



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
KALP VE DAMAR CERRAHİSİ ANABİLİM DALI**

**AKUT EKSTREMİTE İSKEMİSİNE MARUZ BIRAKILAN
RATLARDA (SIÇANLARDA) OZON TEDAVİSİNİN EKSTREMİTE
ÜZERİNE ETKİSİ**

UZMANLIK TEZİ

DR. KAAAN ALTUNYUVA

TEZ DANIŞMANI:

PROF. DR. EMİN TİRELİ

İSTANBUL-2018

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
KALP VE DAMAR CERRAHİSİ ANABİLİM DALI**

**AKUT EKSTREMİTE İSKEMİSİNE MARUZ BIRAKILAN
RATLARDA (SIÇANLARDA) OZON TEDAVİSİNİN EKSTREMİTE
ÜZERİNE ETKİSİ**

UZMANLIK TEZİ

DR. KAAAN ALTUNYUVA

TEZ DANIŞMANI:

PROF. DR. EMİN TİRELİ

İSTANBUL-2018

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir.

(BAP Proje ID: 31664)

I. TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerini benden esirgemeyen değerli hocalarım Prof. Dr. Ufuk Alpagut, Prof. Dr. Onur Göksel, Prof. Dr. Türkan Tansel, Prof. Dr. Murat Başaran, Prof. Dr. Nilgün Bozbuğa ve Prof. Dr. İhsan Bakır'a

Tez çalışmamın hazırlık aşamasında bana desteğini esirgemeyen, bilgi ve tecrübesi ile mesleki gelişimime katkıda bulunan, tez danışmanım ve değerli hocam Prof. Dr. Emin Tireli'ye,

Eğitimim süresince bilgi ve tecrübeleri ile bana yön veren, cerrahi gelişimimde inkar edilemez katkıları olan değerli abim Doç. Dr. Ömer Ali Sayın 'a

Tezimin laboratuvar çalışma aşamalarındaki yardımlarından dolayı Biyokimya Anabilim Dalından Doç. Dr. Canan Küçükgergin ve Prof. Dr. Semra Abbasoğlu 'na

Asistanlığın her anını paylaştığım ve 5 sene boyunca birlikte geliştığım, gelişirken de bir şeyler öğrendiğim değerli Kalp Damar Cerrahisi Asistan grubuna,

Desteğini hiç bir zaman benden esirgemeyen anneme ve kardeşlerime, bu mesleği sevmemi sağlayan ve her anlamda örnek bir hekim olmayı bana öğreten babam Dr. Bora Altunyuva 'ya ve bana İstanbul Tıp Fakültesi'nin en büyük armağanı olan değerli eşim, yol arkadaşım, herşeyim Dr. Anna Abbasgholizadeh'e sonsuz teşekkürü bir borç bilirim...

Dr. Kaan Altunyuva
İstanbul 2018

II. İÇİNDEKİLER

I. TEŞEKKÜR	I
II. İÇİNDEKİLER	II
III. TABLOLAR LİSTESİ.....	III
IV. ŞEKİLLER LİSTESİ.....	IV
V. SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ.....	VI
1. ÖZET	1
2. ABSTRACT.....	3
3. GİRİŞ VE AMAÇ.....	5
4. GENEL BİLGİLER	7
5. GEREÇ VE YÖNTEM.....	41
6. BULGULAR.....	56
7. TARTIŞMA	65
8. SONUÇ.....	73
9. KAYNAKLAR	74
10. EKLER.....	83
11.ÖZGEÇMİŞ.....	85

III. TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1. Radikal ve radikal olmayan bileşikler

Tablo 2. Organizmada antioksidan sistem elemanları

Tablo 3. O₃'ün genel olarak kullanım alanları

Tablo 4. İskemi oluşturulan sıçanlarda ozon uygulamasının serumda reaktif oksijen türleri (ROS), malondialdehit (MDA), proteinlerin ileri oksidasyon ürünleri (AOPP)ve antioksidan aktivite (FRAP) düzeyleri üzerine etkisi

Tablo 5. İskemi oluşturulan sıçanlarda ozon uygulamasının serumda serumda superoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) aktiviteleri üzerine etkisi

Tablo 6. İskemi oluşturulan sıçanlarda ozon uygulamasının serumda serumda Tümör nekroz faktör (TNF α) ve Nükleer faktör eritroid 2 ile ilişkili faktör 2 (NRF2) değerleri üzerine etkisi

Tablo 7. İskemi oluşturulan sıçanlarda ozon uygulamasının kas dokusunda reaktif oksijen türleri (ROS), malondialdehit (MDA), proteinlerin ileri oksidasyon ürünleri (AOPP) düzeyleri üzerine etkisi

Tablo 8. İskemi oluşturulan sıçanlarda ozon uygulamasının kas dokusunda glutatyon (GSH) ve antioksidan aktivite (FRAP) değerleri üzerine etkisi

Tablo 9. İskemi oluşturulan sıçanlarda ozon uygulamasının kas dokusunda superoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) aktiviteleri üzerine etkisi

Tablo 10. İskemi oluşturulan sıçanlarda ozon uygulamasının dokuda Tümör nekroz faktör (TNF α) ve Nükleer faktör eritroid 2 ile ilişkili faktör 2 (NRF2) değerleri üzerine etkisi

IV. ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Hücre hasarındaki başlıca biyokimyasal mekanizmalar ve hasar yerleri

Şekil 2. Ksantin-hipoksantin metabolizması ve serbest oksijen radikal oluşum şeması

Şekil 3. Hücre zedelenmesinde Ca^{+2} 'un rolü ve hücre zedelenmesi

Şekil 4. Serbest radikallerin, hücre yapısını bozarak hastalık oluşumundaki rolü

Şekil 5. İskemi-reperfüzyon hasarında lökosit-endotel etkileşimi

Şekil 6. Ozon(O_3) kimyasal formülü

Şekil 7. UV etkisiyle ozon oluşumu

Şekil 8. Ozon jeneratörü yapısı

Şekil 9. Ozon Tedavisinin Etkileri.

Şekil 10. Sıçanların hassas tartıda tartılması

Şekil 11. Sıçanlarda intraperitoneal enjeksiyon uygulaması

Şekil 12. Anestezi sonrası laparotomi insizyonu için hazırlanan sıçan

Şekil 13. İnfrarenal abdominal aortanın diseksiyonu ve ipek suturele dönülmesi

Şekil 14. İnfrarenal abdominal aortanın atravmatik olarak klempe edilmesi

Şekil 15. Laparotomi insizyonunun kapatılması

Şekil 16. Biyokimyasal inceleme için uygun kas örneklerinin alınması

Şekil 17. Kas dokusunda her üç grupta ROS düzeyinde izlenen değişiklikler

Şekil 18. Kas dokusunda her üç grupta MDA düzeyinde izlenen değişiklikler

Şekil 19. Kas dokusunda her üç grupta GSH düzeyinde izlenen değişiklikler

Şekil 20. Kas dokusunda her üç grupta FRAP düzeyinde izlenen değişiklikler

Şekil 21. Kas dokusunda her üç grupta SOD düzeyinde izlenen değişiklikler

Şekil 22. Kas dokusunda her üç grupta GPx düzeyinde izlenen değişiklikler

Şekil 23. Kas dokusunda her üç grupta TNF-a düzeyinde izlenen değişiklikler

Şekil 24. Kas dokusunda her üç grupta NRF2 düzeyinde izlenen değişiklikler

V. SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

ACE:	Anjiotensin dönüştürücü enzim
AOPP:	Proteinlerin İleri Oksidasyon Ürünleri
ARE:	Antioksidan tepki elemanı
CO:	Karbonmonoksit
C5a:	Kompleman faktör 5a
DNA:	Deoksiribonükleik asit
ET-1:	Endotelin-1
FRAP:	Antioksidan kapasite
G6PDH:	Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz
GSH:	Glutasyon
GSH-R:	Glutasyon redüktaz
GSH-Px:	Glutasyon peroksidaz
H2O2 :	Hidrojen Peroksit Radikali
HOCL :	Hipoklorik Asit
HT:	Otohemoterapi
ICAM-1:	İntersellüler adezyon molekülü-1
IL:	İnterlökin
I/R :	İskemi – Reperfüzyon
İRH :	İskemi Reperfüzyon Hasarı
KAT:	Katalaz
LDH :	Laktat dehidrogenaz
LOO- :	Lipid peroksit radikali
LOOH :	Lipid hidroperoksit
LOP:	Lipid oksidasyon ürünleri
MDA :	Malondialdehit
MCP:	Monosit kemoatraktan protein
NRF2 :	Nükleer faktör eritroid 2 ilişkili faktör 2
NADPH :	Nikotinamid Adenin dinükleotid fosfat
OH- :	Hidroksil Radikali
O2 :	Oksijen molekülü
O2- :	Süperoksit Radikali
O3 :	Ozon
OHT :	Otohemoterapi
PAF :	Trombosit Aktive Edici Faktör
PECAM:	Trombosit ve Endotel Adhezyon Molekülü
PMNL:	Polimorfonükleer Lökosit
PG :	Prostaglandin

PGI:	Prostoglandin I
PSGL-1:	P-selektin glikoprotein ligand-1
ROS:	Reaktif Oksijen Türleri
RNT :	Reaktif Nitrojen Türevleri
SOD:	Superoksit Dismutaz
SOR :	Serbest Oksijen Radikali
SR :	Serbest Radikal
TNF:	Tümör nekrozis faktör
TNF-α :	Tümör Nekroz Faktör Alfa
UV:	Ultraviyole
VCAM-1:	Vasküler hücre adezyon molekülü-1

1. ÖZET

Altunyuva. K. Akut ekstremitte iskemisine bırakılan ratlarda (sıçanlarda) ozon tedavisinin ekstremitte üzerine etkisi. Tıpta Uzmanlık Tezi. İstanbul, 2018.

Amaç: Alt ekstremitte iskemisi akut veya kronik olarak ülkemizde sık olarak karşımıza çıkan, multifaktöriyel olarak prezentasyon gösteren, önemli mortalite ve morbidite sebeplerinden biridir. İskemi sırasında oluşan hipoksi ve revaskülarizasyon sonrası oluşan reperfüzyon hasarı dokularda reversible ve irreversible hasarlar oluşturmaktadırlar.

Kontrollü ozon uygulamasının, iskekiye ve reperfüzyon sırasında oluşacak olan oksidatif strese karşı koruma sağlayacağı, adaptasyonu teşvik edeceği, reaktif oksijen türlerinin neden olduğu hasarı önlediği ve iskekiye-reperfüzyon (I / R) hasarına karşı koruyucu olabileceği gösterilmiştir. Bu çalışmada, alt ekstremitte iskemisine maruz bırakılan ratlarda ozon tedavisinin ekstremitte üzerine olan etkisini araştırmayı planladık.

Gereç ve Yöntem: Bu çalışmada ortalama ağırlıkları 200-400 gr olan 21 adet Wistar Albino cinsi sıçan rastgele 3 gruba ayrıldı. Kontrol grubu(n=5) sıçanlara sadece deri altı kesi yapıldı. İskemi-reperfüzyon (İR) grubu(n=8) sıçanlarda infrarenal abdominal aort 60 dk süreyle klemplenerek iskekiye oluşturuldu, sonra klempler kaldırılarak 120 dk reperfüzyon yapıldı. İskemi-reperfüzyon (İR)+tedavi(n=8) grubu sıçanlara cerrahi işleminden 4 gün önce başlanılarak her gün tek doz intraperitoneal yolla 20 mcg/ml medikal ozon uygulandı. Ozon tedavisi tamamlandıktan sonra sıçanlarda infrarenal abdominal aort 60 dk süreyle klemplenerek iskekiye oluşturuldu, sonra klempler kaldırılarak 120 dk reperfüzyon yapıldı. Reperfüzyon süresi bitince kontrol grubu da dahil olmak üzere tüm sıçanlar sakrifiye edilerek uygun kan örnekleri alındı, gastroknemius kas dokusu biyokimyasal değerlendirme için çıkarılarak uygun koşullarda saklandı.

İncelemeler serum ile kas dokusunda yapıldı ve özellikle prooksidan-antioksidan sistem ve inflamasyon ile ilgili değişimler araştırıldı. Bu çerçevede serum ve dokuda reaktif oksijen radikalleri (ROS), malondialdehit (MDA), proteinlerin ileri oksidasyon ürünleri (AOPP), tümör nekroz faktörü-alfa (TNF- α) ve nükleer faktör eritroid 2 ilişkili faktör 2 (NRF2) düzeyleri; total antioksidan kapasite ile antioksidan enzim aktiviteleri ölçüldü. Ayrıca dokuda glutatyon (GSH) düzeyleri tayin edildi.

Bulgular: Biyokimyasal incelemelerde; serum ROS, MDA, AOPP, GSH ve FRAP, TNF α , NRF2 düzeyleri, antioksidan enzim aktivitelerinde değişim gözlenmedi.

Kas dokusu oksidan sistem üzerinde yapılan incelemelerde; ROS, MDA, AOPP düzeylerinde iskemi-reperfüzyon ile artış saptandı. Medikal ozon uygulamasının kas dokusunda prooksidan durumunu azalttığı saptandı.

Yine kas dokusunda antioksidan sistem üzerinde yapılan incelemelerde GSH ve SOD değerlerinde iskemi ile anlamlı düşüş farkedildi. Ozon (O₃) tedavi uygulaması ile bu değerlerde anlamlı artış saptandı. İ/R hasarının bir sonucu olarak kas dokusunda TNF-a düzeylerinde değişim gözlenmedi, NRF2 ‘da ise anlamlı artış saptandı.

Sonuç: Sonuç olarak, İR grubunda alt ekstremitede iskemi- reperfüzyon hasarı oluştuğunu ve ozon tedavisinin bu hasara karşı koruyucu etkisinin olduğunu söyleyebiliriz.

Anahtar Kelimeler: Antioksidan, İskemi-reperfüzyon, ozon

2. ABSTRACT

Altunyuva.K. The effect of ozone treatment on extremity in rats with acute limb ischemia. Master's thesis in Medicine. İstanbul, 2018.

Objective: Lower extremity ischemia is one of the major causes of mortality and morbidity presenting as a multifactorial presentation which is frequently seen in our country as acute or chronic. The reperfusion injury caused by hypoxia and revascularization during ischemia is reversible and irreversible.

It has been shown that controlled ozone administration will provide protection against the oxidative stress that will occur during ischemia and reperfusion, or stimulate adaptation, prevent damage caused by reactive oxygen species and protect against ischemia-reperfusion (I / R) damage. In this study, we are planning to investigate the effect of ozone therapy on the extremities in rats with lower extremity ischemia.

Materials and Methods: In this study, 21 Wistar Albino rats with an average weight of 200-400 g were randomly divided into 3 groups. Only subcutaneous incision was made to the rats in the control group (n = 5). Ischemia-reperfusion (IR) group (n = 8) was applied to the ischemia by clamping the infrarenal abdominal aorta for 60 min in rats. After the clamps were removed, reperfusion was performed for 120 min. Ischemia-reperfusion (IR) + treatment (n = 8) rats were started 4 days before the surgical procedure and 20 mcg / ml medical ozone was administered intraperitoneally daily. After the ozone treatment was completed, ischemia was induced by clamping the infrarenal abdominal aorta for 60 min in rats. After the clamps were removed, reperfusion was performed for 120 min. After the reperfusion period was over, all rats, including the control group, were sacrificed and appropriate blood samples were taken. Gastrocnemius muscle tissue was removed for biochemical evaluation and stored under appropriate conditions.

The investigations were performed with serum in muscle tissue and especially the changes related to prooxidant-antioxidant system and inflammation were investigated.

In this context, serum ROS, MDA, AOPP, GSH, FRAP, TNF α , NRF2, SOD and GSH-Px levels were determined. In addition, lipid peroxide and protein oxidation

products, antioxidant system elements, tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) and nuclear factor erythroid 2 related factor 2 (NRF2) were determined in the tissues.

Result: In biochemical investigations; no change was observed in serum ROS, MDA, AOPP, GSH and FRAP, TNF α , NRF2 levels, SOD and GSH-Px activities. In the studies on muscle tissue oxidant system; ROS, MDA and AOPP levels were increased with ischemia-reperfusion. A significant decrease was observed in these parameters with medical ozone application.

GSH and SOD levels were significantly decreased in the muscle tissue antioxidant system. Ozone (O₃) treatment showed a significant increase in these values. As a result of I / R injury, no significant changes were observed in TNF-a levels in muscle tissue and a significant increase in NRF2 was observed. No changes were observed in the TNF- α and NRF2 results with the application of ozone.

Conclusion: In conclusion, we can say that in IR group there is ischemia-reperfusion injury in lower extremity and ozone treatment is protective against this injury.

Key Words: Antioxidant, Ischemia-reperfusion, ozone

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Arteriyel kan akımı azalmasına bağlı organ perfüzyonunun bozulmasının sonucu hücrelerin oksijenden yoksun kalması şeklinde tanımlanan iskemi, toksik metabolitlerin birikmesi sonucunda hücre ölümüne neden olur. İskemi doku veya organa yetersiz oksijen akışı sonucunda oluşan hipoksinin en sık görülen sebebidir (1). Reperfüzyon; oksijenin ve kan akımının iskemik dokuya tekrar ulaşmasıdır. Doku düzeyindeki hasar reversible ise hücresel fonksiyonlar geri kazanılabilir. Oksijenin iskemik ortama girmesi, ilerleyen metabolik süreçler sonucunda serbest oksijen radikallerinin oluşmasına neden olacaktır.

İskemi sırasında oluşan hipoksi ve revaskülarizasyon sonrası oluşan reperfüzyon hasarı dokularda reversible ve irreversible hasarlar oluşturmaktadır (2).

İskemi-reperfüzyona maruz kalan dokularda ciddi ve önemli hasarlar meydana gelmektedir. İskemi-reperfüzyon yalnızca iskemik bölge değil aynı zamanda iskemik bölgenin dışında kalan alanlarda da büyük oranda hasar oluşturmaktadır (3). İskemik dokunun reperfüzyonu sırasında, oksijenli kan, kan hücresi sekestrasyonuna neden olur ve oksidanların sayısını ve aktivitelerini artırır. Reperfüzyon, erken iskemik hasarın sitokin salınımı ve hidroksil radikal ($\text{OH}^\cdot$), süperoksit radikali ($\text{O}_2^\cdot$) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi reaktif oksijen türleri (ROS) ve kompleman sisteminin aktivasyonu ile tehlikeli etkilerini artırır. Bu fenomen “iskemi-reperfüzyon (I/R)” hasarı olarak adlandırılmıştır (4, 5).

İskemi/reperfüzyon hasarı kaynaklı doku hasarı alt ekstremitte revaskülarizasyonu, abdominal aort cerrahi gibi prosedürlerden sonra karşılaşılan önemli bir problemdir. İskemik dokunun reperfüze edilmesi mikrovasküler disfonksiyon ve bozulmuş doku bariyer fonksiyonu ile karakterize olan lokal ve sistemik inflamatuvar yanıtı neden olur.

İskelet kası I / R, aterosklerotik tıkaçıcı hastalık, arteriyel tromboz veya arteriyel emboli, organ nakli, kardiyovasküler cerrahi ve vasküler travma gibi vasküler problemlerle ortaya çıkabilir.

Ozon, üç atomlu oksijen (O_3) molekülü olarak tanımlanır. Ozon tedavisi ozon ve oksijen (O_3 / O_2) karışımı olarak uygulanır. Medikal ozon temelde enfekte yaralar, kolit, proktit, dolaşım bozuklukları ve viral hastalıklar için tıpta kullanılır. Kontrollü ozon

uygulamasının iskemiye ve reperfüzyon sırasında oluşacak olan oksidatif strese karşı koruma sağlayacağı veya adaptasyonu teşvik edeceği, reaktif oksijen türlerinin neden olduğu hasarı önlediği ve alt ekstremitte iskemi-reperfüzyon (I/R) hasarına karşı koruyucu olabileceği gösterilmiştir (6).

Tıpta kullanılan medikal ozon tedavisinin en önemli etkisi, antioksidatif yanıtının uyarılması ve mitokondriyal bütünlüğün korunmasıdır. Medikal ozon, son yıllarda farklı hastalıklar için yeni bir tedavi olarak görülmüştür ve iskemi - reperfüzyon (I/R) hasarında oluşan oksidatif stresin azaltılmasında önemli rolleri olduğu düşünülmekte ve araştırılmaktadır. (7, 8, 9).

Bu çalışmada, alt ekstremitte iskemisine bırakılan ratlarda ozon tedavisinin ekstremitte üzerine olan etkisini araştırmayı planlamaktayız. Deneysel araştırma sonrasında serum ve dokularda ortaya çıkan metabolik değişimlerin ne oranda etkilendiği incelendi. İncelemeler serum ile kas dokusunda yapıldı ve özellikle prooksidan-antioksidan sistem ve inflamasyon ile ilgili değişimler araştırıldı. Bu çerçevede serumda ROS, AOPP ve tümör nekroz faktörü-alfa (TNF- α) tayin edildi. Ayrıca dokularda lipit peroksit ve protein oksidasyon ürünleri, antioksidan sistem elemanları ve tümör nekroz faktörü-alfa (TNF- α) belirlendi.

Çalışmanın sonuçlarının olumlu olması durumunda öncül bir preklinik araştırma ortaya çıkacak; günümüzde özellikle revaskularizasyon ve operasyon şansı olmayan akut-kronik iskemi bulguları ile klinik olarak kendini prezente eden periferik arter hastalıklarının tedavisinde hekimlere yol gösterecektir.

4.GENEL BİLGİLER

4.1. Hücre hasarı, nedenleri ve mekanizması

Hücreler uyum sağlayamadıkları her hangi intrinsik veya ekstrinsik strese maruz kaldığında hasara uğrarlar.

Hücre hasarı geri dönüşümlü ve geri dönüşümsüz olarak iki türdür. Geri dönüşümlü hasarda önemli yapısal ve fonksiyonel anormallikler oluşsa da, ağır membran ve çekirdek hasarı gelişmemiştir ve koşullar normale dönerse hücre normal yaşamına dönebilir. Hücre ölümünde ise geri dönüş yoktur ve iki tipi vardır: Nekroz ve apoptoz (10).

Hücre hasarının etkenleri aşağıdaki gibi kategorize edilir:

1) Oksijen eksikliği (Hipoksi). Hücre zedelenmesinin ve ölümün önemli ve sık görülen nedenlerindendir. İskemi en sık görülen şeklidir ve dokuya gelen arteriyel kanın kesintiye uğraması veya venöz dönüşün azalması anlamına gelir.

2) Kimyasal etkenler. Hava kirliliğine yol açan maddeler, böcek ilaçları, CO, asbest, etil alkol, tedavi amacıyla kullanılan ilaçlar

3) Enfeksiyon etkenleri; Bakteriler, mantarlar, virüsler

4) Bağışıklık reaksiyonları; Otoimmün ve alerjik reaksiyonlar

5) Genetik faktörler; Konjenital malfarmasyonlar'dan küçük genlerdeki mikrolelesyonlara kadar tüm genetik mutasyonlar

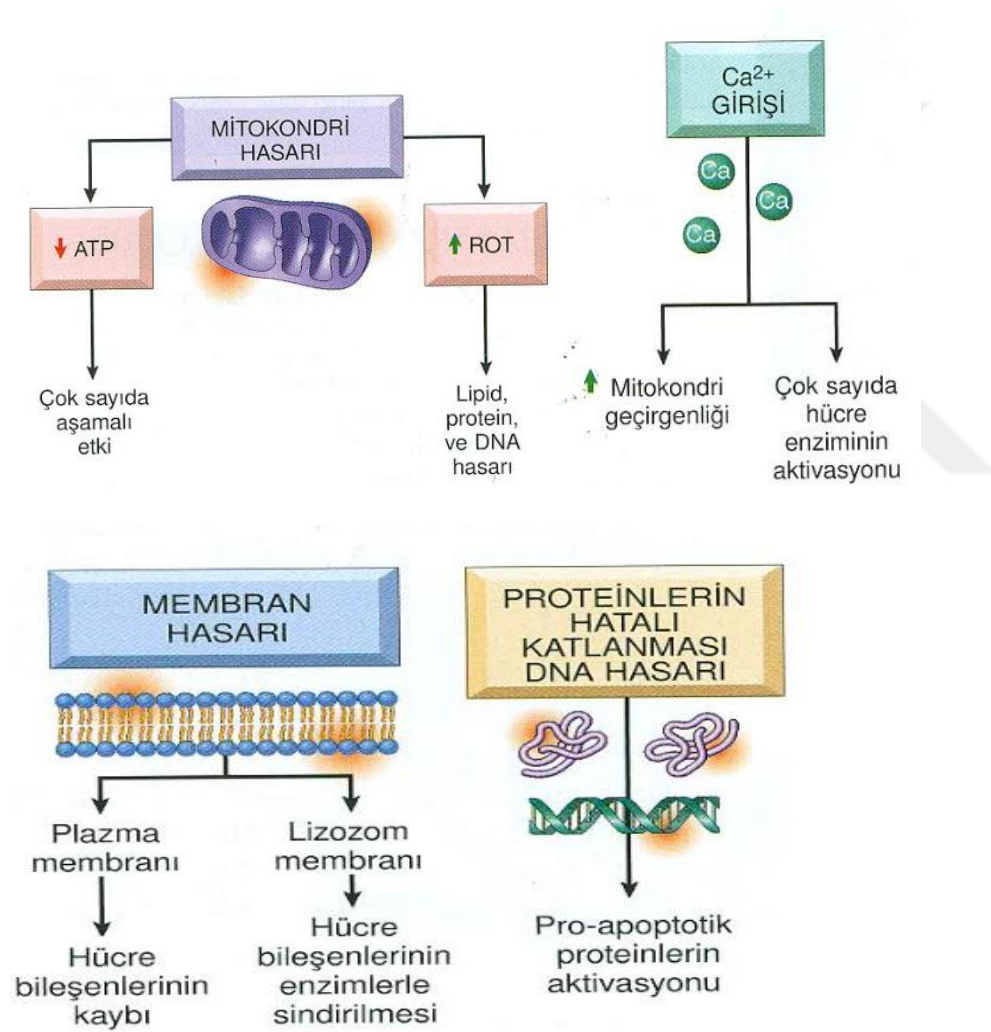
6) Beslenme dengesizlikleri; Protein kalori yetersizliği, hayvansal gıdalar, vitamin eksiklikleri

7) Fiziksel etkenler; Travma aşırı sıcak veya soğuk, radyasyon, elektrik şoku, atmosfer basıncındaki ani değişiklikler

8) Yaşlanma. Hücreler yaşlandıkça çoğalma ve kendini onarma yeteneğini kaybeder, bu da hücrelerin ölümüne sebep olur.

Hücre hasarı hücredeki temel bileşenlerin bir veya birden fazlasının fonksiyonel ve biyokimyasal anormalliğinden kaynaklanır. Hücre zedelenmesinin ana biyokimyasal mekanizmaları (10) (Şekil 1)

- 1) Mitokondriler ve bunların patolojik koşullarda ATP (adenozin trifosfat) ve ROS (reaktif oksijen türevleri) üretimindeki bozukluk
- 2) Kalsiyum homeostazındaki bozukluk
- 3) Hücre membranlarının zarar görmesi
- 4) DNA hasarı ve proteinlerin hatalı katlanması



Şekil 1. Hücre hasarındaki başlıca biyokimyasal mekanizmalar ve hasar yerleri

4.2. İskemi ve hipoksik hasar

Bir dokunun arteriyel ya da venöz kan akımının herhangi bir nedenle azalmasına bağlı yetersiz perfüzyonu sonucu dokunun oksijenden fakir kalmasına ve hücrel döngü için gerekli olan enerji döngüsünün bozulmasına iskemide denir. Bu durumda anaerobik metabolizma devreye girer. Laktik asit ve toksik metabolitler bu nedenle niteliksel ve niceliksel olarak artarlar.

Dokuda enzim işleyişleri oluşan asidoz nedeniyle değişir ve yüksek enerjili fosfat bağlarının yapımı eksilir. Dolayısı ile hücreler için gerekli olan enerji yeterli düzeyde üretilmez. Hipoksik durumun şiddetine bağlı olarak hücreler adapte olabilir, zedelenebilir, ya da ölür. Hücre zedelenmesinin en sık görülen tipi iskemidir. Hipoksi ise dokuya yetersiz oksijen sunumu şeklinde tanımlanır. Her iki durumda iskemide-reperfüzyon hasarının ilk kısmını oluşturmakta ve metabolizmanın anaerobik tarafa kaymasıyla karakterizedir (11).

İnsan fizyolojisinde oksijen döngüsü hayati açıdan önemlidir. Oksidatif fosforilasyon sırasında ATP sentezi için kullanılan oksijen aynı zamanda hücrel düzeydeki oksidatif hasar mekanizmalarında da rol oynamaktadır. Protein sentezi ve aktivitesini kontrol eden kısa ve uzun dönem mekanizmalarla hücrel ve sistemik oksijen konsantrasyonlarının dengelenmesi oksijen biyoyararlanımı açısından önemlidir. İskemide hücre zedelenmesinin patogeneğinde oksijen yetersizliğinin önemi belirtilmekle birlikte kısmen azalmış reaktif oksijen türevleride hücre ölümüne neden olmaktadır (12).

İskemide sekonder oluşan doku hasarı, hipoperfüzyonun süresi ve miktarı ile orantılı olup; hücrenin tipi, yaralanmaya karşı hassasiyeti, diferansiyasyonu, kan ihtiyacı ve metabolizmasına göre farklılık gösterir. İskemide bazı dokular dirençli iken (kemik, deri), bazı dokular hassastır (iskelet kası, böbrek) (12).

Uzun süreli iskemilerde; asidoz, hücre içi kalsiyum/sodyum oranında artış, ATP/fosfokreatin seviyesi azalması, hipoksantin seviye artması, membran potansiyel değişiklikleri, iskelet bütünlüğü kaybı, nükleotid hidrolizi gibi birçok değişim meydana gelir (13). İskeminin şiddeti ve süresine bağlı olarak iki türlü hücrel zedelenme oluşur:

- a) Geri dönüşlü zedelenme b) Geri dönüşsüz zedelenme.

4.2.1. Geri Dönüflü Zedelenme

Normal şartlarda 3-4 dakikalık iskemi, yüksek enerjili fosfat olan fosfokreatinin ile adenozin trifosfat (ATP) depolarının boşalmasına neden olur. Potasyumun difüzyonla dışarı atılımı ve sodyumun hücre içi birikimine yol açan sodyum pompası yetersizliğine sebep olacak şekilde oubain duyarlı ATPaz aktivitesinin azalmasına neden olur.

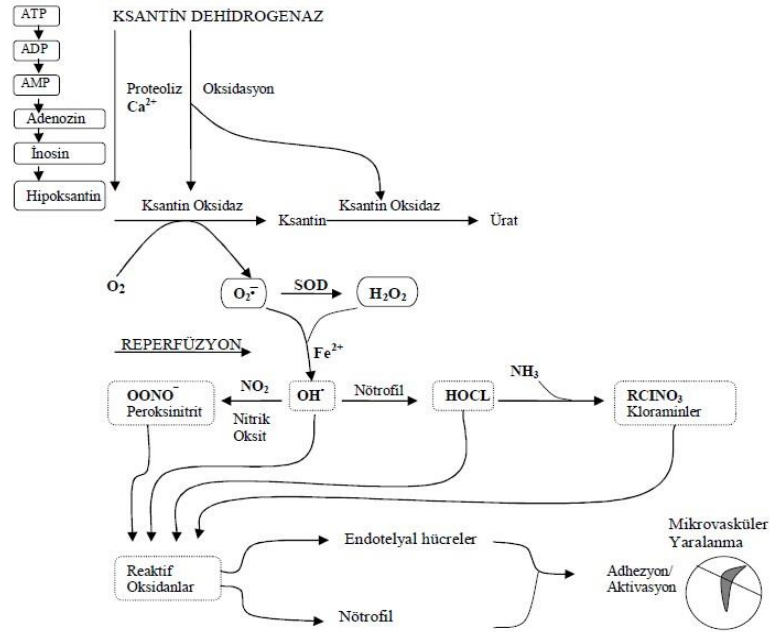
İyon tutulumuna izo-ozmotik su birikimi eşlik etmesi ile akut hücresel şişme ortaya çıkar. Bu hidrasyon, inorganik fosfatlar, laktik asit ve pürin nükleozitleri gibi diğer metabolitlerin birikimi ile artan hücre içi ozmotik yükü daha da artar (10).

Anaerobik glikoliz ile aerobik glikolizle oluşan ATP nin ancak % 7 si elde edilebilmektedir. Hücresel ATP de azalma ile birlikte adenozin monofosfat (AMP) artışı fosfofruktokinazı uyarır, bu da anaerobik glikoliz ile glikojenden ATP sentezini artırarak hücreye enerji sağlar. Glikolizis laktik asit ve fosfat türevlerinin hidrolizi ile inorganik fosfatların birikimine yol açar, bu da hücre içi pH'sı düşürür (10). Yine iskemi sırasında devam eden başka bir olay ATP seviyesinin azalmasına karşın ADP düzeyinin artmasıdır. Artan ADP'ler önce AMP'ye daha sonra adenozin, inozin ve en sonunda hipoksantine dönüşür. Hipoksantin reaktif oksijen radikallerinin prekürsörü olarak hücre içinde miktarı artar (13).

Normal koşullarda hipoksantin, ksantin dehidrogenaz yardımıyla ksantine dönüştürülür. İskemi sırasında ksantin dehidrogenaz ksantin oksidaza dönüşür. Substrat olarak nikotinamid adenin dinükleotid kullanan ksantin dehidrogenazın aksine ksantin oksidaz oksijeni kullanır. Bundan dolayı hipoksantin ksantine dönüşümünü katalize edemez, sonuçta dokuda hipoksantin düzeyi aşırı seviyelere çıkar. Reperfüzyonla oksijen tekrar dokuya sunulduğunda fazla miktardaki hipoksantin ksantin oksidaz ile reaksiyona girmesi sonucunda toksik serbest oksijen radikalleri oluşur (10) (Şekil 2). Serbest radikallerin oluşumundan sonra ribozomların granüllü endoplazmik retikulumdan (GER) ayrılması ve polizomlardan monozomların oluşumu ile protein sentezinde azalma bunu takip eder.

Hipoksinin devam etmesi ile mitokondrial fonksiyonun daha da kötüleşmesine neden olur ve membran geçirgenliğinin artışı sonucunda morfolojik hasar artar. Hücrenin ana hatları, mikrovillus gibi ultrastrüktürel özelliklerin kaybı söz konusudur. Mitokondri, endoplazmik retikulum ve tüm hücreler ozmotik regülasyonun bozulması nedeni ile

şişmişlerdir. İskemi düzeltilir ve O₂ düzeyleri normale dönerse tüm bu bozulmalar geri dönebilir, ancak iskemi ve hipoksi devam ederse ATP'deki azalma şiddetlenir ve geri dönüşümsüz hasar meydana gelir (14).



Şekil 2. Ksantin-hipoksantin metabolizması ve serbest oksijen radikal oluşum şeması

4.2.2. Geri Dönüşsüz Zedelenme

Morfolojik olarak mitokondrilerin ileri derecede vakuolizasyonu, plazma zarlarının aşırı yıkımı, lizozomların şişmesi görülür. Mitokondri matriksinde şekilsiz yoğunlaşmalar gelişir. Mitokondride iskemiden sonra bu erken geri dönüşsüz zedelenme bulguları 30-40 dakikada izlenebilir (10).

Doku canlılığının sürdürülebildiği maksimum iskemi süresi kritik iskemi zamanı olarak tanımlanır. Ortalama kritik iskemi süresi ise %50 doku kaybına neden olan iskemik zaman dönemidir. Kritik iskemi süresi hücrenin metabolik aktivitesi ve adaptasyon mekanizmalarına göre farklılık gösterir. Uzun süreli iskemide geri dönüşümsüz hasar ve nekroz kaçınılmazdır (13).

Protein, temel koenzimler ve ribonükleik asitler aşırı geçirgen membranlardan kaybolur. Hücre aynı zamanda yaşamını sürdürmek için gerekli olan ATP'nin yeniden oluşumunda kullanacağı hücre içi yüksek enerjili fosfatlarını kaybeder (15).

PH düşmesi lizozom membranlarında zedelenmeye yol açar. Enzimler sitoplazmaya geçerek asit hidrolazların aktivasyonu ile hücre bileşenlerinin enzimatik sindirimine bu da ribonükleoprotein, deoksiribonükleoprotein ve glikojen yitimine sebep olur. Tüm bu olaylar sonucunda ölü hücre myelin şekiller biçiminde büyük fosfolipid kitlelerine dönüşebilir. Bu ya diğer hücrelerce fagosite edilir, ya da yağ asitlerine parçalanır. Yağ asitlerinin artıklarının kalsifikasyonu kalsiyum sabunlarının oluşmasına neden olur.

Geri dönüşsüz hücre zedelenmesinde mekanizmalar ne olursa olsun sonuç aşırı miktarda Ca^{+2} 'un hücre içine girmesidir. Membran zedelenmesi sonucunda kalsiyum yüksek yoğunlukta bulunduğu hücre dışından hücre içine geçer. Reperfüzyon sağlansa dahi kalsiyum akümülayonu devam eder. Kalsiyum mitokondriler tarafından alınır; hücresel enzimleri inhibe eder, proteinleri denatüre eder ve koagülasyon nekrozu için karakteristik değişikliklere neden olur.

Hücreyi ölüme götüren biyokimyasal değişikliklerde kalsiyum iyonları önemli rol oynarlar. Membran bütünlüğünün bozulması ayrıca hücre içinde bulunan süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz gibi antioksidan enzimlerin kaybını da hızlandırmaktadır. Bu durumdaki hücre reperfüzyon hasarına daha duyarlı hale gelecektir. Bu nedenle iskemi ne kadar uzarsa meydana gelen reperfüzyon hasarı da o derece ciddi olmaktadır (10).

Hücre hasarında 4 ana sistem etkilenir:

1-Hücre membran bütünlüğü, hücre ve organellerinin iyonik ve osmotik dengesi

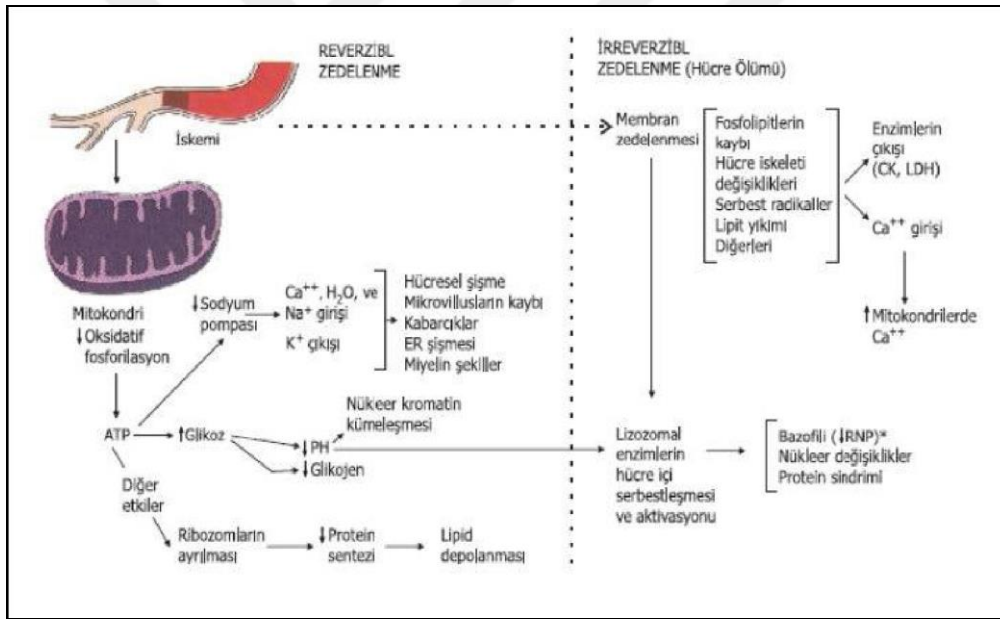
2-Aerobik solunum, mitokondrial oksidatif fosforilasyon ve ATP oluşumu

3-Protein sentezi

4-Hücrenin genetik aparatı

Hücre ölümünden önce hücresel fonksiyonlar kaybolur. Hasarın morfolojik görünümü, kritik biyokimyasal sistemlerde bozukluklar oluşup geri dönüşümsüz hasar oturduktan çok sonra belirginleşir. Hücre şişmesi dakikalar içinde görülebilen geri dönüşümlü bir hasardır. Geri dönüşümsüz hasar 20-60 dakika içinde ışık mikroskopunda görülebilirken, hücre ölümü ancak 10-12 saatte belirgin hale gelir (10).

Geri dönüşümsüz hasarın temelinde iki olay vardır; birincisi ciddi enerji azalmasının neden olduğu olayları geri döndürmede yetersizlik, ikincisi membran fonksiyonlarının kaybıdır (10).



Şekil 3. Hücre zedelenmesinde Ca²⁺ 'un rolü ve hücre zedelenmesi

4.3. Reperfüzyon

İskemik dokuda, hem hücrenin rejenerasyonu, hem de toksik metabolitlerin temizlenmesi için, kan akımının yeniden sağlanması gerekir. Ancak iskemik dokunun reperfüzyonu bir dizi olayın başlaması ile paradoksal olarak doku hasarına yol açar (16). Reperfüzyon sırasında dokuda nötrofil infiltrasyonu, kompleman sisteminin aktivasyonu, kalsiyum aracılı proteazların aktivasyonu, araşidonik asit (AA) metabolizması gibi pek çok sistem, serbest radikal (SR) oluşumunu artırarak, hasara neden olmaktadır (16).

Özellikle şok, yanık, sepsis, pankreatit gibi olgularda ortaya çıkan hipovolemi ile iskemi ve bu durumların düzeltilmesi ile de reperfüzyon hasarı neden olmaktadır (16, 19). Serebrovasküler olaylarda, myokard enfarktüsünde uygulanan trombolitik tedavi veya revaskülarizasyon işlemlerinden sonra yine reperfüzyon hasarı ortaya çıkmaktadır (16).

Kardiovasküler cerrahide aort ya da periferik arter klemp uygulaması sonrası ortaya çıkan tablo İRH ile karakterizedir. Transplantasyon cerrahisinde transplante edilecek organın iskemi ve reperfüzyonu söz konusu olup, oluşan hasar greft fonksiyonlarını etkilemektedir.

Neredeyse bütün cerrahi işlemler sırasında dokuların iskemisi ve sıklıkla bunu takip eden bir reperfüzyon periyodu vardır (16). Daha önce de belirtildiği gibi iskemik dokuların reperfüzyonu, toksik serbest oksijen radikali (SOR) oluşumuna neden olmaktadır. Bunlar süperoksit anyonlar (O_2^-), hidroksil radikalleri (OH^-), hipoklorik asit (HOCl), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve nitrik oksitten derive peroksinitrit (19). Oksijen kökenli serbest radikal aracılığı ile oluşan hasarda ilk basamak, ksantin oksidaz kökenli O_2^- anyonlarının üretilmesidir (17).

Hücresel ATP iskemisi sırasında hipoksantin oluşturmak üzere indirgenir. Normal koşullarda hipoksantin, ksantin dehidrogenaz yardımıyla ksantine oksidize edilir. Ancak iskemi sırasında ksantin dehidrogenaz, ksantin oksidaza dönüştürülür. Substrat olarak nikotinamid adenin dinükleotid kullanan ksantin dehidrogenazın tersine, ksantin oksidaz oksijeni kullanır ve bundan dolayı iskemi sırasında hipoksantin ksantine dönüşümünü katalize edemez ve bu da hipoksantin dokuda aşırı seviyelere çıkmasına neden olmaktadır. Reperfüzyonla oksijen tekrar sunulduğunda, fazla miktardaki hipoksantin ksantin oksidaz ile dönüştürülmesi SOR oluşumu ile sonuçlanır (19).

Sellüler ve subsellüler membranların lipid peroksidasyonu da, oksijen kökenli SR' in artırdığı hücre hasarında önemli bir mekanizmadır (18). Hücre membranları içerisinde poliansatüre yağ asitlerinin lipid peroksidasyonu, hücresel bütünlük ve fonksiyon kaybı ile sonuçlanabilir. Bu durum tek başına OH^- radikalleri ile başlatılabileceği gibi, uygun bir şelatör varlığında O_2^- ile de başlatılabilir (10).

4.3.1. İskemi Reperfüzyon Hasarı

İskemide canlı dokulara kan akımının sağlanması, hücre düzeyindeki hasarı arttırabilir. Reperfüzyonla birlikte oluşan hasarın büyüklüğü iske mi süresi ve şiddeti ile ilişkilidir. Kısa süreli iskemilerde reperfüzyon hasarının şiddeti hafif olurken, iske mi süresinin uzun ve geri dönüşsüz hasarın oluştuğu durumlarda reperfüzyonla birlikte hücrelerin kurtarılması çok daha zordur (22).

İske mi sırasında dokuda oluşan metabolitler, hipoperfüzyona bağlı olarak dokuda birikir. Kan akımının normale dönmesiyle metabolitlerin oksidasyonu sonucu oluşan maddeler dolaşıma karışır ve kan yolu ile tüm vücuda yayılarak uzak organ hasarına sebep olurlar. İske mi sırasında hasara duyarlı hale gelmiş bazı hücreleri öldürebilen en olası etkinin serbest oksijen radikalleri olduğu düşünülmektedir.

Bunlar endotel, parankimal hücreler ve inflamasyon nedeniyle dokulara yönelen nötrofillerden kaynaklanabilir. Lipid peroksidasyonu ile, serbest oksijen radikalleri membranlara zarar verebildikleri gibi deoksiribonükleik asit (DNA), protein ve mitokondrilere hasar verebilir. Reperfüzyon sırasında hücre içine Ca^{+2} birikiminin artması ve Ca^{+2} 'un mitokondri içine alınması reperfüzyon hasarının bel kemiğini oluşturmaktadır.

4.3.2. İske mi-Reperfüzyon Hasarı Mekanizması

İske mi reperfüzyon hasarında fizyopatolojik değişikliklere yol açan faktörler (21) :

- a) Serbest oksijen radikalleri,
- b) Polimorf nüveli lökositler
- c) Kompleman sistemi,

d) Endotel hücreleridir.

4.3.2.1. Serbest Oksijen Radikalleri (SOR)

Atomlarda elektronlar orbita adı verilen uzaysal bölgede çiftler halinde bulunurlar. Atomlar arasında etkileşim ile bağlar meydana gelmekte ve moleküler yapı oluşmaktadır. Serbest radikal, dış orbitalinde tek sayıda elektron bulunan bir atom veya moleküldür. Dış orbitalde, iki ile bölünmeyen elektron varlığı, atom veya molekülü reaktif kılar. Normalde hücrelerde en büyük serbest oksijen radikali kaynağı mitokondriyal elektron transport zincirinden olan sızıntılardır.

Mitokondri iç zarında yerleşmiş oksidatif fosforilasyon zinciri bileşenleri büyük oranda indirgendiği zaman mitokondriyal süperoksit radikal (O_2^-) üretimi artar (20). Serbest radikaller stabil olmadığı için ömürleri çok kısadır. Elektriksel yükleri pozitif, negatif veya nötr olabilir (23).

Serbest radikaller fizyolojik şartlarda ve dış etkenlere karşı organizmanın savunmasında etkili olmaktadır ve intrensik faktörlerin yardımı ile bu radikallerin organizmaya olabilecek zararlı etkileri önlenabilmektedir. Biyolojik sistemlerde oluşan serbest radikallerin endojen kaynaklı oksijen, nitrik oksit (NO), uyarılmış nötrofil, mitokondriyal elektron transport sistemi, endoplazmik retikulum, peroksizom ve plazma membranı olarak sayılabilir (21).

Moleküler oksijen aerobik canlılarda serbest radikaller için en önemli kaynaktır. Metabolizma sırasında O_2 'nin %98'i suya (H_2O) indirgenmektedir. Geriye kalan yaklaşık %2'lik kısım ise süperoksit (O_2^-) radikali ve hidroksil (OH^-) radikaline dönüşür. En önemli serbest oksijen radikalleri süperoksit (O_2^-) ve hidroksil (OH^-) anyonlarıdır (Tablo 1) (23). Hidrojen peroksit (H_2O_2) biyolojik sistemlerde süperoksit oluşumu yoluyla sık olarak meydana gelmektedir. Burada iki süperoksit molekülü iki hidrojenle reaksiyona girerek H_2O_2 ve O_2 oluşturur. Eşlenmemiş elektron içermediği için tek başına radikal değildir (23).

RADİKALLER:	RADİKAL OLMAYANLAR:
Süperoksit radikal(O_2^-)	Hidrojen peroksit (H_2O_2)
Hidroksil radikal (OH^-)	Lipid hidroperoksit(LOOH)
Alkoksil radikal (LO^-)	Hipoklorik asit ($HOCL$)
Peroksil radikal(LOO^-)	

Tablo 1. Radikal ve radikal olmayan bileşikler

Serbest oksijen radikallerinin toksik etkileri (Şekil 4):

- Hücre organelleri ve membranındaki lipid ve protein yapısını bozarlar.
- Hücre içi yararlı enzimleri etkisizleştirirler.
- DNA'yı tahrip ederler.
- Mitokondrilerde aerobik solunumu bozarlar.

-Elastaz, proteaz, fosfolipaz, lipoksigenaz, siklooksigenaz, ksantinoksidaz, indolamin dioksigenaz, triptofan dioksigenaz, galaktoz oksidaz gibi litik enzimleri aktive ederler.

-Hücresinin potasyum kaybını arttırırlar.

-Trombosit agregasyonunu arttırırlar.

-Dokulara fagosit toplanmasını kolaylaştırırlar.

-Hücre dışındaki kollagen doku komponentlerini, savunma enzimlerini ve transmitterleri yıkarlar (25).

Vücutta serbest radikal kaynakları:

-Stres ile artan katekolaminlerin oksidasyonu fagositik inflamasyon hücrelerinden salgılanma (nötrofil, monosit, makrofaj, eosinofil, endotelyal hücreler)

-Uzun süreli metabolik hastalıklar yaşlanma süreci ve diğer nedenler: Sıcak şoku, güneş ışını, sigara

-Normal biyolojik işlemler (Oksijenli solunum, katabolik ve anabolik işlemler)

-Oksidatif stres yapıcı durumlar (İskemi - hemoraji - travma - radyoaktivite - intoksikasyon-ksenobiotik maddeler)

-Oksidan enzimler (Ksantin oksidaz, İndolamin dioksigenaz, Triptofan dioksigenaz, Galaktoz oksidaz, Siklooksigenaz, Lipooksigenaz, Monoamino oksidaz) (23, 25)

Hidroksil radikali (OH⁻): Fenton Reaksiyonu ve Haber-Weiss Reaksiyonu sonucu hidrojen peroksitten oluşmaktadır. Oldukça reaktif ve toksik bir radikaldir, yarılanma ömrü çok kısadır. Oluştığı yerin hemen çevresinde oldukça büyük hasara yol açabilir, elektronegativitesi ve büyük molekül yapısı nedeni ile DNA, protein, karbonhidrat ve lipitler gibi makromoleküllerle reaksiyona girerek oksidatif hasara neden olur (23, 27).

Süperoksit (O₂⁻): Tüm aerobik hücrelerde moleküler oksijenin (O₂) bir elektron alarak indirgenmesi sonucu meydana gelmektedir. Çok toksik olmayan bir serbest radikaldir. Süperoksit radikali kendisi direkt olarak etki etmez. Bu radikal anyonun asıl önemi, hidrojen peroksit (H₂O₂) kaynağı olmasıdır.

Zayıf oksidan etkisine karşın düşük pH değerlerinde protonlanarak hidroperoksil (HO₂⁻) oluşur (23). Süperoksit radikali ile perhidroksil radikali birbirleriyle reaksiyona girince, biri okside olur diğeri indirgenir. Bu dismutasyon reaksiyonunda, moleküler oksijen ve hidrojen peroksit meydana gelir. Süperoksit radikalının fizyolojik bir serbest radikal olan nitrik oksit (NO⁻) ile birleşmesi sonucu reaktif oksijen türü olan peroksinitrit (ONOO⁻) meydana gelir. Peroksinitrit, nitrit (NO₂⁻) ve nitrat (NO₃⁻) oluşturmak üzere metabolize edilir. Peroksinitrit, azot dioksit (NO₂⁻), hidroksil radikali (OH⁻), nitronyum

iyonu (NO_2^-) gibi toksik ürünlere dönüşebilir. Nitrik oksitin (NO^-) zararlı etkilerinden peroksinitrit sorumludur (26).

Hidrojen peroksid (H_2O_2): Metal iyonların yokluğunda stabil, zayıf oksidan, zayıf redüktan, biyolojik membranları kolayca geçebilen reaktif oksijen bileşiğidir (23).

Singlet oksijen (O_2): Radikal değildir. Serbest oksijen radikalleri ile birlikte olan reaktif oksijen türüdür (23).

Hidroperoksil (HO_2^-): Hidrojen peroksit (H_2O_2), süperoksidin çevresindeki moleküllerden bir elektron alması veya moleküler oksijenin çevresindeki moleküllerden iki elektron alması sonucu oluşan peroksitin, iki proton (H^+) ile birleşmesi sonucu oluşmaktadır. Süperoksidin (O_2^-) dismutasyonu biyolojik sistemlerde hidrojen peroksitin asıl kaynağını oluşturmaktadır. İki süperoksit molekülü, süperoksitin dismutasyonu reaksiyonunda iki proton alarak hidrojen peroksit ve moleküler oksijeni meydana getirirler.

Bu reaksiyon süperoksit dismutaz (SOD) enzimi tarafından katalizlenir. Spontan dismutasyon, pH 4,8 'de en hızlıdır; enzimatik dismutasyon ise spontan dismutasyonun nispeten yavaş olduğu nötral ya da alkali pH'da daha belirgindir. Hidrojen peroksit bir serbest radikal olmadığı halde reaktif oksijen türleri (ROS) kapsamına girer ve serbest radikal biyokimyasında önemli bir rol oynar.

Çünkü Fe^{+2} veya diğer geçiş metallerinin varlığında Fenton Reaksiyonu sonucu, süperoksit radikalinin (O_2^-) varlığında Haber-Weiss Reaksiyonu sonucu en reaktif ve zarar verici serbest oksijen radikali olan hidroksil radikali (OH^-) oluşturur. Süperoksit radikalının lipitte çözünübilirliği sınırlı olduğu halde hidrojenperoksit lipitte çözünebilir. Bu nedenle hidrojenperoksit kendisinin olduğu yerden uzakta olan, fakat Fe^{+2} içeren membranlarda hasar yol açabilir (33).

Nitrikoksit (NO^-): Nitrik oksit sentetaz (NOS) enzimi aracılığı ile endotelde sentezlenen serbest radikaldir. Üç farklı NOS enzimi vardır. Endotelial, nöronal ve normal koşullarda üretilmeyen ancak enflamasyon veya enfeksiyon durumlarında sitokinler veya endotoksinler tarafından indüklenebilen NOS (iNOS)'dur. NO , süperoksit anyon radikali ile hızla reaksiyona girdiğinden hücre koruyucusu olarak düşünülebilir (23, 29).

Nitrik oksit vasküler tonusun fizyolojik düzenlemesi ve normal vasküler geçirgenliğin devamı, lökosit adezyonunun engellenmesi, trombosit agregasyonunun inhibisyonu, oksijen kaynaklı serbest radikallerin temizlenmesi, düz kas proliferasyonunun engellenmesi, immun defansın güçlendirilmesi, endotel hücrelerinin rejenerasyonu gibi birçok olayda etkili olmaktadır (30).

Ayrıca iskemik dokularda süperoksit dismutaz aktivitesini etkileyerek hidrojen peroksit birikimini azaltır (29). Fizyolojik değişimde üretilen NO, esas olarak oksihemoglobin tarafından nitrata (NO_3^-) oksitlenerek aktivitesi sonlandırılır. Oksijen radikallerindeki durumun aksine, normal vasküler fizyolojide NO:

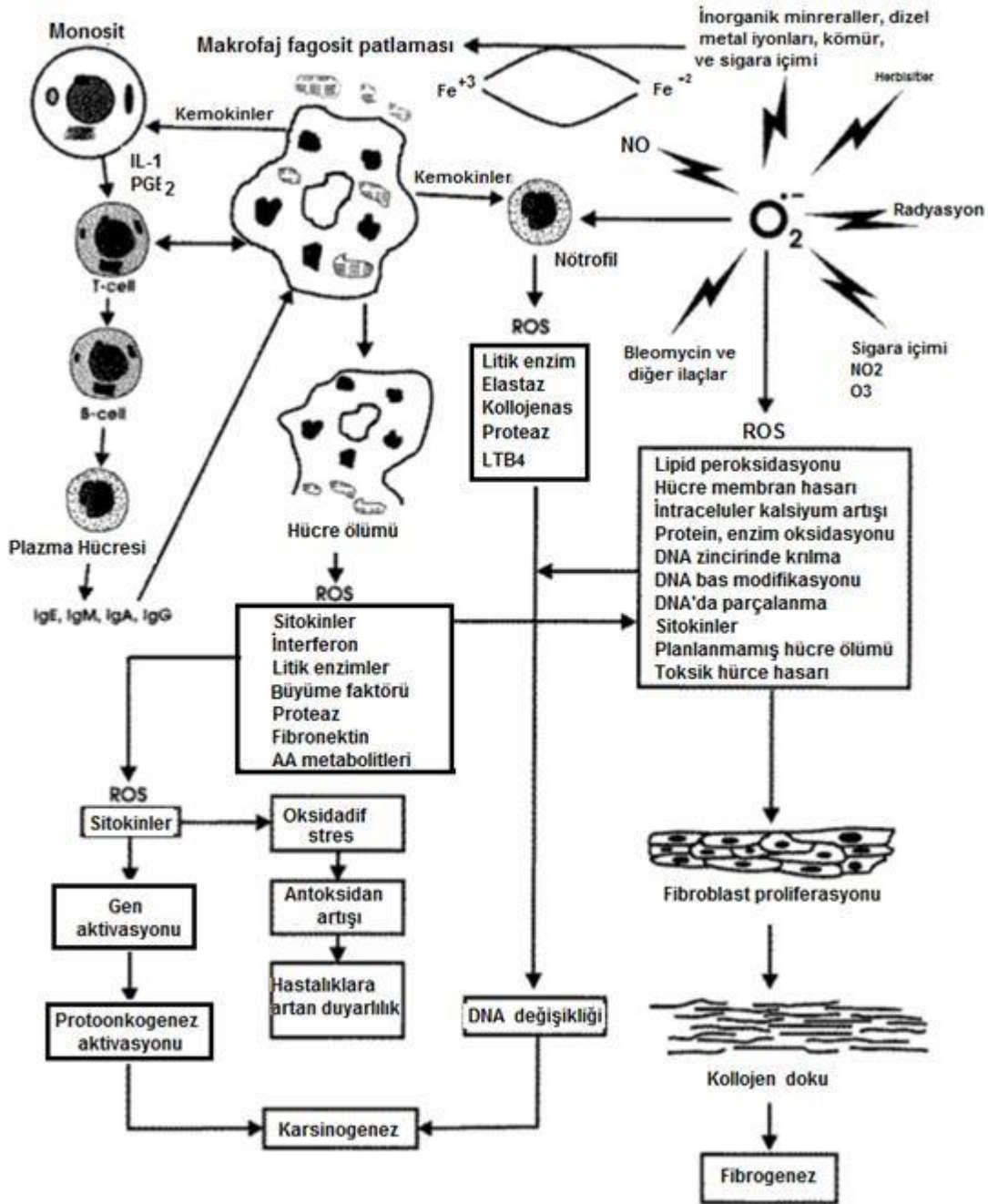
- Vasküler düz kas hücrelerinin gevşemesine neden olur.
- Trombosit adezyon ve agregasyonunda inhibisyona neden olur.
- Lipit peroksit radikalleri ile reaksiyona girerek antioksidan ve antiaterosklerotik etki oluşturur.
- Süperoksit radikalleri ile etkileşir.
- Damar düz kas hücrelerinin proliferasyonunu inhibe eder.
- Santral sinir sisteminde nörotransmitterdir.
- Vasodilatör tonüsün devamlılığının sağlar.
- Nontrombotik endotelial yüzeyin sürdürülmesini sağlar.
- Lökosit-endotel hücresi etkileşiminden korunmada etkilidir.

Patolojik olaylarda ise; ödem oluşumunda, makrofajların antimikrobia ve tümorosidal aktivitelerinin düzenlenmesinde pro- ve anti-inflamatuvar ürünler gibi davranır. Ortamdaki nitrik oksidi temizleyen herhangi bir özel enzimi bulunmamaktadır (28).

En sık olarak lipid yapılarla olma üzere organizmada pek çok türde serbest radikal oluşabilir. Doymamış yağ asitlerinin açıl grubundan bir hidrojen çıkarsa lipid radikali meydana gelir. Oluşan lipid radikali oksijen ile reaksiyona girer ve lipit peroksit (LOO^-) radikali oluşturur. İskelet kası lipid radikallerinin en önemli kaynağıdır (33).

Lipid peroksit radikali, diğer lipidlerle zincir reaksiyonu başlatır ve lipit hidroperoksitler (LOOH) oluşur. Ortamda bulunan demir ve bakır iyonları lipid peroksidasyonunu hızlandırır. Lipid radikaller yüksek derecede sitotoksik ürünlere

dönüşebilir. Bunlar arasında en çok bilinen ürün aldehid grubundan malondialdehittir (MDA) (17, 24, 29, 32).



Şekil 4. Serbest radikallerin, hücre yapısını bozarak hastalık oluşumundaki rolü.

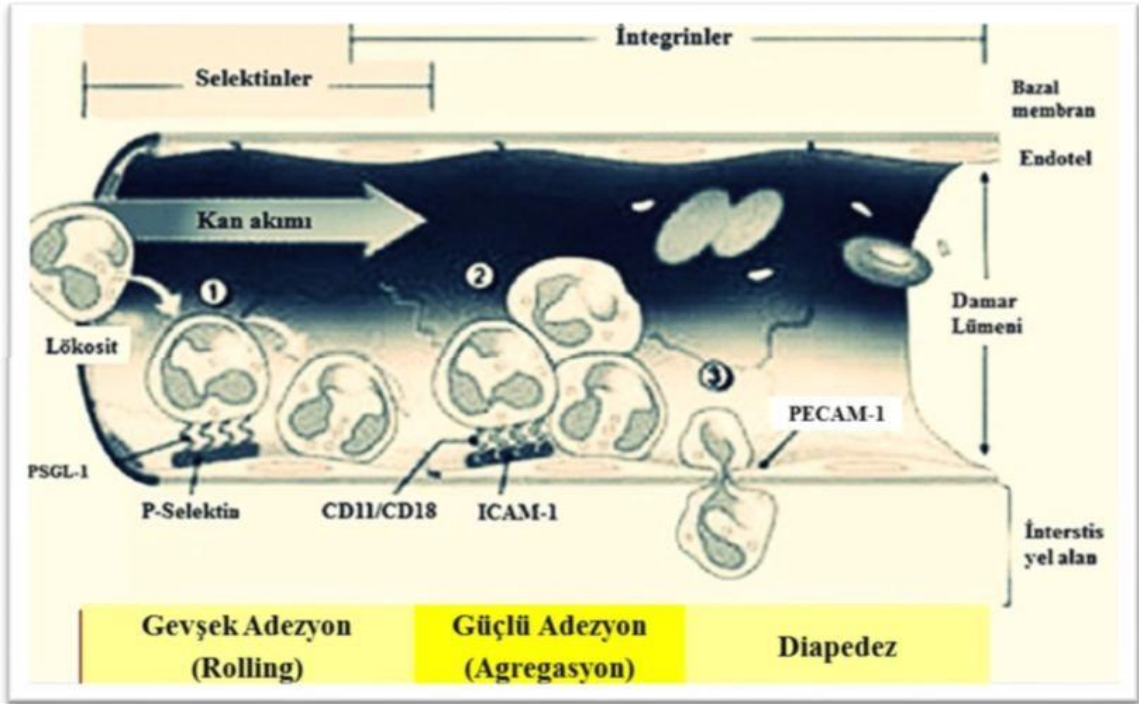
4.3.2.2. İskemi Reperfüzyon Hasarında Polimorf Nüveli Lökositler

Vasküler geçirgenlik artışından başlıca sorumlu olan hücreler polimorf nüveli lökositler olup iskemi-reperfüzyon hasarı sonrasında aktif hale gelen ilk hücre grubudur (31, 10).

Bu hücreler lökosit ve endotel hücre yüzeyleri adezyon molekül oluşumunu artırarak lökosit aktivasyonu, kemotaksis ve lökosit migrasyonu ile sonuçlanan kaskadın aktivasyonunu başlatırlar (28). Bu aktivasyon sonrası oluşan hasar SOR salınımı, interlökin-1 (IL-1), interlökin-6 (IL-6) ve TNF- α gibi sitokinlerin ve sitotoksik enzimlerin salınmasını, vasküler geçirgenlikte artış ile birlikte mikrovasküler oklüzyon oluşturmalarına bağlıdır. Dolaşımda bulunan nötrofiller aktive olduklarında iskemik doku endoteline yapışıp interstisyel alana doğru göç ederler (35).

Nötrofillerin aktivasyon ve migrasyonları lökositler ve aktive olmuş endotel hücreleri arasında oluşan E-selektin, P-selektin ve L-selektin adı verilen adezyon molekülleri aracılığıyla gerçekleşir. Adezyona uğramış bu lökositler kompleman faktör 5a (C5a), interlökin 8 (IL-8), lökotrien B4 (LTB4), ve trombosit aktive edici faktör (PAF) aracılığı ile aktive edilirler ve yüzeylerinde CD11b/18 molekülleri belirir. CD11b/18 ve ayrıca intersellüler adezyon molekülü-1 (ICAM- 1) etkinliği sonucu daha önce oluşan adezyon güçlenir ve transendotelial migrasyon meydana gelir (Şekil 5) (21, 27).

Lökosit göçü esas olarak venöz kılcal damarlardan olur. Hasarlı dokuya olan lökosit kemotaksisi C5a, LTB-4, IL-8 yoluyla sağlanır. İskemi reperfüzyon sırasında oluşan TNF- α , IL 1 β , PAF ve kompleman sistemi gibi inflamatuvar araçların hepsi nötrofil göçüne katkıda bulunmaktadır (35).



PSGL-1: P-selectin glycoprotein ligand-1; ICAM-1: İntersellüler adezyon molekülü1PECAM-1: Platelet endothelial cell adhesion molecule.

Şekil 5. İskemi-reperfüzyon hasarında lökosit-endoel etkileşimi

Hasarlanmış bölgede biriken hücre tipi inflamasyonun süresi ve uyarının tipine göre değişir. İskemi reperfüzyon hasarına inflamatuvar cevapta ilk 6-24 saat nötrofil hakimiyeti mevcut iken, 24-48 saatte monositler baskın hale geçerler. Bunun nedeni nötrofillerin kanda daha fazla bulunması, daha hızlı aktive olmaları, adezyon moleküllerine yüksek afinite ile bağlanmaları ve yarı ömürlerinin kısa olmasıdır. Dolayısıyla akut dönemde nötrofil, kronik dönemde monosit hakimiyeti vardır (36).

Tüm bu basamaklar sonucunda lökositler dokuda hasarı artışına sebep olurlar. Bu durumun klinik yansıması mikrovasküler tromboz ve disfonksiyon ile karakterize no-reflowfenomenidir (25).

4.3.2.3. İskemi Reperfüzyon Hasarında Komplemanın Rolü

Kompleman sistemi bir dizi plazma proteini ve bu proteinlerin hücre zarı reseptörlerinden oluşur. Hepatositler, monositler, makrofajlar, böbreğin tübül ve glomerüler hücreleri kompleman komponentlerinin üretim yerleridir. Kompleman sisteminin aktivasyonu sonucunda proinflamatuvar komponentler (C3a, C5a, iC3b ve C5b-9) oluşur. C3a ve C5a anaflatoksinlerdir ve lökositleri aktive ederler. C5a ayrıca,

makrofaj inflamatuvar protein (MIP)-2, MIP-1a, MIP-1b, monosit kemoatraktan protein (MCP)-1, TNF- α , IL-1 ve IL-6 üretimini uyarak inflamatuvar yanıtı artırır.

Kompleman tarafından sentezi uyarılan lökosit adezyon molekülleri vasküler hücre adezyon molekülü-1 (VCAM-1), ICAM- 1, E-selektin ve P-selektinlerdir (17, 37). C5b9 endotelde IL-1a, IL-8 ve MCP-1 salgısını stimüle ederek lökosit aktivasyonu ve kemotaksisi artırır. Aynı zamanda endotel bağımlı vazodilatasyonu inhibe ederek ve endotelde siklik guanozin monofosfatı azaltarak vasküler tonusu hasarına sebep olur. (21, 38).

4.3.2.4. Sitokinler

Sitokinler hücreler arası iletişimi sağlayan aracı moleküllerdir. Bu terim ayrıca, immunomodülatör ajanlar olan interlökinler ve interferonları da tanımlamak için kullanılır. Literatürde; interlökin-1 (IL1), interlökin-6 (IL6), tromboksan A2 (TXA2) ve tümör nekroz faktörü (TNF) 'nin etkileri, iskemi-reperfüzyon hasarı için iyi tanımlanmıştır. Bu sitokinler; lökositler ve vasküler endotel bariyeri arasında sinyal görevi üstlenerek lökositlerin selektif adezyon ve migrasyonunu sağlamaktadır (39).

4.3.2.5. İskemi Reperfüzyon Hasarında Endotel Hücresinin Rolü

Endotel kan ile dokuları birbirinden ayıran tek sıra dizilmiş hücrelerden oluşan bir bariyerdir. Damar fonksiyonlarının sağlanmasında önemli rol alır. Seçici geçirgen bariyer özelliği sayesinde kan ve dokular arasında madde alış verişinden sorumludur (40). Endotel hücreleri SOR için hem hedef konumundadır, hem de SOR üretim kaynağıdır. Mikrovasküler homeostazdan sorumlu olan endotelin (ET) ve NO'nun ana kaynağı endoteldir (41). Endotel hücrelerinin oksidatif stresi sonucu kompleman aktive edilir ve lökosit adezyon moleküllerinin üretimi artar. SOR etkisi ile endotel hücreleri endotelin, NO, IL-1, PAF, prostaglandinler (PGI2, PGE2), granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktör (GM-CSF), büyüme faktörü ve tromboksan A2 (TxA2) salgırlar. Endotel hücreleri aktive olduklarında kendi bazal membranlarını sindiren kollajenler salgırlar (42).

4.3.3. Damar Cerrahisinde İskemi Reperfüzyon

İskemi-reperfüzyon sendromuoluşturan iki temel komponent vardır. Bunlardan biri iskemik lokal hasar, diğeri yetmezlikle sonuçlanan uzak organ hasarlarıdır (23).

İskelet kası; büyük kütleye sahip olması ve iskemik hasara karşı en duyarlı dokulardan biri olması sebebiyle alt ekstremite iskemi reperfüzyon hasarının gelişmesinde önemlidir. Reperfüzyon hasarında prognoz kas hasarı miktarıyla doğru orantılıdır. (43).

İskemiye karşı doku toleransı, dokunun yapısı ve kollateral akımla yakından ilişkili olsa da, sıcaklık ve doku kitlesi de prognozda önemlidir. Hasarlı dokulardan salınan yıkım ürünleri sonucu pıhtılaşma mekanizmalarının aktifleşmesi ile vasküler hasar ve trombozis oluşturarak kas hasarının daha da artmasına sebebiyet verir.

Prokoagülanlar ve yıkım ürünleri dokunun revaskülerizasyonu sonucu sistemik dolaşıma geçer ve sistemik koagülasyonu tetikleyebilir. Faktör XII'nin aktivasyonu, kompleman, tromboksan, histamin ve bradikinin gibi inflamatuvar mediatörler bu tabloda rol alırlar (23, 44).

Damar cerrahisinden sonra görülen sistemik reperfüzyon hasarı sırasında böbrek, akciğer, karaciğer, santral sinir sistemi, gastrointestinal sistem ve miyokard hasarı görülebilmektedir (45). Oluşan komplikasyonların şiddeti tutulan doku kitlesi ve iskemi süresi ile yakından ilişkilidir, morbidite ve mortaliteyi azaltmak amacıyla kas hasarı oluşmadan önceki kritik safhada revaskülerizasyonun sağlanması gerekmektedir (23).

Lökosit aracılı iskemi reperfüzyon hasarını engellemeyi hedefleyen çalışmalar inflamatuvar mediatör salınımı ve reseptör bağlanması, lökosit adezyon molekülü sentezi ve lökosit endotel adezyonunun inhibisyonu konularını ele almışlardır (46).

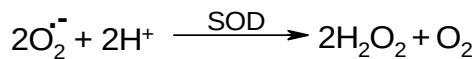
4.3.4. Antioksidan Sistem

Antioksidanlar, serbest radikal oluşumunu azaltma, oluşan zararlı radikalleri ortadan kaldırma ve hasar görmüş hücresel eleman ve yapıtaşlarını tamir etme ve temizleme gibi çeşitli mekanizmalarla etkilolurlar. Antioksidan sistem; enzimleri, suda ve yağda çözünen radikal tutucularını ve metal iyonlarını bağlayan proteinlerden oluşmaktadır (Tablo 2) (48, 49, 50, 51).

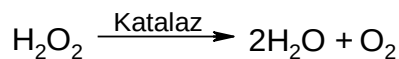
Enzimler	Suda çözünen radikal tutucuları	Yağda çözünen radikal tutucuları	Metal iyonlarını bağlayan proteinler
◆ Süperoksit dismutaz ◆ Katalaz ◆ Glutasyon peroksidaz ◆ Glutasyon redüktaz ◆ Glutasyon transferaz	◆ Glutasyon ◆ Vitamin C ◆ Ürik asit ◆ Glikoz ◆ Sistein	◆ Vitamin E ◆ β-Karoten ◆ Bilirubin ◆ Ubikinol ◆ Flavonoidler	◆ Ferritin ◆ Transferrin ◆ Haptoglobin ◆ Seruloplazmin ◆ Albümin

Tablo 2. Organizmada antioksidan sistem elemanları

Süperoksit dismutaz (SOD): SOD enzimi süperoksit radikalini değişime uğratarak H₂O₂ ve moleküler oksijene dönüşümünü sağlar. Substrat olarak serbest radikal kullanan tek enzimdir. İnsanlarda SOD'un Cu-Zn ve Mn kapsayan iki izoenzimi bulunmaktadır. Cu ve Zn içeren tipi sitozolde, Mn içeren tipi ise mitokondride bulunur (48, 49, 50, 51).

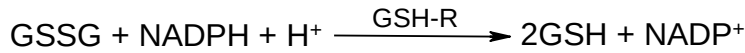
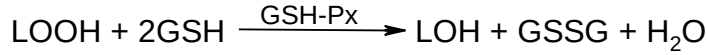


Katalaz (KAT): Bu enzim yüksek konsantrasyonda oluşan H₂O₂'i oksijen ve suya parçalayan reaksiyonu katalizler. Enzim, peroksizomlarda yerleşmiştir (48, 49, 50, 51).

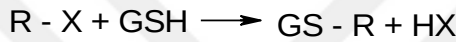


Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px): GSH-Px'in iki farklı tipi bulunur. Selenyum bağımlı formu hem H₂O₂'in hem de LOOH'lerin metabolizmasında yer alırken, selenyuma bağımlı olmayan tipi sadece LOOH'leri metabolize etmektedir. Bu

tepkimelerde glutatyon (GSH) hidrojen verici olarak görev yapmakta, H₂O₂ ve LOOH'ler indirgenirken, GSH oksitlenmiş şekline (GSSG) dönüşmektedir. Oksitlenmiş glutatyon ise NADPH'a bağımlı glutatyon redüktaz (GSH-R) tarafından tekrar GSH'a indirgenmektedir (48, 49, 50, 51).



Glutatyon Transferaz (GST): GST'ler çeşitli endojen ve ekzojen bileşiklerin GSH ile konjugasyon tepkimelerinde yer alırlar. GST'lerin bazı izoenzimleri GSH-Px aktivitesi göstererek LOOH'lerin metabolizmasını da sağlarlar (48, 49, 50, 51).



Glutatyon (GSH): Glutamat, sistein ve glisinden sentezlenen bir tripeptiddir. Başta karaciğer olmak üzere pek çok dokuda yüksek düzeyde bulunur. GSH hücre için en önemli antioksidan moleküldür ve serbest radikaller ve peroksitlerle reaksiyona girerek hücreleri oksidan hasara karşı korur. Enzim tepkimelerine doğrudan katıldıkları gibi dolaylı olarak bazı enzimlerin substratı veya kofaktörü olarak da görev yapmaktadır. GSH-Px, GSH-R ve GST gibi enzimlerin fonksiyonu için gereklidir. Ayrıca hücrenin protein yapısındaki sülfhidril (-SH) gruplarını indirgenmiş halde tutarak pek çok proteinin ve enzimin inaktivasyonunu engeller. GSH amino asitlerin membrandan transportunda da rol alır (48, 49, 50, 51).

Vitamin E (α-tokoferol): E vitamini yağda çözünen en kuvvetli antioksidan vitamindir ve yapısal olarak bir grup bileşiği içerir (tokoferoller ve tokotrienoller). Bunların tümü izoprenoid takısı içerirler. Antioksidan aktivitesi en yüksek olan α-tokoferoldür. Yapısındaki fenol halkasındaki hidroksil grubu aktif kısmını oluşturur ve molekülün antioksidan özelliği buna bağlı olarak ortaya çıkar.

E vitamini bitkisel yağlar ve tohumlarda bol miktarda bulunmaktadır. E vitamininin radikal reaksiyonları sırasında zincirleme devam eden reaksiyonları bozucu etkisi (zincir kırıcı antioksidan) bulunmaktadır. Çok güçlü bir antioksidan olarak serbest radikalleri ve lipid peroksitlerini indirgeyerek çok doymamış yağ asitlerini koruyan ilk

savunma hattını oluşturmaktadır. GSH, askorbik asit ve koenzim Q10 (ubikinon) E vitaminin yenilenmesinde görev almaktadır (48, 49, 50, 51).

Vitamin C (Askorbik Asit): Suda çözünen en güçlü antioksidan moleküldür. Üretilemediği için diyet yoluyla alınması gerekir. Yapısal olarak heksozlara benzemektedir ve organizmada kolayca dehidroaskorbik aside oksitlenmektedir. Süperoksit radikali, hidroksil radikali ve singlet oksijen ile hızlıca tepkimeye girerek onları etkisizleştirmektedir. Sulu fazda bulunmasına karşın lipit peroksidasyonunu başlatıcı radikalleri temizleyerek lipitleri ve zarları da oksidan hasara karşı korumaktadır. E vitamininin yenilenmesinde Tokoferoksil radikalının α - tokoferole indirgenmesini sağlayarak katkıda bulunur (48, 49, 50, 51).

Serbest radikallerin zararlarına karşın organizmada güçlü bir savunma sistemi olmasına rağmen, bazı durumlarda savunma sistemi yetersiz kalmakta ve mikroskopik ve makroskopik düzeyde hasarlanmalar meydana gelmektedir. Hasarın yerine bağlı olarak çeşitli organ ve sistemler etkilenmektedir. Günümüzde serbest radikallerin; aşlanma, ateroskleroz, kanser oluşumu, iskemi-reperfüzyon hasarı ve karaciğer hasarı gibi birçok hastalığın ve patolojinin temelinde önemli bir rol oynadığı kabul edilmektedir (48, 49, 50, 51, 52).

Diğer antioksidanlar: **Bilirubin**, süperoksit ve hidroksil radikali toplayıcısı, **albümin** ise Lipitperoksid toplayıcısıdır. **Seruloplazmin** olasılıkla SOD'a benzer mekanizmayla etki gösterir. Ferröz demiri (Fe^{+2}) ferrik demire (Fe^{+3}) yükselterek Fenton reaksiyonunu ve böylece hidroksil radikali oluşumunu inhibe eder. **Transferrin** ve **laktoferrin** dolaşımdaki serbest demiri, **ferritin** ise dokudaki demiri bağlar. **Sistein**, süperoksit ve hidroksil radikali toplayıcısıdır. **Ebselen** selenyumlu bir bileşiktir; GSHPx aktivitesini güçlendirir ve lipoksijenaz yolunu inhibe eder. **Sitokinler** başta katalaz olmak üzere antioksidan enzimleri aktive ederler; ancak proteolitik enzimleri aktive ettikleri için zararlı da olabilirler. **Demir şelatörleri** hücre içine girerek serbest demiri bağlamak suretiyle onu etkisizleştirirler, böylece Fenton reaksiyonunu ve sonuçta hidroksil radikali oluşumunu inhibe ederler. Bu özelliklerinden dolayı reperfüzyonda kullanılmalarının faydalı olduğu kaydedilmiştir. **Desferroksamin** serbest Fe^{+3} 'ü bağlar. **Oksipürinol** allopürinolün metabolitidir, doğrudan hidroksil radikali ve hipokloriti azaltıcı yönde etki eder. **Mannitol** hidroksil radikalini toplayıcı etki gösterir (53).

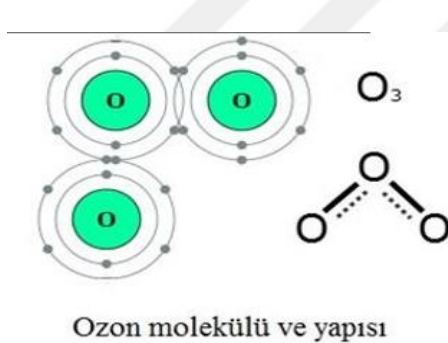
4.4. Ozon Tedavisi

4.4.1. Ozon ve Etkileri

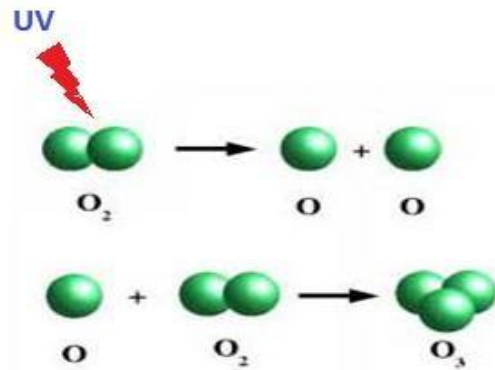
O₃ atmosferik O₂ 'nin çok enerji yüklü, üç atomlu kimyasal şeklidir (Şekil6). Oda sıcaklığında O₃ karakteristik kokusu olan bir gazdır.

Doğada stratosferde (yer yüzeyinden 25–30 km yükseklikte) UV dalgaların (<185nm) etkisiyle oksijen molekülleri parçalanır ve yüksek derecede reaktif oksijen atomu oluşur. Chapman teorisine göre oluşan bu moleküller endotermik reaksiyona girerek üç atomlu ozon gazını oluştururlar. Ayrıca yıldırım düşmesi gibi doğal olaylar sırasında da atmosferdeki oksijenin katalizlenmesi sonucu ozon gazı oluşmaktadır (54).

Ozon, yapay olarak da oksijen atomlarının üzerine uygulanan kuvvetli elektriksel akım ile oluşabilir (Şekil 7).



Şekil 6. Ozon (O₃) kimyasal formülü



Şekil 7. UV etkisiyle ozon oluşumu

Oksijen molekülü kararlı olmasına karşın, ozon (O₃) kararsızdır ve yaklaşık 20 dakika içerisinde oksijene dönüşebilir. Ozondan bu şekilde oksijen gazı oluşurken serbest kalan atom ise ortamdaki diğer moleküllere bağlanarak medikalde fayda sağlayan yapıları oluşturur (54).

Ozon, oksijen gazından daha ağır, açık mavi renkli ve keskin kokulu bir gazdır. Stratosfer tabakası içinde gaz halde 1–10 ppm konsantrasyonda bulunmaktadır (55).

Diğer gazlar (O₂, CO₂) gibi suda çözünebilir. Oksijene göre 1,6 kat daha yoğun olduğu ve suda çözünürlüğünün 10 kat (100 mL suda 49 mL O₃, 0,02 M, 0°C’de) daha fazla olduğu bilinir. Spontan yıkılır yarı ömrü 20 °C’ de 40 dakikadır ancak -111.9 0C altında likit olarak depo edilebilir. Suda hemen çözünerek O₂ gazı oluşturmaya rağmen, biyolojik sıvılarda organik ve inorganik moleküllerle tepkimeye girerek serbest radikallerin oluşumuna neden olur (56). Hemoterapi esnasında uygulanan ozon/oksijen karışımındaki ozon, sırasıyla plazmada bulunan çoklu doymamış yağ asitleriyle, antioksidan bileşiklerle ve sistein gibi sülfhidril (SH) grubu içeren tiyoller ile tepkimeye girer (54).

Ozon kimyasal yapısı itibariyle radikal özelliği taşımamakla birlikte, florin ve persülfattan sonra, bilinen üçüncü en güçlü oksidan maddedir (57).

20-40 µg/m³ ’te keskin kokusu anlaşılan ozon gazının, düşük konsantrasyonda inhalasyonu solunum yollarına, 400 µg/m³ ve üzeri konsantrasyonlardaki inhalasyonu ise akciğer ve göz için toksik kabul edilmektedir (57).

Ozonun tarihsel süreci özetlenecek olursa;

1839’da ozon, Christian Friedrich Shönbein tarafından keşfedilmiştir.

1860’da Monako şehrinin su arıtma tesisinde dezenfeksiyon amacıyla kullanılmaya başlanmıştır.

1896’da Nikola Tesla, ABD’de ilk ozon jeneratörünün patentini almıştır.

1915’de Dr. Albert Wolff tarafından ilk kez tıpta kullanımı başlatılmıştır.

1935’de Dr. Erwin Payr “Cerrahi’de Ozon Uygulamaları” başlığı altında kendi vakalarından oluşan sunumuyla ozonun tedavideki yeriyle ilgili ilk önemli bildiriği yayınlamıştır.

1960’ların sonunda klinikte rutin kullanımına da H. Wolff tarafından başlanmıştır.

1975’de Wolff tarafından otohemoterapi tariflenmiştir.

1981’de Werkmeister kronik yaraların tedavisinde ozonu kullanmaya başlamıştır (58).

4.4.2. Ozonun Kullanım Alanları

Ozon hem sanayi, hem de biyoteknolojide yaygın bir kullanım alanı bulmuştur (54).

Tablo 3. O₃'ün genel olarak kullanım alanları (54).

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

Atık suyun temizlenmesi ve yeniden işlenebilir hale getirmesinde en önemli araçlardan biri de O₃'dur. Ozon oksidasyon gücü çok yüksek olan bir gaz ve bilinen en kuvvetli dezenfektandır (59). O₃ gazının dezenfeksiyon etkisi, aynı şartlar altında klorunkinden 3125 defa daha fazladır. Spor, kist ve virüslere karşı klordan daha etkilidir (60). Ayrıca O₃, havada bulunan O₂ in parçalanması yoluyla elde edildiği için kararsız yapısı nedeniyle dezenfeksiyon görevini tamamladıktan sonra daima hammaddesi olan O₂ e dönüşür.

Bu özelliği ile gıda sektöründe kullanımını, diğer dezenfektanlara göre daha avantajlıdır (59). O₃ oksidasyon özellikleri bakımından hipoklorik asit'ten 25 kat, hipoklorit'ten 2500 kat, kloromin'den 5000 kat daha etkili olmasına karşın, onlar gibi atık ve zararlı maddeler ortaya çıkarmaz (60). O₂ molekülü, yüksek enerji ile 2 adet O₂ atomuna parçalandıktan sonra, bir diğer O₂ molekülü ile tepkimeye girerek kararsız bir molekül oluşur. Bu yeni molekül O₃ tür. Kararsız yapısı sebebiyle ortamdaki bakteri,

virüs, mantar, küf gibi istenmeyen organikleri yok ederken, demir, mangan, klor, nitrit vb. maddeleri de oksitleyerek ortamdan uzaklaştırır (59).

4.4.3. Medikal ozon elde edilmesi ve etki mekanizmaları

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

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

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

Oksijen atomlarının medikal ozon jeneratörleri ile yüksek oranda voltajdan geçmesi (yüksek voltaj gradyenti, 4000-14000V) ile oluşturulmaktadır (61).

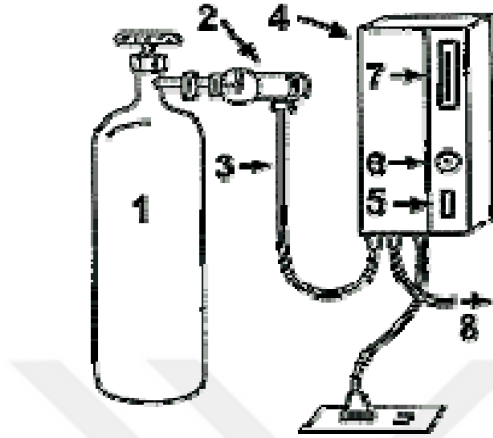


Düşük frekans voltajda plazmik deşarjlı tıbbi ozon jeneratörünün ilkesi Şekil 8'de açıklanmaktadır. Burada tıbbi ozon seri bağlanmış iki yüksek voltaj tüpünden geçmektedir. Tüpler de yaklaşık 4000 ile 9000 V arasında değişen voltaja bağlıdır.

Enerji O₂ moleküllerinin oksijen atomlarına ayrışmasını sağlar. Atomlar var olan bir O₂ molekülüyle birleşerek O₃ molekülünü oluşturur. Fazla veya kullanılmayan ozon katalitik yolla yeniden oksijene dönüştürülür (60).

Tıbbi ozon teknik ozonun tersine, saf tıbbi oksijenden hazırlanır. Normal atmosfer havasının bu karışıma girmemesi gerekir. Çünkü ozon, havadaki NO₂ ile reaksiyona girerek toksik bir gaz olan nitrojen dioksit (N₂O₂)'i oluşturabilmektedir. Endüstriyel ozon için ise hava gazı kullanılabilir. İstenen doz ve konsantrasyonda ozon/oksijen karışımı elde edilebilir. Konsantrasyon oranları, ozon/oksijen karışım oranlarına göre (%0.05 O₃-%5 O₃) 1-100 mikrogram/mililitre arasında değişir. Ozon molekülü sabit olmadığı için tıbbi biçimi her zaman taze olarak çalışma yerinde hazırlanır ve anında uygulanır (60). Ozonun saf olarak verilmesi oldukça tehlikeli olduğundan tedavi öncesinde mutlaka belli oranda oksijenle karıştırılmalıdır. Karışım içerisinde

oksijen %95 'den az ozon %5'ten fazla olmamalıdır. Ayrıca emboliye neden olmaması için ozon gaz olarak doğrudan damar içerisine verilmemeli, dışarıda kan ile iyice karıştırdıktan sonra infüzyon yapılmalıdır. Ozon ile temasta mutlaka ozona dayanıklı malzemenin (paslanmaz çelik, nötral cam ve teflon) kullanılması gerekir (54).

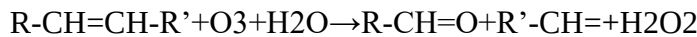


1. Oksijen tüpü, 2. Oksijen akım regülatörü, 3. Oksijen çıkış tüpü, 4. Ozon jeneratörü, 5. Güç kaynağı, 6. Konsantrasyon regülatörü, 7. Akım ölçer, 8. Ozon çıkışı

Şekil 8. Ozon jeneratörü yapısı (60)

HT (Majör Otohemoterapi) esnasında uygulanan ozon/oksijen karışımındaki ozon afinite sırasıyla çoklu doymamış yağ asitleriyle, antioksidanlarla ve sistein gibi sülfhidril (SH) grubu taşıyan tiyol bileşikleriyle reaksiyona girer.

Ozonun miktarına bağlı olarak karbonhidratlar, proteinler (dolayısıyla da enzimler), DNA ve RNA da bu reaksiyondan etkilenebilir. Tüm bu bileşikler ozon karşısında elektron donörü gibi davranarak oksitlenirler. Sonuçta süperoksit (O₂), hidrojen peroksit (H₂O₂) ve hipoklorik asit (HClO) gibi reaktif oksijen türevleri (ROT) oluşur. Bu reaksiyonlardan en önemlisi doymamış yağ asitlerinin oksidasyonudur. Ana reaksiyon aşağıdaki gibidir (54).



Bu reaksiyonda her hidrojen peroksit ile birlikte iki de lipit oksidasyon ürünü (lipid oxidation products; LOP) oluşmaktadır (62). Lipit oksidasyon ürünleri için iyi bilenen örnekler şunlardır; lipoperoksil radikalleri, hidroperoksitler, malondialdehit, izoprostan, alkenaller ve 4-hidroksi-2,3-trans nonenal (HNE) (63, 64). Görülüyor ki, ozonun biyolojik etkilerinin ortaya çıkması için serbest radikallerin varlığı önemlidir.

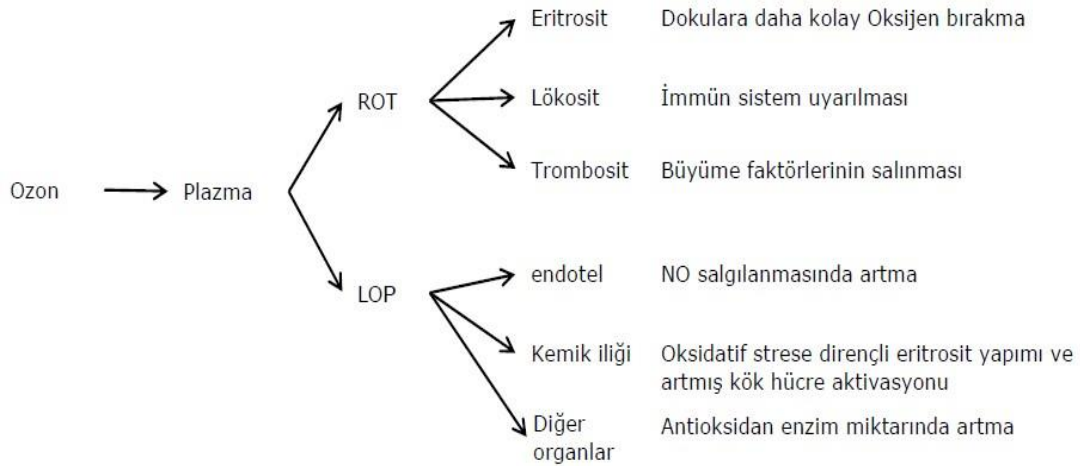
Ozonun biyolojik etkilerini açıklamak için yapılan çalışmalarda daha çok HT tedavisi model alınmıştır (54). HT esnasında uygulanan ozon/oksijen karışımındaki ozon plazmada hızla çözünür. Daha önce bahsedildiği gibi sıvılardaki çözünürlüğü fazla olan ozonun bir kısmı plazmada bulunan antioksidanlar ile reaksiyona girerek bunların miktarlarını azaltır. Bu anlık olaylar sırasında çeşitli ROT de oluşabilmektedir. Bu radikallerin yarı ömrü çok kısa olduğu için, daha kan hastaya geri verilemeden, yani ototransfüzyondan önce bunlar ortadan kalkarak yerlerini lipit oksidasyon ürünlerine bırakırlar.

Bu ürünler, büyük oranda kandaki hakim hücre olan eritrositlerin membranlarının oksidasyonu ile ortaya çıkar. Eritrosit membranındaki doymamış yağ asitleri oksidasyona çok duyarlıdır. Yukarıda formülünü de gösterdiğimiz üzere, bu reaksiyonlar sırasında ortaya çıkan hidrojen peroksit, molekül yapısı itibariyle radikal olmayan oksitleyici bir moleküldür (54, 65).

Hidrojen peroksitin ozonun tedavi edici etkinliklerinin bir kısmından sorumludur ve ikincil habercisi gibi davrandığı kabul edilmektedir. İlk etkilerinden biri eritrositlerde 2,3-difosfogliserat düzeyini artırma yoluyla hemoglobin-oksijen ayrışma eğrisinin sağa kaymasına ve böylece oksijenin dokulara daha kolay bırakılmasına neden olmasıdır. Plazmada konsantrasyonu artan hidrojen peroksit kolayca hücrelerin içine diffüze olarak, lökosit ve endotelial hücrelerde çeşitli interferon, interlökin ve transforme edici büyüme faktörü (TGF) yapımını da artıran uyarıları tetikler (66).

Lipit oksidasyon ürünlerinin yarı ömürleri ise saatlere varabilmekte, dolayısıyla ömrü çok kısa olan ROT'lerin ilk etkileri sonrasında ozonun gecikmiş etkilerinden sorumlu tutulmaktadır. Uzun yarı ömürlerinden dolayı bu ürünler ototransfüzyon ile vücuda verilmiş olur ve dolaşım yoluyla dokulara ulaşarak buralarda çeşitli biyolojik etkiler gösterirler (54, 66, 67).

HT tedavisi yapılmadan önce kanın antikoagülan verilerek hazırlanması gerekir. Çünkü ozon doza bağlı olarak trombosit fonksiyonlarının artışına neden olmaktadır. Trombosit fonksiyonlarındaki artışın bazı yararlı sonuçları da olmaktadır. Aktive olmuş trombositler içlerinde bulunan büyüme faktörlerini salarak iskemi ve ülserli hastalarda iyileşmeye olumlu katkı sağlar (62). HT sonrası ozonlanmış kanın vücuda verilmesi ile oluşan terapötik etkileri Şekil 9'da gösterilmiştir (54).



Şekil 9. Ozon Tedavisinin Etkileri. (ROT: Reaktif oksijen türevleri, LOP: Lipit oksidasyon ürünleri (Lipid oxidation products))

Ozonun konsantrasyonuna bağlı olarak artan kuvvetli okside edici özelliği nedeniyle belli bir orandan sonra vücut için de toksik etkisi olabileceği gerçeğini unutmamak gerekir. Plazmanın sahip olduğu geniş antioksidan kapasite ve eritrositlerdeki antioksidan enzimler nedeniyle, kan ozon toksisitesine karşı en dirençli dokudur. HT sonucu ortaya çıkan ROT artışı ve antioksidanların azalması geçici bir durumdur.

Bocci ve Carlo, yaptıkları çalışmada değişik dozlarda (20, 40, 60, 80 µg/ml) ozon uygulanmış kanlarda dozla doğru orantılı olarak glutatyon ve total antioksidan seviyesinde azalma, lipit peroksidasyonu ve okside glutatyon düzeyinde artma olduğunu göstermiş, uygulamanın 20 dakika sonrasında ise antioksidan düzeylerinin eski haline döndüğünü tespit etmişlerdir (54).

HT uygulaması sırasında tedavinin etkinliğini kanın toplam antioksidan gücü belirlemektedir. Kanın antioksidan kapasitesi düşük, ozonun konsantrasyonu fazla olursa şiddetli membran oksidasyonu sonucu eritrositler hemolize olur, tam tersi olduğunda ise ozondan beklenen ROS ve hidrojen peroksit yanıtı yeterli olmayabilir ve arzulanan terapötik etki görülemeyebilir.

4.4.4. Medikal Ozon Uygulama Biçimleri

4.4.4.1. Sistemik uygulama biçimleri

4.4.4.1.1. Major Otohemoterapi: Son yıllarda MAH düşük riskli ozon uygulamalarının en önemli biçimi haline gelmiştir. Bu reaksiyon hastanın vücudu dışında gerçekleşmekte; bundan sonra hastanın “kendi kanı” aktif alyuvar hücreleri ile re-infüzyona sokulmakta ve immuno-kompetan hücreler aktive olmaktadır.

İşlem sırasında tek kullanımlık steril malzeme kullanılır. İşlem kapalı, basıncı alınmış bir sistem içinde yapılır. Ozonla çalışırken her zaman ozona dirençli malzeme kullanılmalıdır. Hastanın 50–100 ml kanı alınır, organizma dışında uygun dozda ozon ile zenginleştirilir. Ozon/oksijen karışımı, kandan son derece ince kabarcıklar biçiminde geçirilir. Dakikada 60–90 damla olacak şekilde kan hastaya geri verilir.

Bu yöntemin en önemli endikasyonları; arteriyel dolaşım bozuklukları, enfeksiyonlar, bağışıklık yetersizliğinden kaynaklanan hastalıklar, kanser hastalarının ek tedavisi, romatizmal hastalıklar ve eklem iltihaplarıdır (60, 68, 69).

4.4.4.1.2. Minör Terapi: Bir diğer uygulama şekli olan minör hemoterapide ise hastadan alınan 5 ml kan ile aynı miktarda 80–100 µl/ml konsantrasyonundaki oksijen/ozon karışımı bir dakika inkübe edilir. Bu sürede ozonun, yine aynı şekilde önce kanda çözünüp sonra da biyolojik moleküller ile reaksiyona girmesi beklenir. Sonrasında bu kan, gluteus kasına yavaşça enjekte edilir.

Bu işlem esnasında anesteziye gerek yoktur. Tartışmalı olmakla birlikte, bu uygulamanın immünomodülatör bir etkisinin olduğu iddia edilmektedir.

4.4.4.1.3. Rektal O3/O2 insüflasyonu: En eski sistemik ve lokal uygulama yollarından biri, ozon gazının rektal uygulanmasıdır (70). Sistemik olarak MAH’ye gerçek bir alternatif oluşturmuştur. Bu yöntemle yaklaşık 10–12 insüflasyonluk bir dizinin uygulanmasını takiben MAH’ın sonuçları ile uyumlu bir metabolik değişim elde edilir. Rektal insüflasyon, katetere bağlı ozona dirençli şırınga yardımıyla veya bir ozon konteyneri ile silikon doz çantası kullanılarak gerçekleştirilir. Kural olarak 150–300 mL ozon/oksijen karışımı uygulanır.

İşlemin en fazla kanıtlanan endikasyonları; sistemik olarak MAH'de, özellikle de intravenöz reinfüzyonun damarların uygun olmaması nedeniyle uygulanamadığı yaşlı hastalar; topikal olarak bağırsaklarda proktit ve kolit gibi patolojik durumlar ve çocuklarda bir enfeksiyonun diğerini izlediği, bağışıklık sisteminde zaafiyet olan pediatrik enfeksiyonlardır (71, 72).

4.4.4.2. Topikal Uygulamalar

4.4.4.2.1. Düşük basınçlı ozon gazı uygulaması: Düşük basınç terimi normal atmosfer basıncının altındaki değerler için kullanılmaktadır. Kendini sınırlı yaralarda, ozon gazının düşük atmosferik basınçta ve bir emme kabı altında sürekli akışının olumlu etkisi daha önce yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (12). Burada ozon/oksijen karışımı plastik kap biçimindeki cihazdan sürekli olarak tedavi edilecek bölgeye akıtılır. Bölge daha önce suyla ıslatılır, O₃ geri çekilir ve kataliz aracılığıyla yeniden O₂'ye dönüştürülür.

Basınç kişiye göre ayarlanabilir ve lezyonun özelliklerine göre değiştirilebilir. Tedavinin özellikle dekübitis, radyasyon tahribatında ve fistüllerde yararlı olduğu bilinmektedir (60).

4.4.4.2.2. Transkutanöz ozon imersiyonu: Varis ülserleri ve geniş alana yayılan enfekte olmuş yaraların tedavisinde ozona dirençli plastik çanta ve/veya torbaların kullanılması pratik olmaktadır. Hem çanta hem torbalara uygun bir bağlantı parçası ve açma/kapama muslukları takılmıştır. Yara işlem öncesinde bol suyla yıkanır. Plastik çanta yara üzerine dikkatle yerleştirilir. Bir bandaj yardımı ile gaz kaçağı önlenir. Hava, önce açma/kapama musluğu kullanılarak çantadan çıkarılır ve belirlenmiş konsantrasyondaki ozon/oksijen karışımı ile doldurulur. Ülser veya yara bölgesinin 15 dakika boyunca karışım ile temas etmesi yeterlidir. Kalan atık ozon katalizör kullanılarak oksijene dönüştürülür ve solunum yoluyla ilgili her türlü sorun elimine edilmiş olunur (60, 68, 71).

4.4.4.2.3. Ozonize su uygulaması: Yakın zamanda yapılmış cerrahi müdahaleler de dahil olmak üzere enfekte olmuş her türlü yaraya karşı topikal uygulama için endikedir.

Ozonize su kompresler biçiminde uygulanabilir. Ozonize H₂O kompresleri, özellikle ödem oluşumu gibi inflamatuvar süreçlerin başlangıç aşamalarında, hızlı ve önemli ölçüde ağrı gidericidir. (60, 68, 71).

Ozonize su çift damıtılmış sudan taze olarak hazırlanır. Bu suyun ml'si azami 20 µg ozon absorbe eder, oda sıcaklığında yarı ömrü yaklaşık 10 saattir. +4oC'de bu süre 5 güne çıkar, yani ozonize suyun evde kullanılması da mümkündür. Ozonize su güvenilir bir maddedir. Pratik olarak herhangi bir gaz açığa çıkarmadığı için havaya ozon karışmaz. Daha çok lokal yara tedavisinde kullanılan tedavinin en önemli endikasyonları; yeni yaralar, enfekte yaralar, mantar enfeksiyonları, liken veya küfler, zona, herpes zoster, otitis eksternadır (66).

4.4.4.2.4. Topikal rektal insüflasyon: Kolit ve proktit tedavisinde kullanılmaktadır. (71, 72).

4.4.4.2.5. İntraartiküler ozon enjeksiyonu: İntraartiküler ozon enjeksiyonu daha çok travma ile uğraşan bölümler tarafından kullanılır ve başta diz ve omuz eklemleri olmak üzere akut ve kronik ağrılı eklem rahatsızlıklarında yararlı ve etkin olduğu kanıtlanmıştır.

En önemli endikasyonları; gonartrozis, akut omuz eklemleri sorunu, kısmi sınırlı hareket fonksiyonu, kronik omuz eklemi hastalıkları, ağrılı hareketlerin tedavisidir (73, 74).

4.4.5. Ozon tedavisinde klinik endikasyonlar ve terapötik doz ayarlanması

Medikal ozon tedavisi klinik endikasyonlar:

- Kronik inflamasyon ile seyreden solunum sistemi hastalıkları (87)
- Astım
- Kronik obstrüktif akciğer hastalığı
- Otoimmün hastalıklarda non-spesifik immunomodülasyon amacıyla (84)
- Romatoid artrit, Multipl skleroz, Sistemik Lupus Eritromatozis, Behçet hastalığı gibi hastalıklarda yardımcı tedavi olarak
- Virüslere bağlı hastalıklar (81, 82)
- Viral hepatitler (hepatit B ve C)
- Herpes ve Papillomavirus enfeksiyonları

- Zor iyileşen ülserlerin tedavisinde (77, 80)
- Diyabetik ayak
- Dekubitüs ülserleri
- İltihabi barsak hastalıkları (Crohn, ülseratif kolit, proktit)
- Yanıklar
- Bakteri ve mantar infeksiyonları
- Vasküler oklüzyona bağlı özellikle bacaklarda ortaya çıkan ülserler
- Geriatrik şikayetlerde (83)
- Kronik yorgunluk, halsizlik, genel vücut ağrısı
- Egzersiz yaparken ortaya çıkan yorgunluk ve bacaklarda dolaşım bozukluğuna bağlı ortaya çıkan ağrı ve ödem
- Yaşa bağlı maküler dejenerasyonda
- Cinsel fonksiyonların desteklenmesi (83)
- Diyabetin erken evrelerindeki ereksiyon kaybının tedavisinde
- Depresyon ve duygu durum bozukluklarına bağlı cinsel isteksizliklerin ve ereksiyon sorunlarının giderilmesi
- Kalp yetmezliği olan hastalarda non-spesifik immunmodülasyon (minor AHT) ve antioksidan sistemi desteklemek (major AHT) amacı ile (85)
- Vasküler bozukluklar ve damar endotel hasarına bağlı durumlarda (86)
- Diyabet hastalarında damarların hasarlanması sonucu ortaya çıkan dolaşım bozuklukları ve doku hasarının (göz, böbrek, sinir) azaltılmasında
- Fibromiyaljide ortaya çıkan bölgesel dolaşım bozukluğunun giderilmesi
- Özellikle sigara içimine bağlı dolaşım bozukluklarının giderilmesi

Ozonun sahip olduğu oksidatif etkisinden dolayı doz hesaplaması son derece önemlidir, düşük doz uygulamalarda herhangi bir tedavi edici etkisi ortaya çıkmazken, yüksek doz uygulamalarda toksik etkisi ortaya çıkar. Tedavi etkisi olan 10-80 µl/ml doz aralığında uygulanması halinde, kanda ve diğer dokularda bulunan enzimler, hidrofilik ve lipofilik antioksidan sistemler tarafından aktif hale getirilir ve ozon tedavisinin etkisi ortaya çıkar (77).

4.4.6. Ozon tedavisinde kontraendikasyonlar ve yan etkiler

Medikal ozonun yüksek düzeyde toksik olması sebebiyle solunum yoluyla verilmesi ve hava embolisi riski nedeniyle direkt venöz uygulama kesinlikle kontrendikedir. Ciddi G6PDH eksikliği (Favizm), anjiotensin dönüştürücü enzim (ACE) inhibitörü kullanımı (ani hipotansiyon riski nedeniyle), astım, hipertiroidizm, kanama bozukluğu (trombositopeni), kardiyak patolojiler (yeni geçirilmiş kalp krizi, kontrol altına alınamayan kardiyovasküler hastalıklar), kronik pankreatitte kullanımı kontrendike olarak kabul edilmektedir (75).

Başta vitamin C ve E olmak üzere tüm antioksidan tedaviler ozon uygulamasının etkinliğini azalttığı için tedavi öncesi kesilmelidir. Tedavi süresince antioksidan moleküllerden zengin gıdalar çok miktarda tüketilmemelidir (76).

Uygun doz ve şekilde verildiği takdirde yan etkisi yok denecek kadar azdır. Ozon gazının konsantrasyonu, ortamın sıcaklığı, nem ve maruziyet süresi advers etkilerinin ortaya çıkışında önemli faktörlerdir (50). En sık rastlanılan yan etki hemolizdir (77).

Solunum sistemine olan yan etkileri konsantrasyon ve maruziyet süresiyle doğru orantılıdır. Akut maruziyette, 0.35 ppm'ye kadar oranlarda hafif belirtiler ortaya çıkarken 0.35-0.75 ppm arasındaki akut maruziyetlerde dispne, öksürük, boğaz kuruluğu, bulantı ve kusma gibi belirtiler görülür. 1 ppm'in üzerindeki maruziyetlerde ise akciğer fonksiyonlarında azalma, aşırı yorgunluk, baş dönmesi, konsantrasyonda güçlük ve siyanoz görülebilir. 9 ppm gibi yüksek konsantrasyonlara maruziyette hava yollarında inflamasyon başlar. 11 ppm gibi bir orana 15 dakika maruziyet tam bilinç kaybına neden olur. 50 ppm'ye 30 dakika maruziyet ise ölümcül olarak kabul edilir. Kronik etkilenimde ise baş ağrısı, sıkışma hissi, pulmoner ödem, burun ve boğazda irritasyon görülebilir (78). Ozonun karsinojen, terotojen ya da embriyotoksik olup olmadığı konusunda ise yeterli çalışma yoktur (79).

5. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma, İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Kalp ve Damar Cerrahisi, Biyokimya Anabilim Dalları tarafından Ağustos -Aralık 2018 tarihleri arasında İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü'nde yapıldı. Çalışma öncesinde, İstanbul Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunun (İ.Ü. HADYEK), 31.05.2018 tarihli oturumunda onay alındı (Ek-1). Çalışma için İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi kapsamında destek sağlanmıştır (BAP Proje ID: 31664) (Ek-2).

5.1. Deney Hayvanları

Bu çalışmada İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü'nden temin edilen ve ortalama ağırlıkları 200-400 gr olan toplam 21 adet erkek Wistar Albino cinsi sıçan kullanıldı. Sıçanlar rastgele ve kontrol grubu 5, diğer iki grup 8 adet olacak şekilde üç gruba ayrıldı. Sıçanlar deney öncesi 7 gün süre ile tel kafeslerde 12 saat gündüz 12 saat gece sirkadyen ritimde, ortam sıcaklığı 24-26 santigrat derece ve nem oranı % 50-60 olacak şekilde tutuldu. Sıçanların beslenmesinde standart ticari pellet yemi ve şehir içme suyu kullanıldı. Tüm sıçanların bakımları, Tıbbi Araştırmalar Ulusal Derneği tarafından biçimlendirilen 'Deney Hayvanlarının Bakım Prensipleri'ne ve Laboratuvar Hayvanı Kaynakları Enstitüsü tarafından yeniden düzenlenen 'Laboratuvar Hayvanlarının Bakım ve Kullanımı için Klavuzu'na uygun olarak yapılmıştır.

5.2 Anestezi ve Cerrahi prosedür

Tüm sıçanlar deney öncesi hassas terazide tartıldı, ağırlıkları kayıt edildi (Şekil 10). İntraperitoneal 50-60 mg/kg ketamin hidroklorür (Ketalar®, Parke-Dawis, Pfizer, İstanbul, Türkiye) ve 5 mg/kg ksilazin hidroklorür (Rompun®, Bayer AG, Leverkusen, Almanya) uygulaması sonrası anestezi derinliği her 15 dakikada bir, kuyruktan ağrı verilerek değerlendirildi (Şekil 11). Bu dozun 1/3'ü gerektiğinde intramuskuler olarak tekrarlandı.

Cerrahi girişim, enjeksiyonlar ve kan alınması anestezi altında yapıldı. Anestezi süresince denekler, solunum desteğine ihtiyaç duymadan, oda havasında izlendiler.

Deney sırasında gelişebilecek hipotermiyi önlemek amacıyla, cerrahi girişim ısıtıcı lamba altında yapıldı ve vücut sıcaklığı rektal termometre ile ölçülerek 37°C civarında tutuldu.

Sıçanlar supin pozisyonda ameliyat masasına yatırıldı. Karın orta hattı traş edildi (Şekil 12). Operasyon bölgesi dezenfekte edildikten sonra median laparotomi insizyonu yapıldı. Kontrol grubundaki sıçanlara deri altı kesi ve median laparotomi yapıldı, aorta ile ilgili herhangi bir işlem yapılmadan katlar anatomisine uygun olarak kapatıldı. Diğer sıçanlarda laparotomi sonrasında yüzeysel mikrodisseksiyon yapıldıktan sonra derin mikrodisseksiyon ile retroperitoneal bölgede infrarenal abdominal bulundu, ipek sütür ile döndü (Şekil 13). İntravenöz 100Ü/kg dozunda heparin uygulamasını takiben 5dk sonra infrarenal abdominal aorta atravmatik bulldog klemp ile 60 dk süreli olarak oklüde edildi (Şekil 14). Isı kaybı ve sıvı kaybını önlemek amacı ile laparotomi insizyonu klempaj süresince kapatıldı.

60 dakika sonunda laparotomi insizyonu yeniden açılarak aorta üzerindeki klemp kaldırıldı ve laparotomi insizyonu tekrardan kapatılarak 120 dk süre ile alt ekstremité reperfüzyonu sağlandı (Şekil 15). Reperfüzyon süresi bitince kontrol grubu da dahil olmak üzere tüm sıçanlar intraperitoneal olarak yüksek doz anestezi madde (135 mg/kg sodyum pentotal) verilerek sakrifiye edildikten sonra uygun kan örnekleri alındı, gastrocnemius kas dokusu biyokimyasal değerlendirme için çıkarıldı (Şekil 16), azot tankında hemen dondurularak deneyler yapılana kadar -80 c de bekletildi. Serum eldesi için kan örnekleri 2500 rpm’de santrifüj edildi.

5.3. Deney Modeli

Çalışmada kullanılması planlanan toplam 21 sıçan 3 gruba ayrıldı:

A grubu: Kontrol grubu (5 adet)

B grubu: Alt ekstremité iskemisine maruz bırakılan sıçan grubu (8 adet)

C grubu: Ozon tedavisi uygulanmış, alt ekstremité iskemisine maruz bırakılan sıçan grubu (8 adet)

A grubunda bulunan sıçanlar (kontrol grubu) anestezi verilerek sadece deri altı kesi + laparotomi insizyonu yapıldı. Hayvanlar cerrahi stres altında bırakıldıktan sonra laparotomi, cilt ve ciltaltı insizyonları kapatıldı. Hayvanlar cerrahi stres sonrası sakrifiye edildi.

B grubunda bulunan sıçanların (iskemi-reperfüzyon grubu) anestezi sonrası infrarenal abdominal aortaları 60 dk süreyle klempe edilerek alt ekstremitede iskemi oluşturuldu. Sonra klempler kaldırılarak 120 dakika süre ile reperfüzyon gerçekleştirildi. Sıçanlar reperfüzyon sonrası sakrifiye edildi.

C grubunda bulunan sıçanlara (Ozon+iskemi-reperfüzyon grubu) işlem öncesi intraperitoneal yolla 20 mcg/ml dozda medikal ozon 4 gün boyunca her gün tek doz olarak uygulandı. Sıçanların anestezi sonrası infrarenal abdominal aortaları 60 dk süreyle klempe edilerek alt ekstremitede iskemi oluşturuldu. Sonra klempler kaldırılarak 120 dakika süre ile reperfüzyon gerçekleştirildi.

Sıçanlar reperfüzyon sonrası sakrifiye edildi. Tüm gruplarda bulunan sıçanların sakrifiye edilmesinden sonra uygun kan örnekleri alındı, gastroknemius kas dokusu biyokimyasal değerlendirme için çıkarıldı, azot tankında hemen dondurularak deneyler yapılana kadar -80 c de bekletildi. Serum eldesi için kan örnekleri 2500 rpm’de santrifüj edildi.



Şekil 10. Şıçanların hassas tartıda tartılması



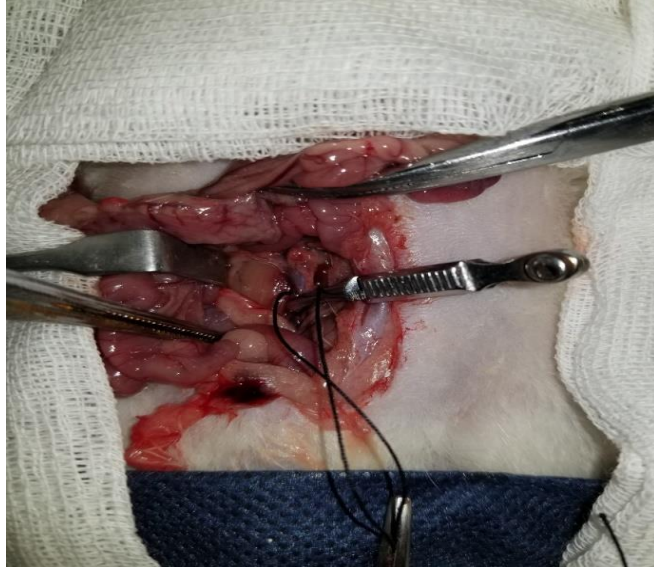
Şekil 11. Sıçanlarda intraperitoneal enjeksiyon uygulaması



Şekil 12.Anestezi sonrası laporotomi insizyonu için hazırlanan sıçan



Şekil 13. İnfrarenal abdominal aortanın diseksiyonu ve ipek suturele dönülmesi



Şekil 14. İnfrarenal abdominal aortanın atravmatik olarak klempe edilmesi



Şekil 15. Laporotomi insizyonunun kapatılması



Şekil 16. Biyokimyasal inceleme için uygun kas örneklerinin alınması

5.4. BİYOKİMYASAL İNCELEMELER

5.4.1. Gereçler

- a. Homojenizatör (Ultra-Turrax T25 / Janke & Kunkel Ika Labortechnik)
- b. Spektrofotometre (Ultrospec 2000 / Pharmacia Biotech)
- c. Mikrosantrifüj (Biofuge / Heraeus Instruments)
- d. Masaüstü soğutmalı santrifüj (Megafuge 1.0 R / Heraeus Instruments)
- e. Thermo Electron Corporation Fluoroskan Ascent FL
- f. pH metre (HI 9321 microprocessor pH meter)
- g. Su banyosu (Electromag)
- h. Vorteks (Ika MS2 Minishaker)
- i. Manyetik karıştırıcı ve ısıtıcı (Ika Labortechnik)
- j. Hassas terazi (AND HR-120)
- k. ELISA mikroparka okuyucusu (Bio-tek Elx-800 ve µQuant)
- l. Pipet takımı (Eppendorf)
- m. Doku Takip Cihazı (Thermoshandon Excelcior)

5.4.2. Serumda yapılan incelemeler

ROS ölçümü (88): Bu metod 2,7-diklorodihidrofloresein diasetat (DCFH-DA)'ın esterazlar ile 2,7-diklorodihidrofloresein (DCFH)'e dönüşmesi ve oluşan bu ürünün ortamdaki ROS tarafından floresans veren 2,7-diklorofloresein (DCF)'e oksitlenmesi prensibine dayanır.

Ayıraçlar:

Tamponlanmış tuzlu su (PBS) (pH: 7.4): 17.6 mL 0.5 M KH₂PO₄ ve 60.8 mL K₂HPO₄ karıştırıldı, pH'sı 7.4'e ayarlanarak distile su ile 1000 mL'ye tamamlandı (0.05 M fosfat tamponu). Bundan 100 mL alındı ve üzerine 1000 mL % 0.9 NaCl eklenerek PBS hazırlandı.

DCFH-DA: 5 mM'lık ana çözelti % 99 DMSO ile hazırlandı ve -20°C'de saklandı. Çalışma öncesi 1 mM olacak şekilde PBS ile sulandırıldı.

İşlem:

0.2 mL 10 kez sulandırılmış serum örneği alındı. Üzerine 0.02 mL 1mM DCFH-DA çözeltisi eklendi. Çalkalayıcı su banyosunda 37°C'de 30 dakika inkübe edildi. Ayrıca deney körü hazırlamak için, aynı miktar sulandırılmış serum üzerine 0.02 mL PBS eklendi ve aynı koşullarda inkübe edildi. Süre bitiminde deney körü ile deney tüplerinden alınan 0.2 mL'lik örnekler koyu renkli mikrolplaka kuyucuklarına pipetlendi ve hızla florometrik mikrolplaka okuyucuda (λeksitasyon:485 nm, λemiyon:538 nm) okundu (Thermo Electron Corporation Fluoroskan Ascent FL). Sonuçlar rölatif floresan ünite (RFU) olarak verildi.

MDA düzeyleri tayini (89): Tiyobarbitürik (TBA) asit kullanılarak asit ortamda TBA ile MDA'nın oluşturduğu kompleks spektrofotometrik olarak ölçüldü.

Ayıraçlar:

Buege-Aust ayırıcı: 375 mg TBA bir miktar distile suda eritildi. Üzerine 15 mL %100'lük triklorasetik asit ve 2.1 mL derişik hidroklorik asit (HCl) eklendi, karıştırıldı ve hafifçe ısıtılarak çözündükten sonra distile su ile 100 mL'ye tamamlandı.

1,1,3,3-tetraetoksipropan (TEP) standardı: 22 mg TEP 10 mL distile suda

çözünerek 10 mM'lık ana standart hazırlandı. Daha sonra bu ana standart 1000 kez sulandırılarak 10 μ M'lık çalışma standardı hazırlandı.

İşlem:

0.5 mL serum üzerine 0.50 mL PBS ve 2 mL Buege-Aust ayırıcı eklendi. Kaynar su banyosunda 15 dakika tutuldu. Soğuduktan sonra 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek elde edilen süpernatantın absorbansı köre karşı okundu. Ayrıca kör ve standart tüpler hazırlandı. Sonuçlar ekstinksiyon katsayısı ($\epsilon=1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) ve standardın absorbansı değerlendirilerek hesaplandı.

AOPP düzeyleri tayini (90): Başlıca ditirozin içeren çapraz bağlı protein ürünleri olan AOPP tayini için serum örneklerinin sitrik asit içeren asit ortamda verdiği absorbanslar 340 nm.'de okundu. Sonuçlar kloramin-T ile potasyum iyodürün (KI) oksidasyonu ile oluşan triiyodid ile standardize edilerek karşılaştırıldı.

Ayırıcılar:

0.2 M sitrik asit

1.16 M KI

Kloramin-T stok standardı (100 mM): 227.6 mg kloramin-T 10 mL'de çözüldü ve sulandırılarak 25, 50 ve 100 μ M'lık çalışma standartları hazırlandı.

İşlem:

Mikroplaka kuyucuklarına 0.04 mL serum ve 0.16 mL 0.2 M sitrik asit konuldu (deney). Ayrıca 0.190 mL 0.2 M sitrik asit ve 0.01 mL 1.16 M potasyum iyodür içeren (kör) ve 0.190 μ L kloramin-T (25, 50 ve 100 μ M; 0.2 M sitrik asitte hazırlandı) ve 0.01 mL 1.16 M KI içeren (standart) kuyucuklar hazırlandı ve 2 dakika sonra kör tüpe karşı deney ve standardın absorbansları 340 nm'de μ Quant mikroplaka okuyucuda belirlendi. Sonuçlar μ mol/L kloramin-T eşdeğeri olarak verildi.

Antioksidan kapasite (Ferric Reducing Antioxidant Power; FRAP) (91): Bu yöntemin prensibi Fe^{+3} 'ü Fe^{+2} 'ye indirgeyen antioksidan gücün ölçülmesine dayanır. Sonuçlar askorbik asidin indirgeme potansiyeli ile karşılaştırılarak hesaplandı.

Ayır   lar:

40 mM HCl

300 mM Asetat tamponu (pH 3.6): 3.1 g Na-asetat (3H₂O) 100 mL kadar distile suda eritildi, 16 mL asetik asit eklendi ve ayıracın pH'ı 3.6'ya ayarlandı ve distile su ile litreye tamamlandı.

10 mM 2,4,6-tripridil-s-triazin (TPTZ): 31.2 mg TPTZ tartıldı ve 10 mL 40 mM HCl'de eritildi.

20 mM FeCl₃ (6H₂O): 54 mg FeCl₃ (6H₂O) 10 mL distile suda        .

Askorbik asit standartları: 500 ve 1000   M (sudaki       )

FRAP ayıracı: Asetat tamponu, TPTZ ve FeCl₃ ayır   ları sırası ile 10:1:1 olacak      de karı   tırılarak hazırlandı.

     :

Mikroplaka kuyucuklarına 0.01 mL serum ve 0.2 mL FRAP         ayıracı konuldu, 37  C'de 4 dakika ink   be edildikten sonra mikroplaka okuyucuda 593 nm'de absorbanslar okundu. Ayrıca 0.01 mL askorbik asit (500 ve 1000   M) ve 0.2 mL FRAP         ayıracı i      standartlar hazırlandı. 1 mM askorbik asidin FRAP de   eri 2000 olarak kabul edilerek sonu   lar   M olarak verildi.

Cu-Zn-SOD aktivitesinin         (92): SOD aktivitesi, riboflavin ile duyarlandırılmış o-dianisidinin fotooksidasyon hızını artırma yetene   i olarak        . Riboflavinin floresans ı      etkisiyle olu   turdu   u O₂⁻, ortamdaki SOD'un etkisiyle H₂O₂'e d       r. H₂O₂ ise o-dianisidin ile reaksiyona girerek renkli   r   n olu   turur. Olu      renkli   r   n 460 nm'de spektrofotometrik olarak saptanır.

Ayır   lar:

0.1 mM EDTA i        50 mM potasyum fosfat tamponu (pH 7.8)

0.2 mM riboflavin: 7.3 mg riboflavin 100 mL 10 mM potasyum fosfat tamponunda (pH 7.5)'de        .

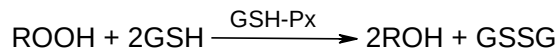
6 mM o-dianisidin: 19 mg o-dianisidin 10 mL distile suda çözündü.

SOD (100 IU/mL) standardı: Sigma firmasından sağlanan SOD standardı 100 IU/mL olacak şekilde soğuk distile su ile sulandırıldı. Daha sonra bu ana standarttan 0.1 ve 0.05 mL alınarak deney ortamında 10 ve 5 IU SOD standardının bulunması sağlandı.

İşlem:

Kör, standart ve deney tüplerine sırası ile 2.6 mL 50 mM potasyum fosfat tamponu (pH:7.8), 0.1 mL o-dianisidin ilave edildi. Kör tüpüne 0.1 mL distile su; standart tüpüne 0.1 mL standart; deney tüpüne serum 0.1 mL eklendi. Daha sonra her tüpe 30 saniye ara ile 0.2 mL riboflavin kondu, karıştırıldı ve 460 nm'deki absorbans değerleri hızla okundu. Tüpler 20W floresans lamba içeren 37°C'ye ayarlanmış özel bir kutuya yerleştirildi ve tam 8 dakika süre ile floresans ışığa maruz bırakıldı. Sürenin bitiminde tüplerin absorbansı tekrar 460 nm'de okundu ve iki absorbans arasındaki fark alındı. Ayrıca deney körü ve standart için de aynı işlemler yapıldı. Sonuçlar IU/ml olarak verildi.

GSH-Px aktivitesinin ölçülmesi (93): GSH-Px aktivite tayini birbirini izleyen iki reaksiyona dayanır. Birinci reaksiyonda H₂O₂ veya organik hidroperoksitler (ROOH), GSH-Px etkisi ile indirgenirken, ortamdaki GSH oksitlenmiş GSH'a (GSSG) dönüşür. İkinci reaksiyonda GSSG, GSH- redüktaz (GSH-R) etkisi ile tekrar GSH'a, NADPH ise NADP⁺'ye oksitlenmektedir. Bu dönüşüm 340 nm'de absorbansda azalma olarak izlenir, NADPH 340 nm'de bir absorbans verdiği halde, NADP⁺ bu dalga boyunda absorbans vermemektedir.



İşlem:

GSH-Px aktivitesi, 1 mL'lik hacimde son konsantrasyonlar 50 mM potasyum fosfat tamponu (pH 7.0), 1 mM EDTA, 1 mM sodyum azid, 0.2 mM NADPH, 1 mM GSH, 0.5 IU/mL glutatyon redüktaz (GSH-R), 1.2 mM kumen hidroperoksit ve enzim kaynağı içerecek şekilde hazırlanmış ortamda 37°C'de tayin edilmektedir.

Bu amaçla 20 mL potasyum fosfat tamponu (125 mM, pH 7.0), 2.5 mL sodyum

azid (130 mg/dl), 2.5 mL Na₂-EDTA (744 mg/dL), 5 mL NADPH (8.3 mg/5 mL), GSH (15.3 mg/5 mL) içeren bir havuz hazırlandı ve bu havuzdan 0.7 mL alınarak 37°C'ye ayarlanmış termostatlı spektrofotometrede küvetlere kondu. Üzerine 0.1 mL GSH-Re (0.5 IU) ve 0.1 mL 50 kez sulu hemolizat eklendi. Daha sonra 0.1 mL 12 mM kümen hidroperoksit ilavesi ile reaksiyon başlatıldı ve absorbans azalması 340 nm'de izlendi.

Sonuçlar NADPH'in ekstinksiyon katsayısından yararlanılarak hesaplandı ve nmol NADPH /dakika/ml olarak belirtildi.

TNF- α düzeyleri ölçümü: Serum örneklerinin TNF- α Sandviç ELISA prensibine dayanan Bioassay technology marka (Shanghai, CHINA, katalog no: EO764Ra) ticari kitler ile ölçülmüştür. Sonuçlar pg/mL olarak verilmiştir.

NRF2 düzeyleri ölçümü: Serum örneklerinin NRF2 düzeyleri Sandviç ELISA prensibine dayanan Elabscience marka (USA, katalog no: E-EL-H1564) ticari kitler ile ölçülmüştür. Sonuçlar pg/mLolarak verilmiştir.

5.4.3.Kas dokusunda yapılan incelemeler

Doku homojenatlarının hazırlanması ve postmitokondri fraksiyonlarının eldesi: Kas dokusu tartıldı ve doku homojenizatörü kullanılarak soğuk 0.15 M KCl çözeltisi içinde homojenize edildi ve % 10'luk homojenatlar (w/v) hazırlandı. Postmitokondri fraksiyonu eldesi için, doku homojenatları +4°C'ye ayarlanmış soğuk santrifüjde 600 x g'de 10 dk santrifüj edilerek parçalanmamış doku örnekleri ve nükleer fraksiyon uzaklaştırıldı. Dokularda SOD ve GSH-Px ölçümleri hariç tüm incelemeler bu fraksiyonda yapıldı. SOD ve GSH-Px tayinleri ise bu fraksiyonun ependorf santrifüjünde 10.000xg'de 20 dk santrifüjü ile elde edilen postmitokondri fraksiyonunda ölçüldü. Tüm örnekler kullanılıncaya kadar -80°C'de saklandı.

ROS tayini (88): Doku homojenatı örneklerinden 0.2 mL alınarak serumda kullanılan yöntem aynen uygulanarak yapıldı. Sonuçlar RFU olarak verildi.

MDA düzeyleri tayini (89): 0.2 mL doku homojenatı alınarak, serumdaki yöntemle tayin edildi. Sonuçlar nmol/grdoku olarak verildi.

AOPP düzeyleri tayini (90): Kas dokusu homojenatları 10 kez sulandırılıp mikropilaya kuyucuklarına 0.04 mL konulduktan sonra serumda AOPP tayini için

tanımlanan yöntem aynen uygulandı. Sonuçlar nmol/mg protein olarak verildi.

GSH düzeyleri tayini (94): GSH düzeyleri, Elman ayıracı (5,5'- ditiobis-2 nitro benzoik asit) kullanılarak tayin edildi. Bu ayıracın dokulardaki serbest sülfidril (-SH) grupları tarafından indirgenmesi sonucunda, 1 mol SH grubu başına 1 mol 2-nitro-5 tiyobenzoik asit (DTNB) oluşmaktadır. Sarı renkli bu ürün spektrofotometrik olarak 412 nm'de absorbands vermektedir.

Ayıraçlar:

Proteinsizleştirme çözeltisi: 1.67 g glasiyal metafosforik asit, 200 mg Na-EDTA ve 30 g NaCl 100 mL distile suda çözöldü.

0.3 M Na₂HPO₄: 42.6 g Na₂HPO₄ 1000 mL distile suda çözöndü.

Ellman Renk Ayıracı: 4 mg 5.5'-ditiyobis-(2-nitrobenzoik asit) 10 mL %1'lik sodyum sitrat çözeltisinde çözöldü.

GSH standartları: 5 mg ve 10 mg GSH tartılarak 100 mL'de eritildi.

İşlem: Ependorf tüplere 0.1 mL homojenat, 0.4 mL 0.15 M KCl ve 0.75 mL proteinsizleştirme çözeltisi kondu, karıştırıldı, 10000xg'de 10 dakika santrifüj edildi. Ayıraç körü ve standart tüplere de aynı işlemler uygulandı. Daha sonra elde edilen bu supernatanlardan mikrolaka kuyucuklarına 0.05 mL pipetlendi ve üzerine 0.2 mL 0.3 M Na₂HPO₄ ve 0.05 mL Ellman ayıracı kondu ve oluşan renkler 412 nm'de ayıraç körüne karşı okundu.

Hesap: GSH düzeyleri ekstinksiyon katsayısı kullanılarak hesaplandı ve sonuçlar µmol GSH/grdoku olarak tanımlandı.

Antioksidan kapasite (FRAP) ölçölmesi (91): Mikrolaka kuyucuklarına kas homojenatlarından 0.01 mL alınarak serum için tanımlanan yöntem uygulanarak yapıldı. Sonuçlar nmol/mg protein olarak verildi.

SOD aktivitesinin ölçölmesi (92): 2.6 mL 50 mM potasyum fosfat tamponu (pH:7.8) ve 0.1 mL o-dianisidin konulan tüplere kas için 0.05 mL postmitokondri fraksiyonu eklendi, serumda uygulandığı gibi hacim 2.8 mL'ye tamamlandı ve serumda SOD aktivitesi tayini için belirtilen işlemler uygulanarak deneyler tamamlandı. Sonuçlar

IU/mg protein olarak verildi.

GSH-Px aktivitesinin ölçülmesi (93): 20 mL potasyum fosfattamponu (125 mM, pH 7.0), 2.5 mL sodyum azid (130 mg/dl), 2.5 mL Na₂-EDTA (744 mg/dl), 5 mL NADPH (8.3 mg/5 mL), GSH (15.3 mg/5 mL) içeren bir havuz hazırlandı ve bu havuzdan 0.7 mL alınarak spektrofotometre küvetlerine kondu. Üzerine 0.1 mL GSH-Re (0.5 IU) ve 0.1 mL 10 kez sulu kas post mitokondri fraksiyonu eklendi. Daha sonra 0.1 mL 12 mM kümen hidroperoksit ilavesi ile reaksiyon başlatıldı ve spektrofotometrede absorbans azalması 340 nm’de izlendi. Sonuçlar nmol/dakika/mg protein olarak verildi.

Protein tayini (95): Doku homojenatlarında ve postmitokondri fraksiyonlarında protein miktarı Bişinkoninik asit metodu ile belirlendi.

Ayırıcılar:

Bişinkoninik asit (Bicinchoninic acid solution; Sigma B 9643)

% 4 CuSO₄

Protein renklendirme ayıracı: 10 mL bişikonik asit çözeltisi üzerine 0.2 mL %4 Cu SO₄ ekleyerek hazırlandı.

İşlem:

Mikroplaka kuyucuklarına konan 0.2 mL protein renklendirici ayıracı üzerine 20 kez sulandırılmış kas homojenatları veya post mitokondri fraksiyonlarından 0.01 mL eklendi. Karıştırıldıktan sonra 37°C’de 30 dakika beklendi. Oda ısısında soğutuldu ve oluşan rengin absorbansı 562 nm’de mikropilaka okuyucuda kör tüpe karşı okundu. Ayrıca protein standartları içeren kuyucuklar da hazırlandı.

TNF- α düzeyleri ölçümü: Doku örneklerinin TNF- α Sandviç ELISA prensibine dayanan Bioassay technology marka (Shanghai, CHINA, katalog no: EO764Ra) ticari kitler ile ölçülmüştür. Sonuçlar dokuda pg /mgprotein olarak verilmiştir.

NRF2 düzeyleri ölçümü: Doku örneklerinin NRF2 düzeyleri Sandviç ELISA prensibine dayanan Elabscience marka (USA, katalog no: E-EL-H1564) ticari kitler ile

ölçülmüştür. Sonuçlar dokuda pg /mgprotein olarak verilmiştir.

İstatistik incelemeler

Sonuçlar ortalama $\pm$ SD olarak verildi. Grup dağılımları Levene's testiyle saptandı ve ANOVA (post-hoc Tukey) veya Kruskal-Wallis (post-hoc Mann-Whitney U) testi kullanıldı.



6.BULGULAR

Çalışmamızda alt ekstremitede iskemi reperfüzyon modeli oluşturulan sıçanlara uygulanan ozon tedavisinin serum ve kas dokusunda oksidan ve antioksidan göstergeler üzerine etkileri araştırıldı. Bu amaçla ROS, MDA, AOPP düzeyleri ile birlikte GSH ve FRAP, TNF α , NRF2 düzeyleri, SOD ve GSH-Px aktiviteleri incelendi.

6.1. Serumda Elde Edilen Bulgular

İskemi-reperfüzyon modeli oluşturulması ve ozon tedavisi uygulaması serum oksidan ve antioksidan göstergelerini etkilemedi.

Tablo 4. İskemi oluşturulan sıçanlarda ozon uygulamasının serumda reaktif oksijen türleri (ROS), malondialdehit (MDA), proteinlerin ileri oksidasyon ürünleri (AOPP)ve antioksidan aktivite (FRAP) düzeyleri üzerine etkisi (Ortalama $\pm$ SD)

	n	ROS (RFU)	MDA (μ mol/L)	AOPP (μ mol/L)	FRAP (μ mol/L)
Kontrol	5	191.3 $\pm$ 41.5	3.28 $\pm$ 0.59	135.0 $\pm$ 20.4	308.1 $\pm$ 15.8
İskemi	8	186.3 $\pm$ 49.6	3.93 $\pm$ 0.76	219.0 $\pm$ 59.5	336.7 $\pm$ 32.3
İskemi+ozon	8	193.2 $\pm$ 67.0	4.16 $\pm$ 1.00	172.5 $\pm$ 50.0	308.3 $\pm$ 65.2

Tablo 5. İskemi oluşturulan sıçanlarda ozon uygulamasının serumda serumda superoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) aktiviteleri üzerine etkisi (Ortalama $\pm$ SD)

	n	SOD (U/ml)	GSH-Px (nmol/ml)
Kontrol	5	9.76 $\pm$ 0.92	514.6 $\pm$ 97.4
İskemi	8	10.0 $\pm$ 1.53	539.4 $\pm$ 147.7
İskemi+ozon	8	9.62 $\pm$ 0.83	489.2 $\pm$ 116.1

Tablo 6. İskemi oluşturulan sıçanlarda ozon uygulamasının serumda serumda Tümör nekroz faktör (TNF α) ve Nükleer faktör eritroid 2 ile ilişkili faktör 2 (NRF2) değerleri üzerine etkisi (Ortalama $\pm$ SD)

	n	TNF α (pg/ml)	NRF2 (pg/ml)
Kontrol	5	44.9 $\pm$ 9.54	201.4 $\pm$ 18.7
İskemi	8	42.2 $\pm$ 4.44	186.0 $\pm$ 45.8
İskemi+ozon	8	40.0 $\pm$ 7.66	189.2 $\pm$ 47.1

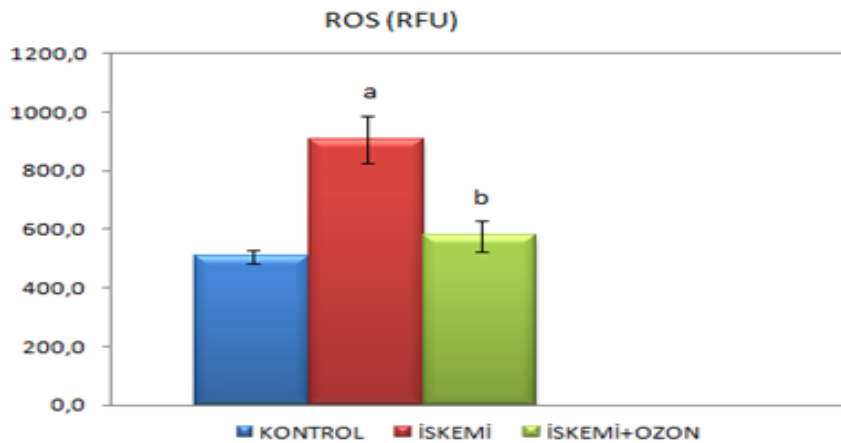
6.2. 6.2. Kas dokusunda Elde Edilen Bulgular

a) Kas dokusu ROS düzeylerinde iskemi uygulamasıyla anlamlı bir artış saptandı. Bu düzeyler ozon uygulamasıyla anlamlı azalmalar gösterdi (Şekil 17). Kas dokusunda MDA düzeyleri de iskemi grubunda arttı. Bu düzeyler ozon uygulamasıyla azaldı (Şekil 18). AOPP düzeyleri de iskemi grubundaki sıçanlarda artış gösterdi. Bu düzeyler ozon tedavi edilen sıçanlarda azaldı (Tablo 7).

Tablo 7. İskemi oluşturulan sıçanlarda ozon uygulamasının kas dokusunda reaktif oksijen türleri (ROS), malondialdehit (MDA), proteinlerin ileri oksidasyon ürünleri (AOPP) düzeyleri üzerine etkisi (Ortalama±SD)

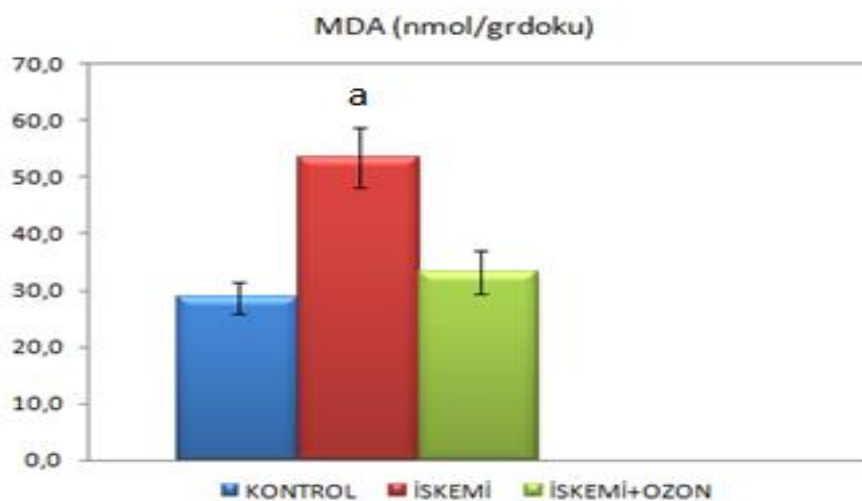
	n	ROS (RFU)	MDA (nmol/grdoku)	AOPP (nmol/mgprotein)
Kontrol	5	507.5±41.9	28.9±18.7	7.17±1.97
İskemi	8	906.0±76.8 ^a	53.5±23.7 ^a	20.2±6.6 ^a
İskemi+ozon	8	577.8±179.9 ^b	33.3±14.4	12.0±4.46 ^{a,b}

^a p<0.05 kontrol grubu ile; ^b p<0.05 iskemi grubu ile karşılaştırıldığında;



Şekil 17. İskemi ve ozon tedavisi uygulanan sıçanlarda kas dokusunda reaktif oksijen türleri (ROS) düzeyleri üzerine etkisi (Ortalama±SD)

^a $p < 0.05$ kontrol grubu ile; ^b $p < 0.05$ iskemi grubu ile karşılaştırıldığında;



Şekil 18. İskemi ve ozon tedavisi uygulanan sıçanlarda kas dokusunda malondialdehit (MDA) düzeyleri üzerine etkisi (Ortalama±SD)

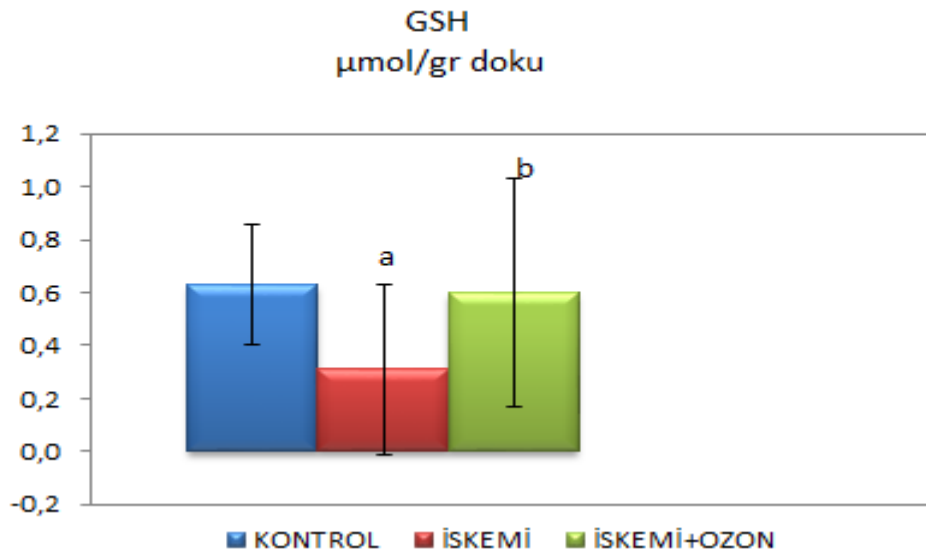
^a $p < 0.05$ kontrol grubu ile; ^b $p < 0.05$ iskemi grubu ile karşılaştırıldığında;

b) İskemi uygulaması kas dokusu GSH düzeylerini de etkiledi. Ozon uygulaması sıçanların kas dokusu GSH düzeyleri kontrol grubuyla karşılaştırıldığında bir farklılık bulunmadı. Kas dokusunda FRAP düzeyleri iskemi grubunda azalırken ozon uygulaması ile FRAP düzeyleri arttı. (Şekil 19), (Tablo 8).

Tablo 8. İskemi oluşturulan sıçanlarda ozon uygulamasının kas dokusunda glutatyon (GSH) ve antioksidan aktivite (FRAP) değerleri üzerine etkisi (Ortalama±SD)

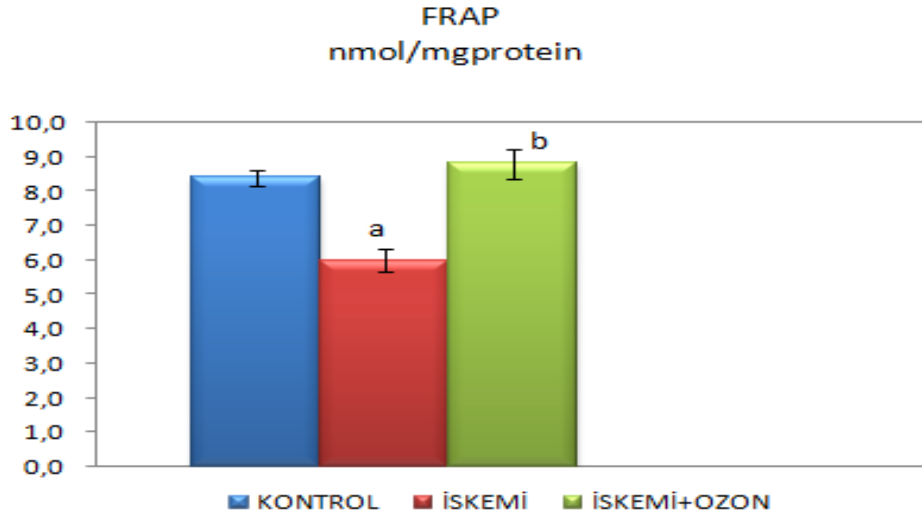
	n	GSH ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ protein)	FRAP (nmol/mg protein)
Kontrol	5	0.63±0.18	8.42±2.0
İskemi	8	0.31±0.23 ^a	6.01±1.0 ^a
İskemi+ozon	8	0.60±0.29 ^b	8.82±1.0 ^b

^a p<0.05 kontrol grubu ile; ^b p<0.05 iskemi grubu ile karşılaştırıldığında;



Şekil 19. İskemi ve ozon tedavisi uygulanan sıçanlarda kas dokusunda glutatyon (GSH) düzeyleri üzerine etkisi (Ortalama±SD)

^a p<0.05 kontrol grubu ile; ^b p<0.05 iskemi grubu ile karşılaştırıldığında;



Şekil 20. İskemi ve ozon tedavisi uygulanan sıçanlarda kas dokusunda antioksidan aktivite (FRAP) düzeyleri üzerine etkisi (Ortalama $\pm$ SD)

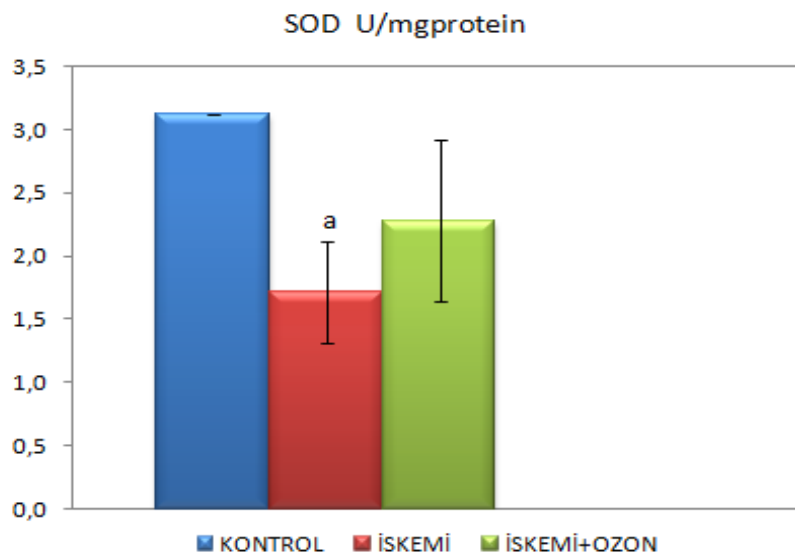
^a $p < 0.05$ kontrol grubu ile; ^b $p < 0.05$ iskemi grubu ile karşılaştırıldığında

c) Kas dokusunda GSH-Px aktivitelerinde gruplar arası bir farklılık bulunmadı (Şekil 22). Fakat SOD düzeylerinde iskemi grubunda azalma görülürken, (Şekil 21) tedavi grubunda SOD düzeylerinde anlamlı olmayan bir artış eğilimi gözlemlendi (Tablo 9).

Tablo 9. İskemi oluşturulan sıçanlarda ozon uygulamasının kas dokusunda superoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) aktiviteleri üzerine etkisi (Ortalama $\pm$ SD)

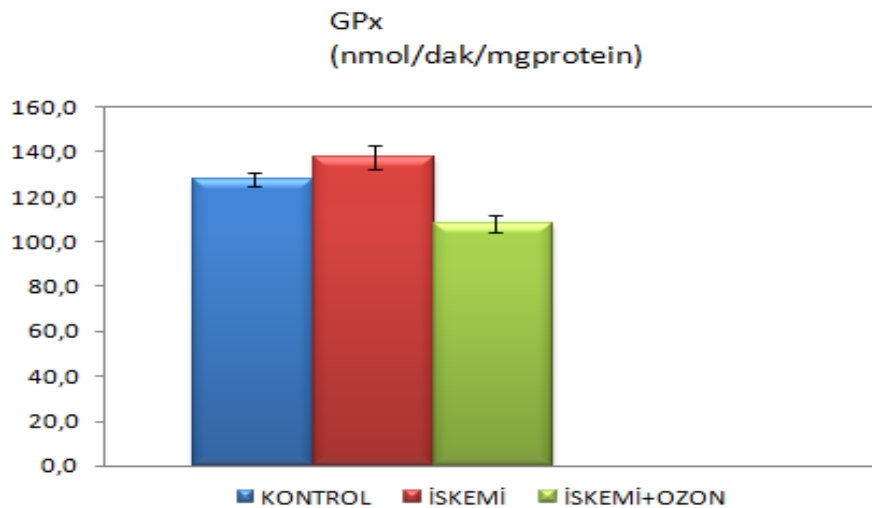
	n	SOD (U/mg protein)	GSH-Px (nmol/dk/mg protein)
Kontrol	5	3.12 $\pm$ 0.74	127.8 $\pm$ 33.3
İskemi	8	1.72 $\pm$ 0.53 ^a	137.8 $\pm$ 30.7
İskemi+ozon	8	2.28 $\pm$ 0.50	108.0 $\pm$ 35.8

^a $p < 0.05$ kontrol grubu ile karşılaştırıldığında;



Şekil 21. İskemi ve ozon tedavisi uygulanan sıçanlarda kas dokusunda superoksit dismutaz (SOD) aktivitesi üzerine etkisi (Ortalama±SD)

^a $p < 0.05$ kontrol grubu ile; ^b $p < 0.05$ iskemi grubu ile karşılaştırıldığında;



Şekil 22. İskemi ve ozon tedavisi uygulanan sıçanlarda kas dokusunda glutatyon peroksidaz (GSH-Px) aktivitesi üzerine etkisi (Ortalama±SD)

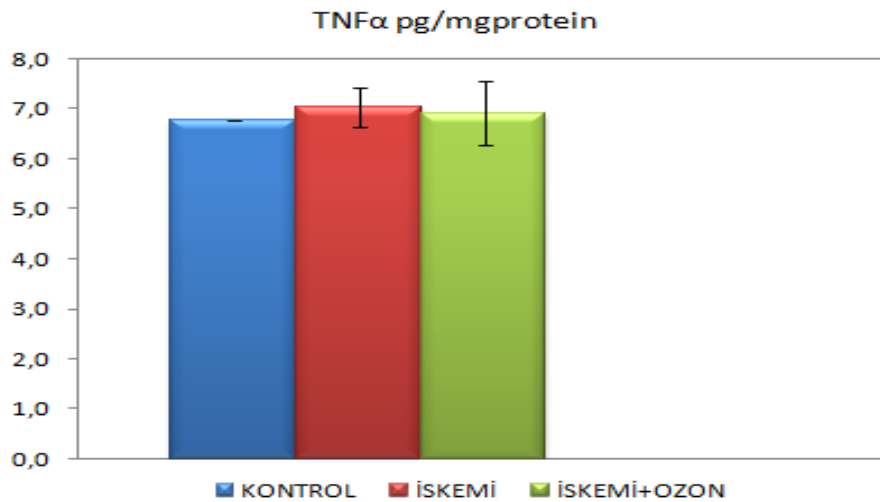
^a $p < 0.05$ kontrol grubu ile; ^b $p < 0.05$ iskemi grubu ile karşılaştırıldığında;

d)Kas dokusunda yapılan incelemerde TNF-a düzeyinde İ/R grubunda değişim gözlenmedi. NRF2 seviyelerinde ise İ/R grubunda anlamlı artış farkedildi. İ/R+ tedavi grubunda TNF-a ve NRF2 düzeylerinde anlamlı düşme saptanmadı.

Tablo 10. İskemi oluşturulan sıçanlarda ozon uygulamasının dokuda Tümör nekroz faktör (TNF α) ve Nükleer faktör eritroid 2 ile ilişkili faktör 2 (NRF2) değerleri üzerine etkisi (Ortalama $\pm$ SD)

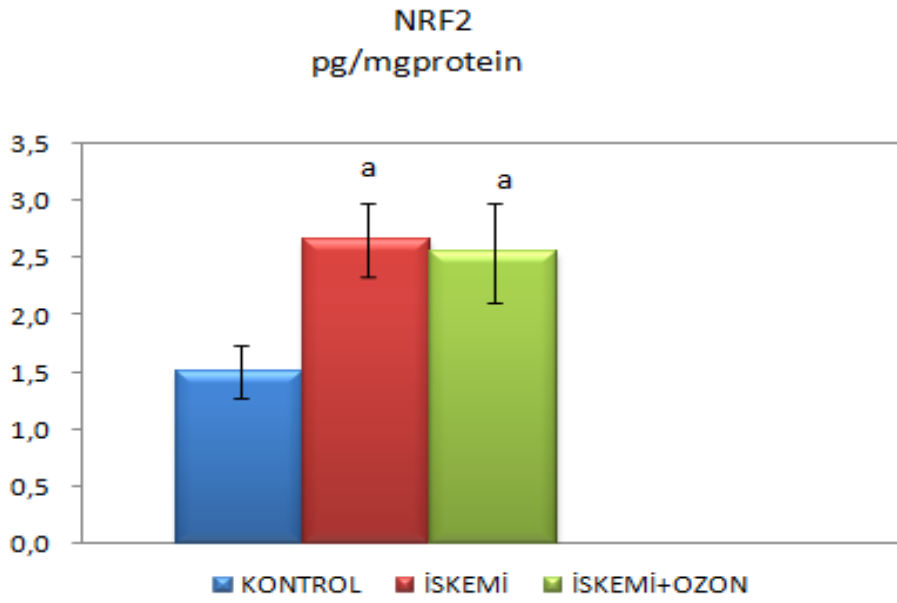
	n	TNF α (pg/mgprotein)	NRF2 (pg/mgprotein)
Kontrol	5	6.78 $\pm$ 0.99	1.51 $\pm$ 0.27
İskemi	8	7.03 $\pm$ 0.97	2.66 $\pm$ 1.32 ^a
İskemi+ozon	8	6.91 $\pm$ 1.03	2.55 $\pm$ 0.97 ^a

^a p<0.05 kontrol grubu ile karşılaştırıldığında;



Şekil 23. İskemi ve ozon tedavisi uygulanan sıçanlarda kas dokusunda Tümör nekroz faktör (TNF α) düzeyi üzerine etkisi (Ortalama $\pm$ SD)

^a p<0.05 kontrol grubu ile; ^b p<0.05 iskemi grubu ile karşılaştırıldığında;



Şekil 24. İskemi ve ozon tedavisi uygulanan sıçanlarda kas dokusunda Nükleer faktör eritroid 2 ile ilişkili faktör 2 (NRF2) düzeyi üzerine etkisi (Ortalama±SD)

^a $p < 0.05$ kontrol grubu ile; ^b $p < 0.05$ iskemi grubu ile karşılaştırıldığında

7. TARTIŞMA

Arteriyel kan akımı azalmasına bağlı organ perfüzyonunun bozulmasının sonucu hücrelerin oksijenden yoksun kalması şeklinde tanımlanan iskemi, toksik metabolitlerin birikmesi sonucunda hücre ölümüne neden olur. İskemi doku veya organa yetersiz oksijen akışı sonucunda oluşan hipoksinin en sık görülen sebebidir (1).

Reperfüzyon; oksijenin ve kan akımının iskemik dokuya tekrar ulaşmasıdır. Doku düzeyindeki hasar reversible ise hücresel fonksiyonlar geri kazanılabilir. Oksijenin iskemik ortama girmesi, ilerleyen metabolik süreçler sonucunda serbest oksijen radikallerinin oluşmasına neden olacaktır.

İskemi sırasında oluşan hipoksi ve revaskülarizasyon sonrası oluşan reperfüzyon hasarı dokularda reversible ve irreversible hasarlar oluşturmaktadırlar (2).

İskemi-reperfüzyona maruz kalan dokularda ciddi ve önemli hasarlar meydana gelmektedir. İskemi-reperfüzyon yalnızca iskemik bölge değil aynı zamanda iskemik bölgenin dışında kalan alanlarda da büyük oranda hasar oluşturmaktadır (3). İskemik dokunun reperfüzyonu sırasında, oksijenli kan, kan hücresi sekestrasyonuna neden olur ve oksidanların sayısını ve aktivitelerini artırır. Reperfüzyon, erken iskemik hasarın sitokin salınımı ve hidroksil radikal ($\text{OH}^\cdot$), süperoksit radikali ($\text{O}_2^\cdot$) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi reaktif oksijen türleri (ROS) ve kompleman sisteminin aktivasyonu ile tehlikeli etkilerini artırır. Bu fenomen “iskemi-reperfüzyon (I / R)” hasarı olarak adlandırılmıştır (4, 5).

İskemi/reperfüzyon hasarı kaynaklı doku hasarı; alt ekstremité revaskularizasyonu, abdominal aort cerrahi gibi prosedürlerden sonra karşılaşılan önemli bir problemdir. İskemik dokunun reperfüze edilmesi mikrovasküler disfonksiyon ve bozulmuş doku bariyer fonksiyonu ile karakterize olan lokal ve sistemik inflamatuvar yanıtı neden olur.

İskelet kası I / R, aterosklerotik tıkalıcı hastalık, arteriyel tromboz veya arteriyel emboli, organ nakli, kardiyovasküler cerrahi ve vasküler travma gibi vasküler problemlerle ortaya çıkabilir.

Ozon (O₃) üzerine yapılan çalışmalarda, immün aracılardan stimülasyonu ile direncin artırılması olduğunu belirlemiştir. Ozon, üç atomlu oksijen (O₃) molekülü olarak tanımlanır. Ozon tedavisi ozon ve oksijen (O₃/O₂) karışımı olarak uygulanır. Medikal ozon temelde enfekte yaralar, kolit, proktit, dolaşım bozuklukları ve viral hastalıklar için tıpta kullanılır. Kontrollü ozon uygulamasının, iskemiye ve reperfüzyon sırasında oluşacak olan oksidatif strese karşı koruma sağlayacağı veya adaptasyonu teşvik edeceği, reaktif oksijen türlerinin neden olduğu hasarı önlediği ve alt ekstremitelerde iskemi-reperfüzyon (I/R) hasarına karşı koruyucu olabileceği gösterilmiştir (6).

Tıpta kullanılan medikal ozon tedavisinin en önemli etkisi, antioksidatif yanıtların uyarılması ve mitokondriyal bütünlüğün korunmasıdır. Medikal ozon son yıllarda farklı hastalıklar için yeni bir tedavi olarak görülmüştür ve iskemi/reperfüzyon (I/R) hasarında oluşan oksidatif stresin azaltılmasında önemli rolleri olduğu düşünülmekte ve araştırılmaktadır (7, 8, 9).

Bu çalışmada, sıçan alt ekstremitesinde infrarenal abdominal aorta klempe edilerek iskemi-reperfüzyon modeli oluşturularak, iskemi-reperfüzyon öncesi medikal ozon uygulanan ratlarda iskelet kası viabilitesi üzerine oksidan ve antioksidan sistem etkileri araştırılmıştır.

Günümüzde iskemi-reperfüzyon hasarının etiyolojisinde serbest oksijen radikallerinin rol oynadığını söylemek mümkündür. Bu radikaller etkilerini sarkolemma fosfolipidlerinin oksidasyonu ve bunun sonucunda membran bütünlüğünün bozulması ile göstermektedirler. SOD, glutatyon peroksidaz ve katalaz gibi antioksidan enzimlerin iskemi sonrasında miktarlarının azalmış olduğu tespit edilmiş, aynı zamanda ciddi endotel hasarına yol açan endarterektomi işleminden sonra reperfüzyon hasarının belirgin olarak arttığı ortaya konmuştur (109).

I/R hasarına neden olduğu etkiler vasküler cerrahide karşımıza çıkmakta ve postoperatif süreçte morbidite ve mortalite üzerine etkili olmaktadır. İskemiye maruz bırakılan dokunun yanında; akciğer, böbrek, kalp, iskelet kası, santral sinir sistemi ve gastrointestinal sistem iskemi reperfüzyon hasarından etkilenen dokulardır (97).

Özellikle aort cerrahisinde abdominal aortaya geçici süre kros-klemp uygulamalarında, tek ya da çift taraflı akut femoral arter tıkanıklıklarında alt ekstremitelerde akut iskemi-reperfüzyon hasarı meydana gelmektedir. Abdominal aort cerrahisi sırasında iskemik kalan ekstremitelerde lokal doku hasarı, iskemik alanın dışındaki bölgelerde de uzak doku ve organ hasarı oluşturabilir. İnfrarenal abdominal aortaya kros-klemp yerleştirilmesi sonrası oluşan alt ekstremitelerde iskemi-reperfüzyon hasarında böbrekler hedef organ konumundadır ve bu durum klinik olarak postoperatif süreçte önemlidir (98, 99).

Periferik arter hastalıklarının en sık karşılaşılan sonucu akut veya kronik süreçte alt ekstremitelerde malperfüzyondur. Abdominal aort anevrizması, Leriche sendromu ve aortoiliak hastalıkların cerrahi tedavilerinde infrarenal aorta klempe edilmekte ve alt ekstremitelerde anastomoz süresince iskemik bırakılmaktadır. Aortik klempin kaldırılması ile iskemik dokuların reperfüzyonu ile sonuçlanmaktadır. Ekstremitelerde iskemisinin oluşturulması amacı ile deneysel olarak çok sayıda model geliştirilmiştir. Bunlardan biri direkt olarak infrarenal abdominal aortanın klempe edilmesidir. (100, 101).

Kiriş ve ark. (102) infrarenal aortik iskemi / reperfüzyon modelinde renal hasarı araştırmışlar, 30 dakika iskemi ve 60 dakika reperfüzyon ile oklüzyonun proksimalindeki uzak organlarda IR hasarının oluştuğunu, MDA düzeyi ve antioksidan enzim aktivitelerinin artışının tespiti ile göstermişlerdir.

Ozon, üç oksijen atomundan oluşan bir kimyasal bileşiktir. İki atomlu normal atmosferik oksijenin çok yüksek enerji taşıyan bir formudur. Yüksek derecede oksidasyon gücü nedeni ile “aktif oksijen” olarak isimlendirilir. Dolaşımında çoğunlukla birlikte hareket eden alyuvarlar, O₃ ile karşılaşınca ayrılır, şekil değiştirir, düzenli sıralar halinde daha hızlı hareket etmeye başlarlar. Yüzey alanları genişlediğinden fazla miktarda oksijen alan alyuvarlar vücudun ihtiyacı olan bölgesine hızla ulaşabilmektedir (56). Medikal uygulamalarda ozon O₂/O₃ karışım şeklinde kullanılır.

Son yıllarda medikal ozonun kullanımı hızla artmaktadır. Ozon ile karıştırılmış kanın reinfüzyonu ile NO düzeylerinde artış, iskemik alanlarda vazodilatasyona neden olarak hipokside azalma, süperoksit dismutaz aktivasyonu ve glutatyon seviyesinde azalma ile oksidatif stresin azaltıldığı gösterilmiştir (54,60). Son zamanlarda yapılan farmakolojik çalışmaların ışığında ozon, bir ön-ilaç olarak kabul edilebilir. Belirli toksik

olmayan dozlarda biyokimyasal yolların yeniden düzenlenmesini indükleyebilir ve birçok sistemde ikincil mesajcıların aktivasyonunu sağlayabilir. Günümüzde düşük doz ozon ile antioksidan enzimlerin, nitrik oksit yolunun ve diğer hücresel aktivitelerin düzenlenebileceği kanıtlanmıştır ve birçok patolojik durumda ozonun şaşırtan etkilerini desteklemektedir (56, 59)

Diabetes mellitusun oksidatif stres ile ilişkili bir rahatsızlık olduğu düşüncesiyle, ozon tedavisinin antioksidan sistemleri koruyabileceği ve diyabetik komplikasyonlarla ilişkili olan endotel hücre hasarının diğer belirleyicilerini fizyolojik seviyelerde tutabileceği öne sürülmüştür (110).

Sanchez ve ark. (111) yaptıkları bir çalışmada tip 2 diabetes mellitusu olan ve nöroenfeksiyöz diyabetik ayağı bulunan hastalarda ozon tedavisinin hiperglisemiye azaltarak glisemik kontrolü iyileştirdiği, insülin duyarlılığını artırdığı ve diabetes mellitus ve komplikasyonları ile ilişkili oksidatif stresi iyileştirerek yara iyileşmesini hızlandırdığı belirtilmiştir.

Uysal ve ark. (115) alt extremité İR modelinde melatoninin akciğer hasarı üzerine etkisini belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmada Aortik IR grubunda kanda ve dokuda MDA'nın yükseldiğini saptamışlardır.

Kapan ve ark. (116) yaptıkları deneysel aortik IR modelinde renal doku SOD düzeylerinin kontrol grubuna göre İR grubunda anlamlı düzeyde yükseldiğini bildirmişlerdir.

Leon OS ve ark. (117) yaptıkları çalışmada kontrollü O₃ verilmesinin oksidatif ön koşullanmaya veya oksidatif strese adaptasyonu sağlayarak SOR ile indüklenen hasarı azaltabileceğini göstermiştir.

Ajamieh ve ark. (7) ratlarda yapılan hepatik IR modelinde O₃ oksidatif önkoşullanma ile sağlanan koruyucu mekanizmaların protein sentezi ile sağlandığı ve O₃ tedavisinin bu yolla mitokondriyal fonksiyonları ve hücresel redoks dengesini koruduğu belirlemişlerdir. Ayrıca yaptıkları çalışmada karaciğer dokusunda IR grubunda sham ve kontrol gruplarına göre SOD ve Katalaz değerlerinde anlamlı düşüş saptamışlardır.

Aceto ve ark. (112) yaptıkları araştırmada, kardiopulmoner bypass uygulanan hastalarda aortik klempleme ve klempten kaldırılması sonrası kanda GSH-Px aktivitelerinde artış olduğunu saptamışlardır.

Biedunkiewicz ve ark. (113) intermittan kladikasyonu olan 10 hemodiyaliz hastasında uyguladıkları ozonlu otohemoterapi tedavisinin oksijen kontrollü tek kör çalışmasında ağrısız yürüme mesafesi ve maksimum yürüme mesafelerini değerlendirmişlerdir. Maksimum yürüme mesafesinde bazal değerlere göre %35, oksijen kontrol grubuna göre %22,7 anlamlı artışı gözlemişlerdir ($p<0,01$ ve $p<0,03$). Ağrısız yürüme mesafesinde de bazal değerlere göre %71, oksijen kontrol grubuna göre %62,8 artış gözlemişlerdir ($p<0,02$ ve $p<0,03$). Bu sonuçlarla ozon otohemoterapisinin periferik arteriel hastalığı olan hastalarda yürüyüş kabiliyetlerini artırdığı ve iskeminin klinik belirtileri azalttığını düşünmüşlerdir.

Chen H. ve ark. (114) sıçanlarda yaptıkları deneysel renal İR hasarında O₃ ile yapılan önkoşullanma sonucunda, SOD düzeylerini önemli ölçüde azalttığını bildirmişlerdir. Bu sonuçlar O₃'ün antioksidan özelliği ile aortik İR'nin indüklediği oksidatif stresi anlamlı ölçüde azalttığını desteklemektedir.

Oluşturulan İ/R modelinde; medikal ozonun iskelet kası viabilitesi, oksidan/antioksidan sistem üzerine etkilerinin araştırıldığı bu deneysel çalışmada, iskemi oluşturmak amacıyla atravmatik bulldog klempten yardımı ile infrarenal abdominal aorta oklüde edilerek alt ekstremitte iskemisi oluşturma yöntemi kullanılmıştır (103,104). Kolay uygulanabilir olması nedeniyle turnike yöntemini savunan yazarlar olsada (105,106,107), arterial oklüzyonun selektif olamaması, venöz ve lenfatik damarlarda oklüzyon yapması, kas ve sinir zedelenmesine neden olabileceği için çalışmamızda turnike yöntemi tercih edilmemiştir.

Çalışmamızda deneysel hayvan modeli olarak sıklıkla tercih edilen Wistar-Albino türü sıçanlar tercih edildi. Küçük kemirgenler özellikle de sıçanlar, serebral fizyolojilerinin ve vaskülarizasyonlarının insana yakın olmasından dolayı alt ekstremitte iskemi modelinin oluşturulmasında tercih edilmektedir. Maliyet, kolay bakım ve müdahale avantajları nedeniyle sıçan modelini seçmeyi uygun bulduk (108).

Çalışmamızda alt ekstremitte iskemi/reperfüzyon modeli oluşturmak amacı ile 60 dk süreyle infrarenal abdominal aorta klempten sonrası 120 dakika süresince (klempler alınarak) reperfüzyon gerçekleştirdik.

Medikal ozonu işlem öncesi intraperitoneal yolla 20 mcg/ml dozda 4 gün boyunca her gün tek doz olarak uyguladık.

Çıkarılan kas dokusu ve alınan kan örnekleri biyokimyasal olarak antioksidan ve oksidan sistem özellikleri açısından değerlendirildi. Oksidan parametrelerden malondialdehid (MDA), proteinlerin ileri oksidasyon ürünleri (AOPP), reaktif oksijen türleri (ROS), antioksidan parametrelerden ise superoksid dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px), antioksidan kapasite (FRAP) ve glutatyon (GSH) düzeylerine bakıldı. Biyokimyasal incelemelerde; serum ROS, MDA, AOPP, GSH ve FRAP, TNF α , NRF2 düzeyleri, SOD ve GSH-Px aktivitelerinde değişim gözlenmedi.

Lipid peroksidasyon ürünü olan MDA hasarlanmış hücre membranındaki yağ asit radikalleri ile etkileşerek lipit peroksidasyon reaksiyonunu artırır ve üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonundan MDA meydana gelir. Stabil bir molekül olan MDA düzeyi ölçümü ile membran hasarı derecesi hakkında fikir sahibi olunabilir. Bu yüzden oksidatif stres durumlarında biyomarker olarak MDA kullanılır (90). Bizim çalışmamızda kas dokusunda MDA düzeyleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında İR grubunda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur. Ozon tedavisinin MDA düzeylerini istatistiksel olarak azalttığı görüldü.

Aynı zamanda proteinlerin ileri oksidasyon ürünleri (AOPP) oksidatif strese hasarlanmış proteinlerin göstergesi olarak kullanılmaktadır (89). Çalışmamızda kas dokusunda AOPP düzeyleri de İR grubunda kontrol grubuna göre yüksek, İR+Tedavi grubunda İR grubuna göre istatistiksel olarak düşük bulundu.

Kas dokusunda ROS düzeyleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, İR grubunda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur. Ozon tedavisinin ROS düzeylerini istatistiksel olarak azalttığı görüldü.

Nonenzimatik antioksidan olan glutatyon, hücre içinde tripeptik (glutamik asit, sistein glisin) olarak sentezlenir ve hücre içinde indirgenmiş şekilde (GSH) bulunur. Glutatyon (GSH) çok önemli bir antioksidandır, serbest radikaller ve peroksitlerle reaksiyona girerek hücreleri oksidatif hasara karşı korur (93).

Ozon etkinliğinin araştırıldığı çalışmada İR+Tedavi grubunda kas dokusunda glutatyon düzeyinin İR grubuna göre artış saptanmıştır. İR+ Tedavi grubunda ise kontrol grubu ile karşılaştırıldığında glutatyon düzeyinde anlamlı artış saptanmadı.

Glutatyon Peroksidaz aktivitelerinde her üç grupta da birbirlerine yakın değerler çıkmıştır. Bu enzim aktivite düzeyleri, İR hasarını ve ozon tedavisinin koruyucu etkilerini değerlendirmemizde yardımcı olmamıştır. Fakat süperoksit dismutaz (SOD)

düzeylerinde iskemi grubunda azalma görülürken tedavi grubunda kas dokusu SOD düzeylerinde anlamlı artış gözlemlendi.

Kas dokusunda yapılan incelemelerde TNF-a düzeylerinde değişim gözlemlenmedi, NRF2 'da ise anlamlı artış farkedildi (%76). Ozon uygulaması ile TNF-a ve NRF2 sonuçlarında herhangi bir değişim gözlemlenmedi.

Nükleer solunumsal faktör 2 (Nrf2), NQO1 ve diğer detoksifiye edici genler için bir transkripsiyon faktörü olup antioksidan sistemi indüksiyonunu düzenleyen bir transkripsiyon faktörüdür. Oksidatif stres, Nrf2 ekspresyon seviyesinin artması ve fosforilasyonuna neden olur (118). Bu nedenle oksidatif stresin önemli bir belirteci olarak kabul edilmektedir. Çalışmamızda iskemi grubu, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında Nrf2 seviyesinin önemli derecede artarken, ozon tedavisi uygulanan grupta da kontrol grubuna göre anlamlı artış izlendi.

Oksidatif stres, serbest radikallerin oluşumu ve ortadan kaldırılması arasındaki dengenin bozulması sonucunda oluşmaktadır. Özellikle iskemi gibi çeşitli durumların vücutta aşırı oksidan üretimine veya antioksidan mekanizmanın zayıflamasına yol açarak oksidatif stresin artışına yol açtığı öne sürülmektedir. Birçok hücre tipinde, oksidatif strese karşı çok sayıda hücrel yanıtın, antioksidan tepki elemanı (ARE) ve transkripsiyon faktörü, nükleer faktör eritroid 2-iliskili faktör-2 (Nrf2) aracılığıyla hareket eden sinyal oluşturmaya dahil olduğu bulunmuştur (119). Nrf2 çeşitli faz 2 detoksifiye ve anti-oksidan enzimlerin ARE aracılığıyla indüksiyonu yoluyla hücreyi oksidatif strese karşı korumaktadır. Nrf2 sinyallemeye yolu, geniş bir uyarıcı dizisine yeniden katılan bir dizi antioksidan genin ekspresyonunu yukarı regüle ederek oksidatif strese karşı hücreyi korur (120). Çalışmamızda, iskemi sonucunda Nrf2 seviyesi yükselirken ozon uygulaması (tedavi grubu) Nrf2 seviyelerinde bir azalmaya neden olmamıştır.

İskemi sırasında GSH düzeylerindeki önemli bir düşüş, hücrel redoks durumunda bir değişikliği gösterir, bu da hücrelerin ROS'a daha duyarlı olabileceğini gösterir. Bu, antioksidan enzim savunma mekanizmasının etkinliğinde bir azalmaya neden olmaktadır. Bu çalışmada, ozon uygulanan grupta kas dokusundaki GSH düzeylerindeki artış, oksidatif strese hücrel yanıtta bir artış olduğunu düşündürmektedir.

Malondialdehit, lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olarak kullanılan reaktif bir karbon bileşendir. Ozon uygulaması ile düşük MDA düzeylerinden anlaşılabileceği üzere, iskemi ile indüklenen oksidatif stres önemli ölçüde azaltılmıştır.

Dokuda yapılan incelemelerde iskemi-reperfüzyon grubunda oksidan sistem parametrelerinde artma ve antioksidan sistem parametrelerinde azalma istatistiksel açıdan anlamlı olarak farkedildi. Ozon tedavisinin oksidan sistem ürünlerini azalttığı, antioksidan sistem ürünlerini arttırdığı anlamlı olarak saptandı.

Sonuç olarak, elimizdeki bulgular, iskemi-reperfüzyon modeli çalışmamızın sonucunda biyokimyasal olarak İR hasarının oluştuğunu; verilen ozon tedavisinin bu hasara karşı koruyucu etki gösterdiğini, fakat Nrf2 sinyalleme yolu üzerinde etkili olmadığını desteklemektedir.



8. SONUÇ

Sonuç olarak bu çalışma, medikal ozon tedavisinin alt ekstremitede oluşturulan iskemi-reperfüzyon hasarı üzerine etkisinin araştırılması için yapılmıştır. Çalışmamızda elde ettiğimiz biyokimyasal sonuçlara göre; İR grubunda, kas dokusunda iskemi-reperfüzyon hasarı oluştuğunu ve medikal ozon tedavisinin bu hasara karşı koruyucu etkisinin olduğunu söyleyebiliriz.

Elde edilen bulgular ışığında alt ekstremitte iskemisinde; perfüzyonun tekrar oluşturulması ve I/R sonrası oluşabilecek lokal / sistemik etkilerin azaltılmasında, ozon tedavisinin faydalı olabileceği kanaatindeyiz.

Bu çalışmanın sonuçlarına dayanarak; ozon tedavisinin günümüzde özellikle revaskularizasyon ve operasyon şansı olmayan, akut-kronik iskemi bulguları ile klinik olarak karşımıza çıkan, periferik arter hastalıklarının tedavisinde katkı sağlayacağını düşünüyoruz. Medikal ozon ile ilgili preklinik çalışmaların artması ve klinik alanlarda uygulama sıklığının artması ile ozon tedavisinin; revaskularizasyon şansı olmayan periferik arter hastalıklarının tedavisinde, medikal tedaviye alternatif bir tedavi yöntemi olacağını düşünmekteyiz.

9.KAYNAKLAR

1. Li C, Jackson RM. Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002; 282: 227-41.
2. Başgöz BB, Cintosun Ü, Taşçı İ. Periferik Arter Hastalığı ve Kalp. *Türkiye Klinikleri J Cardiol-Special Topics* 2017;10(3):173-7
3. Liu J, Zhang P, Tian J, Li L, Li J, Tian JH, et al. Ozone therapy for treating foot ulcers in people with diabetes. *Cochrane Database Syst Rev*. 2015 Oct 27;(10):CD008474.
4. Jing Q, Chen H. Efficacy and safety of ozone therapy administered by autologous blood transfusion for acute ischemic stroke: study protocol for a multi-center open-label large-sample parallel randomized controlled trial. *Asia Pac J Clin Trials Nerv Syst Dis*1(2), 37.
5. Wu X, Li Z, Liu X, Peng H, Huang Y1, et al. Major ozonated autohemotherapy promotes the recovery of upper limb motor function in patients with acute cerebral infarction. *Neural Regen Res*. 2013 Feb 15;8(5):461-8.
6. Tafil-Klawe M, Woźniak A, Drewa T, Ponikowska I, Drewa J, et al. Ozone therapy and the activity of selected lysosomal enzymes in blood serum of patients with lower limb ischaemia associated with obliterative atheromatosis. *Med Sci Monit*. 2002 Jul;8(7):CR520-5.
7. Ajamieh HH, Menéndez S, Martínez-Sánchez G, Candelario-Jalil E, Re L, et al. Effects of ozone oxidative preconditioning on nitric oxide generation and cellular redox balance in a rat model of hepatic ischaemia-reperfusion. *Liver Int*. 2004 Feb;24(1):55-62.
8. Wang L, Chen H, Liu XH, Chen ZY, Weng XD, et al. The protective effect of ozone oxidative preconditioning against hypoxia/reoxygenation injury in rat kidney cells. *Ren Fail*. 2014 Oct;36(9):1449-54.
9. Tezcan AH, Ozturk O, Ustebay S, Adali Y, Yagmurdur H. The beneficial effects of ozone therapy in acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. *Pharmacol Rep*. 2018 Apr;70(2):340-345.
10. Kumar V, Abbas A, Aster J (çeviri:Tuzlalı S, Güllüoğlu M, Çevikbaş U). Robbins temel patoloji. Dokuzuncu baskı. İstanbul Nobel Tıp Kitabevi 2013;17.
11. Siemionow M, Arslan E. Ischemia/reperfusion injury: a review in relation to free tissue transfers. *Microsurgery*. 2004; 24(6): 468-75.
12. Semenza GL. Perspective on oxygen sensing. *Cell*. 1999;Aug 6; 98(3):281-4.

13. Eltzschig HK, Collard CD. Vascular ischemia and reperfusion injury. *Br Med Bull*. 2004; Oct 19;70:71-86 Print 2004. Rewiew. Erratum in: *BrMed Bull*. 2005; 7374:139.
14. Newmeyer DD, Ferguson-Miller S. Mitochondria: releasing power for life and unleashing the machineries of death. *Cell*. 2003;21;112(4):481-90.
15. Krag AE, Hvas CL, Kiil BJ, Eschen GT, Damsgaard TE, Hvas AM. Local and systemic coagulation marker response to musculocutaneous flap ischemia-reperfusion injury and remote ischemic conditioning: An experimental study in a porcine model. *Microsurgery*. 2018 Sep;38(6):690-697.
16. Nuh Zafer Cantürk, İskender Sayek. Cerrahi araştırma kitabı. 2005 nobel tıp kitabevleri.
17. Granger DN. Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischaemia-reperfusion injury. *Am L Physiol* 1988; 255.HI269-75.
18. Ernster L. Biochemistry of reoxygenation injury. *Crit Care Med* 1988;16:947-53
19. Toyokuni S: Reactive oxygen species-induced molecular damage and its application in pathology. *Pathol int* 1999; 49:91-102.
20. Granger DN. Ischemia-reperfusion: mechanisms of microvascular dysfunction and the influence of risk factors for cardiovascular disease. *Microcirculation* 1999; 6: 167-178.
21. Woodfin A, Voisin MB, Nourshargh S. PECAM-1: a multi-functional molecule in inflammation and vascular biology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27: 2514-2523.
22. Dick F, Li J, Giraud M-N, Kalka C, Schmidli J, Tevæarai H. Basic control of reperfusion effectively protects against reperfusion injury in a realistic rodent model of acute limb circulation. *Circulation*. 2008 Nov 4;118(19):1920-8.
23. Ege T. Kalp ve damar hastalıklarında iskemi-reperfüzyon hasarı. Duran E (Editör). *Kalp ve damar cerrahisi*. I.Baskı. İstanbul: Çapa Tıp Kitabevi; 2004: 197-215.
24. Zimiani K.Guarnier F. Miranda H. Watanabe M.Cecchini R. Nitric oxide mediated oxidative stress injury in rat skeletal muscle subjected to ischemia/reperfusion as evaluated by chemiluminescence. *Nitric Oxide* 2005; 13: 196–203.
25. Pham-Huy L A, He H, Pham-Huy C. Free Radicals, Antioxidants in disease and health. *Int J Biomed Sci* 2008; 4: 89-96.
26. Lefer AM, Lefer DJ. The role of nitric oxide and cell adhesion molecules on the microcirculation in ischaemia-reperfusion. *Cardiovasc Res* 1996; 32: 743751.
27. Anaya-Prado R, Toledo-Pereyra LH, Lentsch AB, Ward PA. Ischemia/ reperfusion injury. *The Surg Res* 2002; 105: 248-258.
28. Jackson MJ, Pye D, Palomero J. The production of reactive oxygen and nitrogen species by skeletal muscle. *J Appl Physiol* 2007; 102: 1664-1670.

29. Yavaş D, Zengin M, Kaklıkaya İ, Uzun Z, Ören A, et al. Serbest oksijen radikal temizleyici olarak aprotininin rolü (deneysel çalışma). *GKD Cer Derg* 1994; 2: 208-215.
30. Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 1994; 76: 301-314.
31. Serizawa A, Nakamura S, Suzuki S, Baba S, Nakano M. Involvement of platelet activating factor in cytokine production and neutrophil activation after hepatic ischemia-reperfusion. *Hepatology* 1996; 23: 1656-1663.
32. López-Neblina F, Páez-Rollys AJ, Toledo-Pereyra LH. Mechanism of protection of verapamil by preventing neutrophil infiltration in the ischemic rat kidney. *J Surg Res* 1996; 61: 469-472.
33. Russel RC, Roth AC, Kucan JO, Zook EG. Reperfusion injury and oxygen free radicals: A review. *J Reconstr Microsurg* 1989; 5: 79-84.
34. De Silva R, Dunning J, Trull A, Vuylsteke A. A review of ischaemiareperfusion injury in the cardiorespiratory system. *Ann Cardiac Anaest* 2003; 6: 126–131.
35. Gute DC, Ishida T, Yarimizu K, Korthuis RJ. Inflammatory responses to ischemia and reperfusion in skeletal muscle. *Molec Cell Bioch* 1998; 179: 169–187.
36. Blaisdell F W. The pathophysiology of skeletal muscle ischemia and the reperfusion syndrome: A review. *Cardio Surg* 2002; 10: 620–630.
37. Boğa M. Akut ekstremite iskemisi. *Türk Aile Hek Derg* 2009; 13: 11-15.
38. Zhang W, Smith C, Shapiro A, Monette R, Hutchison J, Stanimirovic D. Increased expression of bioactive chemokines in human cerebromicrovascular endothelial cells and astrocytes subjected to simulated ischemia in vitro. *J Neuroimmunol* 1999; 101: 148-160.
39. Gillani S, Cao J, Suzuki T, Hak DJ. The effect of ischemia reperfusion injury on skeletal muscle Injury. *Int J Care Injured* 2011; 4590-6: 1-6.
40. Gautam N, Olofsson AM, Herwald H, Iversen LF, Lundgren-Akerlund E, Hedqvist Pet al. Heparin-binding protein (HBP/CAP37): A missing link in neutrophil-evoked alteration of vascular permeability *Nat Med* 2001; 7: 1123-1127.
41. García-Villalón AL, Amezcua YM, Monge L, Fernández N, Salcedo A, Diéquez G. Endothelin-1 potentiation of coronary artery contraction after ischemia-reperfusion. *Vascul Pharmacol* 2008; 48: 109-114.
42. Weight SC, Bell PRF, Nicholson ML. Renal ischaemia-reperfusion injury. *Br J Surg* 1996; 83: 162-170.
43. Liu P, Yin K, Yue G, Wong P. Role of nitric oxide in hepatic ischemiareperfusion with endotoxemia. *J Inflamm* 1995; 46: 144-54.

44. Becker M, Menger MD, Lehr HA. Heparin-released superoxide dismutase inhibits postischemic leukocyte adhesion to venular endothelium. *Am J Physiol* 1994; 297: 925-930.
45. Carden DL, Granger DN. Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. *J Pathol* 2000; 190: 255-66.
46. Panés J, Perry M, Granger DN. Leukocyte-endothelial cell adhesion: avenues for therapeutic intervention. *Br J Pharmacol* 1999; 126: 537-550.
47. Belkin M, Brown RD, Wright JG. A new quantitative spectrophotometric assay of ischemia-reperfusion injury in skeletal muscle. *Am J Surg* 1988; 156: 83–86.
48. Halliwell B, Gutteridge JM. *Free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford, Oxford University Press, 1999.
49. Nakazawa H, Genka C, Fujishima M. Pathological aspects of active oxygens/free radicals. *Jpn J Physiol* 1996; 46: 15-32.
50. Uysal M. Serbest radikaller ve oksidatif stres. *Biyokimya*, Editörler F. Gürdöl ve E. Ademoğlu. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 2010; s. 647-652.
51. Yalçın AS. Antioksidanlar. *Klinik Gelişim* 1998; 11: 342-346.
52. Kehrer JP, Smith CV. Free radicals in Biology: Sources, reactivities, and roles in the etiology of human diseases. In: Frei B (ed). *Natural Antioxidants in Human Health and Disease*. Academic Press, San Diego 1994; p. 25-62.
53. Akkuş İ, 1995. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. 1. Baskı, Mimoza Yayınları, s.1-60.
54. Bocci, V.A., I. Zanardi, and V. Travagli, Ozone acting on human blood yields a hormetic dose-response relationship. *J Transl Med*, 2011. 9: p. 66. 59
55. Azarpazhooh A, Limeback H. The application of ozone in dentistry: A systematic review of literature. *Journal of Dentistry*, 2008; 36: 104–16
56. Heng S, Yeung KL, Djafer M, Schrotter J.C. A novel membrane reactor for ozone water treatment. *J Membr Sci*, 2007;289: 67–75.
57. Viebahn-Haensler, R. *The Use of Ozone in Medicine* 5 ed2007, İffezheim, Germany: Odrei Publishers. p.14-48.
58. Ozler M, Oter Ş, Korkmaz A. Ozon gazının tıbbi amaçlı kullanılması. *TAF Prev Med Bull*.
59. Oleg V. Maslennikov, Claudia N. Kontorshchikova, Irina A. Gribkova. Ozone therapy in Practice. *Health Manual*. Nizhny Novgorod 2008; 8(1):59-64.

60. Viebahn R. The use of ozone in medicine. 2nd ed. Heidelberg: Karl F. Haug Publishers, 1994, 1-178.
61. Edward L. Ozone: The revolution in dentistry., Quintessence Publishing Co. Ltd; London, 2004.
62. Pryor WA, Squadrito GL, Friedman M. The cascade mechanism to explain ozone toxicity: the role of lipid ozonation products. *Free Radic Biol Med.* 1995; 19(6): 935-41.
63. Mustafa MG. Biochemical basis of ozone toxicity. *Free Radical Biol Med.* 1990; 9: 245-265.
64. Schaur RJ. Basic aspects of the biochemical reactivity of 4-hydroxynonenal. 2003; 24: 149-159.
65. Di Paolo N, Gaggiotti E, Galli F. Extracorporeal blood oxygenation and ozonation: clinical and biological implications of ozone therapy. *Redox Rep.* 2005; 10(3): 121-30.
66. Di Paolo N, Bocci V, Gaggiotti E. Ozone therapy. *Int J Artif Organs.* 2004; 27(3): 168-75.
67. Halliwell B, Clement MV, Long LH. Hydrogen peroxide in the human body. *FEBS Lett.* 2000; 486: 10-13.
68. Velio Alvaro Bocci. Scientific and Medical Aspects of Ozone Therapy. State of the Art, *Archives of Medical Research.* 37 (2006) 425–435.
69. Bocci V, Aldinucci C. Biochemical modifications induced in human blood by oxygenation-ozonation. *J Biochem Mol Toxicol.* 2006; 20(3): 133–8.
70. Görgü N. Tavşan Böbrek Dokusunda ESWL İle İndüklenen Oksidatif Hasar Üzerine Antioksidan (Taurin) ve Ozon Terapi Etkilerinin Biyokimyasal Ve Histomorfometrik Karşılaştırılması. Uzmanlık Tezi, Kırıkkale, 2011.
71. Rilling S. The basic clinical applications of ozone therapy. *Ozonachrichten* 1985; 4: 7–17.
72. Rakovsky S ve Zaikov G, Application Of Ozone In Medicine, Chemistry & Chemical Technology, 2009 Vol. 3, No. 3.
73. Sagai M ve Bocci V. Mechanisms of Action Involved in Ozone Therapy: Is healing induced via a mild oxidative stress? *Medical Gas Research* 2011, 1: 29.
74. Ramirez D, González R, Merino N, Rodriguez S, Ancheta O. Inhibitory effects of Spirulina in zymosan-induced arthritis in mice. *Mediators Inflamm* 2002; 11: 75–79.
75. Beck EG, Wasser G, Viebahn-Hansler R. The current status of ozone therapy empirical developments and basic research. *Forsch Komplementarmed.* 1989; 5: 61-75.
76. Kushmakov R, Gandhi J, Seyam O, Jiang W, Joshi G, et al. Ozone therapy for diabetic foot. *Med Gas Res.* 2018 Sep 25; 8(3): 111-115.

77. Bocci VA. Tropospheric ozone toxicity vs. usefulness of ozone therapy. *Arch Med Res.* 2007;38(2): 265-67.
78. Wainstein J, Feldbrin Z, Boaz M, Harman-Boehm I. Efficacy of ozone-oxygen therapy for the treatment of diabetic foot ulcers. *Diabetes Technol Ther.* 2011 Dec;13(12):1255-60.
79. Gazzeri R, Galarza M, Neroni M, Esposito S, Alfieri A. Fulminating septicemia secondary to oxygen-ozone therapy for lumbar disc herniation. *Spine.* 2007;32(3): E121-3.
80. Martinez-Sanchez G, Al-Dalain SM, Menéndez S, Re L, Giuliani A, Candelario-Jalil E, et al. Therapeutic efficacy of ozone in patients with diabetic foot. *Eur J Pharmacol.* 2005;523:1-3:151-161.
81. Bocci V. Oxygen-ozone therapy: a critical evaluation. Springer, 2002:1-8.
82. Tseng C, Li C. Inactivation of surface viruses by gaseous ozone. *J Environ Health.* 2008 Jun;70:10:56-62.
83. Bolarin D M, Bhalla D K, Kleinman M T. Effects of repeated exposures of geriatric rats to ozone and particle-containing atmospheres: an analysis of bronchoalveolar lavage and plasma proteins. 1997; 9: 5 : 423-434.
84. Kesik V, Uysal B, Kurt B, Kismet E and Koseoglu V. Ozone ameliorates methotrexate-induced intestinal injury in rats. *Cancer Biol Ther.* 2009; 8: 1623-1628.
85. Bocci V, Travagli V, Zanardi I. May oxygen-ozone therapy improve cardiovascular disorders? *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets.* 2009; Jun;9:2:78-85.
86. De Monte A, van der Zee H, Bocci V. Major ozonated autohemotherapy in chronic limb ischemia with ulcerations. *J Altern Complement Med.* 2005;11:2:363-367.
87. Solic JJ, Hazucha MJ, Bromberg PA. The acute effects of 0.2 ppm ozone in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am Rev Respir Dis.* 1982;125:6: 664-669.
88. Wang H, Joseph JA. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radic Biol Med.* 1999; 27:612-616.
89. Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 1978; 52: 302–310.
90. Hanasand M, Omdal R, Norheim KB, Gøransson LG, Brede C, Jonsson G. Improved detection of advanced oxidation protein products in plasma. *Clin Chim Acta* 2012; 413: 901-906.
91. Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem* 1996; 239: 70-76.

92. Mylorie AA, Collins H, Umbles C, Kyle J. Erythrocyte superoxide dismutase activity and other parameters of copper status in rats ingesting lead acetate. *Toxicol Appl Pharmacol* 1986; 82: 512–20.
93. Lawrence RA, Burk RF. Glutathione peroxidase activity in selenium–deficient rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 1976; 71: 952–8.
94. Beutler E, Duron O, Kelly BM. Improved method for the determination of blood glutathione. *J Lab Clin Med* 1963; 61: 882–888.
95. Smith PK, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 1985; 150: 76–85.
96. Hybertson BM, et al. Oxidative stress in health and disease: the therapeutic potential of Nrf2 activation. *Mol Aspects Med*. 2011.
97. Roberts AJ, et al. Cardiac and renal responses to cross-clamping of the descending thoracic aorta. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1983; 86: 732- 741.
98. Nath AK, Fischereder M, Hostetter H. The role of oxidants in progressive renal injury. *Kidney Int* 1994; 45: 111-115.
99. Baud L, Ardaillou R. Involvement of reactive oxygen species in kidney damage. *Br Med Bull* 1993; 49: 621-629.
100. Falciani M, Rinaldi B, D'Agostino B, Mazzeo F, Rossi S, Nobili B, et al. Effects of Nebivolol on human platelet aggregation. *J Cardiovasc Pharmacol* 2001; 38: 922-929.
101. Okutan H, Savaş Ç, Delibas N. The antioxidant effect of melatonin in lung injury after aortic occlusion-reperfusion. *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 2004; 3: 519-522.
102. Kiriş İ, Okutan H, Savaş Ç, Yönden Z, Delibas N. Deneysel aortik iskemi reperfüzyon modelinde renal hasara gadolinyum klorürün etkisi. *Turkish J Vasc Surg* 2005; 14: 13-18.
103. Chang WC, Hsu FL. Inhibition of platelet aggregation and arachidonate metabolism in platelets by procyanidins. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1989; 38: 181-188.
104. Bagchi D, Garg A, Krohn RL. Oxygen free radical scavenging abilities of vitamins C and E, and a grape seed proanthocyanidin extract in vitro. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 1997; 95: 179-189.
105. Kumar V, Abbas AK, Fausto N. Cell Injury, Cell Death and Adaptations. Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease, 8th Edition. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2007: 1-29.
106. Ernster L. Biochemistry of reoxygenation injury. *Crit Care Med* 1988; 16: 947-953.

107. Parvums DV. The pathology of ischemia-reperfusion. Grace PA, Mathie RT (eds). Ischemia-reperfusion injury. London: Blackwell Science 1999: 3–19.
108. Prieto-Arribas R, Moreno-Gutiérrez A, Simal-Hernández P, et al. Experimental models of cerebral ischemia. *Rev Neurol* 2008;47(8):414-26.
109. Weman SM, Karhunen PJ, Penttillä A, Jarvinen AA, Salminen US. Reperfusion injury associated with one-fourth of deaths after coronary artery bypass grafting. *Ann Thorac Surg.* 2000;70:807-812.
110. Al Dalain SM, Martinez G, Jalil EC, Menendez S, Re L, Giuliani A, et al. Ozone treatment reduces markers of oxidative and endothelial damage in an experimental diabetes model in rats. *Pharmacol Res* 2001; 44(5):391-396.
111. Sanchez GM, Al-Dalain SM, Menendez S, Re L, Giuliani A, Jalil EC, et al. Therapeutic efficacy of ozone in patients with diabetic foot. *Eur J Pharmacol* 2005;523:151-161.
112. Aceto A, Mezzetti A, Di Ilio C, Calafiore AM, De Cesare D, Bosco G, Acciai N, et al. Effect of ischaemia-reperfusion on glutathione peroxidase, glutathione reductase and glutathione transferase activities in human heart protected by hypothermic cardioplegia. *Free Radic Res Commun.* 1990;8(2):85-91.
113. Biedunkiewicz B, Tylicki L, Niewegłowski T, Burakowski S, Rutkowski B. Clinical efficacy of ozonated autohemotherapy in hemodialyzed patients with intermittent claudication: an oxygen-controlled study. *Int J Artif Organs* 2004 ;27:29-34.
114. Hui Chen, Bianzhi Xing, Xiuheng Liu, Bingyan Zhan, Jiangqiao Zhou et al. Similarities Between Ozone Oxidative Preconditioning and Ischemic Preconditioning in Renal Ischemia/Reperfusion Injury *Archives of Medical Research* 39 (2008) 169-178.
115. A Uysal, İ Akar, KK Özsin, A Rahman, B Üstündağ, Hİ Özeran. Alt ekstremite iskemi reperfüzyonunun yol açtığı akciğer hasarında melatoninin koruyucu etkinliği. *Türk Göğüs Kalp Damar Cerrahisi Dergisi Ekim* 2006, Cilt 14, Sayı 4, Sayfa(lar) 308-314.
116. Kapan S, Kiris İ, Kılbas A, Altuntas İ, Karahan N, Okutan H. Eritropoetinin sıçan aortik iskemi reperfüzyonunda akciğer hasarı üzerine etkisi. *Türk Göğüs Kalp Damar Cer Derg* 2009;17:110-6.
117. Leon OS, Menendez S, Merino N, Castillo R, Sam S, Perez L, et al. Ozone oxidative preconditioning: a protection against cellular damage by free radicals. *Mediat Inflamm* 1998; 7: 289-294.
118. Kilic U, Sahin K, Tuzcu M, Basak N, Orhan C, Elibol-Can B et al. 2015: Enhancement of cisplatin sensitivity in human cervical cancer: epigallocatechin-3-gallate. *Frontiers in Nutrition*, 1,28.

- 119.Sies H, Masumoto H. 1996: Ebselen as a glutathione peroxidase mimic and as a scavenger of peroxynitrite. *Advances in Pharmacology Elsevier*. 38: 229-246.
- 120.Huang HC, Nguyen T, Pickett CB. 2002: Phosphorylation of Nrf2 at Ser-40 by protein kinase C regulates antioxidant response element-mediated transcription. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 45, 42769-42774.



10. EKLER

Ek-1



T.C
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU



Sayın Prof. Dr. Emin TİRELİ
İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi

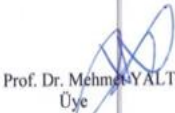
Karar No:2018/ 52

Başvuru : 21.05.2018

Toplantı Tarihi : 31.05.2018

Sorumluluğunu üstlendiğiniz, aşağıda çalışma materyali belirtilen Asistan Doktor Kaan ALTUNYUVA'ya ait "Akut ekstremité iskemisine maruz bırakılan ratlarda (sıçanlarda) ozon tedavisinin ekstremité üzerine etkisi" isimli projeniz Kurulumuz tarafından incelenmiş ve Etik Kurul ilkelerine uygun bulunmuştur.

Çalışılacak Hayvanın	Türü	Sıçan	İÜ Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı
	Cinsiyeti	Erkek	
	Sayısı	21	
Proje Başlangıç/Bitiş Tarihi		01.06.2018/01.12.2018	


 Prof. Dr. Mehmet YALTIK
Üye

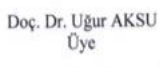

 Prof. Dr. Alev AKDOĞAN KAYMAZ
İÜ HADYEK Başkanı


 Prof. Dr. Mustafa Oral ÖNCÜL
Üye


 Prof. Dr. Alper OKYAR
Üye


 Prof. Dr. Ufuk ÇAKATAY
Üye

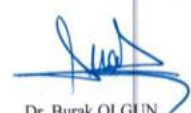

 Doç. Dr. Aygül EKİCİ
Üye


 Doç. Dr. Uğur AKSU
Üye


 Dr. Öğretim Üyesi Altan ARMUTAK
Üye


 Dr. Öğretim Üyesi Aydın ÇEVİK
Üye


 Uzm. Vet. Hek. Fatma TEKELİ
Üye


 Dr. Burak OLGUN


 Avukat Selma DEMİR

Ek-2



T.C
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi



Konu: Yürürlüğe Giren Proje Öneriniz

Tarih
28.09.2018

Sayın Prof.Dr. Emin TİRELİ

Aşağıda bilgileri özetlenen proje önerinize yönelik değerlendirme süreci tamamlanmış ve BAP Komisyonu tarafından desteklenmesi uygun görülen projeniz, proje sözleşmesinin Rektörlük Makamı tarafından onaylanmasıyla yürürlüğe girmiş bulunmaktadır.

Tebrik eder, çalışmalarınızda başarılar dilerim.

Saygılarımla,

Prof.Dr. Ayşe EROL
 Koordinatör

Proje Başlığı: Akut ekstremitte iskemisine maruz bırakılan ratlarda (sıçanlarda) ozon tedavisinin ekstremitte üzerine etkisi

Proje No: TTU-2018-31664

Proje Türü: T.Uzmanlık

Süresi: 6 ay

Başlama Tarihi: 28.09.2018

Onaylanan Bütçesi: 20.000,00 TL

Proje Yürütücüsü: Prof.Dr. Emin TİRELİ

Araştırmacı(lar): ARŞ.GÖR. KAAAN ALTUNYUVA

11. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Kaan	Soyadı	Altunyuva
Doğ.Yeri	Elazığ/TÜRKİYE	Doğ.Tar.	14.08.1988
Uyruğu	Türkiye Cumhuriyeti	TC NO:	12155116888
Email	kaanaltuny@hotmail.com	Tel	05354778936

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora		
Yük.Lis.		
Lisans	İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi/ Çanakkale 18 Mart Üniversitesi Tıp Fakültesi	2009-2013/ 2007-2009
Lise	Cağaloğlu Anadolu Lisesi	2002-2007

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.			-
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜD S Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	iyi	iyi	iyi		

Yayınları/ /Sertifikaları/Ödülleri

Poster Sunumları:

Midaortic Syndrome. Metin Onur Beyaz, Çağla Canbay, Murat Ugurlucan, Ömer Ali Sayın, Didem Melis Öztas, Mehmet Akif Önal, Siraslan Bahseliyev, Kaan Altunyuvu, Ergin Arslanoğlu, Murat Basaran, Nilgün Bozbuğa, Enver Dayıoğlu. The 64th International Congress of the European Society of Cardiovascular and Endovascular Surgery, 2015, İstanbul.

Behçet Hastalarındaki Abdominal Aort Patolojilerine Endovasküler Yaklaşımlarımızın Orta Dönem Sonuçları. Mehmet Akif Onalan, Onur Selcuk Goksel, Şıraslan Bahseliyev, Sinan Şahin, Ergin Eren, Celalettin Karatepe, Bayer Cınar. 17. Ulusal Vaskuler Ve Endovaskuler Cerrahi Kongresi & 8. Ulusal Fleboloji Kongresi.

Periferik Arter Hastalıklarında Endarterektomi ve Patchplasty. Metin Onur Beyaz, Didem Melis Öztas, Mehmet Akif Önal, Şıraslan Bahseliyev, Kaan Altunyuvu, Ergin Arsalanoğlu, Çağla Canbay, Seda Yıldırım, Ömer Ali Sayın, Murat Uğurlucan, Ufuk Alpagut, Enver Dayıoğlu. 17. Ulusal Vaskuler Ve Endovaskuler Cerrahi Kongresi & 8. Ulusal Fleboloji Kongresi.

Kladikasyoda ayırıcı tanı; Aortik Agenezi. Kaan Altunyuvu, Ergin Arslanoğlu, Çağla Canbay, Seda Cemile Pamuk, Mert Meriç. Türk Kalp ve Damar Cerrahisi Derneği 15. Kongresi, 2018, Antalya.

Akut Tip B diseksiyon nedeni ile Tevar işlemi uygulanan hastada izlenen iatrojenik karotis arter diseksiyonu. Kaan Altunyuvu, Çağla Canbay, İbrahim Demir, Onur Selçuk Göksel. Türk Kalp ve Damar Cerrahisi Derneği 15. Kongresi, 2018, Antalya.

Mitral kapakta lokalize aritmojen kitle. Kaan Altunyuvu, Çağla Canbay, Mazlum Şahin, Onur Selçuk Göksel, Emin Tireli. Türk Kalp ve Damar Cerrahisi Derneği 15. Kongresi, 2018, Antalya.

Kritik bacak iskemisinde derin femoral artere Miller venöz cuff. Kaan Altunyuva, Ergin Arslanoğlu, Mert Meriç. Türk Kalp ve Damar Cerrahisi Derneği 15. Kongresi, 2018, Antalya.

İleri yaş bilateral karotis arter lezyonu olan hastalarda endarterektomi. Onur Selçuk Göksel, Kaan Altunyuva, Ergin Arslanoğlu, Çağla Canbay, Doğan Yetüt. Türk Kalp ve Damar Cerrahisi Derneği 15. Kongresi, 2018, Antalya.

Travmatik ATA psödoanevrizmalarında iki farklı yaklaşım. Kaan Altunyuva, Ergin Arslanoğlu, İbrahim Demir, Melike Ertan, Ömer Ali Sayın. Türk Kalp ve Damar Cerrahisi Derneği 15. Kongresi, 2018, Antalya.

Semptomatik karotis arter stenozu ve tortiyozitesinde modifiye teknik: Rezeksiyon ve reimplantasyon. Kaan Altunyuva, Ergin Arslanoğlu, Doğan Yetüt, Ömer Ali Sayın. Türk Kalp ve Damar Cerrahisi Derneği 15. Kongresi, 2018, Antalya.

Rivaroksaban kullanım öyküsü olan hastada spontan femoral psödoanevrizma. Kaan Altunyuva, Ömer Ali Sayın, Ergin Arslanoğlu, Melike Ertan, İbrahim Demir. Türk Kalp ve Damar Cerrahisi Derneği 15. Kongresi, 2018, Antalya.

Sözlü Sunum:

İzole iliak arter anevrizmalarında endovasküler tedavi - tek merkezde 10 yıllık deneyim. Kaan Altunyuva, Çağla Canbay, Emre Gök, Ergin Arslanoğlu, Melike Ertan, İbrahim Demir, Onur Selçuk Göksel. Türk Kalp ve Damar Cerrahisi Derneği 15. Kongresi, 2018, Antalya.

Sertifikalar:

Pure Progress Anastomoz Beceri Kursu Katılım Sertifikası.18 Kasım 2014

Pure Progress Mitral Kapak Tamir Kursu Katılım Sertifikası.19 Aralık 2015

17. Ulusal Vaskuler Ve Endovaskuler Cerrahi Kongresi, 2015, Antalya

TKDC derneği 14. Kongresi, 2016, Antalya

Pure Progress Aort Kök Cerrahi Kursu Katılım Sertifikası.5 Kasım 2016, İstanbul

18. Ulusal Vaskuler Ve Endovaskuler Cerrahi Kongresi, 2017, Kıbrıs

İstanbul Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Deney Hayvanları
Kullanım Sertifikası, İstanbul 2017

4. Minimal İnvazif ve Robotik Cerrahi Kongresi. 21-23 Haziran 2018, İstanbul

TKDC derneği 15. Kongresi, 26-29 Ekim 2018, Antalya

Fleboloji Derneği Ven Akademisi İstanbul Toplantısı. 10 Kasım 2018, İstanbul