

T.C.
BÜLENT ECEVİT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI

OZONLA ÖN KOŞULLAMANIN PREOPERATİF RADYOTERAPİ ALAN
RATLARDA KOLON ANASTOMOZU İYİLEŞMESİ ÜZERİNE ETKİSİ
(DENEYSEL ÇALIŞMA)

Dr. İlhan TAŞDÖVEN

TIPTA UZMANLIK TEZİ

ZONGULDAK

2013

**T.C.
BÜLENT ECEVİT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI**

**OZONLA ÖN KOŞULLAMANIN PREOPERATİF RADYOTERAPİ ALAN
RATLARDA KOLON ANASTOMOZU İYİLEŞMESİ ÜZERİNE ETKİSİ**

(DENEYSEL ÇALIŞMA)

Dr. İlhan TAŞDÖVEN

TIPTA UZMANLIK TEZİ

**TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Ali Uğur EMRE**

ZONGULDAK

2013

TEZ ONAY TUTANAĞI

Tezin Teslim Edildiği Üniversite/Fakülte: Bülent Ecevit Üniversitesi Tıp Fakültesi

Tez Başlığı : Ozonla Ön Koşullamanın Preoperatif Radyoterapi Alan Ratlarda Kolon Anastomozu İyileşmesi Üzerine Etkisi

Tez Yazarı : Arş. Gör. Dr. İlhan TAŞDÖVEN

Tez Savunma Tarihi: 25/01/2013

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Ali Uğur EMRE

Doç. Dr. Ali Uğur EMRE
Jüri Başkanı

Doç. Dr. Kemal KARAKAYA
Üye

Yrd. Doç. Dr. Fatma Ayça GÜLTEKİN
Üye

UYGUNDUR

08/04/2013

Prof. Dr. Mustafa AYDIN
Dekan

TEŞEKKÜR

Asistanlık eğitimi süresince bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen ve tez çalışmalarım da katkıları olan danışman hocam Doç. Dr. Ali Uğur EMRE'ye, yine eğitim süresinde her türlü bilgi ve tecrübesini paylaştığım değerli hocalarım Prof.Dr. Mustafa ÇÖMERT, Doç. Dr. Öge TAŞCILAR, Doç. Dr. Bülent UÇAN, Ablam olarak gördüğüm Doç. Dr. Güldeniz Karadeniz ÇAKMAK, Doç. Dr. Kemal KARAKAYA, çalışmalarım da destek için Yrd. Doç. Dr. Fatma Ayça GÜLTEKİN'e asistanlık eğitimim süresince birlikte çalışma şansına eriştiğim arkadaşlarım Dr. Hüseyin BAYRAK, Dr. Önder ÖNER, Dr. Ufuk TALİ, Dr. Serap ÇABALAK, Dr. Onur MERDİVAN, Dr. Murat YÜLÜKLÜ, Dr. Demet SÜMER, Dr. Metin VARLI, Dr. Erkan AKSOY, Dr. Sayit TAYFUN, Dr. Selçuk ÖZKAN ve bütün Genel cerrahi hemşirelerine ve diğer çalışanlarına teşekkür ederim.

Radyasyon Onkolojisi Yrd. Doç. Dr. Bekir Hakan Bakkal'a Patolojik incelemelerimde katkılarından dolayı Doç. Dr. Banu DOĞAN GÜN'e ve istatistiksel analizlerde katkılarını sunan Prof. Dr. Vildan Sümbüloğlu ve veri analizinde katkıları olan Öğr. Gör. Mustafa Çağatay BÜYÜKUYSAL'a teşekkür ederim.

Eğitim süresince tüm sıkıntılarıma katlanarak beni destekleyen çocuğum Tolga BERK'e teşekkürler.

Dr. İlhan TAŞDÖVEN

Zonguldak, 2013

ÖZET

İlhan Taşdöven “Ozonla Ön Koşullamanın Preopartif Radyoterapi Alan Ratlarda Kolon Anastomozu İyileşmesi Üzerine Etkisi” Bülent Ecevit Üniversitesi Tıp Fakültesi, Genel Cerrahi, Uzmanlık Tezi, Zonguldak, 2013.

Giriş-Amaç: Kolorektal kanserlerde uygulanan neoadjuvan radyoterapi anastomoz iyileşmesindeki mekanik ve biyokimyasal parametreleri olumsuz yönde etkilemektedir. Radyasyonun etkisi, hücrelerde bulunan suyun radyolitik dekompozisyonu sonucunda açığa çıkan serbest oksijen radikalleri (SOR) ile meydana gelmektedir. Dahası, radyasyon mikrovasküler dolaşımın azalmasına, lokal iskemi ve dolayısıyla yetersiz iyileşmeye neden olmaktadır. Yapılan çalışmalar, ozonun antioksidan enzim aktivitesini artırdığını ve konağı SOR ile meydana gelebilecek hasarlanmaya karşı hazırladığını göstermiştir. Bu çalışmada kontrollü olarak verilen ozonun preoperatif radyoterapi verilen ratlarda kolon anastomozu iyileşmesi üzerine etkilerini incelendi

Gereç ve Yöntem: Ratlar (n=48) 6 gruba ayrıldı. Tüm gruplardaki ratlara sol kolon rezeksiyonu ve anastomozu uygulandı. Kontrol Grupları (1 ve 2); sadece anastomoz uygulandı. Salin Grupları (3 ve 4); radyoterapi öncesi 5 gün boyunca 1 mg/kg/gün intraperitoneal salin verildi. Ozon Grupları (5 ve 6); radyoterapi öncesi 5 gün boyunca 1 mg/kg/gün intraperitoneal ozon verildi. Takiben ratlara 6 Gy total vücut ışınlaması uygulandı. Anastomozlar ise ışınlama sonrası 7. günde gerçekleştirildi. Grup1, 3 ve 5'teki ratlar anastomoz sonrası 3. günde, Grup 2, 4 ve 6 daki ratlar ise anastomoz sonrası 7. Günde sakrifiye edildiler. İntraperitoneal adezyon, anastomoza ait komplikasyonlar ve anastomoz patlama basınçları değerlendirildi. Anastomoz yapılan segmentte hidroksiprolin (HPO) düzeyi, myeloperoksidaz aktivitesi (MPO) ve malondialdehid (MDA) düzeylerine bakıldı ve histopatolojik değerlendirilme yapıldı.

SONUÇLAR: Ortalama anastomoz patlama basıncı Grup 3 ve Grup 6 da anlamlı olarak yüksek bulundu; sırası ile 50.75 ve 140.88 cm-su. Ozon verilen gruplarda (Grup 5 ve 6) HPO düzeyleri verilmeyen gruplara (Grup 3 ve 4) oranla daha yüksekti. Tüm gruplarda kontrol gruplarına oranla inflamatuvar hücre infiltrasyonunun daha yoğun olduğu gözlemlendi. Gruplar arasında fibroblast proliferasyonunun benzer olduğu ve istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü. MPO aktivitesi Grup 5 ve 6'da klinik olarak yüksek bulunurken, grup 3 ve 4 ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Oksidatif hasarın

belirteçlerinden MDA düzeyleri ozonla önkoşullama yapılan Grup 5'teki ratlarda Grup 3 ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulundu. Grup 2, 4 ve 6 MDA düzeyleri açısından değerlendirildiğinde Grup 6'da klinik olarak anlamlı düşüş saptanırken, istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı tespit edildi.

Tartışma ve Sonuç: Çalışmada, ozonla oksidatif ön koşullamanın radyoterapi sonrası yapılan kolon anastomozları üzerine olumlu etkisi gözlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Anastomoz, ozon, radyoterapi.

ABSTRACT

Taşdöven İlhan “Effects of Ozone Preconditioning on The Healing of Rat Colonic Anastomosis After Preoperative Radiotherapy” Bulent Ecevit University Faculty of Medicine. Thesis in General Surgery, Zonguldak 2013.

Introduction--Purpose: Neoadjuvant radiotherapy for colorectal cancer could affect mechanical and biochemical parameters of anastomotic healing. The killing action of radiation is mainly mediated through the free radicals generated from the radiolytic decomposition of cellular water. Moreover radiation may cause the reduction of the microvascular bed and local ischemia with impaired healing. It was demonstrated that ozone increases antioxidant enzyme activities and prepares the host to face physiopathologic conditions mediated by reactive oxygen species (ROS). We aimed to investigate the effect of controlled administration of ozone on healing of anastomosis and activation of antioxidant enzymes in colon in radiotherapy received colonic anastomosis.

Material and Methods: Rats (n=48) were randomly divided into 3 groups. Left colonic resection and **anastomosis** were performed in each group. Control groups (1 and 2); received no further treatment. Saline-treated Groups (3 and 4); 1 mg/kg/day saline was administered intraperitoneally for five consecutive day before irradiation. Ozone-treated Groups (5 and 6); rats received 1 mg/kg/day ozone therapy intraperitoneally for five consecutive day before irradiation. Then rats were exposed to whole-body IR (6 Gy) after pretreatment with either saline or ozone. Anastomosis was performed in groups on the 7th day after irradiation. Group 1, group 3 and group 5 rats were sacrificed on the third postoperative day. Group 2, group 4 and group 6 rats were sacrificed on the seventh postoperative day. Intraperitoneal adhesions, anastomotic complications, and anastomotic bursting pressure measurements were recorded. Following these measurements the anastomotic segment was resected for hydroxyproline (HPO) content, myeloperoxidase (MPO) activity, malonyldialdehyde (MDA) level and histopathological evaluation.

Results: The mean bursting pressure was significantly low in Group 3 and was significantly high in Group 6; 50.75 and 140.88 cm of water. In the groups in which ozone was given (Groups 5 and 6), the tissue HPO levels were higher than in the groups which

were not given ozone (Groups 3 and 4). In all the groups in respect to the control group, inflammatory cell infiltration was observed in a more intense way. Among the groups, fibroblast proliferation was observed equally and statistically insignificant. Although the mean values for MPO activity in Groups 5 and 6 were higher than those in groups 3 and 4, the differences of mean values for MPO activity in those groups were statistically not significant. With regard to the markers of the oxidative damage, MDA levels were statistically significantly lower in the ozone treated group compared to the saline treated group on rats sacrificed on 3rd PO day. In spite of clinical significance, there were no statistically significant differences among the Group 2, Group 4 and Group 6 regarding MDA levels.

Conclusion: Ozone oxidative preconditioning has favorable effects on healing of experimental colon anastomosis.

Key Words: Colon anastomosis, Ozone, radiotherapy.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
TEŞEKKÜR	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER.....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	x
ŞEKİLLER	xii
RESİMLER	xiii
TABLolar	xiv
GRAFİKLER.....	xv
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1 KOLONUN ANATOMİ HİSTOLOJİ VE FİZYOLOJİSİ.....	3
2.1.1 Çekum	3
2.1.2 Çıkan Kolon	4
2.1.3 Transvers Kolon	4
2.1.4 İnen Kolon.....	4
2.1.5 Sigmoid Kolon	4
2.1.6 Rektum	5
2.1.7 Kalın Barsağın Arter ve Venleri.....	5
2.1.8 Kalın Barsağın Sinirleri.....	6
2.1.9 Kalın Barsağın Lenfatikleri	7
2.1.10 Histoloji	7

2.1.11 Fizyoloji.....	8
2.2 YARA İYİLEŞMESİ.....	9
2.2.1 Hemostaz ve inflamasyon fazı	9
2.2.2 Proliferasyon fazı	10
2.2.3 Olgunlaşma ve yeniden yapılanma fazı.....	10
2.3 GASTROİNTESTİAL SİSTEMDE YARA İYİLEŞMESİ VE KOLON ANASTOMOZU	10
2.3.1 Anastomoz İyileşmesini Etkileyen Faktörler	11
2.3.2 Gastrointestinal Kanalda Yara İyileşmesi Fizyolojisi	16
2.4 BAGIRSAKTA ANASTOMOZ İYİLEŞMESİNİ İNCELEME YÖNTEMLERİ....	18
2.4.1 Mekanik inceleme Yöntemleri	19
2.4.2 Biyokimyasal Yöntemler.....	19
2.4.3 Histopatolojik Değerlendirme	20
2.4.4 Radyoaktif isaretleme Yöntemleri.....	20
2.4.5 Diğer Yöntemler	20
2.5 OZON	21
2.5.1 Medikal ozonun uygulama biçimleri.....	21
2.5.2 Medikal ozonun etki mekanizmaları	24
2.5.3 Medikal Ozon Tedavisinin Klinik Uygulamaları	29
2.6 SERBEST RADİKALLER	30
2.6.1 Malondialdehid (MDA)	31
2.6.2 SOD	31
2.7 RADYOTERAPİ.....	32
2.7.1 Radyasyonun Hücre Üzerindeki Biyolojik Etkileri.....	32
2.7.2 Radyasyonun Dokular Üzerindeki Etkileri	33
2.7.3 Preoperatif Radyoterapi.....	34

2.7.4 Radyasyon Enteriti	35
2.8 ÖN KOSULLAMA UYGULAMASI VE ÖN KOSULLAMA TEDAVİSİ.....	36
3. MATERİYAL ve METOD	38
3.1 GRUPLAR	38
3.2 CERRAHİ İŞLEM.....	39
3.3 SAKRİFİKASYON	41
3.4 PATLAMA BASINCI ÖLÇÜMÜ.....	41
3.5 BİYOKİMYASAL İNCELEMELER	42
3.6 HİSTOPATOLOJİK DEĞERLENDİRME	43
3.7 İSTATİSTİKSEL İNCELEME	44
4. BULGULAR	45
4.1 ANASTOMOZ PATLAMA BASINCI DEĞERLERİ	45
4.2 DOKU HİDROKSİPROLİN DÜZEYLERİ.....	46
4.3 DOKUDA MALONDİALDEHİD DÜZEYLERİ(MDA).....	48
4.4 DOKUDA MYELOPEROKSİDAZ AKTİVİTELERİ	49
4.5 DOKUDA SÜPEROKSİT DİSMUTAZ(SOD) AKTİVİTELERİ.....	50
4.6 HİSTOPATOLOJİK İNCELEME.....	52
5. TARTIŞMA.....	55
6. SONUÇ.....	61
KAYNAKLAR.....	62
EK AÇIKLAMALAR	75

SİMGELER VE KISALTMALAR

Atm	: Atmosfer
ATP	: Adenozin trifosfat
CO ₂	: Karbon dioksit
ÇDYA	: Çoklu doymamıs yağ asiti
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EGF	: epidermal growth factor
Fe	: Demir molekülü
GSH	: Glutatyon
GSH-Px	: Glutatyon peroksidaz
GSH-R	: Glutatyon redüktaz
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
HClO	: Hipoklorik asit
HO-1	: Hem oksijenaz
HSP-70	: ısı şok protein-70
IL-I	: interleukin 1
LOÜ	: Lipit oksidasyon ürünü
MDA	: Malondialdehit
MPO	: myeloperoksidaz
Mmol	: Mikromol
ml	: Mililitre
NAP-II	: neutrophil-activating peptide-II
Nmol	: Nanomol
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NO	: Nitrik oksit
O ₂ -	: Superoksit serbest radikali
O ₂	: Oksijen
O ₃	: Ozon
OH	: Hidroksil radikali
ROÜ	: Reaktif oksijen ürünleri

SOD	: Superoksit dismutaz
SOR	: Superoksit redüktaz
TGF- β	: transforming growth factor β
XOD	: Ksantin oksidaz
XOD	: Ksantin oksidaz

ŞEKİLLER

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 1. Kolonun arterler	6
Şekil 2. Ozon jenaratörü makinasının iç mekanik şekli görünüm.....	21

RESİMLER

<u>Resim</u>	<u>Sayfa</u>
Resim 1. Kolonun histolojik yapısı enine kesit.....	8
Resim 2. Şıçanlara kas içi ketamin uygulaması	38
Resim 3. Anestezisi altındaki denek	39
Resim 4. Ozon üretici makine	39
Resim 5. Patlama basıncı ölçülmesi.....	41
Resim 6. A grubu: Yüzeyde iltihabi eksuda yanısıra mukozal ve submukozal alanda mikst iltihabi hücre infiltrasyonu ve ödem (H&E, x50)	52
Resim 7. D grubu: İltihabi eksudaya eşlik eden yüzey epitelinde reepitelizasyon ve mononükleer iltihabi hücreler (H&E, x50)	53
Resim 8. F grubu: Mukozal ve submukozal alanda fibrozis, mononükleer iltihabi hücrele ve fokal yüzeyel reepitelizasyon (H&E, x50)	53

TABLÖLAR

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
Tablo 1. Anostamoz iyileşmesini etkileyen faktörler	12
Tablo 2. Patlama basınç degerleri ve standart sapmaları	44
Tablo 3. Ortalama hidroksiprolin değerleri (µg/g yaş doku).	46
Tablo 4. Ortalama MDA değerleri (HPO, nmol/ mg doku).Tablo 4. Ortalama MDA değerleri (HPO, nmol/ mg doku).....	47
Tablo 5. Gruplara göre anastomotik dokuda myeloperoksidaz aktiviteleri (MPO, nmol/ mg doku).....	48
Tablo 6. Gruplara göre anastomotik dokuda süperoksitdismutaz aktiviteleri (SOD, Ü/ml doku).	50
Tablo 7. Grubların inflamatuvar hücre infiltrasyonunun yüzde oranları	51

GRAFİKLER

<u>Grafik</u>	<u>Sayfa</u>
Grafik 1. Gruplara göre anastomoz patlama basıncı degerlerinin dagılımı.....	45
Grafik 2. Gruplara göre anastomotik dokuda hidroksiprolin düzeyleri (HPO, µg/gr doku).	46
Grafik 3. Gruplara göre anastomotik dokuda malondialdehid düzeyleri (MDA, nmol/mg doku).	48
Grafik 4. Gruplara göre anastomotik dokuda myeloperoksidaz aktiviteleri (MPO, nmol/mg doku).	49
Grafik 5. Gruplara göre anastomotik dokuda süperoksitdismutaz aktiviteleri (SOD, Ü/ml doku).	50

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kolon anastomozu yapılmış hastalarda gelişen en önemli komplikasyonlardan biri anastomoz kapağıdır. Bu komplikasyonun postoperatif takip ve tedavideki gelişmelere rağmen mortalite ve morbiditeye etkisi yüksektir (85). Operasyon sonrasında %2-10 arasında değişebilen anastomoz kaçakları görülebilmektedir (1,2). Bu oranlar operasyon bölgesine göre değişmektedir. Sol kolonda %3, sağ kolonda %2 ve rektumda %10 oranlarında anastomoz kapağı bildirilmiştir (85). Anastomoz kapağı sonrası mortalite oranı ise %15 civarındadır (86). Anastomoz iyileşmesini önemli düzeyde bozan birçok faktör bulunmaktadır. Bu faktörler içinde splanknik sistemde perfüzyon bozukluğu, lokal enfeksiyon varlığı (peritonit), hemorajik sok ve şiddetli kan kaybı sayılabilir. Bunların çoğu anastomotik perfüzyonu azaltıp iskemi veya hipoperfüzyona hatta daha kötü sonuçlara yol açan iskemi-reperfüzyona neden olmaktadır (87-88).

Radyasyon maruziyetinin canlılarda genetik mutasyonlara, oksidatif hasar yoluyla lipid ve proteinler üzerinde yapısal ve fonksiyonel bozukluklara neden olarak kanser ve yaşlılığın etyopatogenezinde rol oynadığı, bu durumun yüksek oksijen konsantrasyonlarında daha dramatik olduğu öne sürülmektedir. Birçok hastalığın tedavisinde kullanılmakta olan yöntemler beraberinde ilave sorunlara da neden olabilmektedir. Günümüzde kanser tedavisinde kullanılan kemoterapi ve radyoterapi yöntemleri doğaları gereği kanser hücreleriyle birlikte sağlıklı hücre ve dokulara da önemli ölçüde zarar verebilmektedir. Radyoterapide kullanılan iyonize ısımlar organizmada doza ve ısımlama süresine bağlı olarak birtakım hasarlar oluşturur. Bu hasarların en önemlisi maruz kalan radyasyon etkisi ile oluşan oksidatif stres ve neden olduğu oksidatif hasarlardır. Öte yandan bir takım ilave yöntemlerle kullanılan ana yöntemin zararlı yan etkileri de en aza indirilmeye çalışılmaktadır (84).

Medikal ozon (O₃) tedavisi antioksidan, antiinflamatuvar, antimikrobiyal etkileri nedeniyle tıpta tedavi amacıyla geniş alanda kullanılmaktadır (77). Farmakolojik ilaçlarla tedaviden farklı olarak ozon tedavisi ilaç-reseptör ilişkisi ile değil, vücudun kendi güçlü potansiyelleri olan antioksidan ve antiinflamatuvar yolları kullanarak yarattığı alarm

reaksiyonu ile vücudu hastalıklar karşısında güçlendiren bir tedavi yöntemidir (78, 79). Ozonun tedavi edici etkisi özellikle ROÜ, hidrojen peroksit ve lipit oksidasyon ürünü (LOÜ) üzerinden olmaktadır (80). Dolayısıyla ozon, iskemi reperfüzyon hasarını önlemede etkili olabileceği düşünülerek iskemi-reperfüzyon çalışmalarında tedavi amaçlı kullanılmıştır (81-82). Ozon ön kosullama tedavisinin karaciğer, kalp, böbrek gibi çeşitli organlarda iskemi reperfüzyon hasarını önlemede etkili olduğu deneysel çalışmalarda gösterilmiştir (81-83). Ozon tedavisinde ozon toksisitesi nedeniyle ozon saf verilememekte oksijen/ozon karışımı şeklinde uygulanmaktadır (77).

Çalışmamızda, sıçanlarda operasyon öncesi intraperitoneal olarak uygulanan ozon (O₃) ile ön kosullama sonrası abomino-pelvik radyoterapi uygulandı sonrasında sol kolon anastomoz yapıldı. Radyoterpi sonrası oluşan hasarı önlemede ozon uygulanan sıçanlarda antioksidan kapasitede meydana gelen artış, anastomoz hattında inflamatuvar sürecin baskılanması ve histopatolojik değişikliklerin gösterilmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 KOLONUN ANATOMİ HİSTOLOJİ VE FİZYOLOJİSİ

Kalın barsak ileumun sonundan anüse kadar uzanır ve ortalama 1.5 m uzunluğundadır. İleum ve çekumun birleşme yerinde ileoçekal valv denilen bir kapak vardır. Bu kapak barsak içeriğinin kalın barsaktan ince barsağa geçmesine engel olur. Kalın barsağın yapısı ve görünüşü ince barsaktan farklıdır. İnce barsaklardan geniştir, daha geniş bir bölümü sabittir. Longitudinal kas lifleri biraraya gelerek kolon duvarında tenya denilen bantları meydana getirirler (1,2).

Üç tane tenya vardır;

- 1-Tenya libera
- 2-Tenya mezokolika
- 3-Tenya omentalis

Tenyalar sirküler kas tabakasından ve barsak uzunluğundan daha kısadırlar, bu nedenle kolon büzülmüş ve keseler (haustralar) oluşturmuştur (1,2,3,4). Haustra barsağın iç yüzünde birbirinden semilüner plikalarla ayrılmışlardır (3,4). Kalın barsağın dış yüzünde periton ile örtülü yağ doku uzantıları görülür. Bunlara "appendices epiploika" denir (1,4). Kalın barsak çekum, çıkan kolon, transvers kolon, inen kolon, sigmoid kolon ve rektum denilen bölümlerden oluşmuştur (1,2,3,4).

2.1.1 Çekum

Kalın barsağın ilk parçasıdır, sağ iliak fossada yer alır. Uzunluğu ortalama 6 cm, genişliği 7.5cm'dir. Alt tarafta inguinal ligamenti biraz aşar, yukarıda asendan kolon ile devam eder. Arka yüzü iliakus ve psoas majör kasları ile komşudur. Çekum tamamen periton ile

kaplıdır. Taenialar çekumun arka yüzünün iç tarafında, appendiks vermiformisin yapıştığı yerden başlar (2,3,4).

2.1.2 Çıkan Kolon

Çekumdan karaciğerin sağ lobunun alt yüzüne kadar uzanır. 15-20 cm uzunluğundadır. Burada birden sola ve biraz öne doğru bükülerek fleksura hepaticayı yapar, ön ve yan yüzleri periton ile örtülüdür. Arka duvarı gevşek bağdoku ile karın arka duvarına tutunmuştur. Bazen arka yüzü peritonla örtülü olabilir. O zaman bir mezokolonu olur (1,3).

2.1.3 Transvers Kolon

Hepatik fleksuradan başlar, aşağıya doğru konveks bir kavis yapar. Umbilikal ve sol hipokondriak bölgeyi çaprazlayarak geçer. Dalağın alt ucu altında aşağıya doğru bükülerek splenik fleksurayı yapar. Ortalama 50 cm uzunluğundadır. Transvers mezokolon ile karın arka duvarına tutunmuştur (2,3).

2.1.4 İnen Kolon

Splenik fleksuradan sol iliak fossaya kadar uzanır. Ortalama 25 cm uzunluğundadır. Sol böbreğin dış kenarını izleyerek psoas majör ve quadratus lumborum kası arasında iliak kristaya kadar iner. İliakus ve psoas majörkaslarının önünde içe ve aşağıya kıvrılır, küçük pelvis giriminde sigmoid kolonla sonlanır. Yan ve ön yüzü peritonla örtülüdür. Arka yüzü çıkan kolon gibi gevşek bir bağ doku ile karın arka duvarına yapışıktır (1,2,3,4).

2.1.5 Sigmoid Kolon

Sigmoid kolon psoas majör kasının iç kenarından minör pelvis giriminde başlar, bir kıvrım yapar ve üçüncü sakral vertebra hizasında rektumla sonlanır (1,3). Ortalama uzunluğu 40 cm dir. Kıvrımın üç parçası vardır. Birinci parça pelvisin sol duvarını takip ederek aşağıya doğru iner. İkinci parça erkekte rektum ile mesane, kadında rektum ile uterus arasında pelvis boşluğunu çaprazlar ve pelvisin sağ duvarına uzanır. Üçüncü parça geriye doğru bükülür, sakrumun önünde orta hatta aşağıya doğru devam eder. Sigmoid kolon peritonla tamamen sarılıdır. Uzunluğu değişebilen bir mezo ile karın arka duvarına tutunmuştur

(1,2,3,4). Sigmoid kolonun şekli ve pozisyonu kendi uzunluğuna, mezokolonun büyüklüğüne, gerilme durumuna, rektum, mesane ve kadında uterusun durumuna bağlıdır. Fazla gerildiği zaman küçük pelvisten karın boşluğuna doğru yükselir, boş iken tekrar pelvis içine iner. Sigmoid kolonun aşağı kesiminde taenialar incelmeye başlar ve rektuma yakın kısımda tamamen kaybolurlar (3,4).

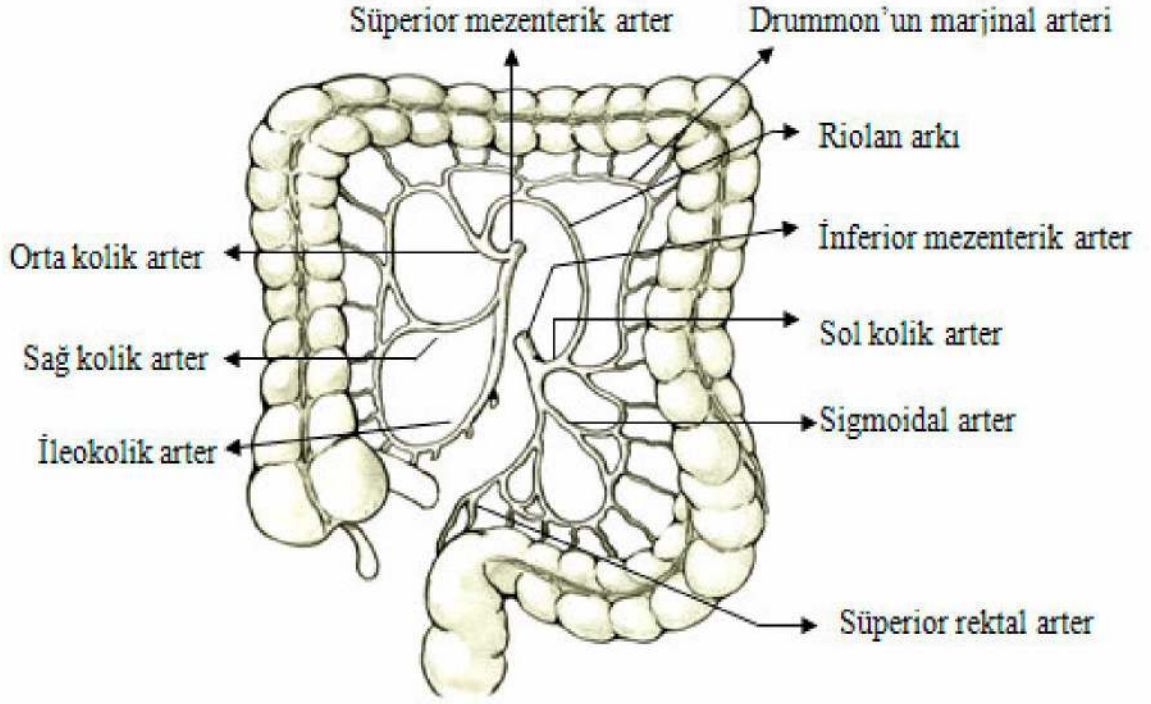
2.1.6 Rektum

Sigmoid kolon 3. sakral vertebra düzeyinde, sigmoid mezokolonun alt ucunda rektumla devam eder. Rektum sakrumla koksiksin konkavlığına uygun bir eğrilik göstererek aşağıya doğru uzanır. Bu antero-posterior eğriliğe fleksura sakralis denir. Bu eğrilik önce aşağıya ve arkaya sonra öne doğrudur. Rektum pelvik diaframdan geçerek anal kanalla devam eder. Anorektal kavşak koksiks ucunun biraz aşağısında 2-3 cm önünde yer alır. Rektumun alt ucundan itibaren anal kanal aşağıya ve arkaya doğru uzanır. Bu seviye prostatın alt ucu hizasındadır. Rektumun arkaya doğru yaptığı bu eğriliğe fleksura perinealis denir (4). Rektumun üst ve alt uçları orta çizgi üzerindedir. Rektumun ortalama 12 cm uzunluğu vardır. Üst kısmı boş iken 4 cm çapındadır, alt kısmı ise geniştir ve ampulla adını alır. Rektum sigmoid kolondan farklıdır. Haustraları, "appendices epiploikaları", mezenter ve taeniaları yoktur. Taenialar sigmoid kolon ile rektumun birleşme yerinin 5 cm üzerinde iki geniş muskuler band yaparak biri rektumun önünde, diğeri arkasında aşağıya doğru ilerler. Rektumun üçte iki ön üst kısmı peritonla örtülüdür. Ön yüzünü örten periton mesaneye geçerek erkeklerde "excavatio rectovesicalis"i, kadınlarda uterusu geçerek "excavatio rectouterina"yı (Douglas çıkmazı) oluşturur. Bu çıkmazın düzeyi erkeklerde daha yüksektir. Rektovezikal çıkmaz anüsten 7.5 cm uzaklıktadır (1,2,3,4).

2.1.7 Kalın Barsağın Arter ve Venleri

Kalın barsağın splenik fleksuraya kadar olan kısmını superior mezenterik arterin dalları besler. Çekuma ileoçekal arterin çekal dalından, appendikse ramus appendicesten, çıkan kolona sağ kolik arterden, transvers kolonun üçte iki sağ kısmına arteria kolika mediadan gelir. Splenik fleksuradan sonra gelen parçalarında inferior mezenterik arterin dalları besler. Splenik fleksura ve inen kolona sol kolik arter, sigmoid kolona sigmoid arter, rektuma da superior rektal arterden gider. Rektum ve anal kanala ayrıca internal iliak arterin dalı olan arteria rektalis media, internal pudendal arterin dalı olan inferior rektal arter ve abdominal

aortanın bifurkasyonundan çıkan arteria sakralis media besler (3,4). Kalın barsağın venleri superior ve inferior mezenterik venlere dökülürler. Rektumun ve anal kanalın çevresindeki ven pleksusundan çıkan dalların bir kısmı superior rektal ven yolu ile inferior mezenterik vene, bir kısmı da medial ve inferior rektal venler yolu ile internal iliak vene dökülürler (2,3,4).



Şekil 1. Kolonun arterler

2.1.8 Kalın Barsağın Sinirleri

Çekum, appendiks, çıkan kolon, transvers kolonun üçte iki sağ tarafı sempatiklerini çöliak ve superior mezenterik pleksuslardan, parasempatiklerini de nervus vagustan alırlar. Transvers kolonun üçte bir sol kısmı, inen kolon ve sigmoid kolon, rektum ve anal kanalın üst kısımları sempatiklerini sempatik trunkus lumbar kısmından ve superior hipogastrik pleksustan, parasempatiklerini pelvik splanknik sinirlerden (nervi erigentes) inferior hipogastrik pleksus (pelvik pleksus) vasıtasıyla alırlar (1,2,3,4).

2.1.9 Kalın Barsağın Lenfatikleri

Kolon ve rektumun mukoza ve seroza altında lenfatik pleksusu vardır. Bu lenfatik pleksus mezokolon içinde bulunan lenf nodlarına drene olur. Mezenter içindeki lenfatikler ve lenf nodları o barsak segmentini besleyen damarlar boyunca yer alırlar. Bu lenf nodları dört grupta toplanır: Epikolik, parakolik, ara ve ana lenf nodları. Epikolik lenf nodları kolonun üzerinde, parakolik lenf nodları marjinal damar ile kolonun arasında yer alırlar. Daha ileri bölgede ara lenf nodları kolik damarlar, ana lenf nodları da superior ve inferior mezenterik damarlar boyunca yer alırlar. Rektum ve anal kanal lenfatikleri de o bölgeyi destekleyen damarlar boyunca yer alırlar. Bu lenfatikler yukarı, yana ve aşağıya doğru drene olabilirler. Yukarı doğru drenaj inferior mezenterik arter boyunca olurken, yana doğru drenaj arteria rektalis media boyunca internal iliak nodlara ve dolayısıyla pelvik duvara doğru olur. Aşağı doğru akım ise, rektumun arkası ve anal kanal etrafında olan pleksustan iskiorektal yağ dokusuna, inguinal lenf nodlarına veya internal iliak lenf nodlarına olur (1,2,3,4).

2.1.10 Histoloji

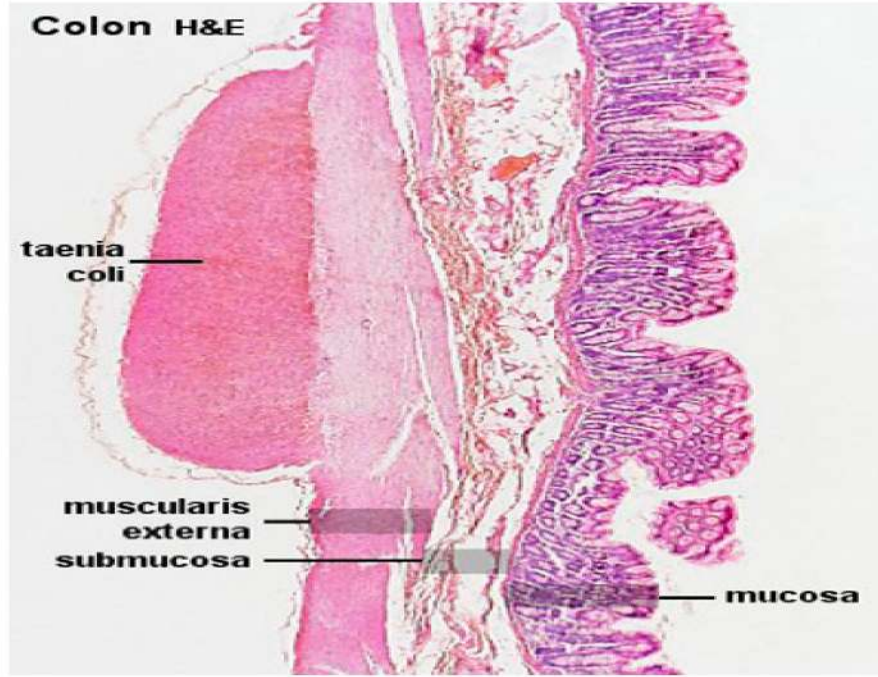
Sindirim kanalında görülen 4 tabaka kolonda da vardır.

Tunika mukoza: Mukoza yüzey epitelyumu, kripta, lamina propria ve lamina muskularis mukozadan oluşur. Barsağın bu bölümünde villus yoktur. Yüzey epiteli basit kolumnar veya kuboidal epitelden oluşur. İntestinal bezler uzundur. Çok sayıda goblet ve emici (absorbtiv) hücre, az sayıda enteroendokrin hücre ile karakterizedir. Epitelyal hücreler arasında T lenfositler mevcuttur. Lamina propria; fibroblastlar, damarlar, sinirler, düz kas ve inflamatuvar hücrelerin gevşek bir kolleksiyonunu içerir. Lenfatikler lamina proprianın alt 1/3'lük bölümünde sınırlıdır. Normalde mevcut olan inflamatuvar hücreler, lenfositler, plazma hücreleri, mast hücreleri, eozinofil ve histiyositlerdir. Muskularis mukoza ince bir kas tabakasıdır. Mukozayı daha derin submukozadan ayırmaktadır (6, 7).

Tunika submukoza: Lamina proprianın hücresel içeriği submukozal stromada da yer alır. İki noral pleksus submukozal bölgede yer alır. Bunlar; Meissner submukozal pleksus ve derin submukozal pleksustur. Submukoza arteriolleri, venulleri ve lenfatikleri içerir (6, 7).

Tunika muskularis: İçte sirkuler, dışta longitudinal kaslardan meydana gelmiştir. Auerbach pleksusu iki kas tabakası arasında yer alır. Dış longitudinal tabaka lifleri tenya koli denilen uc kalın longitudinal bant halinde toplanmıştır (6, 7).

Tunika seroza: Peritondur. Cecum, appendiks, transvers kolon ve sigmoid kolonu tam olarak sarar (intraperitoneal). Asenden kolon, desenden kolon ve rektumun bir bölümü ile anal kanal peritonun arkasında kalır (6, 7).



Resim 1: Kolonun histolojik yapısı enine kesit

2.1.11 Fizyoloji

Kolon'un başlıca fonksiyonları; depo, absorpsiyon, il erletme ve defekasyondur. Tüm bu fonksiyonlar noral, humoral ve muskuler yapıların lokal ve santral seviyelerdeki yakın koordinasyonu ile sağlanmaktadır (5).

Flora: Doğumda insan kolonu sterildir. Ancak saatler içinde oral bölgeden anal bölgeye doğru kolonizasyon başlar. Kolondaki dominant bakteri Bakteriodes'dir. İlk olarak doğumdan 10 gün sonra görülür. Doğumdan 3 –4 hafta sonra karakteristik gayta florası yerleşmiştir. Kolondaki bakteriyel populasyon anaerobik ve aerobik bakterilerden oluşur. Yaklaşık olarak fekal içeriğin üçte biri canlı bakteriden oluşur. Fecsin 1 gramında

yaklaşık olarak 10¹¹ ile 10¹² bakteri bulunur. Anaerobik organizmalar aerobiklere göre 10000:1 oranında dominanttır. Kolondaki bakteriyel floranın bilinmesinin cerrahi açısından önem i proflaksi ve tedavide kullanılacak antibiyotik açısından rehber olmasıdır (8). Gastrointestinal sistem lumeni içerisinde mikroorgani zma sayısı farklı olup, bu sayıyı lumen içi PH, mukus miktarı, safranin varlığı ve barsak motilitesi etkiler (8).

2.2 YARA İYİLEŞMESİ

Yara iyileşmesinin cerrahi yönden önemli aşamaları şöyle sıralanabilir;

1. Hemostaz ve inflamasyon
2. Proliferasyon (fibroplazi)
3. Olgunlaşma ve yeniden yapılanma

Bu aşamaları kısaca aşağıdaki gibi detaylandırabiliriz:

2.2.1 Hemostaz ve inflamasyon fazı

Yaralanma sonucu yırtılmış damarlarda vazokonstrüksiyon meydana gelir ve koagülasyon kaskadı başlar. Trombosit α granüllerinin degranüle olması ile fazla miktarda transforming growth factor β (TGF- β) salınır. TGF- β , makrofaj ve lenfositlerin kemotaksisini hızla uyarır. Lenfositler ve monositler de, PDGF, TGF- β , PF4, kompleman, protein C5a, lökotrien B₄ ve PAF gibi diğer trombosit kökenli yangı hücreleri tarafından yaraya çekilirler. Trombositlerin subendotelyal kollagen ile teması sonucu intrinsik koagülasyon kaskadı başlar. Oluşan pıhtı nötrofil, monosit ve fibroblast gibi hücrelerin yara ortamında toplanması için bir ağ gibi görev yapar. Hemostazı takiben plazma ve doku kaynaklı enflamasyon mediatörleri (histamin, serotonin, prostaglandinler gibi) vazodilatasyon ve permeabilitede artışa neden olur. Yara ortamından salınan kemotaktik ajanlar (kompleman faktörleri, IL-I, TNF- α , TGF- β , trombosit faktör IV ve bakteriyel ürünler gibi) hücre migrasyonunu stimüle eder. Nötrofiller yaraya doğru göç eden ilk hücre grubudur. FGF ve PDGF nötrofillerin yaraya infiltrasyonunu uyarır. İnflamasyon süresince nötrofiller, makrofajlar ve lenfositler baskın durumdadır. Yara alanına olan hücre kemotaksisini hücrelerin fonksiyonel aktivasyon kazanması takip eder. Bunun sonucunda sitokinler ve büyüme faktörlerinin üretim ve salınımında artma olur. Aktive olan

makrofajlar, debridman, matriks sentezi ve anjiogenez gibi yara iyileşmesini birçok yönden ilgilendiren önemli görevleri yerine getirir. Başlangıçta trombositlerden salınan faktörler makrofaj aktivasyonu için ilk ve güçlü bir uyarım sağlar. Fibronektin ve kollagen gibi bazı hücrel ürünlerin fagositozu da makrofajların aktivasyonunu şiddetlendirir ve sitokinler salgılar (9,10,11).

2.2.2 Proliferasyon fazı

Fibroblastik proliferasyon, transforming growth factor β (TGF- β) ve interleukin 1 (IL-1) ile stimüle edilir. Anjiogenez epidermal growth factor (EGF) ve IL-8 ile aktive edilir, nötrofillerin yaraya infiltrasyonu TNF- α ve neutrophil-activating peptide-II (NAP-II) ile tetiklenir (11). Fibroblastlar ve endotelial hücreler bu faz sırasında proliferasyon yapan temel hücrelerdir. Fibroblastlar yaraya çevre dokulardan göç ederler. ve büyüme faktörlerinden bazıları, (ör: PDGF, EGF) fibroblastların kemotaksisini tetiklerler. Kollagen sentezi için lizin ve prolinin hidroksilasyonu gereklidir. Hidroksilasyon için kullanılan kofaktörler ise ferröz demir, moleküler oksijen, alfa-ketoglutarat ve askorbik asittir (12). İntakt venüllerden endotelial hücre proliferasyonu sonucu yeni kapiller damarlar yara alanı içine doğru ilerler (neovaskularizasyon).

2.2.3 Olgunlaşma ve yeniden yapılanma fazı

Bu fazın en önemli özelliği yarada kollagenin yıkım ve sentezinden sorumlu olan, kollagenaz aktivitesi sitokinlerin sıkı kontrolü altındadır (13,14). Kollagen yıkımı iyileşmenin erken dönemlerinde başlar ve özellikle hemostaz ve inflamasyon fazında iyice hızlanır. Yaradaki kollagenaz kaynakları inflamatuvar hücreler, endotel hücreleri, fibroblastlar ve keratinositlerdir. Olgunlaşma ve yeniden yapılanma fazı 1 yıla kadar sürer (15).

2.3 GASTROİNTESTİAL SİSTEMDE YARA İYİLEŞMESİ VE KOLON ANASTOMOZU

Gastrointestinal anastomoz iyileşmesine etki eden lokal ve sistemik faktörler hakkında bilimiz artsa da anastomotik kaçak ve ayrılma yüksek mortalitesi olan sık ve ciddi problemlerdendir (26). Kolon anastomozundaki iyileşme dönemleri de vücudun diğer

bölgelerindeki yara iyileşmesine benzer. Hemostaz, inflamasyon, proliferasyon ve matürasyon dönemlerini içerir (27,28). Başlangıçta hematoma ve vazokonstriksiyonu takiben sekonder vazodilatasyon ve kapiller permeabilite artışı görülür (26,29,30). İlk 4 günde inflamasyon ve ödem mevcuttur. 24-48 saat içinde invajine olan mukoza ve submukozada yaygın inflamatuvar yanıt gelişir ve bu kısım nekroze olarak lümeneye düşer. İnvajine edilen kısım küçük ise primer iyileşme görülür. Bu bulgular anastomozu aşırı inverte etmekten kaçınmak gerektiğini gösterir (29,31). 4ncü güne doğru intestinal anastomoz bölgesinde granülasyon dokusu oldukça yoğundur. Postoperatif 3-5. günlerde anastomoz hattında daha fazla olmak üzere tüm kolonda kollajenolitik aktivitede artma olur (2,20,27,30-32). Anastomoz kaçağı açısından en riskli dönem olarak kabul edilen bu dönemde anastomoz dayanıklılığı konulan dikişler ve anastomoz çevresindeki submukozanın bu dikişlerin gerilimini karşılayabilmesine bağlıdır (20,32).

Sağlam gastrointestinal sistemde gerilim gücünün çoğunu submukoza sağlar ve anastomoz yapılmış barsak uçlarını bir araya getiren sütürleri tutabilecek güce sahip tek tabaka submukozadır (26,29,31). Irvin ve Hunt (32), anastomoz bölgesinde postoperatif 3. günde kollajen içeriğinde %25 azalma saptamışlardır. Fakat Jönsson ve ark (28), daha güncel çalışmalarında erken postoperatif günlerde, ne kollajen içeriğinde net bir azalma, ne de kollajen eriyebilirliğinde bir değişim görmemişlerdir. İkinci evrede fibroblast aktivitesi belirgindir. Postoperatif 4. günden başlayarak anastomozda güçlü kollajen uyarımı başlamıştır ve izleyen her gün yara kuvveti artar. Kollajen lifleri submukoza ve subserozada belirmeye başlar. Remodeling döneminde de granülasyon dokusu azalarak yerini düzenli hücre sıralarına, düz kas hücrelerine ve normal dokuya bırakır. Bu evre 10-180 gün arası bir süreyi kapsayabilir (29).

2.3.1 Anastomoz İyileşmesini Etkileyen Faktörler

Anastomoz iyileşmesini olumlu yada olumsuz yönde etkileyen pek çok faktör vardır (21,31). Bunlar lokal ve sistemik faktörler olmak üzere iki gruba ayrılır (20,24,27-29) (Tablo1).

Lokal Faktörler	Sistemik Faktörler
Kan akım	Yaş
Bakteryel kontaminasyon	Anemi
Anastomozda gerginlik olması	Malnütrisyon
Radyasyon	Hipovolemi
Hematom	Şok, sepsis, asidoz
Distal obstrüksiyon	Glükokortikoid steroidler
Mekanik travma	Antiinflamatuvar ilaçlar
Cerrahi teknik ve dikiş materyali	Sarılık
Doku tipi	Şişmanlık
Yabancı cisim	İmmün yetmezlik
Hipertermi	Üremi
Drenler	Vitamin ve mineral eksikliği
Sağlıklı doku uçları	Hipoksi
Barsak hazırlığı ve antibiyotik kullanımı	Malign hastalıklar
Aşırı mobilizasyon	Diabet

Tablo 1. Anostamoz iyileşmesini etkileyen faktörler

2.3.1.1 Lokal faktörler

Lokal kan akımı ve doku oksijenasyonu, iyi bir anastomoz iyileşmesi için gereklidir. Yeterli oksijen dağılımı kollajen sentezi sırasında lizin ve prolin hidroksilasyonu için gereklidir (22,32,33). Lokal kan akımındaki bozulma inflamasyonu olumsuz etkileyerek anastomozu riskli kılmaktadır. İskemik dokular zayıf iyileşir ve kolaylıkla enfekte olur (17). Oksijen basıncı 55 mmHg altındaki dokularda kaçak oranı %10 dur. 25 mmHg ve altındaki değerlerde ise iyileşme mümkün değildir (34,35). Ayrıca anastomoz uçların hazırlanması sırasında aşırı devaskülarizasyon, yetersiz mobilizasyon sonucunda yapılan gergin anastomoz veya hemostaz için aşırı koter kullanılması anastomoz bölgesinde iskemi oluşumuna yol açmaktadır. İskemi sonucunda oluşan nekrozun derecesine göre anastomoz ayrılması veya kaçak oluşmaktadır (36). Ancak bunlar cerrahi dikkat ve beceri ile önlenilecek durumlardır (37).

Anastomoz kaçaklarını en aza indirmek için bugüne kadar anastomoz tekniğinde çok sayıda modifikasyon geliştirilmiştir ve klinik olarak denenmiştir. Cerrahi teknik gastrointestinal iyileşmeyi belirgin olarak etkilemektedir (23,38). Yapılan çalışmalarda inversiyon yapıcı sütürlerde yapılan anastomozlarda kaçak oranının daha düşük olduğu görülmüştür (39). Everting anastomozlarda kaçak riski yüksektir ve daha çok adezyon oluşumuna sebep olurlar, fakat stenoz insidansı daha azdır (24,40). Sütürler kenardan uygun mesafede konmalı ve düğümler dokuyu strangüle etmeden güvenli bir şekilde bağlanmalıdır (41,42). Anastomoz tamamlandıktan sonra lümen açıklığı, doku kenarlarının canlılığı kontrol edilmeli, gerilim, torsiyon ve distal obstrüksiyon olmadığından emin olunmalıdır (24).

Çift kat dikiş, iyileşmenin erken döneminde ekstra dikiş materyali ve invert dokuda iskemi nedeni ile inflamatuvar cevabı arttırırlar. İnflamatuvar fazda daha fazla kollajen yıkıldığı için anastomoz daha zayıf olur. Tek kat sütürü savunanlar bu yöntemde doku kenarlarına daha az zarar verildiğini ve daha geniş lümen kaldığını savunurlar (24).

Jiborn ve ark (23), sıçanlarda yaptığı deneysel çalışmada, kolon anastomozlarında devamlı dikiş tekniği kullanılmasının, tek tek dikiş tekniği kullanılmasına göre daha yüksek oranda anastomoz komplikasyonuna yol açtığı ve kollajen yıkımını arttırdığını bildirmiştir.

Sonuç olarak, kolonda, seroza, müsküler, ve submukoza tabakalarını içeren, mukozayı lümene gömecek tarzda, ayrı ayrı dikişlerle, tek kat uygulanan anastomoz tekniğinin en güvenilir yöntem olduğu görülmektedir (27).

Staplerler daha geniş stoma oluşturur, daha az travma, adezyon ve inflamatuvar cevap meydana getirir. Stapler kullanılarak yapılan anastomozların anastomoz kaçağını önlemede etkin bir yöntem olduğu belirtilmektedir (43). Ancak staplerlerin doku uçlarını çekerek gerilim yaratma ve doku kenarlarına kan akışına izin vererek, anastomoz hattında kanama oluşturma riski vardır (24). Staplerlerin mevcut gerilim altında doku uçlarını bırakma riski, sütürlere nazaran daha fazladır. Akılda tutulması gereken önemli bir nokta sepsis veya iskemi gibi anastomoz bütünlüğünü tehlikeye sokan durumlarda, stapler tekniği daha iyi anastomoz iyileşmesi sağlamaz (44-45).

Lokal infeksiyon oluşması, anastomoz kaçaklarının en önemli nedenlerinden biridir (25). Kolon florasının zengin oluşu ve operasyon sırasında çevresel bulaşmalar olması lokal infeksiyonun nedeni olarak gösterilmektedir (46). İnfeksiyon yara dokusunda kollajenaz aktivitesini arttırarak kollajen miktarında azalmaya neden olur (25,47). İnfekte alanda mikroorganizmalar doku hipoksisine yol açarak fibroblast fonksiyonuna etki ederler ve yeni kollajen sentezinin de azalmasına neden olurlar (47-49). Hematom ve yabancı cisimler özellikle ekstra peritoneal anastomozlarda infeksiyon riskini arttırarak iyileşmeyi olumsuz etkiler (25,50,51). Karın travması ve geniş doku diseksiyonu ile yapılan anastomozlarda peritonun bakteriyel kirlenmeye karşı koruyucu özelliği bozulduğundan, infeksiyon ve kaçak oranı artmaktadır (48). Irvin ve Hunt (48,49), yaptıkları deneysel çalışmalarda karın içi travmanın anastomoz kaçağı oranını arttırdığını bildirmişlerdir. Bu çalışmalarda anastomoz bölgesinde belirgin infeksiyonla birlikte düşük kollajen seviyeleri tespit edilmiştir.

Drenler infeksiyona sebep olabilecek koleksiyonları boşaltırlar. Ayrıca anastomoz kaçağından ve kanamadan haberdar ederler. Ancak organizmalar için peritoneal kavite dışarıdan retrograd bir yol oluşturdıkları için anastomozu erode edebilir, adezyon oluşumunu uyarabilirler (24).

Emilebilir ve emilemeyen sütür materyalleri, gastrointestinal cerrahide değişik başarı oranlarıyla kullanılmaktadırlar. Sütür materyali ameliyat edilecek gastrointestinal bölümüne göre seçilmelidir. Sütür, anastomoza yeterli mekanik destek sağlayacak kadar güçlü, fakat dokudan geçerken travmayı azaltmak için ince olmalıdır. Emilebilir sütürler arasında yer alan katgüt, kuvvetinin %90' ını 5-7 gün içerisinde kaybettiğinden dolayı kolon anastomozuna yeterli mekanik desteği sağlayamamakta, ayrıca enzimatik yolla emildiğinden daha çok doku reaksiyonuna neden olmaktadır (52).

Ameliyat öncesi barsak hazırlığında amaç, kolonun dışkı yükünü tamamen ortadan kaldırarak antibiyotiklerin etkinliğini arttırmak ve teknik açıdan ameliyatı kolaylaştırmaktır. Antibiyotik profilaksisi, mekanik barsak temizliğine eklenirse infeksiyöz komplikasyonların sıklığında dikkate değer bir azalma görülür (53). Kolonun dışkı yükü azalmaksızın yapılan kolorektal ameliyatlardan hemen sonra oluşacak distansiyon, anastomoz uçlarında iskemiye yol açarak, anastomoz kaçaklarının oluşmasını kolaylaştırır (36). Ancak son yıllarda farklı görüşler ileri sürülmüştür. Barbul ve ark. (24), kolorektal

cerrahi öncesi barsak hazırlığı yapılan ve yapılmayan hastalar arasında önemli farklar görüldüğünü ifade etmiştir.

2.3.1.2 Sistemik faktörler

İleri yaş, habaset veya kronik hastalıklarda görülen beslenme bozukluğu, elektrolit dengesizliği, hipoproteinemi, hipovolemi ve anemi gibi durumlar anastomoz iyileşmesine olumsuz etki etmektedir. Kolon cerrahisi genellikle ileri yaş hastalarda yapılmakta ve bu da anastomoz kaçağı riskini arttırmaktadır (18,21,54). Anastomoz komplikasyonları yaşla artış gösterir (24). İleri yaş grubundaki hastalarda yandaş hastalıklar (kardiak, respiratuar, malnütrisyon) ve ilaç kullanımıyla sık karşılaşılması, bu olumsuz durumun sayılan faktörlere sekonder geliştiğini akla getirmektedir. Deneysel çalışmalarda yaş faktörünün anastomoz iyileşmesini etkilediği gösterilememiştir (18).

Hipovolemi doku perfüzyonunu azaltarak iyileşmeyi olumsuz etkiler (39,54). Yara iyileşmesi için yeterli doku perfüzyonu sağlanması ve kan kaybının hızla yerine konması gerekir.

Malnütrisyonlu hastalarda hipoproteinemiyle birlikte kollajen yapımı bozulur ve anastomoz iyileşmesinde belirgin gecikme meydana gelir (21,55-56). Kısa zincirli yağ asitleri (KZYA) diyetle yer alan lifli gıdaların fermantasyonu sonucu oluşur ve epitelyal hücrelerin proliferasyonunu uyarmaktadır, KZYA'nın direkt intraluminal infüzyonu kolon anastomoz iyileşmesini hızlandırır (24).

Kollajen sentezi ve yara iyileşmesi için gerekli olan C ve E vitaminleri, demir (Fe⁺²) ve çinko (Zn) eksikliklerinde de iyileşme bozulur (28).

İmmün sistem baskılanmış kişilerde inflamatuvar fazda polimorf nüveli lökositlerin yokluğu, yara infeksiyonuna neden olabilir. Böylece inflamatuvar faz uzar ve yara iyileşmesi gecikir (22).

Lokal infeksiyon anastomoz kaçaklarının en önemli nedenlerinden biridir (57). İnfekte bölgedeki artan kollojenaz enzim aktivitesi kollajen yıkımını artırır. Ayrıca bölgede artan mikroorganizmalar doku hipoksisine yol açarak fibroblast fonksiyonlarını bozar ve kollajen yapımını azaltır. Sonuçta anastomoz iyileşmesi sırasında kollajen üretimi ve

yıkımı arasındaki denge gerek dikiş hattındaki infeksiyon, gerekse de abdominal sepsis varlığında yıkım lehine bozulmaktadır (24,16).

Diyabet, inflamasyonda rol oynayan nötrofil, makrofaj ve lenfosit fonksiyonlarının bozulmasına, fibroblast proliferasyonunu bozarak kollajen depolanmasının azalmasına yol açmakta ve yara iyileşmesini olumsuz etkilemektedir (19,58). Diyabetik sıçanlardaki çalışmalarda, bağ dokusu yapımındaki eksikliğe paralel olarak yara gücünün azaldığı gösterilmiştir (58,60). Verhofstad ve ark (59), deneysel çalışmalarda diyabetik sıçanlarda post operatif 3. günde anastomoz iyileşmesinin olumsuz etkilendiğini ancak hidroksprolin konsantrasyon ve içeriğinin değişmediğini gözlemlemişlerdir.

Malign hastalıklar, katabolik etkileri nedeniyle iyileşmeyi geciktirirler (28). Üremi, sarılık gibi hastalıklar ve protein sentezinin bozulduğu karaciğer yetmezliği de anastomoz iyileşmesini bozmaktadır (28).

Kemoterapötikler fibroblast proliferasyon inhibasyonu ile veya doğrudan kollajen sentezini azaltarak anastomoz üzerine olumsuz etki gösterirler.

Nonsteroid anti-inflamatuar ilaçlar (NSAID) barsak iyileşmesinin ilk üç gününde kollajenolizi azaltırlar, yine NSAID ların kollajen üretimini arttırarak anastomoz iyileşmesini kolaylaştırdıkları ifade edilmektedir (24). Kortikosteroidlerin, yara iyileşmesi üzerine olumsuz etkileri iyi bilinsede kolon anastomozuna etkileri hala netlik kazanmamıştır. Elektif koşullar altında, her iki segmenti de iyi hazırlanmış, sağlıklı kolon usulüne uygun anastomoz edildiğinde, infeksiyon ve diğer olumsuz etkileyici faktörler de bulunmuyorsa tüm vakaların %98'inin klinik olarak saptanabilen kaçak olmaksızın iyileşeceği beklenir (61).

2.3.2 Gastrointestinal Kanalda Yara İyileşmesi Fizyolojisi

Hemostatik vazokonstrüksiyon barsak duvarının herhangi bir nedenle hasar görmesine ilk tepkidir. Bunu, kininlerin aktive olmasıyla vazodilatasyon ve damar geçirgenliğinde artış izler. Sütür atılırken kesinlikle unutulmaması gereken bu durum doku uçlarında ödem ile karakterizedir. Sütürler ödematöz dokuyu sıkıştıracağından, belirli bir aritmetiksel ara ve sayıyı geçmeleri halinde, iskemik nekroz hemen hemen kaçınılmazdır (68,70).

Gastrointestinal anastomozların mukozal bileşeni, yara granülasyon dokusunu çevreleyen, epitelyal hücrelerin migrasyonu ve hiperplazisi ile onarılır. Böylece defekt kapatılarak lümen içeriğine karşı bariyer oluşturulur (66). Tanımlanan süreç barsak tabakaları direkt olarak uç uca getirilmişse 3 gün içinde tamamlanır. Mukozal eversiyon ve inversiyon ise bu süreci geciktirir (68,70). İlk dört günde inflamasyon ve ödem vardır. Yirmidört-kırksekiz saat içinde invagine olan mukoza ve submukozada yaygın inflamatuvar yanıt gelişir ve bu kısım nekroze olarak lümene düşer. Eğer invagine olan kısım küçükse primer iyileşme görülür. Bu durum anastomozlarda aşırı invaginasyondan kaçınılması gerekliliğini göstermektedir (63).

Sağlam barsak duvarının mekanik kuvveti, başlıca submukozadaki fibröz bağ dokusuna sağlanır. Bu dokunun başlıca içeriği kollagen olup gastrointestinal kanalda uniform olarak dağılmıştır ve sütürleri tutabilecek sağlamlığa sahip olan tek tabakadır. Postoperatif üç-dördüncü gün boyunca anastomozun bütünlüğü fibrin tıkaçın yaradaki açıklığı tıkaması ve onu sızdırmaz hale getirmesine bağlıdır. Dördüncü güne doğru intestinal anastomoz bölgesinde granülasyon dokusu yoğundur. İyileşme sürecindeki barsak anastomozunun zayıf olduğu bir dönem vardır. Bu dönem postoperatif üç-beşinci günlerdir. Anastomozu takiben ilk dört gün kolagen yıkımına olan eğilim görülürken ikinci haftada kollagen sentezi ön plana çıkar. Anastomozun dördüncü gününden başlayarak güçlü kollagen uyarımı başlamıştır. Yara kuvveti postoperatif yedinci gün % 50-60, onuncu gün ise % 100'e ulaşmaktadır (63). Kollajen üretimini, kolonda fibroblastlar ve düz kas hücreleri yaparlar (67). Düz kas hücreleri submukozada bulunan üç kollajen çeşidini de üretmektedir. Muskularis mukoza ve muskularis propria arasında uzanan submukozanın düz kas hücreleri tarafından oluşan bir düzen içinde devamlılığı saptanmış olup, bu tabakanın işlevi barsak duvarı gerginliğini arttırmak şeklindedir (68,70). Deneysel modellerde histopatolojik araştırmalar anastomoz sonrası üçüncü ve beşinci günler arasında iyileşen intestinal kas tabakasında indifferansiye mezenşimal hücrelerin artış gösterdiğini ve kapiller invazyona eşlik ettiklerini, ileri evrede ise bu hücrelerin düz kas hücrelerine ve fagositik histiositlere dönüştüğüne işaret etmektedir. Bu değişim, düz kas hücrelerinin yeniden oluşumunda, yara uçlarında düz kas hücrelerinin proliferasyonundan daha etkili olduğu düşünülmektedir (70). Ayrıca anastomozun üçüncü ve beşinci günlerinde neovaskülarizasyonda artarak anastomoz beslenmesini sağlamaktadır (69). Proliferatif fazın başladığının indirekt göstergesi anastomozda granülasyon dokusunun gözlenmesidir.

Ayrıca intraperitoneal anastomozlarda omentum majus sütür hattını çevreleyerek granülasyon gelişimini artırır (68).

İyileşmenin proliferatif fazında ise doku kollajeni lizis ve sentezi devam eder (68,70). İyileşmenin ilk birkaç gününde, anastomoz bütünlüğünün sağlanmasında, sütür bütünlüğünün korunmasında kollajenaz enzimi, önemlibir rol oynar (65). Üçüncü günden sonra kollajenaz aktivitesi giderek artmakta buna bağlı olarak anastomoz bölgesinde sütür tutma kapasitesi %80'lere kadar düşmektedir. Kollajenaz, gelatinaz ve stromelizin ile birlikte matriks metaloproteinaz sınıfından olup, bu protein GİS" de olduğu kadar sütür hattında da yeniden düzenlenmektedir. Enzimin hücrel kaynağı ve sentezini kontrol eden faktörler net olarak ortaya konulamamıştır. Ratlarda matriks metaloproteinaz inhibitörleri ile yapılan çalışmalarda matriks metaloproteinaz inhibitörlerinin anastomoz iyileşmesini arttırdığı saptanmıştır (64,65,68). Altıncı günden onuncu güne kadar kolagen lifleri sütürlerin üzerine doğru mukoza ve serozada ilerleme gösterir. Birinci haftada sütürlerin barsak lümenine atılması, alçak küboidal mukoza epiteli proliferasyonu ve submukozal vasküler proliferasyon izlenir (63). Üçüncü faza ait kolon anastomozunda görülen değişikliklerin en karakteristiği randomize yerleşim gösteren düz kas proliferasyonu ve düzenli kollagen lifleridir. Düz kas hücreleri sayıca artar ve düzenli sıralar oluştururlar. Granülasyon dokusu elemanları gittikçe azalarak normal doku yapısına benzemeyi amaçlayan düzenlemeler yapılır (63). Üçüncü haftadan birinci yıla kadar olan süre yeniden modellenme sonucunda anastomoz hattındaki duvar incelir. Muskularis mukoza tamamen yapılanmamış, submukoza bölgesinde ilerlemiş arterioller görülür. Muskularis propria ve muskularis mukoza arasında tanımlanamayan ayırım submukozaya patolojik görünüm verir ve bir sene sonunda bile anastomoz hattı histolojik olarak saptanabilir (63).

2.4 BAĞIRSAKTA ANASTOMOZ İYİLESMESİNİ İNCELEME YÖNTEMLERİ

Anastomoz iyileşmesini inceleme yöntemleri içinde mekanik, biyokimyasal ve histolojik değerlendirme sayılabilir. Bu çalışmada mekanik değerlendirme patlama basıncı, biyokimyasal inceleme ise doku hidroksiprolin düzeyleri incelenerek yapılmıştır. Histolojik inceleme çoğu zaman kantitatif bir araç olmasa da çalışmamızda histopatolojik değerlendirme kriterleri skorlanarak, gruplar arasında istatistiki olarak karşılaştırma yapılmasına olanak sağlanmıştır.

2.4.1 Mekanik inceleme Yöntemleri

2.4.1.1 Anastomoz Patlama Basıncı

Anastomoz patlama basıncı yüzyıldan uzun süredir uygulanan bir yöntemdir. Anastomoz uygulanan bağırsak segmentinin intraluminal gaz veya sıvı nedeniyle artan basınca karşı gösterdiği duvar direnci olarak tanımlanabilir. Patlama basıncını ölçmek için bağırsak segmenti su banyosu içerisinde hava veya boya ilave edilmiş sıvı ile sisirilir ve manometre aracılığı ile basınç kaydedilir. intraluminal basıncın sabit ve uygun bir hızla yükseltilmesi (2-12 ml H₂O/dk) sonucun daha güvenilir olarak saptanmasını sağlar. Farklı çalışmalar patlama basıncının anastomoz yapıldıktan sonraki 2-3. gün en düşük düzeyde olduğunu göstermiştir (73). Takip eden günlerde hızlı bir şekilde artarak 7. gün normal kolon segmentindeki düzeye ulaşır ve bu dönemde patlama anastomoz dışında bir yerden gerçekleşir (72). Ameliyat sonrası erken dönemde anastomoz iyileşmesinin değerlendirilmesi için en uygun yöntem olduğu düşünülmektedir (73).

2.4.1.2 Kopma Direnci (Ayrılma Kuvveti)

Bağırsak segmentinin uzun eksenine paralel olarak kesip çıkartılan bir bağırsak seridinin iki ucuna zıt yönde uygulanan ve kopmaya yol açan kuvvet kopma direnci olarak tanımlanır (73). Bu işlem ölçüm için geliştirilen tensiometer (gerilim ölçer) cihazı ile yapılmaktadır. Ameliyat sonrası 4. günden itibaren başlayan yeni kollajen sentezi ile paralellik gösterir. Anastomozdan 10 gün sonra anastomozun kopma direnci, normal kolonun yaklaşık % 50'si kadardır. Patlama basıncından daha yavaş olarak yeniden kazanıldığı için yara iyileşmesinin geç dönem belirticidir. Bu yöntem, uygulanan kuvvetin tüm duvara esit olarak dağılmasının mümkün olmayacağı varsayılarak birçok araştırmacı tarafından eleştirilmiş ve güvenilir kabul edilmemiştir (74).

2.4.2 Biyokimyasal Yöntemler

Anastomoz iyileşmesinin biyokimyasal olarak değerlendirilmesinde kollajen konsantrasyonu kullanılmaktadır. Kollajen submukozal dokuda yerleşmiştir ve bağırsak duvarının devamlılığını ve mekanik kuvvetini sağlamada etkindir. Doku kollajen miktarı bir aminoasit olan hidroksiprolin düzeyinin ölçümü ile saptanır. Hidroksiprolin

omurgalıların dokularında hemen hemen yalnızca kollajende (kollajende % 14 ve elastinde % 2) bulunur, diğer hayvan proteinlerinde önemli miktarda yoktur (72). İyileşme sürecinin gözlenmek istendiği dokulardaki kollajen metabolizması çalışmalarında hidroksiprolinin yararlı bir belirteç olması bu aminoasitin dağılımının tek tipliliğinden kaynaklanmaktadır (76). Hidroksiprolin düzeyi birim yas dokuda ağırlık olarak ($\mu\text{g}/\text{mg}$ yas doku) hesaplanmaktadır. Anastomoz iyileşmesinde kollajen içeriği kadar kollajenin kalitesi ve çaprazlaşma yeteneği de önem taşır; ancak bunu direkt olarak belirleyen bir yöntem bulunmamaktadır (74). GİS’de yara iyileşmesini değerlendiren bir diğer biyokimyasal yöntem de intramural pH ölçümüdür. Teknik olarak zor olmasına karşın anastomoz bölgesinin kanlanması ve dolayısıyla yara iyileşmesi açısından kantitatif verilerin eldesi mümkündür (74).

2.4.3 Histopatolojik Değerlendirme

Anastomoz iyileşmesinin histopatolojik incelenmesinde ışık ve elektron mikroskobu kullanılabilir. Işık mikroskobu ile inflamatuvar göç, nekroz derecesi, kapiller ve mukozal onarımın durumu incelenebilir. Bu veriler semikantitatif olarak belirlenmiş çeşitli skorum sistemleri doğrultusunda değerlendirilerek istatistiki karşılaştırmalar uygulanabilir. Nekrozun ve inflamatuvar göçün fazla olması granülosit kökenli kollajenaz aktivitesinin artması ve dolayısıyla daha zayıf iyileşme ile sonuçlanmaktadır (75). Elektron mikroskobu ile kollajenin lif diziliş şekilleri ve normale göre oluşan farklılaşmalar ile hücrenin organel düzeyindeki yapısal değişiklikleri incelenebilir.

2.4.4 Radyoaktif İşaretleme Yöntemleri

Dokuların rejenerasyon kapasitelerinin incelenmesinde çeşitli radyoaktif maddeler kullanılmaktadır. Bu yöntemlerle fibroblastlar işaretleterek (timidin C14 ve H3 ile) anastomotik fibroblastik aktivite sayısal olarak değerlendirilebilirken, hidroksiprolin düzeyi ve kollajen sentez yüzdesi de belirlenebilmektedir (71).

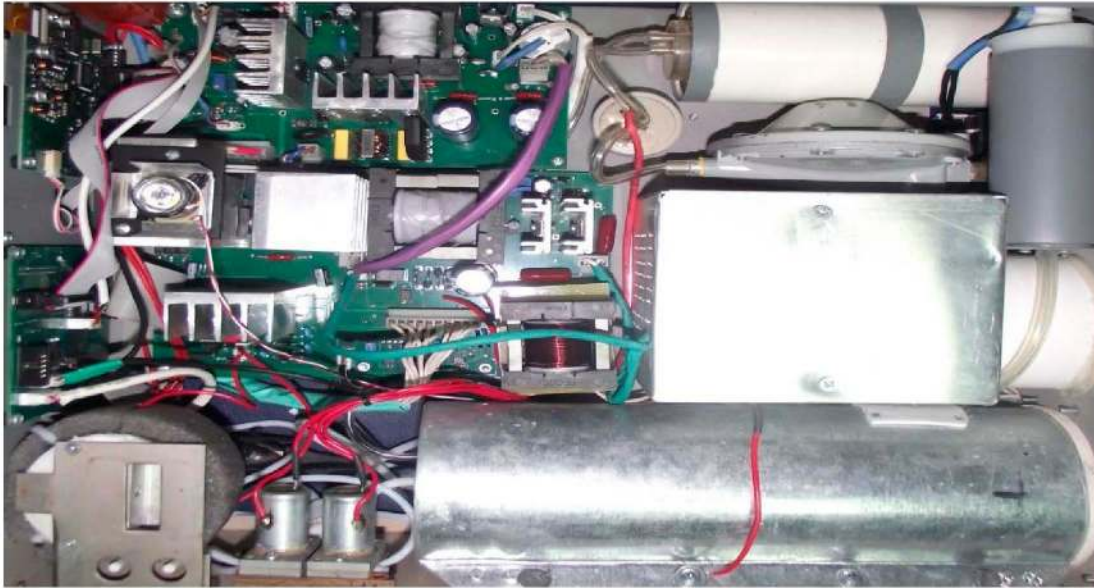
2.4.5 Diğer Yöntemler

Mikroanjiyografi, doppler ultrasonografi, fluoreseinle boyama ve yerel ısı ölçümleri de anastomoz iyileşmesinin incelenmesi için kullanılan yöntemlerdir.

2.5 OZON

Ozon üç oksijen atomundan oluşan renksiz, keskin kokulu gaz halinde bir moleküldür. Oksijen molekülünün kararlı haline karşın, O₃, kararsız bir moleküldür. Ozon gazını alman kimyacı Christian Friedrich Schönbein 1839 yılında keşfetmiştir. Keşfinden sonraki ilk yıllarda dezenfeksiyon amacıyla kullanılmıştır. 1860 yılında Monako şehrinin su arıtma tesisinde dezenfeksiyon amacıyla ozon kullanılmaya başlanmıştır. Ozonun bu dezenfekte edici etkisi güçlü okside edici özelliğinden kaynaklanmaktadır. Sadece virüs ve bakterileri öldürmekle kalmaz tüm mikroorganizmalar ve toksinlerini de okside edebilir. Ozon ayrıca fenoller, pestisidleri, deterjanları, kimyasal atıkları ve aromatik bileşikler de etkili şekilde nötralize edebilir (100, 101). Ozon kimyasal yapısı itibariyle radikal özelliği taşımamakla birlikte, florin ve persülfattan sonra, bilinen üçüncü en güçlü oksidan maddedir (99).

Ozon oluşumunu aşağıdaki tepkime ile gösterilebilir.



Şekil 2. Ozon jeneratörü makinasının iç mekanik şekli görünüm

2.5.1 Medikal ozonun uygulama biçimleri

a. Sistemik uygulamalar

Majör otohemoterapi: Son yıllarda majör otohemoterapi, düşük riskli ozon uygulamalarının en önemli şekli haline gelmiştir. “Ozon+kan reaksiyonu”, hastanın vücudunun dışında gerçekleşmekte, bundan sonra hastanın kendi kanı aktif eritrositlerle reinfüzyona sokulmakta ve immüno-kompetan hücreler aktive olmaktadır. Bu tedavide ilke olarak uygulama steril malzemeler kullanılarak kapalı, basıncı alınmış bir sistem içinde yapılmaktadır. Hastadan 50-100 ml kan alınır, organizma dışında ozon ile zenginleştirilir. Ozon/oksijen karışımı, kandan son derece ince kabarcıklar biçiminde geçirilir. Kan daha sonra hastaya rutin transfüzyon işlemlerinde olduğu gibi tekrar infüze edilir. Majör otohemoterapinin en önemli endikasyonları, arteriyel dolaşım bozuklukları, enfeksiyonlar, bağışıklık sistemi yetersizlikleri, kanser hastalıklarının adjuvan tedavileri ve romatizma/eklem iltihaplarıdır (103).

Rektal insüflasyon: En eski sistemik ve lokal uygulama yollarından biri, ozon gazının rektal uygulanmasıdır. Sistemik etkileri açısından majör otohemoterapiye alternatif oluşturmıştır. Bu yöntemle, yaklaşık 10-12 insüflasyonluk bir uygulama dizisini takiben majör otohemoterapiye benzer sonuçlar elde edilebilir. Rektal insüflasyon, katetere bağlı ozona dirençli bir enjektör yardımı ile veya bir ozon konteyneri ve silikon doz çantası kullanarak gerçekleştirilebilir. Kural olarak 150-300 ml ozon/oksijen karışımı uygulanır. Bu tatbik yönteminin çocuklarda en uygunu ve pratiği olduğu gösterilmiştir. İnsüflasyon, hastaya yüzükoyun yatar pozisyonda uygulanmalıdır (103). Genel olarak rektal insüflasyon, venöz yapılarının uygun olmadığı majör otohemoterapi endikasyonu olan hastalarda, bağırsaklarda proktit veya kolit gibi patolojik durumlarda veya immün sistemi zayıf pediatrik vakalarda rekürren enfeksiyonların tedavisinde kullanılabilir (103).

b. Topikal uygulamalar

Düşük basınçlı ozon gazı uygulaması: Lokal olarak sınırlı yaralarda ozon/oksijen karışımı plastik kap biçiminde bir cihazdan sürekli olarak tedavi edilecek olan bölgeye akıtılır. Bölge daha önce su ile ıslatılır. Basınç, yani kısmi vakum, hastanın kendisini en az rahatsız hissedeceği biçimde ayarlanır. Uygulamanın, özellikle dekübit yaralarında, radyasyon hasarında ve fistüllerde yararlı olabileceği gösterilmiştir. Diyabetik ayak yaralarında plastik bir bot kullanılır ve hastanın bacağı bot içine yerleştirildikten sonra botun üst kısmı gaz kaçırmayacak şekilde kapatılır (103).

Ozona dirençli plastik kaplarda transkütan ozon irrigasyonu: Venöz ülserler ve geniş alana yayılan asırı enfekte olmuş yaraların tedavisinde ozona dirençli plastik çanta ve/veya torbaların kullanılması pratiktir. Yara, uygulama öncesinde salin ile yıkanır; ardından bir velcro bandı ile gaz kaçırmayı önlenir. İçerisindeki hava önce açma-kapama musluğu ile çıkartılır ve ardından belirlenmiş oksijen/ozon karışımı ile doldurulur. Ülser veya yara bölgesi ile gaz karışımının teması sağlanır. Medikal ozon ortalama 10-15 dakika kadar süreyle uygulanır. Artık ozon, katalizör kullanılarak oksijene dönüştürülür ve solunum yolu ile ortaya çıkabilecek bir sorun engellenmiş olunur (103).

Ozonize su uygulanması: Ozonize su, yeni veya yakın zamanda yapılmış cerrahi müdahaleler de dahil olmak üzere, enfekte olmuş her tür yaraya karşı topikaluygulama için endikedir. Ozonize su, kompresler biçiminde uygulanabilir. Aynı zamanda tamamlayıcı bir tedavidir. Çünkü ıslak bir ortam söz konusu olduğundan, polar O_3 molekülü, aynı yapıdaki H_2O molekülleri tarafından çevrilir; böylelikle enflamasyon, yanık ve diğer deri lezyonları gibi lokal uygulamalarda optimal bir konumsağlar. Ayrıca ozonize kompresler, ödem oluşumu gibi enflamatuar süreçlerin başlangıç asamaları sırasında hızlı ve önemli ölçüde ağrı kontrolü sağlar. Lokal ozon uygulanması, hücresel metabolizmayı aktive eder, ATP artışı sağlar ve lezyonun yakınındaki üreme yatkınlığını koruyan hücrelerin polarize olmalarına katkıda bulunur. (103). Kural olarak ozonize su, çift damıtılmış sudan taze olarak hazırlanır. Bu su maksimum 20 µg/ml ozon absorbe eder ve oda sıcaklığında yarı ömrü ortalama 10 saattir. Pratik olarak herhangi bir gaz açığa çıkarmadığı için havaya ozon karışmaz. Kullanılan ozon miktarı suda erime özelliği ile orantılı olduğundan doz aşımı gözlenmez. Ozonize su, enfekte yaraların tedavisinde, mantar enfeksiyonları, liken veya küflerde, zona, herpes tedavisinde ve diş hekimliğinde hem dezenfektan olarak, hem de diş çekimi sonrasındaki yaraların tedavisinde, bukkal kavitedeki iltihaplar, candida veya prodontitis vakalarında kullanılabilir (103).

Topikal uygulama olarak rektal insüflasyon: Sistemik etkisine ek olarak rektal insüflasyonunun lokal etkisi de kolit ve proktit tedavisinde önemli yer tutar. Fistül tedavisinde fistül içine ozon/oksijen infiltrasyonu için kateter ve emilim kabı birlikte kullanılır (103).

İntraartiküler enjeksiyon: İntraartiküler ozon enjeksiyonunun basta omuz ve diz eklemleri olmak üzere akut ve kronik ağrılı eklem rahatsızlıklarında yararlı ve etkili olduğu

kanıtlanmıştır. En önemli kullanım alanları gonartroz, akut/kronik ağrılı eklem rahatsızlıkları ve hareket kısıtlılığı oluşturan eklem rahatsızlıklarıdır. İntraartiküler ozon uygulaması, eklem ağrılarının tedavisinde yardımcı bir yöntemdir (103).

2.5.2 Medikal ozonun etki mekanizmaları

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

Lokal uygulamada medikal ozonun etkileri:

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

Sistemik uygulamada medikal ozonun etkileri:

a. Alyuvar hücreleri

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

b. İmmüno-kompleman hücreler

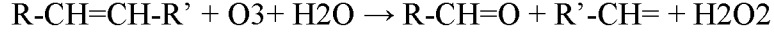
1. Mononükleer hücrelerin ılımlı aktivasyonu,
2. Sitokinlerin serbest kalması (IL-1, IL-2, IFN-γ, TNF-α, TGF-β vb) (114).

Ozon, saklanamayan ve kararlı olmayan bir gazdır ve 20°C’de yarı ömrü 40 dakika olduğundan üretilir üretilmez kullanılmalıdır. Ozonun tıpta kullanılması isteniyorsa mutlaka toksisitesinden korunmak gerekir ve bu da yalnızca iyi standardize olmuş bir fotometresi olan ozon jeneratörü ve daha önceden belirlenmiş gaz hacmini kullanarak sağlanabilir. Bunun yanında toksisite oluşturmada terapötik etkinlik sağlayacak optimal dozu bilmeliyiz (105, 106).

Bilimsel bir toplantıda ozonun tedavi edici bir ajan olarak gündeme alındığı ilk önemli organizasyon ise 1935 yılında Berlin’de toplanan 59uncu Alman Cerrahi Birliği (59th Meeting of the German Surgical Society) toplantısı olup, burada Dr. Erwin Payr “Cerrahi’de Ozon Uygulamaları” başlığı altında kendi vakalarından oluşan derleme türünde bir sunum yapmıştır (5, 6). Bu tarihten sonra 80’li yıllara kadar, ozon tedavisini münferit olarak uygulayan çeşitli hekimler ve araştırmacılar bulunmaktadır. 1980’li yıllardan itibaren ise tıbbi amaçla ozon kullanımına yönelik gerek bilimsel çalışmalar, gerekse vaka serileri literatürde artmaya başlamıştır. Ozon tedavisi belirli bir miktarda O_3/O_2 karışımının vücut boşluklarına ya da dolaşım sistemine uygulanmasıdır; bu karışım intravenöz, intramuskuler, intraartiküler, intraplevral, intrarektal, intradiskal ve deneysel araştırmalarda intraperitoneal uygulanabildiği gibi topikal de uygulanabilir (107, 110, 111). Ozon tedavisinin klasik uygulaması haline gelmiş olan yöntem 1974 yılında Wolff tarafından tarif edilmiştir. Bu yöntemde; bir miktar kan (50–270 ml) vücut dışına alınarak, ozona dayanıklı bir şişede 5–10 dakika oksijen/ozon karışımıyla temas ettikten sonra tekrar aynı kişiye geri verilir (ototransfüzyon) (110). Bu uygulama şekli majör otohemoterapi (HT) olarak adlandırılmaktadır. Bu tarihten günümüze, daha çok Avrupa’da olmak üzere milyonlarca ozon ototransfüzyon tedavisi yapılmıştır (112). Ozon reaktif bir molekül olduğu için tıbbi amaçlı kullanımında dikkat edilmesi gereken bazı durumlar vardır.

Ozon, hiçbir zaman saf olarak verilmemeli ve belli oranda oksijenle karıştırılarak uygulanmalıdır. Bu karışımda oksijen %95’den az ozon %5’ten fazla olmamalıdır. Normal atmosfer havasının bu karışıma girmesi engellenmelidir. Çünkü ozonun reaktif özelliğinden dolayı hava ile teması sonucu toksik bir gaz olan nitrojen dioksit (N_2O_2) oluşabilmektedir. Ayrıca emboliye sebep olmaması için ozon gaz olarak damar sistemi içerisine verilmemelidir. Tüm işlemler sırasında ozona dayanıklı malzemenin (paslanmaz çelik, nötral cam ve teflon) kullanılması gerekmektedir (110). Ozon, diğer gazlar (O_2 , CO_2) gibi suda çözünür. Ozon oksijene göre 1,6 kat daha yoğun ve suda çözünürlüğü 10 kat daha fazla olan bir moleküldür. Saf suda diğer gazlar gibi Henry kanununa göre çözünür. Çözünmesi ısıya, basınca ve konsantrasyonuna bağlıdır. Biyolojik sıvılarda ise ozon oksijenden farklı olarak hızlıca biyomoleküller ile reaksiyona girer. Dolayısı ile HT esnasında uygulanan O_3/O_2 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 O_3 gazı

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 (110).



Bu reaksiyonda her hidrojen peroksit ile birlikte iki de lipid oksidasyon ürünü (lipid oxidation products; LOP) oluşmaktadır (129,113). Lipid oksidasyon ürünleri için iyi bilinen örnekler şunlardır; lipoperoksil radikalleri, hidroperoksitler, malondialdehit, izoprostan, alkenaller ve 4-hidroksi-2,3-trans nonenal (HNE) (127-128). Görülüyor ki, ozonun biyolojik etkilerinin ortaya çıkması için serbest radikallerin varlığı önemlidir. Serbest radikaller, çeşitli patolojik süreçlerin gerek başlatıcısı, gerek ara basamaklarda işe karışabilen, gerekse sonucunda ortaya çıkabilen reaktif maddelerdir. Bunlar, organizmada aerobik solunum sırasında mitokondride ve fagositlerde solunum patlaması gibi çeşitli fizyolojik durumlarda da oluşabilmektedir (53). Aerobik canlılar serbest radikallerin toksik etkilerinden korunmak için antioksidan sistemler geliştirmişlerdir. Non enzimatik olanlar; ürik asit, askorbik asit, protein (özellikle albumin), protein olmayan tiyoller, vitamin E ve bilirubindir. Enzimatik olanlar ise süperoksit dismutaz, katalaz ile glutatyon peroksidaz (GPx) glutatyon transferaz (GST), glutatyon (GSH) ve glutatyon redüktazdan (GR) oluşan glutatyon sistemidir (113). Son zamanlara kadar oksidatif stresin hücre hasarındaki rolü ve hastalıkların altında yatan patolojik süreçlere etkileri konusuna odaklanılmıştı. Patolojik süreçlerde oksidatif stresin artış mekanizmaları ve etkilerini açıklayan yüzlerce çalışma yapılmıştır (114-115). Yakın zamanda yapılan çalışmalarda ise oksidatif stresin bilinenin tersi etkilerinin de olabileceği görülmüştür. Bu çalışmalarda oksidasyon/redüksiyon (redoks) reaksiyonlarının başta hücre içi haberleşme olmak üzere biyolojik mekanizmalarda rol aldığı gösterilmiştir. Artık açık olarak biliniyor ki gerek reaktif moleküller gerekse bunların çeşitli biyolojik moleküllerle reaksiyona girmesi sonucu ortaya çıkan oksidasyon ürünleri düşük konsantrasyonlarda (fizyolojik düzeylerde) hücrede önemli roller üstlenmektedir (115-116).

Ozonun biyolojik etkilerini açıklamak için yapılan çalışmalarda daha çok HT tedavisi model alınmıştır (117-126). HT esnasında uygulanan O₃/O₂ 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 lipid 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 itibarıyla radikal olmayan oksitleyici bir moleküldür (110, 113, 119). Hidrojen peroksitin ozonun tedavi edici etkinliklerinin en azından bir kısmından sorumlu, ikincil habercisi gibi davrandığı kabul edilmektedir. İlk etkilerinden biri eritrositlerde 2,3-difosfoglisarat düzeyini artırma yoluyla hemoglobın-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 (120). Lipid 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 (119, 121, 122). 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 (113).

Ozonun konsantrasyonuna bağlı olarak artan kuvvetli okside edici özelliği nedeniyle belli bir orandan sonra vücut için de toksik etkisi olabileceği gerçeğini unutmamak gerekmektedir. Doğal olarak, organizmadaki antioksidan savunma sistemleri ozon oksidasyonuna karşı koyacaktır. Plazmanın sahip olduğu geniş antioksidan kapasite ve eritrositlerdeki antioksidan enzimler nedeniyle, kan ozon toksisitesine karşı en dirençli dokudur. HT uygulamaları sırasında plazmada çözünen ozonun burada bulunan antioksidanlar (bilirubin, askorbik asit, SH grubu taşıyan glutatyon ve albumin) ile reaksiyona girerek bunların konsantrasyonunu azaltmaktadır (119). Öte yandan, 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, lipid peroksidasyonu ve okside glutatyon düzeyinde artma olduğunu göstermiş, uygulamanın 20 dakika sonrasında ise antioksidan düzeylerinin eski haline döndüğünü tespit etmişlerdir (126). Denilebilir ki, 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.

Ozon uygulamaları sonucunda oluşması beklenen ROT ve lipid oksidasyon ürünlerinin terapötik etki gösterebilmesi için belli bir konsantrasyonda olması gerekir (110). Bu açıdan, kanda bulunan antioksidanların önemi yapılan bir çalışma ile gösterilmiştir. Bu çalışmada eritrositler yıkanarak plazmadan uzaklaştırılmış ve değişik konsantrasyonlarda ozon uygulanmıştır. Yapılan değerlendirmelerde düşük 10–20 µg/ml ozon konsantrasyonlarındaki uygulamalarda bile eritrositlerin çoğunda hemoliz olduğu görülmüştür (118). Yapılan çalışmalarda ozonun terapötik konsantrasyonu 10–80 µg/ml olarak belirlenmiştir. Bu ozon konsantrasyonu Rice-Evans'ın tarif ettiği total antioksidan kapasiteyi %25'den fazla düşürmediği gibi azalan antioksidanlar 20 dakika sonra eski haline gelmektedir (117, 118, 123, 124). Ozon uygulaması ile hem oksijenaz-1 (HO-1) enziminin de uyarıldığı bildirilmiştir. Bu enzimin artışından gerek ROT, gerekse yukarıda sözü edilen ılımlı eritrosit hemolizisorumlu olabilir. HO-1, hem halkasının yıkım yolunda görev alan mikrozomal bir enzimdir ve yapımı oksidatif stres artışı, proinflatuvar sitokinler ve nitrik oksit (NO) ile uyarılabilmektedir. Bu enzim hem molekülünü biliverdin ve karbon monoksit (CO) parçalar. Son yıllarda HO-1 ile yapılmış birçok çalışmada bu enzimin; antioksidan antiapoptotik antiinflatuvar etkilerinin olduğu gösterilmiştir. Ozon uygulaması sonucu görülen en etkin HO-1 artışının aynı zamanda ozonun terapötik doz aralığı olarak da vurgulanan 20–80 µg/ml arasında ortaya çıktığı gösterilmiştir. Yine HO-1'in yanında ısı şok protein-70 (HSP-70)'in de arttığı gösterilmiştir (124–125).

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

enjekte edilir. Bu uygulama sonrasında kas içine enjekte edilen kanın doku derinliklerine ilerlerken pıhtılaşmasına rağmen hastalardan çok azı hafif şişme ve ağrıdan yakınmaktadır. Bu işlem esnasında anesteziye gerek yoktur. Tartışmalı olmakla birlikte, bu uygulamanın immünmodülatuar bir etkisinin olduğu iddia edilmekte ve etki mekanizması şu şekilde açıklanmaktadır: Enjeksiyon yerinde hafif derecede steril inflamasyon meydana gelmekte, bölgeye nötrofil ve monositler gelerek denatüre proteinleri ve parçalanmış eritrositleri fagosite etmektedir. Eğer kan içinde HCV, HBV ve HIV gibi virüsler var ise ozon tarafından inaktive edilip parçalanmış bu virüs atıkları bölgeye gelen bu immün hücreler tarafından ortadan kaldırılır. Böylece bu işlem bir çeşit aşı etkisi yaratır ve immün sistemi bu antijenlere karşı uyarır (110).

2.5.3 Medikal Ozon Tedavisinin Klinik Uygulamaları

Ozon tedavisinin özellikle inflamatuvar sürecin yoğun olarak yaşandığı ve immün sistemin ön planda yer aldığı fizyopatolojik durumlarda tedavi edici etkisi şaşırtıcıdır. Ozon uygulamaları yara iyileşmesi, yaşa bağlı maküler dejenerasyon, iskemik ve enfeksiyöz hastalıklarda yapılan vaka analiz çalışmalarında olumlu etkiler göstermiştir. Bunun yanında basit diş ve ağız enfeksiyonlarından hepatitlere kadar uzanan geniş bir aralıktaki çeşitli enfeksiyon hastalıklarında etkin olarak uygulanmaktadır (130–131). Ayrıca çeşitli derecelerde artrit ve artroz vakaları ile romatizmal hastalıkları da kapsayan ortopedik hastalıklarda da faydalı etkiler rapor eden araştırmalar dikkat çekmektedir. Buna örnek olarak Mutu ve arkadaşlarının lomber disk hernisi olan hastalarda yaptığı çalışmayı gösterebiliriz. Bu çalışmada lomber disk hernisi olan hastalara oksijen/ozon karışımı disk içine enjeksiyonla uygulanmıştır ve gerek hasta memnuniyeti gerekse medikal olarak yapılan değerlendirmede bu tedavinin yararlı olduğu görülmüştür (133). Martinez-Sanchez ve arkadaşları diyabetik ayak gelişmiş hastalarda yaptıkları çalışmada ozon tedavisinin etkinliğini değerlendirmişlerdir. Bu çalışmada ozon tedavisi uygulanan hastalarda antibiyotik tedavisi alanlara göre yara iyileşmesi hızlanmış, hastanede kalma süreleri kısalmış, glisemi düzeyleri daha iyi kontrol edilebilmiş ve antioksidan enzim düzeyleri artmış olarak bulunmuştur (131).

2.6 SERBEST RADİKALLER

ücre zedelenmesinde önemli bir mekanizma kısmen oksijen türevleri ile aktifleşen, iskemik reperfüzyondaki serbest radikallere bağlı zedelenmedir. Serbest radikaller kimyasal, oksijen ve diğer gaz toksisiteleri, hücresel yaşlanma, fagositik hücrelerin mikropları öldürmesi, iltihabi hasarlar, makrofajların tümörü harabiyeti ve diğer olaylarda genel bir doku zedelenmesi yolu izleyerek etkili olurlar. Radikaller hücre içinde ultraviyole veya X ışını gibi radyan enerjinin tutulumu veya normal fizyolojik olaylarda redoks reaksiyonları ile oluşurlar ve egzogen kimyasal maddelerin enzimatik metabolizmalarından türerler. Radyan enerji suyu eriterek $\text{OH}\cdot$ (hidroksil iyonları) ve $\text{H}\cdot$ iyonlarını serbestleştirir. Moleküler oksijenin redüksiyonundan türeyen diğer bir serbest radikal süperoksittir ($\text{O}_2\cdot^-$). Normal oksijen suya indirgenir, fakat mitokondriyonlar, lizozomlar, peroksizomlar ve plazma membranındaki ksantin oksidaz gibi bazı oksidazların etkisiyle bazı reaksiyonlarda $\text{O}_2\cdot^-$ oluşabilir. Değerlilikleri değiştiği için transisyonel olarak adlandırılan demir ve bakır gibi bazı metaller serbest elektronları alıp vererek serbest radikal oluşumunu (Fenton reaksiyonu: $\text{Fe}^{++} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{+++} + \text{OH}\cdot + \text{OH}\cdot$) katalizlerler. Demir, özellikle toksik olan OH oluşumuna yol açtığı için toksik oksijen zedelenmesinde önemlidir. Serbest demirin büyük kısmı ferrik (Fe^{+++}) biçimindedir. Fenton reaksiyonuyla aktif olan ferröz (Fe^{++}) iyonuna redüklenir. Bu reaksiyon süperoksit iyonu ile sağlanır ve demir kaynağı ve süperoksit maksimal oksidatif hücre hasarı için gereklidir.

Vücutta serbest radikaller oluşunca organizma tarafından atılmaya çalışılır. Çoğu hücrede bulunan süperoksit dismutazların (SOD) katalitik etkisi ile kayıp hızı belirgin ölçüde artar ($\text{O}_2\cdot^- + \text{O}_2\cdot^- + 2\text{H}^{+} \xrightarrow{\text{SOD}} \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$). SOD tarafından katalizlenen bu tepkime “dismutasyon tepkimesi” diye adlandırılır. Süperoksit, özellikle hafif asidik koşullarda SOD olmadan kendiliğinden dismutasyonla da H_2O_2 'e çevrilebilir. SOD enziminin yüksek katalitik etkisi nedeniyle hücrelerde süperoksit birikimine izin verilmez. Glutatyon peroksidaz gibi birçok enzim serbest radikallere karşı koruyucudur ($2\text{OH}\cdot + 2\text{GSH} \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{GSSG}$). Peroksizomda bulunan katalaz, H_2O_2 'yi dekompoze eder ($2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$). Bu enzimler hücreleri serbest radikallere karşı korurlar. Alternatif olarak vitamin E, sistein, glutatyon ve seruloplazmin gibi sülfiridler serbest radikallerin oluşumunu engelleyerek veya onları inaktive ederek etkileyen endojen ya da ekzogen antioksidanlardır (138).

2.6.1 Malonildialdehid (MDA)

Peroksidasyona uğramış olan poliansatüre yağ asidlerinden oluşan reaktif bileşiklerden biri olan üç karbonlu MDA bir ketoaldehiddir (**Şekil X**). Araşidonik asidden, birçok lipoksidden, hidroperoksidlerden, endoperoksidlerden, prostaglandinlerden ve tromboksanlardan oluşabilen MDA'nın ana kaynağı ansatüre yağ asidlerinin peroksidasyonudur (133). Birçok makromolekül ile hızlı bir şekilde tepkimeye giren ve çok reaktif bir bileşik olan MDA, serbest olarak veya farklı doku bileşenleri ile kompleks oluşturmaktadır. Doku lipid peroksidasyonu sonucu oluşan MDA hücresel düzeyde metabolize edilir. Karaciğer aldehid dehidrogenazı tarafından enzimatik yıkılıma uğrayan MDA, CO₂'e metabolize olmakta veya mitokondriyal yolla yıkılabilmektedir. İdrarda asit ile hidrolize edilebilen formda küçük miktarlarda ekskrete edilir. Eritrosit membranının aminofosfolipid organizasyonunu bozan MDA, hücre hasarında ve yaşlanma pigmenti olan lipofuksinlerin oluşumunda etkili gösterilmiştir. MDA'nın mutajenik olduğu ve kimyasal karsinojen gibi davrandığı da bilinmektedir (134). Biyolojik örneklerde lipid peroksidasyonunun ve serbest radikal aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan en kolay ve yaygın yöntem, MDA'nın tiobarbitürik asid (TBA) ile tepkimesidir (135). Lipid peroksidasyonunun belirlenmesi için kullanılan ve spesifik olmayan bir yöntem olmasına rağmen TBA tepkimesi, MDA üretiminin iyi bir göstergedir. Ayrıca, TBA testinin kaynatma aşamasında daha önce oluşmuş olan lipid hidroperoksidlerinin yıkılımı sonucunda artefakt bir MDA üretimi olmaktadır. Okside lipidlerde bulunan 2,4-alkadienler ve 2- alkenaller de TBA ile pozitif sonuç vermektedir. HPLC, serbest MDA ölçümünde en güvenilir yöntemdir.

2.6.2 SOD

Süperoksidin protonlanmış formu olan HO₂ ile doğrudan oksitleme, bakır (Cu⁺²) ile demir (Fe⁺²) gibi metallerle veya seruloplazminle katalizlenen tepkimeler ve NO• ile O₂ •- arasındaki tepkimelerde oluşan reaktif peroksinitritler aracılığıyla LDL değişikliğe uğramaktadır. Damar duvarındaki O₂ •- kaynakları arasında endotel hücreleri, düz kas hücreleri, makrofajlar ve adventisyal fibroblastlarda bulunan NAD(P)H oksidazlar, lipoksijenazlar, ksantin oksidazlar, ve NO sentazlar bulunmaktadır (136). Süperoksid anyon radikallerine karşı ana savunma aracı olan SOD, süperoksidin hidrojen perokside dismutasyonunu katalizleyen bir metalloenzimdir. Genetik olarak kromozomda lokalizedir

(137). SOD tarafından katalizlenen tepkimenin hızı $2 \times 10^9/\text{ms}$ 'dir. Hücre içi SOD aktivitesindeki artış dioksijenin toksisitesine karşı gelişen bir direnç artışına neden olur (133).

2.7 RADYOTERAPİ

1895 yılında X ışınlarının Wilhelm Conrad Roentgen tarafından keşfinden sonra 1898 yılında Marie ve Pierre Curie radyumu keşfetmişlerdir. İyonizan radyasyonun hücreler üzerine öldürücü etkileri bulunması üzerine ilk defa 1899'da kanserli bir hastada radyoterapiye bağlı kür bildirilmiştir (145). 1951'de radyoaktif cobalt (Co-60) ile tedavi dönemi başlamış ve sonrasında yüksek enerjili (megavoltaj) ışın üreten lineer akseleratörler geliştirilmiş. Bu sayede toraks ve batin içi derin dokulardan kaynaklanan habis tümörlerde başarı sağlanmıştır (146). İyonizan radyasyon, dokular tarafından absorbe edildiğinde atomlardan elektronlar ayırarak iyonizasyonuna neden olan radyasyon olur ve iki gruba ayrılır. Elektromanyetik dalgalar ve partiküler radyasyon. Elektromanyetik dalgalar, foton denilen enerji yığınlarından meydana gelir. Partiküler radyasyon ise elektronlar, beta partikülleri, pozitronlar, alfa tanecikleri, nötronlar ve yüksek enerjili ağır iyonlardır (147).

Radyoterapinin, eksternal radyoterapi ve brakiterapi olmak üzere iki ana uygulama şekli vardır. External radyoterapide hasta ile cihaz arasında birkaç cm ile birkaç metre arasında geçişen aralık mevcuttur. Brakiterapide ise radyasyon kaynağı tel iğne, plak şeklinde direkt dokunun içine (interstisyel) veya intrakaviter olarak yerleştirilir. Brakiterapinin avantajı, komşu normal dokulara fazla zarar vermeden tümör dokusuna daha kısa zamanda daha yüksek doz radyasyon verebilmesidir (68).

Uluslararası sistemde iyonize radyasyon birimi Gray'dir. Bir Gray(Gy), dokunun birim üntitesi tarafından absorbe edilen enerji miktarıdır. Bir Gy=100 cGy (CentiGray) olup 1 cGy=1 rad'dır. Pratikte genellikle cGy ve rad birimleri kullanılır (147).

2.7.1 Radyasyonun Hücre Üzerindeki Biyolojik Etkileri

Radyasyon, bir moleküle isabet edince ilk ve en önemli etkisi, molekülün dış yüzeyindeki elektronları ayırarak molekülü iyonlaştırmaktır. Yüksek doz (letal doz), DNA zinciri

üzerindeki onarılması mümkün olmayan kırıklar oluşturarak hücre ölümüne yol açar. Letal dozun altındaysa hücre bölünmesi duraklar. Doz düşükse bölünme bir süre sonra yeniden başlar. Doz arttıkça bölünmenin başlama zamanı uzar, mitoz sayısı azalır, anormal mitoz şekilleri ve dejenere hücreler ortaya çıkar, gen mutasyonları ortaya çıkar (147).

Radyasyonun hücreye etkisi iki yolla olur. Birinci etki, hücrede su moleküllerinin iyonizasyonu sonucu serbest radikallerin oluşması ve bunların birleşmesiyle oluşan hidrojen peroksitin DNA zincirinde parçalanmaya yol açmasıdır. İkinci etki biçimi ise, iyonizan partiküllerin direkt DNA molekülüne çarpması ve onda kopmalar meydana getirmesidir. Kopma ciddi bir bölgedense hücre ölür, değilse sakat hücre tipleri ortaya çıkar (147). Radyasyonun etkisi hücre siklus fazına göre farklıdır. Mitoz (M) ve ikinci dinlenme fazı (G2) radyosensitifken, birinci dinlenme (G1) ve sentez (S) fazları radyorezistandır (148).

2.7.2 Radyasyonun Dokular Üzerindeki Etkileri

Radyasyonun dokular üzerindeki etkileri, belirtilerin ortaya çıkış zamanına göre erken ve geç dönem olmak üzere iki aşamalıdır (147). Erken dönem etkileri gastrointestinal mukoza, kemik iliği, testisin germinatif hücreleri gibi hızlı çoğalan dokularda proliferasyona olumsuz etki nedeniyledir. Radyoterapiden saatler ya da günler sonra ortaya çıkar ve geçicidir. Geç dönem etkileri, tedaviyi takip eden 6 ay ile 6 yıllık bir dönemde ortaya çıkar ve ilerliyicidir. Geç dönemde dokularda meydana gelen değişiklikler üç grupta incelenebilir (147).

1-Epitelial ve parankimal değişiklikler

- a) Atrofi
- b) İskemik nekroz
- c) Metaplazi
- d) Atipi
- e) Displazi
- f) Neoplazi

2-Stromal değişiklikler

- a) Fibrozis
- b) Atipik fibroblastlar
- c) Fibrinöz eksuda
- d) Nekroz

3-Vasküler değişiklikler

Kapillerler ve sinuzoidlerin esasını endotel oluşturduğu için en radyosensitif vasküler yapılardır. Damarlarda hyalen dejenerasyonu meydana gelir. Radyasyon yaralanmalarının temelinde yatan patoloji esas olarak endotelde hasara neden olan kapiller ve arteriollerde oluşan fibrin trombüslerdir (149). Pelvik ışınlama sonucunda gelişebilecek radyasyona bağlı komplikasyonlar; proktit, rektal ülser, striktür, rektovaginal fistül, fibrozis, kolit, ileit, ileal obstrüksiyon, radyasyon sistiti, üretra striktürü, vulvit (144).

Radyoterapide amaç, en az komplikasyon ve en etkin dozla tedavidir. Toplam dozun fraksiyone verilmesi cilt ve mukozalarda kompensatuar proliferasyona neden olacağından daha az komplikasyona yola açar. Bu nedenle çoğu zaman, akut reaksiyon şiddeti ile geç dönem komplikasyonları arasında direkt bir ilişki yoktur. Yüksek toplam doz, yüksek ancak geniş aralıklı fraksiyonlarla verilirse önemli bir akut etki görülmeksizin ciddi geç komplikasyonlar çıkabilir (147). Diabet, hipertansiyon, ve daha önce yapılmış özellikle alt batin cerrahi girişimler radyasyon hasarını arttırırlar (150). Cerrahinin başarısını arttırmak amacıyla radyoterapi preoperatif, intraoperatif veya postoperatif uygulanabilir.

2.7.3 Preoperatif Radyoterapi

Amaç;

1. Cerrahi rezeksiyon sınırlarının çevresindeki subklinik seyreden hastalığı ortadan kaldırmak ve lokal nüksü önlemek (142,151).
2. Operasyon sahasındaki canlı tümöral hücre sayısını azaltarak tümör implantasyon olasılığını azaltmak (141,152).
3. Operasyon alanının dışındaki lenf bezi metastazlarını ortadan kaldırmak (139,140,152).

4. Tümördeki klon oluşturabilen hücre sayısını azaltarak, uzak metastaz olasılığını azaltmak (139).
5. Tümör rezektabilitesini arttırmak (140,141).
6. Sürviyi uzatmak (139,141,143).

Preoperatif radyoterapi ile lenf bezleri içindeki tümör hücreleri yok edildiğinden Dukes C'deki tümörler Dukes B'ye indirgenirler, böylece rezeksiyon sonrası daha iyi bir prognoza yol açarlar (152). Postoperatif radyoterapide tümör hücrelerinin operasyon sırasında operasyon alanının dışına dağılarak radyasyon alanının dışında kalması ve cerrahi rezeksiyon sonrasında nisbeten hipoksik olması nedeniyle bu dokuların kısmen radyorezistan hale gelmeleri postoperatif radyoterapinin dezavantajını oluşturmaktadır (147). Preoperatif radyoterapinin en büyük dezavantajı ise, radyasyon hasarının oluşturduğu dokuların iyileşme problemidir (139). Radyoterapi yapılan bölgede fibroblast hasarı ile birlikte meydana gelen kollajen hasarı ve stromadaki düzensizlik nedeniyle iltihabi ve mezenkimal hücrelerin bölgeye göçü engellenir (147). Mikrovasküler alanda gelişen hipoksi enfeksiyona zemin hazırlar (153). Radyasyonun tüm bu olumsuz etkileri nedeniyle yara iyileşmesi gecikir. Radyasyon, çoğunlukla doza bağlı olarak intestinal mikrosirkülasyonda bozulmalar yaparak anastomoz kaçağı oranındaki artıştan da sorumlu tutulmuştur (147).

2.7.4 Radyasyon Enteriti

Radyasyon enteriti, abdomen, pelvis veya rektuma yapılan radyasyon terapisi sırasında veya sonrasında oluşan ince ve kalın barsağın fonksiyonel bir Bozukluğudur. Radyasyon enteriti, abdominal ve pelvik radyoterapinin en korkulan komplikasyonlarından biridir (154). Fistül, striktür ve malabsorbsiyonla sonuçlanan barsak hasarlanmaları ciddi anlamda hayatı tehdit edici komplikasyonlardır ve hastanın kaliteli yaşamını etkiler (155). Radyasyon enteritinin inidensindeki artma, kemoterapi ve radyoterapinin kombine olarak kullanımının artmasına bağlanmaktadır (156).

Kalın ve ince barsak mukozası, ionize radyasyona çok duyarlıdır. Barsaklarda akut yan etkiler 800-1000cGy arası ortaya çıkar (157). Abdomen, pelvis veya rektumdan radyasyon alan hastaların çoğunda akut enteritin bulguları gözükür. Klinik olarak tespit edilen hasarlanmalar, radyasyon terapisinin birinci seansından 8 hafta sonrasına kadar akut olarak

değerlendirilir (158). En çok bulantı, kusma, abdominal kramp, tenesmus ve sulu diyare şikayetleri olur, zamanla malabsorbsiyonla sonuçlanır. Kronik radyasyon enteriti, tedavinin tamamlanmasından aylar yıllar sonra veya akut enterit şeklinde başlayabilir ve tedavinin kesilmesinden sonrada devam edebilir. Abdomene radyasyon tedavisi alan hastaların sadece %5-15’inde kronik problemler gelişir (159).

Radyasyon enteritinin oluşmasını ve şiddetini etkileyen faktörler;

- 1-Doz ve fraksinasyon
- 2-Tümör çapı ve dağılımı
- 3-Tedavi edilen normal barsak boyutu
- 4-Konkomitant kemoterapi
- 5-İntrakaviter radyasyon implantları
- 6-Bireysel farklılıklar (geçirilmiş abdominal veya pelvik cerrahi, hipertansiyon, diabetes mellitus, pelvik inflamatuvar hastalık, yetersiz beslenme) (160,161).

Radyoterapi, temel olarak hızlı proliferasyon gösteren epitel hücrelerine sitotoksik etki gösterir. Histopatolojik olarak radyasyon enteriti, diffüz kollajen depolanması ve progresif oklüzif vaskulit ile karakterizedir. Kriptik hücre duvar nekrozu, günlük 150-300cGy lik doz verilmesinden 12-24 saat sonra gözlenebilir. Vakulit ve fibrozis zamanla barsak lümeninin daralmasına ve oluşan striktürün proksimalindeki barsağın dilatasyonuna neden olur. Tutulmuş barsak segmenti ve seroza kalınlaşır. Ülserasyon, nekroz ve bazende barsak duvarının perforasyonu ile sonuçlanır (154). Genellikle cerrahi dışı yaklaşım ön planda gelir. Medikal olarak yaklaşım diare, dehidratasyon ve malabsorbsiyona yöneliktir. Semptomlar, ilaçlar, diyet ve istirahat ile geçer. Cerrahi yaklaşım en sık fistül (mesane, vagen, deri, barsak), obstrüksiyon, striktür, veya perforasyon nedeniyle olur. Ayrıca radyoterapi öncesi bir takım ajanlar; selenyum, tokoferol, amifostin gibi, radyasyon hasarının toksisitesini azaltmak için denenmiştir (162).

2.8 ÖN KOSULLAMA UYGULAMASI VE ÖN KOSULLAMA TEDAVİSİ

1986’da Reimer ve arkadaşlarının köpek miyokardlarının, dört kısa epizot iskemi ve reperfüzyona maruz kalanlarının, önceden maruz kalmayanlara göre, daha uzun iskemi periyotlarında iskemiye iyi tolere ettiklerinin göstermesi, ön kosullama (‘preconditioning’)

teriminin ileri sürülmesine yol açmıştır (89). Tasikardi, hipoksik perfüzyon ve farmakolojik ajanlar gibi diğer uyaranların, myokardda ön iskemik ön kosullamanın benzeri koruyucu etkiyi taklit ettikleri gösterilmiştir ve dolayısıyla farmakolojik ön kosullama deneysel çalışmalarda kullanılmaya başlanmıştır (90). Erken koruma mekanizmasında potasyum-ATP (K_{ATP}) kanallarının farmakolojik ya da iskemi tarafından oluşturulan blokajı ile potasyum dışı asırı akımının etkileri gibi benzeri etkiler yoluyla koruyucu etki görülmektedir. Oysa geç koruma mekanizmasında etki, uygulamadan ortalama 24 saat (12-72 saat) sonrasında görülmekte ve bu ikincil etkinin oluşmasında koruyucu proteinlerin üretiminin etkili olduğu öne sürülmektedir. Bu proteinlerden olan antioksidan enzimlerin üretimi, iskeminin de içinde bulunduğu bazı stres durumlarında artar (91). Örneğin, Hoshida ve arkadaşları köpek kalbinde yaptıkları bir çalışmada iskemiden 24 saat sonra MnSOD enziminin arttığını tespit etmişlerdir (92). Roth ve arkadaşları iskemi sırasında adenozinin retinal kan akımını artırdığını göstermişlerdir (93). Larsen, sıçan retinalarındaki iskemik hasarın adenzin deaminaz inhibitörü enjeksiyonu ya da A1 reseptör antagonisti enjeksiyonu ile önlendiğini, elektroretinografi (ERG) bulgularının yardımıyla göstermiştir (94). Kontrollü kısa bir periyot sublethal iskekiye oluşturulan iskemik ön kosullamaya maruz kalmanın, daha sonraki daha uzun lethal bir iskemi epizotunda oluşan hücresel hasarı azaltan dokuyu koruyucu bir mekanizma olduğu gösterilmiştir. Literatürde, ön kosullama ile ilişkili diğer bir terim olan farmakolojik ön kosullama, farmakolojik ajanların oklüzyondan önce verilerek infarksiyonu azaltıcı etkisinin araştırılmasını ifade etmektedir. Ön kosullamanın koruyucu etkisinde, iskemi ile tetiklenme sonucu intrasellüler bazı mediyatörlerin rol oynadığı söylenmektedir. Bunlardan en önemli ikisi; K_{ATP} kanalı ve protein kinaz C'nin spesifik izoformlarıdır. Ön kosullamada adenozinin yanında bradikinin ve opioidler de tetikleyici rol oynarlar (95).

3. MATERYAL ve METOD

Bu deneysel çalışma Bülent Ecevit Üniversitesi (Zonguldak Karaelmas Üniversitesi) Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu izniyle, BEÜ Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirildi. Deneysel çalışmada ağırlıkları 200-250 gram arasında değişen, 10-12 haftalık Wistar Albino türü 48 Adet dişi sıçan kullanıldı. Çalışma süresince denek sıçanlar; uygun ısı (21 ± 1 °C) ve neme (%50-60) sahip sabit çevrekoşullarında, standart sıçan yemi ve günlük taze şehir şebeke suyu ile beslenip, yonga talaşlı yataklığın kullanıldığı saydam plastik kafeslerde tutuldu.

3.1 GRUPLAR

Ratlar üç gruba randomize edildi;

Kontrol 3. gün Grubu (n=8): İntraperitoneal 0.5 ml salin birbirini takip eden 5 gün boyunca verildi. Son dozun uygulanmasından sonra ratlarda sol kolon anastomozu yapıp anastomozu takip eden 3. Günde ratlar sakrifiye edildi.

Kontrol 7. gün Grubu (n=8): İntraperitoneal 0.5 ml salin birbirini takip eden 5 gün boyunca verildi. Son dozun uygulanmasından sonra ratlarda sol kolon anastomozu yapıp anastomozu takip eden 7. Günde ratlar sakrifiye edildi.

Radyasyon 3. gün Grubu (n=8): İntraperitoneal 0.5 ml salin birbirini takip eden 5 gün boyunca verildikten sonra son dozun uygulanmasından 1 saat sonra tek doz 500 cGy pelvik ışınlama uygulandı. Işınlama sonrası 7. günde sol kolon düzeyinde anastomoz uygulanarak anastomoz sonrası ratlar 3. günde sakrifiye edildi.

Radyasyon 7. gün Grubu (n=8): İntraperitoneal 0.5 ml salin birbirini takip eden 5 gün boyunca verildikten sonra son dozun uygulanmasından 1 saat sonra tek doz 500 cGy pelvik ışınlama uygulandı. Işınlama sonrası 7. günde sol kolon düzeyinde anastomoz uygulanarak anastomoz sonrası ratlar 7. günde sakrifiye edildi.

Ozon Ön-koşullama + Radyasyon 3. gün Grubu Grubu (n=8): İntraperitoneal 0.7 mg/kg ozon/oksijen gaz karışımı birbirini takip eden 5 gün boyunca verildikten sonra son

dozun uygulanmasından 1 saat sonra tek doz 500 cGy pelvik ışınlama uygulandı. Işınlama sonrası 7. günde sol kolon düzeyinde anastomoz uygulanarak anastomoz sonrası ratlar 3. günde sakrifiye edildi.

Ozon Ön-koşullama + Radyasyon 7. gün Grubu (n=10): İntraperitoneal 0.7 mg/kg ozon/oksijen gaz karışımı birbirini takip eden 5 gün boyunca verildikten sonra son dozun uygulanmasından 1 saat sonra tek doz 500 cGy pelvik ışınlama uygulandı. Işınlama sonrası 7. günde sol kolon düzeyinde anastomoz uygulanarak anastomoz sonrası ratlar 7. günde sakrifiye edildi. Ratlarda yara yeri ile ilgili komplikasyonlar, intrabdominal abse, anastomotik kaçak ve stenoz olup olmadığı değerlendirildi. Anastomozda patlama basıncı, hidroksiprolin düzeyi, histopatoloji ve biyokimyasal değerlendirme yapıldı. Biyokimyasal incelemede dokularda oksidatif marker olarak MDA, MPO VE SOD düzeyine bakıldı.

3.2 CERRAHİ İŞLEM

Sıçanlara barsak temizliği amaçlı hiçbir hazırlık yapılmadı. Her sıçana intramüsküler 80 mg/kg Ketamin HCl (Ketalar® flakon, Eczacıbaşı İlaç Sanayi ve Ticaret A.Ş., Lüleburgaz, Türkiye) ve “xylazine” HCl 10 mg/kg (Rompun® %2, Bayer, Leverkusen, Germany) enjekte edilerek dissosiyatif anestezi sağlandı (Şekil 8, 9) (2, 73). Sıçanın ameliyat masasına sırtüstü yatırılmasını takiben karın duvarı tıraş makinası ile tıraş edildi. Cilt, povidon iyot ile silinerek antisepsi sağlandı. 4 cm uzunluğunda standart orta hat insizyonuyla laparotomi işlemi uygulandı. Sol kolon ortaya konuldu. Sol kolona, damar sistemi korunarak, kolonik transeksiyon işlemi uygulandı. İki santimetre proksimal ve distal kolonik içerik sağma yöntemi ile temizlendi.



Resim 2. Şıçanlara kas içi ketamin uygulaması.



Resim 3. Anestezisi altındaki denek

Dikiş materyalinin anastomoz iyileşmesi üzerine etkisini en aza indirmek için emilmeyen, monoflaman olan yuvarlak iğneli 6/0 polipropilen dikişler kullanıldı. Yaklaşık 6-8 adet tek tek primer dikiş ile uç uca anastomoz işlemi uygulandı (Şekil 11, 12). Orta hat kesisi, faysa ve cilt ayrı ayrı olacak şekilde, devamlı 3/0 ipek dikişler kullanılarak kapatıldı. Tüm gruplardaki her şıçana aynı cerrahi prosedür uygulandı. El becerisinin sonuçlara en az etki etmesi için, her gruptan denekler, tek bir cerrah tarafından, karışık olarak ameliyat edildi. Ozon B.E.Ü Tıp Fakültesi Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı'nda ozon jeneratörü [Bozon N,ECONICA, Ukrayna] ile sağlandı. Ozon günlük hazırlandı 30 dk içinde kontrol grubu dışındaki tüm gruplara intraperitoneal olarak 5 gün boyunca günde tek doz halinde verildi.



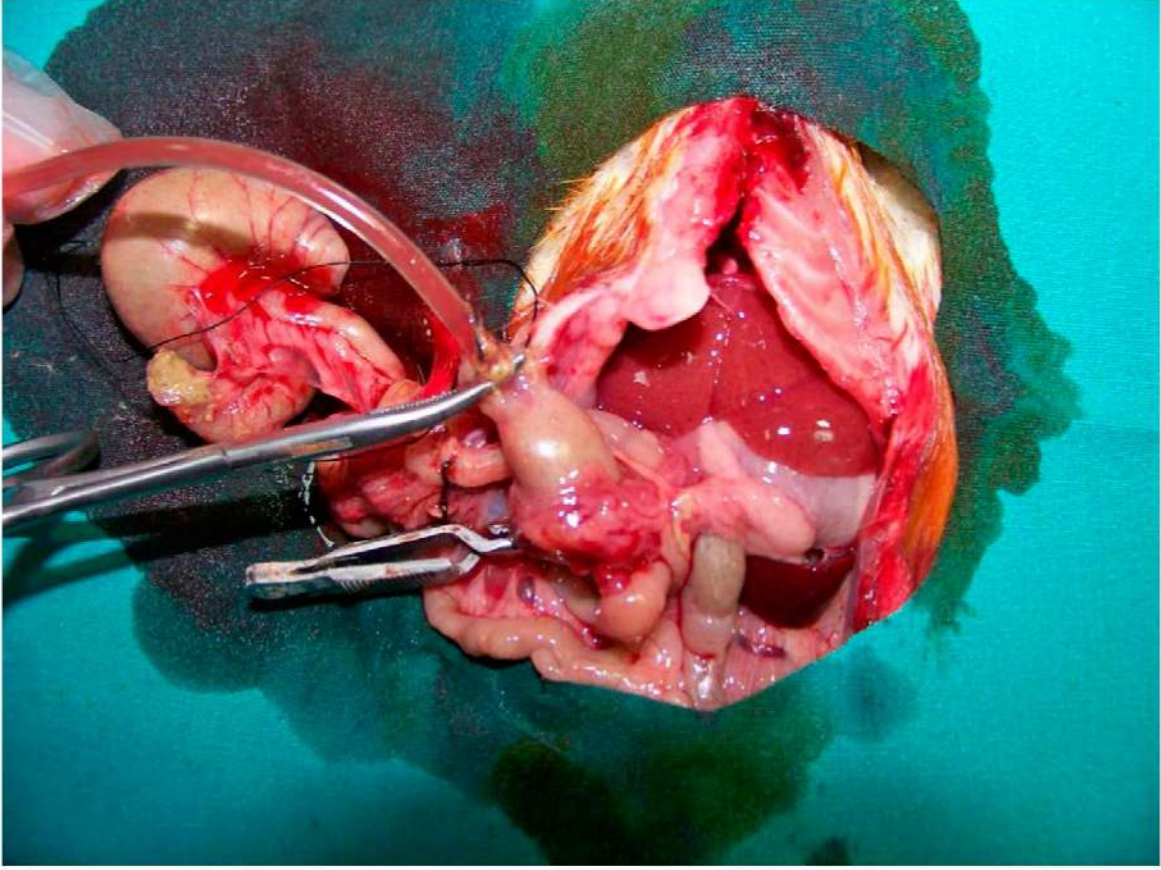
Resim 4. Ozon üretici makine

3.3 SAKRİFİKASYON

Tüm denekler ameliyat sonrası 3 .ve 7 gün yukarıda tarif edilen anestezi yöntemi ile uyutularak, orta hat laparotominin ardından intrakardiyak kan alma yöntemi ile sakrifiye edildi. Patlama basıncının ölçülmesinin ardından kolon segmenti anastomoz hattının 2 cm proksimal ve 2 cm distalini içerecek şekilde rezeke edilerek, anastomozun ortasından geçecek şekilde iki eşit parçaya bölündü. Bir parça histopatolojik inceleme için %10'luk formaldehid solüsyonuna konuldu, diğer parça hidroksiprolin, MPO, SOD ve MDA düzeyi ölçümü için -80 'C'de donduruldu.

3.4 PATLAMA BASINCI ÖLÇÜMÜ

Patlama basıncını ölçmek için sıvı pompası (Infusion pump, Abbott, ABD), basınç transdüseri (Transpac IV, Abbott, ABD) ve monitör (Petas KMA 460 R, Ankara, Türkiye) temin edildi. Karın açıldıktan sonra anastomoz yapılan segment bulundu. Anastomoz bölgesindeki yapışıkların giderilmesi veya manüplasyonu anastomozu zedeleyerek kaçak oluşmasına yol açabileceğinden ve böyle bir kaçığın ölçümlerin farklı çıkmasına neden olabileceğinden, çevre yapışıklıklar korundu. Apse, anastomoz ayrılması ve kaçak varlığı dikkatlice incelendi. Anastomoz bütünlüğünün korunmasına özen gösterildi. Anastomoz hattının distal ucuna minibulldog klemp yerleştirilerek hava ve sıvı kaçağı engellendi. Anastomozun proksimal ucu transekte edildi ve içindeki fekal içerik (varsa) uzaklaştırılarak içine basınç transdüseri ile monitöre bağlanan 6 french kalınlığında kateter yerleştirildi. Hava ve sıvı kaçağını önlemek amacıyla 2/0 ipek ile kateter tespit edilerek kapalı bir sistem oluşturuldu. Perfüzyon pompası ile 50 ml/saat hızla proksimale yerleştirilen kateterden kolon içine sıvı verildi ve monitörde basınç takip edildi. Anastomozdaki patlama sırasında sıvı kaçağı veya basınçta ani düşme belirlenerek, o andaki monitör göstergesi anastomoz patlama basıncı olarak kaydedildi.



Resim 5. Patlama basıncı ölçülmesi

3.5 BİYOKİMYASAL İNCELEMELER

Biyokimyasal analizler Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla Sağlık Yüksekokulu Beslenme ve Diyetetik Araştırma Laboratuvarında ölçüldü. Patlama basıncı ölçümünden sonra anastomoz hattından alınan kesitler - 80 C°'de saklandı. Dokuların önce kuru ağırlığı ölçüldü. Dokuda hidroksiprolin ölçümü için dokular serum fizyolojik ile homojenize edilip Kivirikko' nun yönteminden modifiye Allen düzeltilmesi yapılarak 540, 560, ve 580 nm'de spektrofotometre ile okundu. Sonuçlar mikrogram/100 mg yaş doku olarak kaydedildi (147).

Doku hidroksiprolin düzeylerinin ölçümü: Doku örnekleri 6N HCl ile hidrolize edildi. Hidrolizasyon sonrası numunelerden 25 µL alınarak liyofilize edildi ve %50 (v/v) izopropil alkol ile çözüldü. 10 dakika sonra bu örneklerle kloramin-T eklendi. Ardından 1 ml Ehrlich solüsyonu eklenerek 50 °C'de 90 dakika inkübe edildi. Reaksiyon sonrası oluşan renk değişikliği 560 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçüldü. Aynı koşullar altında, 0.4, 0.8, 1.2 ve 1.6 µg'lık hidroksiprolin standartları çalışıldı. Numune absorbansları

standartlardan elde edilen eğri üzerinden hesaplandı. Sonuçlar $\mu\text{g/g}$ doku olarak verildi (202).

Doku Miyeloperoksidaz (MPO) ve Malondialdehit (MDA) düzeylerinin ölçümü: Doku MPO (Uscn Life Science, Wuhan, China) ve MDA (Cusabio Biotech Co., LTD., Newark, USA) ELISA kitleri ile çalışılmıştır. Sonuçlar MPO düzeyleri için U/mg doku, MDA MPO düzeyleri için nmol/ mg protein olarak verilmiştir.

Doku süperoksit dismutaz aktivitesinin tayini: Dokular, kloroform / etanol karışımı ile 1/1 (v/v) oranında karıştırıldı. 5000xg'de +4 °C'de 2 saat santrifuj edildi. Enzim aktivitesi tayini ve protein tayini bu süpernatandan yapıldı (203). % 50 inhibisyonu 1Ü aktivitenin sağladığı düşünülerek hesap yapıldı. Sonuçlar Ü/ml olarak verildi.

Protein Tayini: Lowry metoduna (204) göre süpernatanda protein tayinleri yapıldı. Süpernatantlar 1/5 oranında dilüe edilerek üzerlerine 2 mL reaktif karışımı (0.5 mL % 2'lik Na_2CO_3 içinde 0.1 N'lik NaOH, 0.5 mL %2'lik Na-K tartarat, 16.5 mL %1'lik CuSO_4) eklendi. Deney tüpleri karıştırıldıktan sonra, 15 dakika bekletildi. Daha sonra deney tüplerine 200 μL Folin ciocalteu's fenol eklenerek iyice karıştırıldı ve 1 saat karanlıkta bekletildi. Kör tüpleride süpernatantlar gibi çalışıldı ancak numune yerine distile su konuldu. Tüpler 750 nm'de köre karşı okundu. Sonuçlar standart eğri üzerinde hesaplanarak mg/mL olarak verildi.

3.6 HİSTOPATOLOJİK DEĞERLENDİRME

%10'luk formaldehit solüsyonu içine konularak saklanan doku parçalarından parafin bloklar hazırlanarak, 4-5 μm kalınlığında kesitler halinde hemtoksilen&eozen ile boyanıp tek bir patolog tarafından kör olarak ışık mikroskopunda değerlendirildi (LEİCA DMLS). Mukozal yara iyileşmesi Pars ve arkadaşları tarafından önerilen skala doğrultusunda skorlandı (205). Anastomotik yara iyileşmesinin granülosit infiltrasyonu, mononükleer hücre infiltrasyonu, fibroblastik proliferasyon, fokal nekroz, eksuda formasyonu 0:yok 1:hafif 2:orta 3:şiddetli şeklinde modifiye edilen parametreler doğrultusunda değerlendirilerek skorlandı (205-206).

3.7 İSTATİSTİKSEL İNCELEME

Çalışmanın istatistiksel analizlerinde SPSS 13.0 paket programı kullanılmıştır. Çalışmada ölçümle belirtilen sürekli değişkenler ortalama ve standart sapma ile, kategorik değişkenler frekans ve yüzde ile gösterilmiştir. Sürekli değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro Wilk testi ile incelenmiştir. Normal dağılıma göstermeyen değişkenlerin 3 ve daha fazla grup karşılaştırmalarında Kruskal Wallis testi, 2 grup karşılaştırmalarında Mann Whitney U testi kullanılmıştır. Çalışmadaki tüm istatistiksel analizlerde p değeri 0,05'in altındaki karşılaştırmalar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

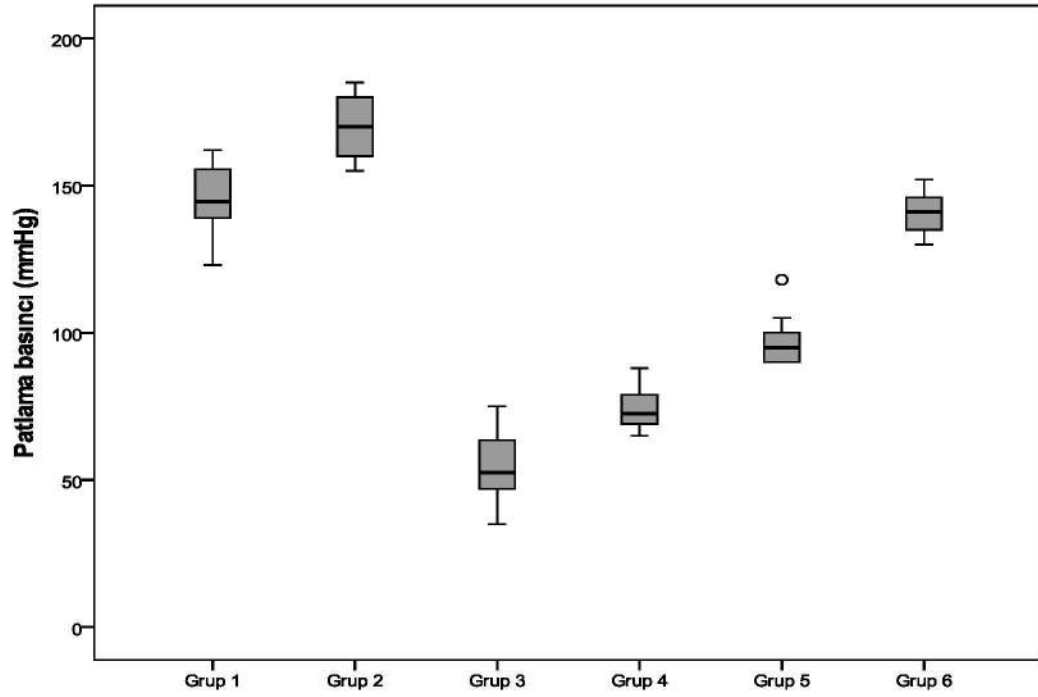
4. BULGULAR

4.1 ANASTOMOZ PATLAMA BASINCI DEGERLERİ

Anestezi ve cerrahi isleme baglı hiçbir grupta ölüm olmamıştır. Tüm deneklerde patlamanın anastomoz hattından olduğu görüldü. Anastomoz sonrası 3.cü ve 7.inci gündeki patlama basınç degerleri ve standart sapmaları Tablo 2’de ve gruplara göre anastomoz patlama basınç degerlerinin dagılımı Grafik 1 ’de gösterilmiştir.

Tablo 2. Patlama basınç degerleri ve standart sapmaları

Gruplar	Ort. Pat. Bas.(PB, mmhg) $\pm$ std sap.	median	minumum	maximum
Grup 1	145,38 $\pm$ 12,716	144,5	123	162
Grup 2	149,63 $\pm$ 37,489	157,5	90	192
Grup 3	50,75 $\pm$ 18,722	52,5	15	75
Grup 4	74,13 $\pm$ 25,737	84	40	104
Grup 5	86 $\pm$ 19,479	82,5	60	118
Grup 6	140,88 $\pm$ 31,832	142,5	90	185



Grafik 1. Gruplara göre anastomoz patlama basıncı degerlerinin dagılımı

Gruplar patlama basıncı açısından degerlendirildiginde ölçümlerin normal dagılım gösterdigi ve her 6 grup arasında da istatistiki olarak anlamlı fark oldugu görüldü ($p<0.001$). Radyoterapi alan gruplarda (Grup III, IV,V ve VI) kontrol gruplarına (Grup I ve II) göre patlama basıncları düşük olduğu görüldü ($p<0.001$). Ozonla ön koşullamanın uygulandığı radyoterapi alan Grup V ve VI' nın patlama basıncları, Salin uygulanması sonrası radyoterapi alan Grup III ve IV 'ün patlama basınclarından istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu tespit edildi ($p<0.001$).

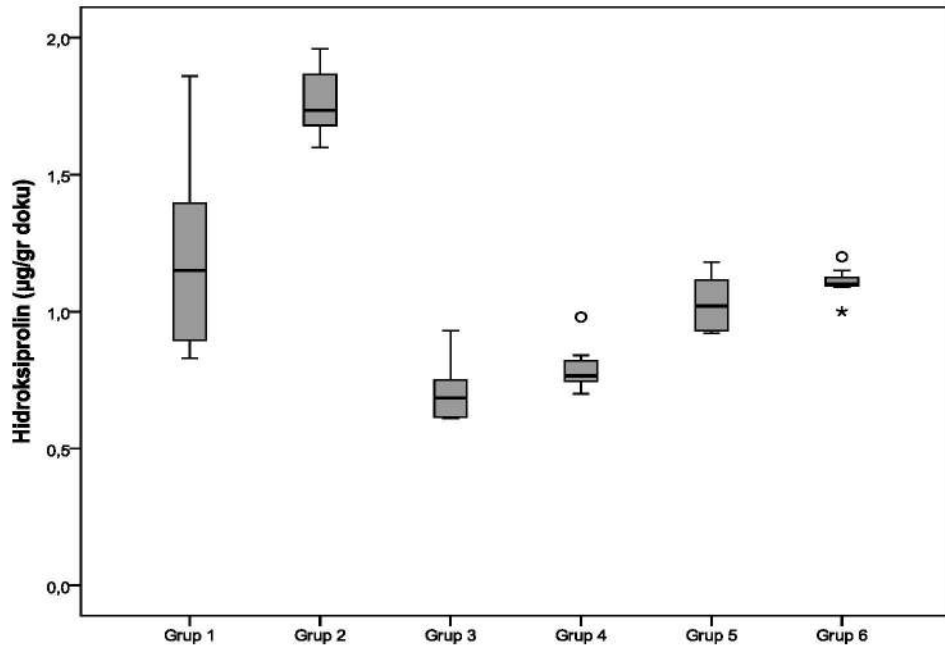
4.2 DOKU HİDROKSİPROLİN DÜZEYLERİ

Hidroksiprolin değerlerinin gruplara göre istatistiksel ortalama değerleri ve değerlerin gruplar arası karşılaştırması Tablo 3'de ve gruplara göre doku hidroksiprolin degerlerinin dagılımı Grafik 2'de gösterilmistir.

Tablo 3. Ortalama hidroksiprolin değerleri ($\mu\text{g/g}$ yaş doku).

Denek	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	Grup 5	Grup 6
1	1.86	1.88	0.93	0.78	1.04	1.09
2	1.44	1.65	0.62	0.75	1.13	1.1
3	1.35	1.71	0.65	0.98	0.92	1.1
4	0.85	1.75	0.77	0.8	1.1	1.0
5	1.23	1.85	0.72	0.84	0.92	1.2
6	0.83	1.72	0.61	0.75	1.0	1.15
7	1.07	1.96	0.73	0.7	1.18	1.1
8	0.94	1.6	0.61	0.74	0.94	1.1
Ort.	1,071	0,912	0,786	0,896	0,942	1,025
$\pm\text{SS}$	0,241	0,100	0,129	0,158	0,165	0,098

Salin uygulanması sonrası radyoterapi alan Grup III ve IV ‘ün doku HPO düzeyinin kontrol grubu Grup I ve II ile karşılaştırıldığında düşük olduğu izlenmiştir. ($p<0,05$). Ozonla  n koşullamanın uygulandığı radyoterapi alan Grup V ve VI’ nın ise HPO değerlerinin Grup III ve IV’e göre istatistiksel olarak yüksek olduğu görülmüştür.



Grafik 2: Gruplara göre anastomotik dokuda hidroksiprolin düzeyleri (HPO, $\mu\text{g/gr}$ doku).

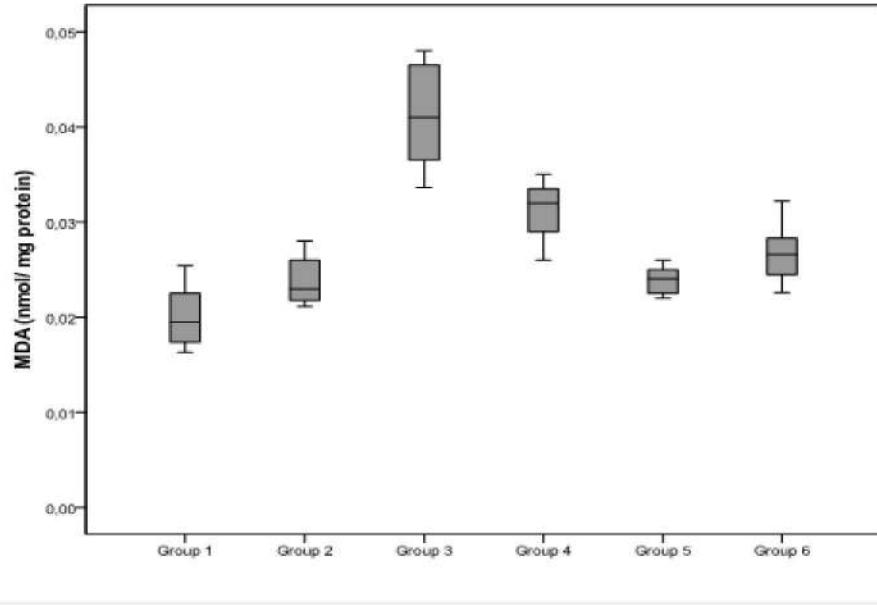
4.3 DOKUDA MALONDİALDEHİD DÜZEYLERİ(MDA)

Doku malonaldehid değerlerinin gruplara göre istatistiksel ortalama değerleri Tablo 4 ve değerlerin gruplar arası karşılaştırması Grafik 3’de gösterilmektedir.

Tablo 4. Ortalama MDA değerleri (HPO, nmol/ mg doku).

Denek	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	Grup 5	Grup 6
1	0.0254	0.022	0.046	0.035	0.022	0.0226
2	0.0164	0.0211	0.044	0.035	0.024	0.0261
3	0.0198	0.027	0.0336	0.032	0.024	0.027
4	0.022	0.028	0.038	0.03	0.026	0.0286
5	0.0183	0.023	0.0357	0.032	0.022	0.026
6	0.0192	0.023	0.0373	0.028	0.023	0.028
7	0.023	0.0215	0.048	0.026	0.025	0.0322
8	0.0163	0.025	0.047	0.032	0.025	0.0229
Ort.	0,021	0,296	0,396	0,422	0,442	0,496
±SS	0,111	0,092	0,093	0,135	0,076	0,090

Radyoterapi alan gruplarda (Grup III, IV, V ve VI) MDA düzeylerinin, kontrol grubuna(Grup I ve II)göre yüksek olduğu gözlenmiş, ancak sadece 3 gün sakrifiye edilen salin –radyoterapi grubunda (Grup 3) istatistiksel anlam bulunmuştur (p=0.014). Benzer şekilde ozon ön koşullama grubunda (Grup V ve VI) ,MDA düzeylerinde azalma sağlarken, istatistiksel olarak yine sadece 3 gün sakrifiye edilen ozon –radyoterapi (Grup 5) grubunda MDA düzeyinde anlamlı düşme izlenmiştir (p=0.014).



Grafik 3. Gruplara göre anastomotik dokuda malondialdehid düzeyleri (MDA, nmol/ mg doku).

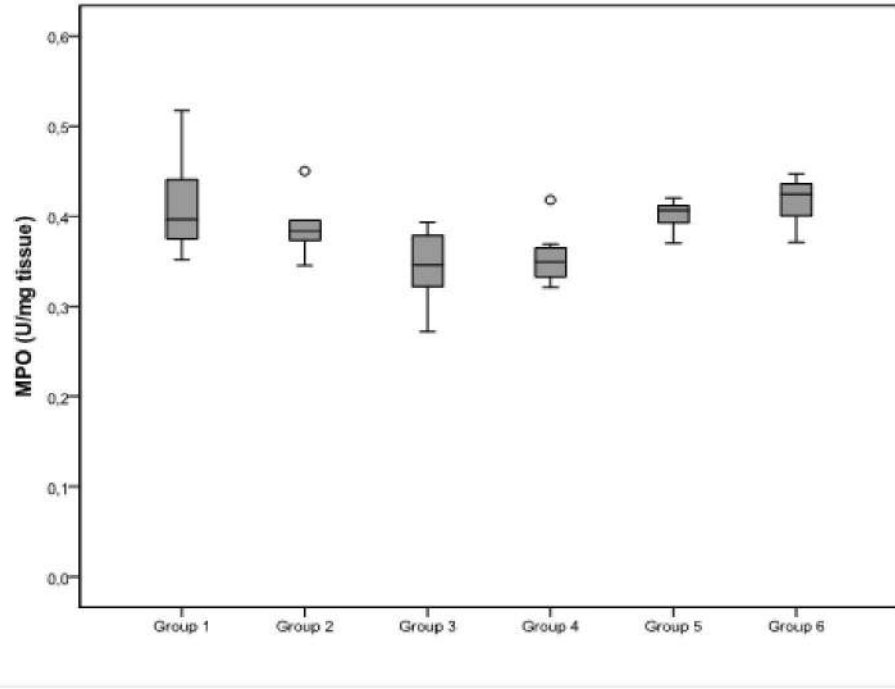
4.4 DOKUDA MYELOPEROKSİDAZ AKTİVİTELERİ

Doku myeloperoksidaz değerlerinin gruplara göre istatistiksel ortalama değerleri Tablo 5 ve değerlerin gruplar arası karşılaştırması Grafik 4’de gösterilmektedir.

Tablo 5. Gruplara göre anastomotik dokuda myeloperoksidaz aktiviteleri (MPO, nmol/ mg doku).

Denek	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	Grup 5	Grup 6
1	0.377	0.385	0.324	0.335	0.383	0.435
2	0.478	0.372	0.38	0.321	0.37	0.371
3	0.395	0.395	0.272	0.347	0.413	0.447
4	0.517	0.395	0.35	0.369	0.407	0.437
5	0.403	0.345	0.341	0.36	0.406	0.427
6	0.373	0.382	0.393	0.33	0.402	0.383
7	0.397	0.45	0.32	0.352	0.41	0.422
8	0.352	0.375	0.377	0.418	0.42	0.418
Ort.	0,357	0,296	0,396	0,422	0,442	0,496
±SS	0,111	0,092	0,093	0,135	0,076	0,090

Radyoterapi alan gruplarda (Grup III, IV,V ve VI) MPO düzeylerinin, kontrol grubuna (Grup I ve II) göre düşük olduğu, ozonla ön koşullamanın uygulandığı grupta (Grup V ve VI) MPO düzeylerinde artış sağladığı izlenmiş olmasına rağmen, elde edilen sonuçların ancak klinik düzeyde anlamlı olduğu ve gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar olmadığı izlenmiştir.



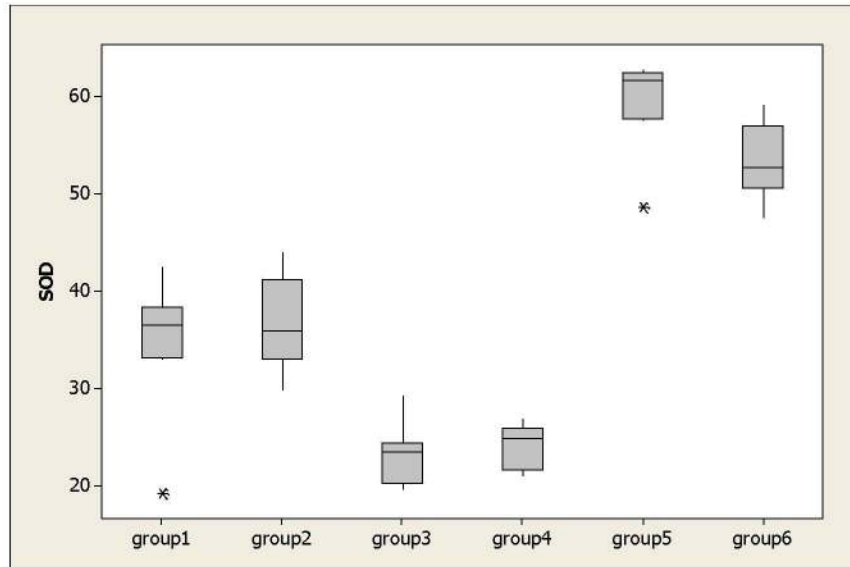
Grafik 4. Gruplara göre anastomotik dokuda myeloperoksidaz aktiviteleri (MPO, nmol/ mg doku).

4.5 DOKUDA SÜPEROKSİTDİSMUTAZ(SOD) AKTİVİTELERİ

Doku süperoksitdismutaz değerlerinin gruplara göre istatistiksel ortalama değerleri Tablo 6 ve değerlerin gruplar arası karşılaştırması Grafik 5’de gösterilmektedir.

Tablo 6. Gruplara göre anastomotik dokuda süperoksitdismutaz aktiviteleri (SOD, Ü/ml doku).

Denek	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	Grup 5	Grup 6
1	33.96	29.88	29.3	22.89	48.62	52.32
2	36.49	32.78	23.4	21.28	58.31	59.1
3	32.99	33.97	19.74	25.07	61.95	53.62
4	36.6	36.5	21.81	26.84	62.64	53.08
5	36.67	41.2	23.85	24.71	61.26	58.16
6	42.41	35.44	23.53	25.66	57.55	47.53
7	38.96	41.29	19.62	21.02	62.68	50.05
8	19.26	43.86	24.57	25.88	61.91	52.13
Ort.	34.66	36.86	23.22	24.16	59.36	53.24
±SS	6.86	4.83	3.07	2.18	4.75	3.84



Grafik 5. Gruplara göre anastomotik dokuda süperoksitdismutaz aktiviteleri (SOD, Ü/ml doku).

Grupların kendi aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark izlenilmedi. Salin uygulanması sonrası radyoterapi alan Grup III ve IV 'ün doku SOD düzeyinin kontrol grubu Grup I ve II

ile karşılaştırıldığında düşük olduğu izlenmiştir ($p<0,05$). Ozonla ön koşullamanın uygulandığı radyoterapi alan Grup V ve VI' nın ise SOD değerlerinin Grup III ve IV'e göre istatistiksel olarak yüksek olduğu görülmüştür ($p<0,05$).

4.6 HİSTOPATOLOJİK İNCELEME

Grupların anastomotik yara iyileşmesi, granülasyon dokusu gelişimi ve lokal inflamatuvar cevabın histolojik değişiklikleri Tablo 9'da skorlandı ve yüzde oranları Tablo 9'da gösterildi. Philips ve ark geliştirdiği 0-4 arası sayısal skalanın Ehrlich ve Hunt tarafından modifiye edilmiş şekli histopatolojik değerlendirmede kullanıldı. Tüm gruplarda kontrol gruplarına oranla inflamatuvar hücre infiltrasyonunun daha yoğun olduğu gözlemlendi. Gruplar arasında fibroblast proliferasyonunun benzer olduğu ve istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü.

Tablo 7. Grupların inflamatuvar hücre infiltrasyonunun yüzde oranları Granülosit infiltrasyonu

	n, (%)					
	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	Grup 5	Grup 6
0 (=yok)	0	0	1 (%12,5)	2(%25)	4(%50)	3(%37,5)
1 (=hafif)	3(%37,5)	4 (%50)	4 (%50)	5(%62,5)	4(%50)	5(62,5)
2(=orta)	1(%12,5)	3(%37,5)	2(%25)	1(12,5)	0	0
3(=şiddetli)	4 (%50)	1 (%12,5)	1(%12,5)	0	0	0

Mononükleer Hücre İnfiltrasyonu

	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	Grup 5	Grup 6
0 (=yok)	0	0	2(%25)	1(%12,5)	0	0
1 (=hafif)	6(%75)	2(%25)	4 (%50)	5(%62,5)	7(%87,5)	7(%87,5)
2(=orta)	2(%25)	3(%37,5)	1(%12,5)	2(%25)	1(%12,5)	1(%12,5)
3(=şiddetli)	0	3(%37,5)	1(%12,5)	0	0	0

Fibroblastik Proliferasyon

	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	Grup 5	Grup 6
0 (=yok)	0	0	2(%25)	1(%12,5)	0	0
1 (=hafif)	7(%87,5)	1(%12,5)	4 (%50)	4 (%50)	6(%75)	4 (%50)
2(=orta)	1(%12,5)	3(%37,5)	2(%25)	3(%37,5)	2(%25)	3(%37,5)
3(=şiddetli)	0	4 (%50)	0	0	0	1(%12,5)

Tablo 7: Grupların inflamatuvar hücre infiltrasyonunun yüzde oranları (devamı)

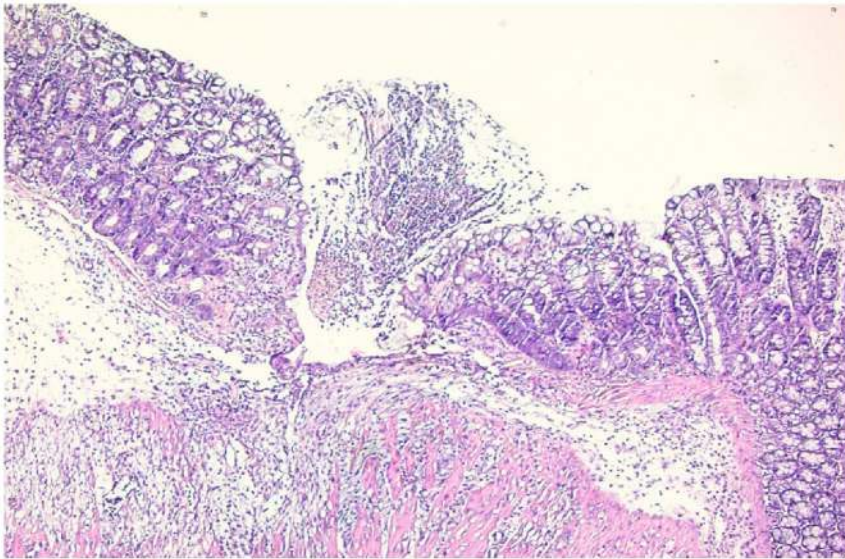
Fokal nekroz

	n, (%)					
	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	Grup 5	Grup 6
0 (=yok)	8(%100)	6(%75)	7(%87,5)	8(%100)	7(%87,5)	8(%100)
1 (=hafif)	0	2(%25)	0	0	1(%12,5)	0
2(=orta)	0	0	1(%12,5)	0	0	0
3(=şiddetli)	0	0	0	0	0	0

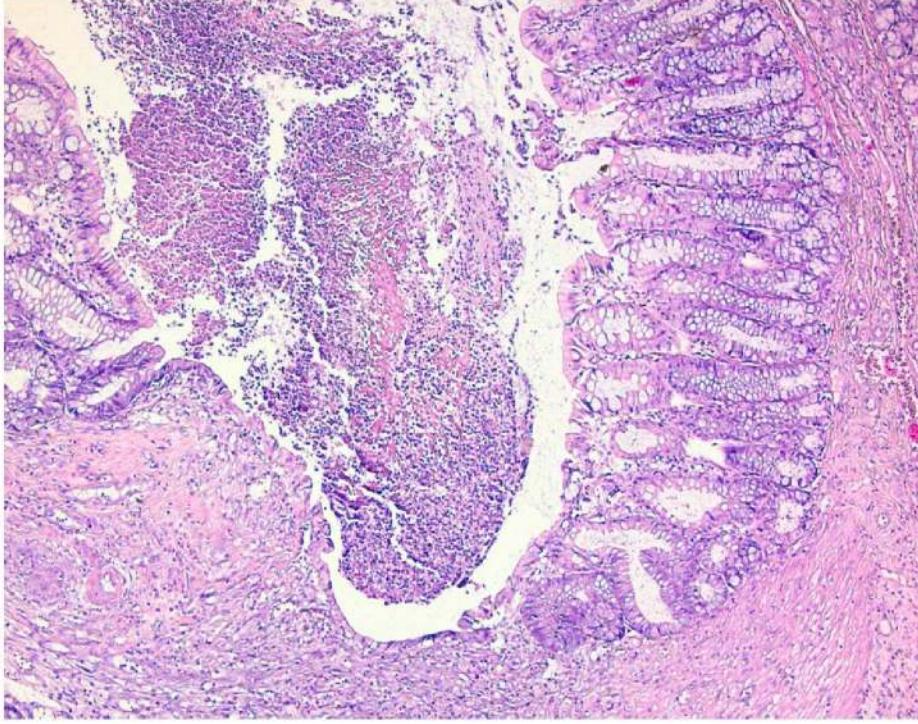
Eksuda formasyonu

	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	Grup 5	Grup 6
0 (=yok)	1(%12,5)	3(%37,5)	7(%87,5)	5 (%62,5)	6(%75)	5 (%62,5)
1 (=hafif)	3(%37,5)	4 (%50)	1(%12,5)	3(%37,5)	0	2(%25)
2(=orta)	1(%12,5)	0	0	0	2(%25)	1(%12,5)
3(=şiddetli)	3(%37,5)	1(%12,5)	0	0	0	0

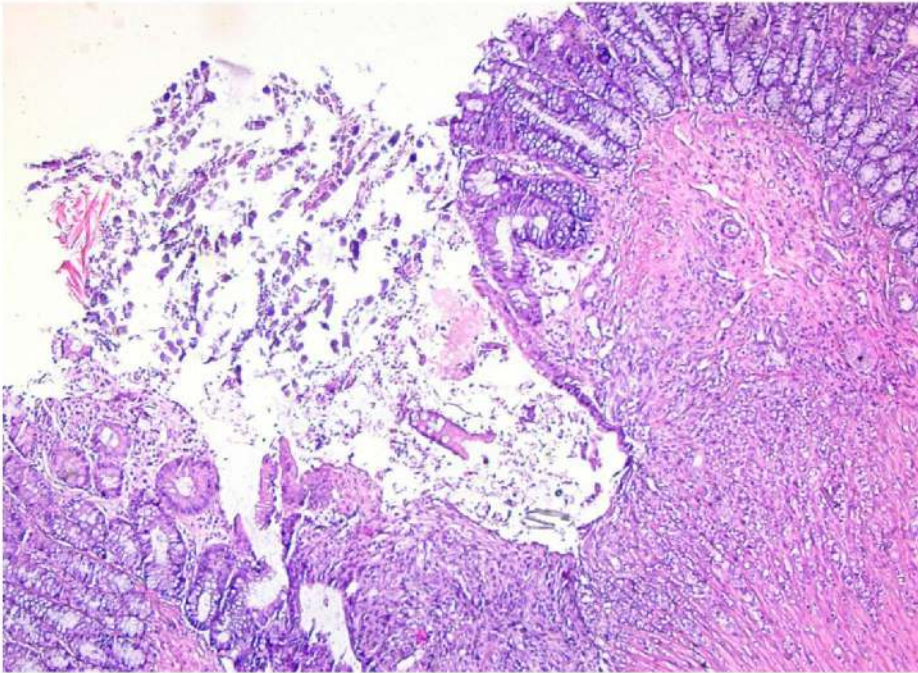
İncelenen diğer histopatolojik özelliklerde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı görüldü.



Resim 6. A grubu: Yüzeyde iltihabi eksuda yanı sıra mukozal ve submukozal alanda mikst iltihabi hücre infiltrasyonu ve ödem (H&E, x50)



Resim 7. D grubu: İltihabi eksudaya eşlik eden yüzey epitelinde reepitelazyon ve mononükleer iltihabi hücreler (H&E, x50)



Resim 8. F grubu: Mukozal ve submukozal alanda fibrozis, mononükleer iltihabi hücreler ve fokal yüzeyel reepitelizasyon (H&E, x50)

5. TARTIŞMA

Gastrointestinal sistem cerrahisinin yapıtaşları olan anastomozlar günümüzde oldukça sık olarak uygulanmaktadır. Özellikle kolon rezeksiyonlarından sonra görülen anastomoz kaçakları yoğun fekal içerik nedeniyle mortalite ve morbiditede artışa yol açmaktadır. Bunun dışında, acil şartlarda ve iskemi durumunda kaçak riskinin daha çok arttığı yapılan klinik çalışmalarla kanıtlanmıştır (171). Kolorektal cerrahide anastomoz kaçığı farklı serilerde değişik oranlarda bildirilmekle birlikte, Fielding ve arkadaşları tarafından incelenen geniş vaka serisinde bu oran %13 olarak bulunmuş, diğer bir çalışma ise radyolojik kaçak oranının %51'e dek yükselebildiğini ortaya koymuştur (172). Olusturabileceği sonuçlar göz önüne alındığında anastomoz iyileşmesini artırıcı ve kaçak oranını azaltabilecek teknik uygulamalar ve farmakolojik ajanlar günümüz cerrahisinin temel araştırma konularından biri olmuştur.

Yara iyileşmesinde doku oksijenlenmesi önemli bir yer tutar. Yara iyileşmesi hipoksiden olumsuz yönde etkilenir (174, 175, 177, 181). Dokunun yeterli oksijenizasyonu kan hacmi, doku perfüzyonu ve arteriyal oksijen doygunluğu ile sağlanır (180). Yeterli doku oksijenlenmesi, nötrofillerin normal oksidatif fosforilasyonu, lökosit aktivasyonu, fibroblast üretimi, angiogenez ve yeniden epitelizeasyon için gereklidir (174, 175, 178, 181). Günümüze kadar kolonik anastomoz kaçıklarını engellemek için koyun barsağı, kıkırdak plaklar, kaz trakeası, ham deri gibi ilginç olanlar da dahil pek çok ilaç, cerrahi teknik, protez, yapıştırıcı maddeler gibi dıştan bariyer oluşturacak ürünler denenmiştir ancak günümüze kadar ideal bir algoritim saptanamamıştır (173, 179).

Madden ve arkadaşları (183), yara iyileşmesi biyolojisinde kollajenin yeri ni açıklamak için sadece ne kadar kollajenin mevcut olduğunu bilmenin yetmeyeceğini, kollajenin sentez ve lizis oranlarının da bilinmesi gerektiğini bildirmişlerdir. Cronin yaptığı bir alışmada (184), anastomoz patlama basıncı ölçümlerinde anastomoz yaptıktan sonraki 3. günden itibaren uygulanacak olan kuvvetin giderek arttığını ve 7–10. Günlerde maksimuma ulaştığını, aynı zamanda ilk 3 günde hidroksiprolin konsantrasyonunun anastomoz bölgesinde %40 azaldığını ve yaklaşık 5. günden itibaren normale yaklaştığı,

10–14. günlerde ise normalin üstüne çıktığını bildirmiştir. Jiborn ve arkadaşları yaptıkları deneysel bir çalışmada (182), sol kolon rezeksiyonu ve anastomozundan sonra tüm kolonda kollajen konsantrasyonunda hissedilir derecede azalma göstermişlerdir. Postoperatuar ilk 4 gün süresince lizisin üstün olduğunu, 7. günde ise artmış net kollajen miktarının sentezinin başladığının göstergesi olduğunu belirterek tüm kolonun rezeksiyon ve anastomoz travmasına tepki gösterdiğini ve kolon iyileşmesindeki nazik dengenin kollajen lizis ve sentezi arasında var olduğunu kabul etmişlerdir. Barsak anastomoz iyileşmesinin değerlendirilmesinde histopatolojik olarak fibrozis skorlaması kullanıldı (185). Çalışmamızda kontrol grubunda, radyoterapi grubu hemde ozon ile önkoşullama grubunda postoperatif 7. gündeki fibrozis değerleri postoperatif 3. gündeki fibrozis değerlerine göre daha yüksek saptandı. Bu farklılığın yara iyileşmesi süreci ile doğru orantılı olduğu düşünülmektedir.

Ozon, üç oksijen atomundan oluşan bir kimyasal bileşiktir. İki atomlu normal atmosferik oksijenin çok yüksek enerji taşıyan bir şeklidir. Medikal uygulamalarda ozon O_2/O_3 karışım şeklinde kullanılır. Son yıllarda medikal ozonun kullanımı hızla yaygınlaşmaktadır. Bu yaygınlaşma sadece kullanım hızındaki artışta değil, aynı zamanda tıbbi branşlarda da olmaktadır. 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 (190,191). Medikal ozonun kullanıldığı ana branşları nöroloji, ortopedi, dahiliye, spor hekimliği, endokrinoloji şeklinde kabaca verebiliriz. Bütün bu branşlarda kullanılmasına rağmen ozonun terapötik bir ajan olarak sınıflandırılması henüz günümüzde bazı zorluklar taşımaktadır. Çünkü hastalara uygulanan tedaviye verdikleri yanıtlardaki farklılıklar, standardize edilmiş çalışmaların yapılmasını zorlaştırmaktadır (110). 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. Bu bağlamda iskemik prekondisyonun en iyi örneği teşkil eder.

Günümüzde düşük doz ozon ile antioksidan enzimlerin, nitrik oksit yolunun ve diğer hücresel aktivitelerin düzenlenebileceği kanıtlanmıştır ve birçok patolojik durumda ozonun şaşırtan etkilerini desteklemektedir (193). Diyabet, düz kasların ve endotelin reaktivitesini etkileyen, damarlarda çok sayıda değişikliklere yol açan bir hastalıktır. Vasküler endotel,

hiperglisemi ile indüklenen metabolik değişikliklere yatkın bir hedef gibi gözükmektedir. Poliöl yolunun aktivasyonu, proteinlerin enzimatik olmayan glikozilasyonu ve reaktif oksijen türlerindeki artışın diyabetin komplikasyonları içinde önemli bir rolü vardır. Ozon tedavi edici bir ajan olarak kullanılmış ve faydalı etkileri gözlenmiştir. Bununla birlikte günümüze kadar yalnızca birkaç biyokimyasal ve farmakodinamik mekanizma gösterilebilmiştir (191,194,195). Ozonun kronik oksidatif stresine yönelik adaptasyonu indüklediği 1996 yılında tanımlamıştır (81). Diğer çalışmalar da kontrollü ozon verilmesinin oksidatif prekondisyoningi veya oksidatif strese adaptasyonu sağlayarak reaktif oksijen türleri ile indüklenen hasarı azaltabileceğini göstermiştir (191,195). 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 (196). Sanchez ve ark. nın 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 stresini iyileştirerek yara iyileşmesinde rol oynadığı öne sürülmüştür (192). Bu çalışmada ozonun farmakodinamik etkilerinin süperoksitler üzerine olan etkilerine dayandığı belirtilmiştir. Ozon ile medikal tedavi alan grupta kontrol grubuna kıyasla lezyonlarda iyileşmenin daha fazla olduğu ve amputasyonların daha az oranda görüldüğü belirtilmiş, bu özelliklerine dayanarak diabetes mellitus ve komplikasyonlarına yönelik alternatif bir tedavi metodu olabileceği belirtilmiştir.

Ozon tedavisi cerrahide yanıklar, yara bakımı, dekübit ülserleri, kötü iyileşen yaralar, dermatolojide fungal egzema, herpes simplex ve zoster, akne, alopesi tedavisi, KBB’da Otitis media ve externa tedavisinde, jinekolojide inflamatuvar genital hastalıkların tedavisinde, enfeksiyonlarda özellikle Hepatit B ve C tedavisinde viral yükü azaltma amacıyla kullanılmaktadır. Diyabetik ayak tedavisinde enfekte yara iyileşmesinde kullanım bulmaktadır (163, 164, 167). Ayrıca ağrı tedavisinde özellikle disk hernisi nedeniyle meydana gelen bel ağrılarında intradiskal, intraartiküler kullanımı da yaygınlaşmaktadır (168). İnsan ve hayvanlardaki ozon kullanımının tartışmaları hala mevcuttur. Özellikle yüksek doz kullanımında serbest radikal formasyonları salınımına bağlı yan etkileri ve inhalasyon yolu ile verildiğinde görülen respiratuar sistemdeki irritan etkileri bu tartışmada önemli rol almaktadır (165, 164). Bu nedenler klinik pratikte O₃ gazı kullanımı sınırlanmaktadır.

İlk başlarda dezenfektan olarak kullanılan ozon mikroorganizmaları öldürme özelliğine sahiptir(164). Ozonla ilgili olarak ilk kez 1935 yılında bilimsel bir toplantıda dr erwin payr tarafından “cerrahide ozon uygulamaları” adında bir derleme sunulmuştur(108). Ozonun etkin terapötik konsantrasyonu 10-80 mikrogram/miligram olarak bildirilmektedir(110). Bu konsantrasyonda sistemik olarak hidrojen peroksitin plazma seviyesi artırır. H₂O₂ artışı lokosit ve endotel hücrelerinde büyüme faktörleri, interlökin ve interferon salınımına yol açar(124). Ozonun bu etkisi yara ve yanık iyileşmesine katkı sağlayabilmektedir. İskemik ve ülserle yaralarda ozonun aktive olmuş trombositlerden büyüme faktörü salgılatarak iyileşmeyi hızlandıracığı literatürde bildirilmiştir(169). Literatürde topikal ozonlu yağ tedavileri diyabetik ayak yaralarında hem gaz karışımı şeklinde, hemde kremler şeklinde kullanılarak tedavilerde etkin bulunmuştur (163,170).

Ozonun iskemi-reperfüzyon hasarını önlemede kullanıldığı çalımsalar literatürde mevcuttur. Ajamieh ve ark. sıçanlarda oluşturdıkları hepatik iskemi reperfüzyon modelinde iskemik ön koşullama ve ozon ön koşullamasının etkilerini karşılaştırmışlar ve biyokimyasal parametreler açısından iki yöntemin eş sonuçlar verdiğini fakat histopatolojik incelemede ozonun iyileştirme etkisinin üstün geldiğini belirtmişlerdir (186). Stadlbauer ve ark. kardiyak greft vericisi ve alıcısına transplantasyon öncesi intraperitoneal olarak ozon uygulamışlar ve transplantasyon sırasında gelişen iskemi-reperfüzyon hasarını azaltıcı etkisini histolojik ve biyokimyasal bulgularla göstermişlerdir (188). Barber ve ark. Renal transplantasyondan önce ozon ön koşullamasının sıcak renal iskemi yaratılan sıçanlarda uygulandığı çalışmalarında renal hasarın azaltıldığını göstermişlerdir (187). Borrego ve ark. Sisplatinle indüklenen sıçan renal iskemisinde gelişen hasarın azaltılmasında ozonun antioksidan sistem üzerinden etkili olduğunu göstermişlerdir (189). Çalışmamızda Gruplara göre anastomotik dokuda hidroksiprolin düzeyleri (HPO, µg/gr doku). Grup 3 ve 4’te doku HPO düzeyinin kontrol grubu ile karşılaştırıldığında düşük olduğu izlenmiştir (p<0,05). Ozon ön koşullama yapılan Grup 5 ve 6’da ise HPO değerlerinin Grup 3 ve 4’e göre istatistiksel olarak yüksek olduğu görülmüştür. Gruplara göre anastomotik dokuda malondialdehid düzeyleri (HPO, µg/gr doku). Radyoterapi alan gruplarda MDA düzeylerinin, kontrol grubuna göre yüksek olduğu gözlenmiş, ancak sadece 3 gün sakrifiye edilen salin –radyoterapi grubunda (Grup 3) istatistiksel anlam bulunmuştur (p=0.014). Benzer şekilde ozon ön koşullama, MDA düzeylerinde azalma sağlarken, istatistiksel olarak yine sadece 3 gün sakrifiye edilen ozon –radyoterapi (Grup 5) grubunda MDA düzeyinde anlamlı düşme izlenmiştir (p=0.014).

Stevens ve arkadaşları (198), 5000rad'lık preoperatif radyoterapiyi takiben yaptıkları anterior rezeksiyon olgularını, radyoterapisiz grupla karşılaştırmışlar ve radyoterapili grupta kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek anastomoz kaçağı saptamışlardır.

Pleskovic A ve arkadaşları 20 köpek üzerinde yaptıkları çalışmada kombine radyoterapi+kemoterapi uygulanmış sonuçta kolon mukozasında erken dönemde enterosit ve lenfosit kaybını tesbit etmiş, bunun da mukozal bariyerde bozulma, malabsorbsiyon sendromu, stenoz, inflamasyona yol açabileceğini ifade etmişlerdir (199).

Blake DP ve arkadaşları köpekler üzerinde yaptıkları araştırmada 6000 rad radyasyondan sonra stapler ya da elle yaptıkları anastomozlarda her iki grupta da anastomoz kaçağı oranını yüksek olarak gözlemlemişlerdir (197).

Winsey ve arkadaşları sıçanlar üzerinde yaptıkları çalışmada 200 rad radyasyondan sonra postoperatif 7.günde yaptığı ölçümlerde patlama basıncı ve hidroksiprolin düzeylerinin önemli derecede düştüğünü ifade etmişlerdir (200).

Özet olarak tüm bu çalışmalarda (197,198,199,200,201) radyasyonun uygulanan doza ve süreye bağlı olarak barsak anastomoz iyileşmesini olumsuz etkilediği bildirilmektedir. Bizim çalışmamızda, sıçanlara ratlara 6 Gy total vücut ışınlaması uygulanmasını takiben 7. günde kolon anastomozu uyguladık. Postopereatif 3. ve 7. günde yapılan ölçümlerde, Radyoterapi alan gruplarda kontrol gruplarına göre PB'nın düşük olduğu görüldü ($p<0.001$). Ozonla ön koşullamanın PB'ında artışa neden olduğu, ve bunun salin-radyoterapi gruplarından istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu tespit edildi ($p<0.001$). Salin-radyoterapi (Grup 3 ve 4)'te doku HPO düzeyinin kontrol grubu (Grup 1 ve 2) ile karşılaştırıldığında düşük olduğu izlenmiştir. ($p<0,05$). Ozon ön koşullama yapılan Grup 5 ve 6'da ise HPO değerlerinin Grup 3 ve 4'e göre istatistiksel olarak yüksek olduğu görülmüştür. Bu bulgularla preoperatif 7. günde uygulanan tek ve düşük doz radyasyonun anastomoz iyileşmesini bozduğunu saptadık. Histopatolojik incelemeler sonucunda radyasyon grubunun anastomoz iyileşmesi ve yara iyileşme skorlarının kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük olduğunu ($p<0.05$) gözlemledik.

Çalışmamızda, radyoterapinin kolon anastomoz iyileşmesi üzerinde, erken dönemde olumsuz yönde etkileri olduğu izlenmiştir. Bu etki, radyoterapi alan gruplarda, düşük

patlama basıncı ve hidroksiprolin düzeyleri tespit edilmesine neden olmuştur. Radyoterapiye bağlı hasar, oksidatif stres sonucu meydana gelirken, çalışma gruplarında oksidatif stres belirteçlerinden sadece 3 gün sakrifiye edilen salin-radyoterapi grubunda (Grup 3) MDA istatistiksel anlam bulunmuş, diğer gruplarda MDA ve MPO değerleri açısından klinik anlam içeren ancak istatistiğe yansımayan değerler tespit edilmiştir.

Çalışmamızda Ozonla ön koşullama ratlarda gerçekleştirilen kolon anastomozlarında, patlama basıncı ve hidroksiprolin değerlerinin yükselmesine neden olmuştur. Ozonun, anastomoz dokusunda açığa çıkan oksidatif belirteçler üzerine etkisi, yine istatistiksel olarak sadece 3 gün sakrifiye edilen ozon-radyoterapi (Grup 5) grubunda MDA düzeyinde düşme şeklinde izlenmiş, diğer gruplarda ise MDA ve MPO değerleri açısından klinik anlam içeren ancak istatistiğe yansımayan değerler tespit edilmiştir.

6. SONUÇ

Çalışmamızda radyoterapinin literatürle uyumlu olarak anastomoz iyileşmesini olumsuz etkilediğini tespit ettik. Ozon anastomoz iyileşmesi üzerine olumlu etkilediğini hidroksiprolin, SOD, MDA ölçümü ve histopatolojik incelemelerle ortaya çıkardık. Ozon+radyoterapi grubunun, radyoterapi grubuna göre hidroksiprolin, patlama basıncı değerleri ve histopatolojik skorlaması anlamlı olarak yüksek bulundu ($p<0.05$). Fakat her ikisinde kontrol grubuyla karşılaştırıldığında aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0.05$). Ozonla oksidatif ön koşullamanın radyoterapi sonrası yapılan anastomozlar üzerine olumlu etkisi gözlenmiştir. Sonuç olarak çalışmamızda, ozon özellikle kolorektal cerrahide preoperatif veya postoperatif radyoterapi sonrası anastomoz iyileşmesine destek oluşturabilir. Ancak, ozonun endojen antioksidan kapasite üzerine etkilerini ortaya koymaya yönelik çalışmaların yapılmasına gerek vardır.

KAYNAKLAR

1. Schwartz S, Shires GT, Spencer F., Principles of surgery 6 th ed.pp:1192-1278,USA 1994
2. İlgi S, Gökşen Y, Y,Sayek i: Temel Cerrahi. Edit.: Sayeki. Gastrointestinal Sistem Anatomisi, Kolorektal Polipler ve Polipozis sendromları, Kolorektal Karsinomlar. Cilt 1,1. baskı, Ankara: Güneş Kitabevi, 1991:555-67,816-839
3. Bozfakıoğlu Y, Müslümanoğlu M: Cerrahi Gastroenteroloji. Edit. :Değerli Ü, Bozfakıoğlu Y.Kolon Hastalıkları.4.baskı, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi, 1997: 142-168
4. Harpaz N, Saxena R: Modern Surgical Pathology. In: Weidner N, Cote RJ, Suster S, Weiss LM. Gastrointestinal Tract, Large Intestine. Vol 1,1 st ed:Saunders,2003: 749-852
5. Romolo JL. Embryology and anatomy of the colon, Shackelford's Surgery of the alimentary Tract, Ed: George D. Zuideman 1996: 3 –16.
6. Sternberg SS. Colon, Chapter 29, I n Histology for Pathologists, ed: Sternber SS, NewYork: RavenPress, 1992:573 –588.
7. Rosai J, Large Bowel. In Ackerman's Surgical Pathology, ed: Rosai J. New York: St. Louis Mosby 1996: 729–799.
8. Menteş B, İrkorucu O. Kolon Fizyolojisi. Ed: Alemdaroğlu K, Akcal T, Buğra D. Kolon Rektum ve Anal Bölge Hastalıkları. İstanbul: 2004: 31 –37
9. Beezhold DH, Personius C. Fibronectin fragments stimulate tumor necrosis factor secretion by human monocytes. J Leukoc Biol. 1992 Jan;51(1):59-64.
10. Syk I, Agren MS, Adawi D, Jeppsson B. Inhibition of matrix metalloproteinases enhances breaking strength of colonic anastomoses in an experimental model. Br J Surg.2001;88(2):228-234.
11. Henry G, Garner WL. Inflammatory mediators in wound healing. Surg Clin North Am.2003;83(3):483-507.
12. Thompson SK, Chang EY, Jobe BA. Clinical review: Healing in gastrointestinal anastomoses, part I. Microsurgery. 2006;26(3):131-136.
13. Ma C, Tarnuzzer RW, Chegini N. Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of matrix metalloproteinases in mesothelial cells and their regulation by transforming growth factor-beta1. Wound Repair Regen. 1999;7(6):477-485.
14. Varga J, Yufit T, Brown RR. Inhibition of collagenase and stromelysin gene expression by interferon-gamma in human dermal fibroblasts is mediated in part via induction of tryptophan degradation. . J Clin Invest. 1995;96(1):475-481
15. Witte MB, Barbul A. General principles of wound healing. Surg Clin North Am. 1997 Jun;77(3):509-28.

16. Khoury GA, Waxman BP. Large bowel anastomoses. A review. Br J Surg 1983; 70: 61-63.
17. Jonsson K, Jensen JA, Goodson WH. Tissue oxygenation, anemia and perfusion in relation to wound healing in surgical patients. Ann Surg 1991; 214: 605-613.
18. Stoop MJ, Dirksen R, Hendriks T. Advanced age alone does not suppress anastomotic healing in intestine. Surgery 1996; 119: 15-19.
19. Mast BA, Cohen IK, Diegelmann RF. Wound healing. Biochemical & Clinical Aspects. Philadelphia. 1992; pp.344-355.
20. Schilling JA. Wound Healing. Surg Clin North Am 1976; 56: 859-874.
21. Peker Y, Kaya M, Küçükali İ. Kolon rezeksiyonu sonrası anastomoz kaçığı sorunu (162 olgunun retrospektif incelenmesi). Kolon ve Rektum Hast Derg 1991; 1: 149-153.
22. Carrico TJ, Mehrhof Jr. Al, Cohen IK. Biology of Wound Healing. Surg Clin North Am 1984; 64: 721-733.
23. Jiborn H, Ahonen J, Zeddefeldt B. Healing of experimental colonic anastomoses: III. Collagen metabolism in the colon after left colon resection. Am J Sug 1980; 139: 398-405.
24. Thornton FJ, Barbul A. Healing in the Gastrointestinal Tract. Surg Clin North Am 1997; 77: 549-573.
25. Hawley PR, Faulk WP, Hunt TK. Collagenase activity in the gastrointestinal tract. Br J Surg 1970; 57: 896-899.
26. Jönsson K, Jiborn H, Zederfeldt B. Breaking strength of small inteststinal anastomoses. Am J Surg 1983; 145: 800-803.
27. Kahya AS. Kolon obstrüksiyonu nedeni ile uygulanan rezeksiyon sonrası, düşük molekül ağırlıklı heparin, papaverin ve pentoksifilinin anastomoz iyileşmesi üzerine etkileri. İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Uzmanlık Tezi. İstanbul, 2001.
28. Yarımkaya A. İskemik kolon modelinde anastomoz iyileşmesine büyüme hormonu ve anabolik steroidlerin etkileri. İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Uzmanlık Tezi. İstanbul, 2000.
29. Giray S. Preoperatif radyoterapi uygulanmış sıçanlarda kolon anastomozuna hiperbarik oksijen ve pentoksifilinin etkileri. İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Uzmanlık Tezi. İstanbul, 1998.
30. Irvin TT, Hunt TK. Reappraisal of the healing process of anastomoses of colon. Surg Gynecol Obstet 1974; 138: 741-746.
31. Kim SC, Buchmiller LT, Fonkalsrud WE, Phillips D. The effect of anabolic steroids on ameliorating the adverse effects of chronic corticosteroids on intestinal anastomotic healing in rabbits. Gynec Obst Surg 1993; 176: 73-79
32. Hunt TK, Zederfeldt B, Goldstick TK. Oxygen and healing (review). Am J Surg 1969; 118: 521.
33. Underfriend S. Formation of Hydroxyproline in collagen (review) Science 1966; 152: 1335-1340

34. Shandall A, Lowndes R, Young HL. Colonic anastomotic healing and oxygen tension. *Br J Surg* 1985; 72: 606-609.
35. Sheridan WG, Lowndes RH, Young HL. Tissue oxygen tension as a predictor of colonic anastomotic healing. *Dis Colon Rectum* 1987; 30: 867-871.
36. Ravitch M, Brolin R. Studies in the healing of intestinal anastomoses. *World J Surg* 1981; 5: 627-637.
37. Zengin K. Deneyisel distal kolon obstrüksiyonlarında peroperatif antegrad serum fizyolojik lavajı ile peroperatif antegrad sukralfat lavajının primer barsak anastomozu üzerine etkileri. . İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Genel Cerrahi. Uzmanlık tezi. İstanbul, 1998.
38. Yesilkaya Y, Sothan N, Bengisu N. The effects of different suture techniques on collagen metabolism in experimental distal colonic anastomoses. *Br J Surg* 1985; 72: 987-989.
39. Irvin TT, Edwards JP. Comparison of single layer inverting two layer inverting and everting anastomoses in the rabbit colon. *Br J Surg* 1973; 60: 453-457.
40. Abramowitz HB, Butcher HJ. Everting and inverting anastomoses. An experimental study of comparative safety. *Am J Surg* 1971; 28: 142-144.
41. Hongstrom H, Hanglund J, Zederfeldt B. Suture technique and early breaking strength of intestinal anastomoses and laparotomy wounds. *Acta Chir Scand* 1985; 151: 441-443.
42. Waninger J, Kauffmann GW, Shah IA, et al. Influence of the distance between interrupted sutures and tension of sutures on healing of experimental colonic anastomoses. *Am J Surg* 1992; 163: 319-323.
43. Goldsmith HS. Protection of low rectal anastomosis with intact omentum. *Surg Gynec Obstet* 1977; 144: 584-586.
44. Graffner H, Löwenhielm P, Walter B. :The healing process in high and low anterior resection of the rectum. A comparative study in the pig using stapling devices. *Dis Colon Rectum* 1984; 27: 772-774.
45. Thornton FJ, Barbul A. Wound Healing: Healing in the Gastrointestinal tract. *Surg Clin North Am* 1997; 77: 549-73.
46. Feathers RS, Lewis AAM, Sagor GR. Profilactic systemic antibiotics in colorectal surgery. *Lancet* 1977; 2: 4-8.
47. Irvin TT. Collagen metabolism in infected colonic anastomoses. *Surg Gynecol Obstet* 1976; 143: 220-224
48. Irvin TT, Hunt TK. Effect of trauma on colonic healing. *Br J Surg* 1974; 61: 430-436.
49. Irvin TT, Hunt TK. Pathogenesis and prevention of disruption of colonic anastomoses in traumatized rats. *Br J Surg* 1974; 61: 437-439.
50. Mc Lachlin AD. Anastomotic leakage below the peritoneal reflection, a study in the dog. *Dis Colon Rectum* 1978; 21: 400-401.
51. Fazio VW. Sump suction and irrigation of the presacral space. *Dis Colon Rectum* 1978; 21: 401-405.

52. Rout WR. Closure of wound . Shackelford's Surgery of The Alimentary Tract 1996; 4: 336-352.
53. Tireli M, Uslu A, Demirçak A. Kolorektal cerrahide oral ve sistemik yolla yapılan antibiyotik profilaksisinin sonuçları, Kolon Rektum Hast Derg 1993; 3: 17-19.
54. Irvin TT, Goligher JC. Aetiology of distruption of intestinal anastomoses. Br J Surg 1973; 60: 461-464.
55. Karahasanoglu T, Altınlı E, Hamzaoglu İ. Effect of growrh hormone treatment on the healing of left colonic anastomoses in protein malnourished rats. Br J Surg 1998; 85: 931-933.
56. Atkinson JB, Kosi M, Srikanth MS, at al. Growth hormone reverses impaired wound healing in protein-malourished rats treated with corticosteroids. J Pediat Surg 1992; 27: 1026-1028 (Abstract).
57. Hawley PR, Faulk WP, Hunt TK. Collagenase activity in the gastrointestinal tract. Br J Surg 1970; 57: 896-900.
58. Goodsan WH, Hunt TK. Wound healing and the diabetic patient. Surg Gynecol Obstet 1979; 149: 600-608.
59. Verhofstad MHJ, Hendriks TH. Diabetes impairs the development of early strength, but not the accumulation of collagen, during intestinal anastomotic healing in rat. Br J Surg 1994; 81: 1040-1045
60. Hennessey PJ, Black CT, Andrassy RJ. Epidermal growth and insulin act synergistically during diabetic healing. Arc Surg 1990; 125: 926-929.
61. Chassin JL. Operative Strategy in General Surgery, Colon Resection 2th edition, New York 1980; p. 291-296.
62. Chowcat, N.,L, Savage., F.J., Hembry., R.M., Boulos., P. B., Role of Collagenase in Colonic Anastomoses A Reappraisal. Br. J. Surg., 75:330- 334, 1988.
63. Giray, S.: Preoperatif Radyoterapi Uygulanmış Sıçanlarda Kolon Anastomozuna Hiperbarik Oksijen ve Pentoksifilinin Etkileri. İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Uzmanlık Tezi 1998.
64. Jain, K.K., The History of Hyperbaric Medicine. In: Textbook of Hyperbaric Medicine, Chapt. 1, 2nd Revised Edition. Seatle, Toronto, Bern, Göttingen, Hogrefe & Huber Publishers, 3-9, 1996.
65. Kiyama, T., Onda, M., Tokunaga, A., Efron, D.T., Barbul, A., Effect of Matrix Metalloproteinase Inhibition on Colonic Anastomotic Healing in Rats. J. Gastrointest. Surg., 5:303-311, 2001.
66. Kuzu, M.A., Kuzu, J., Köksoy, C., Akyol, F.H., Uzal, B., Kale, I.T., Orhan, D., Terzi, C., Histological Evaluation of Colonic Anastomotic Healing in the Rat Following Preoperative 5-Fluorouracil, Fractionated Irradiation and Combined Treatment. Int. J. Colorectal Dis., 13: 235-240, 1998.
67. Nayci, A., Çömelekoğlu, Ü., Polat, A., Polat, G., Renda, N., Avlan, D., Taşkınlat, H., Aksöyek, S., Dexamethasone Impairs the Healing of Colonic Anastomoses: A Possible Role for Nitric Oxide (Nitric Oxide in Steroid Impaired Anastomotic Healing). Ankara Cerrahi Dergisi, 2: 40-47, 2003.

68. Öztürk, E., Normal ve İskemik Kolon Anastomozu Üzerine Hiperbarik Oksijen Tedavisinin Etkileri. GATA Askeri Tıp fakültesi Uzmanlık Tezi 2003
69. Seifert, W.F., Verhofstad, A.A.J., Wobbles, T., Lange, W., Rijken, P.F.J.W., Kogel, A.J.V.D., Hendriks, T., Quantitation of Angiogenesis in Healing Anastomoses of the Rat Colon. *Experimental and Molecular Pathology*, 64: 31-40, 1997.
70. Thornton, F.J., Barbul, A., Healing in the Gastrointestinal Tract. *Surg. Clin. North-Am.* 77: 549-573, 1997.
71. Jiborn H, Ahonen J, Zederfeldt B. Healing of experimental colonic anastomoses. The effect of suture technic on collagen concentration in the colonic wall. *Am J Surg.* 1978 Mar;135(3):333-40
72. Jiborn H, Ahonen J, Zederfeldt B. Healing of experimental colonic anastomoses. IV. Effect of suture technique on collagen metabolism in the colonic wall. *Am J Surg.* 1980 Mar;139(3):406-13.
73. Braskén P. Healing of experimental colon anastomosis. *Eur J Surg Suppl.* 1991;(566):1-51.
74. Hendriks T, Mastboom WJ. Healing of experimental intestinal anastomoses: parameters for repair. *Dis Colon Rectum* 1990;33(10): 891-901.
75. Hesp WL, Hendriks T, Schillings PH. Histological features of wound repair: a comparison between experimental ileal and colonic anastomoses. *Br J Surg.* 1985; 66(5):511-518.
76. Shandall A, Lowndes R, Young HL. Colonic anastomotic healing and oxygen tension. *Br J Surg* 1985;72:606-9.
77. Bocci V. Physical-chemical properties of ozone. Natural production of ozone. The toxicology of ozone. In: *Ozone. A new medical drug.* Dordrecht: Springer; 2005. vol Chapter 1, p. 5-8.
78. Bocci VA. Scientific and medical aspects of ozone therapy. State of the art. *Arch Med Res* 2006;37(4):425-35.
79. Re L, Mawsouf MN, Menendez S, Leon OS, Sanchez GM, Hernandez F. Ozone therapy: clinical and basic evidence of its therapeutic potential. *Arch Med Res* 2008;39(1):17-26.
80. Bocci V. How does ozone act? How and why can We avoid ozone toxicity? In: Bocci V, editor. *Ozone. A new medical drug* Dordrecht: Springer; 2005. Vol Chapter 4, p. 19-28.
81. Ajamieh HH, Menéndez S, Merino N, Martínez-sánchez G, Re L, León O. Ischemic and ozone oxidative preconditioning in the protection against hepatic ischemic-reperfusion injury. *Ozone: Science & Engineering* 2003; 25:241-50.
82. Barber E, Menéndez S, Leon OS, Barber MO, Merino N, Calunga JL, et al. Prevention of renal injury after induction of ozone tolerance in rats submitted to warm ischaemia. *Mediators of Inflammation* 1999;8:37-41.
83. Berson EL, Remulla JF, Rosner B, Sandberg MA, Weigel-DiFranco C. Evaluation of patients with retinitis pigmentosa receiving electric stimulation, 84) Little, J.B.:

Ionizing radiation. Edited by: Weichselbaum, R.R.: Cancer Medicine Section 3/Cancer etiology. London: BC Decker Inc, 207-218, 2003

85. Buchs NC, Gervaz P, Secic M, Bucher P, Mugnier-Konrad B, Morel P.: Incidence, consequences, and risk factors for anastomotic dehiscence after colorectal surgery: a prospective monocentric study, *Int J Colorectal Dis*, 23(3): 265-270, 2008
86. Doğmus M, Ersoy E, Anadol AZ, Ozel U, Bilgehan A.: Effect of calcitonin generelated peptide on anastomic healing in the presence of endotoxin, *ANZ J Surg*, 75: 1106-1110, 2005
87. Sheridan WG, Lowndes RH, Young HL. Tissue oxygen tension as a predictor of colonic anastomotic healing. *Dis Colon Rectum* 1987;30:867-71.
88. Kologlu M, Yorganci K, Renda N, Sayek I. Effect of local and remote ischemiaeperfusion injury on healing of colonic anastomoses. *Surgery* 2000;128:99-104.
89. Reimer KA, Murry CE, Yamasawa I, Hill ML, Jennings RB. Four brief periods of myocardial ischemia cause no cumulative ATP loss or necrosis. *Am J Physiol* 1986;251(6 Pt 2):H1306-15.
90. Lawson CS, Downey JM. Preconditioning: state of the art myocardial protection. *Cardiovasc Res* 1993;27(4):542-50.
91. Hawaleshka A, Jacobsohn E. Ischaemic preconditioning: mechanisms and potential clinical applications. *Can J Anaesth* 1998;45(7):670-82.
92. Hoshida S, Kuzuya T, Fuji H, Yamashita N, Oe H, Hori M, et al. Sublethal ischemia alters myocardial antioxidant activity in canine heart. *Am J Physiol* 1993;264(1 Pt 2):H33-9.
93. Roth S. Post-ischemic hyperemia in the cat retina: the effects of adenosine receptor blockade. *Curr Eye Res* 1995;14(4):323-8.
94. Larsen AK, Osborne NN. Involvement of adenosine in retinal ischemia. Studies on the rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996;37(13):2603-11.
95. Demiryürek S, Ceylan H, Demiryürek AT. Đskemik önkosullamanın klinik uygulamaları. *Genel Tıp Derg* 2004;14(1):31-4.
96. Bocci VA. Scientific and medical aspects of ozone therapy. State of the art. *Arch Med Res* 2006;37(4):425-35.
97. Re L, Mawsouf MN, Menendez S, Leon OS, Sanchez GM, Hernandez F. Ozone therapy: clinical and basic evidence of its therapeutic potential. *Arch Med Res* 2008;39(1):17-26.
98. Barber E, Menéndez S, Leon OS, Barber MO, Merino N, Calunga JL, et al. Prevention of renal injury after induction of ozone tolerance in rats submitted to warm ischaemia. *Mediators of Inflammation* 1999;8:37-41.
99. Bocci VA. Scientific and Medical Aspects of Ozone Therapy. State of the Art. *Arch Med Res* 2006; 37:425-35.
100. Dellinger RP, Levy MM, Carlet JM, Bion J, Parker MM, Jaeschke R, Reinhart K, Angus DC, Buisson CB, Beale R, Calandra T, Dhainaut JF, Gerlach H, Harveyem, Marini JJ, Marshall J, Ranieri M, Ramsay G, Sevransky J, Thompson BT, Townsend

S, Vender JS, Zimmerman JL, Vincent JL, for the International Surviving Sepsis Campaign Guidelines Committee et al. Surviving Sepsis Campaign: International guidelines for management of severe sepsis and septic shock:2008. Crit Care Med 2008; 36:296–327.

101. Jacqueline IK. Kirk-Othmer encyclopedia of chemical technology. John Wiley & Sons, 3rd ed. 1981.
102. Valacchi G, Bocci V. Studies on the biological effects of ozone: 11. Release of factors from human endothelial cells. *Mediators Inflamm*, 2000; 9(6): 271-6.
103. Viebahn-Haensler R. Ozon Oksijen Karışımlarının Tıpta Kullanımının Temel Özellik ve Gereklilikleri; Ozonun Tıpta Kullanımı. Medikal Ozon Oksijen Derneği, 2005: 53-65.
104. Viebahn-Haensler R. Ozon Oksijen Karışımlarının Tıpta Kullanımının Temel Özellik ve Gereklilikleri; Ozonun Tıpta Kullanımı. Medikal Ozon Oksijen Derneği, 2005: 102-134.
105. Halliwell B, Clement MV, Long LH. Hydrogen peroxide in the human body. *FEBS Lett*, 2000; 486: 10-13.
106. Bocci V, Aldinucci C, Bianchi L. The use of hydrogen peroxide as a medical drug. *Riv Ital Ossigeno Ozonoterapia*, 2005; 4: 30-39.
107. Zamora ZB, Borrego A, L'opez OY, Delgado R, Gonz'alez R, Men'endez S, Hern'andez F, Schulz S. Effects of Ozone Oxidative Preconditioning on TNF- α Release and Antioxidant-Prooxidant Intracellular Balance in Mice During Endotoxic Shock. *Mediators Inflamm*. 2005; 24:16–22.
108. Bocci V. Oxygen-ozone therapy: a critical evaluation. Springer, 2002.p.1–8
109. Rubin MB. The history of ozone. *Bull Hist Chem*. 2001; 26:40–56.
110. Bocci VA. Scientific and Medical Aspects of Ozone Therapy. State of the Art. *Arch Med Res* 2006; 37:425–35.
111. Bocci V, Ozone a new medical drug. published by Springer, Dordrecht, The Netherlands. 2005. 75–85..
112. Travagli V, Zanardi I, Silvietti A, Bocci V. A Physicochemical investigation on the effects of ozone on blood. *Int J Biol Macromol*. 2007; 4:1504–11.
113. Di Paolo N, Gaggiotti E, Galli F. Extracorporeal blood oxygenation and ozonation: clinical and biological implications of ozone therapy. *Redox Rep*. 2005; 10:121–30.
114. Korkmaz A, Oter S, Sadir S, Coskun O, Topal T, Ozler M, Bilgic H. Peroxynitrite may be involved in bladder damage caused by cyclophosphamide in rats. *J Urol*. 2005; 173:1793–6.
115. Young IS, Woodside JV. Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol*. 2001; 54:176–86.
116. Thannickal VJ, Fanburg BL Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2000; 279:L1005–28.

117. Bocci V, Valacchi G, Corradeschi F, Fanetti G, Studies on the biological effects of ozone: 8. Effects on the total antioxidant status and on interleukin-8 production. *Mediat Inflamm.* 1998; 7:313–7.
118. Travagli V, Zanardi I, Silvietti A, Bocci V. A physicochemical investigation on the effects of ozone on blood. *Int J Biol Macromol.* 2007; 41:504–11.
119. Bocci V. Is it true that ozone is always toxic? The end of a dogma. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2006; 216:493–504.
120. Di Paolo N, Bocci V, Gaggiotti E. Ozone therapy. *Int J Artif Organs.* 2004; 27:168–75.
121. Halliwell B, Clement MV, Long LH. Hydrogen peroxide in the human body. *FEBS Lett.* 2000; 486:10–3.
122. Bocci V, Aldinucci C, Bianchi L. The use of hydrogen peroxide as a medical drug. *Riv Ital Ossigeno Ozonoterapia.* 2005; 4:30–9.
123. Rice-Evans C, Miller NJ. Total antioxidant status in plasma and body fluids. *Methods Enzymol.* 1994; 234:279–93.
124. Bocci V, Aldinucci C, Mosci F, Carraro F, Valacchi G. Ozonation of human blood induces a remarkable upregulation of heme oxygenase-1 and heat stress protein-70. *Mediators Inflamm.* 2007; 2007:1–6.
125. LE Otterbein, MP Soares, K Yamashita, FH Bach. Heme oxygenase-1: unleashing the protective properties of heme. *Trends Immunol.* 2003; 24:449–55.
126. Bocci V, Aldinucci C. Biochemical modifications induced in human blood by oxygenation-ozonation. *J Biochem Mol Toxicol.* 2006; 20:133–8.
127. Schaur RJ. Basic aspects of the biochemical reactivity of 4-hydroxynonenal. *Mol Aspects Med.* 2003; 24:149–59.
128. Mustafa MG. Biochemical basis of ozone toxicity. *Free Radic Biol Med.* 1990; 9:245–65.
129. Pryor WA, Squadrito GL, Friedman M. The cascade mechanism to explain ozone toxicity: the role of lipid ozonation products. *Free Radic Biol Med.* 1995; 19:935–41.
130. Stübinger S, Sader R, Filippi A. The use of ozone in dentistry and maxillofacial surgery: a review. *Quintessence Int.* 2006; 37:353–9.
131. Bocci V. The case for oxygen-ozonotherapy. *Br J Biomed Sci.* 2007; 64:44–9.
132. M. Muto, G. Ambrosanio, G. Guarnieri, E. Capobianco, G. Piccolo, G. Annunziata A. Rotondo. Low back pain and sciatica: treatment with intradiscal-intraforaminal O₂-O₃ injection. Our experience. *Radiol med.* 2008; 113:695–706.
133. Rumley A.G., Paterson J.R. Analytical aspects of antioxidants and free radical activity in clinical biochemistry. *Ann Clin Biochem.* 1998; 35:181–200.
134. Uchida K. Role of reactive aldehyde in cardiovascular disease. *Free Radical Biol Med.*, 2000; 28:1685–96.
135. Holley A.E., Cheeseman K.H. Measuring free radical reactions in vivo. *Brit Med Bull.* 1993; 49:494–505.

136. Sentman M.L., Brannström T., Westerlund S., Laukkanen MO, Ylä-Herttuala S, Basu S, Marklund SL. Extracellular superoxide dismutase deficiency and atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001; 21:1477–1482.
137. Chan P.H. Role of oxidants in ischemic brain damage. *Stroke.*, 1996; 27:1121–8.
138. Kumar V, Cotran RS, Robbins SL. Temel Patoloji, Çeviri Editörü Çevikbaş U.İkinci baskı; 1995: 7-9.
139. Cummings, BJ. Adjuvant radiation therapy for colorectal cancer. *Cancer Suppl* 1992;70:1372-1383.
140. Friedman P, Garb JL, McCabe DP. Intestinal anastomosis after preoperative radiation therapy for carcinoma of the rectum. *Surg. Gynecol. Obstet.* 1987;64:257- 260.
141. Whiting JF, Howes A, Osteen RT. Preoperative radiation for unresectable carcinoma of the rectum. *Surg. Gynecol. Obstet.* 1993;176:203-207.
142. Staffan W, Hasse J, Bengt Z. Preoperative radiation and colonic healing. *Eur. J. Surg.* 1994;160:47-51.
143. Pahlmann L. Initial report from a swedish multicentre study examining the role of preoperative irradiation in the treatment of patients with resectable rectal carcinoma. *Br. J. Surg.* 1993; 80:1333-1336.
144. Khoury GA, Waxman BP. Large bowel anastomoses. The healing process and sutured anastomoses. A review. *Br J Surg* 1983;70:61-63.
145. Hall, EJ., Cox, JD. Physical and biologic of radiation therapy. In: Moss, WT., Cox, JD.,eds.Radiation Oncology:Radionale, Technique, Results.6th ed.St Louis: The C.V. Mosby Company,1998;1-57.
146. Prudy, JA., Glasgow, GP., Lightfoot, DA. Principles of radiologic physic, dosymetri, and treatment planning. In: Perez, CA., Brady, LW.,eds.Principles and practice of radiation oncology 2nd ed. Philadelphia: J.B. Lippincott Company 1992.
147. Withers, RH. Biologic basis of radiation therapy. Principles and practice of radiation oncology. Perez, C, Brady, L, ed. Lippincott Co. Philadelphia, 1992;64- 98.
148. Marx, ER., Ehler, JW., Tayapongask, P. Relationship of oxygen dose to angiogenesis induction in irradiated tissue. *Am.J.Surg.*,1990;160:519-524.
149. Nakada, T., Kutoba, Y., Sasagawa, I. Therapeutic experience of hyperbaric oxygenation in radiation colitis. Report of a case. *Dis. Colon&Rectum*, 1993;36: 962-965.
150. Picolo, EV., Shellito, CP. Surgery for radiation injury to the large intestine. *Dis. Colon&Rectum*, 1994;37:675-84.
151. Lange, E., Fechner, R., Spaulding, C. Rectal carcinoma treated by preoperative irradiation. *Am.J.Surg.*,1992;158:287-292.
152. Higgins, GA.,Conn, JH., Jordan, PH. Preoperative radiotherapy for colorectal cancer. *Ann. Surg.*,1975;181:624-630.
153. Wellwood, JM., Jackson, BT. The intestinal complications of radiotherapy. *Br. J. Surg.*, 1973;60:814-818.

154. Nguyen, NP., Antoine, JE., Dutta, S. Current concepts in radiation enteritis and implications for future clinical trials. *Cancer.*, 2002; 95(5):1151-63.
155. Mann, WJ. Surgical management of radiation enteropathy. *Surg. Clin. N. Amer.*, 1991; 71:977-990.
156. Ooi, BS., Tjandra, JJ., Green, MD. Morbidities of adjuvant chemotherapy and radiotherapy for resectable rectal cancer. An overview. *Dis. Col. Rectum.*, 1999; 42: 403-418.
157. Perez, CA, Brady, LW. Principles and Practice of Radiation Oncology. 3rd ed. Philadelphia, Lippincott-Raven publisher, 1998.
158. O'Brien, PH., Jenrette JM. Radiation enteritis. *Am. Surg.*, 1987; 53(9):501-504.
159. Yeoh, EK., Horowitz, M. Radiation enteritis. *Surg. Gynecol. Obstet.*, 1987; 165(4): 373-379.
160. Gallagher, MJ., Brereton, HD., Rostock, RA. A prospective study of treatment techniques to minimize the volume of pelvic small bowel with reduction of acute and late effects associated with pelvic irradiation. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 1986; 12(9):1565-73.
161. Haddad, GK., Grodsinsky, C., Allen, H. The spectrum of radiation enteritis. Surgical considerations. *Dis. Col. Rectum*, 1983; 26(9): 590-594.
162. Srinivasan, V., Weiss, JF. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 1992; 23:841-845.
163. Bocci V, Ozone a new medical drug. published by Springer, Dordrecht, The Netherlands. 2005. 75–85.
164. Bocci V. Ozone as Janus: this controversial gas can be either toxic or medically useful. *Mediators Inflamm.* 2004; 13:3–11.
165. Bhalla DK, Gupta SK, Reinhart PG. Alteration of epithelial integrity, alkaline phosphatase activity, and fibronectin expression in lungs of rats exposed to ozone. *J Toxicol Environ Health A.* 1999; 57: 329–43.
166. Pryor, WA. Mechanisms of radical formation from reactions of ozone with target molecules in the lung. *Free Radic Biol Med.* 1994; 17:451–65. 64
167. Souza YM, Fontes B, Martins JO, Sannomiya P, Brito GS, Younes RN, Rasslan S. Evaluation of the effects of ozone therapy in the treatment of intra-abdominal infection in rats. *Clinics.* 2010; 65:195–202.
168. Andreula CF, Simonetti L, De Santis F, Agati R, Ricci R, Leonardi M. Minimally invasive oxygen–ozone therapy for lumbar disk herniation. *AJNR Am J Neuroradiol* 2003; 24:996–1000.
169. Di Paolo N, Bocci V, Gaggiotti E. Ozone therapy. *Int J Artif Organs.* 2004; 27(3): 168-75.
170. Martínez-Sánchez G, Al-Dalain SM, Menéndez S, Re L, Giuliani A, Candelario-Jalil E, Alvarez H, Fernández-Montequín JI, León OS. Therapeutic efficacy of ozone in patients with diabetic foot. *Eur J Pharmacol.* 2005; 523(1-3): 151-61.
171. Schrock TR, Deveney CW, Dumphy JE. Factors contributing to leakage of colonic anastomoses. *Ann Surg* 1973; 177:513-8.

172. Fielding LP, Stewart-Brown S, Blesovsky L, Kearney G. Anastomotic integrity after operations for large-bowel cancer: a multicentre study. *Br Med J*. 1980 Aug 9;281(6237):411-4.
173. Bertagnolli MM, Mahmoud NN, Daly JM. Colorectal Carcinoma, Surgical Aspects of Colorectal Carcinoma. *Hematology/oncology Clinics of North America* 1997; 11:655-677
174. Ersoy YE. Sıçanlarda sol kolon anastomozunda, anastomoz iyileşmesi ve klamp hattı perfüzyonuna pentoksifilin ve papaverinin etkileri. Uzmanlık Tezi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, İstanbul, 2003
175. Güzel S. İskemik kolon modelinde anastomoz iyileşmesine hiperbarik oksijen ve pgg-glukanın etkileri. Uzmanlık Tezi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, İstanbul, 2003
176. Hallstead WS. Circular suture of the intestine-An experimental study. *Am J Med Sci* 1887; 94:436-461
177. İpek T. Yara iyileşmesi. Ed: S Aydın, T Akça, T Çolak. *Cerrahi Hastalarda Tanı ve Fizik Muayene*. Nobel Kitabevi, Adana, 2008; 451-457
178. Kahya AS. Kolon obstüksiyonu nedeniyle uygulanan rezeksiyon sonrası, düşük molekül ağırlıklı heparin, papaverin ve pentoksifilin anastomoz iyileşmesi üzerine etkileri. Uzmanlık Tezi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, İstanbul, 2001
179. Kanellos I, Mantzoros I, Demetriades H, et al. Sutureless colonic anastomosis in the rat: a randomized controlled study. *Tech Coloproctol* 2002; 6:143-146
180. Verhofstad MH, Bisseling TM, Haans EM, et al. Collagen synthesis in rat skin and ileum fibroblasts is affected differently by diabetes-related factors. *Int J Exp Pathol* 1998; 79:321-328
181. Witte MB, Barbul A. Repair of full-thickness bowel injury. *Crit Care Med* 2003; 31:538-546
182. Jibom H, Abonen J, Zederfeldt R. Healing of experimental colonic anastomoses. Collagen metabolism in the colon after left colon resection. *Am J Surg* 1980; 139: 398-405.
183. Madden JW, Peacock EE. Studies on the biology of collagen during wound healing. Role of collagen synthesis and deposition in cutaneous wounds of the rat. *Surgery* 1968; 64: 288-294.
184. Croinin K, Jackson DS, Dunphy JE. Specific activity of hydroxyproline tritium in the healing colon. *Surg Gyn Obst* 1968; 1260:1061 -1065.
185. Zuidewijn R, Schillings PHM, Wobbes T, Boer HHM.: histologic evaluation of wound healing in experimental intestinal anastomoses: effects of antineoplastic agents, *Int J Pathol*, 73: 465-484, 1992.
186. Ajamieh HH, Menéndez S, Merino N, Martínez-sánchez G, Re L, León O. Ischemic and ozone oxidative preconditioning in the protection against hepatic ischemic-reperfusion injury. *Ozone: Science & Engineering* 2003;25:241-50.
187. Barber E, Menéndez S, Leon OS, Barber MO, Merino N, Calunga JL, et al. Prevention of renal injury after induction of ozone tolerance in rats submitted to warm ischaemia. *Mediators of Inflammation* 1999;8:37-41.

188. Stadlbauer TH, Eisele A, Heidt MC, Tillmanns HH, Schulz S. Preconditioning with ozone abrogates acute rejection and prolongs cardiac allograft survival in rats. *Transplant Proc* 2008;40(4):974-7.
189. Borrego A, Zamora ZB, Gonzalez R, Romay C, Menendez S, Hernandez F, et al. Protection by ozone preconditioning is mediated by the antioxidant system in cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Mediators Inflamm* 2004;13(1):13-9.
190. Ajamieh HH, Menéndez S, Martínez-Sánchez G, Candelario-Jalil E, Re L, Giuliani A, et al. Effects of ozone oxidative preconditioning on nitric oxide generation and cellular redox balance in a rat model of hepatic ischaemiareperfusion. *Liver Int.* 2004 Feb;24(1):55-62.
191. Peralta C, Leon OS, Xaus C, Prats N, Jalil EC, Planell ES, et al. Protective effect of ozone treatment on the injury associated with hepatic ischemiareperfusion: antioxidant-prooxidant balance. *Free Radic Res* 1999;31(3):191- 196.
192. 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.
193. Re L, Mawsouf MN, Menendez S, Leon OS, Sanchez GM, Hernandez F. Ozone therapy: Clinical and basic evidence of it's therapeutic potential. *Arch Med Res* 2008; 39: 17-26.
194. Bocci V. Does ozone therapy normalize the cellular redox balance? Implications for therapy of human immunodeficiency virus infection and several other diseases. *Med Hypotheses* 1996; 46:150-154.
195. 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.
196. 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.
197. Blake DP, Bubrick MP, Kochsiek GG. Low anterior anastomotic dehiscence following preoperative irradiation with 6000 rads. *Dis colon and rectum*,1984;27: 176.
198. Stevens KR, Fletcher WS, Allen CV. Anterior resection and primary anastosis following high dose preoperative irradiation for adenocarcinoma of the rectosigmoid cancer.1978,41:2065-71.
199. Pleskovic A, Zorc-Pleskovic R, Vraspir-Porenta O.Colon mucosal cells after combined radiotherapy and chemotherapy. *Folia Biol(praha)*,2001;47:156-162.
200. Winsey K, Simon RJ, Levenson S. Effect of supplemental vit-A on colon anastomotic healing in rats given preoperative irradiation. *Am J Surg*,1987;153.
201. Anderson CR, McNiel EA, Gilette EL. Late complications of pelvic irradiation in 16 dogs. *Vet Radiol Ultrasound*.2002; 43:187-192.
202. Jamall IS, Finelli UN, Que Hee SS. A simple method to determine nanogram levels of 4-hydroxyproline in biological tissues. *Anal Biochem.* 1981;112:70-75.

- 203.** Yi-Sun, S., Oberley, L.W. Li , Y.: A Simple Method for Clinical Assay of Superoxide Dismutase, Clin. Chem., 34 (13) , 497-500 . (1988)
- 204.** Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. J Biol Biochem 193: 145-157
- 205.** Houdart R, Lavergne A, Galian A, Hautefeuille P. Evolution anatomopathologique des anastomoses digestives bord a bord en un plan. Etude de 210 anastomoses coliques chez le rat de 2e and 180e jour. Gastroenterol Clin Biol 1983;7:465–73.
- 206.** M. A. Kuzu, J. Kuzu, C. Köksoy, F. H. Aksoy, D. Uzal Histological evaluation of colonic anastomotic healing in the rat following preoperative 5-fluorouracil, fractionated irradiation, and combined treatment. Int j colorect Dis (1998) 13:235-240

EK AÇIKLAMALAR

EK1: Etik Kurul Onayı



**T.C.
Zonguldak Karaelmas Üniversitesi
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu**

TOPLANTI TARİHİ : 23/12/2010
TOPLANTI NO : 2010/11

- 2- Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı Başkanlığı'nın, 2010-34-23/12 Protokol nolu "Ozonla Ön Koşullamanın Preoperatif Radyoterapi Alan Ratlarda Kolon Anastomozu İyileşmesi Üzerine Etkisi" konulu çalışmasının Hastane Radyasyon Kurulu'ndan izin alındıktan sonra onay verilmesine,

Oy birliği ile karar verildi.

ASLI GİBİDİR

Prof. Dr. Z. Nur BANOĞLU
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanı