

**T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
ANESTEZİYOLOJİ VE REANİMASYON
ANABİLİM DALI**

**DENEYSEL SEPSİS MODELİNDE UYGULANAN OZON GAZI ÖN
KOŞULLAMASININ KARACİĞER, BÖBREK, AKCİĞER
HİSTOPATOLOJİSİ VE SERUM SÜPEROKSİD DİSMUTAZ, TİYOL
VE MALONİLDİALDEHİD KONSANTRASYONLARI ÜZERİNE OLAN
ETKİSİNİN BELİRLENMESİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Özden BOYACILAR

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Mehmet UYAR

İZMİR

2010

İÇİNDEKİLER

Giriş ve Amaç	1
Genel Bilgiler	3
Sepsis	3
Ozon	16
Serbest Oksijen Radikalleri	24
Serbest Radikallerin Tepkimeleri	25
Serbest Oksijen Radikallerinin Organizmadaki Etkileri	26
Lipid Peroksidasyonu	27
MDA	28
SOD	29
Tiyol	30
Materyal ve Metod	31
Bulgular	38
Histopatolojik Bulgular	38
Biyokimyasal Bulgular	47
Tartışma ve Sonuç	49
Özet	53
Kaynaklar	55

GİRİŞ ve AMAÇ

Sepsis mortalitesi halen çok yüksektir ve yeni tedavi arayışları sürmektedir [1, 2, 3]. Sepsis öncesi intraperitoneal ozon (O₃) gazı uygulamasının sepsise bağlı oluşan hiperinflamasyonu azaltabildiği ve böylelikle sağ kalım oranlarını arttırdığı daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir [4].

Ozonun kabul edilen ilk tıbbi kullanımı 1915 yılında Birinci Dünya Savaşı sırasında Alman askerlerinin gangren ve benzeri ciddi yaralanmalarının tedavisidir [5, 6]. O₃ gazı klinikte intravenöz, intramuskuler, intraartiküler, intraplevral, intrarektal, intradiskal ve deneysel araştırmalarda intraperitoneal uygulanabildiği gibi topikal de uygulanabilmektedir [7, 8, 9]. Basit diş ve ağız enfeksiyonlarından hepatitlere kadar uzanan geniş bir aralıktaki çeşitli enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde klinikte etkin olarak uygulanmaktadır [10–12]. Lomber disk hernisi olan hastalara oksijen/ozon karışımı disk içine enjeksiyonla uygulanmıştır ve gerek hasta memnuniyeti gerekse medikal olarak yapılan değerlendirmede bu tedavinin yararlı olduğu görülmüştür [13].

O₃ gazı invitro ortamda güçlü antimikrobiosidal aktiviteye sahiptir [4]. Bunun yanı sıra ozon bir çok inflamatuvar olayda in vivo modülasyon veya regülasyon yapmaktadır. Ozonun immun sistem üzerindeki etkileri arasında peritoneal ve alveolar makrofajların fagositik aktivitesinin modülasyonu da bulunmaktadır [4], bu fagositik etki toksin veya bakterilere karşı ilk defansı oluşturur. O₃ gazının etkileri arasında farklı abdominal organlardaki (örneğin dalak ve karaciğer) sitokinlerin salınımı ve üretimini modüle etmek de sayılabilir ve böylelikle ciddi enfeksiyonlara bağlı sonuçları etkileyebilir. O₃ gazının tekrarlayan uygulamaları hepatik ve renal iskemik reperfüzyon sonrası salınan serbest radikallere karşı toleransta bir artış sağlayabilir [4]. Düşük doz ozonun serbest Oksijen (O₂)

radikallerin neden olduğu patofizyolojik değişikliklerdeki katalaz, superoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon peroksidazı içeren endojen antioksidan sistemleri arttırdığı gösterilmiştir [4].

O₃ gazı verilmesi reaktif oksijen türleri (ROS) ve lipid oksidasyon ürünleri (LOP) aktivitesini iki fazda düzenler, erken dönemde sirkülasyonda bu moleküllerin hücre reseptörlerine bağlanmasını azaltırken, geç dönemde potansiyel toksisitesini azaltır [7].

Düşük dozda verilen O₃ gazı transmembranöz O₂ akımını stimüle ederek glutatyon peroksidaz, katalaz ve SOD gibi enzimleri indükler. Bunun sonucunda da mitokondrial O₂ kullanımını kolaylaştırır. İntraperitoneal O₂/O₃ karışımının uygulanmasının septik şokun neden olduğu serbest radikal oluşumunu azalttığı gösterilmiştir [8].

Bu araştırmada deneysel sepsis modeli oluşturulan ratlarda intraperitoneal olarak uygulanan O₃ gazı ön koşullaması sonucu antioksidan kapasitede meydana gelen artış, farklı doku tiplerinde inflamatuvar sürecin baskılanması ve histopatolojik değişikliklerin gösterilmesi amaçlanmıştır.

GENEL BİLGİLER

SEPSİS

Sepsis enfeksiyona sistemik inflamatuvar cevap ile karakterize kompleks bir sendromdur. Ciddi sepsis, septik şok ve sepsise bağlı organ disfonksiyonları koroner yoğun bakım üniteleri dışındaki yoğun bakım ünitelerinde rastlanan ölümlerin hala en önemli nedenidir [1, 14, 15]. Son derece gelişmiş yoğun bakım ekipman ve destek tedavilerine rağmen, sepsiste mortalite oranları % 35'lerde seyretmektedir. Sepsiste multi-organ yetmezliğinin tabloya eklenmesiyle bu oranlarda ciddi artışlar gözlenmektedir [14].

Sepsis tanımlanması, tanı konulması ve tedavisi oldukça zordur. Sepsis “konağın enfeksiyona karşı gösterdiği kontrolsüz sistemik inflamatuvar yanıt”olarak tanımlanır. İnfeksiyona vücudun sistemik inflamatuvar yanıtı ile başlayan sepsis, ciddi sepsis ve septik şoka ve sonunda başlangıçtaki hasar bölgesinden uzaktaki organlarda önce işlev bozukluğu, takiben de organ yetmezliklerinin gelişmesine yol açarak hastanın kaybedilmesine neden olabilir [16, 17]. Ciddi sepsis, septik şok, çoklu organ işlev bozukluğu sendromu ve çoklu organ yetmezliği gibi sepsisin ilerlemesi ile ortaya çıkan durumlar, sepsise yol açan temel bozukluğun süregen olarak ilerlemesi sonucu gelişirler ve sepsisin bu süregen doğası içinde ortaya çıkan daha ileri evrelerini oluştururlar. Sepsis ve daha ileri evrelerinin gelişmesinde rol oynayan bu temel patofizyolojik bozukluk, başlangıçtaki hasar bölgesinden uzakta bulunan organlarda da gelişen, enfeksiyona konağın kontrol altına alınamamış jeneralize bir inflamatuvar yanıtıdır ve endojen mediyatörlere bağlı olarak gelişir [16, 17]. “Sistemik inflamatuvar yanıt sendromu: SIRS” adı ile bilinen bu jeneralize inflamatuvar yanıt eninde sonunda end-organ işlev bozukluğu ve/veya yetmezliği ile sonuçlanır. Sepsis ilerledikçe, yani ciddi sepsis, septik şok ve organ işlev bozuklukları geliştikçe mortalite ve morbidite de artmaktadır [18, 19]. Bu nedenle sepsis tanısının, olabildiğince erken konulması

önemlidir. Şok veya organ işlev bozukluğu gelişmeden tanı konulması, infeksiyon kaynağının hızla araştırılmasına, antibiyoterapiye erken başlanmasına, cerrahi drenaj veya debridman gerektiren hastalarda ise drenaj ve debridmanın erken yapılmasına olanak sağlar. Açıktır ki, sepsis ve ilişkili durumlarda, yatak başında hekime hızla tanı konulmasında yardımcı olacak, herkes tarafından kabul görmüş tanı kriterlerine gereksinim vardır. Bu tip kriterler aynı zamanda, epidemiyolojik çalışmalar ve diğer araştırmalarda hastaların çalışmaya kabul edilmesinde standardizasyon sağlanması açısından da gereklidir [20].

Epidemiyoloji

Sepsis gelişen hastalarda sıklıkla altta yatan başka bir hastalık olduğu ve klinik bulgulardan en az sepsis kadar bu hastalıkta sorumlu olabileceği için sepsisin tanısının konması çoğu kez güçtür ve insidansı tam olarak saptanamamaktadır. Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde sepsis insidansı her yıl artmaktadır. ABD'de yayınlanan çalışmada 1979 yılında 100.000'de 73,6 iken, 1987 yılında 100.000'de 175,9 olarak verilmiştir [2]. Diğer bir çalışmada ise ABD'de 1979 yılından 2000 yılına kadar 10.319.418 sepsis olgusu izlendiği bildirilmiştir ve her yıl 751.000 yeni ağır sepsis vakası hesaplanmıştır [3].

Ülkemizde bir yoğun bakım ünitesinde 1997 yılında yapılan bir yıllık çalışmada nazokomiyal sepsis oranı %33,1, 1999–2002 yılları arasında yapılan çalışmalarda ise nazokomiyal bakteriyemi/sepsis oranı %12,4–21,5 arasında bulunmuştur [21].

Sepsis olgularının çoğu hastane ortamında gelişmektedir. Tanı ve tedavi amaçlı girişimsel teknikler, dış ortama duyarlı olan dokular için hasarlayıcı ortam oluşturmakta ve sepsise zemin hazırlamaktadır. Bu nedenle infeksiyon riski taşıyan her türlü girişim sepsis

riskide taşımaktadır. Yoğun bakım ünitelerinde yatan hastaların en sık rastlanan ölüm nedeninin sepsis olduğu bildirilmektedir [22, 23].

Etiyoloji

Septik süreci başlatan mikrobiyolojik etkenlerin bilinmesi, sepsis fizyopatolojisinin daha iyi anlaşılması yanında olası tedavi yöntemlerinin geliştirilmesinde de önemlidir. Vücudun doğal immünitesi tarafından algılanan ve tanınan bakteri ürünlerine, patojen-bağımlı moleküler yapılar (Pathogen-Associated Molecular Patterns (PAMPs)) denir [24]. Bu yapılar içerisinde en önemlisi lipopolisakkarid (LPS)'dir.

Gram-negatif bakteri hücre duvarında var olan LPS (endotoksin olarak da bilinir) septik sürecin başlamasında ve ilerlemesinde etkin rol oynar. LPS üç farklı yapıdan oluşur [25]. O-polisakkarid zinciri molekülün dış yüzeyinde bulunur ve her bakteri türü için spesifik özellikler taşır. O-polisakkarid tek başına inflamatuvar bir reaksiyon oluşturamaz. Ancak koruyucu özelliklere sahip immünglobulin M sentezine neden olur. LPS'nin orta kısmında hegzoz ve heptoz şekerler vardır. Son olarak lipid A kısmı LPS'nin etkilerini oluşturan üçüncü yapısıdır. Lipid A kısmı LPS'nin bakteri duvarına yapışmasında da önemli rol oynar [26].

Gram-pozitif bakterilerde endotoksin yoktur, ancak hücre duvarında peptidoglikan ve lipoteikoik asit içerir. Bu iki moleküler yapı hücre yüzeyindeki reseptörlere bağlanma yeteneğindedir ve inflamasyonu artırıcı (pro-inflamatuvar) özellik gösterir [25]. Bazı gram-pozitif bakteri ekzotoksinlerinin septik şoka neden oldukları bilinmektedir. En iyi bilinen örnekleri toksik şok sendromuna neden olan *Staphylococcus aureus*'un ekzotoksini toksik şok sendromu toksin-1 (TSST-1) ve *Streptococcus pyogenes*'in pirojenik ekzotoksindir.

Bu ekzotoksinler herhangi bir ön uyarı olmadan ortaya çıkar ve yüksek mortaliteye neden olur. Toksik şok sendromları septik şokun en akut ve ağır klinik tablolarıdır [27].

Gram-pozitif bakterilerin süperantijenik toksinleri LPS'ye olan aşırı duyarlılığı artırmaktadır. Stafilokoksik bir toksin olan TSST-1'in, tavşanlarda LPS aşırı duyarlılığını yaklaşık 50.000 kat arttırdığı gösterilmiştir [27]. Öte yandan, LPS'nin TSST-1 ile eş zamanlı enjeksiyonu, her birinin tek başına enjeksiyonundan daha fazla oranda tümör nekroz faktörü (TNF) salınımına neden olmaktadır. Bu nedenle herhangi bir hastada var olan enfeksiyon gram-pozitif bakteriler nedeniyle ortaya çıkmış olsa dahi LPS'lerin olası etkileri göz ardı edilmemelidir [26].

Deneyisel araştırmalarda diğer bazı bakteri ürünlerinin de proinflamatuvar etki göstererek şok benzeri tablo oluşturabildikleri gösterilmiştir. Flagellin ve curli gibi hücre duvar ürünleri bunlara örnek olarak verilebilir [28, 29].

Tanımlar

Sepsis ve benzeri tablolar için tanımlama ve derecelendirme yapmak zordur. Bu konudaki bilgilerimiz arttıkça yeni tanımlamalar, eklemeler ve çıkarmalar yapılması gerekecektir.

Sistemik inflamatuvar yanıt sendromu (SIRS); organizmanın hasara gösterdiği abartılı yanıtıdır [16]. Bir dizi enfeksiyon ve enfeksiyon dışı etken SIRS benzeri bir tabloya neden olabilir [30]. SIRS terimi "septik" gibi görünen fakat infekte olmayan hastaların, sepsisten farklı bir şekilde tanımlanabilmesi için önerilmiştir. SIRS, bir "tetikleyici-medyatör-yanıt" dizisinden oluşur. ACCP/SCCM Consensus konferansının 1992 yılında yaptığı açıklama da enfeksiyon kaynaklı SIRS sepsis olarak tanımlanmıştır. Diğer taraftan ağır sepsis organ disfonksiyonu, septik şok yeterli sıvı replasmanına rağmen arteriyel hipotansiyon olarak

tanımlanmıştır. Bu bildiri SIRS'in genel veya lokal tetiklenebileceğini fakat travma, yanık, akut pankreatit vs. gibi enfeksiyöz olmayan durumlardan da tetiklenebileceğini öngörür. Buna göre tanı kriterleri tanımlanmıştır, iki veya daha fazla tanı kriteri varlığı SIRS olarak kabul edilir [16].

1. Vücut sıcaklığı $>38^{\circ}\text{C}$ veya $<36^{\circ}\text{C}$;
2. Kalp atım sayısı dakikada >90
3. Hiperventilasyon dakikadaki solunum sayısı >20 veya $\text{PaCO}_2 <32$ mmHg
4. Beyaz küre sayısı >12000 UL veya <4000 UL

Bu kriterlerin bir takım avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır ki, bunlar;

Avantajlar

- Neredeyse 100% sensitif
- İnflamatuvar durumu gösterir
- Kullanılabilir bir iletişim aracıdır
- Klinik deneyimlerle ilişkili sepsis içerik kriteri olarak kullanılmıştır
- SIRS kriterleri ne kadar fazlaysa sepsis hastalarındaki ölüm oranı da o kadar artış göstermektedir.

Dezavantajlar

- Altta yatan temel problemi anlamamıza yardımcı olmaz
- Sepsis markırı olarak SIRS yüksek sensitiftir fakat spesifik değildir: Yoğun bakım ünitesinde yatan hastaların 65% i herhangi bir zamanda SIRS olmaktadır.

Uluslararası Sepsis Tanımlama Konferansı 2001 de, sepsis tanısının doğruluğunu arttırmak amacıyla yukarıdaki tanıyı geliştirmeye çalışmıştır. SIRS konseptinin geçerli

olmasına rağmen gelecekte daha iyi epidemiyolojik bilgilerle desteklenmesi durumunda biyokimyasal ve/veya immünolojik kullanımının mümkün olacağını önermiştir. İnflamatuvar cevabın tanımlanmasında klinik kriterlerden daha kesin bir şekilde kullanılabileceğini bildirmiştir. Enfeksiyon mikroorganizma tarafından oluşturulmuş patolojik bir süreç olarak tanımlanmıştır. Buna göre sepsis için **Tablo 1**'de sıralanan değişkenler belirlenmiş ve bu tablodaki kriterlerden birkaçını sergileyen, şüphelenilen veya belgelenmiş enfeksiyonlu hastaların tanımlanmasında kullanıma girmiştir [31, 32].

Tablo 1. Sepsis için tanısal kriterler [32]

Genel Değişkenler

- Vücut ısısı $>38,3^{\circ}\text{C}$ veya $<36^{\circ}\text{C}$
- Kalp hızı $>90/\text{dk}$ veya yaş için normal değerinde $>2\text{sd}$
- Takipne
- Mental durum değişikliği
- Belirgin ödem veya pozitif sıvı dengesi (24 saat içinde $>20\text{ ml/kg}$)
- Diyabet olmaksızın hiperglisemi (kan şekeri $>120\text{ mg/dl}$)

İnflamatuvar Değişkenler

- Lökositoz (BK sayısı >12000)
- Lökopeni (BK sayısı <4000)
- $>10\%$ immatür formlarla birlikte normal BK sayısı
- Plazma C-reaktif protein normal değerinde $>2\text{ SD}$ üzerinde
- Plazma prokalsitonin normal değerinde $>2\text{ SD}$ üzerinde

Hemodinamik Değişkenler

- Arteriyel hipotansiyon (SKB $<90\text{mmHg}$, OAB $<70\text{mmHg}$ veya erişkinde $>40\text{mmHg}$ SKB azalması veya yaş için olan normal değerinde $<2\text{ SD}$ altında olması)
- $\text{SvO}_2 >70$
- $\text{CI} >3,5\text{ L/dk/m}^2$

Organ Disfonksiyonu Değişkenleri

- Arteriyel Hipoksemi ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 <300$)
- Akut Oligüri (idrara debisi $<0,5\text{ ml/kg/sa}$)
- Kreatinin artışı $>0,5\text{mg/dl}$
- Koagülasyon Bozukluğu (INR $>1,5$ veya aPTT $>60\text{sn}$)
- İleus (Barsak seslerinin yokluğu)
- Trombositopeni ($<100.000/\mu\text{l}$)

- Hiperbilirubinemi (plazma bilirubin >4mg/dl)

Doku Perfüzyonu Değişkenleri

- Hiperlaktatemi (>1mmol/L)
- Kapiller dolumun azalması veya beneklenme

SKB : Sistolik kan basıncı OAB : Ortalama arter basıncı BK : Beyaz Küre

Sepsis; infeksiyonla birlikte SIRS varlığıdır. 2001 yılındaki uzlaşma toplantısında infeksiyon; normalde steril olan bir doku, sıvı veya vücut kavitesinin patojenik veya potansiyel olarak patojenik mikroorganizmalar tarafından invazyonu olarak tanımlanmıştır [32].

Ağır sepsis; organ yetmezliği veya fonksiyon bozukluğu/kaybı ile seyreden sepsistir. Ağır sepsis koroner yoğun bakım üniteleri dışındaki yoğun bakım ünitelerindeki en sık ölüm nedenidir [30].

Septik şok; sepsiste olan bir hastada başka bir nedene bağlı olmayan ve sıvı tedavisine yanıtız hipotansiyon olarak tanımlanırken, sepsisteki hipotansiyon ise sistolik arteriyel basıncının 90 mmHg'nın altında olması, ortalama arteriyel basıncının 70 mmHg'nın altında olması veya kan basıncının normal değerinden 40 mmHg kadar düşmesi olarak tanımlanır. Sepsisin indüklediği doku hipoperfüzyonu septik şokta laktat seviyesinin artması veya oligüri ile tanımlanır [33].

Sepsis hastalarında tablo ağırlaştıkça organ fonksiyon bozuklukları bir diğer söylemlerle organ yetmezlikleri gelişir. Eğer birden fazla organ sistemi fonksiyonlarını kendiliğinden gerçekleştiremiyorsa çoklu organ yetmezliğinden bahsedilir [34].

Patogenez

Sepsis esas olarak, konak organizmanın, normalde steril dokuların, sıvıların veya vücut boşluklarının patojen veya potansiyel patojen mikroorganizmalar tarafından

invazyonuna karşı verdiği sistemik maladaptif yanıtıdır. Yakın zamana dek sepsis, sonuçta hücrel hasara ve makro/mikro dolaşımın bozulmasına yol açan hiperinflamasyon ve hiperkoagülasyon durumu olarak kabul edilmekteydi. Ancak, bağışık yanıtın düzenlenmesinde, antiinflamatuvar bir fenotipe doğru kayma lehine bozulma ve fırsatçı patojenlerin virülansını aktive eden hücrelerde fenotipik değisiklikler de en azından bunun kadar önem taşımaktadır. Sepsiste konağın pasif olmadığı, endojen inflamatuvar mediyatörlerin organ hasarlanmasındaki rolleri, noninfeksiyöz tetiklenmelerle de aynı inflamatuvar yanıtın ortaya çıkabildiği ve infeksiyon eradike edilse bile klinik yanıtın sürebildiği saptanmıştır. Sepsis kriterleri içinde tanımlanan hasta grubunun tedaviye aynı şekilde yanıt vermeyen, heterojen bir grup olduğu sonucuna yıllar içinde varılmış ve genetik polimorfizmlerin mortaliteyle ilişkileri ortaya konmaya başlanmıştır [35].

Bazı önemli antioksidan savunma sistemleri glutatyona dayanmaktadır. Glutasyon, indirgenmiş halde iken insan hücrelerindeki en önemli hücre içi antioksidandır. Sepsiste, glutasyon depolarının glutamin ile yer değiştirmesinin, organ hasarının önlenmesinde yararlı bir etki sağladığı gösterilmiştir [35].

Ciddi sepsisin abartılmış inflamatuvar yanıtı pro-inflamatuvar sitokinler tarafından sürdürülür. Bu sitokinler, enfeksiyon veya endotoksinlere yanıtta monositler tarafından üretilen tümör nekroz faktör alfa (TNF- α) ve İnterlökin-1 (IL-1)'dir. Sistemik inflamasyonun ortaya çıkmasıyla interlökin-6 (IL-6) salınımı, doku faktörünün aktivasyonunu tetikler ve tümör nekroz faktörü-a, doğal antikoagülanları baskılar. Böylece sepsiste koagülasyonun aktivasyonu doğrultusunda bir eğilim oluşur. Bu da, mikrovasküler hasara neden olur. Sonuçta mikrodolaşımın engellenmesi, kan akımını azaltarak, dokuların hipoperfüzyonuna ve organlarda işlev bozukluğuna katkıda bulunur [35].

Patofizyoloji

Sepsisteki fizyopatolojik olaylar oldukça karmaşıktır. Organizmada görülen hemodinamik, metabolik ve immün değişiklikler hücreler arası sinyal iletimde rol alan medyatörler ve sitokinler aracılığı ile olmaktadır [36].

Lipopolisakkaridin septik süreci başlatabilmesi için konakçı hücrelerinde LPS-bağlayıcı protein ve CD14 opsonik reseptörün varlığı gerekir [36]. CD14 hücre membranında olduğu gibi (mCD14) dolaşımda da görülebilir (sCD14). Hücre yüzeyinde CD14 reseptörü olmayan dendritik hücreler, fibroblastlar, düz kas hücreleri gibi hücreler sCD14 ile etkileşime girerek LPS ile uyarılır [26, 37].

Mikroorganizma ve konakçının ilk karşılaşmasından sonra doğal immün sistemde humoral ve hücreli immunitiyi kapsayan yaygın bir aktivasyon başlar. Bu noktada mononükleer hücreler klasik proinflatuvar sitokinleri salarak (IL-1, IL-6 ve TNF gibi) kilit rol oynar. TNF ve IL-1 inflamatuvar sitokinlerin prototipini oluşturur ve LPS'ye bağlı septik şok tablosunun oluşmasında son derece etkilidir. LPS ortaya çıkmasından 30 ile 90 dk içerisinde salınır ve ikinci sıra sitokinlerin, lipid mediyatörlerin ve reaktif oksijen metabolitlerinin salınımına neden olur. "High Mobility Group B1 (HMGB1)", makrofajlarda üretilen sitokin benzeri bir yapıdır ve TNF ve IL-1'e göre sepsisin daha geç evrelerinde ortaya çıkar. Bu yapının bloke edilmesi ile septik şoklu deneklerde mortalitede azalma gösterilebilmiştir [37, 38]

Son yıllarda sepsis fizyopatolojisinin aydınlatılmasında en önemli gelişme koagülasyon kaskadının sepsis sürecindeki öneminin anlaşılmasıdır. Sepsiste sitokinler koagülasyonu tetikleyici bir etki gösterir. Bu tür hastalarda koagülasyon bozukluklarına sık rastlanır ve hastaların %30-50'sinde dissemine intravasküler koagülasyon (DİK) gibi ileri

dönem koagülasyon bozuklukları görülür [39]. Koagülasyon yolları ve mononükleer ve endotel hücrelerindeki doku faktörü, LPS ve diğer mikrobiyolojik ürünler tarafından aktive edilir. Doku faktörü daha sonra bir dizi proteolitik kaskadı aktive eder ve protrombin trombine ve nihayetinde fibrojenden fibrin oluşumuna neden olur. Eş zamanlı olarak normal fibrinolitik mekanizmalarda da bir yetmezlik söz konusudur. Bu olaylar sonucunda fibrin yapımında net bir artış ve yıkımında azalma söz konusudur. Böylece küçük kan damarlarında fibrin tıkaçlar oluşur. Yetersiz doku perfüzyonu ve organ yetmezliği gelişir [39].

Sepsiste ortaya çıkan aşırı inflamatuvar yanıt, zıt etki gösteren molekül, medyatör ve sitokinlerle dengelenmeye, düzenlenmeye çalışılır.

Pirojenik ekzotoksin A oluşturan grup A, Streptokoklarla oluşan bazı infeksiyonlarda şok, erişkin sıkıntılı solunum sendromu (ARDS), böbrek yetmezliği ve doku hasarı görülür. Bu tablo streptokoksik toksik şok sendromu olarak isimlendirilmektedir. Pirojenik ekzotoksin, insan ve hayvan çalışmalarında, ateş oluşturmaktadır. Streptokokal pirojenik ekzotoksin A ve B'nin insan mononükleer hücrelerinden TNF- α , IL-1, IL-6 sentezini başlattığını göstermiştir. Bu da TNF- α 'nın, streptokok toksik şok sendromulu hastalarda ateş, şok ve doku hasarında önemli mediatör olduğunu desteklemektedir. Etkisi en iyi bilinen bakteriyel antijen endotoksinidir. Endotoksin mononükleer fagositleri, endotel hücrelerini ve diğer hücreleri de aktive eder. Bu hücrelerle koagülasyon kaskadı ve kompleman sistemide aktive olur [40].

Sepsiste rol alan hemen hemen bütün mediatörler damarlar üzerinde etkilidir. Endotoksin, TNF- α , IL-1, platelet aktive edici faktör (PAF), lökotrienler ve tromboksan A₂ (TXA₂) endotel permeabilitesini artırır. Ayrıca kompleman kaskadının aktivasyonu da endotel hasarı yapar. Komplemanın aktivasyonu damar permeabilitesini direkt veya nötrofilleri aktive ederek indirek yolla bozar. Ayrıca degranülasyon esnasında nötrofillerden toksik oksijen radikalleri ve lizozomal enzimler açığa çıkar. Bunlar endotel permeabilitesini artırır. Damar

permeabilitesinin artması ve endotel hasarı, mikrotrombüslerin oluşumunu kolaylaştırır. Bir anatomik yerde yeterli endotel hasarı oluşunca orada organ yetmezliği gelişir. Eğer birçok yerde endotel hasarı oluşur ise, bu çoklu organ yetmezliği ile sonuçlanır. Hasar kontrol edilemez ise metabolik tüketim gelişir ve hasta ölür. Sepsiste en sık karşılaştığımız organ yetmezliği; akciğer, böbrek, karaciğer ve kalp yetmezliğidir [40].

Sepsiste damar permeabilitesinin bozulması, trombosit ve nötrofil agregasyonu, küçük damarlarda mikrotrombüslerin oluşumunu başlatır. Endotoksin, TNF- α , IL-1 ve diğer endojen mediatörler kontakt ve koagülasyon sistemini aktive eder. Hageman faktörünün aktivasyonu (faktör XII) plazminojeni plazmine çevirir ve intrinsek koagülasyonu başlatır. Fibrinojen fibrine dönüşür, bunu pıhtılaşma izler. Fibrinolitik aktivite artar. Genellikle şok ile beraber kontrol edilemeyen koagülasyonun aktivasyonu, tromboz, trombositlerin ve pıhtılaşma faktörlerinin (faktör II, V ve VIII) tüketimi ile sonuçlanan DİK tablosu ortaya çıkar. Klinikte, deri ve mukoza kanamaları ile kendini gösterir. DİK, sepsisli hastalarda prognozu kötü yönde etkileyen fizyopatolojik bir olaydır. Sepsisli hastalarda ölüm DİK olanlarda %77, DİK olmayanlarda %32 olarak bildirilmiştir [40].

Sepsisteki fizyopatolojik olaylardan biri de septik şoktur. Septik şok en fazla gram negatif bakteriyel sepsislerde görülür. Benzer klinik sendrom gram pozitif, bakteriyel, viral, mantar, mikobakteriyel, riketsia ve protozoer infeksiyonlarda da görülebilir. Değişik klinik çalışmalarda, gram negatif sepsis, *Streptococcus aureus*, *Streptococcus epidermidis* ve *Streptococcus pneumoniae* sepsislerinde şok görülmektedir [40].

Sepsiste açığa çıkan mediatörlerin birçoğu prostaglandin I₂, TXA₂, histamin gibi vazoregülatördürler. Son yıllarda, sepsiste güçlü vazoregülatuvar rol oynayan iki yeni mediatör tanımlanmıştır. Endotelden salınan gevşetici faktör, düz kası gevşetir, Endothelin-1 ise kuvvetli vazokonstrüktördür [40].

Sepsiste gelişen fizyopatolojik olaylar sonucu vazo aktif mediatörler salınır. Bunların etkisi ile sistemik damar direnci azalır. Bu da dokulara giren kan akımının azalmasına neden olur [40].

Sepsiste Klinik Belirti ve Bulgular

Sistemik İnflamatuvar Reaksiyon Sendromu'na yol açan etken ister gram-negatif, isterse gram-pozitif olsun semptom ve bulgular benzerdir. Mortalitesi yüksek olan bu durumun erkenden tanımlanarak, acil ve etkin bir tedavinin uygulanması ile yaşama şansı önemli ölçüde artabilmektedir. Erken tanı için hastanın yüksek sepsis riski taşıyıp taşımadığına dikkat edilmelidir. SIRS'na sistemik bakteriyel bir enfeksiyonun neden olduğunu düşündüren belirti ve bulgular ve komplikasyonlar olarak iki gruba ayırabiliriz [41].

1- Primer belirti ve bulgular

- a- Ateş,
- b- Titreme,
- c- Hiperventilasyon,
- d- Hipotermi,
- e- Cilt lezyonları,
- f- Mental durumda akut değişiklik.

Bunlar yalnızca bakteriyel enfeksiyonlara özgü değildir. Ancak bu bulgularla karşılaşınca hastanın sepsis yönünden değerlendirilmesi ve kültürlerinin alınması gerekir.

2- Komplikasyonlar:

- a- Hipotansiyon,
- b- Kanama,
- c- Lökopeni,

- d- Trombositopeni,
- e- Organ yetmezliği;
 - Akciğer (siyanoz, asidoz)
 - B6brek (olig6ri, asidoz)
 - Karaciğer (sarılık)
 - Kalp (konjestif kalp yetmezliği)

Primer bulgular ve komplikasyonlar arasında kesin bir sınır yoktur. Hipotansiyon, kanama, hipoksi, asidoz, sarılık gibi komplikasyonlar bizi tanıya g6t6ren ilk bulgular olabilir. 6te yandan, hiperventilasyon, v6cut ısısındaki değişikliklerden de 6nce ortaya 6ıkabilir. Yoğun bakım 6nitelerindeki hastaların izlemi sonucunda mental durumda değişiklik ve hiperventilasyonun ilk klinik bulgular olduğu anlaşılmıştır. Sepsiste en erken ortaya 6ıkan metabolik değişiklik ise respiratuar alkalozdur. Bakteriyel, viral, fungal ve hatta parazitik septik tablolarda cilt bulguları ortaya 6ıkabilir. Gram-pozitif mikroorganizmalar, sel6litin yanısıra eritrojenik toksinlere bağlı yaygın bir eritrodermiye yol a6abilirler. Ayrıca gram-negatif bakterilerin neden olduğu bakteriyemilerde de cilt lezyonları gelişebilir. *Pseudomonas aeruginosa* bakteriyemisi i6in patognomonik cilt lezyonu ektima gangrenozumdur. Bu lezyonlar yuvarlak veya oval, 1–5cm 6apında, vezik6l şeklinde başlayan ancak kısa s6rede nekrotik 6lsere d6n6şen bir alanı 6evreleyen bir deriden bir kabarık halka ya da eritemden oluşur. *Pseudomonas* bakteriyemilerin %5–25’inde g6r6l6r. Basillerin doğrudan doğruya vask6ler invazyonuyla gelişir. *Aeromonas hydrophilia*, *Escherichia coli*, *Serratia*, *Klebsiella* ve *Enterobakter* septisemilerinde de cilt lezyonu gelişir [41].

OZON

Ozon üç oksijen atomundan oluşan renksiz, keskin kokulu gaz halinde bir moleküldür. Oksijen molekülünün kararlı haline karşın, O₃, kararsız bir moleküldür. Ozon gazını alman kimyacı Christian Friedrich Schönbein 1839 yılında keşfetmiştir. Keşfinden sonraki ilk yıllarda dezenfeksiyon amacıyla kullanılmıştır. 1860 yılında Monako şehrinin su arıtma tesisinde dezenfeksiyon amacıyla ozon kullanılmaya başlanmıştır. Ozonun bu dezenfekte edici etkisi güçlü okside edici özelliğinden kaynaklanmaktadır. Sadece virüs ve bakterileri öldürmekle kalmaz tüm mikroorganizmalar ve toksinlerini de okside edebilir. Ozon ayrıca fenoller, pestisidleri, deterjanları, kimyasal atıkları ve aromatik bileşikler de etkili şekilde nötralize edebilir [33, 42]. Ozon kimyasal yapısı itibariyle radikal özelliği taşımamakla birlikte, florin ve persülfattan sonra, bilinen üçüncü en güçlü oksidan maddedir [7].

Ozon özellikle atmosferin üst tabakalarında oldukça bol bulunan bir moleküldür. Atmosferdeki ozonun %90'ına yakını, yer yüzeyinden yaklaşık 20–50 km yüksekte bulunan stratosfer tabakası içinde yer alır. Geri kalan %10'luk ozon miktarı ise 10–15 km'ler arasındaki troposfer tabakası içinde bulunmaktadır. Atmosferde stratosfer tabakası içerisinde bulunan ozon, ultraviyole radyasyonunun etkisiyle bir taraftan oluşurken, öbür taraftan da yok edilmektedir. Bu işlem ultraviyole radyasyonun değişik frekanslarında meydana gelir [43].

Ozon oluşumunu aşağıdaki tepkime ile gösterilebilir.



Çok reaktif bir gaz olan ozon canlılar için toksiktir. Akciğer ve gözler ozonun toksik etkisine en hassas organlardır. Gözdeki irritasyonu ve akciğere etkileri konsantrasyon, sıcaklık, nem ve maruz kalınan süreye bağlı olarak değişir. Düşük konsantrasyonda ozon inhalasyonu, boğazda irritasyon ve buna bağlı öksürüğe neden olabilir. Yüksek

konsantrasyonlardaki inhalasyon ise bronşiyal mukoza ve pnömosit hücresi hasarına bağlı akciğer ödeme kadar varabilir [44, 45].

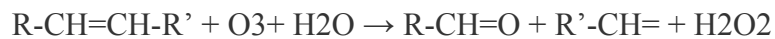
Medikal Ozon ve Etki Mekanizması

Ozonun tıbbi amaçla kullanımının ilk olarak 1880 yılında Dr. John Harvey Kellogg (Battle Creek/Michigan/ABD) tarafından gerçekleştirildiğini yazan kaynaklar bulunmakla birlikte daha yaygın görüşe göre kabul edilen ilk tıbbi kullanımı Dr. Albert Wolff tarafından 1915 yılında Birinci Dünya Savaşı sırasında Alman askerlerinin gangren ve benzeri ciddi yaralanmalarının tedavisinde kullanımıdır. Bilimsel bir toplantıda ozonun tedavi edici bir ajan olarak gündeme alındığı ilk önemli organizasyon ise 1935 yılında Berlin’de toplanan 59uncu Alman Cerrahi Birliği (59th Meeting of the German Surgical Society) toplantısı olup, burada Dr. Erwin Payr “Cerrahi’de Ozon Uygulamaları” başlığı altında kendi vakalarından oluşan derleme türünde bir sunum yapmıştır [5, 6]. Bu tarihten sonra 80’li yıllara kadar, ozon tedavisini münferit olarak uygulayan çeşitli hekimler ve araştırmacılar bulunmaktadır. 1980’li yıllardan itibaren ise tıbbi amaçla ozon kullanımına yönelik gerek bilimsel çalışmalar, gerekse vaka serileri literatürde artmaya başlamıştır.

Ozon tedavisi belirli bir miktarda O_3/O_2 karışımının vücut boşluklarına ya da dolaşım sistemine uygulanmasıdır; bu karışım intravenöz, intramuskuler, intraartiküler, intraplevral, intrarektal, intradiskal ve deneysel araştırmalarda intraperitoneal uygulanabildiği gibi topikal de uygulanabilir [4, 7, 9]. Ozon tedavisinin klasik uygulaması haline gelmiş olan yöntem 1974 yılında Wolff tarafından tarif edilmiştir. Bu yöntemde; bir miktar kan (50–270 ml) vücut dışına alınarak, ozona dayanıklı bir şişede 5–10 dakika oksijen/ozon karışımıyla temas ettikten sonra tekrar aynı kişiye geri verilir (ototransfüzyon) [7]. Bu uygulama şekli majör otohemoterapi (HT) olarak adlandırılmaktadır. Bu tarihten günümüze, daha çok Avrupa’da olmak üzere milyonlarca ozon ototransfüzyon tedavisi yapılmıştır [46].

Ozon reaktif bir molekül olduğu için tıbbi amaçlı kullanımında dikkat edilmesi gereken bazı durumlar vardır. Ozon, hiçbir zaman saf olarak verilmemeli ve belli oranda oksijenle karıştırılarak uygulanmalıdır. Bu karışımda oksijen %95'den az ozon %5'ten fazla olmamalıdır. Normal atmosfer havasının bu karışıma girmesi engellenmelidir. Çünkü ozonun reaktif özelliğinden dolayı hava ile teması sonucu toksik bir gaz olan nitrojen dioksit (N₂O₂) oluşabilmektedir. Ayrıca emboliye sebep olmaması için ozon gaz olarak damar sistemi içerisine verilmemelidir. Tüm işlemler sırasında ozona dayanıklı malzemenin (paslanmaz çelik, nötral cam ve teflon) kullanılması gerekmektedir [7].

Ozon, diğer gazlar (O₂, CO₂) gibi suda çözünebilir. Ozon oksijene göre 1,6 kat daha yoğun ve suda çözünürlüğü 10 kat daha fazla olan bir moleküldür. Saf suda diğer gazlar gibi Henry kanununa göre çözünür. Çözünmesi ısıya, basınca ve konsantrasyonuna bağlıdır. Biyolojik sıvılarda ise ozon oksijenden farklı olarak hızlıca biyomoleküller ile reaksiyona girer. Dolayısı ile HT esnasında uygulanan O₃/O₂ karışımındaki ozon afinite sırasıyla çoklu doymamış yağ asitleriyle, antioksidanlarla ve sistein gibi sülfhidril (-SH) grubu taşıyan tiyol bileşikleri ile reaksiyona girer. Ozonun miktarına bağlı olarak karbonhidratlar, proteinler (dolayısıyla da enzimler), DNA ve RNA da bu reaksiyondan etkilenebilir. Tüm bu bileşikler O₃ gazı karşısında elektron donörü gibi davranarak oksitlenirler. Sonuçta süperoksit (O₂⁻), hidrojen peroksit (H₂O₂) ve hipoklorik asit (HClO) gibi reaktif oksijen türevleri (ROT) oluşur. Bu reaksiyonlardan en önemlisi doymamış yağ asitlerinin oksidasyonudur. Ana reaksiyon aşağıdaki gibidir [7].



Bu reaksiyonda her hidrojen peroksit ile birlikte iki de lipid oksidasyon ürünü (lipid oxidation products; LOP) oluşmaktadır [47,48]. Lipid oksidasyon ürünleri için iyi bilinen

örnekler şunlardır; lipoperoksil radikalleri, hidroperoksitler, malondialdehit, izoprostan, alkenaller ve 4–hidroksi–2,3–trans nonenal (HNE) [49-52].

Görülüyor ki, ozonun biyolojik etkilerinin ortaya çıkması için serbest radikallerin varlığı önemlidir. Serbest radikaller, çeşitli patolojik süreçlerin gerek başlatıcısı, gerek ara basamaklarda işe karışabilen, gerekse sonucunda ortaya çıkabilen reaktif maddelerdir. Bunlar, organizmada aerobik solunum sırasında mitokondride ve fagositlerde solunum patlaması gibi çeşitli fizyolojik durumlarda da oluşabilmektedir [53]. Aerobik canlılar serbest radikallerin toksik etkilerinden korunmak için antioksidan sistemler geliştirmişlerdir. Non enzimatik olanlar; ürik asit, askorbik asit, protein (özellikle albumin), protein olmayan tiyoller, vitamin E ve bilirubindir. Enzimatik olanlar ise süperoksit dismutaz, katalaz ile glutatyon peroksidaz (GPx) glutatyon transferaz (GST), glutatyon (GSH) ve glutatyon redüktazdan (GR) oluşan glutatyon sistemidir [48]. Son zamanlara kadar oksidatif stresin hücre hasarındaki rolü ve hastalıkların altında yatan patolojik süreçlere etkileri konusuna odaklanılmıştı. Patolojik süreçlerde oksidatif stresin artış mekanizmaları ve etkilerini açıklayan yüzlerce çalışma yapılmıştır [54–59]. Yakın zamanda yapılan çalışmalarda ise oksidatif stresin bilinenin tersi etkilerinin de olabileceği görülmüştür. Bu çalışmalarda oksidasyon/redüksiyon (redoks) reaksiyonlarının başta hücre içi haberleşme olmak üzere biyolojik mekanizmalarda rol aldığı gösterilmiştir. Artık açık olarak biliniyor ki gerek reaktif moleküller gerekse bunların çeşitli biyolojik moleküllerle reaksiyona girmesi sonucu ortaya çıkan oksidasyon ürünleri düşük konsantrasyonlarda (fizyolojik düzeylerde) hücrede önemli roller üstlenmektedir [59–62].

Ozonun biyolojik etkilerini açıklamak için yapılan çalışmalarda daha çok HT tedavisi model alınmıştır [63–66]. HT esnasında uygulanan O_3/O_2 karışımındaki ozon plazmada hızla çözünür. Daha önce bahsedildiği gibi sıvılardaki çözünürlüğü fazla olan ozonun bir kısmı plazmada bulunan antioksidanlar ile reaksiyona girerek bunların miktarlarını azaltır. Bu anlık

olaylar sırasında çeşitli ROT’de oluşabilmektedir. Bu radikallerin yarı ömrü çok kısa olduğu için, daha kan hastaya geri verilemeden, yani ototransfüzyondan önce bunlar ortadan kalkarak yerlerini lipid oksidasyon ürünlerine bırakırlar. Bu ürünler, büyük oranda kandaki hakim hücre olan eritrositlerin membranlarının oksidasyonu ile ortaya çıkar. Eritrosit membranındaki doymamış yağ asitleri oksidasyona çok duyarlıdır. Yukarıda formülünü de gösterdiğimiz üzere, bu reaksiyonlar sırasında ortaya çıkan hidrojen peroksit, molekül yapısı itibariyle radikal olmayan oksitleyici bir moleküldür [7, 48, 67].

Hidrojen peroksitin ozonun tedavi edici etkinliklerinin en azından bir kısmından sorumlu, ikincil habercisi gibi davrandığı kabul edilmektedir. İlk etkilerinden biri eritrositlerde 2,3-difosfogliserat düzeyini artırma yoluyla hemoglobin-oksijen ayrışma eğrisinin sağa kaymasına ve böylece oksijenin dokulara daha kolay bırakılmasına neden olmasındır. Plazmada konsantrasyonu artan hidrojen peroksit kolayca hücrelerin içine diffüze olarak; lökosit ve endotelial hücrelerde çeşitli interferon, interlökin ve transforme edici büyüme faktörü (TGF) yapımını da artıran uyarıları tetikler [68]. Lipid oksidasyon ürünlerinin yarı ömürleri ise saatlere varabilmekte, dolayısıyla ömrü çok kısa olan ROT’lerin ilk etkileri sonrasında ozonun gecikmiş etkilerinden sorumlu tutulmaktadır. Uzun yarı ömürlerinden dolayı bu ürünler ototransfüzyon ile vücuda verilmiş olur ve dolaşım yoluyla dokulara ulaşarak buralarda çeşitli biyolojik etkiler gösterirler [67, 69, 70].

HT tedavisi yapılmadan önce kanın antikoagülan verilerek hazırlanması gerekir. Çünkü ozon doza bağlı olarak trombosit fonksiyonlarının artışına neden olmaktadır. Trombosit fonksiyonlarındaki artışın bazı yararlı sonuçları da olmaktadır. Aktive olmuş trombositler içlerinde bulunan büyüme faktörlerini salarak iskemi ve ülserli hastalarda iyileşmeye olumlu katkı sağlar [48].

Ozonun konsantrasyonuna bağlı olarak artan kuvvetli okside edici özelliği nedeniyle belli bir orandan sonra vücut için de toksik etkisi olabileceği gerçeğini unutmamak gerekmektedir. Doğal olarak, organizmadaki antioksidan savunma sistemleri ozon oksidasyonuna karşı koyacaktır. Plazmanın sahip olduğu geniş antioksidan kapasite ve eritrositlerdeki antioksidan enzimler nedeniyle, kan ozon toksisitesine karşı en dirençli dokudur. HT uygulamaları sırasında plazmada çözünen ozonun burada bulunan antioksidanlar (bilirubin, askorbik asit, SH grubu taşıyan glutatyon ve albumin) ile reaksiyona girerek bunların konsantrasyonunu azaltmaktadır [67]. Öte yandan, HT sonucu ortaya çıkan ROT artışı ve antioksidanların azalması geçici bir durumdur. Bocci ve Carlo, yaptıkları çalışmada değişik dozlarda (20, 40, 60, 80 µg/ml) ozon uygulanmış kanlarda dozla doğru orantılı olarak glutatyon ve total antioksidan seviyesinde azalma, lipid peroksidasyonu ve okside glutatyon düzeyinde artma olduğunu göstermiş, uygulamanın 20 dakika sonrasında ise antioksidan düzeylerinin eski haline döndüğünü tespit etmişlerdir [66]. Denilebilir ki, HT uygulaması sırasında tedavinin etkinliğini kanın toplam antioksidan gücü belirlemektedir. Kanın antioksidan kapasitesi düşük, ozonun konsantrasyonu fazla olursa şiddetli membran oksidasyonu sonucu eritrositler hemolize olur, tam tersi olduğunda ise ozondan beklenen ROS ve hidrojen peroksit yanıtı yeterli olmayabilir ve arzulanan terapötik etki görülemeyebilir. Ozon uygulamaları sonucunda oluşması beklenen ROT ve lipid oksidasyon ürünlerinin terapötik etki gösterebilmesi için belli bir konsantrasyonda olması gerekir [7]. Bu açıdan, kanda bulunan antioksidanların önemi yapılan bir çalışma ile gösterilmiştir. Bu çalışmada eritrositler yıkanarak plazmadan uzaklaştırılmış ve değişik konsantrasyonlarda ozon uygulanmıştır. Yapılan değerlendirmelerde düşük 10–20 µg/ml ozon konsantrasyonlarındaki uygulamalarda bile eritrositlerin çoğunda hemoliz olduğu görülmüştür [64]. Yapılan çalışmalarda ozonun terapötik konsantrasyonu 10–80 µg/ml olarak belirlenmiştir. Bu ozon konsantrasyonu Rice-Evans'ın tarif ettiği total antioksidan kapasiteyi %25'den fazla

düşürmediği gibi azalan antioksidanlar 20 dakika sonra eski haline gelmektedir [63, 64, 71, 72].

Ozon uygulaması ile hem oksijenaz-1 (HO-1) enziminin de uyarıldığı bildirilmiştir. Bu enzimin artışından gerek ROT, gerekse yukarıda sözü edilen ılımlı eritrosit hemolizi sorumlu olabilir. HO-1, hem halkasının yıkım yolunda görev alan mikrozomal bir enzimdir ve yapımı oksidatif stres artışı, proinflamatuvar sitokinler ve nitrik oksit (NO) ile uyarılabilmektedir. Bu enzim hem molekülünü biliverdin ve karbon monoksit (CO) parçalar. Son yıllarda HO-1 ile yapılmış birçok çalışmada bu enzimin; antioksidan antiapoptotik antiinflamatuvar etkilerinin olduğu gösterilmiştir. Ozon uygulaması sonucu görülen en etkin HO-1 artışının aynı zamanda ozonun terapötik doz aralığı olarak da vurgulanan 20-80 µg/ml arasında ortaya çıktığı gösterilmiştir. Yine HO-1'in yanında ısı şok protein-70 (HSP-70)'in de arttığı gösterilmiştir [72-74].

Ozonun diğer bir uygulama şekli olan minör hemoterapide ise hastadan alınan 5 ml kan ile aynı miktarda 80-100 µl/ml konsantrasyonundaki oksijen/ozon karışımı bir dakika inkübe edilir. Bu süre zarfında ozonunun, yine aynı şekilde kanda önce çözünüp sonra da biyolojik moleküller ile reaksiyona girmesi beklenir. Sonrasında bu kan, gluteus kasına yavaşça enjekte edilir. Bu uygulama sonrasında kas içine enjekte edilen kanın doku derinliklerine ilerlerken pıhtılaşmasına rağmen hastalardan çok azı hafif şişme ve ağrıdan yakınmaktadır. Bu işlem esnasında anesteziye gerek yoktur. Tartışmalı olmakla birlikte, bu uygulamanın immünmodülatuar bir etkisinin olduğu iddia edilmekte ve etki mekanizması şu şekilde açıklanmaktadır: Enjeksiyon yerinde hafif derecede steril inflamasyon meydana gelmekte, bölgeye nötrofil ve monositler gelerek denatüre proteinleri ve parçalanmış eritrositleri fagosite etmektedir. Eğer kan içinde HCV, HBV ve HIV gibi virüsler var ise ozon tarafından inaktive edilip parçalanmış bu virüs atıkları bölgeye gelen bu immün hücreler

tarafından ortadan kaldırılır. Böylece bu işlem bir çeşit aşı etkisi yaratır ve immün sistemi bu antijenlere karşı uyarır [7].

Medikal Ozon Tedavisinin Klinik Uygulamaları

Ozon tedavisinin özellikle inflamatuvar sürecin yoğun olarak yaşandığı ve immün sistemin ön planda yer aldığı fizyopatolojik durumlarda tedavi edici etkisi şaşırtıcıdır. Ozon uygulamaları yara iyileşmesi, yaşa bağlı maküler dejenerasyon, iskemik ve enfeksiyöz hastalıklarda yapılan vaka analiz çalışmalarında olumlu etkiler göstermiştir. Bunun yanında basit diş ve ağız enfeksiyonlarından hepatitlere kadar uzanan geniş bir aralıktaki çeşitli enfeksiyon hastalıklarında etkin olarak uygulanmaktadır [10–12]. Martinez-Sanchez ve arkadaşları diyabetik ayak gelişmiş hastalarda yaptıkları çalışmada ozon tedavisinin etkinliğini değerlendirmişlerdir. Bu çalışmada ozon tedavisi uygulanan hastalarda antibiyotik tedavisi alanlara göre yara iyileşmesi hızlanmış, hastanede kalma süreleri kısalmış, glisemi düzeyleri daha iyi kontrol edilebilmiş ve antioksidan enzim düzeyleri artmış olarak bulunmuştur [12]. Ayrıca çeşitli derecelerde artrit ve artroz vakaları ile romatizmal hastalıkları da kapsayan ortopedik hastalıklarda da faydalı etkiler rapor eden araştırmalar dikkat çekmektedir. Buna örnek olarak Mutu ve arkadaşlarının lomber disk hernisi olan hastalarda yaptığı çalışmayı gösterebiliriz. Bu çalışmada lomber disk hernisi olan hastalara oksijen/ozon karışımı disk içine enjeksiyonla uygulanmıştır ve gerek hasta memnuniyeti gerekse medikal olarak yapılan değerlendirmede bu tedavinin yararlı olduğu görülmüştür [13].

Medikal Ozon Tedavisinin Yan Etki ve Kontrendikasyonları

Ozon tedavisinin yan etkisi yok denecek kadar azdır. Şimdiye kadar bildirilen yan etkiler uygulama hatalarına bağlı lokal komplikasyonlardır. Bazı durumlarda ozon terapisi

uygulanması sakıncalı olabilir. Bu durumlar: glukoz 6 fosfat dehidrogenaz enzim eksikliği, özellikle erken dönem olmak üzere hamilelik, anjiotensin çevirici enzim (ACE) inhibitörü tedavisi görenler, hipertiroidi, kanama bozukluğu, kontrol altına alınamayan kardiyovasküler hastalıklar ve ozona reaksiyon gösteren astım hastaları olarak sıralanabilir **Tablo 2**'de solunan havadaki ozon gazının farklı konsantrasyonlarda gösterdiği toksik etkiler gösterilmiştir [9].

Tablo 2. Solunan havadaki ozon gazı konsantrasyonu ile artan toksik etkiler

Havadaki O₃ konsantrasyonu (ppm)	Toksik etki
0,1	Üst hava yollarında irritasyon ve salgı artışı
1,0 – 2,0	Rinit, öksürük, baş ağrısı, bazen öğürme ve bulantı
2,0 – 5,0 (10 – 20 dk)	İlerleyici dispne, bronşiyal spazmi retrosternal ağrı
5,0 (60 dk)	Akut pulmoner ödem ve bazen respiratuvar paralizi
10,0	4 saat içinde ölüm
50,0	Dakikalar içinde ölüm

SERBEST OKSİJEN RADİKALLERİ

Atomlarda elektronlar yörünge adı verilen uzaysal bölgede çift olarak bulunmaktadır. Elektronların kapladıkları bölgeler orbital olarak tanımlanmaktadır. Bir orbitalde tek başına bulunan elektron, eşlenmemiş elektrondur. Son yörüngelerinde çift elektron bulunan birçok molekülün yanı sıra az sayıdaki molekülün son yörüngesinde tek elektron yer almaktadır. Son yörüngelerindeki elektronları eşlenmemiş olan bu moleküller, herhangi bir molekül ile etkileşime girerek elektron almakta (yükseltgenme) veya elektron vermektedirler (indirgenme). Başka moleküller ile çok kolay elektron alışverişine girerek yapılarını bozan moleküllere “serbest radikaller”, “oksidan moleküller” veya “reaktif oksijen partikülleri” adı verilmektedir [75, 76].

Oksijenin bir elektron ile tam olmayan indirgenmesi sonucu oksijenin aktif türleri olan oksijen radikalleri oluşmaktadır. Oksijeni metabolize edebilen tüm canlılarda oksijen radikalleri üretilmektedir. Oksijen radikali, serbest elektronunu eşlemek için elektron aldığı bir başka molekülü dayanıksız hale getirmektedir. Elektron düzeni bozulan bu molekül bir başka molekülden elektron alarak düzenini sağlamaktadır. Bu nedenle serbest radikaller, vücutta önemli moleküllere zarar veren bir dizi tepkimeyi başlatabilirler. Patolojik etkilerin ortaya çıkmasına oksijen radikallerinin sayısının artması neden olmaktadır. Oksijen radikallerinin hasara yol açtığı moleküller arasında proteinler, nörotransmitterler, nükleik asitler ve yağ asitleri bulunmaktadır [77].

Serbest Radikallerin Tepkimeleri

Eşlenmemiş elektronlarını birleştiren iki radikal, kovalent bağ oluşturacak şekilde birleşebilmektedir. Radikal olmayan moleküller, elektron eksikleri olmadığı halde başka moleküllerle radikallerden daha zayıf bir şekilde birleşmektedir. Bir radikal, radikal olmayan moleküle elektron verebilmekte (indirgen radikal), elektron alabilmekte (oksidan radikal) veya onunla birleşebilmektedir. Serbest radikaller bu üç tepkime ile radikal olmayan moleküllerin radikale dönüşmesini başlatmakta ve bir dizi zincirleme tepkime sonucu serbest radikallerin sayısı artmaktadır [77].

Dış yörüngesinde eşlenmemiş iki elektron içeren moleküler oksijenin yapısındaki her iki atom denge halinde bulunduğundan oksijen molekülü reaktif özellik taşımamaktadır. Peroksit iyonu ortamdaki iki proton alarak hidrojen peroksit (H_2O_2) oluşturabilmektedir. Süperoksit radikallerinin ortamdaki uzaklaştırıldığı bu dismutasyon tepkimesini süperoksit dismutaz (SOD) katalizlemektedir.

Canlılarda çok sayıda işlevi bulunan sülfidril grupları ile metal iyonlarını etkileyen serbest radikaller, metabolik olayları ve yükseltgenme-indirgenme tepkimelerini değiştirerek çok sayıda zararlı etkiye yol açmaktadır [78]. Süperoksit radikali, damar dokusunda mevcut oksidanların çoğunun temel üreticisidir. Damar endotelinden salıverilen gevşetici bir faktör olan NO ile tepkimeye giren süperoksit radikali, reaktif bir ara ürün olan ve güçlü oksidan etkisi ile bilinen peroksinitriti (ONOO⁻) oluşturmaktadır. Bir çok biyomoleküle zarar veren peroksinitrit, asit ortamda yıkılarak hidroksil radikali meydana getirmektedir [78].

Serbest Oksijen Radikallerinin Organizmadaki Etkileri

Serbest oksijen radikallerinin organizmada yararlı ve zararlı etkileri bulunmaktadır.

Serbest radikallerin yararlı etkileri: Vücuttan atılabilmeleri için Sitokrom p450 enziminin katalizlediği bir tepkime ile hidroksilasyona uğrayan ksenobiyotikler, daha sonra konjugasyon ve metilasyon tepkimeleri ile suda daha çözünür hale getirilerek atılırlar. Bu detoksifikasyon işlemi sırasında reaktif oksijen türleri tepkime döngüsünde merkezi rol oynarlar [79].

Damar endotelinden salıverilen reaktif bir oksijen türü olan NO, damar düz kasının gevşemesine neden olmakta ve trombosit agregasyonunu inhibe etmektedir. Nitrogliserin ve nitroprusit gibi vazodilatör nitratlar, NO'ya metabolize olarak etki gösterirler. Ayrıca, beyinde nörotransmitter olarak görev yapan NO, makrofajların bakterisidal ve tümörisidal etkilerine aracılık eder [79]. Nötrofiller ve monositlerin bakterisidal etki gösterebilmeleri için miyeloperoksidazın yer aldığı oksijene bağımlı bir mekanizma kullanmadırlar. Burada lökosit membranındaki NADPH oksidaz ile moleküler oksijenden oluşan süperoksit radikalinden süperoksid dismutaz ile elde edilen H₂O₂, miyeloperoksidaz katalizörlüğünde bakterileri öldüren hipokoröz asidi oluşturmaktadır [79].

Serbest radikallerin zararlı etkileri: Oksijen kaynaklı serbest radikaller, hücre hasarı ve hücre ölümü için önemli mediyatörlerdir. Yaşlanma prosesinde rol oynayan birçok reaktif kimyasal bileşik, doğrudan veya dolaylı olarak ateroskleroz, reperfüzyon hasarı ve kanser gibi daha birçok hastalığı içeren süreçlerde yer almaktadır [80].

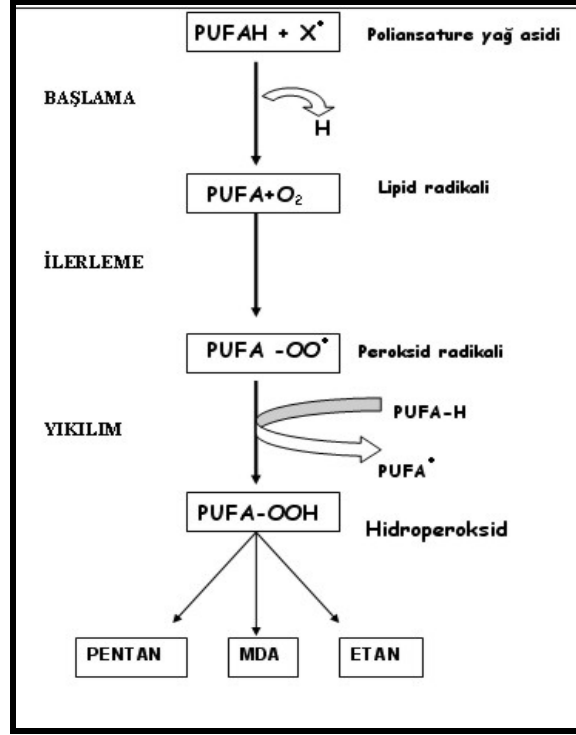
Biyolojik yapılarda, özellikle membranlarda yüksek oranda bulunan doymamış lipidler serbest radikallerle oksidasyona uğrarlar. Lipid peroksidasyonu serbest radikaller tarafından oluşturulan süreçler içinde en yoğun şekilde araştırılanıdır. Genellikle radikallerin ve daha spesifik olarak reaktif oksijen türlerinin oluşturulduğu bölgelerde membran fosfolipidlerinin çok miktarda olması, fosfolipidleri radikaller için kolay ulaşılabilir hedefler haline getirmektedir. Özellikle serbest radikal tepkimelerine çok duyarlı olan poliansatüre yağ asitlerinin peroksidasyonu bir radikal zincir peroksidasyonuna yol açabilmektedir [80].

LİPİD PEROKSİDASYONU

Poliansatüre yağ asitlerinin oksidatif yıkılımı olarak tarif edilen ve zincirleme gerçekleşen bir dizi tepkimenin yer aldığı lipid peroksidasyonunu demir ve bakır gibi iz metaller, ultraviole veya radyasyon katalizleyebilir. Lipid peroksidasyonu zincir başlangıcı, ilerlemesi, dallanması ve sonlanması olarak bilinen dört aşamada gerçekleşmektedir.

Sonlanma aşamasında hidroperoksitler ısı, radyasyon, metal iyonları katalizörlüğünde yıkılarak lipid peroksidasyon ürünlerini meydana getirmektedirler (**Şekil 1**) [79].

Lipid hidroperoksitlerinden lipid oksi radikali (LO^{\bullet}) ve hidroksil radikali (OH^{\bullet}) oluşması sırasında iki değerlikli demir (Fe^{+2}) yükseltgenerek (Fe^{+3}) meydana gelmekte ve peroksidasyon zinciri dallanmaktadır. Bu olay deney hayvanlarında ve insanlarda radikallerin neden olduğu hasarın ve toksisitenin göstergesi olarak kabul edilir [79].



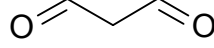
Şekil 1 Lipid peroksidasyonunun şeması (PUFAH: Poliansatüre yağ asidi)

Malonildialdehid (MDA)

Peroksidasyona uğramış olan poliansatüre yağ asidlerinden oluşan reaktif bileşiklerden biri olan üç karbonlu MDA bir ketoaldehiddir (Şekil 2). Araşidonik asidden, birçok lipoksidden, hidroperoksidlerden, endoperoksidlerden, prostaglandinlerden ve tromboksanlardan oluşabilen MDA'nın ana kaynağı ansatüre yağ asidlerinin peroksidasyonudur [81].

Birçok makromolekül ile hızlı bir şekilde tepkimeye giren ve çok reaktif bir bileşik olan MDA, serbest olarak veya farklı doku bileşenleri ile kompleks oluşturmaktadır. Doku lipid peroksidasyonu sonucu oluşan MDA hücresel düzeyde metabolize edilir. Karaciğer aldehid dehidrogenazı tarafından enzimatik yıkılıma uğrayan MDA, CO₂'e metabolize olmakta veya mitokondriyal yolla yıkılabilmektedir. İdrarda asit ile hidrolize edilebilen formda küçük miktarlarda ekskrete edilir. Eritrosit membranının aminofosfolipid organizasyonunu bozan MDA, hücre hasarında ve yaşlanma pigmenti olan lipofuksinlerin oluşumunda etkili

gösterilmiştir. MDA'nın mutajenik olduğu ve kimyasal karsinojen gibi davrandığı da bilinmektedir [82].



Şekil 2 MDA'nın kimyasal yapısı.

Biyolojik örneklerde lipid peroksidasyonunun ve serbest radikal aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan en kolay ve yaygın yöntem, MDA'nın tiobarbitürik asid (TBA) ile tepkimesidir [83]. Lipid peroksidasyonunun belirlenmesi için kullanılan ve spesifik olmayan bir yöntem olmasına rağmen TBA tepkimesi, MDA üretiminin iyi bir göstergedir. Ayrıca, TBA testinin kaynatma aşamasında daha önce oluşmuş olan lipid hidroperoksidlerinin yıkılımı sonucunda artefakt bir MDA üretimi olmaktadır. Okside lipidlerde bulunan 2,4-alkadienler ve 2-alkenaller de TBA ile pozitif sonuç vermektedir. HPLC, serbest MDA ölçümünde en güvenilir yöntemdir.

SOD

Süperoksidin protonlanmış formu olan HO₂ ile doğrudan oksitleme, bakır (Cu⁺²) ile demir (Fe⁺²) gibi metallerle veya seruloplazminle katalizlenen tepkimeler ve NO[•] ile O₂⁻ arasındaki tepkimelerde oluşan reaktif peroksinitritler aracılığıyla LDL değişikliğe uğramaktadır. Damar duvarındaki O₂⁻ kaynakları arasında endotel hücreleri, düz kas hücreleri, makrofajlar ve adventisyal fibroblastlarda bulunan NAD(P)H oksidazlar, lipoksijenazlar, ksantin oksidazlar, ve NO sentazlar bulunmaktadır [84].

Süperoksid anyon radikallerine karşı ana savunma aracı olan SOD, süperoksidin hidrojen perokside dismutasyonunu katalizleyen bir metalloenzimdir. Genetik olarak 21. kromozomda lokalizedir [85]. SOD tarafından katalizlenen tepkimenin hızı 2x10⁹/ms'dir.

Hücre içi SOD aktivitesindeki artış dioksijenin toksisitesine karşı gelişen bir direnç artışına neden olur [81].

Tiyol

Serbest radikallerin proteinlerdeki tiyol (-SH) gruplarının oksidasyonuna yol açtığı gösterilmiştir [86, 87]. Sisteinin -SH grubu oksidatif atığa oldukça yatkındır ve -SH gruplarından değişik mekanizmalarla oluşan tiil radikali (-S[·]) proteinlerdeki disülfid bağlarının oluşumuna öncülük eder [88]. -SH gruplarının disülfidlere ve oksiasitler gibi diğer oksitlenmiş türevlere dönüşümü, radikal aracılı protein oksidasyonunun en erken gözlenebilen belirtisidir [89]. Birçok araştırmacı grubu elektron paramanyetik rezonans (EPR) tekniği kullanarak peroksinitritin tiyol grupları ile reaksiyonu sonucu tiil radikallerinin oluştuğunu göstermiştir. Serum tiyol düzeyleri protein oksidayon markırı olarak kullanılır.

Materyal ve Metod

Deney Grupları

25 adet Wistar tipi albino rat 4 gruba ayrıldı.

Grup 1. (n=4) (Sham grubu) : 5 gün 80ml/kg volümde intraperitoneal hava verilerek batın açılıp kapatıldı.

Grup 2. (n=7) (Kontrol grubu) : 5 gün 50µg/ml doz ve 80ml/kg volümde intraperitoneal ozon verilerek batın açılıp kapatıldı.

Grup 3. (n=7) (Hava/Sepsis grubu) : 5 gün 80ml/kg volümde intraperitoneal hava verilerek çekal ligasyon perforasyon (CLP) metodu ile deneysel sepsis oluşturuldu.

Grup 4. (n=7) (Ozon/Sepsis grubu) : 5 gün 50µg/ml doz ve 80ml/kg volümde intraperitoneal ozon verilerek CLP metodu ile deneysel sepsis oluşturuldu.

Deneysel Yöntem

Bu çalışma, Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Hayvan Etik Kurulu'nun 26.02.2010 tarih ve 2010–25 sayılı onayı ile laboratuvar hayvanları bakım ve koruma kılavuzu (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals-Institute of Laboratory Animal Resources Commission on Life Sciences National Research Council, USA) kriterleri dikkate alınarak gerçekleştirilmiştir.

Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Deney Hayvanları Yetiştirme Merkezi'nden temin edilen, seksüel olgunluğa erişmiş ağırlıkları 180±10 gr arasında değişen Wistar albino dişi ve erkek ratlar, 22°C oda ısısında ve % 45–75 nemde, 12 saat aydınlık ve karanlık dönemlerle, serbest su ve gıda sağlanarak araştırmaya alındılar. Yem ve su günlük olarak değiştirildi.

Çalışma süresince hayvanlar, kenarları sert plastik ve üstünde çelik ızgara bulunan deney grubuna göre işaretlenmiş kafeslerde tutuldu. Ratlar rastgele 4 gruba ayrıldı. 1. gruptaki ratlar sham grubu olarak değerlendirildi ve 5 gün süre ile günde bir kez 80ml/kg volümde intraperitoneal hava verilerek 6. gün anestezi altında steril koşullarda batına girildi ve herhangi bir işlem yapılmadan batın kapatıldı, 7. gün yine anestezi altında ratların karaciğer, akciğer ve böbrek dokuları ve kan örneği alınarak ratlar sakrifiye edildi. 2. gruptaki ratlar kontrol grubu olarak değerlendirildi ve 5 gün süre ile günde bir kez 50 µg/ml doz ve 80ml/kg volümde intraperitoneal O₃ gazı verildi, 6. gün anestezi altında steril koşullarda batına girildi ve herhangi bir işlem yapılmadan batın kapatıldı, 7. gün yine anestezi altında ratların karaciğer, akciğer ve böbrek dokuları ve kan örneği alınarak ratlar sakrifiye edildi. 3. gruptaki ratlar hava/sepsis grubu olarak değerlendirildi ve 5 gün süre ile günde 1 kez 80ml/kg volümde hava verildi. 6. gün ratlarda sepsis modeli oluşturmak amacıyla anestezi altında steril koşullarda çekal ligasyon ve perforasyon (CLP) yapıldı. 7. gün septik olarak kabul edilen ratlardan karaciğer, akciğer ve böbrek dokuları ve kan örneği alınarak ratlar sakrifiye edildi. 4. gruptaki ratlar ozon/sepsis grubu olarak değerlendirildi ve 5 gün süre ile günde 1 kez 50µg/ml doz ve 80ml/kg volümde O₃ gazı verildi. 6. gün ratlarda sepsis modeli oluşturmak amacıyla anestezi altında steril koşullarda çekal ligasyon ve perforasyon (CLP) yapıldı. 7. gün septik olarak kabul edilen ratlardan karaciğer, akciğer ve böbrek dokuları ve kan örneği alınarak ratlar sakrifiye edildi.

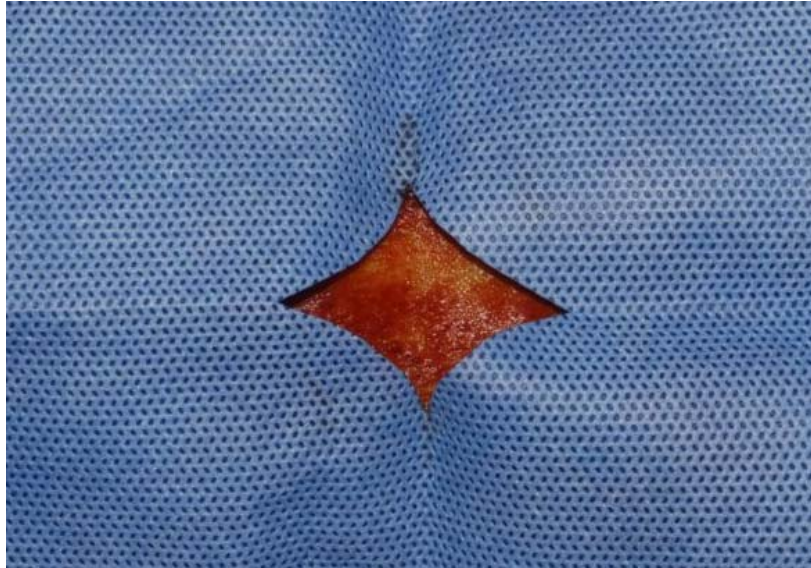
Çekal Ligasyon ve Perforasyon Uygulama Metodu

İntramüsküler yapılan 80–100 mg/kg ketamin ve 5–10 mg/kg ksilazin anestezisi altında batın traşlandı (**Resim1**). Asepsi antisepsi kurallarına uyularak batın derisi %10 Povidon iyod ile silindi. Girişim sahasına 45x45 cm steril delikli örtü serildi (**Resim2**). 2 cm insizyon ile deri, derialtı, fascia kaldırıldı. Batın havalandırıldı. Çekum bulunarak peritondan

ayrıldı. Çekum içeriği distale doğru sıvazlanarak fekaloid içeriğin perfore edilecek alanda birikmesi sağlandı ve 1,5 cm proksimalden 3/0 ipek ile bağlandı. Bağlanan çekum distaline 4 kez 22 G branul ile perforasyon yapıldı. Perfore edilen kısım proksimali sıkılarak fekaloid içeriğin perfore kısımlardan dışarı çıkması ile kontaminasyon sağlandı ve çekum anatomik pozisyonuna tekrar yerleştirildi (**Resim3**). İşlem sırasında tüm ratlar intraperitoneal 10ml/kg %0,9 NaCl ile resüsite edildi. Batın katları fasia deri altı ve deri olarak 3/0 ipek kullanılarak kapatıldı [90, 91].



Resim1 Karın derisinin traşlanması



Resim2 Delikli steril örtü ile batının örtülmesi



Resim3 perforasyon sonrası fekaloid içeriğin çıkarılması

Diseksiyon

İntramüsküler yapılan 80–100 mg/kg ketamin ve 5–10 mg/kg ksilazin anestezisi altında deri, derialtı, fasia kaldırıldı. Batın organları sağ tarafa ekarte edilerek sol böbrek görünür hale getirildi. Sol böbrek retroperitoneal bölgeden disseke edilerek renal arter ve ven klempe edilerek bağlandı sol böbrek çıkarılarak tampon solüsyon içine atıldı. Karaciğer sol lobu ayrılarak arter ve veni bağlandı karaciğer sol lobu çıkartılarak tampon solüsyon içine atıldı. Processus xphoideus belirlendi. Processus xphoideus yukarı kaldırılıp, diafragma belirlendi. Diafragma toraksa girmek için disseke edildi. İntrakardiyak girilerek yaklaşık 2 cc kan K-EDTA'lı tüpe alındı. Akciğerden doku örneği alınarak işlem sonlandırıldı. Alınan tüm doku ve kan örnekleri farklı tüp ve kaplara alınarak etiketlendi

Solunumu devam eden ratların sakrifiye edilmesi işlemi için 60 mg/kg Tiyopental ve 0,1 mg/ kg Vecuronium intrakardiyak verilmesini takiben servikal dislokasyon yöntemi uygulandı.

Işık Mikroskopik Yöntem

Takip ve Gömme

Parçalar 24 saat fiksatifte bekletildi. Ardından 24 saat aynı tamponda yıkanıp bekletildi. 2 saat %80 Etanolde, 3 saat %95 Etanol I'de, 15 saat % 95 Etanol II'de, 2 saat, %100 Etanol I'de, 2 saat %100 Etanol II'de, 2 saat %100 Etanol III'de bekletilerek takip şemasına uyuldu. Alkolden çıkarılan parçalar oda ısısında açık havada iyice kurutuldu. 10 dakika Ksilol I'de, 10 dakika Ksilol II'de, Ksilol III'de parçalar şeffaflaşma kritik noktasında çıkarıldı. 58–60°C'lik etüvde erimiş parafin içerisine alınan parçalar 1 gece bekletildi. Ertesi gün etüvden çıkarılan parçalar mavi boncuk parafin eriyiğine gömülerek bloklandı.

Kesit Alma

Işık mikroskopik kesitler için Leica RM 2145 model mikrotomda 5µ luk kesitler 45°C'lik su banyosuna alındı. Kesitlerin alma iyice yapıştırılması ve parafin uzaklaştırma işlemlerinde mikrodalga fırın (Arçelik MD554) kullanıldı. Tüm gruplardan elde edilen histolojik preparatlarda uygun histokimyasal boyamalar gerçekleştirildi.

Işık Mikroskopik Boyama

H&E Boyama Tekniği

Preparatlar deparafinize ve boyama basamaklarından geçirildi. Bunun için ksilol I'de 10 dakika, ksilol II'de 10 dakika, Ksilol III'de 10 dakika bekletildi, iyice dışarıda kuruduktan sonra alkole geçirildi. %100 Alkol I'de 2 dakika, %100 Alkol II'de 2 dakika, %95 Alkolde 2 dakika, %80 Alkolde 2 dakika (veya daha uzun süre), distile suda 5 dakika bekletildi ve preparatlar iyice süzüldü. Hematoksilende 2,5 dakika (boya her kullanışta süzüldü), akar suda 5 dakika, acid alkolde pembe renk olana kadar bekletildi ve akar suya daldırıp çıkartıldı.

Amonyaklı suda mor renk olana kadar bekletildi, akar suya daldırıp çıkartıldı, distile suda 5 dakika bekletildi ve preparatlar kurutuldu. Eozinde 2,5 dakika, %95 Alkolde 2,5 dakika, %100Alkol I'de 2,5 dakika, % 100Alkol II'de 2 dakika bekletildi, dışarıda iyice kurutuldu. Ksilol I'de 10 dakika, Ksilol II'de 10 dakika, Ksilol III'de 10 dakika bekletildi, boyalı preparatlara entellan damlatılarak kapatıldı (**Resim 4**).



Resim4. Laboratuarda kullanılan teknik, boya ekipmanları ve fotoğraflama işlemi gerçekleştirilen mikroskopik görüntüleme sistemi.

Biyokimyasal Yöntem

Hemolizat hazırlanması

K-EDTA'lı tüplere alınan kan örnekleri santrifüj edildikten sonra plazmaları atılıp serum fizyolojik ile yıkama ve santrifüj işlemleri 3 kez tekrarlandı. Altta biriken eritrosit çöktisinden alınıp 1:4 oranında buzlu su ile karıştırılarak eritrositler çatlatılarak hemolizat örnekleri elde edildi.

MDA Ölçümü

Hemolizat üzerine TBA eklendikten sonra 100°C’de 20 dk kaynatılarak 2000 rpm 10 dakika santrifüjlendikten sonra süpernatantta 532 nm dalga boyunda kolorimetrik ölçüm yapıldı. 1,1,3,3-Tetraetoksipropan ile hazırlanan standart grafikten nmol/mL MDA hesaplanıp, sonuçlar nmol/g Hb olarak verildi.

Tiyol Ölçümü

Serum tiol düzeyleri tiyoller ve 5,5’-ditio-bis-(2-nitrobenzoik asid) arasında tiol-disülfid yerdeğişimi esasına dayanan Hu ve arkadaşlarının metodu ile belirlendi [92]. Absorbanslar 412 nm de okunup, hesaplamalar glutatyon standart eğrisi üzerinden yapıldı.

SOD Ölçümü

Homojenatlar dilüe edilerek pH:10,2’de epinefrinin adenokroma otooksidasyonu temelinde dayalı kolorimetrik yöntem ile SOD düzeyleri hesaplandı. 2 mL karbonat tampon üzerine örnek ve %0,55 epinefrin çözeltisinden eklenerek absorbans artışı 15 saniye ara ile 3 dakika boyunca 480 nm dalga boyunda izlendi. Enzimin epinefrinin adenokroma otooksidasyonunu inhibe etme yüzdesi hesaplandıktan sonra standard grafikten elde edilen veriler U/g Hb olarak değerlendirildi.

Hemoglobin ölçümü

2,5 mL Drabkin üzerine 10 µL hemolizat eklenerek 5 dakika sonra 546 nm dalga boyunda suya karşı okundu. Sonuçlar standard grafikten hesaplanarak gr/ml Hb olarak verildi.

Bulgular

Histopatolojik Bulgular

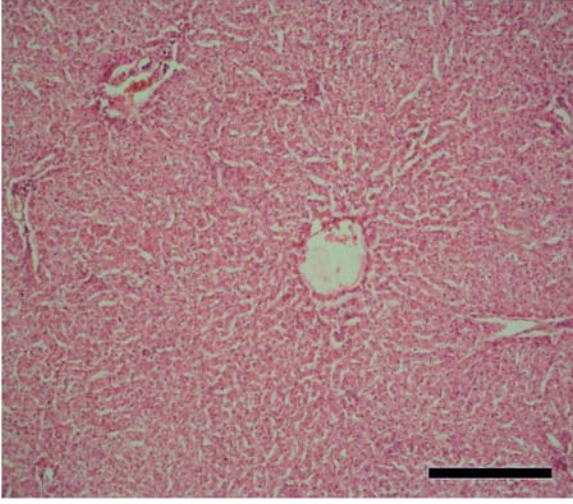
Makroskopik bulgular

Makroskopik olarak sham ve kontrol gruplarından farklı olarak sepsis gruplarının her ikisinde de asit mayi birikimi mevcuttu. Özel olarak hava/sepsis grubunda bu asit mayi hemorojik ve daha bulanık bir nitelik taşımakta idi.

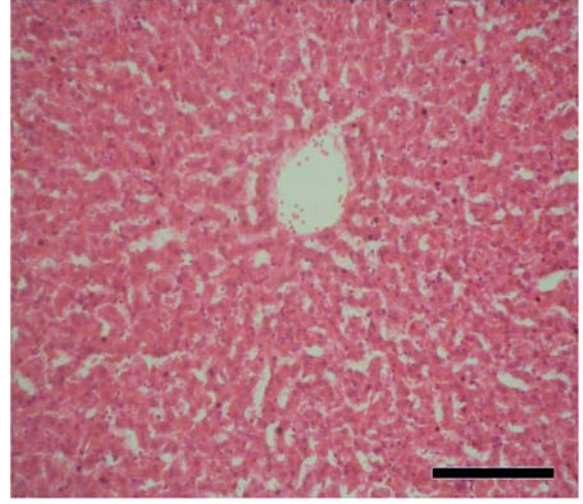
Mikroskopik bulgular

Karaciğer bulguları

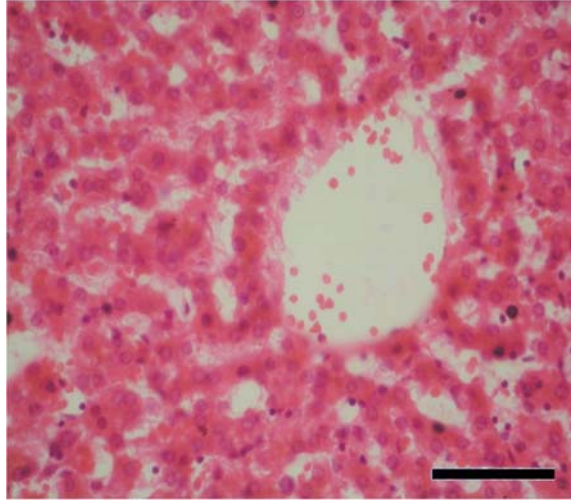
Sham grubu karaciğer olgularında normal histolojik yapı görülmektedir. Dıştan sıkı bir bağ dokusu yapısı olan Glisson kapsülü ile sarılı organda klasik karaciğer lobülünün merkezinde yerleşmiş vena centralis normal histolojik yapıda gözlemlenmiştir. Vena centralisten radial olarak çıkan Remark kordonları fasiküler tarzda yerleşmiş hepatosit hücrelerinden ibarettir. Hepatositlerin laterallerinde sinüzoidler normal yapılarında görüldü. Portal hepatic üçgen yapısında A. Hepaticus interlobularis, V.interlobularis ve Ductus biliferi yapısı normal struktürel formlarında gözlemlenmiştir (**Resim 5-6-7**).



Resim 5 Sham grubu H&E boyama x10 Bar: 500 μ m

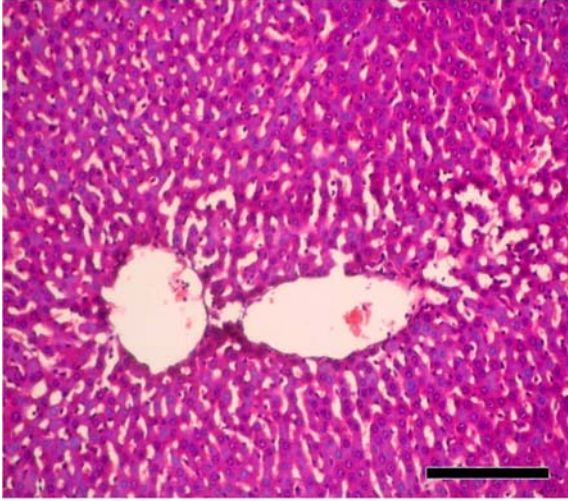


Resim 6 Sham grubu H&E boyama x20 Bar: 250 μ m

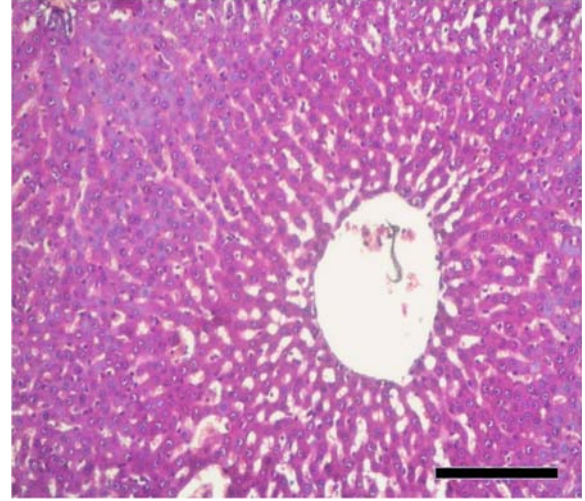


Resim 7 Sham grubu H&E boyama x40 Bar: 125 μ m

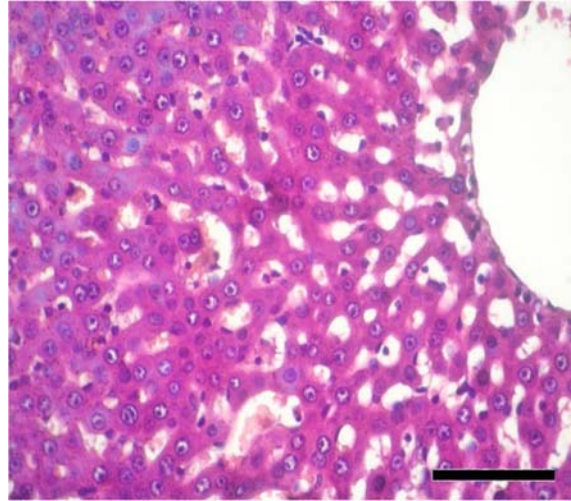
Hava/sepsis grubu karaciğer olgularında klasik karaciğer lobülünün merkezinde yerleşmiş vena centralislerde sham grubuna göre göreceli olarak dilatasyon saptanmıştır. Remark kordonlarına eşlik eden sinuzoid yapılarının sham grubuna göre daha geniş olduğu saptanmıştır. Bu gözlem istatistiksel olarak kanıtlanmıştır (**Grafik 1**). Karaciğer parankimatöz yapısı içinde bazı bölgelerde inflamasyona bağlı olarak oluşan odaklarda saptanmıştır. Bu odaklar içerisinde PNL infiltrasyonuna bağlı hücre kümeleri de saptanmıştır. Portal hepatik üçgen yapısında A. Hepaticus interlobularis, V.interlobularis ve Ductus biliferi yapısı dilate struktur göstermektedir (**Resim 8-9-10**).



Resim 8 Hava/Sepsis grubu H&E boyama x10 Bar: 500µm

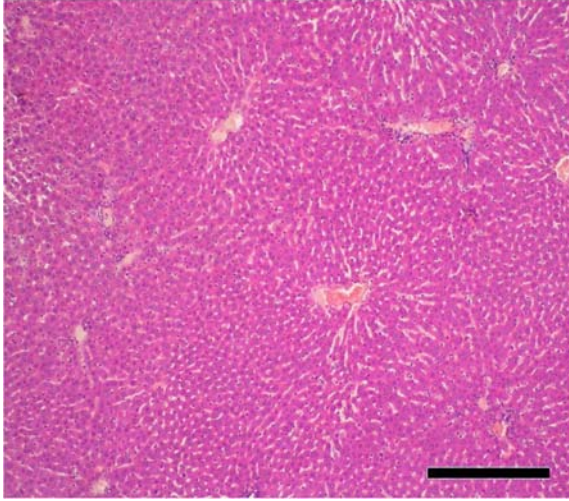


Resim 9 Hava/Sepsis grubu H&E boyama x20 Bar: 250µm

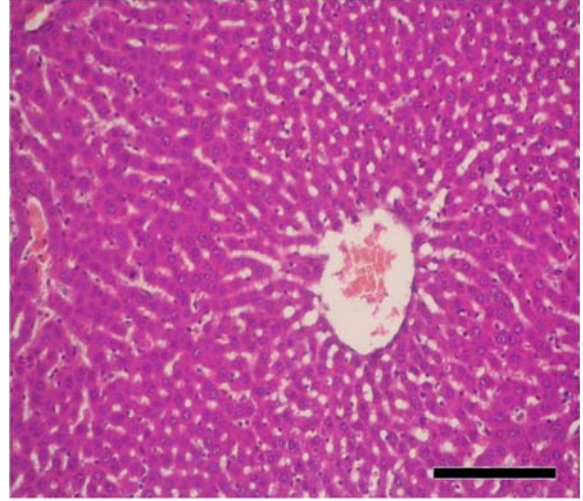


Resim 10 Hava/Sepsis H&E boyama x40 Bar: 125µm

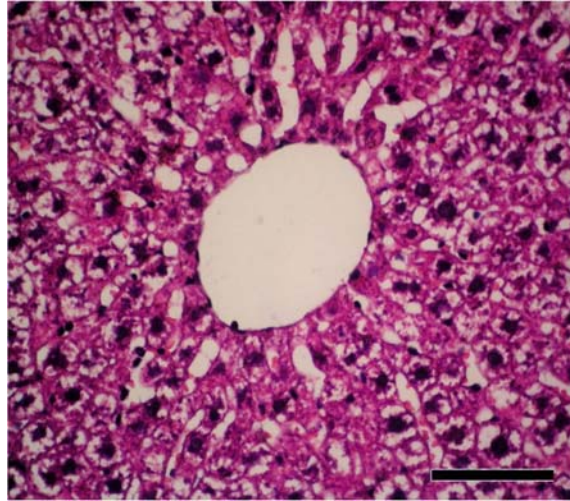
Kontrol grubu karaciğer olgularında klasik karaciğer lobülünün merkezinde yerleşmiş vena centralislerde sham grubuna göre göreceli olarak hafif dilatasyon saptanmıştır. Remark kordonlarına eşlik eden sinuzoid yapılarının sham grubuna daha yakın olduğu saptanmıştır. Bu gözlem istatistiksel olarak kanıtlanmıştır (**Grafik 1**). Karaciğer parankimatöz yapısı içinde inflamasyona bağlı olarak oluşan odaklar görülmemiştir. İlginç olarak kontrol grubunda yaygın olarak hepatosit hücre sitoplazması içinde vakuolize tarzda yapıların birikimi saptanmıştır. Portal hepatic üçgen yapısında A. Hepaticus interlobularis, V.interlobularis ve Ductus biliferi yapısı normal yapıda saptanmıştır (**Resim 11-12-13**).



Resim 11 Kontrol grubu H&E boyama x10 Bar: 500 μ m

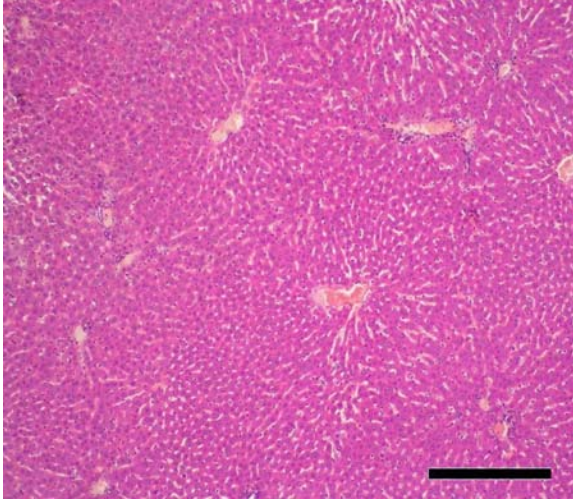


Resim 12 Kontrol grubu H&E boyama x20 Bar: 250 μ m

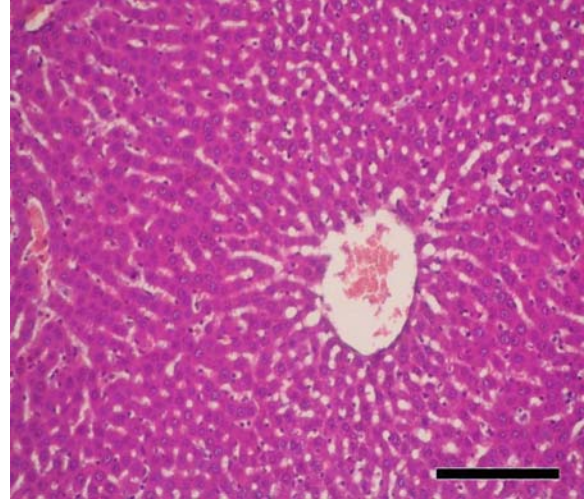


Resim 13 Kontrol grubu H&E boyama x40 Bar: 125 μ m

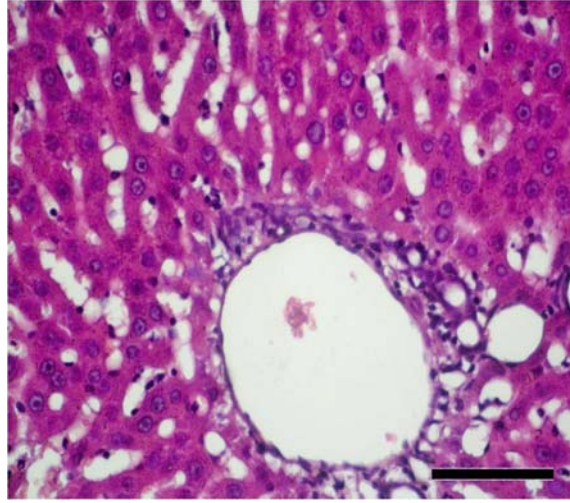
Ozon/sepsis grubu karaciğer olgularında klasik karaciğer lobülünün merkezinde yerleşmiş vena centralislerde sham grubuna göre göreceli olarak hafif dilatasyon saptanmıştır. Remark kordonlarına eşlik eden sinuzoid yapılarının hava/sepsis grubundan göreceli olarak daha küçük ancak kontrol grubundan göreceli olarak daha geniş olduğu saptandı. Bu gözlem istatistiksel olarak da kanıtlanmıştır (**Grafik 1**). Karaciğer parankimatöz yapısı içinde inflamasyona bağlı olarak oluşan odakların yer yer varlığı gözlemlendi. Özellikle bu infiltrasyonun vena centralis duvarında varlığı ilgi çekici idi. Portal hepatik üçgen yapısında A. Hepaticus interlobularis, V.interlobularis ve Ductus biliferi yapısı normal yapıda fakat PNL infiltrasyonunun yönünden pozitifliği saptanmıştır (**Resim 14-15-16**).



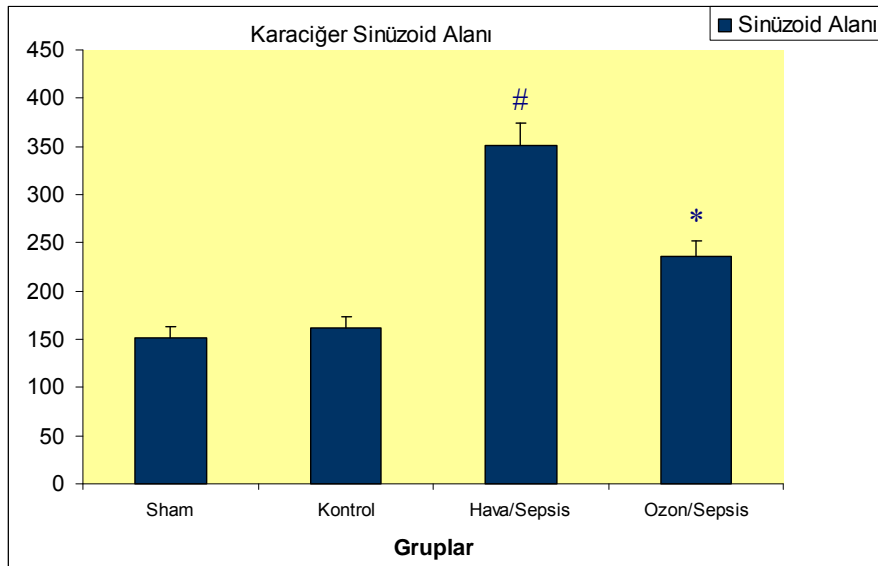
Resim 14 Ozon/Sepsis grubu H&E boyama x10 Bar: 500 μ m



Resim 15 Ozon/Sepsis grubu H&E boyama x20 Bar: 250 μ m



Resim 16 Ozon/Sepsis grubu H&E boyama x40 Bar: 125 μ m



Grafik 1 Karaciğer Sinüzoid Alanı ($p<0,05$)

* Hava/Sepsis Grubuyla karşılaştırıldığında ($p<0,05$)

Sham Grubuyla karşılaştırıldığında ($p<0,05$)

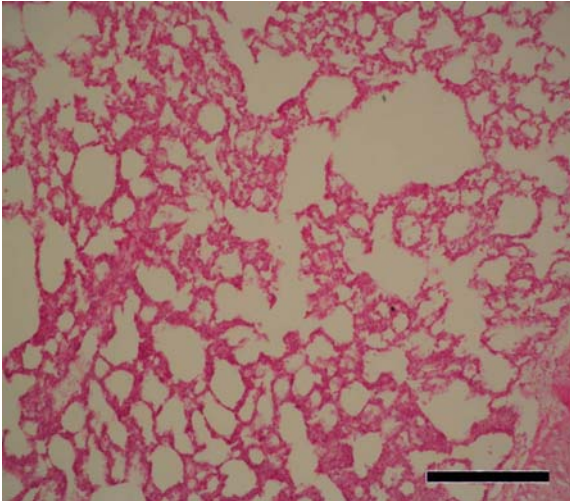
Akciğer Bulguları

Sham grubu grubuna ait akciğer doku kesitleri incelendiğinde, bronş, bronşiol, alveol ve pulmoner interstisyum yapılarının normal olduğu görüldü.

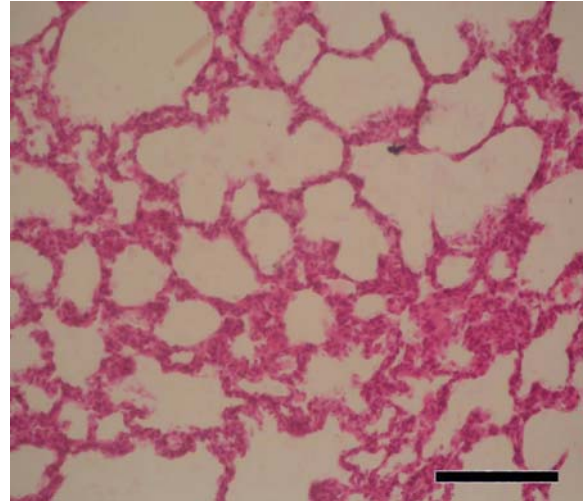
Kontrol grubu ratlarda ise hafif hemorajik alanlar dışında akciğer doku yapısının normal bir görünüme sahip olduğu ve sham grubuna benzediği belirlendi.

Hava/sepsis grubuna ait akciğer doku kesitlerinde bronş ve bronşioollerin epitellerinde dökülme, pulmoner interstisyumda hemoraji ve alveolar dejenerasyon tespit edildi. Ayrıca, yine bu grupta PNL ve makrofaj infiltrasyonunun olduğu gözlemlendi. Bazı alanlarda amfizematöz, bazı alanlarda ise atelektatik alanlar görüldü.

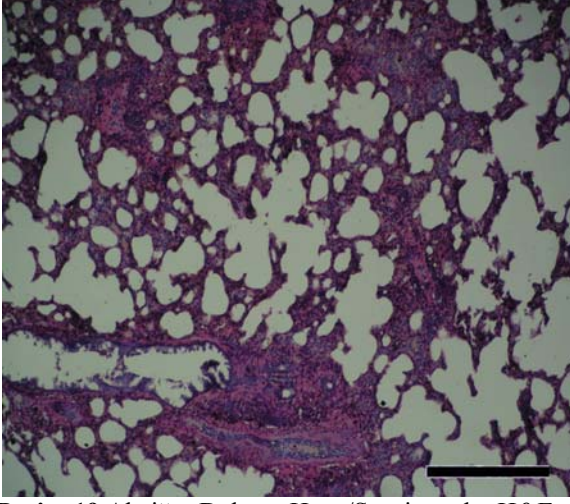
Ozon/sepsis grubunda akciğer dokusunda, interstisyel fibrozis, hemoraji ve ödemin hava/sepsis grubuna kıyasla daha minimal düzeyde seyrettiği gözlemlendi. Hava/sepsis grubunda görülen amfizematöz ve bazı alanlardaki atelektatik alanlar minimal düzeyde gözlemlendi (**Resim 17-18-19-20**).



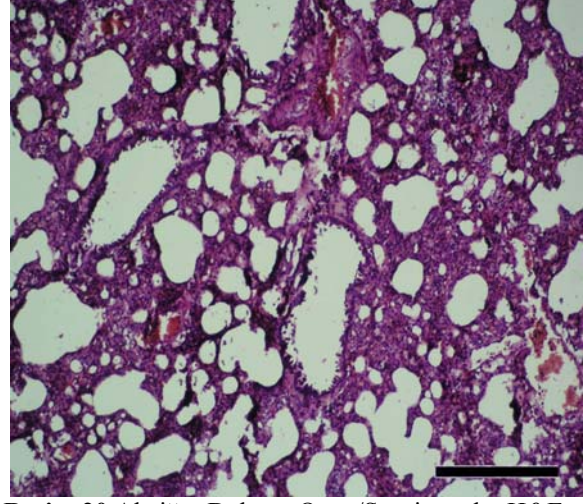
Resim 17 Akciğer Dokusu Sham grubu H&E boyama x20 Bar: 250µm



Resim 18 Akciğer Dokusu Kontrol grubu H&E boyama x20 Bar: 250µm



Resim 19 Akciğer Dokusu Hava/Sepsis grubu H&E boyama x20 Bar: 250µm



Resim 20 Akciğer Dokusu Ozon/Sepsis grubu H&E boyama x20 Bar: 250µm

Böbrek Bulguları

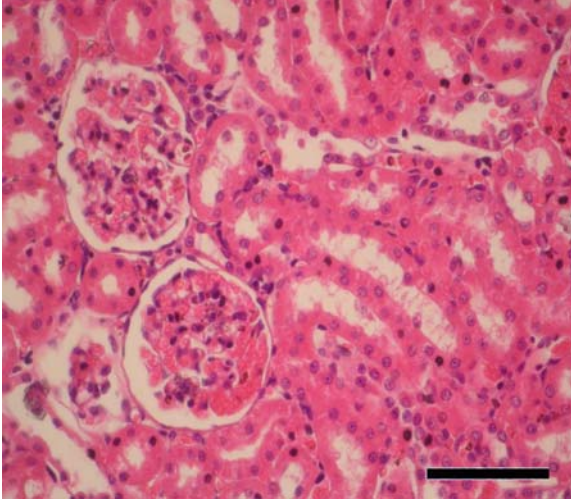
Sham grubu grubuna ait preparatlarda normal böbrek histolojik görünümü saptanmıştır. Organ korteks ve medulla olarak ayırtedilmiş. Korteks kısmında böbreği dıştan saran kapsüle yakın yerleşimli kortikal nefronlar, medullaya yakın sahalarda jukstaglomerüler nefron yapılarına rastlanmıştır. Glomerül yapıları normal histolojik görünüm sergilemektedir. Bu glomerül yapıların kenarlarında içi dökülen mikrovilluslarla karakterize proksimal ve daha dar ve temiz lümenli görünen distal tübüllerin yerleştiği saptanmıştır. Medulla kısmında ise Henle ince, kalın, inen ve çıkan parçalarına ait kesitsel görünüm normal histopatolojik görünüm sergilemektedir.

Kontrol grubu, sham grubuna benzer şekilde organ korteks ve medulla olarak ayırtedilmiş. Korteks kısmında böbreği dıştan saran kapsüle yakın yerleşimli kortikal nefronlar, medullaya yakın sahalarda jukstaglomerüler nefron yapılarına rastlanmıştır. Glomerül yapıları normal histolojik görünüm sergilemektedir. Bu glomerül yapıların kenarlarında içi dökülen mikrovilluslarla karakterize proksimal ve daha dar ve temiz lümenli

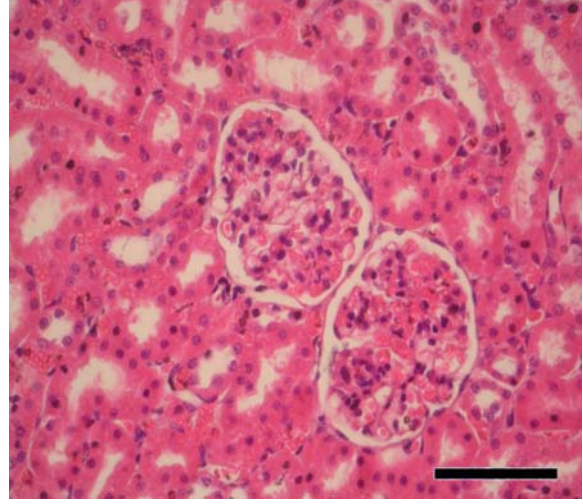
görünen distal tübüllerin yerleştiği saptanmıştır. Medulla kısmında ise tübüler yapılara ait kesitsel görünüm normal histopatolojik görünüm sergilemektedir.

Hava/sepsis grubu böbrek kesitlerinde ise organ korteks ve medulla olarak ayırt edilmiş. Korteks kısmında böbreği dıştan saran kapsüle yakın yerleşimli kortikal nefronlar, medullaya yakın sahalarda jukstaglomerüler nefron yapılarına rastlanmıştır. Glomerüler yapılarda Bowman boşluklarında dilatasyonla uyumlu görünüm hakimdir, bu görünüm ölçümlerde istatistiksel açıdan anlamlı büyük bulunmuştur (**Grafik 2**). Glomerül yumağı oluşturan afferent ve efferent damarlarda da dilatasyon, ödem ve PNL infiltrasyon bulguları belirgin şekilde gözlemlenmiştir. Glomerül yapılarının etrafında görülen proksimal ve distal tübüller dilate ve epitel tabakalarında silinme mevcuttur. Yine aynı şekilde kesit düzleminde saptanabilen arkuat arter, lobar arter ve vazarecta kesitlerinde de belirgin bir dilate yapı hakimdir. Genel anlamda böbreğe ait tüm tübüler yapıların lümeninde fibrinöz madde birikimi ve tübül nükleuslarında kaybolma izlendi. Tübüller arasında fokal odaklar oluşturan mikst tipte iltihabi hücre infiltrasyonu görülmüştür.

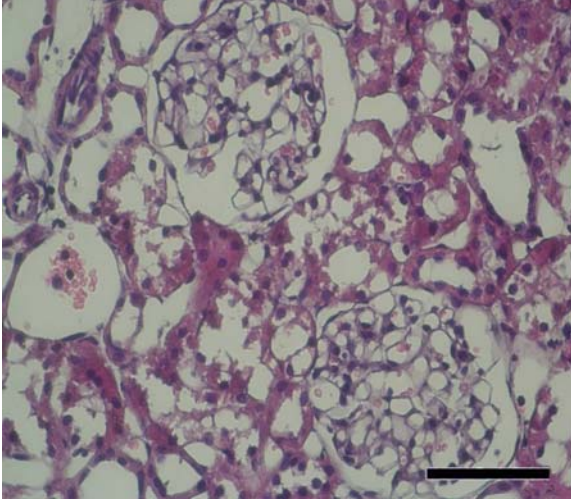
Ozon/sepsis grubunda böbrek kesitlerinde ise organ korteks ve medulla olarak ayırt edilmiş. Korteks kısmında böbreği dıştan saran kapsüle yakın yerleşimli kortikal nefronlar, medullaya yakın sahalarda jukstaglomerüler nefron yapılarına rastlanmıştır. Glomerüler yapılarda Bowman boşluklarında hava/sepsise göre daha az dilate sham grubuna göre daha dilate görünüm hakimdir, bu istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (**Grafik 2**). Glomerül yumağı oluşturan afferent ve efferent damarlarda da daha az dilatasyon, ödem ve PNL infiltrasyonu bulguları belirgindir. Glomerül yapılarının etrafında görülen proksimal ve distal tübüller minimal dilate ve epitel hücrelerinde minimal silinme mevcuttur (**Resim 21-22-23-24**).



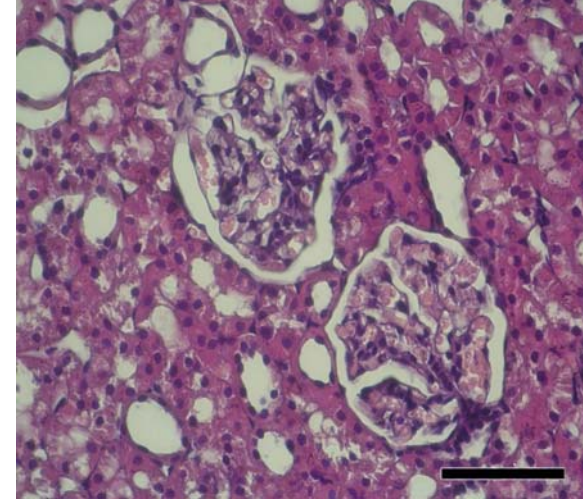
Resim 21 Böbrek Dokusu Sham grubu H&E boyama x40 Bar: 125µm



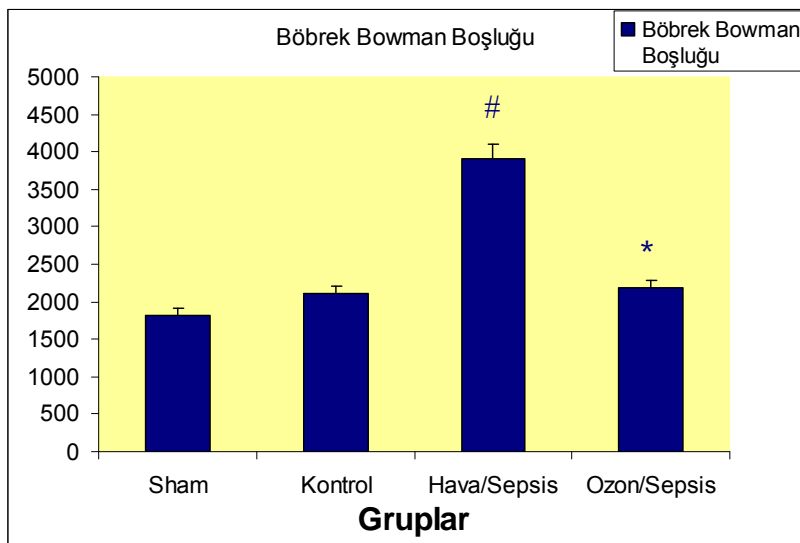
Resim 22 Böbrek Dokusu Kontrol grubu H&E boyama x40 Bar: 125µm



Resim 23 Böbrek Dokusu Hava/Sepsis grubu H&E boyama x40 Bar: 125µm



Resim 24 Böbrek Dokusu Ozon/Sepsis grubu H&E boyama x40 Bar: 125µm



Grafik 2 Böbrek Bowman Boşluğu Alanı

* Hava/Sepsis Grubuyla karşılaştırıldığında ($p < 0,05$)

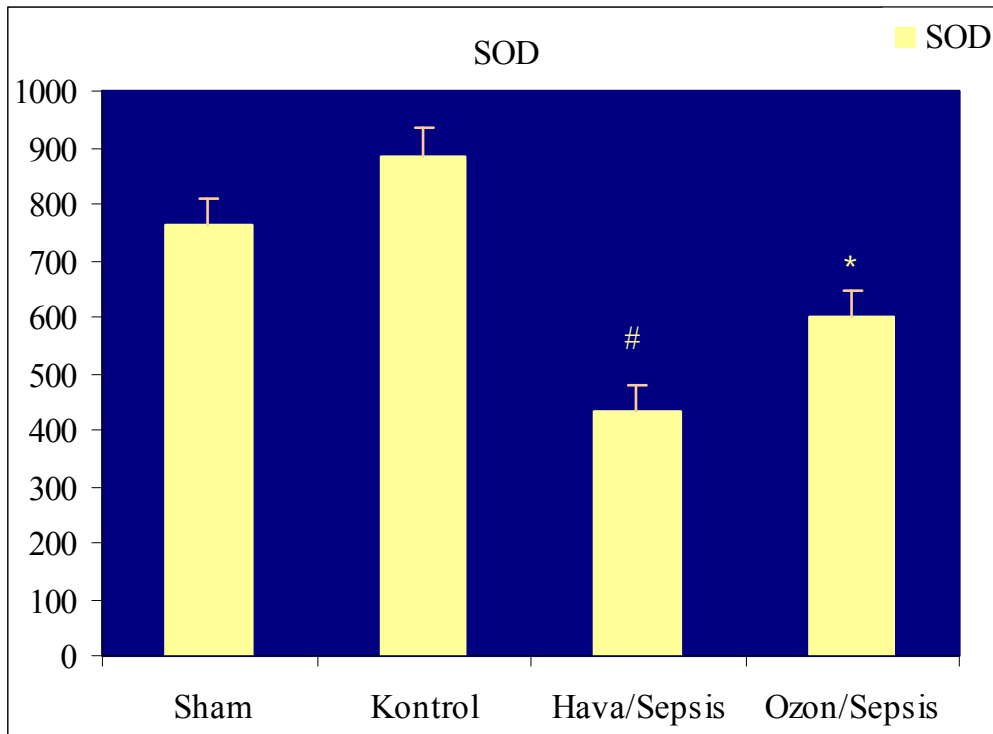
Sham Grubuyla karşılaştırıldığında ($p < 0,05$)

Biyokimyasal Bulgular

Elde edilen biyokimyasal veriler SPSS 15.0 programı ile yorumlandı. Buna göre Ozon verilen Kontrol grubunda, hava verilen Sham grubuna göre SOD değerleri ortalamaları (**Grafik 3**), Tiyoil değerleri ortalamaları (**Grafik 4**) anlamlı olarak yüksek çıkarken, MDA değerleri ortalamaları (**Grafik 5**) anlamlı olarak düşük bulunmuştur ($p<0,05$).

Hava/Sepsis grubunda Sham grubuna göre SOD, Tiyoil düzeyleri anlamlı olarak azalırken MDA değerlerinde anlamlı olarak artış saptanmıştır ($p<0,05$).

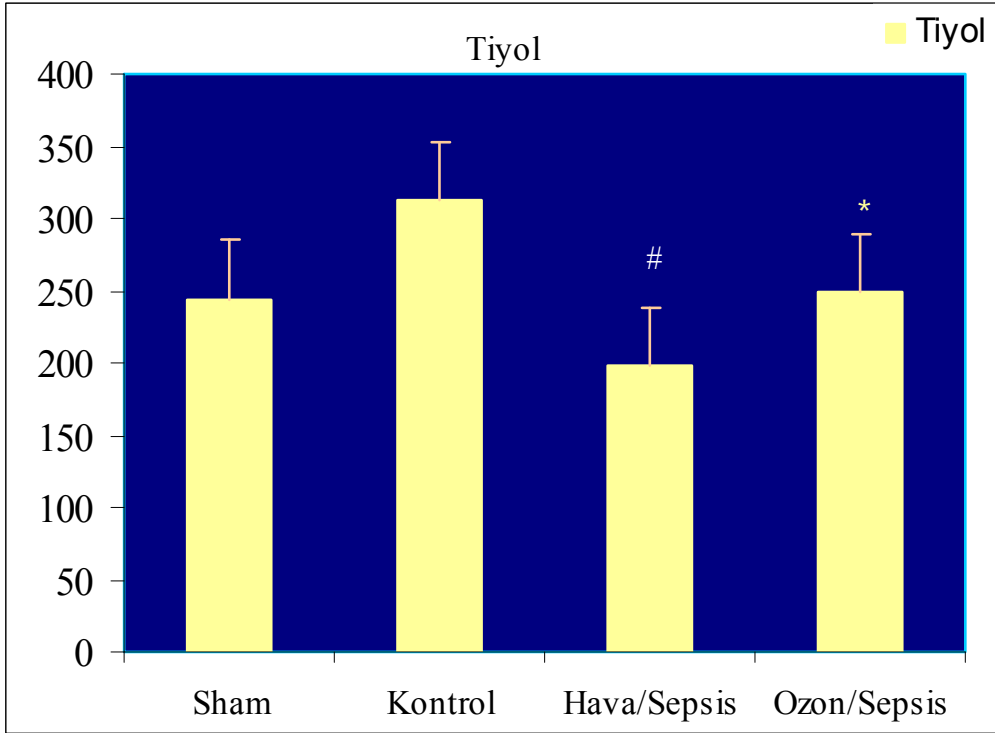
Hava/Sepsis grubunda Ozon/Sepsis grubuna göre SOD, Tiyoil düzeyleri anlamlı olarak azalırken MDA değerlerinde anlamlı olarak artış saptanmıştır ($p<0,05$).



Grafik 3 SOD Seviyeleri

* Hava/Sepsis Grubuyla karşılaştırıldığında ($p<0,05$)

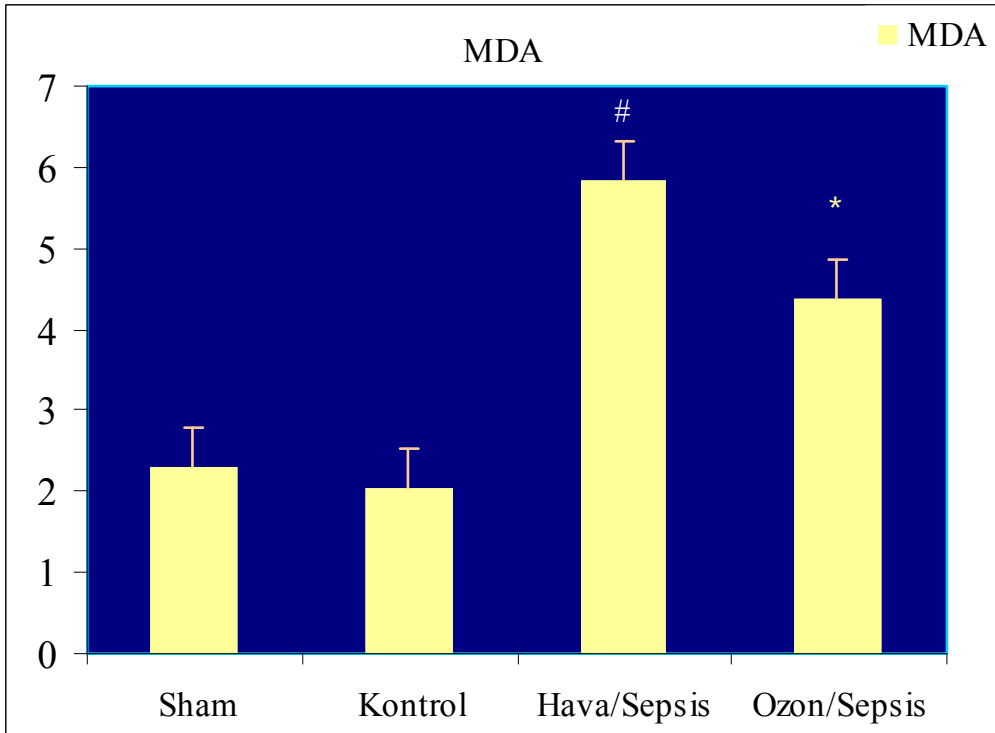
Sham Grubuyla karşılaştırıldığında ($p<0,05$)



Grafik 4 Tiyol Seviyeleri

* Hava/Sepsis Grubuyla karşılaştırıldığında ($p < 0,05$)

Sham Grubuyla karşılaştırıldığında ($p < 0,05$)



Grafik 5 MDA Seviyeleri

* Hava/Sepsis Grubuyla karşılaştırıldığında ($p < 0,05$)

Sham Grubuyla karşılaştırıldığında ($p < 0,05$)

TARTIŞMA ve SONUÇ

Ozon tedavisi cerrahide yanıklar, yara bakımı, dekübit ülserleri, kötü iyileşen yaralar, dermatolojide fungal egzema, herpes simplex ve zoster, akne, alopesi tedavisi, KBB'da Otitis media ve externa tedavisinde, jinekolojide inflamatuvar genital hastalıkların tedavisinde, enfeksiyonlarda özellikle Hepatit B ve C tedavisinde viral yükü azaltma amacıyla kullanılmaktadır. Diyabetik ayak tedavisinde enfekte yara iyileşmesinde kullanım bulunmaktadır [9, 93, 93]. Ayrıca ağrı tedavisinde özellikle disk hernisi nedeniyle meydana gelen bel ağrılarında intradiskal, intraartiküler kullanımı da yaygınlaşmaktadır [95].

İnsan ve hayvanlardaki ozon kullanımının tartışmaları hala mevcuttur. Özellikle yüksek doz kullanımında serbest radikal formasyonları salınımına bağlı yan etkileri ve inhalasyon yolu ile verildiğinde görülen respiratuar sistemdeki irritan etkileri bu tartışmada önemli rol almaktadır [96, 97]. Bu nedenler klinik pratikte O₃ gazı kullanımı sınırlanmaktadır. Son yıllarda O₃ gazının sepsiste sistemik kullanımı ile ilgili çalışmalar yayınlanmıştır [98]. Bu araştırmalar genellikle deneysel sepsis modellerinde uygulanmakta [8] ve özellikle endojen antioksidan kapasiteyi artırmak amacıyla, proflaktik ozonik ön koşullama çalışmaları şeklindedir. Deney hayvanlarında intraabdominal sepsis oluşturmanın en bilinen yöntemi çekal ligasyon ve perforasyon (CLP) 'dur. CLP'dan 24 saat sonra septik modellerin oluşturulduğu saptanmıştır [90, 91]. Çalışmamızda 5 gün boyunca yapılan ozonik ön koşullama sonrasında, CLP ile sepsis oluşturulan ratlardan alınan kan örneklerindeki SOD ve tiyol artışının yanısıra MDA azalması ile yararlı etkiler gösterilirken, doku örneklerinde sepsise bağlı histopatolojik bulgulardaki gerileme de gösterildi [99-104].

Rodriguez ve ark. [105], fekal peritonit indüksiyonu ile sepsis oluşturulmuş ratlarda O₃ gazı uygulamasının SOD ve Glutasyon Peroksidaz (GPx) seviyelerini artırdığını, dolayısıyla ozonik ön koşullama ile sepsiste meydana gelen endojen antioksidan

enzimlerdeki artışı göstermişlerdir. Bizim çalışmamızda da CLP ile sepsis oluşturulmuş ratlarda ozonik ön koşullamanın etkin olduğu SOD, tiyol ve MDA serum değer değişiklikleri ile gözlemledik.

Schulz ve ark. [106], letal polimikroiyal peritonit yapılmış hayvanlarda tekrarlayan O₃ gazı ön koşullamasının mortaliteyi azalttığını göstermişlerdir. Literatürde O₃ uygulamasının tam tersi olarak sağkalım oranlarında azalma olduğunu gösteren çalışmalar da mevcuttur. Trossiyan ve ark. 'nın [107] sepsis oluşturulmuş ratlarda sepsis öncesi 5 gün ozonik ön koşullama ile çalışmalarında sağkalımın %50 'den 35 'e düştüğünü saptamışlardır, ek olarak O₃ tedavisi TNF ve makrofaj inflamatuvar protein oranını artırdığını göstermişlerdir bu nedenle çalışmacılar O₃ gazı ön koşullamasının proinflamatuvar olabileceği sonucuna varmışlardır. Bizim çalışmamızda ozonik ön koşullama yapılan grupta, histopatolojik preparatlarda sepsisin etkilerinin azalmış olmasına rağmen, sham grubuna oranla yer yer hepatosit hücre sitoplazması içinde vakuolize tarzda yapıların birikimi ve hafif hemorajik alanlar dikkati çekti, ancak biyokimyasal verilere bakıldığında SOD ve tiyol değerlerinin, MDA değerlerinin anlamlı olarak değiştiği ve sonucunda inflamasyon ve oksidatif strese azalma saptandığı sonucuna varıldı.

Bette ve ark., [108] wistar türü ratlarda deneysel sepsis sonrasında tüm gruplara tazobaktam piperasilin rejimini uygulamışlar sadece intraabdominal O₃ gazı ön koşullaması yapılmış olan gruplarda yaşam süresi oranlarında artış ile birlikte proinflamatuvar sitokinler olan TNF- α ve IL-1 düzeyinde azalma saptamışlardır.

Torossian ve ark. [107], yine sepsis öncesi uygulanan O₃ gazı veya antibiyotik kullanımının septik ratlarda O₃ gazı tedavisinin doğru etkilerini tahmin edilemeyebileceğini söylemişlerdir. Buna paralel olarak Souza ve ark. [98], tek başına O₃ tedavisi uygulamışlar ve inflamatuvar cevapları modüle etmişler ve akut akciğer hasarını azaltmışlar ancak yaşam

sürelerinde belirgin bir artış saptayamamışlardır. Bizim çalışmamızda da O₃ gazı ön koşullaması sonucu özellikle akciğer histopatolojisinde bulgularda iyileşme olmasına rağmen kontrol grubunda, hafif hemorajik alanlar dikkati çekti.

Literatürde intraperitoneal verilecek O₃ gazı konsantrasyon ve volümü hakkında da tam bir konsensus sağlanmış değildir. Souza ve ark. [98], çalışmasında 102 mcg/ml gibi yüksek konsantrasyonda ancak 20 ml/kg şeklinde düşük volümlerde O₃ gazı uygulamışlardır. Schulz ve ark. [106], ise değişik konsantrasyonlardaki ozonu 80 ml/kg uygulamışlar ve bu volümdeki pneumoperitonyumda potansiyel yan etki oluşmadığını göstermişlerdir. Bizim çalışmamızda da literatürlerdeki çalışmalarla benzer olarak 50 mcg/ml O₃ konsantrasyonu 80 ml/kg volümde uygulandı, uygulamaya dair herhangi bir yan etki oluşmadı. Bu nedenle çalışmada O₃ gazı volümünden ziyade konsantrasyonun oluşan etki ve yan etkilerin daha olası nedeni olabileceğini düşünmekteyiz.

O₃ pneumoperitonyumunun yararlı etkisinin bir açıklaması tekrarlayan O₃ insuflasyonu peritoneal kavite içindeki adeziv dokuların indüklenmesine neden olabilir, böylelikle bakteri ve ürünlerinin kan dolaşımı içine girişini engellemektedir [108]. Bu engellenmenin cevabı biyokimyasal olarak proinflamatuvar mediatorlerin sirkülasyonda daha az artışı ile açıklanabilmektedir ki, bu da çalışmada bakteri ve ürünlerinin ozona bağlı tedavi grubunda sirkülasyona daha az girdiği göstermektedir. Ancak bir takım araştırmacılar yapılan mikro ve makropatolojik ve elektron mikroskopik çalışmalarda peritonda herhangi bir bulguya rastlamamışlardır [109]. Sonuçta Bette ve ark. [108], O₃ gazının esas etkisinin adeziv dokuları indüklemesi ile göstermediğini savunmuşlardır. Bizim çalışmamızda da O₃ gazının etkisinin aslında serumda artan antioksidan kapasiteye bağlı olabileceği sonucuna varılmıştır.

Jacobs ve ark. [110], artmış serum SOD değerlerinin ve Glutasyon peroksidaz seviyelerinin septik ratlarda artmış sağkalım ile çok iyi korele olduğunu bulmuşlardır. Bizim alışmamızda da ozonik n koşullanma ile süperoksid anyon radikallerine karşı ana savunma aracı olan SOD artışı sonucunda, antioksidan kapasite artışını sağladık ve sonuçta lipid peroksidasyon ürünü olan MDA değerlerinde azalma saptadık, ileri çalışmalarda bu değişikliklerin sağkalımı da olumlu olarak etkileyeceği düşünülmektedir.

ÖZET

Amaç: Sepsis mortalitesi halen çok yüksektir ve yeni tedavi arayışları sürmektedir. Bu araştırmada deneysel sepsis modeli oluşturulan ratlarda intraperitoneal olarak uygulanan O₃ gazı ön koşullaması sonucu antioksidan kapasitede meydana gelen artışı ve farklı doku tiplerinde inflamatuvar süreçlerde baskılanmayı ve histopatolojik değişiklikleri gösterebilmeyi amaçladık.

Gereç ve Yöntem: Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Hayvan Etik Kurulu onayı alındıktan sonra Deneysel Hayvanları Yetiştirme Merkezi'nden temin edilen, Wistar albino dişi ve erkek ratlar, uygun koşullarda, serbest su ve gıda sağlanarak araştırmaya alındılar. Ratlar rastgele 4 gruba ayrıldı. 1. gruptaki ratlar sham grubu olarak değerlendirildi ve 5 gün süre ile günde bir kez 80ml/kg volümde intraperitoneal hava verilerek 6. gün anestezi altında steril koşullarda batına girildi ve herhangi bir işlem yapılmadan batın kapatıldı, 7. gün yine anestezi altında ratların karaciğer, akciğer ve böbrek dokuları ve kan örneği alınarak ratlar sakrifiye edildi. 2. gruptaki ratlar kontrol grubu olarak değerlendirildi ve 5 gün süre ile günde bir kez 50 µg/ml doz ve 80ml/kg volümde intraperitoneal O₃ gazı verildi, 6. gün anestezi altında steril koşullarda batına girildi ve herhangi bir işlem yapılmadan batın kapatıldı, 7. gün yine anestezi altında ratların karaciğer, akciğer ve böbrek dokuları ve kan örneği alınarak ratlar sakrifiye edildi. 3. gruptaki ratlar hava/sepsis grubu olarak değerlendirildi ve 5 gün süre ile günde 1 kez 80ml/kg volümde hava verildi. 6. gün ratlarda sepsis modeli oluşturmak amacıyla anestezi altında steril koşullarda çekal ligasyon ve perforasyon (CLP) yapıldı 7. gün septik olarak kabul edilen ratlardan karaciğer, akciğer ve böbrek dokuları ve kan örneği alınarak ratlar sakrifiye edildi. 4. gruptaki ratlar ozon/sepsis grubu olarak değerlendirildi ve 5 gün süre ile günde 1 kez 50µg/ml doz ve 80ml/kg volümde O₃ gazı verildi. 6. gün ratlarda sepsis modeli oluşturmak amacıyla anestezi altında steril koşullarda çekal ligasyon ve perforasyon (CLP)

yapıldı 7. gün septik olarak kabul edilen ratlardan karaciğer, akciğer ve böbrek dokuları ve kan örneği alınarak ratlar kurbanı edıldı. Karaciğer, akciğer ve böbrek dokularında histopatolojik inceleme yapıldı, alınan kan örneklerinden ise, SOD, Tiyol ve MDA değerleri çalışıldı.

Bulgular: İntraperitoneal uygulanan O₃ gazı ön koşullaması gruplarda biyokimyasal olarak tespit edilen SOD ve Tiyol değerlerinde anlamlı olarak yükselme saptanırken MDA değerinde anlamlı düşüş tespit edildi. Bu bize O₃ gazı ön koşullamasının antioksidan mekanizmalarda artış sağladığını göstermektedir. Histopatolojik olarak da karaciğer sinüzoidlerinde hava/sepsis grubunda, ozon/sepsis grubuna göre daha fazla büyüme saptanmış bu bulgu karaciğer hasarını belirtmesi açısından olumlu olarak değerlendirilmiştir. Yine bakılan akciğer dokularında hava/sepsis grubunda ozon/sepsis grubuna göre çok daha fazla oranda alveolar membran harabiyeti gözlenmiştir. Böbrekte yine hava/sepsis grubunda ozon/sepsis grubuna göre bowman boşluğunda artış saptanmış ve istatistiksel olarak anlamlı olarak bulunmuştur. Karaciğer dokusunda ozon gazı alan gruplarda saptanan vakualizasyon verilen O₃ gazı konsantrasyonuna bağlanmıştır. Bununla birlikte ileri konsantrasyon, volüm çalışmalarına ihtiyaç vardır.

Sonuç: Çalışmamızda ozonik ön koşullanma ile endojen antioksidan kapasitede artış ve lipid peroksidasyon ürünlerinde azalma olduğunu, akciğer, karaciğer ve böbrek histopatolojisinde de ozonik ön koşullama yapılan grupta, histopatolojik preparatlarda sepsisin etkilerinin azaldığını gösterdik. Bu sonuçların klinik uygulamaya entegre edilebilmesi için daha ileri çalışmalara gereksinim vardır.

Kaynaklar

1. Balk RA. Sepsis and septic shock: Severe Sepsis and Septic shock. Definitions, epidemiology, and clinical manifestations. *Crit Care Clin.* 2000; 16:179–92.
2. Angus DC, Wax RS. Epidemiology of sepsis: An update. *Crit Care Med Suppl* 2001; 29:109–16.
3. Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M, The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med* 2003; 348:1546–54.
4. Zamora ZB, Borrego A, L'opez OY, Delgado R, Gonz'alez R, Men'endez S, Hern'andez F, Schulz S. Effects of Ozone Oxidative Preconditioning on TNF- α Release and Antioxidant-Prooxidant Intracellular Balance in Mice During Endotoxic Shock. *Mediators Inflamm.* 2005; 24:16–22.
5. Bocci V. Oxygen-ozone therapy: a critical evaluation. Springer, 2002.p.1–8
6. Rubin MB. The history of ozone. *Bull Hist Chem.* 2001; 26:40–56.
7. Bocci VA. Scientific and Medical Aspects of Ozone Therapy. State of the Art. *Arch Med Res* 2006; 37:425–35.
8. Madej P, Plewka A, Madej JA, Nowak M, Plewka D, Franik G, Golka D. 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; 30:52–8.
9. Bocci V, Ozone a new medical drug. published by Springer, Dordrecht, The Netherlands. 2005. 75–85.
10. Stübinger S, Sader R, Filippi A. The use of ozone in dentistry and maxillofacial surgery: a review. *Quintessence Int.* 2006; 37:353–9.
11. Nogales CG, Ferrari PH, Kantorovich EO, Lage-Marques JL. Ozone therapy in medicine and dentistry. *J Contemp Dent Pract.* 2008; 9:75–84.
12. Bocci V. The case for oxygen-ozonotherapy. *Br J Biomed Sci.* 2007; 64:44–9.

13. M. Muto, G. Ambrosanio, G. Guarnieri, E. Capobianco, G. Piccolo, G. Annunziata A. Rotondo. Low back pain and sciatica: treatment with intradiscal-intraforaminal O₂-O₃ injection. Our experience. *Radiol med.* 2008; 113:695–706.
14. Wood KA, Angus DC. Genetic epidemiology of sepsis and septic shock. *Semin Respir Crit Care Med.* 2004; 25:611–8.
15. Bone RC. Gram negative sepsis: Background, clinical features, and intervention. *Chest* 1991; 10:802–8.
16. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA et al. American Collage of Chest Physicians Society of Critical Care Medicine Concensus Coference: Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med* 1992; 20:864–74.
17. Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med* 2003; 336:952–3.
18. Salvo I, de Chian W, Musicco M, Langer M, Piadena R, Wolfer A et al. The Italian sepsis study: preliminary results on the incidence and evaluation of SIRS, sepsis, severe sepsis and septic shock. *Intensive Care Med* 1995; 21:244–9.
19. Muckart DJJ, Bhagwanjee S. American Collage of Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: definition of systemic inflammatory response syndrome and allied disorders in relation to critically injured patients. *Crit Care Med* 1997; 25:1789–95.
20. Kreger BE, Craven DE, McCabe WR. Gram- negative bacteremia IV. Reevaluation of clinical features and treatment in 612 patients. *Am J Med* 1980; 68:344–55.
21. Aygen B, Kayabaş Ü, Güven M, Doğanay M, Sümerkan B, Yıldız O. Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Yoğun Bakım Üniteleri nazokomiyal infeksiyonları

- sürveyansı: Epidemiyoloji, risk faktörleri ve prognozu etkileyen faktörler. Yoğun Bakım Dergisi 2001; 1:122–30.
22. Bone RC, Grodzin CJ, Balk RA. Sepsis: A new hypothesis for pathogenesis of the disease process. *Chest* 1997; 112:235–43.
 23. Niederman MS, Fein AM. Sepsis syndrome, the adult respiratory distress syndrome and nosocomial pneumonia: A common clinical sequence. *Clin Chest Med* 1990; 11:633–56.
 24. Janeway CA Jr, Medzhitov R. Introduction: The role of innate immunity in the adaptive immune response. *Semin Immunol* 1998; 10:349–50.
 25. Heine H, Rietschel ET, Ulmer AJ. The biology of endotoxin. *Mol Biotechnol* 2001; 19:279–96.
 26. Yorgancı K. Sepsis patofizyolojisi. *Yoğun Bakım Dergisi* 2005; 2:80–1.
 27. Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature* 2002; 420:885–91.
 28. Eaves-Pyles T, Murthy K, Liaudet L, Virag L, Ross G, Soriano FG, et al. Flagellin, a novel mediator of Salmonella-induced epithelial activation and systemic inflammation: I kappa B alpha degradation, induction of proinflammatory mediators, and cardiovascular dysfunction. *J Immunol* 2001; 166:1248–60.
 29. Herwald H, Morgelin M, Olsen A, Rhen M, Dahlback B, Muller-Esterl W, et al. Activation of the contact-phase system on bacterial surfaces—a clue to serious complications in infectious diseases. *Nat Med* 1998; 4:298–302.
 30. Yorgancı K, Sayek İ. Sepsis ve ilgili tanımlamalar. *Yoğun Bakım Dergisi* 2005; 2:75–9.
 31. Tulunay M. Sepsis ve ilişkili durumların tanımlamaları. *Yoğun Bakım Derneği Dergisi* 2003; 4:5–14.
 32. Levy MM, FinkMP, Marshall JC. 2001 SCC/ESICM/ACCP/ATS/SIS International sepsis definitions conference. *Crit Care Med* 2003; 31:1250–6.

33. Dellinger RP, Levy MM, Carlet JM, Bion J, Parker MM, Jaeschke R, Reinhart K, Angus DC, Buisson CB, Beale R, Calandra T, Dhainaut JF, Gerlach H, Harvey M, Marini JJ, Marshall J, Ranieri M, Ramsay G, Sevransky J, Thompson BT, Townsend S, Vender JS, Zimmerman JL, Vincent JL, for the International Surviving Sepsis Campaign Guidelines Committee et al. Surviving Sepsis Campaign: International guidelines for management of severe sepsis and septic shock:2008. *Crit Care Med* 2008; 36:296–327.
34. Baue AE. History of MOF and definitions of organ failure. In: Baue AE, Faist E, Fry DE (Eds.). *Multiple Organ Failure: pathophysiology, Prevention, and Therapy*. 1st ed. New York: Springer-Verlag; 2000:3–12.
35. Cinel I, Dellinger R. Advances in pathogenesis and management of sepsis. *Curr Opin Infect Dis* 2007; 20:345–52.
36. Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* 1990; 249:1431–3.
37. Landmann R, Zimmerli W, Sansano S, Link S, Hahn A, Glauser MP et al. Increased circulating soluble CD14 is associated with high mortality in gram-negative septic shock. *J Infect Dis* 1995; 171:639–44.
38. Wang H, Bloom O, Zhang M, Vishnubhakat JM, Ombrellino M, Che J, et al. HMG-1 as late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science* 1999; 285:248–51.
39. Levi M, Ten Cate H. Disseminated intravascular coagulation. *N Engl J Med* 1999; 341:586–92.
40. M Doğanay. Sepsis. Topçu A W, Söyletir G, Doğanay M (Editörler). *İnfeksiyon hastalıkları'nda*. İstanbul: Nobel Kitabevleri; 1996.s.473–86.
41. Akova M, Hayran M, Kocagöz S, Uzun Ö, Ünal S. Sepsiste klinik belirti ve bulgular. Uzun Ö (Editör). *Sepsis ve sekelleri'nde*. Ankara: Bilimsel Tıp Yayımevi; 1999.s.1–15.

42. Jacqueline IK. Kirk-Othmer encyclopedia of chemical technology. John Wiley & Sons, 3rd ed. 1981.
43. Rowland FS. Stratospheric ozone depletion. *Phil Trans R Soc B*. 2006; 361:769–790.
44. Wright ES, Dziedzic D, Wheeler CS. Cellular, biochemical and functional effects of ozone: new research and perspectives on ozone health effects. *Toxicol Lett*. 1990; 51:125–45.
45. Sanhueza PA, Reed GD, Davis WT, Miller TL. An environmental decision-making tool for evaluating ground-level ozone-related health effects. *J Air Waste Manag Assoc*. 2003; 53:1448–59.
46. Travagli V, Zanardi I, Silvietti A, Bocci V. A Physicochemical investigation on the effects of ozone on blood. *Int J Biol Macromol*. 2007; 4:1504–11.
47. Pryor WA, Squadrito GL, Friedman M. The cascade mechanism to explain ozone toxicity: the role of lipid ozonation products. *Free Radic Biol Med*. 1995; 19:935–41.
48. Di Paolo N, Gaggiotti E, Galli F. Extracorporeal blood oxygenation and ozonation: clinical and biological implications of ozone therapy. *Redox Rep*. 2005; 10:121–30.
49. Mustafa MG. Biochemical basis of ozone toxicity. *Free Radic Biol Med*. 1990; 9:245–65.
50. Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med*. 1991; 11:81–128.
51. Hamilton RF, Eschenbacher WL, Szweda L, Holian A. Potential involvement of 4-hydroxynonenal in the response of human lung cells to ozone. *Am J Physiol*. 1998; 274:L8–16.
52. Schaur RJ. Basic aspects of the biochemical reactivity of 4-hydroxynonenal. *Mol Aspects Med*. 2003; 24:149–59.

53. Trachootham D, Lu W, Ogasawara MA, Nilsa RD, Huang P. Redox regulation of cell survival. *Antioxid Redox Signal*. 2008; 10:1343–74.
54. Korkmaz A, Oter S, Sadir S, Coskun O, Topal T, Ozler M, Bilgic H. Peroxynitrite may be involved in bladder damage caused by cyclophosphamide in rats. *J Urol*. 2005; 173:1793–6.
55. Oter S, Korkmaz A, Topal T, Ozcan O, Sadir S, Ozler M, Ogur R, Bilgic H. Correlation between hyperbaric oxygen exposure pressures and oxidative parameters in rat lung, brain, and erythrocytes. *Clin Biochem*. 2005; 38:706–11.
56. Farber JL, Kyle ME, Coleman JB. Mechanism of cell injury by activated oxygen species. *Lab Invest*. 1990; 62:670–9.
57. Jannsen YMW, Van Houten B, Borm PJA, Mossman BT. Cell and tissue response to oxidative damage. *Lab Invest*. 1993; 69:261–74.
58. Wiseman H, Halliwell B. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem J*. 1996; 313:17–29.
59. Young IS, Woodside JV. Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol*. 2001; 54:176–86.
60. Powis G, Briehl M, Oblong J. Redox signaling and the control of cell growth and death. *Pharmacol Ther*. 1995; 65:149–73.
61. Lander HM. An essential role for free radicals and derived species in signal transduction. *FASEB J* 1997; 11:118–24.
62. Thannickal VJ, Fanburg BL. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2000; 279:L1005–28.
63. Bocci V, Valacchi G, Corradeschi F, Fanetti G. Studies on the biological effects of ozone: 8. Effects on the total antioxidant status and on interleukin–8 production. *Mediat Inflamm*. 1998; 7:313–7.

64. Travagli V, Zanardi I, Silvietti A, Bocci V. A physicochemical investigation on the effects of ozone on blood. *Int J Biol Macromol.* 2007; 41:504–11.
65. Valacchi G, Bocci V. Studies on the biological effects of ozone: 10. Release of factors from ozonated human platelets. *Mediators Inflamm.* 1999; 8:205–9.
66. Bocci V, Aldinucci C. Biochemical modifications induced in human blood by oxygenation-ozonation. *J Biochem Mol Toxicol.* 2006; 20:133–8.
67. Bocci V. Is it true that ozone is always toxic? The end of a dogma. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2006; 216:493–504.
68. Di Paolo N, Bocci V, Gaggiotti E. Ozone therapy. *Int J Artif Organs.* 2004; 27:168–75.
69. Halliwell B, Clement MV, Long LH. Hydrogen peroxide in the human body. *FEBS Lett.* 2000; 486:10–3.
70. Bocci V, Aldinucci C, Bianchi L. The use of hydrogen peroxide as a medical drug. *Riv Ital Ossigeno Ozonoterapia.* 2005; 4:30–9.
71. Rice-Evans C, Miller NJ. Total antioxidant status in plasma and body fluids. *Methods Enzymol.* 1994; 234:279–93.
72. Bocci V, Aldinucci C, Mosci F, Carraro F, Valacchi G. Ozonation of human blood induces a remarkable upregulation of heme oxygenase–1 and heat stress protein-70. *Mediators Inflamm.* 2007; 2007:1–6.
73. Fritz HB. Heme oxygenase–1: a therapeutic amplification funnel. *FASEB J* 2005; 19:1216–9.
74. LE Otterbein, MP Soares, K Yamashita, FH Bach. Heme oxygenase–1: unleashing the protective properties of heme. *Trends Immunol.* 2003; 24:449–55.
75. Kurata M., Suzuki M., Agar N.S. Antioxidant systems and erythrocyte life span in mammals. *Comp Biochem Physiol B.*, 1993; 106:477–87.

76. Mc Kord J.M. Oxygen derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med.*, 1985; 213:159–63.
77. Haliwell B. The role of oxygen radicals in human disease with particular reference to the vascular system. *Haemotasis*. 1993; 23:118–26.
78. Wolin M.S., Gupte S.A., Oeckler R.A. Superoxide in the vascular system. *J Vascular Res.* 2002; 9:191–207.
79. Champe P.C, Harvey R.A. Lippincot's illustrated reviews: Biochemistry second edition, J B Lippincot Company, Philadelphia. 1994.
80. De Zwart L.L., Meerman H.N.J., Commandeur J.N.M and Vermeulen N.P.E. Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and humans. *Free Radic Biol Med.*, 1999; 26:202–26.
81. Rumley A.G., Paterson J.R. Analytical aspects of antioxidants and free radical activity in clinical biochemistry. *Ann Clin Biochem.* 1998; 35:181–200.
82. Uchida K. Role of reactive aldehyde in cardiovascular disease. *Free Radical Biol Med.*, 2000; 28:1685–96.
83. Holley A.E., Cheeseman K.H. Measuring free radical reactions in vivo. *Brit Med Bull.* 1993; 49:494–505.
84. Sentman M.L., Brannström T., Westerlund S., Laukkanen MO, Ylä-Herttuala S, Basu S, Marklund SL. Extracellular superoxide dismutase deficiency and atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001; 21:1477–1482.
85. Chan P.H. Role of oxidants in ischemic brain damage. *Stroke.*, 1996; 27:1121–8.
86. Bindoli A, Rigobello MP. Mitochondrial thioredoxin reductase and thiol status. *Methods Enzymol*, 2002; 347:307–16.
87. Netto LES, Kowaltowski AJ, Castilho RF, Vercesi AE. Thiol enzymes protecting mitochondria against oxidative damage. *Methods Enzymol* 2002; 348:260–70.

88. Shacter E. Protein oxidative damage. *Methods Enzymol* 2000; 319:428–436.
89. Dean RT, Fu S, Stocker R, Davies MJ. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem J* 1997; 324:1–18.
90. Wichterman, KA, Baue AE, Chaudry IH. Sepsis and septic shock—a review of laboratory models and a proposal. *J Surg Res.* 1980; 29:189–201.
91. Nakagawa, NK, Jukemura J, Aikawa P, Nogueira RA, Poli-de-Figueredo IF, Sannomiya P. In vivo observation of mesenteric leukocyte-endothelial interactions after cecal ligation/puncture and surgical sepsis source control. *Clinics.* 2007; 62:321–6.
92. Hu ML, Louie S, Cross CE, Motchnik P, Halliwell B. Antioxidant protection against hypochlorous acid in human plasma. *J Lab Clin Med* 1993; 121:257–62.
93. Bocci V. Ozone as Janus: this controversial gas can be either toxic or medically useful. *Mediators Inflamm.* 2004; 13:3–11.
94. Martínez-Sánchez G, Al-Dalain SM, Menéndez S, Re L, Giuliani A, Candelario-Jalil E, Alvarez H, Fernández-Montequín JI, León OS. Therapeutic efficacy of ozone in patients with diabetic foot. *Eur J Pharmacol.* 2005; 523:151–61.
95. Andreula CF, Simonetti L, De Santis F, Agati R, Ricci R, Leonardi M. Minimally invasive oxygen–ozone therapy for lumbar disk herniation. *AJNR Am J Neuroradiol* 2003; 24:996–1000.
96. Bhalla DK, Gupta SK, Reinhart PG. Alteration of epithelial integrity, alkaline phosphatase activity, and fibronectin expression in lungs of rats exposed to ozone. *J Toxicol Environ Health A.* 1999; 57:329–43.
97. Pryor, WA. Mechanisms of radical formation from reactions of ozone with target molecules in the lung. *Free Radic Biol Med.* 1994; 17:451–65.

98. Souza YM, Fontes B, Martins JO, Sannomiya P, Brito GS, Younes RN, Rasslan S. Evaluation of the effects of ozone therapy in the treatment of intra-abdominal infection in rats. *Clinics*. 2010; 65:195–202.
99. Roy D, Wong PK, Engelbrecht RS, Chian ES. Mechanism of enteroviral inactivation by ozone. *Appl Environ Microbiol*. 1981; 41:718–23.
100. Dyas A, Boughton BJ, Das BC. Ozone killing action against bacterial and fungal species: microbiological testing of a domestic ozone generator. *J Clin Pathol*. 1983; 36:1102-4.
101. Olson WP. Ozone. *PDA J Pharm Sci Technol*. 1999; 53:125–8.
102. Steinhart H, Schulz S, Mutters R. Evaluation of ozonated oxygen in an experimental animal model of osteomyelitis as a further treatment option for skull-base osteomyelitis. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 1999; 256:153–7.
103. Sechi LA, Lezcano I, Nunez N, Espim M, Dupre I, Pinna A, et al. Antibacterial activity of ozonized sunflower oil(oleozon). *J Appl Microbiol*. 2001; 90:279–84.
104. Fan L, Song J, McRae KB, Walker BA, Sharpe D. Gaseous ozone treatment inactivates *Listeria innocua* in vitro. *J Appl Microbiol*. 2007; 103:2657–63.
105. Rodríguez ZZ, Guanche A, Álvarez RG, Rosales FH, Alonso Y, 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;58:371–5.
106. Schulz S, Rodriguez ZZ, Mutters R, Menendez S, Bette M. Repetitive pneumoperitoneum with ozonized oxygen as a preventive in lethal polymicrobial sepsis in rats. *Eur Surg Res*. 2003; 35:26–34.

107. Torossian A, Ruehlmann S, Eberhart L, Middeke M, Wulf H, Bauhofer A. Pre-treatment with ozonized oxygen (O₃) aggravates inflammation in septic rats. *Inflamm Res*. 2004; 53:S122–5.
108. Bette M, Nuesing RM, Mutters R, Menendez S, Schulz S. Efficiency of tazobactam/piperacilin in lethal peritonitis is enhanced after preconditioning of rats with O₃/O₂ pneumoperitoneum. *Shock*. 2006; 1:26–9.
109. Gomez-Barry H, Barber E, Menendez S, Gomez M: Estudio estructural y ultraestructural de organos de ratas sometidas a la administracion intraperitoneal de ozono. Libro de Resumenes Primer Congreso Iberoamericano de Aplicaciones del Ozono, La Habana, Cuba: 15, 31 Oct.–3 Nov., 1990.
110. Jacobs S, Sobki S, Morais C, Tariq M: Effect of pentaglobin and piperacillin on survival in a rat model of faecal peritonitis: importance of intervention timings. *Acta Anaesthesiol Scand* 2000; 44:88–95.