

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FARMAKOLOJİ (ECZ) ANABİLİM DALI

**SIÇANLARDA ENDOTOKSİN İLE
OLUŞTURULAN ŞOK MODELİNDE
OZON TEDAVİSİNİN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ecz. Elif Derya ÖZDEMİR

Tez Danışmanı
Doç. Dr. M. Orhan ULUDAĞ

ANKARA

Temmuz 2013

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FARMAKOLOJİ (ECZ) ANABİLİM DALI

**SIÇANLARDA ENDOTOKSİN İLE
OLUŞTURULAN ŞOK MODELİNDE
OZON TEDAVİSİNİN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ecz. Elif Derya ÖZDEMİR

Tez Danışmanı
Doç. Dr. M. Orhan ULUDAĞ

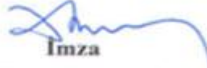
Bu tez Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından 02/2011-24 ve 02/2011-29 kodlu proje numaraları ile desteklenmiştir.

ANKARA
Temmuz 2013

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Farmakoloji (Ecz) Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans Programı
çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından
Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 23/07/2013



İmza

Prof Dr. Nurettin ABACIOĞLU
Gazi Üniversitesi
Jüri Başkanı



İmza

Doç. Dr. M. Orhan ULUDAĞ
Gazi Üniversitesi



İmza

Prof. Dr. Emine DEMİREL YILMAZ
Ankara Üniversitesi

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	i
İçindekiler	ii
Şekiller ve Resimler Dizini	v
Tablolar Dizini	vii
Kısaltmalar	viii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Sepsis ve Septik Şok	4
2.1.1. Sepsis ve Sepsisle İlişkili Tanımlar	4
2.1.2. Sepsis Epidemiyolojisi	9
2.1.3. Sepsis Etiyolojisi	10
2.1.4. Sepsis Patofizyolojisi	10
2.1.4.1. Lipopolisakkarit	11
2.1.4.2. Konakçı Tarafından Lipopolisakkaritin Tanınması	12
2.1.4.3. Sinyal Amplifikasyonu	13
2.1.5. Sepsisin Tedavisi	18
2.2. Deneysel Endotoksik Şok Modeli	21
2.3. Sistemik İnflamasyonda Rol Alan Biyokimyasal	
Parametreler	22
2.3.1. Nitrik Oksit	22
2.3.2. Asimetrik Dimetil Arjinin	25
2.3.3. Total Antioksidan Kapasite	27
2.4. Ozon	29
2.4.1. Ozon Gazının Özellikleri	29
2.4.2. Ozon Tedavisinin Tarihçesi	30
2.4.3. Ozon Gazının Biyolojik Ortamlardaki Davranışı	32
2.5. Tıbbi Ozon ve Tedavide Kullanımı	35
2.5.1. Sistemik Uygulama Biçimleri	37
2.5.1.1. Major Otohemoterapi (AHT; Autohaemotherapy)	37

2.5.1.2. Minör Otohemoterapi	39
2.5.1.3. Ozon-Oksijen Karışımının Rektal İnsüflasyonu (Sistemik Etki)	39
2.5.2. Lokal Uygulama Biçimleri	40
2.5.2.1. Düşük Basıncılı Ozon Gazı İrrigasyonu	40
2.5.2.2. Transkütanöz Ozon İrrigasyonu/İmersiyonu	41
2.5.2.3. Ozon-Oksijen Karışımının Rektal İnsüflasyonu (Lokal Etki)	41
2.5.2.4. İntraartiküler (Eklem İçi) Ozon Enjeksiyonu	41
2.5.2.5. Ozonlanmış Su Uygulaması	42
2.5.2.6. Ozonlanmış Zeytinyağı Uygulaması	42
2.5.3. Ozonun Lokal ve Sistemik Etki Mekanizmaları	43
2.5.4. Ozon Tedavisinin Uygulandığı Çeşitli Hastalıklar	45
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	47
3.1. Gereçler	47
3.1.1. Deney Hayvanları	47
3.1.2. Sarf Malzemesi	47
3.1.3. Araç ve Teçhizat	48
3.2. Deney Grupları ve <i>In Vivo</i> Çalışmalar	49
3.3. Serum Örneklerinin Hazırlanması ve Biyokimyasal Ölçümlerin Yapılması	50
3.3.1. Plazma Nitrik Oksit Düzeylerinin Ölçümü	51
3.3.2. Plazma Asimetrik Dimetil Arjinin Düzeylerinin Ölçümü	51
3.3.3. Plazma Total Antioksidan Kapasitesi Ölçümü	51
3.4. Sonuçların Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analiz	51
4. BULGULAR	53
4.1. Deney Gruplarındaki Sıçanlarda Ölçülen Sistolik Kan Basıncı (SKB) ve Kalp Hızı (KH) Değerleri	53
4.1.1. Kontrol Grubunun SKB ve KH Sonuçları	53
4.1.2. LPS Grubunun SKB ve KH Sonuçları	53
4.1.3. Tedavi-1 (0.1 mg/kg Ozon) Grubunun SKB ve KH Sonuçları	53

4.1.4. Tedavi-2 (0.3 mg/kg Ozon) Grubunun SKB ve KH Sonuçları ..	57
4.1.5. Tedavi-3 (1 mg/kg Ozon) Grubunun SKB ve KH Sonuçları	57
4.1.6. Ozon (1 mg/kg Ozon) Grubunun SKB ve KH Sonuçları	57
4.2. Deney Gruplarındaki Sıçanların Plazmalarında Ölçülen	
Biyokimyasal Parametreler	61
4.2.1. Plazma Nitrik Oksit Düzeyleri	61
4.2.2. Plazma Asimetrik Dimetil Arjinin Düzeyleri	62
4.2.3. Plazma Total Antioksidan Kapasitesi	63
5. TARTIŞMA	64
6. SONUÇ	69
7. ÖZET	70
8. SUMMARY	72
9. KAYNAKLAR	74
10. EKLER	94
10.1. Deney Hayvanı Kullanım Sertifikası	94
10.2. Etik Kurul Onayı	95
10.3. Teşekkür	96
11. ÖZGEÇMİŞ	98

ŞEKİLLER ve RESİMLER DİZİNİ

Şekil 1. Lipopolisakkaritin yapısı	12
Şekil 2. TLR4 reseptörü tarafından LPS'nin tanınması meydana gelen hücre altı olaylar	15
Şekil 3. Sepsis sonucu prokoagülan ve antikoagülan sistem arasındaki dengenin bozulması	16
Şekil 4. Organ yetmezliğinde rol alan eşzamanlı olaylar	17
Şekil 5. Sepsiste lipopolisakkaritin nitrik oksit aracılı etkileri	24
Şekil 6. Sepsisin patofizyolojisinde nitrik oksit ve ADMA'nın rolü	27
Şekil 7. Ozonun izole çifte bağlarla reaksiyonu	33
Şekil 8. Ozonun doymamış yağ asitleriyle reaksiyonu	33
Şekil 9. Standart majör otohemoterapi sistemi	37
Şekil 10. Ozonlanmış kanın hastaya uygulanması sonrasında vücutta dağılımı	38
Şekil 11. O ₂ -O ₃ karışımının kolon lümeninden submukozal dokuya transferinin şematik görüntüsü	40
Şekil 12. Ozonun eritrosit metabolizması üzerine etkileri	44
Şekil 13. Kontrol grubunda ölçülen sistolik kan basıncı (SKB) ve kalp hızı (KH) değerleri Kontrol grubunda ölçülen sistolik kan basıncı (SKB) ve kalp hızı (KH) değerleri	54
Şekil 14. Sıçanlarda LPS ile oluşturulan endotoksemik şok modelinde sistolik kan basıncı (SKB) ve kalp hızı (KH) değerleri	55

Şekil 15. Sıçanlarda LPS ile oluşturulan endotoksemik şok modelinde 0.1mg/kg ozon uygulamasının (Tedavi-1) sistolik kan basıncı (SKB) ve kalp hızı (KH) üzerine etkileri	56
Şekil 16. Sıçanlarda LPS ile oluşturulan endotoksemik şok modelinde 0.3mg/kg ozon uygulamasının (Tedavi-2) sistolik kan basıncı (SKB) ve kalp hızı (KH) üzerine etkileri	58
Şekil 17. Sıçanlarda LPS ile oluşturulan endotoksemik şok modelinde 1.0mg/kg ozon uygulamasının (Tedavi-3) sistolik kan basıncı (SKB) ve kalp hızı (KH) üzerine etkileri	59
Şekil 18. Tek başına ozon uygulamasının sistolik kan basıncı (SKB) ve kalp hızı (KH) üzerine etkisi	60
Şekil 19. Sıçanlarda LPS ile oluşturulan endotoksemik şok modelinde farklı dozlarda ozon tedavisi sonucunda elde edilen plazma NO değerleri	61
Şekil 20. Sıçanlarda LPS ile oluşturulan endotoksemik şok modelinde farklı dozlarda ozon tedavisi sonucunda elde edilen plazma ADMA değerleri	62
Şekil 21. Sıçanlarda LPS ile oluşturulan endotoksemik şok modelinde farklı dozlarda ozon tedavisi sonucunda elde edilen plazma TAK değerleri	63
Resim 1. Medikal ozon cihazı	48

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1. Sepsisle ilişkili tanımlar	6
Tablo 2. Sepsiste Tanı Kriterleri	7
Tablo 3. Nitrik oksitin sepsiste potansiyel etkileri	25
Tablo 4. Ozon tedavisinde önemli gelişmeler	31
Tablo 5. Ozon gazının uygulama yolları	36
Tablo 6. Lokal ve sistemik uygulamada ozonun tıbbi etkileri	43
Tablo 7. Ozonun kullanıldığı çeşitli hastalıklar ve uygulama şekilleri	45

KISALTMALAR

ACCP	: <i>American Collage of Chest Physicians</i>
ADMA	: Asimetrik Dimetil Arjinin
APC	: Aktive Protein C
AT	: Antitrombin
ATS	: <i>American Thoracic Society</i>
CAT	: Katalaz
CD14	: <i>Cluster of Differentiation 14</i>
CuSO₄	: Bakır sülfat
DAMP	: <i>Damage-associated molecular pattern</i> (Hasar-ilişkili moleküler motif)
DDAH	: Dimetil Arjinin Dimetil Amino Hidrolaz
ESICM	: <i>Europen Society of Intensive Care Medicine</i>
FIO₂	: <i>Fraction of inspirerd oxygen</i> (İnspiratuvar oksijen fraksiyonu)
GSH	: Glutatyon
GSH-Px	: GSH-peroksidaz
GSH-Rd	: GSH-redüktaz
GSH-Tr	: GSH-transferaz
GSSG	: İndirgenmiş glutatyon
H₂O₂	: Hidrojen Peroksit
HMGB-1	: <i>High-Mobility Group Box-1</i>
HOCl	: Hipoklorik Asit
HSP	: <i>Heat-shock protein</i> (Isı şok proteini)
IFN-α ve β	: İnterferon-α ve β
IL-1	: İnterlökin-1
IL-1R	: İnterlökin-1 reseptörü
KH	: Kalp Hızı
LPS	: Lipopolisakkarit
LBP	: LPS bağlayıcı protein
MD-2	: Myeloid farklılaşma faktörü 2
MDA	: Malondialdehit

MODS	: <i>Multiple Organ Dysfunction Syndrome</i> (Çoklu organ yetmezliği sendromu)
NMA	: N-monometilarjinin
NO	: Nitrik oksit
NOS	: Nitrik Oksit Sentaz
O₃	: Ozon
PaCO₂	: Parsiyel karbondioksit basıncı
PAF	: Platelet aktive edici faktör
PAI-1	: <i>Plasminogen-Activator Inhibitor Type-1</i>
PAMP	: <i>Pathogen-associated molecular pattern</i> (Patojen-ilişkili moleküler motif)
PaO₂	: Parsiyel oksijen basıncı SCCP: <i>Society of Critical Care Medicine</i>
PRMT-I	: Protein Arjinin Metil Transferaz-I
PRR	: <i>Pattern Recognition Receptor</i> (Motif tanıyıcı reseptör)
PUFA	: Polyunsaturated Fatty Acids (Çoklu doymamış yağ asitleri)
RNT	: Reaktif Nitrojen Türleri
ROT	: Reaktif Oksijen Türleri
SIRS	: <i>Systemic Inflammatory Response Syndrome</i> (Sistemik İnflamatuvar Yanıt Sendromu)
SIS	: <i>Surgical Infection Society</i>
SKB	: Sistolik Kan Basıncı
SOD	: Süperoksit Dismutaz
SSC	: <i>Surviving Sepsis Campaign</i>
TAK	: Total Antioksidan Kapasite
TFPI	: <i>Tissue Factor Pathway Inhibitor</i>
TGF-β	: Tümör büyüme faktörü
TLR	: <i>Toll-like</i> reseptör
TNF-α	: Tümör Nekroz Faktörü- α
ZnSO₄	: Çinko sülfat
2,3-DPG	: 2,3-difosfoglisarat
4-HHE	: trans-4-hidroksinonenal
4-HNE	: 4-hidroksi-2-nonenal

1. GİRİŞ

Sepsis en genel tanımıyla bakteri, mantar, virüs veya protozoalar ile oluşan şiddetli enfeksiyona karşı vücutta gelişen sistemik cevap (hastalık)'tır. Sepsise organ fonksiyon bozukluğu, hipoperfüzyon veya hipotansiyon eşlik ediyorsa şiddetli sepsis; hipotansiyon, sıvı takviyesine dirençli ise septik şok olarak adlandırılır¹.

Normal koşullarda, vücutta enfeksiyon etkenin ortadan kaldırılması sırasında ortaya çıkan (endotoksin) veya enfeksiyona neden olan patojen tarafından salıverilen toksinler (ekzotoksin) dolaşıma yayıldığında çeşitli motif tanıyıcı reseptörler tarafından tanınarak bağışıklık sistemini harekete geçirir ve çoğu zaman inflamasyonla alakalı klinik bir belirti vermeden enfeksiyon kaynağını ortadan kaldırır. Bunun nedeni zararlı etkenin ortadan kaldırılmasının ardından antiinflamatuvar mekanizmaların devreye girmesidir^{2,3}.

Şiddetli enfeksiyon durumunda ise bağışıklık sisteminin aşırı uyarılması sonucu "sitokin fırtınası" olarak da adlandırılan aşırı ve kontrolsüz sitokin salıverilmesi durumu ortaya çıkar. Böylece vücut yaygın bir şekilde uyarılır ve metabolik dengenin bozulması sonucu oksidatif stres; koagülasyon yollarının uyarılması sonucu mikrovasküler tıkanıklıklar; oksidatif stres, hipoperfüzyon ve iskeminin ortak sonucu olarak doku ve organ hasarları meydana gelir. Yeterli müdahale yapılamadığında süreç çoklu organ yetmezliği, şok ve ölümle sonuçlanır^{2,4}.

Geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı, immünosüpresif tedaviler (kanser kemoterapisi, radyasyon tedavisi, transplantasyon reddini engelleyen ilaç kullanımı), yanıklar veya diğer travmalar, intestinal yaralar, invazif cihazlar veya girişimler, drenaj tüpleri, artmış yaş (>65),

gen polimorfizmi, ko-morbiditeler (diyabet, konjestif kalp yetmezliği gibi kronik hastalıklar, siroz, böbrek yetmezliği gibi çeşitli organ fonksiyon bozukluklarının varlığı) sepsiste risk faktörlerini oluşturmaktadır⁵⁻¹¹.

Sepsis ve septik şok birçok mikroorganizmadan kaynaklanabilir. En yaygın saptanan patojenler gram-pozitif ve gram-negatif bakteriler ile mantarlar, daha az sıklıkla ise riketsiya ve virüslerdir⁴. Canlı mikroorganizmanın yanısıra mikroorganizmaya ait toksik hücre bileşenleri veya ekzotoksinler de sepsiste rol alan çeşitli mekanizmaları uyaramaktadır¹²⁻¹⁴.

Erken teşhis ve tedavi, şiddetli sepsis ve septik şoka bağlı mortalitenin azalmasında oldukça önemlidir¹⁵. Mortaliteyi artıran faktörler arasında akut organ yetmezlikleri, düşük arteriyel kan pH'sı (<7.33), şok, altta yatan diğer hastalıklar, hipotermi, trombositopeni, çoklu enfeksiyon kaynağı sayılabilir¹⁶. Steril inflamasyonda da benzer belirtiler görülmesi nedeniyle gereksiz antibiyotik kullanımından kaçınmak için tedavi devam ederken diğer yandan enfeksiyonun varlığının saptanması gerekmektedir¹⁷.

Günümüzde sepsis ve septik şok tedavisinde pek çok yeni uygulamalar bulunmasına karşın hala septik şok mortalitesi yüksek seviyelerdedir ve alternatif tedavi arayışları sürmektedir. Ozon tedavisinin septik şokta alternatif olabileceğine dair sadece birkaç çalışma bulunmaktadır.

Ozon tedavisi üzerine yapılan temel çalışmalar sayesinde, çok çeşitli ve karmaşık olan tedavi yöntemleri gözden geçirilmiş ve düşük riskli yöntemler geliştirilmiştir. Ozonun etki mekanizmalarının da anlaşılmasıyla gerçek bir tedavi yöntemi olduğunu kanıtlamış, geleneksel

tedavi ile tamamlayıcı yöntemler arasındaki etkileşimde önemli bir role sahip olmuştur. Oksijen/ozon (O_2/O_3) gaz karışımının hastadan alınan kanla karıştırılıp tekrar aynı hastaya uygulanması veya basınç altında infüzyonu sıklıkla ve güvenle kullanılan uygulama şekilleri olarak tedavide yerini almıştır¹⁸. Günümüzde ozon tedavisi özellikle diyabetik anjiyopati, diyabetik ayak, kronik hepatit ve kronik intestinal hastalıklarda iyi ve tekrarlanabilir sonuçlar vermektedir¹⁹.

Bu çalışmada sıçanlarda *Escherchia Coli* endotoksini kullanılarak endotoksik şok modeli oluşturulmuştur. Ardından sıçanlara antimikrobiyal, doku perfüzyonunu artırıcı, biyolojik antioksidanları aktive edici etkisi bilinen ozonun üç farklı dozu (0.1, 0.3, 1.0 mg/kg) uygulanmış ve bozulmuş olan fizyolojik ve biyokimyasal parametreleri düzenleyici etkisi olup olmadığı araştırılmıştır. Bu amaçla kan basıncı, kalp hızı, plazma nitrik oksit ve asimetrik dimetil arjinin düzeyleri ile plazma total antioksidan kapasitesi ölçülmüş ve kontrol grubu verileriyle karşılaştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Sepsis ve Septik Şok

Enfeksiyona karşı gelişen, sistemik inflamasyon belirtilerinden (artmış veya azalmış vücut sıcaklığı, artmış veya azalmış lökosit sayısı, taşikardi, hızlı solunum) iki veya daha fazlasını içeren, sıvı takviyesine karşı dirençli hipotansiyonla karakterize klinik bir durumdur²⁰.

2.1.1 Sepsis ve Sepsisle İlişkili Tanımlar

Sepsis terimi Yunanca “çürütmek” anlamına gelen *sepsin*’den türemiştir. Hastalıkla ilgili ilk tanımlar M.Ö 2. yüzyılda “küçük görünmez yaratıklar” olarak yapılmış, bulaşıcılık kavramı ortaya konulmuş ve hasta insanlar izole edilmeye çalışılmıştır. Pan-epidemik enfeksiyonlardan korunma çabalarına rağmen bu hastalık tarih boyunca milyonlarca insanın ölümüne neden olmuştur. Canlı bakterilerle ilgili ilk belgelenmiş gözlemler Leeuwenhoek tarafından 1674’de, bakterilerin morfolojik sınıflandırılması ise 19. yüzyılın başında yapılmıştır. Ancak bu dönemlere kadar enfeksiyon hastalıkları ile sepsis etiyolojisi ve patogenezi arasındaki bağlantı hala belirsizliğini korumaktaydı²¹.

1863 yılında Pasteur tarafından çürüme olayından mikroorganizmaların sorumlu olduğunu ortaya çıkarması²², 1892 yılında Pfeiffer tarafından “*endotoksin*” kavramının ortaya atılmasının ardından bu alandaki gelişmeler hızlanmıştır²³. Yirminci yüzyılın başında sifilizi tedavi etmek amacıyla anti-metabolit ilaçların kullanılması, sülfonamid antibiyotikler ve aşılamanın keşfi enfeksiyonların tedavisi ve enfeksiyondan korunma konusunda devrim niteliğinde gelişmeler

olmuştur. Bu keşifler sonucu sepsisin eradike edildiği düşünülse de hastalık modellerinin değişimi ve antibiyotik direnci nedeniyle sepsis, tıbbi uygulamaların birçok alanında zorlu bir sorun olmaya devam etmiştir²¹.

1991 yılında, ACCP (American Collage of Chest Physicians) ve SCCP (Society of Critical Care Medicine)'nin girişimleriyle sepsis ve devamında meydana gelen olaylarla ilgili tanımlar belirlenmiştir. Bu tanımlamaların amacı; kavram kargaşasını gidermek, hastalığın tanısını erkenden koyarak bir an evvel terapötik müdahalelerde bulunmak, araştırma protokollerini mümkün olduğunca standardize etmek ve klinik çalışmalardan elde edilen bilgilerin sınıflandırılmasını ve uygulanmasını kolaylaştırmaktır^{1,20}. Sepsisle ilişkili durumların tanımları tablo 1'de verilmiştir.

2001 yılında SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS tarafından düzenlenen konferansta, enfeksiyona karşı gelişen klinik cevabın daha iyi tanımlanması amacıyla sepsiste görülen belirti ve semptomların listesi genişletilmiştir^{1,24}. Sepsiste görülen semptomların genişletilmiş şekli tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 1. Sepsisle ilişkili tanımlar²⁰. PaCO₂, Parsiyel karbondioksit basıncı

Bakteriyemi:

Kanda canlı bakterilerin bulunması.

SIRS (Systemic Inflammatory Response Syndrome): Sistemik inflamatuvar yanıt sendromu.

Çeşitli şiddetli travmalara karşı gelişen sistemik inflamatuvar cevap.

Bu cevap aşağıda belirtilen kriterlerden iki veya daha fazlasıyla karakterizedir.

- Vücut sıcaklığının 38°C'den yüksek veya 36°C'den düşük olması.
- Kalp hızının dakikada 90 atımdan fazla olması.
- Solunum hızının dakikada 20 nefesten fazla olması veya PaCO₂'nin 32 mmHg'dan düşük olması.
- Beyaz kan hücresi sayısının 12.000 hücre/μL'den fazla veya 4.000 hücre/μL'den az olması veya %10< olgunlaşmamış nötrofil varlığı.

Bu fizyolojik değişikliklerin kemoterapi kaynaklı nötropeni ve lökopeni gibi durumlar dışında, akut olarak ortaya çıkması gereklidir.

Sepsis:

Enfeksiyon varlığında oluşan SIRS.

Şiddetli Sepsis:

Organ fonksiyon bozukluğu, hipoperfüzyon veya hipotansiyonu da içeren sepsis tablosu. Hipoperfüzyon ve perfüzyon bozuklukları her zaman olmamakla birlikte laktik asidoz, oligüri veya mental durumda akut değişimleri içerebilir.

Septik Şok:

Uygun sıvı takviyesine rağmen oluşan ve perfüzyon bozukluklarına neden olan sepsis kaynaklı hipotansiyon (sistolik kan basıncının <90 mmHg olması veya ≥40 mmHg'den daha fazla düşmesi). Perfüzyon bozuklukları her zaman olmamakla birlikte laktik asidoz, oligüri veya mental durumda akut değişimleri içerebilir. İnotropik veya vazopressör ilaç kullanan hastalarda perfüzyon bozukluğu ölçüldüğünde hipotansiyon görülmeyebilir.

MODS (Multiple Organ Dysfunction Syndrome): Çoklu organ yetmezliği sendromu.

Birden fazla organ fonksiyonunun akut olarak bozulması ve müdahale olmadan homeostazın sağlanamaması durumu.

Tablo 2. Sepsiste Tanı Kriterleri²⁴.

Enfeksiyon^a

Saptanmış veya şüphelenilen ve aşağıdakilerden bazıları^b

Genel Parametreler:

- Ateş (vücut sıcaklığı $>38.3^{\circ}\text{C}$) veya hipotermi (vücut sıcaklığı $<36^{\circ}\text{C}$)
- Kalp hızı > 90 atım/dk veya yaşa bağlı normal değer $>2\text{SD}$ üstü
- Taşipne (>30 nefes/dk)
- Değişmiş mental durum
- Belirgin ödem veya pozitif sıvı dengesi (24 saatten fazla >20 ml/kg)
- Diyabet yokluğunda hiperglisemi (plazma glukoz düzeyi $>110\text{mg/dL}$ veya 7.7 mM/L)

İnflamatuvar Parametreler:

- Lökositoz (beyaz kan hücresi sayısı $>12.000/\mu\text{L}$) veya lökopeni (beyaz kan hücresi sayısı $<4.000/\mu\text{L}$)
- Beyaz kan hücresi sayısı normal fakat $>\%10$ olgunlaşmamış formda
- Plazma C reaktif protein düzeyi normal değer >2 SD üstünde
- Plazma prokalsitonin düzeyi normal değer >2 SD üstünde

Hemodinamik Parametreler:

- Arteriyel hipotansiyon^b (sistolik kan basıncı <90 mmHg, ortalama arteriyel basınç <70 veya yetişkinlerde sistolik kan basıncının >40 mmHg azalması veya yaşa göre normal değer <2 SD altı)
- Karışık venöz oksijen satürasyonu $>\%70^b$
- Kalp indeksi $3.51/\text{min}/\text{m}^2$ c,d
- Organ fonksiyon bozukluğu parametreleri
- Arteriyel hipoksemi ($\text{PaO}_2/\text{FIO}_2 < 300$)
- Akut oligüri (idrar çıkışı <0.5 ml/kg//saat veya 45mM/L en az 24 saat)
- Kreatinin klerensi ≥ 0.5 mg/dL)
- Koagülasyon anormallikleri ($\text{INR} > 1.5$ veya $\text{aPTT} > 60\text{s}$)
- İleus (bağırsak sesi yokluğunda)
- Trombositopeni (platelet sayısı $<100,000/\mu\text{L}$)
- Hiperbilirubinemi (plazma total bilirubin >4 mg/dL veya 70 mmol/L)

Doku Perfüzyon Parametreleri:

- Hiperlaktemi ($> 3\text{mmol/L}$)
- Azalmış kapiller dolum veya beneklenme

- ^a Mikroorganizma tarafından indüklenen patolojik süreç olarak tanımlanmıştır.
- ^b Çocuklarda %70'in üstündeki değerler normaldir (normal değer %75-80) ve bu nedenle yenidoğan ve çocuklarda sepsis belirtisi olarak değerlendirilmemelidir.
- ^c Çocuklarda 3.5-5.5 arası değerler normal ve bu nedenle yenidoğan ve çocuklarda sepsis belirtisi olarak değerlendirilmemelidir.
- ^d Pediatrik popülasyonda sepsis için tanı kriterleri; hiper- veya hipotermi (rektal sıcaklık $>38.5^{\circ}\text{C}$ veya $<35^{\circ}\text{C}$), taşikardi (hipotermik hastalarda görülmeyebilir) ve değişmiş organ fonksiyonu belirtilerinden en az biri - değişmiş mental durum, hipoksemi, serum laktat seviyesi artışı ve sıçrayıcı nabız- ile birlikte inflamasyon ve enfeksiyon belirti ve semptomlarıdır.

SD: Standart Sapma (*Standart Deviation*); PaO_2 : Parsiyel oksijen basıncı; FIO_2 : İnspiratuvar oksijen fraksiyonu (*Fraction of inspired oxygen*)

Lipopolisakkarit (LPS) gram-negatif bakterilerin hücre duvarının ana bileşenidir ve konakçı organizmada meydana gelen gram-negatif bakteri kaynaklı cevabın oluşmasında çok önemli bir role sahiptir²⁵. Bakterinin yapısında bulunan bir toksin olması nedeniyle “*endotoksin*” olarak adlandırılmıştır ve günümüzde endotoksin ile LPS aynı anlamda kullanılmaktadır. LPS'nin deney hayvanları ve insanlar üzerindeki etkileri bakterinin canlı veya ölü olmasından bağımsızdır²⁶. Diğer bir deyişle LPS'nin kan dolaşımına enjeksiyonu sepsisle oldukça benzer patofizyolojik değişikliklere neden olmaktadır²⁷⁻³¹.

Bakteriden izole edilmiş olan LPS'nin organizmanın kan dolaşımına verilmesiyle oluşan şok, canlı bakteri varlığı söz konusu olmadığından “*endotoksik şok*” olarak tanımlanmaktadır.

2.1.2 Sepsis Epidemiyolojisi

2006 verilerine göre sepsis Amerika'da ölüme en sık neden olan 15 durum içerisinde onuncu sıradadır. Ayrıca sepsis kaynaklı ölüm, toplam ölümlerin %1.4'ünü oluşturmaktadır³².

Angus ve arkadaşları tarafından Amerika'nın yedi eyaletinde yapılan çalışmada altı milyondan fazla hastanın hastane kayıtları incelenmiştir. Çalışmaya göre; Amerika'da yılda 751.000 şiddetli sepsis vakası (% 0.3) meydana geldiği bulunmuştur ve şiddetli sepsis vakalarının mortalite oranı %28.6 olarak tespit edilmiştir. Vaka başına ortalama maliyet 22,100 dolar, toplam maliyet ise yıllık 16.7 milyar dolar olarak hesaplanmıştır. 85 yaş üstü hastalarda, çocuklara göre insidans yaklaşık 100 kat; mortalite oranı ise yaklaşık 4 kat fazla olarak gözlenmiştir³³.

Martin ve arkadaşlarının 750 milyon hasta üzerinde yaptığı çalışmaya göre; 1979-2000 arasındaki yirmi iki yıllık süreçte Amerika'da sepsisin görülme sıklığı her 100.000 kişide 82.7'den 240.4'e artmıştır. Mortalite oranı 1979-1984 arasındaki süreçte %27.8, 1995-2000 arasındaki süreçte ise %17.9 azalmış fakat toplam ölüm sayısı artmaya devam etmiştir. Çalışmada organ yetmezliğinin varlığı ve yetmezlikte olan organ sayısı ile mortalite arasında korelasyon olduğu saptanmıştır. Organ yetmezliği olmayan hastalarda mortalite yaklaşık %15 iken, üç veya daha fazla organında yetmezliği olan hastalarda bu oran yaklaşık %70 olarak belirlenmiştir. En sık akciğer (hastaların %18'i) ve böbrek (hastaların %15'i) yetmezliği, daha az sıklıkta ise kardiyovasküler (%7), hematolojik (%6), metabolik (%4) ve nörolojik (%2) yetmezlikler gözlemlenmiştir³⁴.

2.1.3 Sepsis Etiyolojisi

Martin ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya göre, sepsis vakalarının %52.1'i gram pozitif bakteri, %37.6'sı gram negatif bakteri, %4.7'si polimikrobiyal enfeksiyon, %1'i anaerob bakteri ve %4.6'sı fungus kaynaklıdır³⁴.

Yakın zamanda Gray ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya göre en yaygın enfeksiyon kaynağı solunum sistemidir (%64.5). Daha az sıklıkla ise akut abdominal enfeksiyon, idrar yolu ve deri/yumuşak doku enfeksiyonu sonucu olarak sepsis ortaya çıkabilmektedir³⁵. Bu sonuçlar Vincent ve arkadaşlarının yaptığı çok merkezli çalışmanın sonuçları ile benzerlik göstermektedir. Bu çalışmaya göre en yaygın enfeksiyon kaynağı akciğerler (%68), ikinci sırada ise abdominal bölgedir (%22)³⁶.

2.1.4 Sepsis Patofizyolojisi

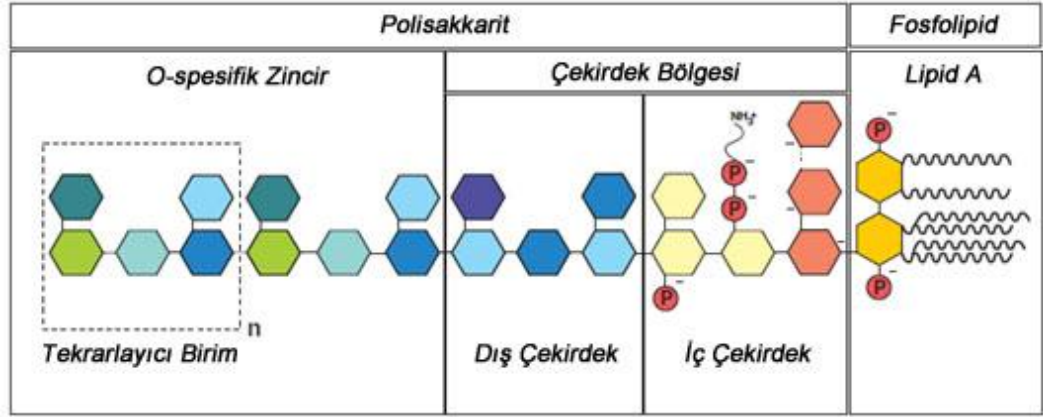
Sepsis birçok sistemin aktive olduğu karmaşık bir patolojik durumdur. Mikroorganizmaların çeşitli bileşenlerinin (*pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs)) veya doku hasarı nedeniyle hücre dışına çıkan endojen intraselüler protein ve lipidlerin (*danger-associated molecular patterns* (DAMPs)) çeşitli motif tanıyıcı (*pattern recognizing*) reseptörler tarafından algılanması sonucu lökositlerde, epitel ve endotel hücrelerinde ve nöroendokrin sistemde çeşitli hücre içi olaylar tetiklenmektedir³⁷. Bu hücrel uyarılma sonucu oluşan çeşitli mediyatörler ise komplement ve koagülasyon sistemlerinin aktivasyonuna neden olmaktadır³⁸.

Hücresel uyarılmayı tetikleyen patojen kaynaklı moleküllere lipopolisakkarit (LPS), lipoproteinler, dış membran proteinleri, flagellin, peptidoglikan, lipoteikoik asit gibi yüzey molekülleri ve bakteriyel lizis sırasında salıverilen heat-shock protein (HSP), DNA fragmentleri örnek verilebilir³⁷. Hücre hasarı sonucu açığa çıkan *high-mobility group box-1* (HMGB-1), S100 proteini, ürik asit, endojen nükleik asitler ve ekstraselüler matriks proteinleri olan heparan sülfat, proteoglikanlar gibi moleküller ise steril inflamasyondan sorumludur³⁹.

PAMP ve DAMP'lar tarafından immün hücrelerin uyarılması sonucu oluşan inflamatuvar sinyaller, fırsatçı mikroorganizmanın eradikasyonunu sağlayan proinflamatuvar mediyatörler ve bu cevabın kontrolünü ve hücre/doku/organ iyileşmesini sağlayan antiinflamatuvar mediyatörlerin salıverilmesine neden olur. Normalde konakçı yararına olan inflamatuvar cevap, aşırı ve uzun süreli olduğunda hasar verici hale gelir⁴⁰. Pro- ve anti-inflamatuvar mediyatörler arasındaki denge bozulduğunda sitokinler, platelet aktive edici faktör (PAF), oksijen radikalleri ve nitrik oksit gibi endojen proinflamatuvar mediyatörlerin aşırı üretimi sonucu hipotansiyon, çoklu organ yetmezliği ve ölüm meydana gelmektedir⁴¹.

2.1.4.1 *Lipopolisakkarit*

Lipopolisakkarit (LPS; endotoksin) gram-negatif bakterilerin dış membranına gömülü halde bulunan, ısıya karşı oldukça dirençli amfifilik bir moleküldür. Bu molekül, birbirine kovalent olarak bağlı lipit A, oligosakkarit çekirdek ve O-yan zinciri olmak üzere üç bölge içermektedir. LPS'nin toksisitesinden esas sorumlu olan lipit A bölgesi, iki N-asetilglukozamin kalıntısına bağlı yağ asiti zincirlerinden oluşmaktadır^{25,42} (Şekil 1).



Şekil 1. Lipopolisakkaritin yapısı²⁵ (Kaynaktaki şekil Türkçeleştirilmiş ve düzenlenmiştir).

2.1.4.2 Konakçı Tarafından Lipopolisakkaritin Tanınması

İnsan, fare veya sıçan immün hücreleri LPS veya lipoprotein gibi çeşitli mikrobiyel ürünlere pikogram/ml gibi çok düşük konsantrasyonlarda bile cevap oluşturmaktadır. İmmün sistemin bu moleküllere karşı yüksek cevaplılığından *Toll-like* reseptör (TLR)'ler olarak adlandırılan reseptör ailesi sorumludur⁴².

TLR'ler, motif tanıyıcı reseptör ailesinin (*Pattern Recognition Receptors*; PRRs) bir üyesidir⁴³. Bu reseptörler, ekstraselüler bölgesi lösince-zengin tekrarlar içeren, sitoplazmik bölgesi interlökin-1 (IL-1) reseptörüyle (IL-1R) benzerlik gösteren transmembran proteinlerdir⁴². TLR'lerin insanda tanımlanmış 10 üyesinden biri olan TLR4, LPS'nin tanınmasından sorumludur^{44,45}.

Bakteriyel membranda bulunan LPS'nin immün sistemini uyarıcı etkisi zayıftır. Membranda bulunan LPS'nin TLR4 ile etkileşimine kadar meydana gelen aşamalarda üç molekül daha görev almaktadır. Bunlar, LPS bağlayıcı protein (LBP), *cluster of differentiation* 14 (CD14),

myeloid farklılaşma faktörü 2 (MD-2)'dir. Bu moleküller LPS'nin membrandan ayrılıp reseptöre sunulmasına aracılık ederler⁴².

LBP, gram-negatif bakterinin membranında bulunan LPS'nin CD14'e bağlanmasını katalizleyen, karaciğer ve akciğerde üretilen bir akut faz reaktanıdır^{42,46,47}. CD14'e bağlanma, LPS'nin TLR4/MD-2 kompleksine bağlanabilmesi için gerekli olan uygun mesafeyi sağlar⁴⁸. CD14 molekülü myeloid hücrelerin membranına bağlı (mCD14) olabildiği gibi dolaşımda çözünebilir formda (sCD14) da bulunmaktadır. sCD14 dendritik hücreler, fibroblastlar, düz kas hücreleri ve vasküler endotel hücreleri gibi yapısal olarak CD14 negatif olan hücrelerin de LPS'ye karşı cevap oluşturabilmesine aracılık etmektedir⁴⁹. Sağlıklı insanlarda da bulunan çözünebilir CD14'ün (sCD14) düzeyleri sepsisli hastalarda artmış durumdadır⁵⁰.

TLR ve MD-2 heterodimer oluşturarak LPS moleküllerindeki 'motifi' tanır. LPS'nin bağlanması sonucu, 2 set TLR4-MD2-LPS kompleksi simetrik olarak birleşerek m-şekli reseptör homodimerini oluşturur⁵¹.

2.1.4.3 Sinyal Amplifikasyonu

LPS'nin TLR4 tarafından algılanması, hücre içinde bir dizi fosforilasyon ve ubiquitinasyon reaksiyonu sonucu tümör nekroz faktörü- α (TNF- α), interlökin-1 (IL-1) gibi proinflamatuvar sitokinlerin ve interferon- α (IFN- α), IFN- β gibi tip 1 interferonların ekspresyona neden olur⁴³ (Şekil 2).

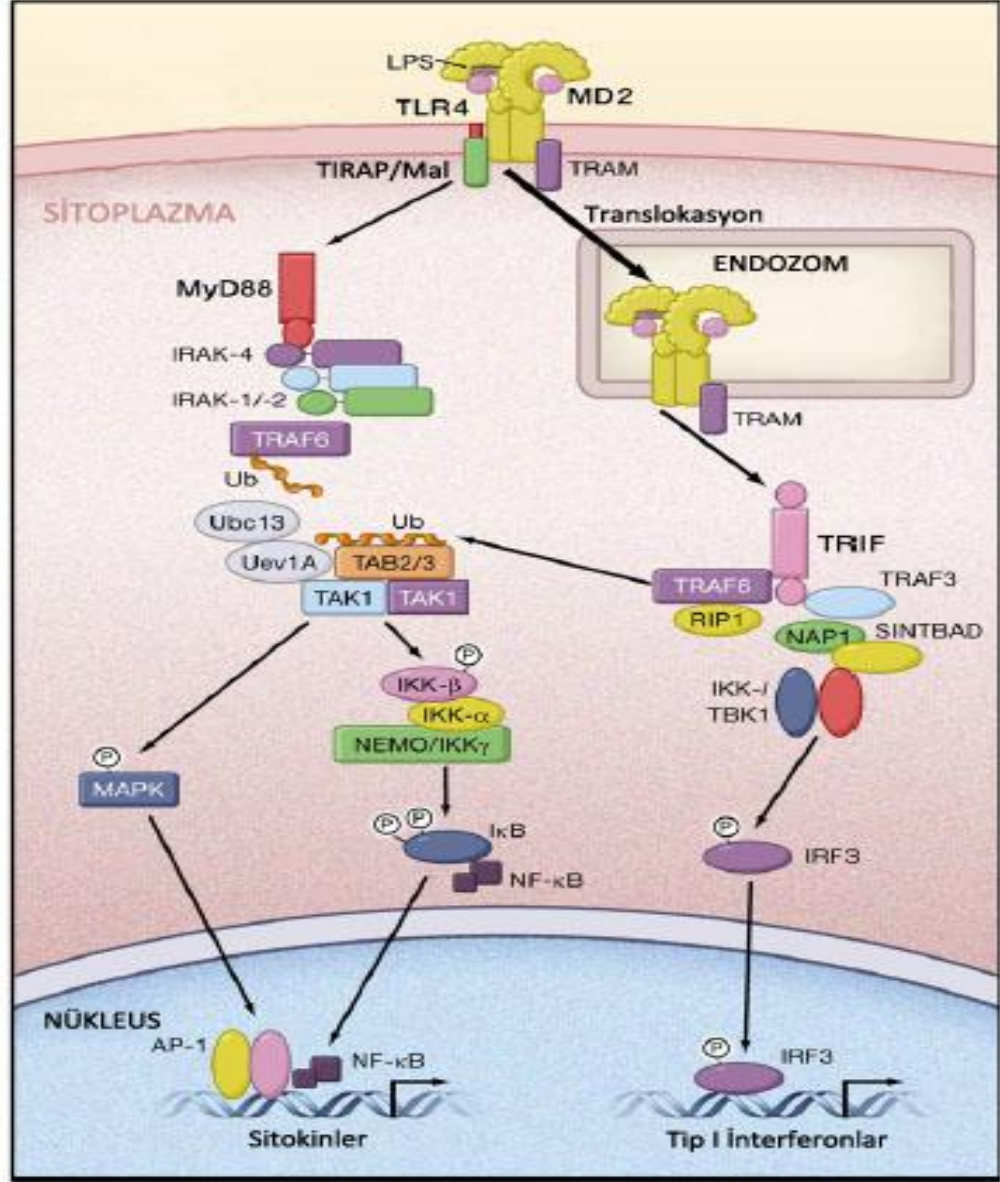
LPS'ye maruziyetten 30-90 dk sonra, TNF- α ve IL-1 salıverilerek inflamatuvar sürecin 2. aşamasını tetikler. Bu aşama sitokinler, lipid mediyatörler ve reaktif oksijen türlerini (ROT) içermektedir.

Ayrıca bu sitokinler hücre adezyon moleküllerinin *upregulasyonu* sonucu dokulara inflamatuvar hücrelerin migrasyonuna sebep olur. Böylece doğal ve edinilmiş bağışıklık sistemi, koagülasyon yolları yaygın olarak uyarılır⁴⁹.

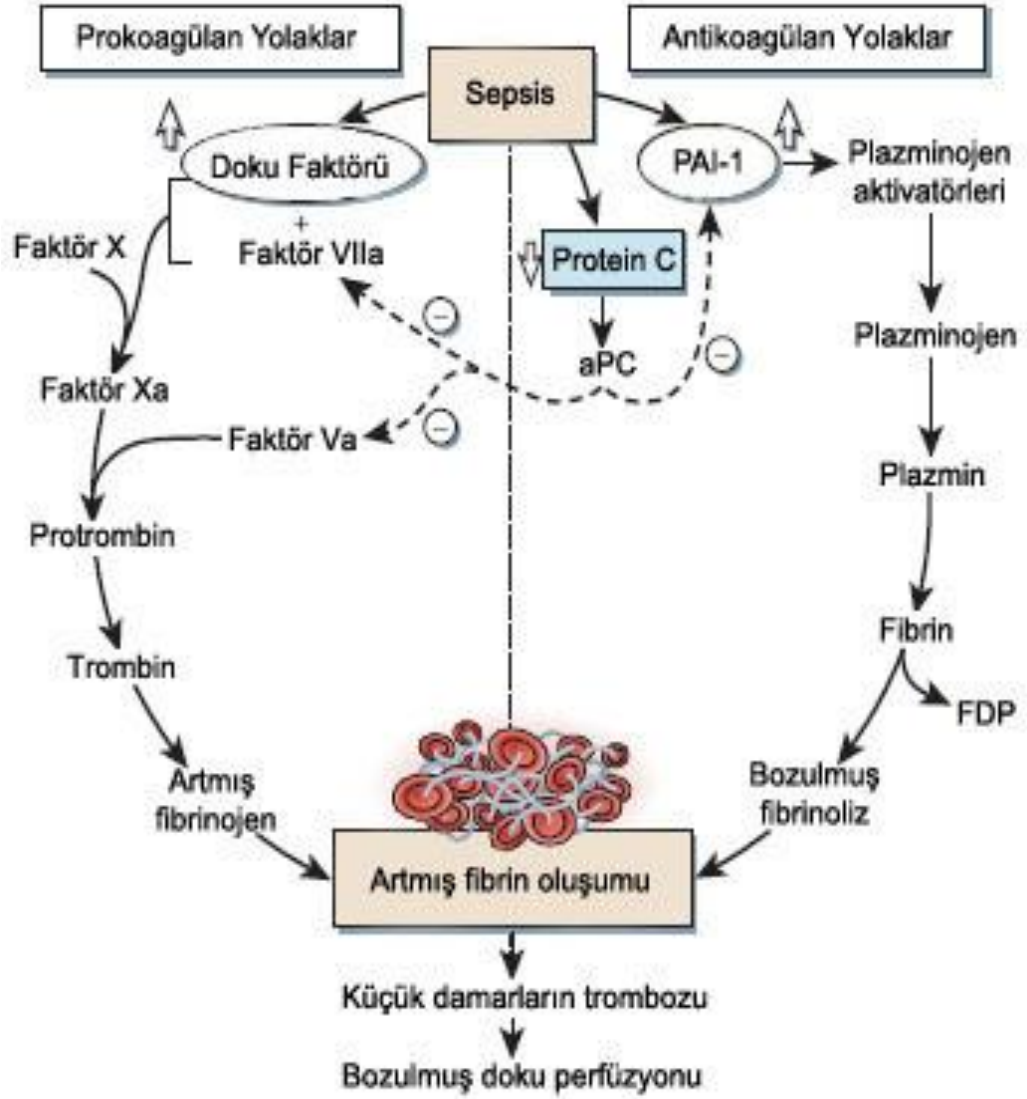
IL-1 β ve TNF- α , hem monositlerde hem de endotelial hücrelerde, doku faktörü (TF; *tissue factor*) ekspresyonunu artırır. Doku faktörü de koagülasyon sisteminin ekstrinsik yolağını tetikler⁵². Aynı zamanda, yüksek PAI-1 (*plasminogen-activator inhibitor type-1*) düzeyleri nedeniyle fibrinin plazmin tarafından yıkımı da bozulmuştur. Fibrinin artmış üretimi ve azalmış yıkımının net sonucu olarak, damarlarda fibrin birikimi meydana gelir. Bu durum küçük damarlarda trombüs oluşumuna neden olmaktadır⁴⁹ (Şekil 3).

Koagülasyon bozukluklarına aracılık eden olan bir diğer olay ise antikoagülan etkili olan antitrombin (AT), aktive protein C (APC) ve TFPI (*tissue factor pathway inhibitor*) gibi proteinlerin ekspresyonunun azalmasıdır. Bu moleküller normalde trombin üretimi inhibe ederek koagülasyon sistemini düzenlenmesine katkı sağlamaktadırlar⁵².

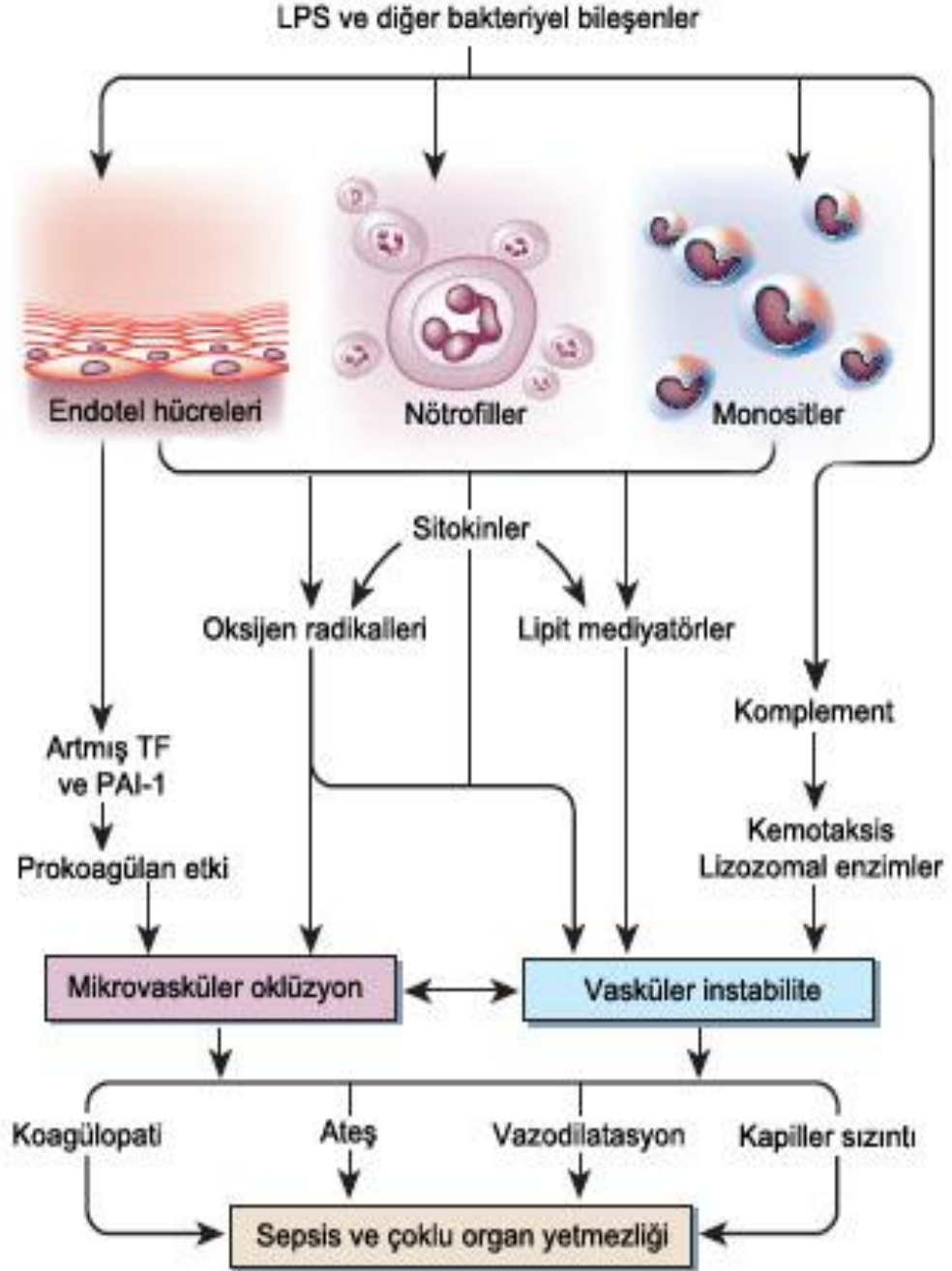
Azalmış miyokardiyal kontraktilite, bozulmuş periferel vasküler tonüs ve mikrovasküler oklüzyonun birlikte sebep olduğu doku hipoperfüzyonu ve yetersiz oksijenizasyon sonucu organ yetmezliği ortaya çıkmaktadır⁴⁹ (Şekil 4).



Şekil 2. TLR4 reseptörü tarafından LPS'nin tanınması meydana gelen hücre altı olaylar⁴³ (Kaynaktaki şekil sadeleştirilmiş ve Türkçe'ye çevrilmiştir).



Şekil 3. Sepsis sonucu prokoagulan ve antikoagulan sistem arasındaki dengenin bozulması⁴⁹ (kaynaktaki şekil Türkçe'ye çevrilmiştir).



Şekil 4. Organ yetmezliğinde rol alan eşzamanlı olaylar⁴⁹ (Kaynaktaki şekil Türkçe'ye çevrilmiştir).

2.1.5 Sepsisin Tedavisi

Surviving Sepsis Campaign (SSC)'in belirlediği uzmanlar tarafından, sepsisle ilgili klinik çalışmaların sonuçlarının yarar-zarar ve maliyet açısından incelenmesiyle oluşturulan kılavuz, sepsis tedavisiyle ilgili en kapsamlı belgedir. Bu kılavuzlardan en günceli 2012 yılında yayınlanmıştır⁵³.

Septik şok şüphesi olan hastalarda ilk olarak hipoksemi, hipotansiyon gibi fizyolojik bozukluklar düzeltilmelidir. Hastanın hava yolunun açık olduğundan emin olunmalı, gerekli durumlarda entübasyon ve mekanik ventilasyon uygulanmalıdır. Hastanın solunum durumu stabilize edildikten sonra uygun perfüzyon sağlanmalıdır⁵⁴.

Hipotansiyon, perfüzyon yetersizliğinin en yaygın belirtici olmakla birlikte özellikle sepsisin erken fazında hipoperfüzyon varlığında bile gözlenmeyebilir. Bu nedenle hipoperfüzyonun değerlendirilmesinde laktat düzeyi artışı oldukça önemli bir bulgudur. Hipoperfüzyonun diğer belirtileri, kanın merkezi organlara akışı nedeniyle serin ve damarları büzüşmüş bir cilt (sepsisin erken fazlarında ılık ve kızarmış olarak gözlenebilir), taşikardi (> 90 atım/dk), bilinç bulanıklığı veya huzursuzluk, oligüri veya anüri ve laktik asidozdur⁵³⁻⁵⁵. Bazı klinisyenler laktat düzeyi artışının organ hipoperfüzyonuna özgü olmaması nedeniyle bu amaçla prokalsitonin düzeyini takip etmeyi tercih etmektedir⁵⁶. Bu bulgular değerlendirilirken hastanın önceden var olan hastalıkları ve kullandığı ilaçlar dikkate alınmalıdır⁵⁴.

Hipoperfüzyon varlığı belirlenmişse, çoklu organ yetmezliği oluşumundan korunmak/oluşumunu sınırlamak için bir an evvel düzeltilmesi sağlanmalıdır. Bu amaçla intravenöz sıvılar, vazopresörler,

inotropolar kullanılabilir veya gerektiğinde kırmızı kan hücresi transfüzyonu yapılabilir^{53,54,57}.

Perfüzyon bozukluğu görülen hastalarda birinci basamak tedavisi olarak intravenöz sıvıların bolus şeklinde verilmesi tavsiye edilmektedir (kalp yetmezliği olmayan hastalarda). Bolus uygulanmasına perfüzyon düzeyi istenen seviyeye ulaşıncaya kadar devam edilmelidir. Hipoperfüzyonla ilgili parametreler her sıvı bolusundan önce ve sonra değerlendirilmelidir. Eğer sıvı resüsitasyonuna rağmen daha ileri sonuç alınamazsa pulmoner ödem oluşması riskinden kaçınmak için sıvı takviyesine son verilmelidir. Bu durumda ikinci basamak tedavi olarak vazopresörler kullanılmalıdır. Vazopresör olarak septik şokta genellikle norepinefrin kullanılmaktadır. Taşikardi ve aritmi nedeniyle beta adrenerjik aktiviteye sahip ilaç kullanımının sakıncalı olduğu durumlarda ise saf alfa adrenerjik aktivite nedeniyle fenilefrin tercih edilebilir.

Bu müdahalelere cevap vermeyen hastalarda ise inotrop tedavisi veya kan transfüzyonu gibi ek tedaviler uygulanır. İnotrop madde olarak dobutamin kullanılır. Düşük dozda dobutamin arterleri dilate ederek kan basıncında azalmaya neden olabilir. Daha yüksek dozlarda ise kalp debisini artırması nedeniyle kan basıncını genellikle artırmaktadır. Dozun belirlenmesinde bu durum dikkate alınmalıdır^{53,54,57}.

Surviving Sepsis Campaign 2012 kılavuzuna göre ilk altı saat içerisinde sıvı resüsitasyonundaki hedefler şu şekilde olmalıdır^{53,57}.

- Santral venöz basınç 8-12 mmHg
- Santral venöz oksijen satürasyonu >%70 veya karışık venöz oksijen satürasyonu >%65
- Ortalama arteriyel basınç $\geq$ 65 mmHg

- İdrar çıkışı ≥ 0.5 m /kg/saat

Glukokortikoid kullanımı, sıvı resisütasyonu ve vazopresör tedavisi hemodinamik dengenin sağlanmasında yeterli olduğunda tavsiye edilmemektedir. Fakat müdahalelere rağmen denge sağlanamazsa 200 mg/gün dozda hidrokortizon intravenöz yoldan uygulanmaya başlanmalıdır⁵³.

Sepsis hastalarında enfeksiyon kaynağı acilen tespit ve tedavi edilmelidir. Septik odağın belirlenmesinde hastanın fiziksel muayenesinin ve hastalık öyküsünün (geçirilmiş bir travma veya ameliyat gibi) dikkatlice irdelenmesi gerekmektedir. Tedavide odağın kontrolü, antibiyotik tedavisinin etkinliği açısından oldukça önemlidir. Bu amaçla enfeksiyon kaynağı olabileceği düşünülerek varsa üriner veya vasküler katater uzaklaştırılmalı, abselere perkütanöz veya cerrahi drenaj uygulanmalıdır. Zorunlu hallerde amputasyon da yapılabilir^{53,54,57}.

Antibiyotik tedavisinden önce Gram boyama ve kültür için tükürük, idrar örnekleri ve şüphelenilen bölgeye göre diğer başka örnekler alınmalıdır. Ayrıca iki farklı yerden venöz kan alınarak anaerobik ve aerobik bakteri yönünden değerlendirilmelidir. Alınan örneklerde Gram boyama yapılması, kültürlerin inkübasyonu devam ederken hastalığın etiyolojisi hakkında ipucu vermesi açısından yararlıdır. Fungal veya viral enfeksiyonlardan şüphelenilen durumlarda, bu mikroorganizmalara yönelik testler de yapılabilir^{53,54,58,59}.

Kültür sonuçları elde edilene kadar acilen ampirik olarak intravenöz antibiyotik tedavisine başlanmalıdır. Bu amaçla mümkün olduğunca geniş spektrumlu antibiyotikler kullanılır. Kültür ve antimikrobiyal duyarlılık sonuçları elde edildiğinde toksisite ve direnç

oluşmaması için patojene özgü tek bir ilaç kullanımına geçilmelidir. Tedavi süresi tipik olarak 7-10 gün olmakla birlikte bazı özel durumlarda (enfeksiyon odağı drenajı yapılamadığında, immün yetmezliği olan veya yavaş klinik cevap gelişen hastalarda) bu süre uzayabilir. Gereksiz yere uzun süreli antibiyotik kullanımından süperenfeksiyona veya ilaç direnci gelişmesine neden olabileceği için kaçınılmalıdır^{53,54,60,61}.

Diyabet öyküsünden bağımsız olarak sepsisli hastalarda sıklıkla hiperglisemi ve insülin rezistansı görülmesi nedeniyle yoğun glisemik kontrol yapılması ve gerekli durumlarda insülin tedavisi uygulanması oldukça önemlidir^{53,54}. Glukoz düzeyindeki değişimlerin mortaliteyle ilişkili olduğunu belirten çeşitli klinik çalışmalar mevcuttur^{62,63}. Hastanın kan glukoz düzeyi ardışık iki ölçümde 180 mg/dl'nin üzerindeyse, insülin tedavisine başlanmalıdır. Tedavi sırasında hipoglisemiden ve kan glukoz düzeyinde geniş dalgalanmalardan kaçınılmalıdır⁵³.

Tedavi sırasında sonuçlar sürekli değerlendirilmeli ve olumlu sonuç alınamıyorsa uygulanan tedaviler antibiyotik tedavisi ve septik odakların kontrolünün yeterliliği açısından değerlendirilmelidir. Olumlu sonuç alınan hastalar ise klinik sonuçlar ve laboratuvar parametreleri açısından takip edilmeye devam edilmelidir^{53,54}.

2.2. Deneysel Endotoksik Şok Modeli

Endotoksinin intravenöz, intraperitoneal veya intratekal yoldan verilmesiyle oluşturulan bir modeldir⁶⁴. Gram-negatif bakteri kaynaklı sepsisin patolojisinde rolü olduğu bilinen LPS'nin infüzyonu veya enjeksiyonu, sepsisin erken aşamalarıyla benzer şekilde sistemik inflamasyona neden olmaktadır. Endotoksin enjeksiyonunun ardından

proinflatuvar sitokin düzeylerinde hızlı ve belirgin fakat geçici bir artış ortaya çıkmaktadır^{65,66}.

Gönüllü insanlara intravenöz yoldan düşük dozda endotoksin uygulanması ile farelere intraperitoneal yoldan endotoksin uygulanması sonrasında meydana gelen hemodinamik, hematolojik ve metabolik değişiklikler benzerlik göstermektedir⁶⁷. Ayrıca sepsis hastalarında endotoksinin serum konsantrasyonu ile hastalığın ciddiyeti ve mortalite arasında korelasyon olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur⁶⁸.

Deitch ve arkadaşları subletal dozda endotoksinin genellikle kardiyovasküler sistemde hiperdinamik duruma, letal dozda ise hipodinamik cevaba neden olduğunu göstermişlerdir⁶⁹. Deney hayvanlarının LPS'ye duyarlılığının insanlara göre daha düşük olması nedeniyle, aynı inflamatuvar cevabı elde etmek için daha yüksek dozların kullanılması gerekmektedir⁷⁰.

2.3. Sistemik İnflamasyonda Rol Alan Biyokimyasal Parametreler

2.3.1 Nitrik Oksit

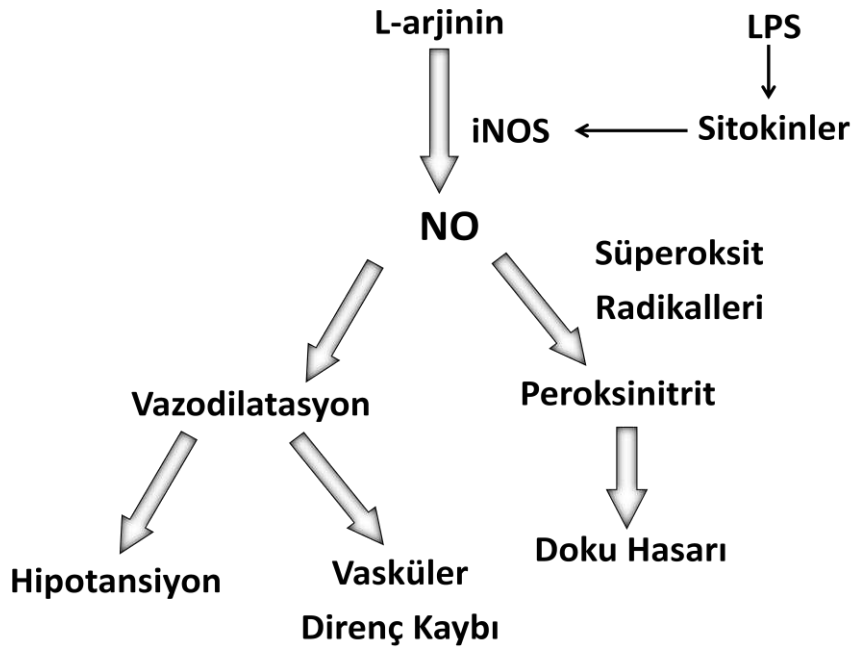
Nitrik oksit (NO) vücutta yaygın bir şekilde bulunan ve birçok fonksiyona aracılık eden bir sinyal mediyatörüdür. Kimyasal yapısı nedeniyle dokulardan kolaylıkla difüze olabilen, dayanıksız ve reaktif bir gaz molekülüdür. Vasküler tonüsün ve permeabilitenin ayarlanmasından, platelet adezyonundan, nörotransmisyon ve mitokondriyal solunumdan sorumludur⁷¹.

NO, L-arjinin ve oksijenden nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi aracılığıyla sentezlenmektedir. Bu enzimlerin günümüzde üç izoformu bilinmektedir-nöronal NOS (nNOS, NOS1), indüklenebilir NOS (iNOS, NOS2), endotelyal NOS (eNOS, NOS3). eNOS ve nNOS gen ekspresyonu artmış hücre içi kalsiyum düzeyleri tarafından aktive edilirken, iNOS gen ekspresyonu TNF α , IFN γ gibi sitokinler tarafından düzenlenmektedir. iNOS izoformu tarafından üretilen NO miktarı (nanomolar düzeyde), yapısal NOS'lar (eNOS ve nNOS) göre (pikomolar düzeyde) daha fazladır⁷².

Nitrik oksitin etkileri guanilat siklaz aracılı direkt etkiler ve guanilat siklazdan bağımsız indirekt etkiler olmak üzere ikiye ayrılabilir. Etkilerin hangi mekanizma aracılığı ile ortaya çıkacağına NO/O₂⁻ oranı tarafından belirlendiği düşünülmektedir. Bu oran on veya daha fazla olduğunda NO'nun etkileri daha çok proteinlerin yapısında bulunan geçiş metallerine bağlanması sonucu bu proteinlerin aktivitelerini değiştirmesi suretiyle gerçekleştirmektedir. Guanilat siklaz aktivasyonu bu mekanizma sonucu (enzim yapısında bulunan demire bağlanma) oluşur ve böylece vazodilatör, antiagregan ve anti-proliferatif etkiler açığa çıkar. Süperoksit üretiminde aşırı artış gözlenen durumlarda oran azaldıkça sırasıyla nitrozilasyon, nitrasyon ve oksidasyon reaksiyonları ortaya çıkmakta ve proteinlerin yapısında gittikçe daha geri dönüşsüz hale gelen değişiklikler meydana gelmektedir⁷³.

Septik şok sırasında nitrik oksit sentazın indüklenebilir izoformunun aktivasyonu sonucu aşırı miktarda salıverilen nitrik oksit (NO) arteriyel hipotansiyona neden olur. Fizyolojik konsantrasyonlarda nitrik oksit üretildiğinde, süperoksitler süperoksit dismutaz (SOD) enzimiyle detoksifiye edilebilirken, iNOS'un uyarılmasıyla aşırı miktarda üretilen NO süperoksitler için SOD ile yarışır. Nitrik oksitin süperoksitlerle reaksiyonu

sonucu sitotoksik bir molekül olan peroksinitrit oluşur^{74,75}. Peroksinitritler protein, lipid ve nükleik asitleri nitratlayarak ve/veya oksitleyerek yapısında çeşitli modifikasyonlara neden olurlar⁷⁶ (Şekil 5).



Şekil 5. Sepsiste lipopolisakkaritin nitrik oksit aracılı etkileri.

Peroksinitrit kaynaklı hasara ek olarak muhtemelen NO'nun, O_2^- tarafından etkisizleştirilmesi sonucu NO biyoaktivitesinde meydana gelen azalma endotel işlev bozukluğuna neden olur⁷³. Ayrıca intact bakteri, bakteriyel hücre duvarı komponentleri veya konakçı kaynaklı birçok faktör (fibrin, sitokin, komplement proteinleri, serin proteazlar, kan akışı veya oksijenizasyondaki değişiklikler gibi) endotel hücrelerini aktive ederek hem yapısal hem de fonksiyonel değişikliklere neden olur^{77,78}. Sepsiste vasküler permeabilite artışıyla meydana gelen yaygın ödem, oksijenin dokulara dağılması için gerekli olan mesafeyi artırır ve interstisyel basınç artışı nedeniyle mikrovasküler perfüzyonun bozulmasına neden olur⁷⁹.

Endotel tabakası, lökositlerin transmigrasyonu, fibrin oluşumu, lokal vazomotor tonüsün ve permeabilitenin düzenlenmesi, programlı hücre ölümü gibi lokal cevabı oluşturan birçok olayda önemli role sahiptir⁸⁰. Fizyolojik koşullarda sıkı kontrol nedeniyle denge halinde meydana gelen bu mekanizmalar, yaygın konakçı cevabı oluşan durumlarda lokal kontrol mekanizmaları tarafından desteklenemez, yaygın inflamasyon ve koagülasyon organ hasarına neden olur⁷⁷.

Sepsiste nitrik oksitin etkisinin yararlı veya zararlı olması miktarının yanı sıra oksiradikallerin varlığı ve süperoksitlerle etkileşmesine de bağlıdır⁸¹. Nitrik oksitin etkisinin iki yönlü olması nedeniyle sepsiste NOS inhibisyonunun faydalı olup olmayacağı henüz tartışmalıdır^{82,83} (Tablo 3).

Tablo 3. Nitrik oksitin sepsiste potansiyel etkileri⁸¹.

	Koruyucu	Zarar Verici
Direkt etkiler	- Kan akışı - Lökosit ve platelet agregasyonunun inhibisyonu - Konakçı savunması	- Sitotoksik etki
İndirekt Etkiler	- Toksik oksiradikallerin temizlenmesi	- Toksik peroksinitrit oluşumu

2.3.2 Asimetrik Dimetil Arjinin

Endojen bir molekül olan asimetrik dimetil arjinin (ADMA) proteinlerin yapısında bulunan arjinin amino asitlerinin Protein Arjinin Metil Transferaz-I (PRMT-I) enzimi tarafından metillenmesinin ardından hidrolize uğraması sonucu oluşmaktadır⁸⁴⁻⁸⁶.

ADMA'nın fizyolojik rolü ilk kez Vallance ve arkadaşları tarafından endotel-bağımlı vazodilatasyonu inhibe etmesinin fark edilmesiyle ortaya çıkarılmıştır⁸⁷. ADMA, NOS'un non-selektif, kompetitif inhibitörüdür. Enzim inhibisyonunun yanı sıra katyonik aminoasit taşıyıcısı için L-arjinin ile yarışarak da nitrik oksit üretimini azaltmaktadır^{88,89}.

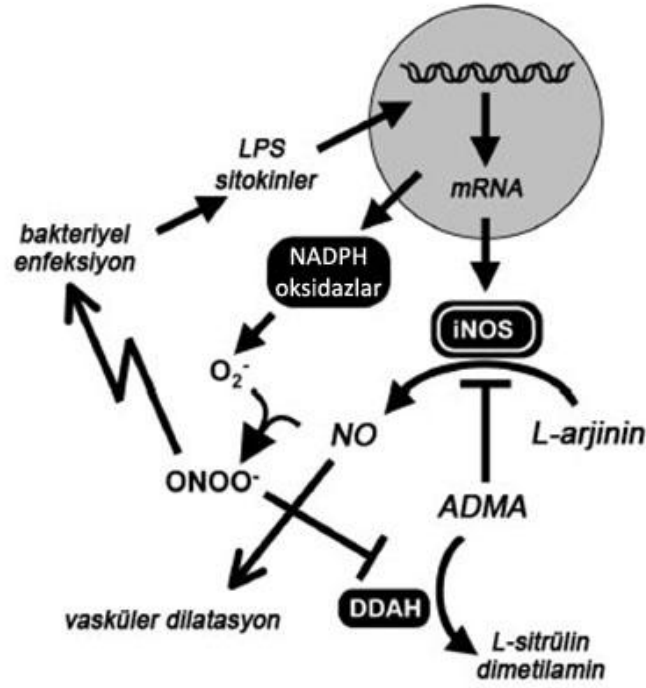
PRMT-I aktivitesi sonucu oluşan bir molekül olan N-monometilarjinin (NMA)'in kan plazma düzeyleri ADMA'ya göre 10 kat daha düşüktür. Bu enzim de ADMA gibi NOS inhibe etme ve L-arjinin taşıyıcısıyla yarışma özelliğine sahiptir^{84,89}.

Sepsis sonucu mikrovasküler yapılarda vazodilatasyon, vazopressör hiporeaktivitesi, endotelyal hücre disfonksiyonu, mikrotromboz, nötrofil adezyonu ve agregasyonu meydana gelmektedir⁹⁰. Endotelyal ve mikrovasküler disfonksiyon yeterli doku perfüzyonu sağlanamaması sebebiyle organ yetmezliğine neden olmaktadır⁷⁷.

O'Dwyer ve arkadaşları tarafından yapılan prospektif gözlemsel çalışmada, şiddetli sepsisli hastaların plazmasında gittikçe artan düzeyde ADMA tespit edilmiştir. Ayrıca ADMA düzeylerinin vazopresör ihtiyacı, organ yetmezliği gelişme riski, laktik asidoz ve IL-6 düzeyleri ile ilişkili olduğu gösterilmiştir⁸⁸.

Davis ve arkadaşları tarafından NO'nun biyoyararlanımının göstergesi olarak periferel arteriyel tonometri kullanılarak mikrovasküler reaktivite ölçülmüş ve reaktivitede en fazla düşüş septik şoklu hastalarda, daha az ise sepsisli hastalarda gözlenmiştir. Mikrovasküler reaktivite ile plazma L-arjinin konsantrasyonları arasında korelasyon bulunamamıştır. Plazma L- arjinin seviyelerinde artış olmasına rağmen mikrovasküler reaktivitede değişim olmamıştır. Bu sonuçlar sepsiste NOS'un kompetitif

olarak inhibe edildiğini düşündürmektedir⁹¹. ADMA'nın sepsisteki olası rolü şekil 6'da bulunmaktadır.



Şekil 6. Sepsisin patofizyolojisinde nitrik oksit ve ADMA'nın rolü⁹². ADMA, asimetrik dimetil arjinin; NO, nitrik oksit; iNOS, indüklenebilir nitrik oksit sentaz; LPS, lipopolisakkarit; DDAH, dimetil arjinin dimetilamino hidrolaz; ONOO⁻, peroksinitrit. (Kaynaktaki şekil Türkçe'ye çevrilmiştir).

2.3.3 Total Antioksidan Kapasite

Hücreler, dokular ve vücut sıvıları endojen ve ekzojen oksidatif maddelere karşı güçlü bir antioksidan savunma sistemine sahiptir. Bu sistemin üç temel görevi oksidatif hasarı önleme, durdurma ve tamir etmedir^{93,94}.

Antioksidan sistemi oluşturan moleküller enzimatik ve enzimatik olmayanlar olmak üzere ikiye ayrılır. Enzimatik moleküller

süperoksit dizmutaz, glutatyon peroksidaz ve katalaz gibi klasik enzimlerden; reaktif ara ürünlerin inaktivasyonunu sağlayan kinon oksidoredüktaz gibi yardımcı enzimlerden; glutatyon S-transferaz, UDP glukronozil transferaz konjugasyon enzimlerinden oluşmaktadır⁹⁵. Enzimatik olmayan antioksidanlar ise bilirubin, ürik asit, albümin, glutatyon, antioksidan vitaminler gibi metabolizma ve besin kökenli endojen bileşiklerdir⁹⁶.

Reaktif oksijen türevleri (ROT)'ne karşı yapılan güçlü savunma, birçok antioksidanın birbiriyle etkileşim halinde çalışması sonucu ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle her bir antioksidanın ayrı ayrı ölçümü vücudun antioksidan durumunu tam olarak yansıtamamaktadır. Total Antioksidan Kapasite (TAK), oksitleyici ve antioksidan bileşikler arasındaki dengenin bir göstergesidir. Bütün antioksidanların oluşturduğu toplam etkiyi ifade etmektedir⁹⁴.

Fizyolojik koşullarda reaktif ROT üretimi ile antioksidan sistem tarafından etkisizleştirilmesi arasında homeostatik bir denge vardır. Bu dengenin sağlanmasında kan merkezi role sahiptir^{94,97}. Sepsis gibi aşırı ROT üretimi veya yetersiz antioksidan savunma olduğu durumlarda denge bozulur ve oksidatif stres meydana gelir. Sepsiste potansiyel ROT kaynakları;

- Mitokondriyal solunum
- Araşidonik asit metabolizması
- Ksantin oksidaz, NADPH oksidaz gibi çeşitli enzimlerin aktivitesi
- Komplement sistemi, bakteri, endotoksin, lizozomal enzimler tarafından aktive edilen granülositler ve diğer fagositlerdir^{98,99}.

Sepsis/SIRS ve ARDS'de meydana gelen vasküler patolojilerde inflamatuvar hücre adezyonunu düzenlemesi ve direkt endotelial hasar nedeniyle ROT ve RNT'nin önemli katkısı bulunmaktadır⁹⁷. Yapılan çeşitli çalışmalarda SIRS veya septik şoklu hastalarda antioksidan kapasitedeki azalma ve reaktif oksijen türlerindeki artmanın çoklu organ yetmezliğine neden olduğunu gösterilmiştir^{100,101}. Pascaul ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise sepsis hastalarında total antioksidan kapasitenin azaldığı, septik şok hastalarında ise arttığı gözlenmiştir¹⁰².

Sonuçların birbiriyle çelişkili olması, sepsisteki patofizyolojik sürecin dinamik yapısı ve kompensatuvar mekanizmaların devreye girmesi nedeniyle vücudunun antioksidan durumunun zamana bağlı değişmesinden kaynaklanıyor olabilir.

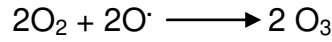
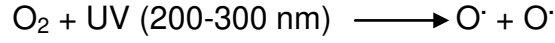
2.4. Ozon

2.4.1 Ozon Gazının Özellikleri

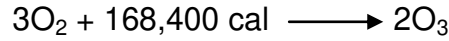
Ozon doğal olarak bulunan, stabil olmayan, üç oksijen molekülünden oluşan halka yapılı bir moleküldür. Yunanca koku anlamına gelmektedir. Saf ozon gazı hafif mavi renkli ve keskin kokuludur¹⁰³.

Atmosferde düşük konsantrasyonda bulunan ozon yeryüzünden yaklaşık 22 km yükseklikte daha yoğun (10 ppm) bir şekilde bulunmaktadır. Ozonun yoğun bir şekilde bulunduğu bu bölgeye ozon tabakası da denilmektedir. Stratosfer ozonun yaklaşık %90'ını içermektedir. Ozon tabakası sayesinde güneşten yayılan ultraviyole radyasyon (200-300nm) absorblanır ve böylece bu radyasyonun

hücrelerdeki nükleik asitler tarafından absorbe edilip DNA hasarına neden olması önlenmiş olur^{104,105}.



Tıbbi amaçla kullanılan ozon, saf oksijenin yüksek voltaj gradiyentinden geçmesi sonucu aşağıda belirtilen reaksiyonun gerçekleşmesiyle üretilmektedir¹⁰³.



Ozon, oksijenden 1.6 kat daha yoğundur ve suda çözünürlüğü 10 kat daha fazladır (0°C'de 100 ml suda 49 ml). Ozon serbest radikal özelliğinde olmamasına rağmen, florin ve persülfattan sonra üçüncü en güçlü oksidandır. Stabil olmaması nedeniyle depolanamaz, hemen kullanılması gerekir. Ozonun yarı ömrü sıcaklığa bağlıdır. 20°C'de 40 dakika, 30°C'de 25 dakika, -50°C'de ise üç haftadır¹⁰³.

2.4.2 Ozon Tedavisinin Tarihçesi

Ozonun keşfinden tedavide kullanımına kadar geçen aşamaların bir kısmı tablo 4'de verilmiştir.

Tablo 4. Ozon tedavisinde önemli gelişmeler¹⁰⁶

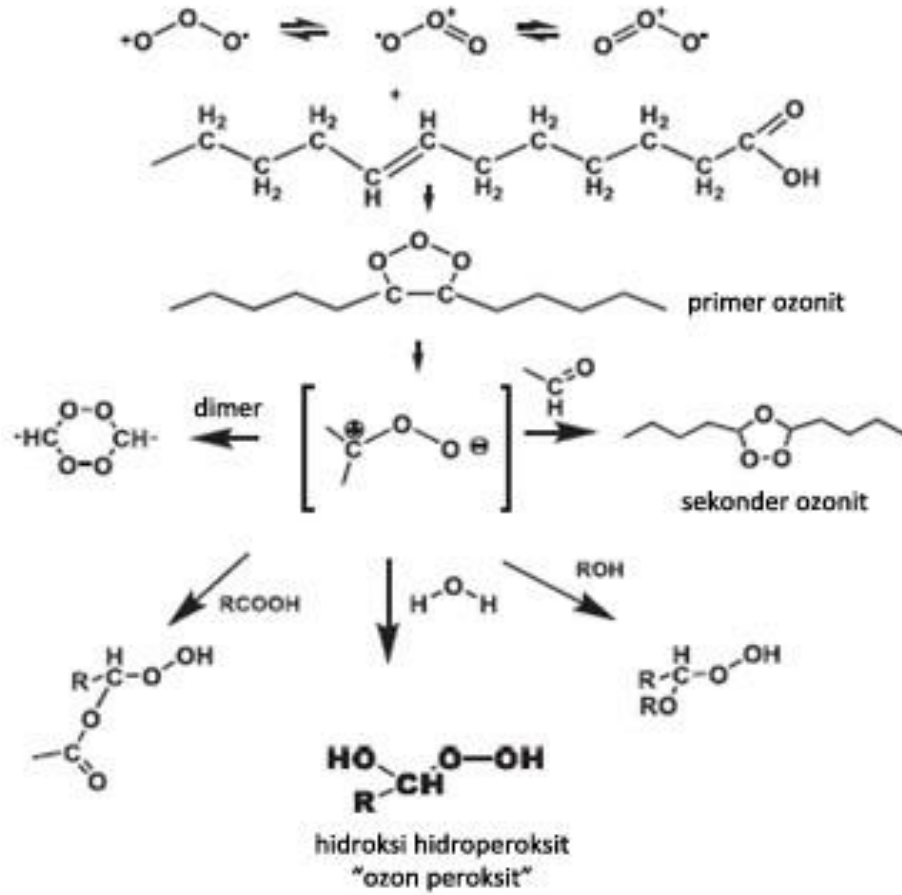
<i>Yıl</i>	<i>Kişi</i>	<i>Gelişme</i>
1840	Christian Friedrich Schönbein	Ozonu keşfetmiştir.
1857	Werner von Siemens	Ozon üretimi amacıyla ilk teknik ozon birimini (Siemens tüpü) oluşturmuştur.
1915	Albert Wolff	I. Dünya Savaşı sırasında enfekte yara, abse, enflamasyon ve kemik kırıklarını başarıyla tedavi etmiş ve çalışmalarını yayınlamıştır.
1932	Erwin Payr	Payr, geçirdiği bir hastalık nedeniyle dişçisi E.A Fisch aracılığıyla kendi bedeninde ozon tedavisini denemiştir.
1932	E.A. Fisch	Ozonun diş tedavisinde kullanımına öncülük etmiş ve ayrıca günümüzde dişçilikte kullanılmakta olan CYTOZAN® adlı cihazı geliştirmiş ve kendi laboratuvarında kullanmıştır.
1935	Erwin Payr	Yazdığı “Cerrahide ozon tedavisi” adlı çalışmasını Berlin’de toplanan 59. Alman Cerrahi Derneği Kongresi’nde sunmuştur. Bu tebliğ bilinen ozon tedavisinin başlangıcını oluşturmaktadır.
1937	P. Aubourg	Rektal insüflasyon yöntemini geliştirmiştir.
1957	Joachim Hänslar	Ozon karışımının doz ayarlamasını yapabilen ilk ozon jeneratörünün geliştirmiştir.
1968	Hans Wolff	Direkt intravasküler gaz uygulamasının emboliye sebep olması nedeniyle düşük

		riskli bir tedavi olan majör otohemoterapi yöntemini geliştirmiştir.
1977	O. Rokitansky	Diyabetik gangrenin topikal ve sistemik tedavisi üzerine ilk kapsamlı çalışmaları yapmıştır.
1981	H. Wermeister	Topikal tedavi olarak düşük basınçlı ozon gazı uygulamasını geliştirmiştir.

Ozon dozunun ayarlanmasına olanak veren medikal ozon jeneratörlerinin üretilmesi ve özellikle Velio Bocci ve Renate Viebahn-Hänsler'in yoğun çalışmaları sonucunda ozonun kan ve diğer biyolojik sıvılardaki etkilerinin tanımlanmasına kadar ozon tedavisi ampirik bir tedavi şekli olarak kalmaya devam etmiştir. Sonrasında meydana gelen hızlı gelişmeler sonucu günümüzde ozon tedavisi klinik uygulamada yerini almıştır¹⁰⁷.

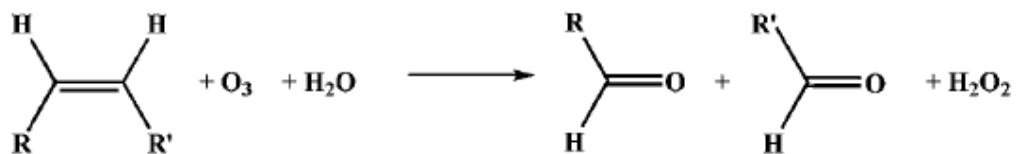
2.4.3 Ozon Gazının Biyolojik Ortamlardaki Davranışı

Oksijenden farklı olarak ozon, biyolojik sıvılarda (serum, plazma, lenf, idrar) çözünmesinin ardından hızlıca reaksiyona uğrar¹⁰⁸. 'Ozon peroksitleri' fizyolojik olarak aktif ozon metabolitleridir ve ozonun sistemik etkisinden sorumludurlar. Ozon fizyolojik koşullarda ($\text{pH} \leq 7.4$) selektif olarak esansiyel yağ asitlerinin izole C=C çift bağlarına 1,3-dipolar katılma reaksiyonu vermektedir (Şekil 7). Reaksiyonda ikincil metabolitler olarak az miktarda aldehitler oluşmaktadır. Oksidatif stresin ölçüsü olan MDA'nın düzeyleri ekstrakorporal kan tedavisi sırasında göz ardı edilebilir bir düzeyde artmaktadır^{19,109}.



Şekil 7. Ozonun izole çifte bağlarla reaksiyonu¹⁹. Fizyolojik şartlarda oluşan ana metabolit ozon peroksitleridir. (Kaynaktaki şekil Türkçe'ye çevrilmiştir).

Biyolojik ortamda ozon tercih sırasına göre çoklu doymamış yağ asitleriyle (PUFA; polyunsaturated fatty acids); askorbik asit, ürik asit gibi antioksidanlarla; sistein, indirgenmiş glutatyon gibi -SH grupları içeren tiyol bileşikleriyle ve albuminle reaksiyona girer (Şekil 8). Ozon, dozuna bağlı olarak, karbonhidratlar, enzimler, DNA ve RNA ile de etkileşebilir. Tüm bu bileşikler oksidasyon sırasında elektron vericisi olarak rol oynar¹⁰⁸.



Şekil 8. Ozonun doymamış yağ asitleriyle reaksiyonu¹¹⁰

Lipit peroksidasyonu sırasında 2 mol lipit peroksidasyon ürününün yanısıra 1 mol H_2O_2 oluşur¹⁰⁸. Bu reaksiyon hem ex vivo (tipik örneği cam şişede toplanan kan içinde) hem de in vivo (ozonun intramüsküler enjeksiyonundan sonra) ortamda meydana gelmektedir. Kanın ozonlanması sürecinin birkaç dakika içinde tamamlanmasına rağmen, oluşan H_2O_2 ve lipoperoksit radikallerinin etkileri iki fazdan oluşmak üzere devam eder¹¹⁰.

ROT, ilk fazda rol oynayarak kısa etkili mesajcı olarak görev yapar ve hızlıca yok olur. Bu moleküllerden biri olan hidrojen peroksit (H_2O_2) non-iyonize bir molekül olması nedeniyle plazmadan hücre sitoplazmasına hızla difüze olur ve hücre içi yolları tetikler. Hücre tipine bağlı olarak eritrosit, lökosit ve plateletlerde farklı biyokimyasal yollar aktive olur ve çeşitli biyolojik etkiler ortaya çıkar. Yüksek konsantrasyonda bulunan indirgenmiş glutatyon (GSH), katalaz ve GSH peroksidaz tarafından hızlıca suya indirgenir^{110,111}.

Lipoperoksit radikalleri hızla çeşitli alkenallere (4-hidroksi-2-nonenal; 4-HNE, trans-4-hidroksinonenal; 4-HHE) dönüşürler. Bu aldehitler in vivo olarak ROT'lardan daha stabildirler. Kanın reinfüzyonu sırasında vücut sıvılarında dilüsyona, eliminasyona (idrar ve safra yoluyla) ve GSH-transferaz (GSH-Tr), aldehit dehidrojenaz gibi enzimler tarafından metabolizmaya uğrarlar. Böylece tüm dokulara özellikle kemik iliği, karaciğer, santral sinir sistemi (SSS) ve endokrin bezlere sadece submikromolar konsantrasyonlarda ulaşır ve ozonun uzun süreli mesajcısı olarak görev alırlar^{108,111-115}.

Oluşan bu membranla ilişkili ozon peroksitleri, ikincil mesajcı olarak görev alır ve süperoksit dismutaz (SOD), GSH-peroksidaz (GSH-Px), GSH-redüktaz (GSH-Rd) ve katalaz (CAT) gibi antioksidan enzimlerle

süperoksit radikallerine göre daha ılımlı bir etkileşim yaparak enzimlerin upregülasyonuna neden olurlar^{19,108}.

H₂O₂ ve lipoperoksit radikalleri çeşitli biyolojik yolları aktive edebilmesi için belirli bir eşik konsantrasyonunun üstünde olması gerekmektedir. Fakat çok yüksek konsantrasyonlarda elimine edilmeden önce çeşitli hücresel bileşenleri hasara uğratabilmektedir. Biyolojik etkilerini gösterirken toksisitesinden kaçınılması için ozonun hassas olarak kalibre edilmiş cihazlarda doğru konsantrasyonda üretilmiş olması önemlidir. Ozon dozu, antioksidan kapasiteye göre belirlenmelidir. Antioksidan kapasite ölçülerek gerekli durumlarda ozon tedavisi öncesinde ve tedavi süresince oral antioksidan alımıyla artırılabilir^{108,116}.

Kandan farklı olarak gözler ve akciğerler düşük antioksidan kapasiteleri nedeniyle ozona oldukça duyarlıdır. Bu nedenle ozonun bu organlarla temasından kaçınılması gerekmektedir^{108,117,118}.

2.5. Tıbbi Ozon ve Tedavide Kullanımı

Tıbbi ozon, saf O₂ ve saf O₃'den oluşan ozon/oksijen karışımıdır. Tıbbi amaçlı oksijenden, tıbbi ozon jeneratörü kullanılarak 1-100 µg/ml konsantrasyon aralığında üretilir¹⁹. Gaz karışımı en az %95 oksijen ve en fazla %5 ozondan oluşur. Ozon jeneratörü paslanmaz çelik, nötral cam, teflon gibi ozona dayanıklı malzemeden yapılmış olmalıdır. Saf oksijen yerine hava kullanılması %78 azot içeriği nedeniyle oksijen ve ozonun yanı sıra çeşitli oranlarda toksik NOx bileşikleri oluşmasına neden olur. Bu nedenle saf oksijen kullanılması zorunludur¹⁰³.

Ozonun tedavi amacıyla kullanımında toksisitesinden korunmak için sürekli olarak ozon konsantrasyonunun ölçülmesini sağlayan iyi standardize edilmiş bir fotometreye sahip hassas bir ozon jeneratörü kullanılmalıdır. Ozon konsantrasyonun doğru hesaplanması da tedavi edici doza ulaşılması ve bu sırada toksik doza ulaşılmaması açısından oldukça önemlidir. Toplam doz basit olarak ozon konsantrasyonu ile gaz hacmi çarpılarak hesaplanır. Örnek olarak; 225 ml hacimde kanı 225 ml hacimde 30 µg/ml ozon konsantrasyonu olan gaz karışımı ile ozonlandırıyorsak, toplam ozon dozu 6.75 mg'a denk gelmektedir. Ayrıca toksisite meydana gelmeden terapötik etkinin görüldüğü optimal dozun önceden bilinmesi gerekmektedir¹⁰⁸.

Ozon, birçok farklı yoldan uygulanabilir (Tablo 5). Fakat embolizme neden olma riski nedeniyle gazın direkt olarak intravenöz yolla uygulanmasından kaçınılmalıdır^{108,110}.

Tablo 5. Ozon gazının uygulama yolları¹¹⁰

<i>Parenteral</i>	<i>Topikal veya lokorejiyonel</i>
- İntramüsküler (IM)	- Nazal*
- Subkütan (SC)	- Tubal*
- İntraperitoneal (İ.p)	- Öriküler
- İntraplevral (IPL)	- Oral*
- İntra-artiküler (IPL)	- Vajinal
(a) Periartiküler	- Üretral ve mesane içi
(b) Miyofasiyal	- Rektal
- İntradiskal (ID)	- Kütanöz
- İntraforaminal (IF)	- Dental
- Intralezyonel	*30-40 sn'lik apne sırasında uygulanır.

2.5.1 Sistemik Uygulama Biçimleri

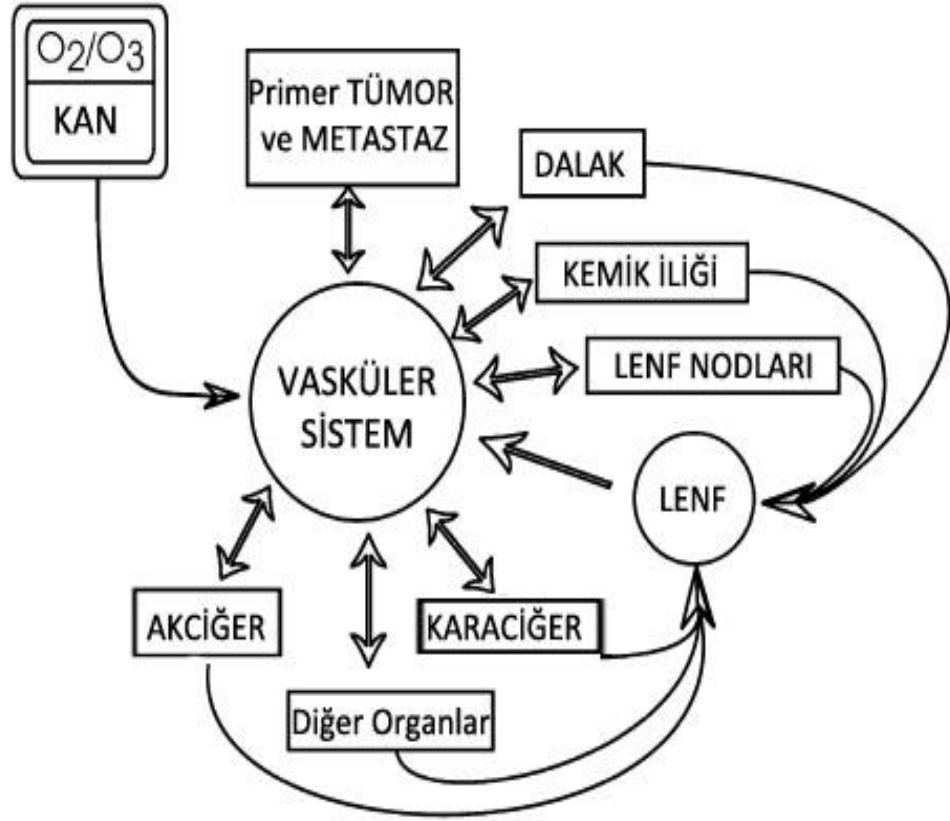
2.5.1.1 *Major Otohemoterapi (AHT; Autohaemotherapy)*

Aseptik koşullarda hastadan steril vakumlu cam şişeye (antikoagülan olarak sodyum sitrat içeren) alınan venöz kana (50-100mL) aynı hacimde 20-80 $\mu\text{g/ml}$ gaz karışımı uygulanması esasına dayanır. En az beş dakika boyunca kan ozonla muamele edilir. Hava kabarcığı oluşmaması açısından gaz ile kanın yavaşça karıştırılması önemlidir. Ardından bu kan aynı intravenöz katater ile tekrar hastaya uygulanır. Hemolize neden olması riski nedeniyle 80 $\mu\text{g/ml}$ 'nin üzerinde ozon içeren gaz karışımı kullanımından kaınılmalıdır^{19,108,111,119} (şekil 9).



şekil 9. Standart majör otohemoterapi sistemi¹⁹. (1) Ozon şırıngası (polipropilen); (2) Bakteri filtresi (0.2 μm); (3) Vakum şişesi (cam); (4) Transfüzyon seti (polietilen).

Ozonlanmış kan hastaya yeniden infüze edildikten sonra tüm organizmaya dağılır. Vücutta dolaşan eritrositler iskemik bölgelere daha çok oksijen dağıtılmasını sağlarken, lökositler postkapiller venüller yoluyla çeşitli organlara göç eder ve burada immün sistemi yavaş olarak uyarır. Plateletler normal içeriklerini kana salıverir ve yok olurlar. Reinfüzyonla verilen lipid peroksidasyon ürünleri, yaklaşık 3L plazma ve 9-11L interstisyel sıvı içinde dilüsyona uğrar ve bütün vücutta akut oksidatif stresin habercisi olarak rol oynar¹⁰⁸ (Şekil 10).



Şekil 10. Ozonlanmış kanın hastaya uygulanması sonrasında vücutta dağılımı¹⁰⁸.
(Kaynaktaki şekil Türkçe'ye çevrilmiştir).

2.5.1.2 Minör Otohemoterapi

Bu yöntemde majör hemoterapiden farklı olarak daha düşük miktarda kan ozonlandırılır. Steril apirojen şırıngaya içine önce 10-20 µg/ml ozon içeren gaz karışımı çekilir. Ardından hastadan 2-5 ml kan aseptik koşullar altında bu şırınga içine alınır. Kuvvetlice karıştırıldıktan sonra ozonlanmış kan (köpük de içeren), herhangi bir anesteziye ihtiyaç duyulmadan *gluteus* kasına enjekte edilir. Bütün işlemler hızlıca ve mümkün olduğunca kısa süre içerisinde gerçekleştirilmelidir¹⁰³.

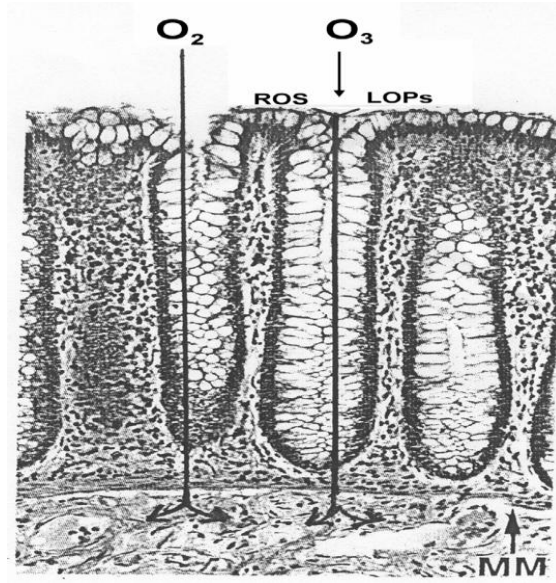
Bu yöntem non-spesifik, bağışıklık uyarıcı tedavidir. Endikasyonları *acne vulgaris*, alerji, kanserin ek tedavisi, immünoaktivasyondur¹⁹.

2.5.1.3 Ozon-Oksijen Karışımının Rektal İnsüflasyonu (Sistemik Etki)

Uygun ozon/oksijen karışımının anüs yolu ile rektum içerisine verilmesi esasına dayanır. Rektuma gaz karışımı uygulandığında her iki gaz da lüminal muköz tabakada çözünür. Oksijen doğrudan dokudan geçerken, ozon reaktif bir molekül olması nedeniyle mukozadaki protein ve lipidlerle reaksiyona girer, kısmen de feçesle ve antioksidanlarla etkileşir. Oluşan ROT ve lipoperoksit radikalleri *muscularis mucosae*'dan geçerek submukozal dokudan venöz ve lenfatik kapillerler ile dolaşıma katılır¹⁰³ (Şekil 11).

Bu uygulama günümüzde ucuz, noninvazif ve pratik olarak risksiz olması nedeniyle dünya çapında yaygın olarak uygulanmaktadır. Kolon içeriğinin ozonu bağlayarak etkisini azaltmasını önlemek için rektal insüflasyon öncesinde defekasyon yapılmış olması veya enema

kullanılması önerilmektedir. İşlem sırasında peristaltizmin uyarılmaması için 1-2 dk'da 50-100 ml gaz karışımı uygulanmalıdır. Sistemik amaçlı uygulamada kullanılan ozon konsantrasyonu 10-25 µg/ml arası, toplam gaz hacmi ise 150-300 ml arasındır^{19,103,120}.



Şekil 11. O₂-O₃ karışımının kolon lümeninden submukozal dokuya transferinin şematik görüntüsü¹⁰³.

2.5.2 Lokal Uygulama Biçimleri

2.5.2.1 *Düşük Basıncılı Ozon Gazı İrrigasyonu*

Bölgesel yaralarda, ozon gazının atmosfer basıncının altındaki basınçta bir emme kabı altında sürekli akışıyla uygulanmaktadır. Yaranın üzerinden geçen gaz karışımındaki ozon tekrar oksijen gazına dönüştürülür. Uygulanacak olan vakum, hastanın toleransına ve lezyonun ciddiyetine göre değişmektedir. Bu yöntemde düşük basınç uygulanması, lokal hiperemizasyon ile yara iyileşmesini hızlandırmaktadır. Bu nedenle yara tedavisinde özellikle tercih edilmektedir. Ayağın alt kısmında diyabete

bağlı oluşan kangren durumunda emilim kabı yerleştirmek zor olacağı için düşük basınçlı ozon uygulaması yerine ozona dirençli plastik bot kullanılmaktadır¹⁰⁶.

2.5.2.2 Transkütanöz Ozon İrrigasyonu/İmersiyonu

Toplardamar ülserleri ve geniş bir alana yayılan aşırı enfekte yaraların tedavisinde pratik olması nedeniyle ozona dirençli plastik bot ve/veya torbalar kullanılır. Uygulamadan önce yara bol suyla yıkanır. Gaz kaçaşının önlenmesi için çanta veya torbanın etrafı bantla deriye yapıştırılır. 15 dakikalık uygulamadan sonra gaz karışımında kalan ozon, oksijen gazına dönüştürülerek detoksifiye edilir^{106,121}.

2.5.2.3 Ozon-Oksijen Karışımının Rektal İnsüflasyonu (Lokal Etki)

Sistemik etkisinin yanı sıra ozon, lokal olarak anal ve rektal fistüllü abseler, proktit, bakteriyel ve ülseratif kolit, Crohn's hastalığı gibi durumlarda kullanılmaktadır. İlk başta yüksek dozda (80-100 µg/ml) küçük hacim içerisinde (50 ml) uygulanıp, hemoraji azaldığında daha düşük dozda (10-20 µg/ml) ve daha büyük hacimde (150-300 ml) uygulamaya devam edilmektedir^{19,106, 121}.

2.5.2.4 İntraartiküler (Eklem İçi) Ozon Enjeksiyonu

Eklem içi ozon enjeksiyonu özellikle diz ve omuz eklemlerinde olmak üzere ağrılı, akut ve kronik eklem rahatsızlıklarında tamamlayıcı tedavi olarak uygulanabilmektedir. Ozonun eklem içi uygulanması kısa sürede ağrıyı dindirir, şişlikleri indirir, ateşi düşürür ve

eklem hareketliliğinde artmaya neden olur. Eklem rahatsızlıklarında yardımcı tedavi olarak uygulanmaktadır¹⁰⁶.

2.5.2.5 Ozonlanmış Su Uygulaması

Ozon oksijen gaz karışımının suyun içinden belli bir süre boyunca geçirilmesiyle elde edilir. Elde edilen su ile cilt yıkanır veya cilde kompres şeklinde uygulanır. Yara, yanık, yavaş iyileşen deri enfeksiyonları ve ödem oluşumunun eşlik ettiği inflamatuvar durumlarda (özellikle başlangıç aşamasında) kullanılır. Ayrıca dişçilikte cerrahi öncesi dezenfeksiyon amacıyla da kullanılmaktadır^{106,121,122}.

Ozonlanmış su elde edilirken safsızlıklardan kaçınılması (örneğin Cl⁻ varlığında HOCl oluşumu) ve karışımın yarıömrünün öngörülen süreden daha kısa olmaması için mutlaka bidistile su kullanılmalıdır. Bidistile suya en az 20 dakika süreyle ozon/oksijen karışımı (60-80 µg/ml) uygulanır. Bu şekilde hazırlanan su 3-4 saat boyunca kullanılabilir. Elde edilen doz ozonun bidistile suda çözünürlüğüyle sınırlı olduğu için (yaklaşık 24 µg/ml) bu uygulamada aşırı dozaj söz konusu değildir^{19,106,121}.

2.5.2.6 Ozonlanmış Zeytinyağı Uygulaması

Ozonlandırılmış zeytinyağının deriye yüzeysel olarak uygulanması yoluyla fistül, dekübitis, ülser gibi dermatolojik hastalıkların tedavisinde kullanılabilir. Farmakolojik etkiden zeytinyağının ozonlandırılması sırasında oluşan ozonitler ve peroksitler sorumludur. Mantar ve bakteri öldürücü etkiyle lezyonların lokal dezenfeksiyonu sağlanır^{106,123}.

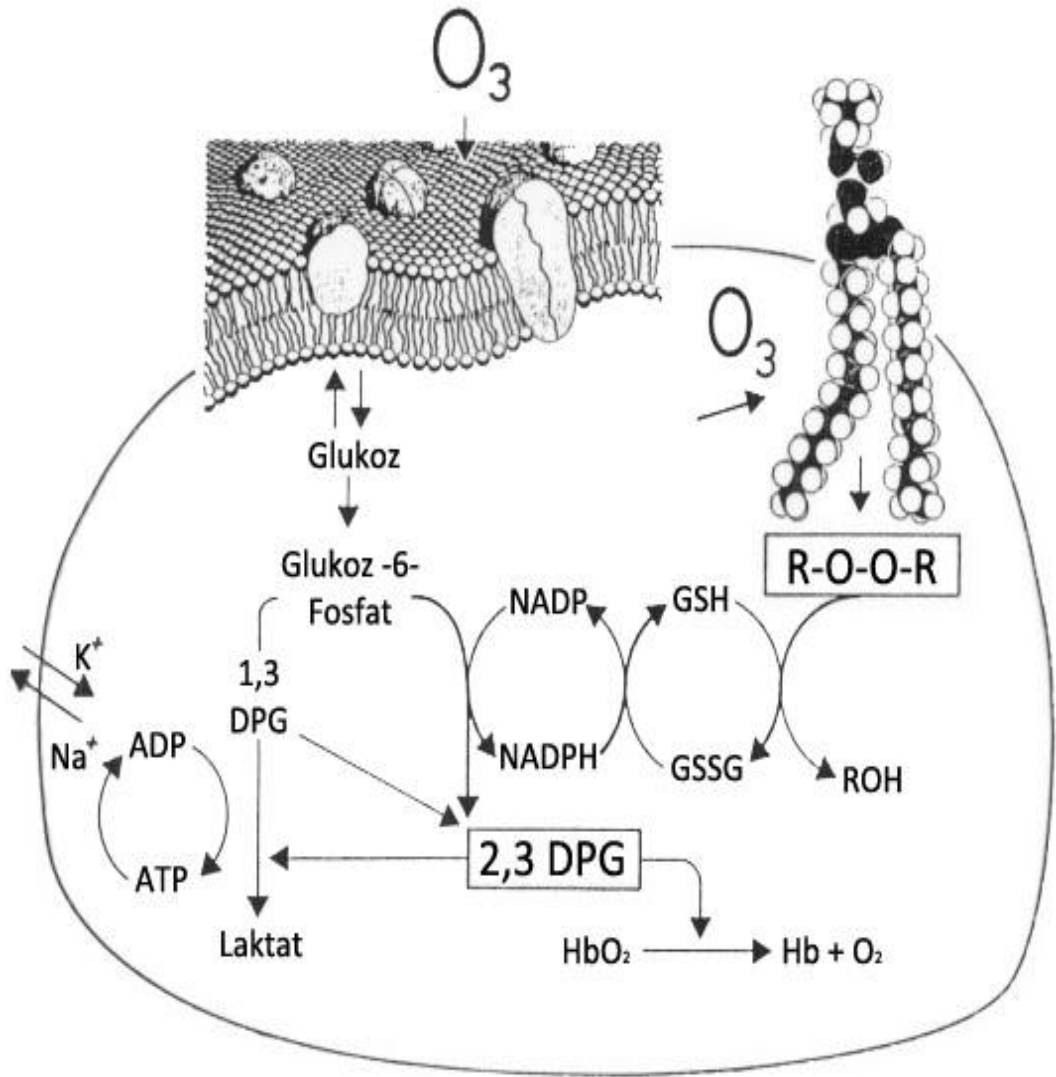
2.5.3 Ozonun Lokal ve Sistemik Etkileri

Ozonun lokal ve sistemik uygulamada farklı etki mekanizmalarına sahiptir. Bu mekanizmalar tablo 6'da verilmiştir. Lokal etkiler ozonun direkt antimikrobiyal ve yara iyileştirici özelliklerinden kaynaklanırken, sistemik etkiler eritrosit, lökosit gibi çeşitli hücrelerin aktivasyonu sonucu ortaya çıkmaktadır.

Tablo 6. Lokal ve sistemik uygulamada ozonun tıbbi etkileri^{106,124,126}.

<i>Topikal Uygulamada (Lokal Uygulama) Ozonun Tıbbi Etkileri</i>	<i>Ekstra-korporal Kan Tedavisinde (Sistemik Uygulama) Ozonun Tıbbi Etkileri</i>
1. Antimikrobiyal etkiler - Antibakteriyel - Antifungal - Antiviral	1. Alyuvar hücrelerinin uyarılmasıyla - Reolojik özelliklerinin gelişmesi - Alyuvar metabolizmasının aktivasyonu sonucu 2,3-DPG ve ATP artışı - HbO ₂ /Hb dengesinin sağa kayması - Oksijen açığa çıkarma özelliğinin artması
2. Yara iyileştirici etki 3. Bağışıklık sistemini harekete geçirici etki	2. Lökositlerin uyarılmasıyla - Mononükleer hücrelerin ılımlı aktivasyonu - Sitokinlerin serbest bırakılması (IL-1, IL-2, IFN- γ , TNF- α , TGF- β vb) 3. Biyolojik antioksidanların ve radikal süpürücülerin aktivasyonu ve indüksiyonu

Eritrositlerde H_2O_2 tarafından glikolizin aktivasyonu sonucu ATP ve 2,3-difosfoglisarat (2,3-DPG) oluşumu artar. 2,3-DPG hemoglobinin oksijene olan afinitesini azaltarak dokulara oksijen saliverilmesini kolaylaştırır. H_2O_2 'nin çoğu eritrositler tarafından temizlenerek GSH tarafından suya indirgenir¹¹¹ (Şekil 12).



Şekil 12. Ozonun eritrosit metabolizması üzerine etkileri¹²⁵ (Kaynaktaki şekil Türkçe'ye çevrilmiştir).

2.5.4. Ozon Tedavisinin Uygulandığı Çeşitli Hastalıklar

Ozon Tedavisinin uygulandığı bazı hastalıklar tablo 7’de verilmiştir.

Tablo 7. Ozonun kullanıldığı çeşitli hastalıklar ve uygulama şekilleri^{106,125}.

<i>Kullanıldığı Durumlar</i>	<i>Önerilen Uygulama Şekli</i>
1. Arteriyel Dolaşım Bozuklukları	
a. Periferel arteriyel dolaşım bozuklukları	* Majör Otohemoterapi
b. Serebral dolaşım bozuklukları	
2. Dışsal Ülserler ve Deri Lezyonları	
a. Yatak Yarası (Decubitis)	
b. Ameliyat sonrası lezyonlar	* Emilim kabı ile düşük basınçlı ozon irigasyonu
c. Radyasyon yaraları	* Ozona dirençli plastik bot
d. Diyabetik kangren	* Ozonlanmış su (kompres şeklinde)
e. Ulcus cruris	
f. Yanık	
3. Patolojik Bağırsak Hastalıkları	
a. Proktit ve kolit	* Rektal insüflasyon
b. Crohn hastalığı	
4. Viral Enfeksiyonlar	
a. Hepatit	* Majör Otohemoterapi
b. Herpes Simpleks (Uçuk) ve Herpes Zoster (Zona)	* Rektal insüflasyon
c. Genel bağışıklık ve direnç zayıflaması	
	* Majör Otohemoterapi
5. Karsinojenik Durumlar (Ek tedavi olarak)	* Rektal insüflasyon

6. Geriatrik Koşullar	
a. Genel canlandırma (Revitalizasyon)	* Majör Otohemoterapi
b. Yaşla bağlantılı maküler dejenerasyon	* Rektal insüflasyon
7. Romatizma ve Artrit	* İntraartiküler uygulama
a. Kronik poliartrit	* Majör Otohemoterapi (akut olmayan
b. Eklem enflamasyonu	dönemde)
8. Dişçilik	* Ozonlanmış su

Enfekte yaraların ozonla tedavisi iki aşamada değerlendirilebilir. Öncelikle ozon dezenfektan (antifungal, antiviral, antibakteriyel) özelliğinden yararlanmak için yüksek dozlarda (60-100 µg/ml) kullanılır. Ardından daha düşük dozda ozon ile tedaviye devam edilerek yara iyileşmesinin sağlanır. Rektal insüflasyon düşük basınçlı emilim kabı varlığında yapılması akciğerlerin ozona maruz kalınması riskinin önlenmesi açısından faydalıdır¹⁰⁶. Ozonun kullanıldığı bu hastalıkların ortak noktası kronik oksidatif stres (malondialdehit; hidrojen peroksit; total hidroperoksit gibi değerlerin patolojik olarak artması) ve anti-oksidan yetersizlik (örneğin SOD ve katalaz dengesizliği)'dir. Bu hastalıkların patolojik süreci üzerinde hormetik özellikte olması nedeniyle düşük dozda ozon düzenleyici etkilere sahiptir¹⁹.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1 Gereçler

3.1.1 Deney Hayvanları

Deneylerde 250-300 g ağırlığında erkek, 12 saat aydınlık 12 saat karanlık periyodunda senkronize edilen Wistar albino sıçanlar kullanılmıştır. Sıçanlar Kobay A.Ş. Laboratuvar Hayvanları Yetistirme ve Deneyisel Araştırmalar Merkezi'nden sağlanmıştır. Bu projede sıçanlar üzerinde yapılan tüm işlemler için Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan onay alınmıştır (G:Ü:ET-11.045, 16/05/2011).

3.1.2 Sarf Malzemesi

Endotoksin (*Escherichia coli* lipopolisakkaridi, O111:B4) (ET)
(L4130, Sigma)

Ozon / oksijen (%5 / %95) gaz karışımı (OZONOSAN)

EDTA'lı tüp (BD Vacutainer REF 368856)

Serum Fizyolojik (Haver)

ADMA Elisa Kit K 3001 (Immundiagnostik)

Steril enjektörler (Hayat 2, 5, 10 ml)

İnsülin enjektörü (Hayat 1ml 100IU)

Pipet uçları (Eppendorf)

Eppendorf tüp (0.5 ml) (Eppendorf)

Eppendorf tüp (1.5 ml) (Eppendorf)

Parafilm

Plastik eldiven

3.1.3 Araç ve Teçhizat

Ozon cihazı (OZONOSAN®)



Resim 1. Medikal ozon cihazı.

Spektrofotometre (Spectramax Plus 384)

Hassas terazi (Shimadzu. Co, AW320)

Vorteks (Firlabo. sa)

Isıticılı kabin (Biopac Systems)

Tail-cuff kuyruktan kan basıncı ölçme cihazı (Biopac Systems, NIBP200A)

Bilgisayarlı veri kayıt sistemi (MP30 Hardware Unit ve Student Lab Software, Biopac Systems Inc., Commat İletişim Ltd.)

Santrifüj cihazı (Nüve NF 800R)

Soğutucu (-80°C) (Sanyo MDF-U5186S)

Cerrahi set

Tek uçlu ve depolu otomatik pipetler (Eppendorf)

Zaman ölçer

Erlen

Cam tüp

3.2 Deney Grupları ve *In Vivo* Çalışmalar

Deneylerden önce sıçanların kuyruktan kan basıncı ölçümüne adaptasyonu için ön ölçümler alınmıştır. Deney günü ısıtma kabinine alınan hayvanların vücut ısıları artırılarak ölçüme hazır hale getirilmiş ve devamında her sıçan için üçer kez kan basınçları ve kalp hızları ölçülmüştür. Daha sonra her bir grup için aşağıdaki protokoller uygulanmıştır. LPS, serum fizyolojik içinde (5mg/ml) çözülmüştür.

1.Grup (Kontrol Grubu); bu gruptaki sıçanlara intraperitoneal (i.p.) serum fizyolojik (%0.9) enjeksiyonu uygulanmıştır. Uygulamadan hemen önce ve enjeksiyondan 1, 2, 3, 4 saat sonra *tail-cuff* (kuyruktan ölçüm) yöntemi ile kan basınçları ve kalp hızı kayıtları alınmıştır.

2.Grup (LPS Grubu); bu gruptaki sıçanlara i.p. olarak LPS enjeksiyonu (10 mg/kg) uygulanmıştır. Uygulamadan hemen önce ve enjeksiyondan 1, 2, 3, 4 saat sonra *tail-cuff* yöntemi ile kan basınçları ve kalp hızı kayıtları alınmıştır.

3.Grup (Tedavi-1 Grubu); bu gruptaki sıçanlara i.p. olarak LPS enjeksiyonu (10 mg/kg) uygulanmıştır. Uygulamadan hemen önce ve 1 saat sonra *tail-cuff* yöntemi ile kan basıncı ve kalp hızı kayıtları alınmış ve i.p. olarak 0,1 mg/kg ozon enjeksiyonu yapılmıştır. Daha sonra birer saat

ara ile (2, 3 ve 4. saatte) kan basınçları ve kalp hızı ölçümlerine devam edilmiştir.

4.Grup (Tedavi-2 Grubu); bu gruptaki sıçanlara i.p. olarak LPS enjeksiyonu (10 mg/kg) uygulanmıştır. Uygulamadan hemen önce ve 1 saat sonra *tail-cuff* yöntemi ile kan basıncı ve kalp hızı kayıtları alınmış ve i.p. olarak 0,3 mg/kg ozon enjeksiyonu yapılmıştır. Daha sonra birer saat ara ile (2, 3 ve 4. saatte) kan basınçları ve kalp hızı ölçümlerine devam edilmiştir.

5.Grup (Tedavi-3 Grubu); bu gruptaki sıçanlara i.p. olarak LPS enjeksiyonu (10 mg/kg) uygulanmıştır. Uygulamadan hemen önce ve 1 saat sonra *tail-cuff* yöntemi ile kan basıncı ve kalp hızı kayıtları alınmış ve i.p. olarak 1,0 mg/kg ozon enjeksiyonu yapılmıştır. Daha sonra birer saat ara ile (2, 3 ve 4. saatte) kan basınçları ve kalp hızı ölçümlerine devam edilmiştir.

6.Grup (Ozon Grubu); bu gruptaki sıçanlara i.p. olarak daha önceki gruplarda kullanılan üç farklı dozun en yükseği olan (1,0 mg/kg) ozon i.p. uygulanmıştır. Uygulamadan hemen önce ve enjeksiyondan 1, 2, 3, 4 saat sonra *tail-cuff* yöntemi ile kan basınçları ve kalp hızı kayıtları alınmıştır.

3.3 Serum Örneklerinin Hazırlanması ve Biyokimyasal Ölçümlerin Yapılması

Deney sonunda sıçanlara sodyum tiyopental (60 mg/kg, i.p) verilerek genel anestezi uygulanmıştır. Daha sonra kan örnekleri EDTA'lı cam tüplere alınarak 10.000 rpm'de 10 dk. santrifüjlenerek elde edilen plazma biyokimyasal incelemeler için -80°C'de saklanmıştır.

3.3.1 Plazma Nitrik Oksit Düzeylerinin Ölçümü

NO düzeyleri Griess yöntemiyle ölçülmüştür. Plazma ve standartlar $ZnSO_4$ ve NaOH ile 13.000 g de 20 dakika santrifüjlenmiş ve enfluent $CuSO_4$ ile kaplanmış kadmiyum granülleri ile 20 dakika çalkalanmıştır. 96 kuyulu plağın her bir kuyusuna hazırlanan çözelti ve reaktifler (N-naftil etilendiamin ve sülfanilik asit) eklenerek spektrofotometrede 546 nm de değerler okunmuştur. Standart eğri için 0-1000 μM Na-nitrit kullanılmıştır.

3.3.2 Plazma Asimetrik Dimetil Arjinin Düzeylerinin Ölçümü

Hazır ADMA kitleriyle (*K3001 ADMA ELISA Kit*) kompetitif ELIZA yöntemi kullanılarak ölçülmüştür.

3.3.3 Plazma Total Antioksidan Kapasitesi Ölçümü

Total antioksidan kapasite, plazma antioksidanları tarafından Cu^{2+} 'nin Cu^{+} 'e indirgenmesi esasına göre kromojenik madde olarak neokuproin kullanılarak ölçülmüştür. 96 kuyulu plağın her bir kuyusuna, örnek plazma veya standart ardından üzerine Kuprik Amonyum Klorür, Neokuproin ve Amonyum asetat tamponu eklenmiştir. İnkübasyonun ardından ve spektrofotometrede 455 nm de değerler okunmuştur. Standart eğri için, 0-1000 μM Trolox kullanılmıştır.

3.4 Sonuçların Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analiz

Deneylerden elde edilen sonuçlar “ortalama $\pm$ ortalamanın standart hatası” şeklinde ifade edilmiştir. Aynı grubun farklı zamanlardaki

kan basınçları ve kalp hızlarına ilişkin veriler tekrarlayan ölçümlerde tek yönlü varyans analizinin ardından post-hoc Dunnett's testi ile değerlendirilmiştir. Biyokimyasal ölçümlerin değerlendirilmesinde ise kontrol ve LPS grupları ile yapılan karşılaştırmalar için student t testi kullanılmıştır. İstatistiksel analizler bir paket program (*GraphPad Prism version 5.00 for Windows: GraphPad Software, San Diego, California, Amerika*) kullanılarak yapılmıştır. 0.05'den küçük P değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1 Deney Gruplarındaki Sıçanlarda Ölçülen Sistolik Kan Basıncı (SKB) ve Kalp Hızı (KH) Değerleri

4.1.1 Kontrol Grubunun SKB ve KH Sonuçları

Kontrol grubundaki sıçanların tedavi öncesinde ölçülen ortalama SKB'ları (116.63 ± 3.07) ve ortalama KH'ları (359.72 ± 12.89) ile intraperitoneal SF uygulamasından sonraki 1, 2, 3 ve 4. saatlerde ölçülen ortalama SKB değerleri (sırasıyla; 109.81 ± 1.51 , 110.23 ± 2.41 , 108.81 ± 4.33 ve 110.43 ± 3.27) ve ortalama KH değerleri (sırasıyla; 352.15 ± 12.08 , 350.26 ± 16.65 , 349.75 ± 14.41 ve 356.15 ± 15.05) arasında istatistiksel anlamlı bir fark bulunmamıştır (Şekil 13).

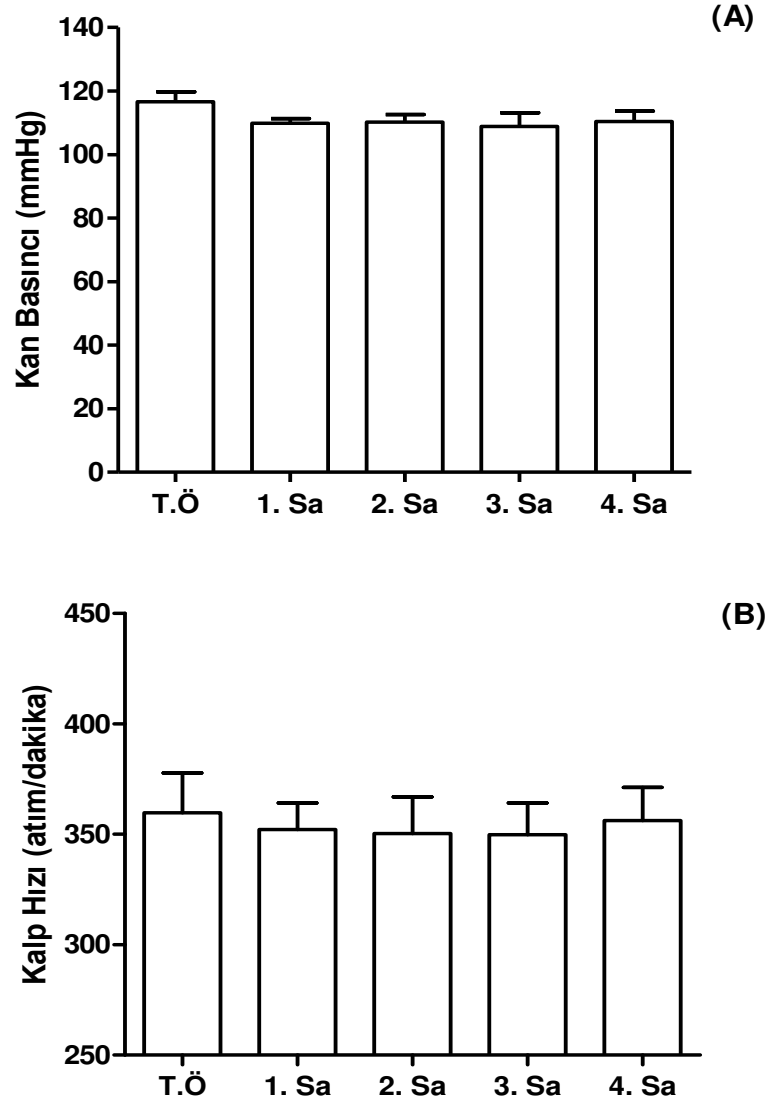
4.1.2 LPS Grubunun (endotoksemik şok grubu) SKB ve KH Sonuçları

Endotoksemik şok grubunda, tedavi öncesine göre LPS uygulamasından sonraki 1, 2, 3 ve 4. saatlerde ortalama SKB değerlerinde (sırasıyla; 81.23 ± 7.62 , 83.36 ± 8.32 , 88.21 ± 7.77 ve 79.76 ± 4.43) istatistiksel olarak anlamlı bir azalma, KH değerlerinde (sırasıyla; 420.31 ± 7.23 , 422.00 ± 9.52 , 417.58 ± 6.79 ve 429.53 ± 9.73) ise istatistiksel olarak anlamlı bir yükselme gözlenmiştir (Şekil 14).

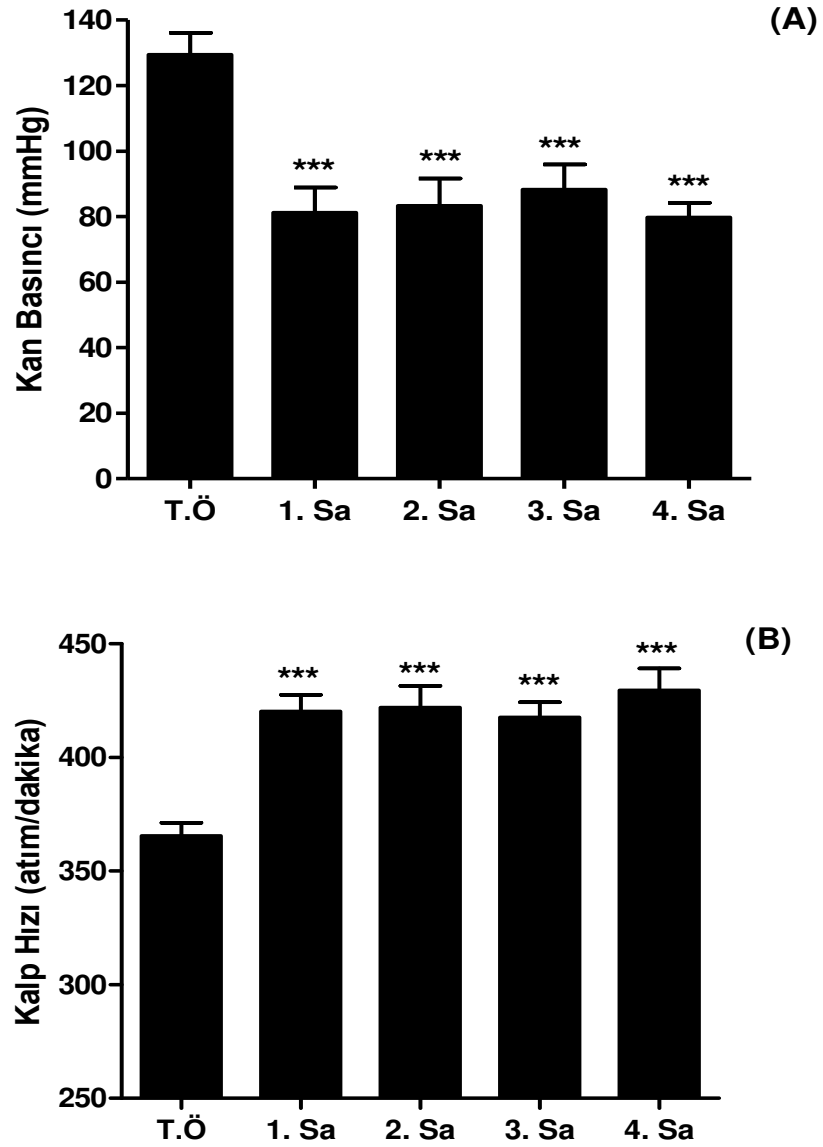
4.1.3 Tedavi-1 (0.1 mg/kg Ozon) Grubunun SKB ve KH Sonuçları

LPS uygulaması ile endotoksemik şok oluşturulan deney grubunda ortalama SKB'da gözlenen düşüş birinci saatte uygulanan

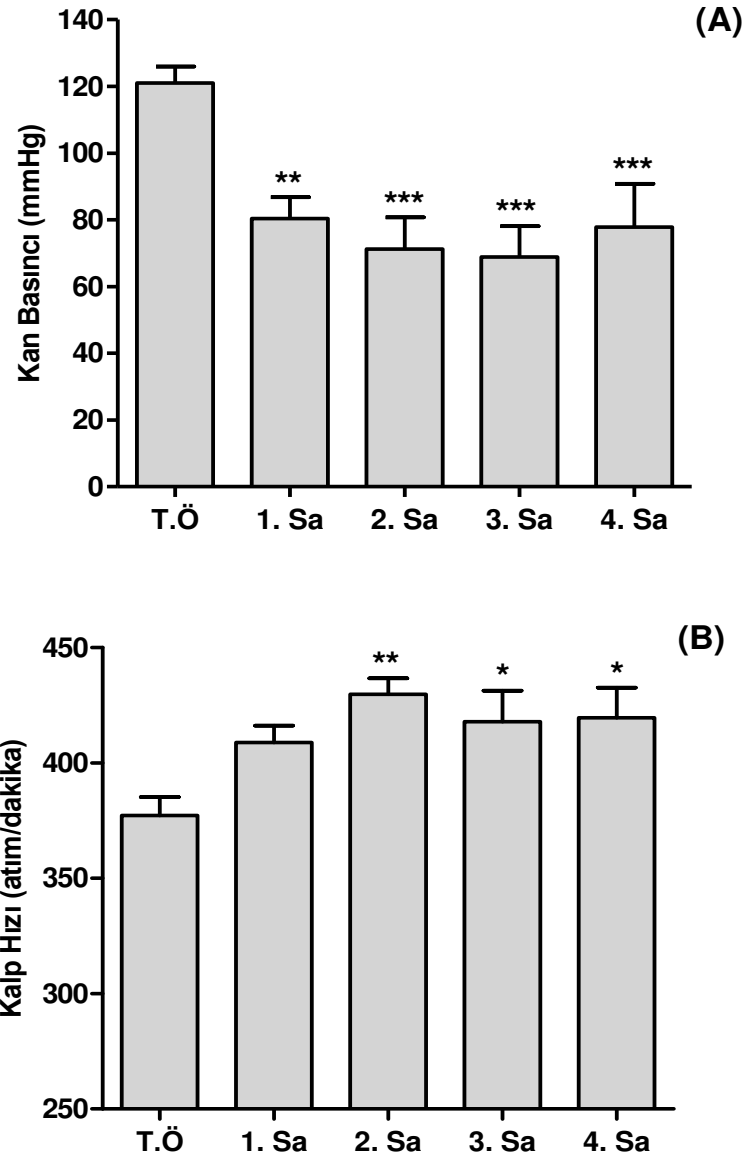
0.1mg/kg ozon (i.p.) ile geri çevrilememiştir. Birinci saat hariç KH değerleri tedavi öncesinden farklı bulunmuştur (Şekil 15).



Şekil 13. Kontrol grubunda ölçülen sistolik kan basıncı (SKB) ve kalp hızı (KH) değerleri. İntraperitoneal SF enjeksiyonundan önce ve 1, 2, 3, 4 saat sonra SKB (A) ve KH (B) ölçülmüştür. SF: Serum Fizyolojik, T.Ö: Tedavi Öncesi.



Şekil 14. Sıçanlarda LPS ile oluşturulan endotoksemik şok modelinde sistolik kan basıncı (SKB) ve kalp hızı (KH) değerleri. LPS (10mg/kg, i.p.) enjeksiyonundan önce ve 1, 2, 3, 4 saat sonra SKB (A) ve KH (B) ölçülmüştür. LPS: Lipopolisakkarit, T.Ö: Tedavi öncesi *T.Ö'den farklı (Tekrarlayan ölçümlerde tek-yönlü varyans analizi, post hoc Dunnett; ***p<0.0001).



Şekil 15. Sıçanlarda LPS ile oluşturulan endotoksemik şok modelinde 0.1mg/kg ozon uygulamasının (Tedavi-1) sistolik kan basıncı (SKB) ve kalp hızı (KH) üzerine etkileri. LPS (10mg/kg, i.p.) enjeksiyonundan önce ve 1, 2, 3, 4 saat sonra SKB (A) ve KH (B) ölçülmüştür. 1. saatte ozon (0.1mg/kg, i.p.) enjekte edilmiştir. LPS: Lipopolisakkarit, T.Ö: Tedavi öncesi. *T.Ö'den farklı (Tekrarlayan ölçümlerde tek-yönlü varyans analizi, post hoc Dunnett; *p<0.05, **p<0.01, *** p<0.0001).

4.1.4 Tedavi-2 (0.3 mg/kg Ozon) Grubunun SKB ve KH Sonuçları

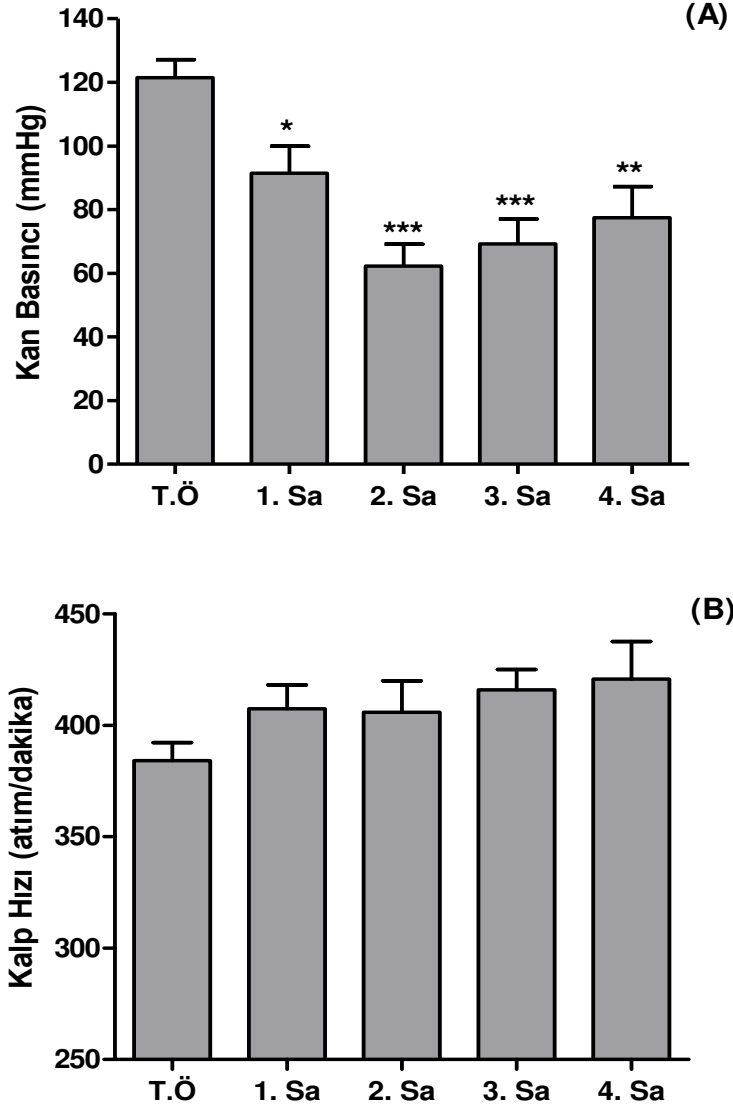
LPS uygulaması ile endotoksemik şok oluşturulan deney grubunda ortalama SKB'da gözlenen düşüş 0.3mg/kg (i.p.) ozon ile geri çevrilememiştir. Ancak, LPS uygulaması ile endotoksemik şok oluşturulan deney grubunda ortalama KH'da gözlenen artış 0.3mg/kg ozon ile geri çevrilmiş ve ölçülen ortalama KH değerlerinde bir miktar artış gözlenirse bile tedavi öncesine göre istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır (Şekil 16).

4.1.5 Tedavi-3 (1 mg/kg Ozon) Grubunun SKB ve KH Sonuçları

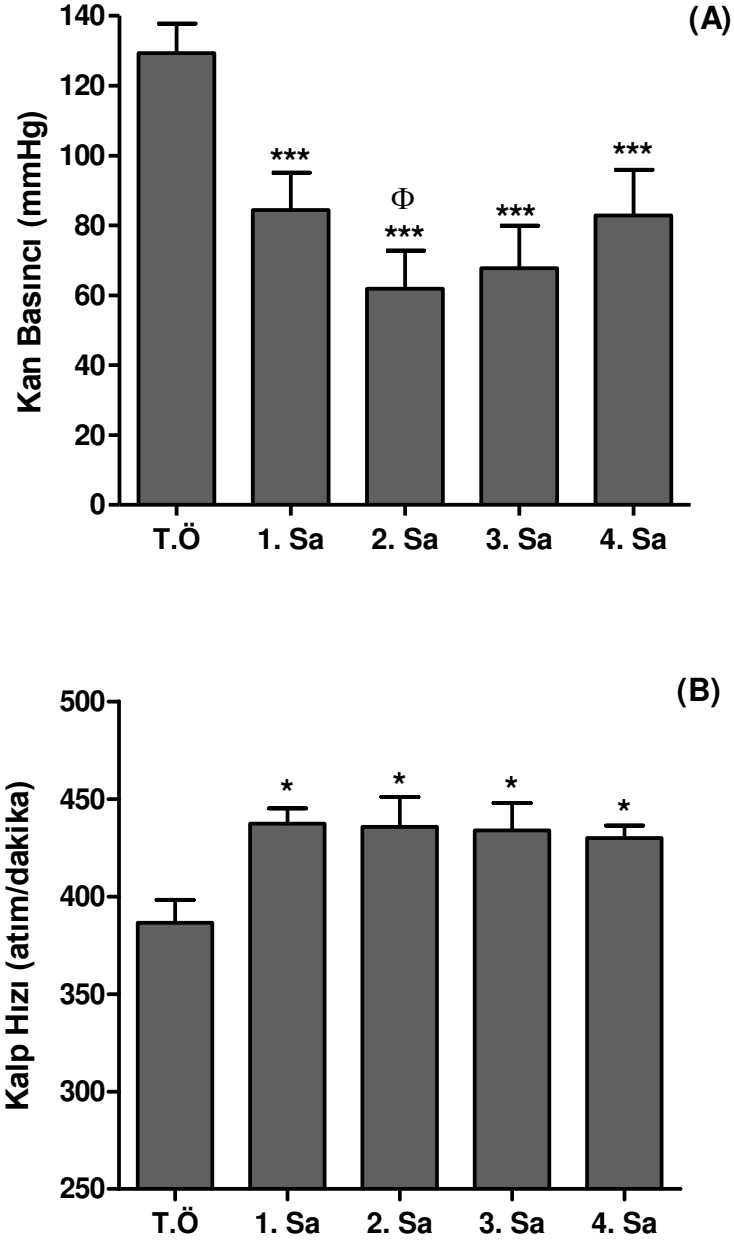
LPS uygulaması ile endotoksemik şok oluşturulan deney grubunda ortalama SKB'da gözlenen düşüş 1.0 mg/kg (i.p.) ozon ile geri çevrilememiştir. Aksine ozondan bir saat sonra ölçülen ortalama SKB 1. saatte ölçülenden düşük bulunmuştur. 1, 2, 3 ve 4. saatte ölçülen ortalama KH değerleri LPS uygulaması ile endotoksemik şok oluşturulan deney grubunda olduğu gibi tedavi öncesine göre yüksek bulunmuştur (Şekil 17).

4.1.6 Ozon (1 mg/kg Ozon) Grubunun SKB ve KH Sonuçları

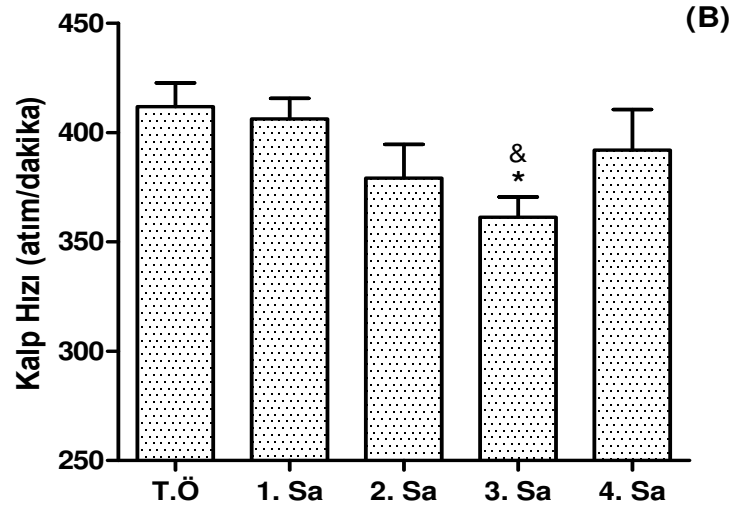
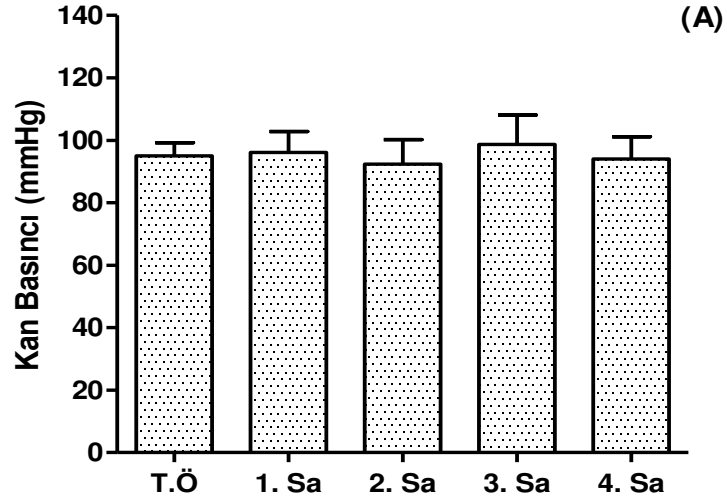
Tek başına ozon tedavisinin etkilerini görmek amacıyla uyguladığımız en yüksek dozu olan 1.0 mg/kg ozon (i.p.) uygulandığında tedavi öncesi ve sonrasında ölçülen ortalama SKB değerlerinde anlamlı değişikliğe neden olmamıştır. Ozon uygulamasından sonra 3. saatteki ortalama KH değeri tedavi öncesi ve ozon uygulamasından sonra 1. saate göre daha düşük bulunmuştur (Şekil 18).



Şekil 16. Sıçanlarda LPS ile oluşturulan endotoksemik şok modelinde 0.3mg/kg ozon uygulamasının (Tedavi-2) sistolik kan basıncı (SKB) ve kalp hızı (KH) üzerine etkileri. LPS (10 mg/kg, i.p.) enjeksiyonundan önce ve 1, 2, 3, 4 saat sonra SKB (A) ve KH (B) ölçülmüştür. 1. saatte ozon (0.3mg/kg, i.p.) enjekte edilmiştir. LPS: Lipopolisakkarit, T.Ö: Tedavi öncesi. *T.Ö'den farklı (Tekrarlayan ölçümlerde tek-yönlü varyans analizi, post hoc Dunnett; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.0001).



Şekil 17. Sıçanlarda LPS ile oluşturulan endotoksemik şok modelinde 1.0mg/kg ozon uygulamasının (Tedavi-3) sistolik kan basıncı (SKB) ve kalp hızı (KH) üzerine etkileri. LPS (10mg/kg, i.p.) enjeksiyonundan önce ve 1, 2, 3, 4 saat sonra SKB (A) ve KH (B) ölçülmüştür. 1. saatte ozon (1.0mg/kg, i.p.) enjekte edilmiştir. LPS: Lipopolisakkarit, T.Ö: Tedavi öncesi. *T.Ö'den farklı, Φ 1.saatten farklı (Tekrarlayan ölçümlerde tek-yönlü varyans analizi, post hoc Dunnett; ***p<0.0001, Φ p<0.05).

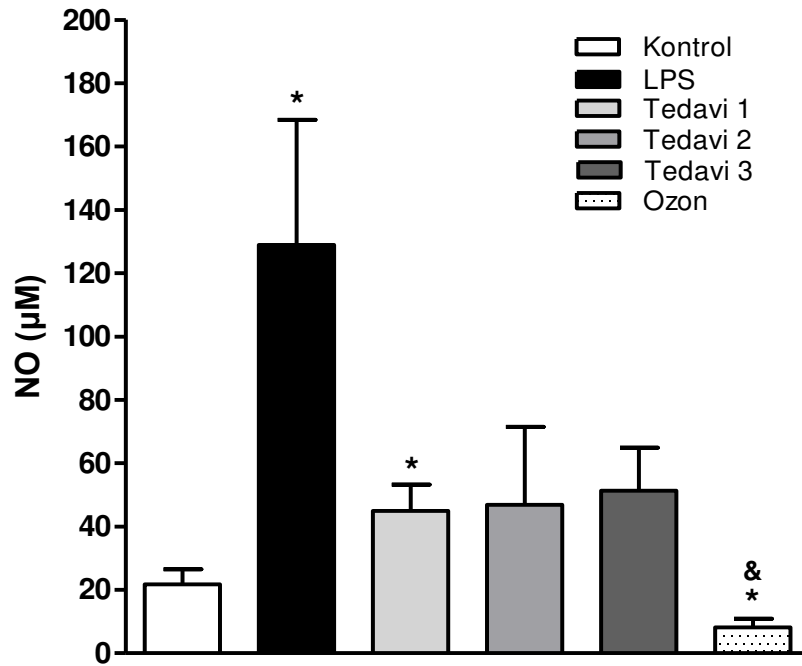


Şekil 18. Tek başına ozon uygulamasının sistolik kan basıncı (SKB) ve kalp hızı (KH) üzerine etkisi. SF enjeksiyonundan önce ve 1, 2, 3, 4 saat sonra SKB (A) ve KH (B) ölçülmüştür. 1. saatte ozon (1.0 mg/kg, i.p.) enjekte edilmiştir. T.Ö: Tedavi öncesi. *T.Ö'den farklı, &1.saatten farklı (Tekrarlayan ölçümlerde tek-yönlü varyans analizi, post hoc Dunnett; * $p < 0.05$).

4.2 Deney Gruplarındaki Sıçanların Plazmalarında Ölçülen Biyokimyasal Parametreler

4.2.1 Plazma Nitrik Oksit Düzeyleri

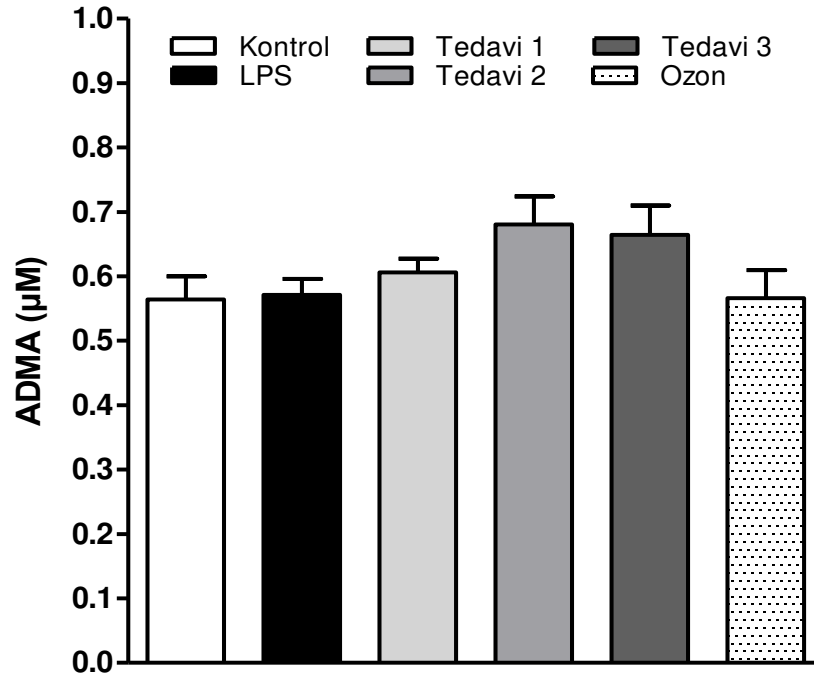
LPS (10mg/kg, i.p.) uygulanan grupta plazma NO düzeyleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur. Tek başına ozon verilen grupta ölçülen NO değerleri hem kontrol grubundan hem de LPS grubundan istatistiksel anlamlı olarak düşük bulunmuştur. Endotoksemik şok gruplarında LPS ile artan NO düzeylerinin doz bağımlı olarak ozon tedavisi ile kontrol düzeylerine düştüğü anlamlı olarak gözlenmiştir (Şekil 19).



Şekil 19. Sıçanlarda LPS ile oluşturulan endotoksemik şok modelinde ozon tedavisi sonucunda elde edilen plazma NO değerleri. Kontrol grubuna (SF), LPS grubuna LPS (10mg/kg, i.p.), Tedavi 1, 2 ve 3 gruplarına LPS den 1 saat sonra sırası ile 0.1, 0.3 ve 1.0mg/kg ozon uygulanmıştır. Tek başına ozon grubuna SF'den 1 saat sonra 1.0mg/kg ozon uygulanmıştır. SF: Serum Fizyolojik, LPS: Lipopolisakkarit, NO: Nitrik Oksit. *Kontrol grubundan farklı ($p<0.05$), &LPS grubundan farklı ($p<0.01$) (student t test).

4.2.2 Plazma Asimetrik Dimetil Arjinin Düzeyleri

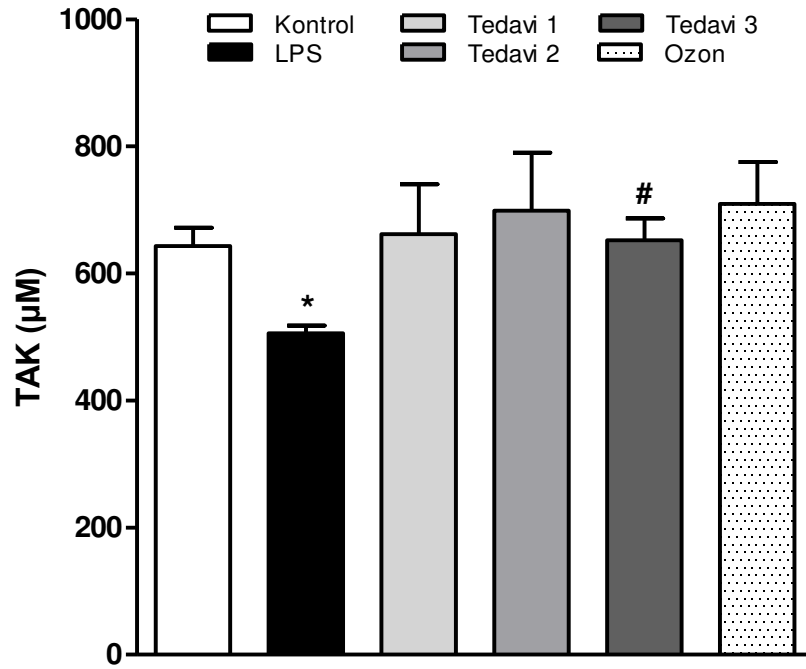
Kontrol (SF) grubunda, LPS (10mg/kg, i.p.) grubunda ve tek başına ozon verilen grupta ölçülen ADMA değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. Doz bağımlı olarak ozon tedavisi verilen gruplarda gözlenen ADMA değerlerindeki artış da istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Şekil 20).



Şekil 20. Sıçanlarda LPS ile oluşturulan endotoksemik şok modelinde farklı dozlarda ozon tedavisi sonucunda elde edilen plazma ADMA değerleri. Kontrol grubuna (SF), LPS grubuna LPS (10mg/kg, i.p.), Tedavi 1, 2 ve 3 gruplarına LPS den 1 saat sonra sırası ile 0.1, 0.3 ve 1.0mg/kg ozon uygulanmıştır. Tek başına ozon grubuna SF'den 1 saat sonra 1.0mg/kg ozon uygulanmıştır. SF: Serum Fizyolojik, LPS: Lipopolisakkarit, ADMA: Asimetrik dimetilarjinin.

4.2.3 Plazma Total Antioksidan Kapasitesi

LPS (10mg/kg, i.p.) uygulanan grupta plazma TAK düzeyleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük bulunmuştur. Tek başına ozon verilen grupta ölçülen TAK değerleri kontrol grubundan istatistiksel anlamlı olarak farklı bulunmamıştır. Endotoksemik şok gruplarında LPS ile düşen TAK düzeylerinin ozon tedavisi ile kontrol düzeylerine yükseldiği anlamlı olarak gözlenmiştir (Şekil 21).



Şekil 21. Sıçanlarda LPS ile oluşturulan endotoksemik şok modelinde farklı dozlarda ozon tedavisi sonucunda elde edilen plazma TAK değerleri. Kontrol grubuna (SF), LPS grubuna LPS (10mg/kg, i.p.), Tedavi 1, 2 ve 3 gruplarına LPS den 1 saat sonra sırası ile 0.1, 0.3 ve 1.0mg/kg ozon uygulanmıştır. Tek başına ozon grubuna SF'den 1 saat sonra 1.0mg/kg ozon uygulanmıştır. SF: Serum Fizyolojik, LPS: Lipopolisakkarit, TAK: Total Antioksidan kapasite. *Kontrol grubundan farklı ($p<0.01$) #LPS grubundan farklı ($p<0.01$) (student t test).

5. TARTIŞMA

Sepsis sonucu ortaya çıkan septik şok tablosunun, organizmanın kanında canlı bakterilerin bulunması (bakteriyemi) sonucu enfeksiyon kaynağı olan mikroorganizma tarafından üretilen toksinlere veya bu mikroorganizmanın toksik parçalanma ürünlerine karşı organizmanın verdiği şiddetli sistemik inflamatuvar yanıt olarak kabul edilmektedir²⁰.

Ölümlle sonuçlanabilen septik şok patojenezi oldukça karmaşıktır. Gram negatif bakteri membranlarında bulunan LPS'nin immun sistemi aşırı uyarmasıyla ortaya çıkan proinflamatuvar sitokin ve interferonlar, koagülasyon kaskadı başta olmak üzere birçok biyokimyasal yolağın uyarılmasına neden olmaktadır. Septik şok sırasında nitrik oksit sentazın indüklenebilir izoformunun (iNOS, NOS₂) aktivasyonu sonucu aşırı miktarda salıverilen nitrik oksit (NO) arteriyal hipotansiyona neden olmaktadır^{43,74}. Endojen bir molekül olan ADMA, NOS'un non-selektif, kompetitif inhibitörüdür. Şiddetli sepsisli hastaların plazmasında gittikçe artan düzeyde ADMA tespit edilmiştir. Ayrıca ADMA düzeylerinin organ yetmezliği gelişme riski, vazopresör ihtiyacı, laktik asidoz, TNF- α ve IL-6 düzeyleri ile ilişkili olduğu gösterilmiştir^{88,126}. Sıçanlarda LPS ile oluşturulan endotoksemik şokta ve tedavi amacıyla intraperitoneal ozon uygulamalarında ortaya çıkan kan basıncı ve kalp hızı değişiklikleri ile buna paralel olarak plazmada NO, TAK ve ADMA düzeylerindeki değişiklikler bu tez kapsamında incelenmiştir.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda sepsis/SIRS ve ARDS'de meydana gelen vasküler patolojilerde inflamatuvar hücre adezyonunu düzenlemesi ve direkt endotelial hasar nedeniyle ROT ve RNT'nin önemli katkısı bulunduğu gösterilmiştir⁹⁷. SIRS veya septik şoklu hastalarda

antioksidan kapasitedeki azalma ve reaktif oksijen türlerindeki artmanın çoklu organ yetmezliğine neden olduğunu gösterilmiştir^{100,101}.

Sepsis patofizyolojisinin ardında yatan olaylar ve mekanizmalar son yıllarda artan bir hızla ortaya çıkarılmaktadır. Bu mekanizmaları hedef alan çeşitli spesifik tedaviler ya başarısızlıkla sonuçlanmış ya da farklı klinik uygulamalarda farklı sonuçlar vermesi nedeniyle rutin tedavide yerini alamamıştır. Tedavinin kendi başarısızlığının yanı sıra sepsisli hastaların oldukça heterojen (yaş, altta yatan durum, enfeksiyon odağı, hastaneye başvuru sırasında hastalığın bulunduğu aşama) olması da sonuçları etkilemektedir¹²⁷.

Daha çok antimikrobiyal etkisiyle tanınan ozonun, bunun yanı sıra doku oksijenasyonunu artırıcı, bağışıklık sistemini uyarıcı, antioksidan enzim aktivitesini artırıcı özelliklerinin de olduğu günümüzde bilinmektedir. Ozon; oksidatif stres, azalmış antioksidan savunma, doku hasarının eşlik ettiği birçok hastalıkta başarılı ve tekrarlanabilir sonuçlar vermektedir¹⁹. Proflaktik amaçlı ozon tedavisi çeşitli deneysel sepsis çalışmalarında olumlu sonuçlar vermiştir¹²⁸⁻¹³¹. Fakat sepsisin ne zaman ortaya çıkacağı öngörülememektedir. Klinik uygulanabilirliği açısından bu çalışmada ozonun tedavi edici etkilerinin olup olmadığı araştırılmıştır.

Çalışmamızda elde edilen bulgulara göre sıçanlara periton içine SF uygulaması kan basıncı ve kalp hızlarında dört saat boyunca herhangi bir değişikliğe neden olmamıştır. Diğer yandan, sıçanlara endotoksin (LPS, i.p.) uygulanmasının ardından birinci saatten başlayarak dördüncü saate kadar belirgin olarak kan basıncı değerleri azalmış ve kalp atım hızları artmıştır. Bu sonuçlar uygulanan deneysel modelde endotoksemik şokun oluşturulduğunun göstergesi olarak kabul edilmiştir. NO düzeylerindeki artmaya paralel olarak meydana gelen kan basıncı

düşüşü, kalp hızı artışıyla kompanse edilmeye çalışılmıştır. Elde ettiğimiz bu veriler Cüez ve arkadaşlarının¹³² endotoksin ile sıçanlarda oluşturdukları endotoksemik şok modelindeki kan basıncı düşüşü ve kalp atım hızı yükselmesiyle uyumluluk göstermektedir.

Üç farklı dozda (0.1, 0.3 ve 1.0 mg/kg periton içine) ozon uygulamasının LPS ile endotoksemik şok oluşturulan sıçanlarda kan basınçları ve kalp hızları üzerine etkileri incelendiğinde tüm dozlarda ve zamanlarda LPS ile oluşan kalp atım hızındaki artışı geri çevirememiştir. Ayrıca endotoksemik şok oluşturulmuş sıçanlarda bu üç dozda intraperitoneal ozon uygulamasının hipotansiyonu düzeltici etkisinin ortaya çıkmadığı gözlenmiştir. Diğer yandan tek başına 1.0 mg/kg ozon periton içerisine verildiğinde sıçanların ortalama kan basınçları ve ortalama kalp hızlarında üçüncü saat hariç olmak üzere herhangi bir değişikliğe neden olmadığı gözlenmiştir. Tek başına 1.0 mg/kg ozon i.p. verildikten sonra üçüncü saatte ortalama kalp hızında anlamlı bir düşme gözlenmiş, daha sonra bu düşme de ortadan kalkmıştır. Bu durum aynı saatte istatistiksel anlamlı olmamakla birlikte ortalama kan basınçlarındaki hafif yükselmeye refleks olarak oluştuğu düşünülebilir.

Endotoksemik şok oluşturulan grupta plazma TAK düzeyleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük bulunmuştur. Kaymak ve arkadaşları¹³³ da sıçanlarda E.coli inokülasyonundan 6 saat sonra serumda total antioksidan kapasitenin azaldığını gözlemlemişlerdir. Bu sonuçlar bizim çalışmamızla uyumludur. LPS verilen gruplara periton içine ozon uygulaması ile her üç dozda da TAK değerlerinin kontrolden farklı olmadığı bulunmuştur. Sonuçlar incelendiğinde, ozon tedavisinin LPS uygulamasıyla azalan total antioksidan kapasiteyi artırma eğiliminde olduğu anlaşılmaktadır. Fakat LPS grubu ile tedavi gruplarının TAK değerleri açısından istatistiksel

olarak anlamlılık sadece 1.0 mg/kg ozon içeren dozda gözlenmiştir. Guanche ve arkadaşları¹³⁴ fekal materyalin intraperitoneal enjeksiyonu ile oluşturdukları sepsis modelinde total antioksidan kapasitenin azaldığını ve ozon ile yapılan önkoşullama sonucu bu düzeylerin arttığını gözlemlemişlerdir. Rodríguez ve arkadaşları¹³⁵ farelerde farklı dozlarda ozonla önkoşullama yapılmış ve ardından intraperitoneal yoldan E.coli endotoksini enjeksiyonu ile endotoksik şok oluşturmuştur. Endotoksik şokta artan hepatik TBARS düzeyi ozon önkoşullamasıyla azalmış, şokta azalan hepatik glutatyon peroksidaz aktivitesi ise ozon tedavisi sonucu artmıştır. Bu veriler bizim sonuçlarımızla uyumluluk göstermektedir.

Endotoksemik şok oluşturulan LPS grubundaki sıçanların plazma nitrik oksit düzeylerinde meydana gelen artma, ozon uygulamasıyla azalma eğilimi göstermektedir. Fakat istatistiksel olarak anlamlılık gözlenmemiştir. Tek başına ozon uygulanan grupta nitrik oksit düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak azalmıştır. Bu durum sıçanlarda periton içine ozon uygulamalarının nitrik oksit düzeylerini azalma yönünde etkilediğini göstermektedir ve ölümcül hipotansiyonun nedenlerinden biri olan plazma NO artışının geri çevrilmesinde rol alabileceğini düşündürmektedir. Alvarez ve arkadaşlarının¹³⁶ farelerde intraperitoneal E.coli endotoksini enjeksiyonu ile oluşturduğu endotoksik şok modelinde de benzer olarak artan nitrit düzeylerinin, ozon önkoşullamasıyla azaldığı gözlemlenmiştir.

TNF- α ve IL-1 septik şokta rol oynayan temel mediyatörlerdir^{137,138}. TNF- α 'nın ise iNOS sentezini güçlü bir şekilde indüklediği bilinmektedir. Zamora ve arkadaşları ozon ön tedavisinin endotoksik şokta TNF- α salıverilmesini azalttığı gözlemlemiştir¹²⁶. Bu durum, ozon tedavisiyle gözlemlenen NO düzeylerindeki azalışın, TNF- α inhibisyonu nedeniyle iNOS üzerindeki indükleyici etkinin ortadan kalkması

sonucu oluřtuđunu dűřűndűrmektedir.  ztař ve arkadařları¹³⁹ tarafından iNOS inhibisyonunun akut nekrotizan pankreatitte ozonun terapötik etkindiđini azalttıđını gözlemlemesi, ozonun NO  zerindeki etkisine iNOS inhibisyonunun aracılık ettiđi dűřűncesini desteklemektedir.

Çalışmamızda plazma ADMA düzeylerinde ise gruplar arasında farklılık gözlenmemiştir. Bu durum endotoksik şokta artmış plazma nitrik oksit düzeylerinin ADMA aktivitesinden bağımsız olduğunu dűřűndűrmektedir. Sepsiste düzeyleri artmış olan süperoksit radikalleri ve nitrik oksitin oluşturduğu peroksinitritin, ADMA'nın yıkılımindan sorumlu olan enzimi inhibe ederek ADMA ak m lasyonuna neden olduğuyla ilgili çalışmalar olmasına rağmen bizim bulgularımızda ADMA akümülasyonu g zlenmemiřtir¹⁴⁰.

Bu tez çalışmasında elde edilen bulgular, endotoksemik şokta ozon tedavisinin kan basıncı ve kalp hızları üzerine anlamlı iyileştirici etkilerinin olmadığını gösterse de bazı biyokimyasal parametreler üzerine düzeltici etkilerinin olabileceğini dűřűndűrmektedir. Zira özellikle artmış NO ve azalmış TAK doku hasarı ve organ fonksiyon bozukluğunda rol olan en önemli faktörlerdendir. Daha sonra yapacağımız çalışmalarda ozon tedavisinin bu faktörler üzerindeki etkilerinin organ hasarları, TNF-  düzeyi, doku laktat düzeyi, mortalite ve tedavi prognozu açısından değerlendirmelerinin yapılması planlanmaktadır. Fakat uygun dozun saptanması için 1 mg/kg'ın üzerindeki dozlarda ozonun kullanıldığı bir çalışma yapılmasına ihtiyaç olduğu anlaşılmaktadır.

6. SONUÇ

Bu tez çalışmasında sıçanlarda *Escherchia Coli* endotoksini kullanılarak endotoksik şok modeli oluşturulmuştur. Ardından sıçanlara antimikrobiyal, doku perfüzyonunu artırıcı, biyolojik antioksidanları aktive edici etkili bir molekül olan ozon farklı dozlarda (0.1, 0.3, 1.0 mg/kg) uygulanmış ve bozulmuş olan fizyolojik ve biyokimyasal parametreleri düzenleyici etkisi olup olmadığı araştırılmıştır. Bu amaçla kan basıncı, kalp hızı, plazma nitrik oksit ve asimetrik dimetil arjinin düzeyleri ile plazma total antioksidan kapasitesi ölçülmüş ve kontrol grubu verileriyle karşılaştırılmıştır.

Elde edilen bulgular, endotoksemik şokta ozon tedavisinin kullanılan doz ve zaman aralığında kan basıncı ve kalp hızları üzerine anlamlı iyileştirici etkilerinin olmadığını gösterse de NO, TAK gibi bazı biyokimyasal parametreler üzerine düzeltici etkilerinin olabileceğini düşündürmektedir. Zira özellikle NO ve TAK bozulan hemodinamik göstergelerde rol alan en önemli faktörlerdendir. Daha sonra yapacağımız çalışmalarda ozon tedavisinin bu faktörler üzerindeki etkilerinin organ hasarları, mortalite ve tedavi prognozu açısından değerlendirmelerinin yapılması planlanmaktadır. Ozon tedavisinde uygun dozun saptanması için 1 mg/kg'ın üzerindeki dozlarda ozonun kullanıldığı bir çalışma yapılmasına, etki mekanizmalarının aydınlatılması için ise TNF- α , H₂S gibi farklı biyokimyasal parametrelerin değerlendirilmesine ihtiyaç olduğu anlaşılmaktadır.

7. ÖZET

SIÇANLARDA ENDOTOKSİN İLE OLUŞTURULAN ŞOK MODELİNDE OZON TEDAVİSİNİN ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Güncel sepsis tedavisi; hipoperfüzyon ve hipotansiyon gibi komplikasyonların giderilmesini ve enfeksiyon kaynağının kontrolünü hedeflemektedir. Bu müdahalelere rağmen sepsis halen yüksek mortalite oranına sahip bir hastalık olma özelliğini korumaktadır. Sepsisin kesin tedavisine yönelik yoğun çalışmalar henüz umut vaadeden sonuçlar vermemiştir.

Bu çalışmada öncelikle tüm sıçanların sistolik kan basınçları (SKB) ve kalp hızları (KH) tail-cuff yöntemi ile ölçülmüştür. Ardından kontrol grubuna serum fizyolojik, tedavi gruplarına lipopolisakkarit (LPS) (10mg/kg, i.p) uygulanmıştır. Birinci saatte tedavi gruplarına (0.1, 0.3, 1.0 mg/kg, i.p) ve ozon grubuna (1.0 mg/kg, i.p) ozon uygulanmıştır. Deney sonunda hayvanlar sakrifiye edilmiş ve ardından toplanan plazma örneklerinde nitrik oksit (NO), asimetrik dimetilarjinin (ADMA) ve total antioksidan kapasite (TAK) düzeyleri ölçülmüştür.

Kontrol ve ozon gruplarında tedavi öncesi ve sonrası SKB ve KH değerlerinde anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Sıçanlara LPS uygulanmasıyla oluşan SKB'lerdeki düşüş ve KH'lerdeki yükselme istatistiksel olarak anlamlıdır. Ozon uygulaması, LPS ile ortaya çıkan SKB'lerindeki düşüş ve KH'lerindeki yükselmeyi geri döndürememiştir. Ancak LPS enjeksiyonu ile total antioksidan kapasitede oluşan azalma, 1.0mg/kg ozon dozunda geri çevrilmiştir. LPS grubunda yükselen plazma NO düzeyleri ozon tedavisi (0.1 mg/kg, i.p.) ile tersine çevrilmiştir. Gruplar arasında plazma ADMA düzeyleri farklılık göstermemiştir.

Endotoksik şok modelinde ozonun NO ve TAK düzeylerini geri çevirmesi nedeniyle, sonuçlar bu modelin klinik karşılığı olan sepsiste biyokimyasal parametreleri düzenlenmesi açısından yararlı olabileceğini düşündürmüştür.

Anahtar Kelimeler: Endotoksik şok, ozon tedavisi, NO, TAK, ADMA, sıçan.

8. SUMMARY

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF OZONE TREATMENT IN ENDOTOXIN INDUCED SHOCK MODEL IN RATS

Current treatment of sepsis aims for resolving complications as hypoperfusion and hypotension, and for controlling infection source. Despite these interventions, sepsis keeps being disease with high mortality rates. Intensive studies for definitive treatment of sepsis haven't given promising results yet.

In this study, firstly systolic blood pressures (SBP) and heart rates (HR) of rats measured with tail-cuff method. Then, saline and lipopolysaccharide (LPS) (10 mg/kg, i.p) applied to control and treatment groups, respectively. At the first hour, ozone applied to treatment groups at three different doses (0.1, 0.3, 1.0mg/kg, i.p.) and to ozone group (1.0 mg/kg, i.p). SBP and HR were measured at 1st, 2nd, 3rd and 4th hours. At the end of the experiment, animals were sacrificed and levels of nitric oxide (NO), asymmetric dimethylarginine (ADMA) and total antioxidant capacity (TAC) were measured in plasma samples that were collected from animals.

In control and ozone groups, before and after the treatment no significant difference observed in SBP and HR values. Decrease in SBP and increase in HR occurred with LPS were statistically significant and ozone application did not reverse these changes. However reduction in TAC and increase in NO levels occurred with LPS reversed by ozone at 1 mg/kg and 0.1 mg/kg doses, respectively. Plasma ADMA levels did not show any difference between groups.

Due to reversing the changes in NO and TAC levels in endotoxic shock model, results suggest that ozone might be useful to correct the biochemical changes in sepsis that clinical counterpart of this model.

Keywords: Endotoxic shock, ozone treatment, NO, TAC, ADMA, rat.

9. KAYNAKLAR

1. Vincent JL. Definition of Sepsis and Non-infectious SIRS. In: Cavaillon JM, Adrie C, editors. Sepsis and Non-infectious Systemic Inflammation. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2009. p. 3-12.
2. Heumann D and Roger T. Initial responses to endotoxins and Gram-negative bacteria. Clinica Chimica Acta. 2002; 323(1-2): 59-72.
3. Keane MP and Strieter RM. The importance of balanced pro-inflammatory and antiinflammatory mechanisms in diffuse lung disease. Respir Res. 2002; 3(1): 5-11.
4. Kang-Birken SL and DiPiro JT. Sepsis and Septic Shock. In: DiPiro JT, Talbert RL, Yee GC, Matzke GR, Wells BG, Posey LM, editors. Pharmacotherapy A Pathophysiologic Approach. 6 th ed. New York: The McGraw-Hill Companies; 2005. p. 2131-2144.
5. Bone RC. Gram-negative sepsis: a dilemma of modern medicine. Clin. Microbiol. Rev. 1993; 6(1): 57-68.
6. Martin GS, Mannino DM, Moss M. The effect of age on the development and outcome of adult sepsis. Crit Care Med. 2006; 34(1): 15.
7. Lorenz E, Mira JP, Cornish KL et al. A novel polymorphism in the toll-like receptor 2 gene and its potential association with staphylococcal infection. Infect Immun. 2000; 68(11): 6398-6401.

8. Sutherland AM, Walley K and Russell JA. Polymorphisms in CD14, mannose-binding lectin, and Toll-like receptor-2 are associated with increased prevalence of infection in critically ill adults. *Crit Care Med.* 2005; 33(3): 638-644.
9. Gu W, Shan YA, Zhou J et al. Functional significance of gene polymorphisms in the promoter of myeloid differentiation-2. *Ann Surg.* 2007; 246(1): 151-158.
10. Hubacek JA, Stuber F, Fohlich D et al. Gene variants of the bactericidal/permeability increasing protein and lipopolysaccharide binding protein in sepsis patients: gender-specific genetic predisposition to sepsis. *Crit Care Med.* 2001; 29(3): 557-561.
11. Marshall JC. Predisposition to Sepsis. In: Gullo A, editor. *Anaesthesia, Pain, Intensive Care and Emergency A.P.I.C.E. Italy*: Springer-Verlag. 2008. p. 241-254.
12. Dziarski R, Tapping RI, Tobias PS. Binding of bacterial peptidoglycan to CD14. *J Biol Chem.* 1998; 273(15): 8680-90.
13. Zhang Y, Doerfler M, Lee TC, Guillemin B, Rom WN. Mechanisms of stimulation of interleukin-1h and tumor necrosis factor-a by *Mycobacterium tuberculosis* components. *J Clin Invest.* 1993; 91(5): 2076-83.
14. Hmama Z, Mey A, Normier G, Binz H, Revillard JP. CD14 and CD11b mediate serum-independent binding to human monocytes of an acylpolygalactoside isolated from *Klebsiella pneumoniae*. *Infect Immun.* 1994; 62(5): 1520-7.

15. Westphal GA, Koenig Á, Filho MC, et al. Reduced mortality after the implementation of a protocol for the early detection of severe sepsis. *Journal of Critical Care*. 2011; 26(1): 76-81.
16. Brun-Buisson C, Doyon F, Carlet J, Dellamonica P, Gouin F, et al. Incidence, Risk Factors, and Outcome of Severe Sepsis and Septic Shock in Adults A Multicenter Prospective Study in Intensive Care Units. *JAMA*. 1995; 274(12): 968-974.
17. Cohen J, Brun-Buisson B, Torres A, Jorgensen J. Diagnosis of infection in sepsis: An evidence-based review. *Crit Care Med*. 2004; 32(11): 466-494.
18. Viebahn-Hänsler R. Milestones of Medical Ozone Paper presented at the 15 th Ozone World Congress of the International Ozone Association in September 2001 in London.
19. Viebahn-Hänsler R, León Fernández OS and Fahmy Z. Ozone in Medicine: The Low-Dose Ozone Concept—Guidelines and Treatment Strategies. *Ozone: Science & Engineering*. 2012; 34(6): 408-424.
20. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Fein AM, Knaus WA et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference. *Chest*. 1992; 101: 1644-55.

21. Singh S, Evans TW. Organ Dysfunction During Sepsis. In: Pinsky MR, Brochard L, Mancebo J, editors. *Applied Physiology in Intensive Care Medicine*. Berlin: Springer-Verlag; 2006. p. 344-356.
22. Brunn GJ, Platt JL. The etiology of sepsis: turned inside out. *TRENDS in Molecular Medicine*. 2006; 12(1): 10-16.
23. Rietschel ET, Cavaillon JM. Richard Pfeiffer and Alexandre Besredka: creators of the concept of endotoxin and anti-endotoxin. *Microbes and Infection*. 2003; 5(15): 1407-1414.
24. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med*. 2003 Apr;31(4):1250-6.
25. Alexander C, Rietschel ET. Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity. *J. Endotoxin Res*. 2001; 7(3): 167-202.
26. Rietschel ET, Westphal O. Endotoxin: historical perspectives. In: Brade H, Opal SM, Vogel SN, Morrisson DC, editors. *Endotoxin in Health and Disease*. New York; Marcel Dekker, 1999; p. 1-30.
27. Martich GD, Boujoukos AJ and Suffredini AF. Response of man to endotoxin. *Immunobiology*. 1993; 187(3-5): 403-416.
28. Martich GD, Danner RL, Ceska M and Suffredini AF. Detection of interleukin 8 and tumor necrosis factor in normal humans after intravenous endotoxin: the effect of antiinflammatory agents. *J. Exp. Med*. 1993; 173(4): 1021-1024.

29. Hesse DG, Tracey KJ, Fong Y, Manogue KR, Palladino MA et al. Cytokine appearance in human endotoxemia and primate bacteremia. *Surg. Gynecol. Obstet.* 1988; 166(2): 147-153.
30. Klosterhalfen B, Horstmann-Jungemann K, Vogel P, Flohe S and Offner F. Time course of various inflammatory mediators during recurrent endotoxemia. *Biochem. Pharmacol.* 1992; 43(10): 2103-2109.
31. Van den Boogaard et al. Endotoxemia-induced inflammation and the effect on the human brain. *Critical Care.* 2010; 14(3): 81-89.
32. Heron M, Hoyert DL, Murphy SL, et al. Deaths: final data for 2006. *Natl Vital Stat Rep.* 2009; 57(14): 1-134.
33. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, et al: Epidemiology of severe sepsis in the United States: Analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med.* 2001; 29(7): 1303-1310.
34. Martin GS, Mannino DM, Eaton S, et al: The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med.* 2003; 348(16): 1546-1554.
35. Gray A, Ward K, Lees F, Dewar C, Dickie S, McGuffie C. The epidemiology of adults with severe sepsis and septic shock in Scottish emergency departments. *Emerg Med J.* 2013; 30(5): 397-401.

36. Vincent JL, Sakr Y, Sprung CL, Ranieri VM, Reinhart K, Gerlach H, et al. Sepsis in European intensive care units: Results of the SOAP study. *Crit Care Med*. 2006; 34(2): 344-353.
37. Annane D, Bellissant E, Cavaillon JM. Septic shock. *Lancet*. 2005; 365: 63-78.
38. Vincent JL, Abraham E. The Last 100 Years of Sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006; 173(3): 256-263.
39. Kono H, Rock KL. How dying cells alert the immune system to danger, *Nat Rev Immunol*. 2008; 8(4): 279-89.
40. Patrozou E, Opal SM. What is inflammation? What is Sepsis? What is MODS? In: Deutschman CS, Neligan PL, editors. *Evidence-Based Practice of Critical Care*. Philadelphia: Saunders; 2010. p. 151-156.
41. Wang H, Yang H., Czura C.J., Sama A.E., Tracey K.J. HMGB1 as a Late Mediator of Lethal Systemic Inflammation. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001; 164(10 Pt 1): 1768-1773.
42. Miyake K. Roles for accessory molecules in microbial recognition by Toll-like receptors. *Journal of Endotoxin Research*. 2006; 12(4): 195-204.
43. Osamu T, Shizuo A. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell*. 2010; 140(6): 805-820.
44. Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, Sanjo H, Ogawa T, Takeda Y, Takeda K, Akira S. Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are

hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J. Immunol.* 1999; 162(7): 3749-3752.

45. Qureshi ST, Lariviere L, Leveque G et al. Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (Tlr4). *J Exp Med* 1999; 189(9): 615-625.
46. Tobias PS, Soldau K, Gegner JA, Mintz D, Ulevitch RJ. Lipopolysaccharide binding protein-mediated complexation of lipopolysaccharide with soluble CD14. *J Biol Chem* 1995; 270(18): 10482-10488.
47. Hailman E, Lichenstein HS, Wurfel MM, Miller DS, Johnson DA et al. Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein accelerates the binding of LPS to CD14. *JEM.* 1994; 179(1): 269-277.
48. Correia J.S., Soldau K., Christen U., Tobias P.S., Ulevitch R.J. Lipopolysaccharide Is in Close Proximity to Each of the Proteins in Its Membrane Receptor Complex. Transfer from CD14 to TLR4 and MD-2. *J Biol Chem.* 2001; 276(24): 21129-35.
49. Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature.* 2002; 420(6917): 885-891.
50. Landmann, R. et al. Increased circulating soluble CD14 is associated with high mortality in Gram-negative septic shock. *J. Infect. Dis.* 1995; 171(3): 639-644.

51. Park, B.S., Song, D.H., Kim, H.M., Choi, B.S., Lee, H., and Lee, J.O. The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. *Nature*. 2009; 458(7242): 1191-1195.
52. Okajima, K. Regulation of inflammatory responses by natural anticoagulants. *Immunol. Rev.* 2002; 184: 258-274.
53. Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A, et al. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2012. *Crit Care Med.* 2013; 41(2): 580-637.
54. Schmidt GA, Mandel JM. Evaluation and management of severe sepsis and septic shock in adults [online]. 2013 [cited 2013 Apr 25]. Available from : URL : <http://www.uptodate.com/contents/evaluation-and-management-of-severe-sepsis-and-septic-shock-in-adults>
55. Recommendations: Initial Resuscitation and Infection Issues [online]. 2013 [cited 2013 Apr 20]. Available from: URL: <http://www.survivingsepsis.org/Guidelines/Documents/Initial%20Resus%20Table.pdf>
56. Chan Y-L, Tseng C-P, Tsay P-K et al. Procalcitonin as a marker of bacterial infection in the emergency department: an observational study. *Crit Care*. 2004; 8(1): 12-20.
57. W. Zhongguo, Ji ZB and Xue JY. Early Goal-Directed Therapy Collaborative Group of Zhejiang Province: The effect of early goal-directed therapy on treatment of critical patients with severe

sepsis/septic shock: A multi-center, prospective, randomized, controlled study [in Chinese]. 2010; 22(6): 331-334.

58. Weinstein MP, Reller RB, Murphy JR et al. The clinical significance of positive blood cultures: a comprehensive analysis of 500 episodes of bacteremia and fungemia in adults. I. Laboratory and epidemiologic observations. *Rev Infect Dis.* 1983; 5(1): 35-53.
59. Daniels R. Surviving the first hours in sepsis: getting the basics right (an intensivist's perspective). *J Antimicrob Chemother* 2011; 66 Suppl 2: ii11–ii23.
60. Kumar A, Roberts D, Wood KE, Light B, Parrillo JE et al. Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. *Crit Care Med* 2006; 34(6): 1589-1596.
61. Ibrahim EH, Sherman G, Ward S et al. The influence of inadequate antimicrobial treatment of bloodstream infections on patient outcomes in the ICU setting. *Chest.* 2000; 118(1): 146-55.
62. Krinsley JS. Glycemic variability: A strong independent predictor of mortality in critically ill patients. *Crit Care Med.* 2008; 36(11): 3008-3013.
63. Mackenzie IM, Whitehouse T, Nightingale PG: The metrics of glycaemic control in critical care. *Intensive Care Med.* 2011; 37(3): 435-443.

64. Fink, MP and Heard SO. Laboratory models of sepsis and septic shock. J Surg Res.1990; 49(2): 186-196.
65. Remick DG, Newcomb DE, Bolgos GL, et al. Comparison of the mortality and inflammatory response of two models of sepsis: lipopolysaccharide vs. cecal ligation and puncture. Shock. 2000; 13(2): 110-116.
66. Michie HR, Manogue KR, Spriggs DR, Revhaug A, et al. Detection of circulating tumor necrosis factor after endotoxin administration. N. Engl. J. Med.1988; 318(23): 1481-1486.
67. Copeland S, Warren HS, Lowry SF, Calvano SE and Remick D. Acute Inflammatory Response to Endotoxin in Mice and Humans. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 2005; 12(1): 60-67.
68. Hurley et al. Endotoxemia and mortality prediction in ICU and other settings: underlying risk and co-detection of gram negative bacteremia are confounders. Critical Care. 2012; 16(4): 148-160.
69. Deitch, E.A., Animal models of sepsis and shock: a review and lessons learned. Shock. 1998; 9(1): 1-11.
70. Popov D, Pavlov G. Sepsis Models In Experimental Animals. Trakia Journal of Sciences. 2013; 11(1): 13-23.
71. Hollenberg SM and Cinel I. Bench-to-bedside review: Nitric oxide in critical illness – update 2008. Critical Care. 2009; 13(4): 218.

72. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J.* 2001; 357(Pt 3): 593-615.
73. Demirel-Yılmaz E, Kayaalp SO. Peptid yapılı otakoidler, gaz otakoidler ve diğerleri. İçinde: Kayaalp SO, editör. Rasyonel tedavi yönünden tıbbi farmakoloji. 12. baskı. Ankara: Pelikan yayınevi; 2009. s. 1265-1280.
74. Stahl W, Matejovic M and Radermacher P. Inhibition of Nitric Oxide Synthase During Sepsis: Revival Because Of Isoform Selectivity? *Shock.* 2010; 34(3): 321-322.
75. Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol Cell Physiol.* 1996; 271(5 Pt 1): 1424-1437.
76. Davis KL, Martin E, Turko IV and Murad F. Novel Effects Of Nitric Oxide. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2001; 41: 203-36.
77. Aird WC. The role of the endothelium in severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrome. *Blood.* 2003; 101(10): 3765-3777.
78. Vallet B, Wiel E. Endothelial cell dysfunction and coagulation. *Crit Care Med.* 2001; 29 7 (Suppl): 36-41.
79. Lee WL, Slutsky AS. Sepsis and Endothelial Permeability. *N Engl J Med.* 2010; 363(7): 689-91.

80. McCuskey RS, Urbaschek R, Urbaschek B. The microcirculation during endotoxemia. *Cardiovasc Res.* 1996; 32(4): 752-763.
81. Groeneveld AB, Sipkema P. Interaction of oxyradicals, antioxidants, and nitric oxide during sepsis. *Crit Care Med.* 2000; 28(6): 2161-2.
82. Siegemund M, Van Bommel J, Schwarte LA, Studer W, Girard T, et al. Inducible nitric oxide synthase inhibition improves intestinal microcirculatory oxygenation and CO₂ balance during endotoxemia in pigs. *Intensive Care Med.* 2005; 31(7): 985-992.
83. Siegemund M, Van Bommel J, Sinaasappel M, Schwarte LA, Studer W, et al. The NO donor SIN-1 improves intestinal arterial PCO₂ gap in experimental endotoxemia: an animal study. *Acta Anaesthesiol Scand.* 2007; 51(6): 693-700.
84. Cooke JP: Does ADMA cause endothelial dysfunction? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000; 20: 2032-37.
85. Ghosh SK, Paik WK, Kim S. Purification and molecular identification of two protein methylases I from calf brain: myelin basic protein- and histone-specific enzyme. *J Biol Chem.* 1988; 263(35): 19024-19033.
86. Gary J. D, Clarke S. RNA and Protein Interactions Modulated by Protein Arginin Methylation. *Prog. Nucleic Acids Res. Mol. Biol.* 1998; 61: 65-131.
87. Vallance P, Leone A, Calver A, Collier J, Moncada S. Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *Lancet.* 1992; 339(8793): 572–575.

88. O'Dwyer MJ et al. Septic shock is correlated with asymmetrical dimethyl arginine levels, which may be influenced by a polymorphism in the dimethylarginine dimethylaminohydrolase II gene: a prospective observational study. *Critical Care*. 2006; 10(5): 139-145.
89. Closs EI, Basha FZ, Habermeier A, Forstermann U. Interference of L-arginine analogues with L-arginine transport mediated by the y⁺ carrier hCAT- 2B. *Nitric Oxide*. 1997; 1(1): 65-73.
90. Trzeciak S, Cinel I, Phillip Dellinger R, Shapiro NI, Arnold RC, et al. Resuscitating the microcirculation in sepsis: the central role of nitric oxide, emerging concepts for novel therapies, and challenges for clinical trials. *Acad Emerg Med*. 2008; 15(5): 399-413.
91. Davis JS, Yeo TW, Thomas JH, McMillan M, Darcy CJ, et al. Sepsis associated microvascular dysfunction measured by peripheral arterial tonometry: an observational study. *Crit Care*. 2009; 13(5): 155-163.
92. Böger RH. Live and let die: asymmetric dimethylarginine and septic shock. *Critical Care*. 2006; 10(6): 169-171.
93. Sies H. Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem*. 1993; 215(2): 213-9.
94. Ghiselli A, Serafini M, Natella F, Scaccini C. Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. *Free Radic. Biol. Med*. 2000; 29(11): 1106-1114.
95. Sies H. Total Antioxidant Capacity: Appraisal of a Concept. *J. Nutr*. 2007; 137(6): 1493-1495.

96. Doisea J-M, Ahob LS, Quenota J-R, Guillandc JC, Zeller M, et al. Plasma antioxidant status in septic critically ill patients: a decrease over time. *Fundamental & Clinical Pharmacology*. 2008; 22(2): 203-209.
97. Gutteridge JM, Mitchell J. Redox imbalance in the critically ill. *Br Med Bull*. 1999; 55(1): 49-75.
98. Victor VM, Rocha M, De la Fuente M. Immune cells: free radicals and antioxidant in sepsis. *Int Immunopharmacol*. 2004; 4(3): 327-47.
99. Gutteridge JM. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem*. 1995; 41 (12 Pt 2): 1819-28.
100. Goode HF, Cowley HC, Walker BE, Howdle PD, Webster NR. Decreased antioxidant status and increased lipid peroxidation in patients with septic shock and secondary organ dysfunction. *Crit Care Med*. 1995; 23(4): 646-651.
101. Motoyama T, Okamoto K, Kukita I, Hamaguchi M, Kinoshita Y, Ogawa H. Possible role of increased oxidant stress in multiple organ failure after systemic inflammatory response syndrome. *Crit Care Med*. 2003, 31(4): 1048-1052.
102. Pascual C, Karzai W, Meier-Hellmann A, Oberhoffer M, Horn A, Bredle D, Reinhart K. Total plasma antioxidant capacity is not always decreased in sepsis. *Crit Care Med*. 1998; 26(4): 705-709.
103. Bocci V: Ozone. A new medical drug. Dordrecht: Springer; 2005.

104. Valacchi G, Fortino V, Bocci V. The dual action of ozone on the skin. *Br J Dermatol.* 2005; 153(6): 1096-1100.
105. Middlebrook AM, Tolbert MA. Stratospheric Ozone Depletion. Colorado: University Corporation for Atmospheric Research; 2000.
106. Viebahn-Hänsler R. Ozonun Tıpta Kullanımı. Lee A (Çev), 1. Basım. İstanbul: Medikal Ozon Oksijen Derneği, 2006.
107. Bocci V, Paola ND. Oxygen-Ozone Therapy in Medicine: An Update. *Blood Purif.* 2009; 28(4): 373-376.
108. Bocci V. Scientific and Medical Aspects of Ozone Therapy. State of the Art. *Archives of Medical Research.* 2006; 37(4): 425-435.
109. Criegee R. Mechanism of Ozonolysis. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1975; 14(11): 745-752.
110. Bocci V, Borrelli E, Travagli V, Zanardi I. The Ozone Paradox: Ozone Is a Strong Oxidant as Well as a Medical Drug. *Medicinal Research Reviews.* 2009; 29(4): 646-682.
111. Bocci V, Zanardi I and Travagli V. Oxygen/ozone as a medical gas mixture. A critical evaluation of the various methods clarifies positive and negative aspects. *Medical Gas Research.* 2011; 1(1): 6-14.
112. Awasthi YC, Ansari GA, Awasthi S. Regulation of 4-hydroxynonenal mediated signaling by glutathione S-transferase. *Methods Enzymol.* 2005; 401:379-407.

113. Alary J, Geuraud F, Cravedi JP: Fate of 4-hydroxynonenal in vivo: disposition and metabolic pathways. *Mol Aspects Med.* 2003; 24(4-5): 177-187.
114. Alary J, Bravais F, Cravedu JP, Debrauwer L, Rao D, Bories G: Mercapturic acid conjugates as urinary end metabolites of the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal in the rat. *Chem Res Toxicol.* 1995; 8: 34-39.
115. Dianzani MU. 4-Hydroxynonenal and cell signalling. *Free Radic Res.* 1998; 28(6): 553-560.
116. Jerrett M, Burnett RT et al. Long-term ozone exposure and mortality. *N Engl J Med.* 2009; 360(11): 1085-1095.
117. Last JA, Gohil K, Mathrani VC, Kenyon NJ. Systemic responses to inhaled ozone in mice: cachexia and down-regulation of liver xenobiotic metabolizing genes. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2005; 208(2): 117-126.
118. Pryor WA, Squadrito GL, Friedman M. The cascade mechanism to explain ozone toxicity: the role of lipid ozonation products. *Free Radic Biol Med.* 1995; 19(6): 935-941.
119. Sunnen GV. Ozone in Medicine: Overview and Future Directions. *J Adv Med.* 1988; 1(3): 159-174.
120. Bocci V. Ozone as a Bioregulator. *Pharmacology and Toxicology of Ozonetheraphy Today. J. Biol. Regul. and Homeost. Agents.* 1996; 10(2-3): 31-53.

121. Health Technology Assessment Unit Medical Development Division
Ministry Of Health. Ozone Therapy [online]. 2005. [cited 2013 Apr 25]. Available from: <http://www.moh.gov.my/>
122. Turk R: Ozone In Dental Medicine. *Ozonachrichten*. 1985; 4: 61-65.
123. Rakovsky S and Zaikov G. Application of Ozone in Medicine. *Chemical Technology*. 2009; 3(3): 237-248.
124. Hoffmann A and Viebahn R. The Influence of Ozone on 2,3 Diphosphoglycerate Synthesis in Red Blood Cell Concentrate [online]. 2009 [cited 2013 Febr 12]. Available from: <http://www.ozonterapiklinigi.com>
125. Viebahn-Hänsler R. The use of ozone in medicine: Mechanisms of action. Munich. 2003. May 23-25, [cited in 2013 Jan 10]. Available from: <http://www.oxidation-therapy.com/pdfs/MechanismofAction.pdf>.
126. Zamora ZB, Borrego A, Lopez OY et al. Effects of ozone oxidative preconditioning on TNF-alpha release and antioxidant-prooxidant intracellular balance in mice during endotoxic shock. *Mediators Inflamm*. 2005; 2005(1): 16-22.
127. Vincent JL, Sun Q and Dubois MJ. Clinical Trials of Immunomodulatory Therapies in Severe Sepsis and Septic Shock. *Clinical Infectious Diseases*. 2002; 34(8): 1084-93.
128. Zamora ZB, Menéndez S, Bette M, Mutters R, Hoffmann S and Schulz S. Ozone Prophylactic Effect and Antibiotics as a Modulator of Inflammatory Septic process in Rats. Paper presented at the 15 th

Ozone World Congress of the International Ozone Association in September 2001 in London.

129. Madej P, Plewka A, Madej JA, Nowak M, Plewka D et al. Ozonotherapy in an Induced Septic Shock. I Effect of Ozonotherapy on Rat Organs in Evaluation of Free Radical Reactions and Selected Enzymatic Systems. *Inflammation*. 2007; 30(1-2): 52-58.
130. Madej P, Plewka A, Madej JA, Nowak M, Plewka D et al. Ozonotherapy in an Induced Septic Shock. II Effect of Ozone Therapy Upon Selected Histochemical Reactions in Organs of Rats in Endotoxemic Shock. *Inflammation*. 2007; 30(3-4): 69-86.
131. Rodríguez ZZ, Guanche D, Álvarez RG, Rosales FH, Alonso Y and Schulz S. Preconditioning with Ozone/Oxygen Mixture Induces Reversion of Some Indicators of Oxidative Stress and Prevents Organic Damage in Rats with Fecal Peritonitis. *Inflamm. Res*. 2009; 58(7): 371-375.
132. Cüz T. N-[20-hidroksieikosa-5(Z),14(Z)-dienoil] glisinin Endotoksin ile Oluşan Hipotansiyonu Önleyici Etkisinin Mekanizmasının Araştırılması. Doktora. Mersin: Mersin Üniversitesi; 2010.
133. Kaymak C, Kadioglu E, Ozcagli E, Osmanoglu G, Izdes S et al. Oxidative DNA damage and total antioxidant status in rats during experimental gram-negative sepsis. *Human & Experimental Toxicology*. 2008; 27(6): 485-491.

134. Guanche D, Hernandez F, Zamora Z and Alonso Y. Effect of ozone pre-conditioning on redox activity in a rat model of septic shock. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 2010; 20(8): 466-471.
135. Rodríguez ZZ, Guanche D, Álvarez RG, Martínez Y, Alonso Y and Schulz S. Effects of ozone oxidative preconditioning on different hepatic biomarkers of oxidative stress in endotoxic shock in mice. *Toxicology Mechanisms and Methods*. 2011; 21(3): 236-240.
136. Alvarez RG, Zamora ZB, Borrego A, Delgado R, Schulz S, and Alonso Y. Ozone oxidative preconditioning reduces nitrite levels in blood serum in LPS: induced endotoxic shock in mice. *Inflamm. Res*. 2009; 58(8): 441-443.
137. Shapira L, Soskolne WA, Houry Y, Barak V, Halabi A, Stabholz A. Protection against endotoxic shock and lipopolysaccharide-induced local inflammation by tetracycline: correlation with inhibition of cytokine secretion. *Infect Immun*. 1996; 64(3): 825-8.
138. Remick, DG, Strieter RM, Eskandari MK, Nguyen DT, Genord MA, Raiford CL and Kunkel SL. Role of tumor necrosis factor alpha in lipopolysaccharide-induced pathologic alterations. *Am. J. Pathol*. 1990; 136(1): 49-60.
139. Oztaş Y et al. Inhibition of iNOS reduces the therapeutic effects of ozone in acute necrotizing pancreatitis: An *in vivo* animal study. [Scand J Clin Lab Invest](#). 2011; 71(5): 370-7.
140. Leiper J, Murray-Rust J, McDonald N, Vallance P. S-nitrosylation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase regulates enzyme activity:

further interactions between nitric oxide synthase and dimethylarginine dimethylaminohydrolase. Proc Natl Acad Sci. 2002; 99(21): 13527-13532.

10. EKLER

10. 1. Deney Hayvanı Kullanım Sertifikası



10. 2. Etik Kurul Onayı

	T.C. GAZİ ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanlığı
SAYI : B.30.2.GÜN.0.05.06.00/108-9169 KONU :	16/05/2011
Sayın Yrd.Doç.Dr.Mecit Orhan ULUDAĞ Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi	
Araştırmacı grubu Mecit Orhan ULUDAĞ, Sevtap HAN, Nurbanu UZUN, Hakan DAYANIR ve Avni BABACAN'dan oluşan, G.Ü.ET-11.045 kod numaralı ve <i>"Sıçanlarda Endotoksin ile Oluşturulan Şok Modelinde Ozon Tedavisinin Etkilerinin Araştırılması"</i> başlıklı araştırma öneriniz incelenmiş ve Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Yönergesindeki ilkelere uygun olduğu saptanarak onaylanmasına oybirliği ile karar verilmiştir.	
Bilgilerinizi saygılarımla rica ederim.	
It is unanimously approved that the research project numbered G.Ü.ET-11.045 and entitled <i>"Effects of Ozone Therapy in the Rat Model of Endotoxin-induced Shock"</i> is in compliance with Gazi University Animal Experiments Local Ethics Committee regulations.	
With my best regards.	
EK : 1 Liste	 Prof.Dr.Gökhan ALPASLAN Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanı

10. 3. Teşekkür

Yüksek Lisans dönemim boyunca yoluma ışık tutan, destek ve yardımlarını esirgemeyen bölüm başkanımız sayın Prof. Dr. Nurettin ABACIOĞLU'na,

Uzmanlık eğitimime bilgi ve tecrübeleriyle büyük katkı sağlayan, tüm çalışmalarım sırasında her türlü yardımı yapan, emek veren değerli hocalarım Doç. Dr. M. Orhan ULUDAĞ ve Prof. Dr. Emine DEMİREL YILMAZ'a,

Tez çalışmamın yürütülmesinde verdiği emek ve destek için sayın ve Uzm. Dr. Suzan Emel USANMAZ'a,

Yüksek lisans eğitim ve öğretimimde bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan değerli hocalarım Prof. Dr. Nurettin ABACIOĞLU, Prof. Dr. Fatma AKAR, Prof. Dr. Mustafa ARK ve Prof. Dr. Nilüfer TURAN DURAL'a,

Deneylerimde ve tez yazımım sırasında emekleri, deneyimleri ve sonsuz desteği için Ecz. Nur Banu BAL'a, tez çalışmamda yardımlarından dolayı Uzm. Ecz. Sevtap HAN'a ve manevi desteklerini esirgemeyen Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Bölümü'ndeki tüm arkadaşlarıma,

Laboratuvar deneylerime katkısı bulunan, emek ve yardımını esirgemeyen Vet. Hekim Dr. Ayşe M. DEMİREL'e ve Lab. Tek. Hacer ŞİRİN ve Soner MAMUK'a,

Tezli yüksek lisans eğitimim boyunca, Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programı ile beni destekledikleri için Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu-Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı'na,

Her zaman yanımda olan, bugün sahip olduğum her şeyde büyük payları bulunan ve manevi desteklerini benden esirgemeyen sevgili aileme,

Saygılarımı ve sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

11. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Elif Derya ÖZDEMİR
Doğum Tarihi : 30.08.1988
Doğum Yeri : Altındağ-Ankara
Yabancı Dili : İngilizce
Telefon (İş) : 0312 202 3123
E-mail : elif.derya.ozdemir@gmail.com

İş ve Eğitim Durumunun Kısa Özeti

2012 - : Gazi Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakoloji
Anabilim Dalı, Araştırma Görevlisi.
2006 - 2011 : Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
2002 – 2006 : Gölbaşı Anadolu Lisesi
1994 – 2002 : İzciiler İlköğretim Okulu

Bilimsel Etkinlikler

Aldığı Burslar : TÜBİTAK Yurt İçi Yüksek Lisans Bursu (2011-2013)

Katıldığı Seminerler:

- 21. Türk Farmakoloji Derneği Farmakoloji Eğitiminde Kuşaklararası Bilimsel Etkileşme Seminerleri (FEKBES)
- 22. Türk Farmakoloji Derneği Farmakoloji Eğitiminde Kuşaklararası Bilimsel Etkileşme Seminerleri (FEKBES)