontrol olarak 50 µM hidrojen peroksit uygulanmış mononükleer hücrelerin komet yöntemiyle elde edilen jel görüntüleri.

5. TARTIŞMA

Çalışmamızın temel bulgusu, yardımcı tedavi yöntemi olarak kullanılan ozon dozunun, mononükleer kan hücrelerinde DNA hasarını arttırmamasıdır.

Hem komet yöntemiyle bakılan DNA kırık miktarı hem de serumdan ELISA yöntemiyle ölçülen ve DNA'da ki oksidatif hasarın göstergesi olan 8-OHdG düzeyi RA'lı hastalarda kontrol grubundan farklı bulunmamıştır. Ayrıca DAS28 değeri 2,6'dan düşük olan remisyondaki hastalar ile DAS28 değeri 2,6'dan büyük olan aktif hastalık dönemindeki hastaların %DNAt değeri ve 8-OHdG seviyeleri arasında da farklılık gözlenmemiştir.

RA sistemik, otoimmün, kronik yangısal bir hastalıktır. Hastalığın ölüm oranında artışa neden olabildiği, karakteristik eklem hasarı dışına birçok hayati organa zarar verebildiği ve kanser riskinde artış meydana getirebildiği bilinmektedir. Hastalığın patogenezi oldukça karmaşıktır ve bağışıklık sisteminin patolojik süreçlerde önemli etkileri bulunmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalar oksidatif stresin RA patolojik süreçlerine katkısına dikkat çekmektedir. Yayınlarda sıkça RA'lı hastalarda oksidatif stresin arttığına ve antioksidan kapasitede ise düşüş yaşandığına değinilmektedir (Tak ve ark. 2000, Seven ve ark. 2008, Kundu ve ark. 2012, Simon ve ark. 2015). Oksidatif stres çeşitli mekanizmalarla DNA'da baz oksidasyonu, abazik bölge oluşumu, tek-çift zincir kırıkları ve çapraz bağlanmalar gibi birçok DNA hasarına neden olmaktadır. Oluşan bu hasarları saptamadaysa birçok yöntem kullanılmaktadır. ROT DNA bazlarında oldukça çeşitli oksidatif baz hasarına neden olabilirler. 8-OHdG ise guanin bazının ROT ile okside olmasıyla oluşur. 8-OHdG ROT kaynaklı en sık karşılaşılan baz hasarı olmasının yanı sıra, mutajenitesi iyi bilinen okside bazdır. Bu nedenle 8-OHdG ölçümü DNA'da ki oksidatif hasarı gösterir ve bu amaçla kullanımı oldukça yaygındır (Cheng ve ark. 2003, Hitchon ve El-Gabalawy 2004, Kageyama ve ak. 2007). Diğer taraftan bazı kanser türlerindeyse 8-OHdG düzeyi kontrol gruplarından farklı bulunmamıştır (Nagashimaa ve ark. 1995, Dinçer ve ark. 2011). Seven ve ark. (2008), RA tanısı yeni konmuş ve tedavi olarak sadece steroid olmayan anti-inflamatuar ilaç (NSAID) alan RA'lı hastalarla yaptıkları çalışmalarında DAS değerinin yüksek (DAS>2,7) olduğu RA'lı hastalarda 8-OHdG düzeyinin, DAS değeri düşük olan hastalardan yüksek olduğunu bulmuşlardır. Hajizadeh ve ark. (2003), çalışmalarında her ne kadar RA'lı hastaların sinoviyal

sıvılarında (SF) 8-OHdG düzeylerinde anlamlı artış saptamış olsalar da, kontrol grubundaki bireylerin hemen hemen yarısında sinoviyal sıvı 8-OHdG düzeyinin kontrol grubu ortalamasından yüksek olduğunu belirtmişlerdir. Kageyama ve ark. (2007), RA'lı hastaların idrarında yüksek seviyede saptadıkları 8-OHdG seviyesinin 6 ay metotreksat tedavisine bağlı düşüş gösterdiğini belirtmişlerdir. Benzer şekilde Kageyama ve ark. (2008), RA'lı hastaların idrarında yüksek düzeyde saptadıkları 8-OHdG düzeyinin anti-TNF- α tedavisine bağlı azaldığını da göstermişler ve bu çalışmada DAS28 ile 8-OHdG seviyesi arasında korelasyon saptamışlardır. Gerek Kageyama ve ark.'ın bahsi geçen ilk çalışmalarında, gerekse ikinci çalışmalarında 8-OHdG düzeyini yüksek saptadıkları RA'lı hastaların ortalama DAS28 değerleri (5.23 ± 0.70 ve 4.13 ± 0.80) bizim çalışmamızda yer alan RA'lı hastaların ortalama DAS28 değerinden (2.91 ± 1.30) yüksektir. Dolayısıyla yüksek hastalık aktivitesinin oksidatif strese neden olabildiği ve oksidatif stresinde 8-OHdG düzeyini etkileyebildiği göz önüne alındığında, bu çalışmada RA'lı hastaların 8-OHdG düzeyi ile kontrol grubunun 8-OHdG düzeyi arasında anlamlı fark bulunmaması hastaların ortalama DAS-28 değerinin düşük olmasından kaynaklanmış olabilir. Nitekim Martelli-Palomino ve ark. (2016), RA'lı hastalardaki artmış DNA hasarının DAS-28 ile korelasyon gösterdiğini bildirmişlerdir. Ayrıca kontrol grubunda yer alan katılımcıların bazılarında ise 8-OHdG düzeyleri oldukça yüksek saptanmıştır ki bu da bireysel birçok farklılıktan kaynaklanmış olabilir (Fenech ve Bonassi 2011, Slyskova ve ark. 2014).

Çalışmanın komet analizi sonuçlarına göre kontrol grubunda yer alan gönüllülerin %DNA_t değerleri ile RA'lı hastaların %DNA_t değerleri arasında anlamlı farklılık bulunmamıştır. Ayrıca DAS28 değeri 2,6'dan küçük olan remisyondaki hastalar ile DAS28 değeri 2,6'dan büyük olan hastalığın aktif olduğu hastaların %DNA_t değerlerinin karşılaştırmasında da anlamlı farklılık ortaya çıkmamıştır.

Otoimmün hastalıklar ve kronik yangılı hastalıklar DNA'da zincir kırıkları ve baz hasarları gibi çeşitli hasarlara neden olabilmektedir. Bununla birlikte kronik yangılı hastalıklar ile otoimmün hastalıklarda görülen kanser riskindeki artışın DNA hasarlarındaki artıştan ya da DNA hasarlarının onarımındaki aksaklıklardan kaynaklanabileceği öne sürülmektedir (Bashir ve ark. 1993, Tak ve ark. 2000). RA otoimmün ve kronik yangısal bir hastalıktır ve hastalığa bağlı olarak hematopoetik

kanserler ile akciğer kanserleri gibi bazı kanser türlerinin riski artabilmektedir (Simon ve ark., 20015).

Alkali komet yöntemi DNA tek zincir kırıklarını ve DNA'daki abazik bölgeleri tespit edebilen oldukça duyarlı ve güvenilirliği yüksek, biyolojik izleme olarak yaygın kullanımı olan genotoksisite testlerindedir. Analiz sonucu elde edilen % DNA_t değeri kırık ya da abazik bölgelerin DNA'da bulunması halinde, sağlam DNA'nın % kaçının kırık ya da abazik bölge olduğunu göstermesi bakımından oldukça objektif oluşu ve jelin boyanması sonrası oluşabilecek art defektleri ölçüm sonucuna nispeten daha az yansıtması nedeniyle komet analiz sonuçlarını değerlendirmede en güvenilir parametre olarak kabul görmektedir (Dusinska ve Collins 2008, Lovell ve Omori 2008, Lorenzo ve ark. 2013). Ancak RA'lı hastalarda komet yöntemiyle DNA hasarının incelendiği çalışmalar oldukça kısıtlıdır. Karaman ve ark. (2011), RA'lı hastalarda alkali komet yöntemiyle DNA hasarını belirledikleri çalışmalarında RA'lı hastalarda komet kuyruk uzunluğunun arttığını, aktif hastalık dönemindeki RA'lı hastalarının komet kuyruklarının ise aktif hastalık döneminde olmayan RA'lı hastaların komet kuyruklarından uzun olduğunu saptamışlardır. Benzer şekilde Mateen ve ark. (2016b), RA'lı hastalarda kuyruk uzunluğunun fazla olduğunu ve DAS değeri büyük olan RA'lı hastaların komet kuyruklarının daha uzun olduğunu saptamışlardır. Yine Altındağ ve ark. (2007), RA'lı hastalarda alkali komet yöntemiyle DNA hasarını belirledikleri çalışmalarında komet görüntülerinin görsel analiziyle elde ettikleri arbitrary unit (AU) değerinin RA'lı hastalarda daha büyük olduğunu ifade etmektedirler. Diğer yandan Jarmalaite ve ark. (2006), RA'lı hastalarda kardeş kromotit değişim sıklığının artmadığını ancak RA'lı hastaların periferik kan lenfositlerinin mitoz ve replikasyon sıklığının azaldığını saptamışlardır. Martelli-Palomino ve ark. (2016), RA'lı hastalardaki artmış DNA hasarının DAS-28 ile korelasyon gösterdiğini, bununla birlikte anti-TNF- α tedavisinin DNA hasarını azalttığını göstermişler ve hastalık aktivitesi ile DNA hasarı arasındaki bu ilişkinin aslında RA patogenezinde oksidatif stresin önemini yansıttığını dile getirmişlerdir. Bizim çalışmamızda yer alan RA'lı hastalar anti-TNF- α tedavisi de dahil çeşitli tedavi uygulanan hastalardı ve hastaların çoğu ise ya remisyondaydı (32 hastanın 14'ü) ya da düşük hastalık aktivitesine (32 hastanın 8'i) sahipti. Kalan 10 hastanın 8 tanesi ise orta hastalık aktivitesine sahipti. Şayet yeni tanı almış ve henüz tedavi başlanmamış hastalar çalışmamızda yer alsaydı

DNA hasarının artmış olduğunu göstermek mümkün olabilirdi. Mevcut oksidan durumun hastalık aktivitesiyle korele olduğu göz önüne alındığında hastalarda kontrol grubuna oranla artmış bir DNA hasarının saptanmaması uygulanan tedavilerle hastalığın kontrol altına alınmış dolayısıyla daha az oksidatif strese maruz kalmalarından kaynaklanmış olabilir. Ayrıca çalışmada yer alan hastalarda beklenenin aksine antioksidan kapasitede azalma olmamış olabilir ya da hastaların sağlıklı beslenme alışkanlıkları DNA hasar oluşumunu azaltmış olabilir (Dusinska ve ark. 2002, Joosen ve ark. 2009, Fenech ve Bonassi 2011).

Çalışmamızda 50 µg/ml yoğunlukta ozon uygulaması yapılan kanlardan ayrıştırılan mononükleer hücrelerin %DNA_t değeri ile ozon uygulaması yapılmayan kanlardan ayrıştırılan mononükleer hücrelerin %DNA_t değeri arasında anlamlı farklılık saptanmamıştır.

Ozon güçlü bir oksidan ajandır. Hava kirliliği nedeniyle ozona maruz kalmanın özellikle akciğerlerde büyük hasara neden olabildiği birçok epidemiyoloji ve çevre kirliliği araştırmalarında ortaya konmuştur. Solunan hava içeriğindeki ozon miktarının artışının nazal hücrelerde ve kan lökositlerinde DNA tek zincir kırıklarının neden olduğu gösterilmiştir (Valverde ve ark. 1997, Pacini ve ark. 2003, Palli ve ark. 2009). Hava kirliliği kaynaklı ozon maruziyetinin neden olduğu genotoksik etkiler erkeklerde kadınlara nazaran daha belirgin bulunmuştur (Fortoul ve ark., 2004). Ferng (2002), çeşitli yoğunlukta ve sürelerde ozon inhale ettirdikleri kobaylarda 1,00 ppm ozonu uzun süre inhale eden hayvanlarda DNA tek zincir kırıklarının arttığını ancak düşük doz da ve kısa süre inhale edilen ozonun böyle bir etki meydana getirmedeğini saptamışlardır. Benzer şekilde Finkenwirth ve ark. (2014), 0,21 ppm ozonu akut olarak 2 saat inhale etmenin periferik kan mononükleer hücrelerinde DNA tek zincir kırıklarına neden olmadığını bununla birlikte DNA tek zincir kırıklarının hızlı onarılması nedeniyle kırık oluşmuşsa bile analiz sürecinde düzelme sağlanmış olabileceğini vurgulamışlardır. Cheng ve ark. (2003), in-vitro ozon uygulamasının A549 hücre hatlarında 8-Oxoguanin oluşumuna neden olduğunu ve DNA tek zincir kırıklarında artış meydana getirdiğini saptamışlardır. Bununla birlikte Diaz-Llera ve ark. (2002), PBS ile seyreltikleri kana (1ml PBS+60 µl kan) ozon uygulamasının doza bağlı şekilde komet uzunluğunu arttırdığını ve DNA'da meydana gelen bu hasarın 45-90 dakika gibi kısa sürede azaldığını saptamışlardır. Dahası seyreltik kana katalaz antioksidan enzimi

ekledikten sonra ozon uygulamasına bağılı oluşan DNA hasarının ise daha az olduğunu belirtmişlerdir. Oksidanların organizmaya zarar vermesini engelleyen antioksidan savunma sistemlerinin gerekliliğı tartışılmazdır. Nitekim Larini ve Bocci (2005), kanı PBS ile seyreltikten sonra ozon uygulanmasının ya da antioksidan enzimlerden yoksun kültür ortamındaki hücelere ozon uygulamasının, kana doğrudan ozon uygulamaktan farklı olduğunu; kanın ihtiva ettiği antioksidanlar nedeniyle ozon uygulamasına dirençli olduğunu ve kana doğrudan 20 µg/ml (0,42 mM) ile 60 µg/ml (1,26 mM) aralığındaki yoğunlukta ozon uygulamasının herhangi bir hasara yol açmadığını ifade etmektedirler.

Yapılan çalışmada RA'lı hastalardan elde edilen kanlara ozon uygulamasının komet yöntemiyle analiz edilen %DNA_t değerini etkilemediğı saptanmıştır. Ayrıca remisyonda olan hastalar ile aktif hastalık döneminde olan hastalardan elde edilen kanlara ozon uygulaması sonucu elde edilen %DNA_t değerleri arasında da anlamlı farklılık oluşmamıştır. Bununla birlikte ozon uygulaması yapılan kontrol ve RA'lı hastaların kanlarından ayrıştırılan mononükleer hücelerin %DNA_t değerleri arasında da fark gözlenmemiştir.

Ozon terapisi alternatif tedavi yöntemi olarak şüpheyle yaklaşılan bir yöntemdir. Diğer taraftan dikkatli kullanıldığında sağıık açısından faydalı etkileri olduğu yönünde iddialar da bulunmaktadır. Ozonun kanla teması sonucu oluşan H₂O₂ ve LOPs, ozonun vücutta meydana getirdiğı etkileri oluşturan aracı moleküllerdir ve 1 mol O₃, 1 mol H₂O₂ ve 2 mol LOPs meydana getirir. Bu nedenle MOHT uygulamasının etkili olabilmesi için ozon konsantrasyonu önemlidir. H₂O₂ hücre membranından geçip hücre içine girdiğinde metal iyonları varlığında kolaylıkla DNA gibi yapılarda ciddi hasarlara neden olabilen OH radikalini meydana getirebilir. OH radikali DNA yapısında bulunan 4 bazda ve şeker grubunda geniş çaplı hasara neden olabilir, DNA zincir kırıklarına yol açabilir. Labuschagne ve ark. (2009), MOHT uygulaması sonrası DNA hasarının ve DNA tamir kapasitesinin nasıl etkilendiğini inceledikleri çalışmalarında, MOHT uygulaması sonrası 4. saatte %DNA_t değerinin azaldığını ancak 24 ve 48. saatlerde %DNA_t değerinin tekrar arttığını, ancak bu artışın ozon uygulaması yapılmayan örneklerin %DNA_t değerinden farklı olmadığını belirtmişlerdir. Ayrıca MOHT uygulaması sonrası 80 µg/ml ozon uygulanan grupların DNA tamir kapasitesinde belirgin artış meydana gelirken 40 µg/ml ozon uygulanan

grupta böyle bir artış ortaya çıkmadığı gibi tersine, DNA tamir kapasitesini düşürdüğünü saptamışlardır. Bu nedenle MOHT uygulamasının çok güvenli olmadığını ve özellikle tekrarlanan şekilde yapılan terapilerin uzun vadede DNA bütünlüğü üzerinde olumsuz etkilerinin olabileceğine dikkat çekmektedirler. Bazı kanser hücre hatlarında ROT'un DNA hasarına sebep olmaktan ziyade DNA'da kalıcı hasarlar oluşmasını engelleyen tamir mekanizmalarında hasara neden olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte RA'lı hastaların sinoviyumunda da yanlış eşleşme baz onarım mekanizmasında ROT kaynaklı aksaklık saptanmıştır (Lee ve ark., 2003). Diaz-Llera ve ark. (2009), rektal ozon uygulaması yaptıkları sıçanlarda uygulamadan sonraki ilk 24 saatte lökosit ve kolorektal hücrelerde komet uzunluğunda artış olduğunu saptamışlardır. Bununla birlikte 24-72 saat arasındaysa komet uzunluklarında azalma olduğunu ancak kontrol hücrelerinin komet uzunluğu seviyesine düşmediğini belirtmişlerdir. Diğer yandan Collins ve ark. (1995), çalışmalarında periferik kan lenfositlerinin H₂O₂ uygulamasına HeLa hücrelerine kıyasla daha dirençli olduğunu ve dolayısıyla tek zincir kırıklarının sıklığının daha az olduğunu saptamışlardır. Bu durumun lenfositler arasındaki varyasyonlardan ya da lenfositler ile HeLa hücreleri arasındaki farklılıklardan kaynaklanabileceğini, nitekim H₂O₂'nin OH radikaline dönüşmesi için gerekli olan Fe⁺² miktarının her hücrede farklı olduğu buna bağlı olarak da DNA hasarının etkilenebileceğini vurgulamışlardır. Benzer şekilde katalaz ve glutatyon peroksidaz gibi antioksidan enzimler ile E vitamini gibi serbest radikalleri engelleyen moleküllerin miktarının hücre tipine ya da lenfosit alt tipine göre değişiklik gösterebildiğini belirtmişlerdir. H₂O₂'nin neden olduğu DNA tek zincir kırıkları hücre içi H₂O₂ yoğunluğuyla doğrudan ilişkilidir (Schraufsttter ve ark., 1988). Bocci ve ark. (2011a), MOHT yöntemiyle ozonu kana uyguladıktan sonra ozonun hızla girdiği reaksiyonlar sonucu oluşan H₂O₂ düzeyinin hücre içinde 0,4 µM gibi oldukça düşük yoğunlukta saptandığını belirtmektedir. Çalışmamızda MOHT yönteminde yaygın kullanılan ozon yoğunluğu ve dozu kullanılmıştır. Uyguladığımız ozon dozu bahsedildiği gibi düşük seviyede hücre içi H₂O₂ artışına neden olduğundan DNA tek zincir kırıklarını artıracak etki oluşturmamış olabilir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu sonuçlara bakarak MOHT dozunda ozon uygulamasının genotoksik etki oluşturmaması açısından güvenilir olduğu söylenebilir. Genotoksik ajanlar DNA'da tek zincir kırıkları veya alkali kararsız bölgeler dışında başka DNA hasarına da neden olabilmekte ya da DNA tamir kapasitesine zarar verebilmektedir. Bununla birlikte genotoksik ajanlar bireysel farklılıklar nedeniyle her zaman aynı düzeyde hasar oluşturmazlar ya da asıl etkileri uzun süre maruziyetten sonra ortaya çıkabilir. Her ne kadar çalışmamızda ozonun DNA hasarına neden olduğu bulgusuna ulaşılmamış olsa da, farklı tedavi protokolleri ve ozon dozlarının DNA hasarını arttırması beklenebilir. Nitekim, ozon ve DNA hasarı ile ilgili yapılmış çalışmalar yetersizdir ve yüksek oksitleme gücüne sahip ozonun tedavi amaçlı kullanımına güvenilirliği bilimsel verilerle teyit edilene kadar şüpheli yaklaşılmalıdır. Konu ile ilgili çalışmaların henüz yeterli sayıda olmaması ve farklı ozon dozlarının ortaya çıkarabileceği etkilerin bilinmemesi nedeniyle bu konuda ilave çalışmalara gereksinim vardır.

7. KAYNAKLAR

- 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 in an urban population of Izmir-Turkey. *Clinical and Experimental Rheumatology*. 2004; 22: 416-420.
- Akbari M, Otterlei M, Pena-Diaz J, Aas PA, Kavli B, Liabakk NB, Hagen L, Imai K, Durandy A, Slupphaug G, Krokan HE. Repair of U/G and U/A in DNA by UNG2 associated repair complexes takes place predominantly by short-patch repair both in proliferating and growth-arrested cells. *Nucleic Acids Research*. 2004; 32/18: 5486-5498.
- Altındağ O, Karakoc M, Kocyigit A, Celik H, Soran N. Increased DNA damage and oxidative stress in patients with rheumatoid arthritis. *Clinical Biochemistry*. 2007; 40: 167-171.
- Azqueta A, Collins AR. The essential comet assay: A comprehensive guide to measuring DNA damage and repair. *Archives of Toxicology*. 2013; 87: 949-968.
- Bashir S, Harris G, Denman MA, Blake DR, Winyard PG. Oxidative DNA damage and cellular sensitivity to oxidative stress in human autoimmune diseases. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 1993; 52: 659-666.
- Bax M, Van Heemst J, Huizinga TWJ, Toes REM. Genetics of rheumatoid arthritis: What have we learned? *Immunogenetics*. 2011; 63: 459-466.
- Bellon S, Ravanat JL, Gasparutto D, Cadet J. Cross-linked thymine-purine base tandem lesions: Synthesis, characterization, and measurement in γ -irradiated isolated DNA. *Chemical Research in Toxicology*. 2002; 1: 598-606.
- Benigni R, Bossa C, Tcheremenskaia O. Nongenotoxic carcinogenicity of chemicals: Mechanisms of action and early recognition through a new set of structural alerts. *Chemical Reviews*. 2013; 113: 2940-2957.
- Bocci V. Scientific and medical aspects of ozone therapy. State of the art. *Archives of Medical Research*. 2006a; 37: 425-435.
- 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. Tropospheric ozone toxicity vs. usefulness of ozone therapy. *Archives of Medical Research*. 2007; 38: 265-267.
- 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. How a calculated oxidative stress can yield multiple therapeutic effects. *Free Radical Research*. 2012; 46/9: 1068-1075.
- 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*. 2011a; 1: 6.
- Bocci V, Zanardi I, Travagli V. Has oxygen-ozonotherapy a future in medicine? *Journal of Experimental and Integrative Medicine*. 2011b; 1/1: 5-11.

- 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*. 2011c; 5: 45-49.
- Bocci V, Borrelli E, Zanardi I, Travagli V. The rectal insufflation is not the best administration route of ozone. *Revista Española de Ozonoterapia*. 2013; 3/1: 99-100.
- Boki KA, Drosos AA, Tzioufas AG, Lanchbury JS, Panayi GS, Moutsopoulos HM. Examination of HLA-DR4 as a severity marker for rheumatoid arthritis in Greek patients. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 1993; 52: 517-519.
- Bont R, Larebeke N. Endogenous DNA damage in humans: A review of quantitative data. *Mutagenesis*. 2004; 19/3: 169-185.
- Borrelli E, De Monte A, Bocci V. Oxygen ozone therapy in the integrated treatment of chronic ulcer: A case series report. *International Journal of Recent Scientific Research*. 2015; 6/5: 4132-4136.
- Brennan FM, B. McInnes LB. Evidence that cytokines play a role in rheumatoid arthritis. *The Journal of Clinical Investigation*. 2008; 118: 3537-3545.
- Braun T, Zwerina J. Positive regulators of osteoclastogenesis and bone resorption in rheumatoid arthritis. *Research and Therapy*. 2011, 13: 235. DOI: 10.1186/ar3380
- Cheng TJ, Kao HP, Chan CC, Chang WP. Effects of ozone on DNA single-strand breaks and 8-oxoguanine formation in A549 cells. *Environmental Research*. 2003; 93: 279-284.
- Christmann M, Tomicic MT, Roos WP, Kaina B. Mechanisms of human DNA repair: An update. *Toxicology*. 2003; 193: 3-34.
- Mauri C, Ehrenstein MR. Cells of the synovium in rheumatoid arthritis B cells. *Arthritis Research and Therapy*. 2007; 9/2: 205. DOI: 10.1186/ar2125
- Cojocaru M, Cojocaru IM, Silosi I, Vrabie CD, Tanasescu R. Extra-articular manifestations in rheumatoid arthritis. *A Journal of Clinical Medicine*. 2010; 5/4: 286-291.
- Collins AR. The comet assay for DNA damage and repair. Principles, applications, and limitations. *Molecular Biotechnology*. 2004; 26: 249-261.
- Collins AR, Ai-guo M, Duthie SJ. The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human cells. *Mutation Research*. 1995; 336: 69-77.
- 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.
- Dayer JM. The pivotal role of interleukin-1 in the clinical manifestations of rheumatoid arthritis. *Rheumatology*. 2003; 42/2: 3-10.
- 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.

- Diaz-Llera S, González-Hernandez Y, Gonzalez Mesa JE, Martínez-Sánchez 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.
- Dinçer Y, Akçay T, Kural AR, Ataus S, Koç EE, Çitgez S, Tuna MB. Evaluation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine concentration and antioxidant enzyme activities in bladder cancer patients. *Turkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*. 2011; 31/3: 553-558.
- Di Paolo N, Bocci V, Gaggiotti E. Ozone therapy. *The International Journal of Artificial Organs*. 2004; 27: 168-175.
- Dizdaroğlu M. Oxidatively induced DNA damage and its repair in cancer. *Mutation Research*. 2015; 763: 212-245.
- Drablos F, Feyzi E, Aas PA, Vaagbo CB, Kavli B, Bratlie MS, Peña-Diaz J, Otterlei M, Slupphaug G, Krokan HE. Alkylation damage in DNA and RNA-repair mechanisms and medical significance. *DNA Repair*. 2004; 3: 1389-1407.
- Dudas A, Chovanec M. DNA double-strand break repair by homologous recombination. *Mutation Research*. 2004; 566: 131-167.
- Dusinska M, Vallova B, Ursinyova M, Hladikova V, Smolkova B, Wsolova L, Raslova K, Collins AR. DNA damage and antioxidants; fluctuations through the year in a central European population group. *Food and Chemical Toxicology*. 2002; 40: 1119-1123.
- Dusinska M, R. Collins AR. The comet assay in human biomonitoring: Gene-environment interactions. *Mutagenesis*. 2008; 23: 191-205.
- Eid MM, Temtamy SA. Cytogenetic studies of chromosomal breakage diseases. *Middle East Journal of Medical Genetics*. 2013; 2: 11-22.
- Ekström K, Hjalgrim H, Brandt L, Baecklund E, Klareskog L, Ekbom A, Askling J. Risk of malignant lymphomas in patients with rheumatoid arthritis and in their first-degree relatives. *Arthritis and Rheumatism*. 2003; 48: 963-70.
- Fenech M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature Protocols*. 2007; 2/5: 1084- 1104.
- Fenech M, Bonassi S. The effect of age, gender, diet and lifestyle on DNA damage measured using micronucleus frequency in human peripheral blood lymphocytes. *Mutagenesis*. 2011; 26/1: 43-49.
- Ferng SF. Ozone-induced DNA single strand-breaks in guinea pig tracheobronchial epithelial cells in vivo. *Inhalation Toxicology*. 2002; 14: 621-633.
- Fijalkowska IJ, Schaaper RM, Jonczyk P. DNA replication fidelity in *Escherichia coli*: A multi-DNA polymerase affair. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Reviews*. 2012; 36/6: 1105-1121.
- Filippin LI, Vercelino R, Marroni NP, Xavier RM. Redox signalling and the inflammatory response in rheumatoid arthritis. *Clinical and Experimental Immunology*. 2008; 152: 415-422.
- Finkenwirth C, Rosbach B, Schröder HC, Müttray A. In vivo ozone exposure does not increase DNA single-strand breaks in human peripheral lymphocytes. *Human and Experimental Toxicology*. 2014; 33/5: 517-521.

- Firestein GS, Echeverri F, Yeo M, Zvaifler NJ, Green DR. Somatic mutations in the p53 tumor suppressor gene in rheumatoid arthritis synovium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997; 94: 10895-10900.
- Fortoul TI, Valverde M, Lo'pez MC, Avila-Costa MR, Avila-Casado MC, Mussali-Galante P, Gonzalez-Villalva A, Rojas E, Ostrosky-Sheje P. Genotoxic differences by sex in nasal epithelium and blood leukocytes in subjects residing in a highly polluted area. *Environmental Research*. 2004; 94: 243-248.
- Gibofsky A. Overview of epidemiology, pathophysiology and diagnosis of rheumatoid arthritis. *American Journal of Managed Care*. 2012; 18: 295-302.
- Glei M, Schaeferhenrich A, Claussen U, Kuechler A, Liehr T, Weise A, Marian B, Sendt W, Pool-Zobel BL. Comet fluorescence in situ hybridization analysis for oxidative stress-induced DNA damage in colon cancer relevant genes. *Toxicological Sciences*. 2007; 96: 279- 284.
- Grassi W, De Angelis R, Lamanna G, Cervini C. The clinical features of rheumatoid arthritis. *European Journal of Radiology*. 1998; 27: 18-24
- Goulielmos GN, Zervou MI, Myrthianou E, Burska A, Niewold TB, Ponchel F. Genetic data: The new challenge of personalized medicine, insights for rheumatoid arthritis patients. *Gene*. 2016; 583: 90-101
- Gyori BM, Venkatachalam G, Thiagarajan PS, Hsu D, Clement MV. Open comet: An automated tool for comet assay image analysis. *Redox Biology*. 2014; 2: 457-465.
- 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 Basimevi, Ankara, 2006: 996-1100.
- Hernandez FA. To What extent does ozone therapy need a real biochemical control system? Assessment and importance of oxidative stress. *Archives of Medical Research*. 2007; 38: 571-578.
- Hitchon CA, El-Gabalawy HS. Oxidation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Research and Therapy*. 2004; 6: 265-278.
- Holoshitz J. The rheumatoid arthritis HLA-DRB1 shared epitope. *Current Opinion in Rheumatology*. 2010; 22/3: 293-298.
- Hovhannisyan GG. Fluorescence in situ hybridization in combination with the comet assay and micronucleus test in genetic toxicology. *Molecular Cytogenetics*. 2010; 3/17: 1-11.
- Ikehata H, Ono T. The mechanisms of UV mutagenesis. *J. Radiat. Res*. 2011; 52: 115-125.
- Jackson SP, Bartek J. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*. 2009; 461/ 2: 1071-1078.
- Jackson AL, Loeb LA. The contribution of endogenous sources of DNA damage to the multiple mutations in cancer. *Mutation Research*. 2001; 477: 7-21.
- Jarmalaite S, Mierauskiene J, Beitas K, Ranceva J, Lazutka JR, Butrimiene I. Sister chromatid exchanges and cell proliferative abilities in cultured peripheral blood lymphocytes of patients

- with rheumatoid and reactive arthritis. *Clinical and Experimental Rheumatology*. 2006; 24: 677-682.
- Joosen AMCP, Kuhnle GGC, Aspinall SM, Barrow TM, E Lecommandeur, Azqueta A, Collins AR, Bingham SA. Effect of processed and red meat on endogenous nitrosation and DNA damage. *Carcinogenesis*. 2009; 30/8: 1402-1407.
- Kaçar C, Gilgil E, Tuncer T, Butun B, Urhan S, Arikan V, Dündar Ü, Öksüz MC, Sümbüloğlu G, Yıldırım Ç, Tekeoğlu İ, Yücel G. Prevalence of rheumatoid arthritis in Antalya, Turkey. *Clinical Rheumatology*. 2005; 24/ 3: 212-214.
- Kageyama Y, Nagafusa MTT, Torikai E, ANagano A. Methotrexate reduces the levels of pentosidine and 8 hydroxy-deoxy guanosine in patients with rheumatoid arthritis. *Modern Rheumatology*. 2007; 17: 398-402.
- Kageyama Y, Takahashi M, Ichikawa T, Torikai E, Nagano A. Reduction of oxidative stress marker levels by anti-TNF- α antibody, infliximab, in patients with rheumatoid arthritis. *Clinical and Experimental Rheumatology*. 2008; 26: 73-80.
- Kallberg H, Jacobsen S, Bengtsson C, Pedersen M, Padyukov L, Garred P, Frisch M, Karlson EW, Klareskog L, Alfredsson L. Alcohol consumption is associated with decreased risk of rheumatoid arthritis: Results from two Scandinavian case-control studies. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2009; 68: 222-227.
- Karlson EW, van Schaardenburg D, van der Helm-van Mil AH. RA: From risk factors and pathogenesis to prevention. Strategies to predict rheumatoid arthritis development in at-risk populations. *Rheumatology*. 2016; 55: 6-15.
- Kay J, Calabrese L. The role of interleukin-1 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Rheumatology*. 2004; 43/3: 2-9.
- Khurana R, Berney SM. Clinical aspects of rheumatoid arthritis. *Pathophysiology*. 2005; 12: 153-165.
- Knedla A, Neumann E, Ladner UM. Developments in the synovial biology field 2006. *Arthritis Research and Therapy*. 2007; 9/2: 209. DOI: 10.1186/ar2140
- Kundu S, Ghosh P, Datta S, Ghosh A, Chattopadhyay S, Chatterjee M. Oxidative stress as a potential biomarker for determining disease activity in patients with Rheumatoid Arthritis. *Free Radical Research*. 2012; 46/12:1482-1489.
- Kvien TK. Epidemiology and burden of illness of rheumatoid arthritis. *Pharmacoeconomics*. 2004; 22/1: 1-12.
- Kvien TK, Uhlig T, Odega S, Heiberg MH. Epidemiological aspects of rheumatoid arthritis the sex ratio. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2006; 1069: 212- 222.
- Larini A, Bocci V. Effects of ozone on isolated peripheral blood mononuclear cells. *Toxicology in Vitro*. 2005; 19: 55-61.
- Labuschagne CF, Van Helden G, Van der Westhuizen FH, Pretorius PJ, Kotze HF. Ozone concentration dependent autohaemotherapy effects on baboon antioxidant capacity and DNA integrity and repair capacity of lymphocytes. *African Journal of Biotechnology*. 2009; 8/5: 715-720.

- Lee DM, Weinblatt ME. Rheumatoid arthritis. *The Lancet*. 2001; 358/15: 903- 911.
- Lee SH, Chang DK, Goel A, Boland CR, Bugbee W, Boyle DL, Firestein GS. Microsatellite instability and suppressed DNA repair enzyme expression in rheumatoid arthritis. *The Journal of Immunology*. 2003; 170: 2214-2220.
- Li H, Wan A. Apoptosis of rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes: Possible roles of nitric oxide and the thioredoxin 1. mediators of inflammation. 2013, Article ID 953462, 8 pages. DOI: 10.1155/2013/953462
- Lindhal T. Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature*. 1993; 362: 709-715.
- Lorenzo Y, Costa S, Collins AR, Azqueta A. The comet assay, DNA damage, DNA repair and cytotoxicity: Hedgehogs are not always dead. *Mutagenesis*. 2013; 28/ 4: 427-432.
- Lovell DP, Omori T. Statistical issues in the use of the comet assay. *Mutagenesis*. 2008; 23: 171-182.
- Luis JD, Cepero SM, Abraham MC. Ozone therapy immunomodulatory effect in the selective immunoglobulin a deficiency. *Journal of Ozone Therapy*. 2015; 1/1: 5-9.
- Martelli-Palomino G, Paoliello-Paschoalato AB, Crispim JC, Rassi DM, Oliveira RD, Louzada P, Lucisano-Valim YM, Donadi EA. DNA damage increase in peripheral neutrophils from patients with rheumatoid arthritis is associated with the disease activity and the presence of shared epitope. *Clinical and Experimental Rheumatology*. 2016. PMID: 27908303 [Abstract].
- Mateen S, Zafar A, Moin S, Khan AQ, Zubair S. Understanding the role of cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2016a; 455: 161-171.
- Mateen S, Moin S, Khan AQ, Zafar A, Fatima N Increased Reactive Oxygen Species Formation and Oxidative Stress in Rheumatoid Arthritis. *Public Library of Science one*. 2016b. DOI: 10.1371/journal.pone.0152925
- Matos J, West SC. Holliday junction resolution: Regulation in space and time. *DNA Repair*. 2014; 19: 176-181.
- Mazouzi A, Velimezi G, Loizou J. DNA replication stress: Causes, resolution and disease. *Experimental Cell Research*. 2014; 329: 85-93.
- Mouw KW, D'Andrea AD. Crosstalk between the nucleotide excision repair and Fanconianemia/BRCA pathways. *DNA Repair*. 2014; 19: 130-134.
- Nagashimaa M, Tsuda H, Takenoshita S, Nagamachi Y, Hirohashi S, Yokota J, Kasaid H. 8-Hydroxydeoxyguanosine levels in DNA of human breastcancers are not significantly different from those of non-cancerous breast tissues by the HPLC-ECD method. *Cancer Letters*. 1995; 90: 157-162.
- Nersesyana A, Fenechb M, Bolognesic C, Misika M, Setayesha T, Wultscha G, Bonassid S, Thomasb. P, Knasmüller. Use of the lymphocyte cytokinesis-block micronucleus assay in occupational biomonitoring of genome damage caused by in vivo exposure to chemical genotoxins: Past, present and future. *Mutation Research*. 2016; 770: 1-11.

- Noll DM, Mason TMG, Miller PS. Formation and repair of interstrand cross-links in DNA. *Chemical Reviews*. 2006; 106: 2. 277-301.
- Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF, Boerkoel CF. 2005. Thompson & Thompson genetics in medicine. *Tıbbi genetik*, 6. baskı, Ayter Ş, Emre S, Öncü Basımevi, 2005: 4-83.
- Ohnishi S, Ma N, Thanan R, Pinlaor S, Hammam O, Murata M, Kawanishi S. DNA Damage in inflammation-related carcinogenesis and cancer stem cells. *Corporation Oxidative Medicine and Cellular Longevity [Electronic Journal]*. 2013; DOI: 10.1155/2013/387014
- Ohshima H, Bartsch H, Chronic infections and inflammatory processes as cancer risk factors: Possible role of nitric oxide in carcinogenesis. *Mutation Research*. 1994; 305:253-64.
- Panayi GS. B cells: A fundamental role in the pathogenesis of rheumatoid arthritis? *Rheumatology* 2005; 44/ 2: 3-7. DOI: 10.1093/rheumatology/keh616
- Pacini S, Giovannelli L, Gulisano M, Peruzzi B, Polli G, Boddi V, Ruggiero M, Bozzo C, Stomeo F, Fenu G, Pezzatini S, Pitozzi V, Dolara P. Association between atmospheric ozone levels and damage to human nasal mucosa in Florence, Italy. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 2003; 42: 127-135.
- Palli D, Sera F, Giovannelli L, Masala G, Grechi D, Bendinelli B, Caini S, Dolara P, Saieva C. Environmental ozone exposure and oxidative DNA damage in adult residents of Florence, Italy. *Environmental Pollution*. 2009; 157: 1521-1525.
- Plenge RM, Padyukov L, Remmers EF, Purcell S, Lee AT, Karlson EW, Wolfe F, Kastner DL, Alfredsson L, Altshuler D, Gregersen PK, Klareskog L, Rioux JD. Replication of putative candidate-gene associations with rheumatoid arthritis in >4,000 samples from North America and Sweden: Association of susceptibility with PTPN22, CTLA4, and PADI4. *The American Journal of Human Genetics*. 2005; 77: 1044-1060.
- Poulsen HE, Prieme H, Loft S. Role of oxidative DNA damage in cancer initiation and promoting. *European Journal of Cancer Prevention*. 1998; 7: 9-16.
- Pryor W, Squadrito G, Friedman M. The cascade mechanism to explain ozone toxicity: The role of lipid ozonation products. *Free Radical Biology and Medicine*. 1995; 19/6: 935-941.
- Quinonez-Flores CM, González-Chávez SA, Del Río Nájera D, Pacheco-Tena C. Oxidative stress relevance in the pathogenesis of the rheumatoid arthritis: A systematic review. *Journal of Biomedicine and Biotechnology Research International [Electronic Journal]*. 2016; DOI: 10.1155/2016/6097417
- Raheel S, Crowson CS, Kerry Wright K, Matteson EL. Risk of malignant neoplasm in patients with incident rheumatoid arthritis 1980-2007 in relation to a comparator cohort: A population-based study. *International Journal of Rheumatology [Electronic Journal]*. 2016; DOI: 10.1155/2016/4609486
- Reme T, Travaglio A, Gueydon E, Adla L, Jorgensen C, Sany J. Mutations of the p53 tumour suppressor gene in erosive rheumatoid synovial tissue. *Clinical and Experimental Immunology*. 1998; 111/2: 353-358.

- Reviron D, Perdriger A, Toussirot E, Wendling D, Balandraud N, Guis S, Semana G, Tiberghien P, Mercier P, Roudier J. Influence of shared epitope-negative HLA-DRB1 alleles on genetic susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatology*. 2001; 44: 535-540.
- Rudan Í, Sidhu S, Papan A, Meng SJ, Xin-Wei Y, Wang W, Campbell-Page RM, Demaio AR, Nair H, Sridhar D, Theodoratou E, Ben Dowman B, Adeloje D, Majeed A, Car J, Campbell H, Wang W, Chan KY, Global Health Epidemiology Reference Group (GHERG). Prevalence of rheumatoid arthritis in low-and middle-income countries: A systematic review and analysis. *Journal of Global Health*. 2015; 5/ 1: 1-10. DOI: 10.7189/jogh.05.010409
- Sagai M, Bocci V. Mechanisms of action involved in ozone therapy: Is healing induced via a mild oxidative stress? *Medical Gas Research*. 2011; 1:29. DOI: 10.1186/2045-9912-1-29
- 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.
- Schwartz A, Martínez-Sánchez G. Ozono therapy and its scientific foundations. *Revista Espanola de Ozonoterapia*. 2012; 2/1: 199-232.
- Seven A, Güzel S, Aslan M, Hamuryudan V. Lipid, protein, DNA oxidation and antioxidant status in rheumatoid arthritis. *Clinical Biochemistry*. 2008; 41: 538-543.
- Silman AJ, Pearson JE. Epidemiology and genetics of rheumatoid arthritis. *Arthritis Research*. 2002; 4/ 3: 265-272.
- Simon TA, Thompson A, Gandhi KK, Hochberg MC, Suissa S. Incidence of malignancy in adult patients with rheumatoid arthritis: A meta-analysis. *Arthritis Research and Therapy*. 2015; 17: 212. DOI: 10.1186/s13075-015-0728-9
- Simonetti V, Dr. William Liboni W, Molinari F. Why ozone therapy in multiple sclerosis? *Revista Española de Ozonoterapia*. 2014; 4: 51-68.
- Slyskova J, Lorenzo Y, Karlsen A, Carlsen MH, Novosadova V, Blomhoff R, Vodicka P, Collins AR. Both genetic and dietary factors underlie individual differences in DNA damage levels and DNA repair capacity. *DNA Repair*. 2014; 16: 66-73.
- Speit G. Does the recommended lymphocyte cytokinesis-block micronucleus assay for human biomonitoring actually detect DNA damage induced by occupational and environmental exposure to genotoxic chemicals? *Mutagenesis*. 2013; 28/4: 375-380.
- Schraufsttler I, Hyslop PA, Jackson JH, Cochrane CG. Oxidant-induced DNA damage of target cells. *The Journal of Clinical Investigation*. 1988; 82: 1040-1050.
- Stojic L, Brun R, Jiricny J. Mismatch repair and DNA damage signalling. *DNA Repair*. 2004; 3: 1091-1101.
- Sutherland BM, Bennett PV, Sidorkina O, Laval J. Clustered damages and total lesions induced in DNA by ionizing radiation: Oxidized bases and strand breaks. *Biochemistry*. 2000; 39: 8026-8031.
- Sweeney SE, Firestein GS. Rheumatoid arthritis: Regulation of synovial inflammation. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 2004; 36: 372-378.

- Szabo C, Ohshima H. DNA Damage induced by peroxynitrite: Subsequent biological effects. *Nitric Oxide: Biology and Chemistry*. 1997; 1/5: 377-385.
- Tai AWH, Newkirk MM. An autoantibody targeting glycosylated IgG is associated with elevated serum immune complexes in rheumatoid arthritis (RA). *Clinical and Experimental Immunology*. 2000; 120: 188-193.
- Tak PP, Zvaifler NJ, Green DR, Firestein GS. Rheumatoid arthritis and p53: How oxidative stress might alter the course of inflammatory diseases. *Immunology Today*. 2000; 21: 78-82.
- T.C. Resmi Gazete, geleneksel ve tamamlayıcı tıp uygulamaları yönetmeliği, 27 Ekim 2014, Sayı: 29158.
- The MHC sequencing consortium. Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex. *Nature*. 1999; 401/67567: 921-923.
- Tobon GJ, Youinou P, Alain Saraux A. The environment, geo-epidemiology, and autoimmune disease: Rheumatoid arthritis. *Autoimmunity Reviews*. 2010; 9: 288-292.
- Top C, Terekeci H. Romatoid artrit tedavisinde hastalığı modifiye eden anti-romatizmal ilaçlar. *Turkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*. 2008; 28: 387-398.
- Travagli V, Zanardi L, Silviotti A, Bocci V. A physicochemical investigation on the effects of ozone on blood. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2007; 41: 504-511.
- Uhlig T, Kvien TK, Jensen JL, Axéll T. Sicca symptoms, saliva and tear production and disease variables in 636 patients with rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 1999; 58: 415-422.
- Valencia LG, García A, Ramírez-Pinilla MP, Fuentes JL. Estimates of DNA damage by the comet assay in the direct-developing frog *eleutherodactylus johnstonei* (Anura, Eleutherodactylidae). *Genetics and Molecular Biology*. 2011; 34/4: 681-688.
- Valverde M, Lopez MC, Lopez I, Sanchez I, Fortoul TI, Ostrosky-Wegman P, Rojas E. DNA damage in leukocytes and buccal and nasal epithelial cells of individuals exposed to air pollution in Mexico City. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 1997; 30: 147-152.
- Valverde M, Rojas E. Environmental and occupational biomonitoring using the comet assay. *Mutation Research*. 2009; 681: 93-109.
- Van den Berg WB. Joint Inflammation and cartilage destruction may occur uncoupled. *Springer Seminars in Immunopathology*. 1998; 20: 149-164.
- Van der Woude D, Lie BA, Lundström E, Balsa A, Feitsma AL, Houwing-Duistermaat JJ, Verduijn W, Nordang GBN, Alfredsson L, Klareskog L, Pascual-Salcedo D, Gonzalez-Gay MA, Lopez-Nevot MA, Valero F, Roep BO, Huizinga TWJ, Kvien TK, Martín J, Padyukov L, Vries RRP, Toes REM. Protection against anti-citrullinated protein antibody-positive rheumatoid arthritis is predominantly associated with HLA-DRB1*1301. *Arthritis and Rheumatology*. 2010; 62: 1236-1245.
- Viatte S, Plant D, Bowes J, Lunt M, Eyre S, Barton A, Worthington J. Genetic markers of rheumatoid arthritis susceptibility in anti-citrullinated peptide antibody negative patients. *Annals of the Rheumatic Diseases* 2012; 71: 1984-1990.

- Viatte S, Plant D and Raychaudhuri S. Genetics and epigenetics of rheumatoid arthritis. *Nature Reviews Rheumatology*. 2013; 9: 141-153.
- Weyand CW. New insights into the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Rheumatology*.2000; 39/1: 3-8.
- Yokuş B, Çakır DÜ. invivo oksidatif DNA hasarı biyomarkeri; 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi*. 2002; 535-543.
- Young A, Jaraquemada D, Awad J, Festenstein H, Corbett M, Hay FC, Koitt IV. Association of HLA-DR4/DW4 and DR2/DW2 with radiologic changes in a prospective study of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatism*. 1984; 27/1: 20-25.



8. EKLER

8.1. Etik Kurul Kararı



T.C.
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
Klinik Araştırmalar Etik Kurul Başkanlığı

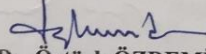
Sayı : KLİ.ARŞ.ETİK.KURUL.BŞK./050.99-192
Konu : Başvuru İncelemesi

07/08/2015

Sayın Prof. Dr. Mustafa EDREMİTLİOĞLU

Yürütücülüğünü yapmış olduğunuz “Romatoid Artritli Hastalardan Elde Edilen Kan Örneklerine Ozon Uygulamasının DNA Hasarına Etkisi” başlıklı 2011-KAEK-27/2015-116 nolu projeniz ile ilgili olarak Klinik Araştırmalar Etik Kurulunun almış olduğu 05/08/2015 tarih ve 13-24 nolu kararı aşağıdadır.

Bilgilerinize rica ederim.


Prof. Dr. Öztürk ÖZDEMİR
Klinik Araştırmalar
Etik Kurul Başkanı

Karar Tarihi :05.08.2015 14:30

Karar No :2015-13

Karar-24) EK-2015-116 no’lu araştırma ile ilgili olarak, proje araştırmacılarından Yük. Lis. Öğr. Pınar YÜKSEL’in sunumunun dinlenmesinin ve raportörün hazırladığı değerlendirilmenin okunması sonrasında yapılan oylamada “**ETİK KURUL ONAYINI ALIR.**” kararı verilmiştir. (Doç. Dr. Dilek ÜLKER ÇAKIR, Doç. Dr. Coşkun BAKAR ve Prof. Dr. Mustafa EDREMİTLİOĞLU projede yer aldıklarından dolayı bu araştırma önerisi için oy kullanmamışlardır.)

8.2. Gönüllü Bilgilendirme/ Onam Formu



ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ					
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU					
GÖNÜLLÜ BİLGİLENDİRME FORMU					
Doküman:	Form-11	Revizyon No:	02	Revizyon Tarihi:	23 / 01 / 2012

1. Çalışmanın adı:

Romatoid artritli hastalardan elde edilen kan örneklerine ozon uygulanmasının DNA hasarına etkisi

2. Araştırmacıların adları, kurumları ve iletişim numaraları.

Mustafa EDREMİTLİOĞLU 0 (286) 218 0018/ 1997

Coşkun ZATERİ 0 (286) 218 0018/ 2418

Pınar YÜKSEL 0 (286) 217 12 33- pemiuyksel@yahoo.com

3. Araştırmanın amacı ve kısa özeti:

Romatizma gibi uzun süren hastalıklarda hücrelerdeki genetik yapı bozulabilmektedir. Bu bozulma ilave hastalıklara neden olabildiği gibi romatizmanın ağırlaşmasına da yol açabilmektedir. Romatizma ağrılı bir hastalık olduğu için ilaç tedavisi yanında bazı hastalara ozon dediğimiz ve oksijene benzeyen bir gaz tedavisi uygulanmaktadır. Ozonun etki mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Ama ozonun hücrelerdeki genetik yapıda bozulma yaptığı bilinmektedir. Bu çalışmada romatizmalı hastalardan alınan kan içine ozon verilmesinin kan hücrelerindeki genetik yapıyı bozup bozmadığı araştırılacaktır.

4. Bu araştırma için neden siz seçildiniz?

Çalışmaya, romatoid artrit tanısı (romatizma) almış hasta gönüllü katılımcılar ile herhangi bir bağışıklık sistemi ve iltihablı hastalığı olmayan, yaş ve cinsiyet bakımından ise romatoid artrit tanısı almış hasta gönüllülerle eşleştirilmiş sağlıklı gönüllü katılımcı alınacaktır. Siz bu belirtilen özelliklerden birine sahip olduğunuz için bu araştırmaya seçildiniz. Bu çalışma 60 katılımcıyla gerçekleştirilecektir. Dolayısıyla sizin dışınızda 59 katılımcı daha çalışmada yer almaktadır.

5. Araştırmaya katılmak / bir kez katıldıktan sonra sonuna kadar devam etmek zorunda mıyım?

Bu araştırmaya katılım tamamen gönüllülük temeline dayanmaktadır. Bir başka deyiş ile araştırmaya katılıp/katılmama tercihiniz tamamen hür iradenize bağlıdır. Araştırmaya katılmamak tamamen sizin kararınızdır. Araştırmaya katılmamak/katılmak istememek sizin herhangi bir şekilde cezalandırılmanıza, yaptırım uygulanmasına yol açmayacaktır. Çalışmaya katılmamak sizin için herhangi bir şekilde dezavantaja dönüşmeyecektir. Bir başka deyiş ile çalışmaya katılmamak size herhangi bir şey kaybettirmeyecektir. Hastalığınızın takibi, tetkiklerinizin yapılması ve değerlendirilmesi, tedaviye yönelik girişimlerin uygulanması gibi herhangi bir aşamada size herhangi bir olumsuz yaklaşıma, kötü muameleye yol açmayacaktır. Araştırmaya katılmak istediğinizde katılımınız sağlandıktan sonra araştırma tamamlanmadan, araştırmanın herhangi bir evresinde ayrılmak isteyebilirsiniz. Bu tamamen sizin hür kararınızdır. Bundan dolayı hiçbir şekilde suçlanamayacağınız gibi herhangi bir şekilde olumsuz yaklaşım, muamele ile karşılaşmayacaksınız. Sonuç olarak eğer araştırmaya katılır ancak devam etmek istemez iseniz istediğiniz zaman araştırmadan çekilebilirsiniz. Araştırmadan ayrılmak istemeniz durumunda araştırmaya devam etmeniz konusunda hiçbir şekilde baskı ya da zorlama uygulanmayacaktır

6. Katılmayı kabul edersem bana ne yapılacaktır?

Araştırmaya katılmayı kabul etmeniz halinde sizden sadece 20 ml koldan kan örneği alınacaktır. Bunun dışında başka her hangi bir şey yapılmayacak ya da yapmanız istenmeyecektir.

7. Araştırmaya katılmak size bir zarar verecek mi? Sizin için olumsuz yönleri/riskleri olacak mı?

Bu araştırmaya katılmak size hiçbir şekilde zarar vermeyecek, olumsuz bir şekilde etkilemeyecektir. Araştırma sırasında yapılacak işlemlerin size hiçbir şekilde zararı yoktur. Herhangi bir risk içermemektedir.

8. Araştırmaya katılmanın size olası yararları nelerdir? Araştırmaya katılmak size bir fayda/üstünlük sağlayacak mı?

Bu araştırmaya katılmanın size doğrudan her hangi bir yararı olmayacak; çalışmaya katılmış olmanız size fayda veya üstünlük sağlamayacaktır.

9. Araştırma için masrafım olacak mı? Araştırmanın benim için maddi bedeli var mı?

Araştırma kapsamında, araştırmanın herhangi bir evresinde sizden hiçbir şekilde ücret talep edilmeyecektir. Bu araştırmaya katılmanız nedeni ile sizden para ya da maddi değeri/içeriği olan herhangi bir şey talep edilmeyecektir.

10. Kimlik bilgilerim ve elde edilen verilerin gizliliği nasıl sağlanacak?

Araştırma dahilinde kimlik bilgileriniz, sizden elde edilen veriler gizli tutulacak, yukarıda açık şekilde kimlik bilgileri belirtilmiş araştırmacıların dışındaki kişilerin bu bilgilere/verilere ulaşması engellenecektir. Sizden elde edilen araştırma verileri ve sonuçları, kimlik bilgileriniz gizlenmek sureti ile başka araştırmalarda kullanılabilir.

11. Araştırma sonunda bana bilgi verilecek mi?

Araştırma sonunda talep etmeniz durumunda araştırmanın genel sonuçları hakkında ve sizden elde edilmiş verilerin sonuçları hakkında bilgilendirileceksiniz. Eğer araştırma bilimsel bir dergide yayınlanır ise talep etmeniz durumunda söz konusu derginin bir kopyası tarafınıza verilecektir.

12. Araştırma sonuçlarına ne olacak?

Araştırma sonuçlarının uluslararası/ulusal bir dergide yayınlanması mümkün olabilir. Yayınlanma aşamasında da kimlik bilgileriniz gizli tutulacaktır. Daha önce de bahsedildiği gibi araştırmadan elde edilen veriler başka bir araştırma için kullanılabilir.

13. Daha ayrıntılı bilgi için,

Aklınıza takılanlar, merak ettiğiniz noktalar için yukarıda açık ad ve adresleri yazılı olan araştırmacılara telefon, e-mail ya da doğrudan görüşme yöntemlerinden herhangi birisini kullanarak ulaşabilirsiniz

14. Teşekkür:

Araştırmamıza katıldığınız için teşekkür ederiz.

BU BİLGİLENDİRME FORMU SİZDE KALACAKTIR. ARAŞTIRMAYA KATILMAK İSTERSENİZ AŞAĞIDA YER ALAN ONAM FORMUNU İMZALAMANIZ GEREKMEKTEDİR.

ONAM FORMU (D²)

Araştırmanın Adı: Romatoid artritli hastalardan elde edilen kan örneklerine ozon uygulanmasının DNA hasarına etkisi

	Evet	Hayır
Hasta Bilgilendirme Formunu okudunuz mu?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Araştırma projesi size sözlü olarak da anlatıldı mı?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Size araştırmayla ilgili soru sorma, tartışma fırsatı tanındı mı?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Sorduğunuz tüm sorulara tatmin edici yanıtlar alabildiniz mi?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Araştırma hakkında yeterli bilgi aldınız mı?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Herhangi bir zamanda herhangi bir nedenle ya da neden göstermeksizin araştırmadan çekilme hakkına sahip olduğunuzu anladınız mı?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Araştırma sonuçlarının uygun bir yolla yayımlanacağına katılıyormusunuz?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Yukarıdaki soruların yanıtları size kim tarafından açıklandı? <i>Lütfen ismini yazınız.</i>		

İmza:

Adı / Soyadı:

Tarih:

8.3. Gönüllü Veri Formu

ROMATOİD ARTRİTLİ HASTALARDAN ELDE EDİLEN KAN ÖRNEKLERİNE OZON UYGULANMASININ DNA HASARINA ETKİSİ

Hasta No:

Tarih:

Hasta adı soyadı:

Tel:

Grubu:

Kontrol

Hasta

1-Kişisel Bilgiler:

Cinsiyet:		Alkol	
Yaş:		Gebelik durumu şuan	
Doğum Tarihi:		Sigara	
Meslek:		Egzersiz alışkanlığı	

2:İlk muayene

Boy:	Kilo:	VKI:
------	-------	------

3- Hastalık öyküsü:

Şikayetlerin ilk başladığı tarih:	
İlk tanı tarihi:	

4- Mevcut sistemik hastalıklar:

5-Eklem muayenesi: 28 eklem (R/L omuz, R/L dirsek, R/L el bileği, R/L 1.-5.MKF, R/L 1.-5. PİF, R/L diz)
Diğer eklemler (R/L TME, R/L SK, R/L ayak bileği, R/L 1.-5. MTF, R/L 1.5. ayak PİF)

Ağrılı eklem sayısı:		ESR:	
Şiş eklem sayısı:		CRP:	
Hasta global değerlendirmesi		DAS-28:	

Son durum değerlendirilmesi: Linkler kullanılabilir

WBC	
HGB	
HCT	
MPV	

Kullanmakta olduğu tedavi:

Kortikosteroidler	DMARD'lar	Anti-TNF'ler
Prednol	Methotrexate	Remicade
Deltacortil	Salazopyrin	Remsima
	Plaquenil	Enbrel
	Arava	Humira
		Simponi
		Cimzia

Diğer

1- Mabthera

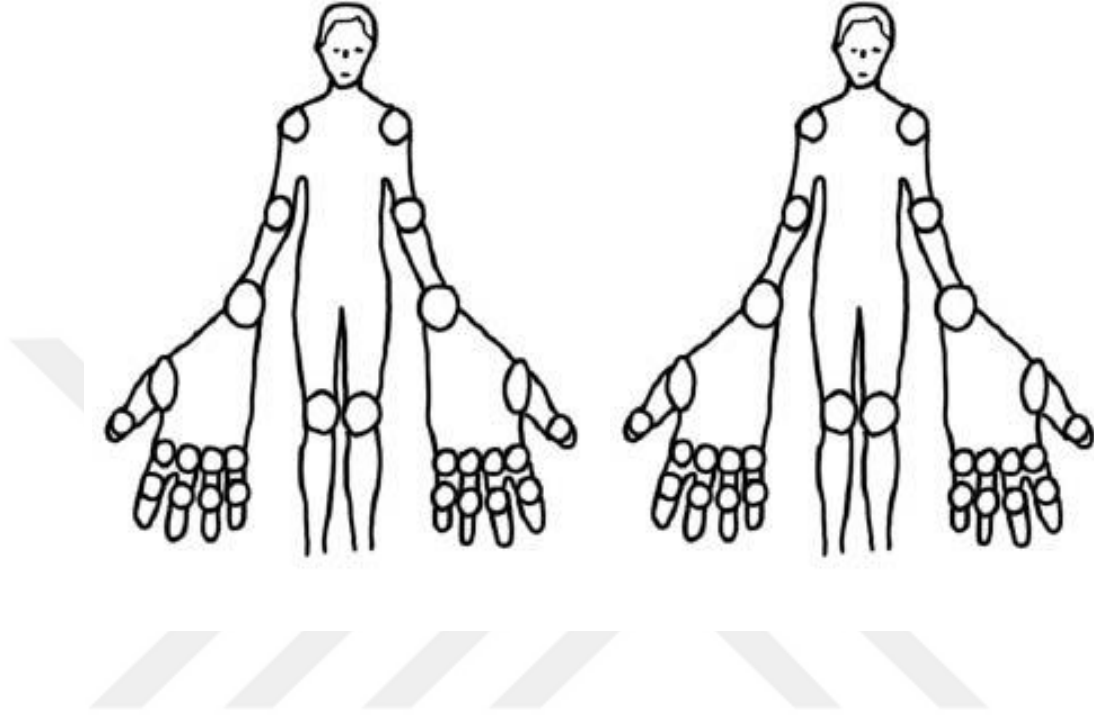
2- Orencia

3- Actemra

4- Tofacitinib

Şiş Eklemler

Hassas Eklemler



8.4. Özgeçmiş

Kişisel Bilgiler

Adı	Pınar	Soyadı	YÜKSEL
Doğum Yeri	Ankara	Doğum Tarihi	31.01.1981
Uyruğu	T. C.	TC Kimlik No	23164575160
E-mail	pemiyuksel@yahoo.com	Tel	05054024926

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora/Uzmanlık		
Yüksek Lisans		
Lisans	İ. Ü. Cerrahpaşa Tıp. Fak. Tıbbi Biyolojik Bilimler	2003

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1. Gümrük Muhafaza Memuru	Gümrük ve Ticaret Bakanlığı	2006-2016
2.		-

Yabancı Dil Sınav Notu[#]

KPDS	ÜD S	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:

D-Ödüller:



8.5. Spiralli Tez Kontrol Formu

	Evet	Hayır
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 sonunda Erişim adresi ve Erişim tarihi sırasıyla verilmelidir.	✓	
12) Çalışmanın Etik Kurul onayı, varsa kurum onayı tezin en arkasına konmalıdır.	✓	
Tarih: 16/01/2017 Öğrenci Pınar YÜKSEL İmza	Tarih: 16/01/2017 Danışmanın Prof. Dr. Mustafa EDREMITLİOĞLU İmza	

8.6. Kontrol Listesi

ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ SİRALLI/CİTLİ 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 checked="" 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: 16/01/2017 Öğrenci Pınar YÜKSEL İmza	Tarih: 16 /01/ 2017 Danışmanın Prof. Dr. Mustafa EDREMITLİOĞLU İmza	

