



T.C.

SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ

**İSTANBUL SULTAN II. ABDÜLHAMİD HAN EĞİTİM VE
ARAŞTIRMA HASTANESİ**

ANESTEZİYOLOJİ VE REANİMASYON KLİNİĞİ

**MAJOR OTOHEMOTERAPİ VE OZONLANMIŞ SERUM
FİZYOLOJİK UYGULAMASININ HEMOREOLOJİ VE KIRMIZI KAN
HÜCRELERİNE OLAN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Dr. İbrahim Ekşi

TIPTA UZMANLIK TEZİ

İSTANBUL/2023



T.C.

SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ

**İSTANBUL SULTAN II. ABDÜLHAMİD HAN EĞİTİM VE
ARAŞTIRMA HASTANESİ**

ANESTEZİYOLOJİ VE REANİMASYON KLİNİĞİ

**MAJOR OTOHEMOTERAPİ VE OZONLANMIŞ SERUM
FİZYOLOJİK UYGULAMASININ HEMOREOLOJİ VE KIRMIZI KAN
HÜCRELERİNE OLAN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Dr. İbrahim Ekşi

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Arzu İrban

TIPTA UZMANLIK TEZİ

İSTANBUL/2023

TEŞEKKÜR

Asistanlık sürecim boyunca öğrettiği gerek teorik bilgiler gerekse yaptırdığı uygulamalar için, tez sürecimin başından itibaren kısa sürede çok verimli işler yapmamı sağlayan ve hep destek olan hocam Prof. Dr. Arzu İrban' a minnetlerimi sunuyorum.

Asistanlığımın ilk gününden itibaren bilgi, beceri ve tecrübeleri ile her zaman öğretici ve destek olan uzman abi ve ablalarımın teşekkürü bir borç bilirim. Hastane içi ve hastane dışı hem mesleki hem de sosyal hayatta bana yol gösterici olan Uzm. Dr. Hamdi Tüfekçi, Doç. Dr. B. Barış Güven, Dr. Öğr. Üyesi Dr. Gökhan İnangil ve Uzm. Dr. Selma San'a desteklerinden dolayı ayrıca teşekkür ederim.

Gerek ameliyathane gerekse de yoğun bakımda asistanlık hayatım boyunca mesai paylaştığım teknisyen, hemşire ve personel arkadaşlarıma yardımları ve emekleri için teşekkürlerimi iletiyorum.

İlk günden itibaren her zorluğu beraber göğüslediğimiz, her mücadelede sırt sırta verdiğimiz başta Uzm. Dr. Temel Güner, Uzm. Dr. Fulya Yurtsever, Uzm. Dr. A. Cihan Çakı olmak üzere tüm asistan kardeşlerime beraber geçirdiğimiz her gün için çok teşekkür ederim.

Son olarak sadece asistanlık değil tüm hayatımda hep arkamda duran ve bir gün bile yalnız bırakmayan babam Nizam Ekşi, annem Sureyya Ekşi, kardeşlerim Aslı Ekşi, Fulya Gökdemir, Mahmut Gökdemir, Erdal Alabak ve Cemil Zalluhoğlu' na her an her koşulda yanımda oldukları için teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
KISALTMALAR.....	iv
TABLO LİSTESİ.....	vi
ŞEKİL LİSTESİ.....	vii
ÖZET.....	viii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1 Ozon.....	3
2.1.1 Ozon Nedir?.....	3
2.1.2 Ozonun Tarihçesi.....	4
2.1.3. Ozonun Atmosferdeki Yeri ve UV Işınlardan Koruma Mekanizması.....	6
2.1.4. Medikal Kullanım Amacıyla Ozon Elde Etme.....	7
2.1.5. Ozon Tedavisi Uygulama Metotları.....	7
2.1.5.1 Major Ozon Hemoterapi (MOHT).....	8
2.1.5.2. Minör Ozon Terapi.....	11
2.1.5.3. Rektal İnsuflasyon.....	11
2.1.5.4. İntraartiküler Ozon Uygulamaları.....	12
2.1.5.5. İntradiskal Ozon Uygulaması.....	12
2.1.5.6 Paravertebral – İntramüsküler Ozon Uygulaması.....	13
2.1.5.7 Topikal Ozon Uygulamaları.....	13
2.1.6 Ozonun Kontrendikasyonları ve Yan Etkileri.....	14
2.2 Reoloji ve Hemoreoloji.....	15
2.2.1 Reoloji Nedir?.....	15
2.2.2 Hemoreoloji Tanımı ve Temel Kavramları.....	17

2.2.2.1 Kan Viskozitesi	18
2.2.2.2. Plazma Viskozitesi	19
2.2.2.3 Hematokrit	20
2.2.2.4 Eritrosit Deformabilitesi	21
2.2.2.4.1 Eritrosit Deformabilitesini Etkileyen Faktörler ve Fizyopatolojik Durumlar	22
2.2.2.5 Eritrosit Agregasyonu	23
2.2.2.5.1 Eritrosit Agregasyonunu Etkileyen Faktörler ve Fizyopatolojik Durumlar	25
2.2.2.6. Hemoreolojinin Klinikteki Yeri ve Önemi	25
3. MATERYAL VE METOD	27
3.1 Çalışmanın Planlanması ve Katılımcıların Seçimi	27
3.2. Çalışma Protokolü	27
3.3 Eritrosit Deformabilitesi Ölçümü	29
3.4. Eritrosit Agregasyonu Ölçümü	31
3.5. Tam Kan ve Plazma Viskozitesi Ölçümü	32
3.6 Veri Analizi.....	32
4. BULGULAR.....	33
5. TARTIŞMA	37
6. SONUÇ	41
7. KAYNAKLAR.....	43

KISALTMALAR

2.3 DPG: 2,3 Difosfogliserat

4-HHE: 4 Hidroksiheksanol

4-HNE: 4 Hidroksineonal

°A: Angström

AI%: Agregasyon yüzdesi

ARE: Antioksidan yanıt elemanları

ATP: Adenozin Trifosfat

C: Celsius derece

Ca: Kalsiyum

Cal: Kalori

Cm: Santimetre

cP : Centipoise

CRP: C Reaktif Protein

EA: Eritrosit Agregasyonu

ED: Eritrosit Deformabilitesi

EI: Elongasyon İndeksi (Uzama İndeksi)

EImax: Maksimum Elongasyon İndeksi (Maksimum Uzama İndeksi)

G6PDH: Glukoz-6-fosfatdehidrojenaz

H₂O₂: Hidrojenperoksit

HbA1c: Glikozile Hemoglobin

Hct: Hematokrit

K: Potasyum

Km: Kilometre

KOAH: Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı

Kv: Kilovolt

LDH: Laktatdehidrogenaz

LOP: Lipid ozonlama ürünü

LORCA: Laser-assisted optical rotational cell analyzer

ml: Mililitre

MOHT: Major ozonhemoterapi

µg: Mikrogram

Na: Sodyum

Nm: Nanometre

NO: Nitrikoksit

NO₂: Nitritdioksit

NRF 2: Nükleer faktör eritroid-2 ilişkili faktör 2

O: Oksijen Atomu

O₂: Oksijen Molekülü

O₃: Ozon

Pa: Paskal

PUFA: Poliansatüre yağ asidi (Çoklu doymamış yağ asidi)

PVP: Polivinilpirolidon

ROS: Reaktif oksijen ürünleri

Sec: Saniye

SF: Serum Fizyolojik (%0.9 NaCl)

SOD: Süperoksit dismutaz

SS^{1/2}: Shear Stress 1/2 (Maksimum Uzama İndeksinin yarısına ulaşılması için gereken kayma stress)

t^{1/2}: Agregasyon yarılanma Zamanı

TKV: Tam kan viskozitesi

UV: Ultraviole (mor ötesi)

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Medikal Ozon Kullanımının Tarihçesi	5
Tablo 2. Ozon Tedavisinin Uygulanma Yöntemleri	7
Tablo 3. Agregasyon	33
Tablo 4. Deformabilite-Elongasyon (I)	34
Tablo 5. Deformabilite-Elongasyon (II)- STR(Pa) Shear Stress	35
Tablo 6. Plazma Viskozitesi.....	36
Tablo 7. Tam Kan Viskozitesi	36



ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Ozonun atmosferde oluşumu	4
Şekil 2. Atmosferi oluşturan katmanlar	6
Şekil 3. MOHT Seti	8
Şekil 4. MOHT' nin Etkileri	10
Şekil 5. Rektal İnsüflasyon Seti	12
Şekil 6. Newtonian Sıvılarda Viskozite.....	17
Şekil 7. Non-Newtonian Sıvılarda Viskozite	17
Şekil 8. Kanda Kayma Hızı-Viskozite Eğrisi	18
Şekil 9. Hematokrit ve tam kan viskozitesi arasındaki ilişki	21
Şekil 10. Eritrosit Deformabilitesi Na-K-ATPaz Mekanizması	23
Şekil 11. Eritrosit Rulo Formasyonu	24
Şekil 12. Medikal Ozon Jeneratörü.....	28
Şekil 13. Vakumlu Sitratl Şişe	29
Şekil 14. MOHT Uygulaması	29
Şekil 16. Lazerli ektasitometre cihazı.....	30
Şekil 17. Cone-plate viskozimetre cihazı	32

ÖZET

Amaç: Ozon (O₃), keşfedildiği 19. yüzyıldan bu yana esas, tamamlayıcı ve alternatif tedavi edici bir ajan olarak kullanılmaktadır. Literatürde O₃' ün yararlı etkilerinin atfedildiği birçok çalışma bulunmaktadır. Kırmızı kan hücrelerinin yapısı ve hemoreolojik parametreler birçok hastalık sonucunda değişmektedir. Bu hastalıklarda ve diğer durumlarda tedavi amacıyla kullanılan O₃' ün bu parametrelere etkisinin bilinmesi tedavideki yeri açısından önemlidir. Biz çalışmamızda major otohemoterapi (MOHT) ve ozonlanmış serum fizyolojik (SF) uygulamasının hemoreolojik parametrelere ve kırmızı kan hücrelerine olan etkilerinin araştırılmasını amaçladık.

Gereç ve Yöntemler: GETAT Klinik Uygulamaları Etik Kurulu (Onay no: 2023-045) onayı sonrası 20 gönüllü kapalı zarf yöntemi ile iki gruba ayrıldı. Her iki grupta da işlem öncesi değerlendirme için damar yolu açılarak 6 ml kan EDTA' lı tüpe alındı. Grup M (Major Otohemoterapi, n:10) için 100 ml kan sitratlı vakumlu şişeye alınarak 100 ml 14 µg/ml dozda ozon-oksijen (O₃-O₂) karışımı ile muamele edildi. Grup S (ozonlanmış SF, n:10) için 100 ml SF içine kabarcık yöntemi ile 100 ml 5mcg/kg dozda O₃-O₂ karışımı verildi. Ozonlanmış kan ve SF 15-20 dakikada retransfüze edildi. Her iki grupta da işlemden 10 dakika sonra örneklem için EDTA' lı tüpe 6 ml kan alındı. İşlem öncesi ve sonrası alınan kanlardan Eritrosit Deformabilitesi (ED), Eritrosit Agregasyonu (EA), Plazma Viskozitesi (PV) ve Tam Kan Viskozitesi (TKV) değerlerine bakıldı. Sonuçlar grupların kendi içinde ve gruplar arası karşılaştırıldı.

Bulgular: Grup S' te agregasyon yüzdesi (%AI) değişkeninin O₃ terapisi sonrasında, uygulama öncesine göre anlamlı olacak şekilde düşük çıktığı saptandı (Z=-2,090; p=0,037). Elongasyon indeksi maksimum değeri (EI max) (P=0,049), ve 1,69 Pa Shear Stres değerindeki EI değeri O₃ terapisi sonrası grup S' te grup M' e göre anlamlı olarak yüksek ölçülmüştür (p=0,025). EI max yarısının elde edildiği shear stress değeri (ss1/2) Grup M de Grup S' ye göre daha yüksek çıkmıştır (p=0,049).

Sonuç: Enfeksiyon, sepsis, hiperparaproteinemiler, diyabet, stroke gibi patolojilerde ED de azalma ve EA da artış olduğu bilinmektedir. Ozonlanmış SF' in deformabiliteyi arttırması ve agregasyon oranını azaltması ile bu hastalıklarda kullanıldığında bu patolojileri tedavisine katkı sağlayacağını düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: Ozon, Major Otohemoterapi, Eritrosit Agregasyonu, Eritrosit Deformabilitesi, Plazma Viskozitesi, Tam Kan Viskozitesi

ABSTRACT

AIM: Ozone (O₃) has been used as a primary, complementary, and alternative therapeutic agent since its discovery in the 19th century. There are many studies attributing beneficial effects to O₃ in the literature. The structure of red blood cells and hemorheological parameters change by various diseases. Knowing the effect of O₃ on these parameters is important in terms of its place in treatment in these diseases and other conditions, In our study, we aim to investigate the effects of major autohemotherapy (MOHT) and ozonated physiological saline solution (SF) application on hemorheological parameters and red blood cells.

Materials and Methods: After the approval of the TCAM Clinical Practices Ethic Committee (Approval no: 2023-045), 20 volunteers were divided into two groups by closed envelope method. In both groups, vascular access was opened and 6 ml of blood was taken into a tube with EDTA for pre-procedural evaluation. For Group M (Major Autohemotherapy, n:10), 100 ml of blood was taken into a vacuum bottle with citrate and treated with 100 ml of ozone-oxygen (O₃-O₂) mixture at a dose of 14 µg/ml. For Group S (ozonated SF, n:10), 100 ml of 5mcg/kg dose of O₃-O₂ mixture was given into 100 ml of SF by bubble method. Ozonated blood and SF were retransfused in 15-20 minutes. 6 ml of blood was taken into an EDTA tube after procedure as sample from both groups. Erythrocyte Deformability (ED), Erythrocyte Aggregation (EA), Plasma Viscosity (PV) and Whole Blood Viscosity (WBV) values were measured from pre and post blood samples. Results were compared within and between groups.

Results: It was determined that the percentage of aggregation (AI%) variable in Group S was significantly lower after O₃ therapy than before the application. (Z=-2.090; p=0.037). Maximum Elongation index value (EI max) (P=0.049), and EI value at 1.69 Pa Shear Stress level were significantly higher after O₃ therapy in the group S compared to the group M (p=0.025). The shear stress value which half of EI max obtained (ss1/2) determined higher in group M than Group S.

Conclusion: It is known that there is a decrease in ED and an increase in EA in many pathologies such as infection, sepsis, hyperparaproteinemias, diabetes and stroke. We think that using ozonated SF will contribute to the treatment of these pathologies by increasing deformability and decreasing aggregation.

Keywords: Ozone, Major Autohemotherapy, Erythrocyte Aggregation, Erythrocyte Deformability, Plasma Viscosity, Whole Blood Viscosity

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Ozon (O_3), 3 oksijen (O) atomundan oluşan renksiz, kötü kokulu bir gazdır ve 19. yüzyılın ortalarında keşfedilmiştir [1]. Doğada stratosfer tabakasında bulunan O_3 medikal ozon jeneratörlerinin keşfi sonrası tedavide kendine yer bulmaya başlamıştır. Medikal ozon, oksijen kaynağından elde edilen oksijen (O_2) moleküllerinin ozon jeneratörünün içinde elektriksel bir manyetik alanından geçerken iki oksijen atomuna bölünerek geçici olarak üç oksijen atomlu O_3 olarak yeniden birleşmesiyle oluşur [2]. Bu şekilde ozon jeneratörü ile, istediğimiz konsantrasyonda O_3 - O_2 karışımı elde edilir [3]. Uzun süredir tedavi edici bir ajan olarak kullanılan O_3 ' ün ; oksidan-antioksidan sistemini dengeleme, optimize O_2 ' nin hücresel düzeyde dağıtılması ve hücre fonksiyonu optimize etmesi gibi literatürde birçok yararlı etkisi yer alır [2]. Literatürde O_3 terapisinin tedavide yer aldığı birçok hastalık tanımlanmıştır ve O_3 terapisi sonrası glikolizde artış, kırmızı kan hücrelerine ve hemoreolojik parametrelerde değişiklikler, bakterisidal etkiler, fungisidal etkiler virüsidal etkiler, immünomodülasyon ve analjezik ve antiinflamatuvar etkiler görülmüştür [1, 2, 4, 5]. Tüm bu etkiler nedeniyle O_3 terapisi ABD' de National Health Institute tarafından alternatif ve tamamlayıcı tedaviler arasında kabul edilmiştir.

Hemoreoloji, kanın ve kanı oluşturan yapıların akışını ve birbirlerine etkisini inceleyen bilim dalıdır. Hemoreolojide incelenen temel parametreler, hematokrit (HCT), tam kan viskozitesi (TKV), plazma viskozitesi (PV), eritrosit deformabilitesi (ED) ve eritrosit agregasyonu (EA)' dur. Çeşitli iskemik patofizyolojiler, inflamatuvar hastalıklar, metabolik hastalıklar, hiperviskozite sendromları, paraproteinemiler gibi klinik durumlarda bu parametrelerde bozukluklar görülebilir. Artan kan viskozitesi, tüm önemli kardiyovasküler risklerle nedensel olarak ilişkili olabilecek biyolojik bir parametredir [6].

Günümüzde O_3 uygulamasının hemoreolojik parametrelere etkisinin değerlendirildiği çalışmalar çok azdır [7, 8]. Bu çalışmalar in vitro yapılmış olup in vivo uygulamanın araştırıldığı çalışmaya literatürde rastlamadık. Biz bu çalışmada in

vivo uygulanan MOHT ve ozonlanmış SF uygulamasının sağlıklı gönüllülerde hemoreolojik parametrelere ve kırmızı kan hücrelere etkisini araştırmayı hedeflemekteyiz.



2. GENEL BİLGİLER

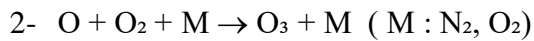
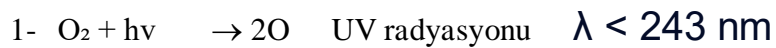
2.1 Ozon

2.1.1 Ozon Nedir?

O₃, üç tane oksijen (O) atomunun birleşmesi ile oluşan bir gazdır [3]. Keskin kokulu olmasından dolayı Yunanca ‘da “koku-koklamak” anlamına gelen “ozein (kokulu madde)” kelimesinden ismini almıştır. Ozon gazının yarı ömrü 20°C'de 40 dakika ve 0°C'de yaklaşık 140 dakikadır [5]. Bu nedenle Ozon, depolanamayan ve hemen kullanılması gereken kararsız bir gazdır.

Ozon doğada kendiliğinden oluşan en güçlü antioksidandır [9]. Yer yüzeyine yakın olması halinde canlıların solunum yolları için irrite edici ve zehirli olabilecek O₃ gazı stratosfer tabakasında yer alır.

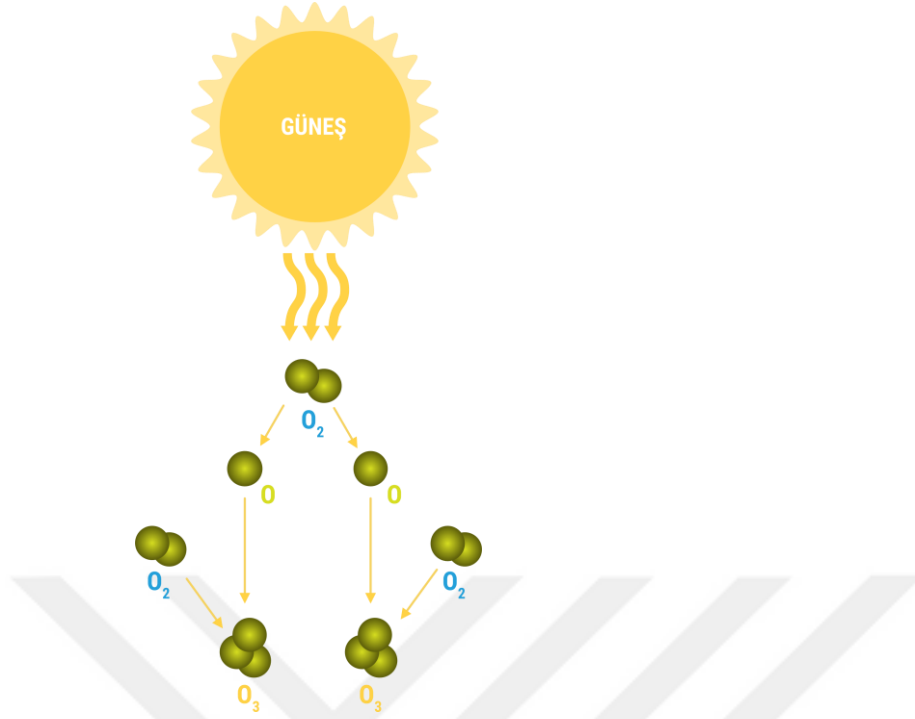
Ozon, atmosferik O₂ ile reaksiyona giren ışınların elektriksel deşarjları nedeniyle yüksek enerjili doğa olayları esnasında oluşur [10]. Güneşten yayılan yüksek enerjili ultraviole ışınları (görünür ve uzun dalga boylu) etkisiyle atmosferde O₂ parçalanır ve serbest Oksijen atomu haline dönüşür ve yine aynı ultraviole ışınların etkisiyle O₂ molekülüyle birleşerek O₃ molekülünü oluşturur. Ayrıca bağışıklık sistemi de antimikrobiyal ajan olarak ozon üretir [11].



Enerji Enerji



hv: 1300 ila 2025 °A arasındaki dalga boylarındaki bir foton



Şekil 1. Ozonun atmosferde oluşumu

2.1.2 Ozonun Tarihçesi

Ozon, insanlık tarihi boyunca elektrik fırtınalarına eşlik eden bir madde olarak bilinmekteydi [12]. Ayrı bir kimyasal bileşik olarak ilk defa , Basel Üniversitesi'nde Kimya Profesörü olan Christian Friedrich Schonbein tarafından tanımlanmıştır [12]. Christian Friedrich Schonbein, 1839 yılında yaptığı çalışmalar esnasında "elektrik kokusu" olan keskin bir gazın ortaya çıktığını fark etti [13]. Ve buna Yunanca da keskin koku anlamına gelen “ozone” adını verdikten sonra, Basel Doğa Bilimleri Derneği'nde "suyun elektrolizi sırasında pozitif elektrottaki koku üzerine" başlıklı bir ders sunmuştur [13]. 1857’ de günümüzde “Siemens tip” ozon jeneratörü olarak bilinen ilk ozon jeneratörü Werner Von Siemens tarafından tasarlanmış ve daha sonra 1897 de ilk ozon jeneratörü patenti Nicola Tesla tarafından Amerika’da alınmış ve ozonun medikal kullanımı böylece hız kazanmıştır [1].

Medikal O₃’ ün tıpta ilk kullanımı, Birinci Dünya Savaşı sırasında Alman askerlerinin gazlı gangrenli Clostridial enfeksiyonlarını tedavi etmek için başlamıştır [14]. Savaş sırasında bulunan diğer birkaç medikal malzeme ile O₃’ ün enfekte yaralara topikal olarak uygulanması sırasında yalnızca enfeksiyonu iyileştirmekle kalmayıp

aynı zamanda hemodinamik ve antiinflamatuvar özelliklere de sahip olduğunu keşfettiler [1]. Yapılan çeşitli çalışmalar ve deneyler sonucunda, güçlü bir oksidan olduğu görülen O₃' ün günümüzde kronik hastalıklar dışında, dezenfeksiyon, gıdaların saklanması, kötü kokuların giderilmesi, havuz ve içme sularında dezenfektan v.s gibi birçok kullanım alanı bulunmaktadır.

Türkiye de geleneksel ve tamamlayıcı tıp uygulamalarını destekleyici ülkeler arasında olup 2014 yılında yayınlanmış olan 29158 sayılı Geleneksel ve Tamamlayıcı Tıp (GETAT) Uygulamaları Yönetmeliği ile O₃' un dahil olduğu bazı uygulamalara izin verilmiştir [15]. Uygulamaların sadece tıp doktorları tarafından yapılması uygun görülmüştür.

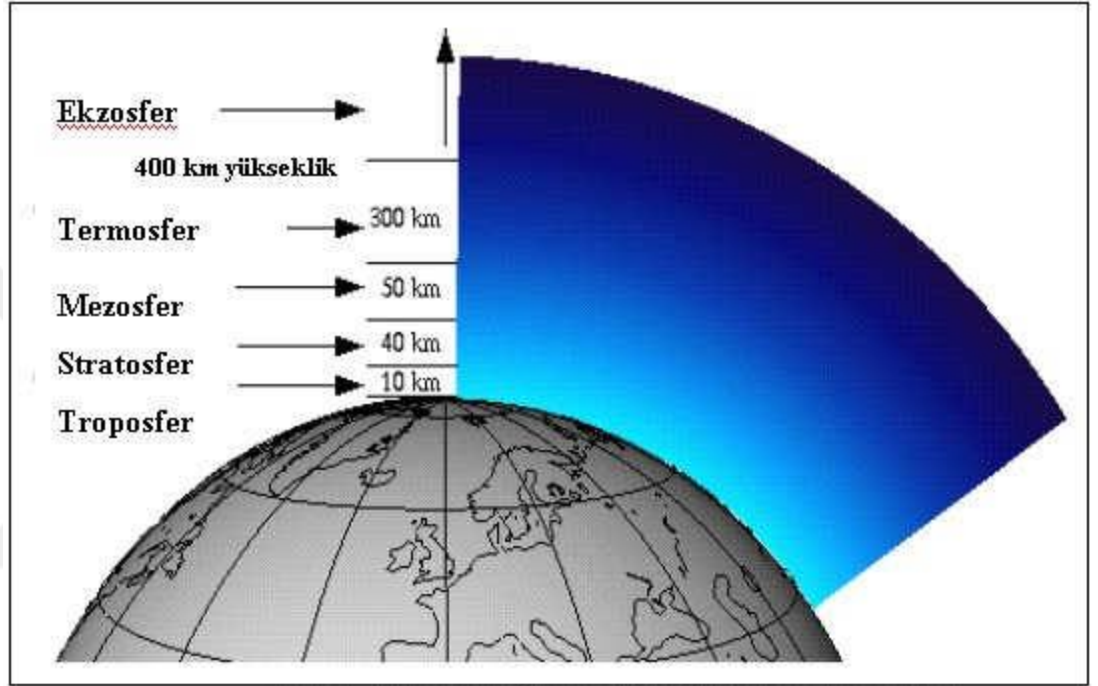
Medikal ozonun tarihteki kronolojik olarak kullanımı ile ilgili bazı başlıklar aşağıda gösterilmiştir.

1839	Medikal ozon Christian Fredrick Schonbein tarafından bulundu.
1856	Ameliyathane odalarında dezenfeksiyon amacıyla kullanıldı.
1860	Fransa'da kirli sulardaki bakteri ve virüsleri öldürmek, koku ve tadı düzeltmek için kullanıldı.
1902	H.J. Clarke O ₃ tedavisini kanser, diyabet, influenza tedavisinde kullandı.
1915	Dr. Albert Wolf 1. Dünya Savaşında Alman askerlerin gazlı gangren (clostridium) tedavisinde kullandı.
1961	Hans Wolf majör ve minör otohemoterapi uygulamalarını kullanmaya başladı.
1979	Dr. George Freibott AIDS hastalarında ozon tedavisini denedi.
1982	Rusya'da yanıkların tedavisinde kullanımı başladı.

Tablo 1. Medikal Ozon Kullanımının Tarihiçesi

2.1.3. Ozonun Atmosferdeki Yeri ve UV Işınlardan Koruma Mekanizması

Doğada O_3 , stratosferde (Dünya yüzeyinden 25–30 km uzaklıkta) UV radyasyonu ($< 183\text{nm}$) tarafından sürekli olarak üretilir [13]. Atmosferdeki ozonun %90' ına yakını, yerden bu Stratosfer tabakası içinde, geri kalan %10'luk kısım ise yerden 10-15 km yukarı uzanan Troposfer tabakasında yer alır. En yoğun O_3 yoğunluğu ise yerden 19-23 km yükseklik civarındadır.



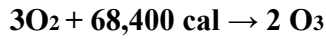
Şekil 2. Atmosferi oluşturan katmanlar

Güneşten yayılan ultraviyole ışınlarına direk maruziyetin cilt kanseri ve katarakt, pterjium gibi bir çok oküler rahatsızlığa yol açtığı bilinmektedir [16]. Atmosferde stratosfer tabakasında bulunan O_3 ve O_2 , güneşten yayılan UV-B'nin büyük miktarını ve UV-C'nin tamamını absorbe ederek dünya yüzeyindeki yaşamı korur. Stratosferde olası bir yapı bozukluğu olması halinde bu zararlı ışınlar dünya yüzeyine erişerek radyoaktif etkilerini gösterecekti. Güneşin UV-B ve UV-C ışınları stratosfere girdiklerinde, O_3 ve O_2 molekülleriyle çarpışırlar. UV-B ışını sadece O_3 'ü parçalamaya yetecek enerjiye sahiptir. UV-C ışını O_3 ve O_2 moleküllerinin ikisini etkileyecek enerji yoğunluğuna sahiptir. Bu süreçler sonunda O_3 stratosferde hem üretilip hem parçalandığı doğal bir denge halindedir.

2.1.4. Medikal Kullanım Amacıyla Ozon Elde Etme

Ozon üretme yöntemleri UV radyasyonu, elektrik deşarjı ve elektrokimyasal işlemlere dayanır [13]. Endüstriyel kullanım için ozon havadan üretilir, ancak medikal amaçlı kullanılacak ozon için saf oksijen kullanılarak üretilmelidir, aksi takdirde eşzamanlı oluşan nitrik dioksit (NO₂) çok toksik olacaktır [17] .

Ozon döngüsel bir yapıya sahip üç oksijen atomunundan meydana gelir. Medikal ozon jeneratörü, aşağıda belirtilen reaksiyon sonucunda, saf oksijenin yüksek voltaj gradiyentinden geçmesi ile ozonun elde edilmesini sağlar [3].



En son teknoloji medikal ozon jeneratörleri, elektrik voltajını 5 kV'tan yaklaşık 14 kV'a kadar kontrol edebilir, elektrotlar arasındaki mesafe, ozon konsantrasyonunda kademeli bir artışı modüle edebilir ve saf oksijen akışı genellikle 1 ile 10 L/dk arasında düzenlenir [13].

2.1.5. Ozon Tedavisi Uygulama Metotları

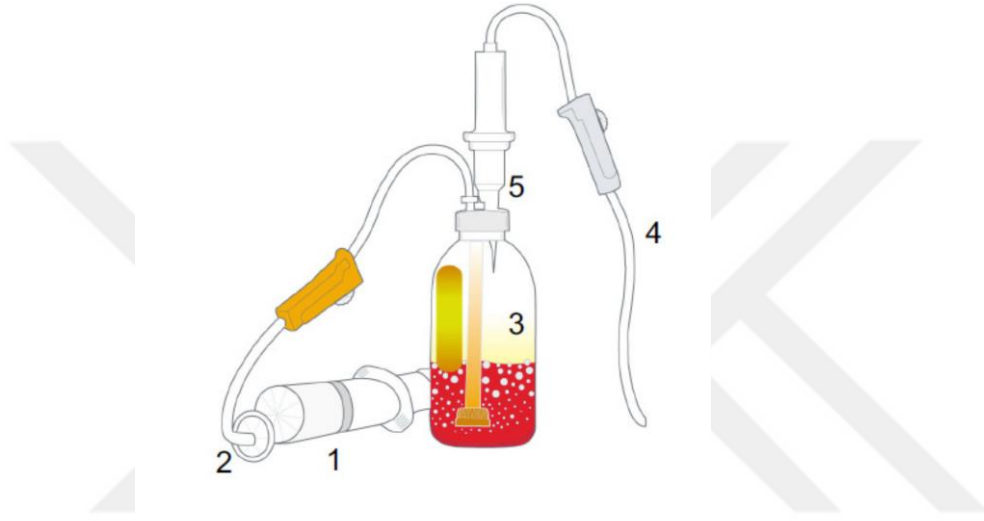
O₃ tedavisinin uygulanma yöntemleri, patolojinin lokalizasyonu ve amaçlarına göre çeşitlilik gösterir [18].

Parenteral	İntravenöz, intramusküler, intraperitoneal, intraplevreal, intra-artiküler, intradiskal, intraforaminal, intralezyonal
Topikal	Lokal
Diğer	Tübal, auriküler, oral, vajinal, rektal, mesane içi, dental

Tablo 2. Ozon Tedavisinin Uygulanma Yöntemleri

2.1.5.1 Major Ozon Hemoterapi (MOHT)

Medikal ozon uygulama yöntemlerinin en popüler olan şekli MOHT'dir [18]. Hans Wolff tarafından O_3-O_2 gaz karışımının direk kana uygulanmasının bulunması, ozonlanmış otohemoterapinin başlangıcı olarak kabul edilir [19]. MOHT'nin arteriyel dolaşım bozuklukları, kronik inflamatuvar hastalıklar, romatolojik hastalıklar, anjiyopatiler, diyabet, kronik bağırsak hastalıkları, romatoid artrit, kronik hepatitler, yaşa bağlı hastalıklar gibi çok çeşitli hastalıkların tedavisinde yeri vardır [20].



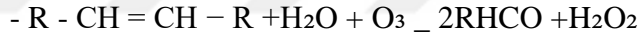
Şekil 3. MOHT Seti[20] 1. Ozon şırıngası 2. Bakteri filtresi 3. Mikro kabarcıklı vakumlu cam şişe 4. Transfüzyon Seti 5. Lateks içermeyen kapak

MOHT uygulamasında, uygulama yapılacak kişiden 50-100 ml kan steril koşullarda vakumlu cam şişeye alınır. Antikoagülan olarak sodyum sitrat kullanılarak 50-100 ml ozon/oksijen karışımı kabarcık yöntemi ile steriliteyi bozmadan cam şişe içinde kan ile karıştırılarak hastaya yeniden transfüze edilir [20]. Sistemik uygulamanın ikinci bir yöntemi ise, serum fizyolojik ozonlama ismi ile bilinen, 100 ml serum fizyolojik içine kabarcık yöntemi ile O_3-O_2 karışımının uygulanıp kişiye yeniden infüze edilmesidir [21].

Medikal ozon "hormesis ilkesi"ni takip eder; yani düşük konsantrasyonlarda veya dozlarda yüksek etkinlik gösterir, konsantrasyon veya doz arttıkça etkinlik azalır, sonunda toksik etkiye dönüşebilir [22]. MOHT sistemik uygulamasında O_3 için konsantrasyon aralığı 10-35 $\mu\text{g/ml}$ 'yi geçmemelidir. 35 $\mu\text{g/ml}$ üstündeki dozlar kırmızı

kan hücrelerinde lizise sebep olabilir. 50 µg/ml'nin üzerinde O₃' ün toksik etkisi açısından dikkatli olunmalıdır [20].

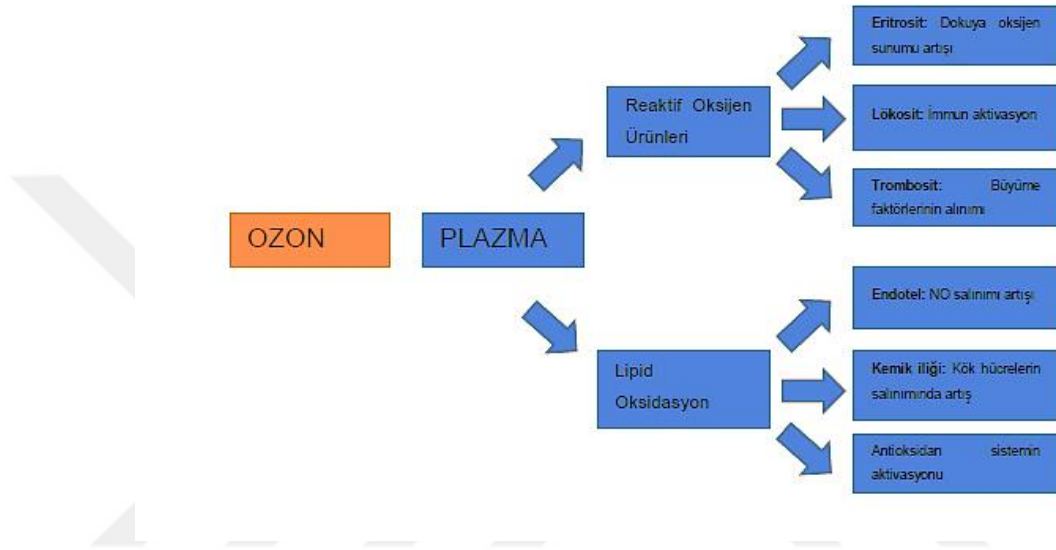
MOHT, inflamatuvar süreçler ve immun sistem kökenli hastalıklarda O₃' ün yüksek oksidan etkilerinden dolayı oldukça etkilidir [19]. Ozon, flor ve persülfattan sonra üçüncü en güçlü oksidan ajandır [13]. Oksidan bir maddenin kan ile karıştırılması, her şeyden önce yüksek seviyede reaktif habercilerin üretimi ile oluşan homeostatik değişikliklerle karakterize bir oksidatif stres yaratır [23]. O₃ kan plazmasında çözüldükten sonra hidrofilik antioksidanlarla reaksiyona girer ve 40 µg/ml lik bir O₃ konsantrasyonu çözüldüğünde kanda ml başına 0,84µmol/ml ye karşı gelecek şekilde, beş dakika içinde, askorbik asitin ortalama %78'i dehidroaskorbata ve ürik asidin yaklaşık %20 si allantoine oksitlenir [23, 24]. Aynı zamanda kan plazmasında çözünen O₃, çoğunlukla albümine bağlı olan doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonunu gerçekleştirir. N-6 Poliansatüre Yağ Asidi (PUFA) 'nın peroksidasyonu Hidrojen Peroksit (H₂O₂) ve 4-hidroksi-nonenal (4-HNE) oluşumuna yol açarken, n-3 PUFA, 4-hidroksi-heksenal (4-HHE) oluşumuna yol açar [23]. Bu peroksidasyon ürünleri oldukça önemli iki haberci olarak görevlidir.



Biyolojik konsantrasyonlarda H₂O₂ en önemli oksidatif biyoregülatörlerden biri olarak kabul edilir [20]. Aynı zamanda H₂O₂, O₃' ün biyolojik ve terapötik etkilerine aracılık eden reaktif oksijen ürünü (ROS) dür, bir O₃ habercisi olarak kabul edilir [3, 25]. ROS lar veya lipid ozonlama ürünleri (LOP) , geniş bir gen yelpazesini aktive eder ve bu sayede immünomodülatör etkili akut faz proteinlerinin ve sitokinlerin sentezini arttırır [9].

Ozonla karşılaşıldığında kan hücrelerinin fonksiyonlarının etkilendiği iyi bilinmektedir. Ozon terapinin eritrositlerde, ATP (adenozin trifosfat) ve 2,3 difosfogliserat (2,3-DPG) konsantrasyonlarını arttırdığı görülmüştür [9]. LOP'ların kemik iliğini uyardığı ve artmış glukoz-6-dehidrojenaz konsantrasyonlarına neden olarak eritrositlerin salınımını arttırdığı varsayılmıştır [26]. Bu etkilerle iskemik dokuda rejenerasyona aracılık ettiği düşünülmektedir.

O₃' ün neden olduğu oksidatif stres, nükleer faktör-eritroid 2 ile ilişkili faktör 2'ye (Nrf2) aracılık eden transkripsiyonel faktörün aktivasyonunu artırır. Nrf2, antioksidan yanıt elemanlarının (ARE) transkripsiyonunu aktif etmekten sorumludur [18]. ARE transkripsiyonu ile çeşitli antioksidan enzimlerin konsantrasyonunda artış olur. Bu antioksidan enzimlerden en çok bilinenleri katalaz ve superoksit dismutaz (SOD) dır ve vücudun kanser dahil bir çok hastalığına sebep olabilen serbest radikalleri yok etme görevini üstlenmişlerdir [27].



Şekil 4. MOHT' nin Etkileri

Son yıllarda dünyada oldukça yankı uyandıran Covid-19 pandemisinde virüsün neden olduğu klinik tablonun tedavisinde O₃ terapisinin etkili olduğunu gösteren çalışmalar yapılmıştır [28-30]. Covid-19 tanısı ile yoğun bakıma yatırılan 3 olguda yapılan incelemede O₃ un tedaviye eklenmesinin hipoksiyi geriletmediği, ferritin, D-dimer, CRP, LDH değerlerinde düşüşü hızlandırdığı, O₂ ihtiyacını azalttığı ve yoğun bakımdan taburculuğu hızlandırdığı görülmüş [31].

Sepsis ve septik şok durumlarında antibiyotik tedavisine eklenen O₃' ün inflamatuvar yanıtı, akut akciğer hasarı görülme oranını ve bakteri yükünü azalttığı gösterilmiştir [32, 33]. O₃ ile temas eden bakteri ve mantar duvarında fosfolipitler ve lipoproteinler oksitlenir böylece bakteriyel ve fungal patojenlerin etkisi inhibe olur [18]. O₃, immün sistemi iyileştirmesi ve sitokin indükleyici özellikleri ile de kronik viral enfeksiyonlarda antiviral tedaviye kombine olarak uygulanabilmektedir [13].

Amfizem ve kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH) gibi kronik akciğer hastalıklarında, O₃ tedavisinin geleneksel tedavilerle birleştirilmesiyle dikkate değer bir iyileşme gözlemlenmiştir [13]. Oksidatif stresi azaltması, antioksidan mekanizmaları tetikleme, immünmodülatör aracılı mekanizmalar, dokuya O₂ sunumunu arttırması bu iyileşmeye katkı sağlamaktadır.

2.1.5.2. Minör Ozon Terapi

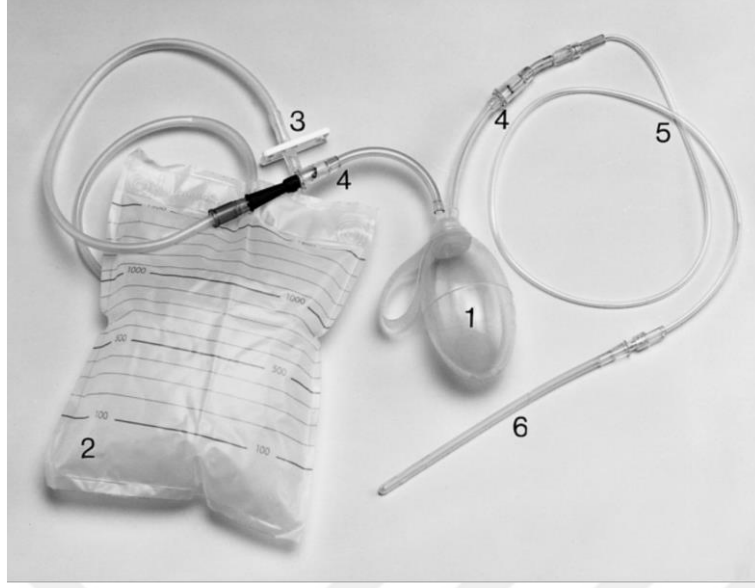
Uygulama yapılacak kişiden alınan 2-5 cc kan, yaklaşık 10-20µg/ml dozda O₃ içeren O₃-O₂ karışımı ile steril bir şırıngada karıştırılarak kas içine enjekte edilir. Minör ozon terapisi bir otoaşılama yöntemidir [22]. T hücrelerini uyararak hücrel bağışıklık sistemini uyarır. Intramusküler olarak uygulanan ozonun, MOHT de olduğu gibi immün sistemi ve iyileşmeyi hızlandıran mekanizmaları stimüle ederek etki gösterdiği düşünülmektedir [34]. Özellikle “proliferatif terapi” de denilen rejeneratif enjeksiyon tedavisi ile kombine edilen minör ozon terapinin; sırt ağrısı, eklem ağrısı, tendon ağrısı benzeri kas-iskelet sistemi hastalıklarının semptomlarının azalmasında, proliferasyonu hızlandırmada ve iyileşmede oldukça efektif olabileceği düşünülmektedir [34].

Otoimmün hastalıklarda, akne vulgaris tedavisinde, alerjik rahatsızlıklarda, adjuvan kanser terapilerinde ve immünoaktivasyon amacıyla kullanılmaktadır [22].

2.1.5.3. Rektal İnsüflasyon

Rektal insüflasyon yöntemi, O₃ tedavisi uygulama yöntemlerinden en eskilerden kabul edilir [22]. Rektal uygulamayı takiben kanın O₂ içeriğinin arttığı tespit edilmiştir [35]. O₃-O₂ gaz karışımı ile rektal insüflasyon, sistemik bir terapötik form olarak giderek daha fazla kullanılmaktadır ve en popüler yöntem olan MOHT'ye bir alternatif olarak görülmektedir [22]. Ayrıca pediatriye uygulama yöntemidir.

Ülseratif kolit, chrone hastalığı, anal fistül ve fissür, hemoroid için kullanıldığında lokal; hepatit B, hepatit C ve onkoloji tedavilerinde immünmodülasyon için kullanıldığında sistemik etkilerinden faydalanılmaktadır.



Şekil 5. Rektal İnsüflasyon Seti 1. Doz ayarlama pompası (slikon) 2. Depolama Torbası 3. Klemp 4. Tek Taraflı Valv 5. Ara Bağlantı Hattı 6. Katater

Sistemik etkileri için 300-900 ml O_3-O_2 gaz karışımı, O_3 oranı 10–25 $\mu g/ml$ olacak şekilde rektal olarak uygulanır. Çocuklarda 10-30 ml gaz karışımı, 10–20 $\mu g/ml$ olacak şekilde uygulanır. Lokal etkiler için 50-300 ml gibi daha küçük volümler yeterli olacaktır.

2.1.5.4. İntraartiküler Ozon Uygulamaları

En sık diz eklemi olmak üzere, omuz, kalça ayak bileği eklemlerinde özellikle spor yaralanmaları, inflamatuvar hastalıklar veya yaşa bağlı dejeneratif hastalıklarda kullanımı yaygındır [36]. Ozon; eklem içi enjeksiyonu sonrası bazı histolojik değişiklikler ile ağrı kesici etki yaratabilmektedir [37].

Eklem içi O_3 enjeksiyonları için, omuz ve diz için yaklaşık 20 ml, 10-20 $\mu g/ml$ O_3 içerecek şekilde gaz karışımı eklem içi için, 2-10 $\mu g/ml$ ozon dozu ise periartiküler ve subkutanöz infiltrasyon için hazırlanır ve uygulanır [22].

2.1.5.5. İntradiskal Ozon Uygulaması

İntradiskal O_3 uygulaması ilk olarak 1980'lerde disk herniasyonu tedavisi için önerildi ve epidural steroidlere ve cerrahi diskektomiye alternatif olarak kullanılmaya başlandı [38]. Endikasyonları, cerrahi gerektiren endikasyonlar ile aynı sayılabilir.

Uygulama esnasında sedasyon uygulanan hastaya işlem radyolojik görüntüleme yöntemleri yardımı ile uygulanır.

Ozon güçlü bir oksitleyicidir ve disk içine uygulanması, proteoglikan moleküllerinin bölünmesine ve negatif yüklü sülfat yan zincirlerinin nötralizasyonuna neden olur [39]. Proteoglikanların oksitlenmesi nükleus pulposus hacminde azalmaya yol açar. Azalan hacim, basıncı azaltır ve ağrıyı azaltır. Diskin su tutma yeteneği azalır ve herniasyon hacminin azalmasına neden olur [40]. Aynı zamanda O₃' ün antioksidan ve antiinflamatuvar etkilerinin de semptomların gerilemesinde etkili olacağı düşünülmektedir O₃ 'ün redoks özelliklerinden dolayı antiinflamatuvar etkilerinin de analjezik etkilere sahip olduğu tahmin edilmektedir.

İntradiskal enjeksiyon için, O₃ konsantrasyonu 20-30 µg/ml olacak şekilde 3-10 ml arasında lokalizasyona göre değişken hacimlerde önerilmektedir [41]. Bu işlem algologlar ve beyin cerrahları tarafından yapılabilir.

2.1.5.6 Paravertebral – İntramüsküler Ozon Uygulaması

Temel endikasyonlarından biri sırt ağrısı olan paravertebral intramüsküler ozon uygulaması intradiskal yöntemle göre daha kolay ve sık kullanılan bir yöntemdir. “kimyasal akapunktur” ismi ile de anılır [42].

Uygulamada hedef alınan diskin bir üst seviyesinde, spinöz proçesin 2-2,5 cm sağ ve sol lateraline ozon konsantrasyonu 10-25 µg/ml olacak şekilde 5-10 ml gaz karışımı düşük hızda enjeksiyon olacak şekilde uygulanır.

2.1.5.7 Topikal Ozon Uygulamaları

Transkütanoz veya banyolama (torbalama) olarak bilinen topikal yöntem, özellikle ekstremitelerdeki infeksiyon, ülser ve lokal deri lezyonlarında uygulanan etkin bir yöntemdir [43]. Deri ıslatıldıktan sonra özel dizayn edilmiş bir torba ile lezyonun olduğu bölge çevrelenir [43]. Torbada, gaz karışımını torba içine veren ve gazı emen giriş ve çıkışlar bulunur ve tedavi boyunca gaz giriş ve çıkışı aynı hızda devam eder. Torbalama yönteminde özellikle enfeksiyon var ise başlangıçta daha yüksek konsantrasyonlarda (70–100 µg/ml) uygulama önerilir [22]. Mikrobisidal ve virostatik etkisi zaten daha düşük konsantrasyonlarda (<40 µg/ml) gerçekleştiğinden,

yara iyileşmesi gerçekten başladığında, konsantrasyon tekrar azaltılabilir ($< 20 \mu\text{g/ml}$), böylece iyileşme süreci devam ederken O_3 'ün metabolik olarak uyarıcı ve immünomodülatör etkisinden tam olarak yararlanılabilir [22].

Topikal uygulamalarda, ozonlu su ve ozonlanmış zeytinyağı kullanımı son zamanlarda popüler olan yöntemlerden biri haline gelmiştir. Oda sıcaklığında, yüksek kaliteli bir O_3 jeneratörü ve bidistile su kullanımında, her ml su için maksimum yaklaşık $20 \mu\text{g}$ O_3 doyunluğu elde edilebilir [44].

Lokal cilt enfeksiyonları, dekübit ülsterler, mikotik enfeksiyonlar, herpes zoster, yanıklar, cerrahi yara izleri gibi endikasyonlarda kullanımı önerilmektedir. Ozonlanmış su ve yağların, mükemmel dezenfektanlar ve iyileştirici uyarıcılar olduğu, topikal antibiyotiklerden, büyüme faktörlerinden, sadece oksijenlenmiş sudan ve negatif basınçlı yara terapilerinden daha etkili olduğu gösterilmiştir [45].

Uygun dozda uygulanan O_3 nükleer faktör kappa B gibi transkripsiyon faktörlerini ve büyüme faktörlerini uyararak proinflamatuvar genleri uyararak yara iyileşmesinde etkisini gösterir ve kronik yara bakımında etkili bir tedavi olarak kullanılabilceği düşünülmektedir [46].

2.1.6 Ozonun Kontraendikasyonları ve Yan Etkileri

O_3 tedavisinin kontraendikasyonlarının temeli, O_3/O_2 karışımının antioksidan özellikleri ile ilgilidir [47]. Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PD) eksikliği, gebelik (rölatif kontraendikasyon), kontrolsüz hipertiroidizm, şiddetli kardiyovasküler hastalık öyküsü ve kalp yetmezliği kontraendikasyonlar olarak sayılabilir [47].

Uygun dozlarda ve uygun metodla uygulandığında O_3 terapisinin ne akut ne de kronik toksik etkilere yol açtığına dair net kanıtlar bulunmamaktadır [19]. Bununla birlikte uygulama veya dozlamda yapılacak bir yanlışlıkta ciddi yan etkilere yol açabileceği bilinmektedir. Genel olarak O_3 toksisitesini açıklayan mekanizmalar şöyle sayılabilir [48] ;

- Serbest radikallerin ve reaktif ara ürünlerin oluşumu.
- Lipid peroksidasyon zincir reaksiyonlarının başlatılması.

- Fonksiyonel grupların ve biyomoleküllerin aktivitelerinin oksidatif kaybı
- Membran geçirgenliği ve fonksiyonlarında değişiklik olması
- İnflamasyonun indüklenmesi.

O₃ maruziyeti iltihaba ve akciğer fonksiyonlarının bozulmasına neden olabilir [49]. Last ve ark. [50] yaptıkları çalışmada, üç gece arka arkaya 8 saat 1.00 ppm O₃ solutulan farelerde proinflamatuvar sitokinler dahil olmak üzere birkaç pulmoner proteinin sentezinin arttığını, Sitokrom P450 üst ailesinin baskılanması da dahil olmak üzere yağ asitleri ve karbohidrat metabolizması ile ilgili bir dizi hepatik enzimin etkinliğinin azaldığını göstermiştir [51]. Başka bir çalışmada da 10.0 ppm O₃ içeren havanın solunması farelerde 4 saat içinde ölüme neden olmuştur [51, 52]. Sonuç olarak O₃'ün güçlü bir oksidan olduğu ve asla direkt solunmaması gerektiği bilinmelidir.

Her ne kadar yavaş olarak O₃ gazının intravenöz olarak direk uygulanması ABD' de yapılan yaygın bir uygulama olmasına rağmen bu uygulama yöntemi Madrid Deklerasyonu'nda "kontraaplikasyon" olarak kabul edilmiştir [53]. Ozon uygulamalarında yanlılıkla yüksek volümde veya hızla damardan gaz olarak O₃ enjeksiyonu akciğer embolisine neden olabilmektedir [51].

Sonuç olarak O₃ tedavisinin başarısı, eşik seviyesinin hemen üzerinde, bir dizi biyokimyasal yolu uyarabilen ve son olarak doğal iyileşme kapasitesinin aktivasyonundan sorumlu olan küçük ve güvenli ve yeterli dozda O₃ kullanılmasına bağlıdır.

2.2 Reoloji ve Hemoreoloji

2.2.1 Reoloji Nedir?

Reoloji; katı, sıvı ve gaz halinde olan maddelerin, akış ve deformabilite özelliklerini inceleyen aynı zamanda akışkanlar mekaniğini de kapsayan bilim dalıdır [54, 55]. Deformasyonu, maddenin ana yapısının içindeki temel noktaların göreceli olarak yer değiştirmesi olarak tanımlayabiliriz [56] . Katı yapıdaki maddeler, bir kuvvetin uygulanmasına belirli bir deformasyonla tepki verir [56]. Bir katı elastik ise,

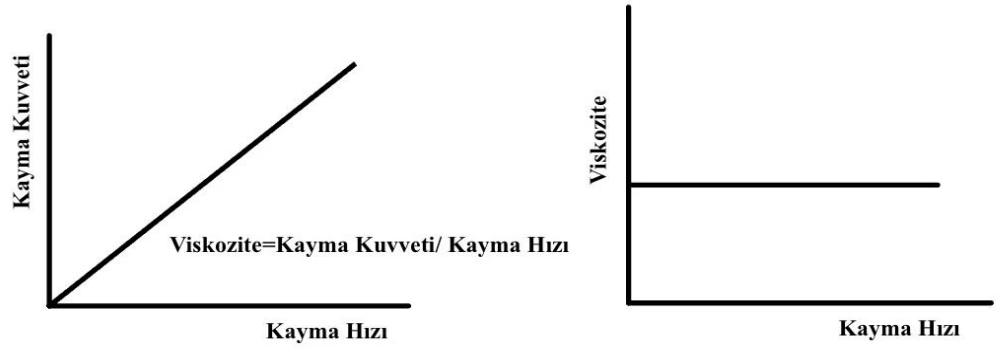
deformasyon uygulanan kuvvetle orantılıdır [57]. Oluşan deformasyon çok büyük değilse, kuvvet kaldırıldığında orijinal şekline geri döner [57].

Sıvı yapıdaki maddelere kuvvet uygulandığında madde yapısı deforme olur veya akmaya başlar [57]. Bazı yapılar, sıvı benzeri ve katı benzeri davranışın bir kombinasyonu olan viskoelastik davranış sergiler, buna örnek olarak kanı verebiliriz [57, 58]. Kanın salınımlı akışa maruz kaldığında viskoelastik bir malzeme olarak nitelendirilmesi, katı veya sıvı olarak sınıflandırılmasından bağımsız kabul edilir [58].

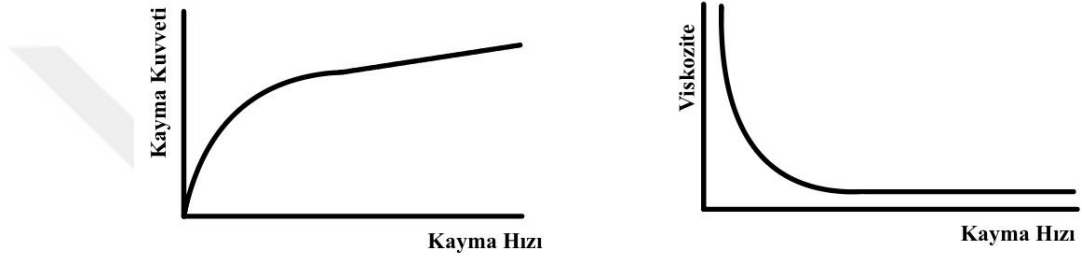
Bir maddenin deformasyon ve/veya akış derecesini incelerken, maddenin birim alanına uygulanan kuvvet göz önünde bulundurulmalıdır [57]. Gerilme olarak adlandırılan bu deforme edici kuvvet, maddenin yüzeyine paralel etki ettiğinde birim alan başına kuvvet kayma gerilimi (shear stress), maddenin yüzeyine dik olarak etki ettiğinde birim alan başına kuvvet normal gerilim (normal stress) dahil olmak üzere birkaç bileşene sahip olabilir [56].

Akışkanlar mekaniğindeki ilk çalışmalar, belirli bir akışkan için, sabit çap ve uzunluktaki bir borudaki akış direncinin boru içindeki akış koşullarına bağlı olduğunu göstermiştir [56, 59]. Akışın olduğu esnada akışa olan direnç azaldıkça akış hızı artar. İki akış çeşidi tanımlanmıştır. Laminar akım; sıvı parçacıklarının boru duvarına paralel bitişik düzlemlerde düzgün hareket ettiği akım çeşididir [56, 60]. Türbülân akım; artan akış hızıyla, sıvı maddenin girdaplar ve düzensiz desenler halinde hareket etmesi sonucu sıvı akışının düzensiz hale gelmesiyle oluşan akım çeşididir [56]. Türbülân akımda görülen direnç laminar akıma göre daha yüksektir. Kayma gerilimi – kayma hızı arasındaki oran sıvı katmanları arasındaki iç direnci yansıtır ve dolayısıyla sıvının viskozitesini yansıtır [56, 57, 59, 60]. Diğer bir deyişle, viskozite, akan bir sıvı ile sabit bir yüzey arasındaki sürtünme direncidir [55].

Reolojide sıvılar Newtonian ve Non-Newtonian olarak iki başlık altında incelenir. Kayma gerilimi – kayma hızı arasındaki oranın sabit olduğu, yani viskozitenin sabit olduğu sıvılar Newtonian sıvı olarak kabul edilir [56]. Viskozitenin sabit olmadığı ve kayma gerilimi-kayma hızı arasındaki orana göre değiştiği sıvılar ise Non-Newtonian sıvı olarak kabul edilir [56].



Şekil 6. Newtonian Sıvılarda Viskozite



Şekil 7. Non-Newtonian Sıvılarda Viskozite

2.2.2 Hemoreoloji Tanımı ve Temel Kavramları

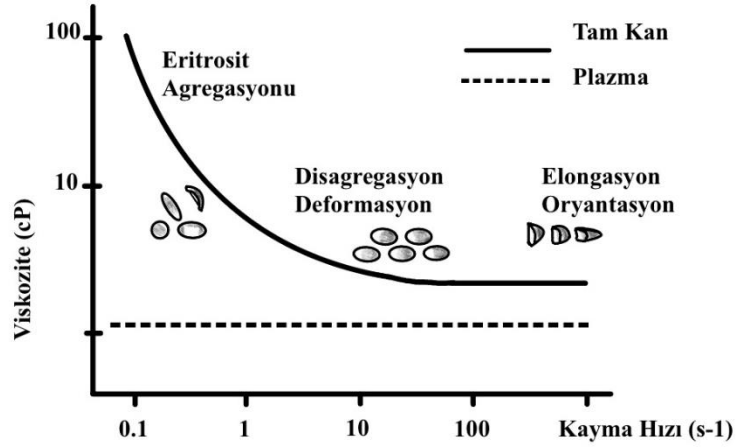
Hemoreoloji kan ve kanı oluşturan hücresel elemanların (eritrositler, lökositler ve trombositler) ve kan plazmasının damar içerisindeki akışını, davranışını ve kan akımına etkilerini inceler [55]. Hemoreoloji, kanın akışında, mikrosirkülasyonda ve organ-doku perfüzyonunda önemli etkileri olan hematokrit (Hct), tam kan viskozitesi, plazma viskozitesi, eritrosit deformabilitesi, eritrosit agregasyonu parametrelerini inceler [54, 55].

Kan reolojisi hala ayrıntıları incelenen ve araştırmaların olduğu bir alan olup, birçok hastalık durumunda kan reolojisinde değişiklikler olduğu bilinmektedir [56]. Özellikle dolaşım bozukluğu ile seyreden iskemik hastalıklar veya doku bütünlüğünü bozan enfektif hastalıklar, kandaki şekilli elemanların yapısını ve diğer parametreleri etkileyebilir. Vasküler kompanseasyon mekanizmalarının bu etkileri ortadan kaldırmada yetersiz kaldığı durumda fizyopatolojik sonuçlar ortaya çıkmaktadır [55, 56].

Normal fizyolojik koşullarda, kan akım laminar akımdır ve sıvı tabakalarının birbiri üzerinde kayması şeklinde karakterizedir [55]. Sıvı akışkanlarında viskozite formülü olan kayma gerilimi-kayma hızı oranı kanın damar içinde akışının özelliğinde göre kan viskozitesini de belirler.

2.2.2.1 Kan Viskozitesi

Kan Non-Newtonian özellik gösteren bir sıvıdır yani viskozitesi değişkendir ve tek bir değer ile tanımlanamaz [56]. Viskozimetreler, bir kan numunesi için bir akış veya viskozite eğrisi veren, bir dizi kayma gerilimi ve/veya kayma hızı üzerinden viskozitenin ölçülmesine izin verir [55, 59]. Düşük kayma hızlarında veya kayma gerilimlerinde viskozite yüksektir, artan kayma hızı ile azalır ve yüksek kayma gerilimi altında minimum bir değere yaklaşır [56, 61]. Kanın bu özelliğine “shear-thinning” adı verilir. Kan akışındaki bu değişikliğin temelini eritrositlerin agregasyon ve deformabilite özellikleri oluşturur. Kayma hızı düşükken eritrositler agregate olmaya meyillidir bu da viskoziteyi artırır, kayma hızının artması ile eritrositler disagege olmaya başlar ve deformasyona uğrayarak viskoziteyi azaltır [59].



Şekil 8. Kanda Kayma Hızı-Viskozite Eğrisi

Normal kanın viskozitesi için nominal değerler yaklaşık olarak 10 sec^{-1} 'de 10 cP, 1 sec^{-1} 'de 20 cP ve $0,1 \text{ sec}^{-1}$ 'de 100 cP'dir [56, 61]. Kan viskozitesi, 100 ila 200 sec^{-1} üzerindeki yüksek kayma hızlarında, 37°C 'de ölçülen normal kanın viskozitesi yaklaşık 4 ila 5 cP'dir ve daha fazla kayma artışına nispeten duyarsız olsa da viskozite,

100 sec⁻¹ 'in altındaki kayma hızlarına karşı giderek daha hassas hale gelir ve kayma hızı azaldıkça viskozite artar [56].

Kanın temel yapısını çeşitli şekilli elemanlar (eritrosit, lökosit ve trombosit) ve sıvı yapıda bir plazma oluşturur. Kanı oluşturan şekilli elemanlar, sıvı içeriklerinden ve esnek zar yapılarından ötürü katı bir özellik göstermezler bu nedenle aslında kan iki fazlı sıvı-sıvı bir süspansiyon olarak düşünülebilir [55]. Bu nedenle belirli bir kayma hızında ve sıcaklığındaki akışkanlığı; plazma ve hücrel yapıların reolojik özellikleri yani eritrosit deformabilitesi ve agregasyonu ile hücrel yapıların hacim yoğunluğu (hematokrit-HCT) ye göre belirlenir [55, 56]. Görece daha düşük konsantrasyonları nedeni ile lökosit ve trombositler, büyük yapıda kan damarlarındaki tam kan viskozitesine kayda değer bir etkide bulunmazlar [61].

Eritrositler 8µm çapında ve 2µm kalınlığında bikonkav disk şeklindedir ve bu spesifik yapısı sayesinde kendilerine özgü mekanik özellikleri vardır [55].

Sonuç olarak kan viskozitesini belirleyen ana parametreleri 4 başlık altında toplayabiliriz;

1. Plazma Viskozitesi
2. Hematokrit
3. Eritrosit Deformabilitesi
4. Eritrosit Agregasyonu

2.2.2.2. Plazma Viskozitesi

Plazma kanın süspansiyon yapısının sıvı kısmının temelini oluşturan yapıdır, bu nedenle plazma viskozitesindeki bir değişiklik, hematokrit ve hücrel elementlerin mevcut durum ve yapısından bağımsız olarak kan viskozitesini doğrudan etkiler [56]. Plazma viskozitesinin 37°C'de fizyolojik değer aralığı 1,10 ve 1,35 cP arasındadır, ama paraproteinemi olarak adlandırılan klinik durumlarda görüldüğü gibi anormal protein seviyeleri olan hastalarda 5 ila 6 cP'ye kadar yükselebilir [56, 62] Plazma, kandan farklı olarak Newtonian özelliktedir, yani viskozitesi normal şartlarda kayma hızından bağımsızdır.

Plazma viskozitesi, hastalık süreçlerinde progresyon takibinde nonspesifik bir göstergedir ve akut faz reaksiyonlarıyla ilişkili patofizyolojik durumlarda yükselir [56, 63]. Fibrinojen gibi akut faz reaktanları, hastalık süreçlerinde plazma viskozitesinin spesifik olmayan artışına önemli ölçüde katkıda bulunur [56].

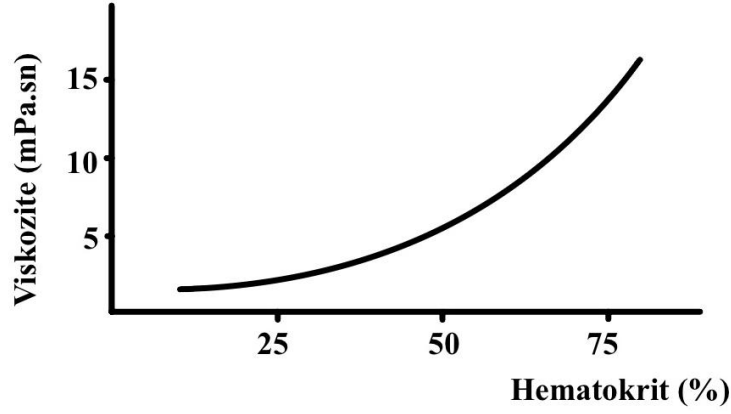
Genel olarak, kanın büyük damarlardaki viskozitesi makrosirkülasyonda akışı yöneten temel parametre iken, mikrosirkülasyonda hücrel yapıların ve plazmanın özellikleri daha baskın hale gelir. Kapiller damarlarda, kan viskozitesi plazma viskozitesine yaklaşır, bu nedenle mikrosirkülasyondaki kan akışının belirlenmesinde plazma viskozitesinin değeri büyük önem taşır [63-65].

2.2.2.3 Hematokrit

Hematokrit, toplam kan hacmine (kırmızı kan hücreleri ve plazma) kıyasla kırmızı kan hücrelerinin hacmini ölçer [66]. Diğer bir tanımla kandaki eritrositlerin hacim yüzdesidir [55]

Tam kan reolojisinin ana fizyolojik belirleyicileri, hematokrit ve fibrinojendir [67]. Laminer akış koşulları altında, akışın aerodinamiğini bozan hücrel elementlerin varlığı, kan viskozitesinin plazma viskozitesinden daha yüksek olmasının başlıca nedenidir [56, 61].

Hematokrit değerinin tam kan viskozitesinin belirleyicilerinden biri olduğundan daha önce bahsetmiştik. Kandaki hematokrit düzeyi ile kan viskozitesi arasındaki ilişki logaritmiktir ve bu nedenle artan hematokrit ile kanın viskozitesi belirgin şekilde artar [63]. Artan hematokrit oranı, tam kan viskozitesinin kayma hızına olan bağımlılığını güçlendirir [63]. Orta ve yüksek kayma hızlarında, hematokrit düzeyinin %1'lik artışı başına kan viskozitesinde yaklaşık %4'lük bir artış görülür[56, 68].



Şekil 9. Hematokrit ve tam kan viskozitesi arasındaki ilişki

Şekil 2.10’da görüldüğü gibi, tam kan viskozitesi ile hematokrit arasında, etkisi %20-60 arası hematokrit değerlerinde daha az, %60 üzeri değerlerde daha fazla görülen logaritmik bir ilişki vardır [55]. Hematokrite ek olarak, eritrositlerin boyut, şekil, hücre içi ve membran özellikleri ve yaş gibi diğer faktörlerinin de kan viskozitesi üzerinde etkileri vardır, ancak hematokrit en önemli belirleyici olmaya devam etmektedir [63].

2.2.2.4 Eritrosit Deformabilitesi

Eritrositler, kırmızı kan hücreleri olarak da bilinen ve kanda oksijenin dokulara taşıyıcısı olarak görev yapan özel hücrelerdir. Eritrositler, dolaşımında dışsal kayma gerilimine maruz kaldıklarında, düşük sitoplazmik viskoziteleri, yüksek yüzey alanı/hücre hacmi oranları ve viskoelastik membranları nedeniyle deforme olabilir [69]. Olgun eritrositler, 6-8µm çapında, yaklaşık 2 µm kalınlığında ve ortalama 90-95 µm³ hacminde, bikonkav disk şeklinde özel bir yapıya sahiptir. Bu özgün şekli eritrositlere bazı mekanik özellikler ve avantajlar sağlar [56].

Eritrosit deformabilitesi, kan akışı sırasında eritrosite uygulanan kuvvetlere yanıt olarak, eritrositin şekil değiştirebilme yeteneğidir [55]. Eritrositler elastik yapıda özellik gösterirler. Bikonkav disk şekilleri sayesinde, belirli bir kuvvet altında uygulanan güçlerle, 2-3 µm çapındaki kapillerlerden geçebilirler [55]. Deformasyona neden olan kuvvetler ortadan kalktığında eski şekillerine dönebilirler. Eritrositin hücre hacmi yaklaşık 90 µm³ hacminde olmasına rağmen ortalama yüzey alanı yaklaşık 140

μm^3 hacminde ölçülmüştür [70]. Bu geniş yüzey alanı sayesinde, kılcal damarlardan geçişi sırasındaki deformasyonu ve dalak sinüzoidlerinin ince yarıklarından geçişi dahil olmak üzere çeşitli fizyolojik deformasyonlara uğrayıp eski haline dönebilmektedir [70].

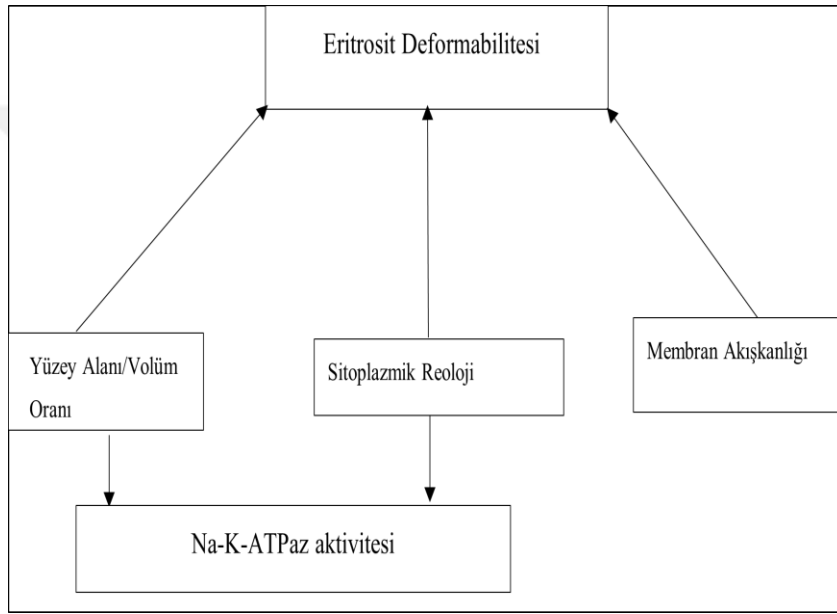
Yüksek kayma hızlarında kan viskozitesini etkileyen en önemli faktör eritrosit deformabilitesidir. Eritrositlerin fizyolojik deformabilitesi, bu yüksek kayma hızlarında eritrosit süspansiyonlarının nispeten düşük viskozite göstermesine bağlıdır [71]. Makrosirkülasyonda eritrositler akış doğrultusuna uyum sağlar ve kan viskozitesini azaltır. Mikrosirkülasyonda ise eritrositlerin dar kılcal damarlardan tekrar tekrar geçmesi gerektiği için, fizyolojik deformabilitesi oksijenin hedef dokulara etkili bir şekilde iletilmesi için çok önemlidir [72]. Eritrositlerin deformasyonu hücre eğriliğindeki bir değişikliği, tek eksenli bir deformasyonu veya alan genişlemesini içerebilir [70]. Bikonkav disk şeklinden uzaklaştıkça, eritrositlerin deforme olma kabiliyeti de azalmaktadır.

2.2.2.4.1 Eritrosit Deformabilitesini Etkileyen Faktörler ve Fizyopatolojik Durumlar

Eritrosit deformabilitesini düzenleyen sistemlerden biri membranlarında lokalize olan Na-K-ATPaz pompasıdır [72]. Na-K-ATPaz pompası, katyonların hücre içi konsantrasyonlarını optimum olacak şekilde korur, böylece hücrenin hacmini ve su homeostazını ve bu şekilde yüzey alanı-hacim oranını ve sitoplazmik reolojiyi düzenler (Şekil 2.11) [72, 73]. Her iki parametre de eritrosit deformabilitesinin belirleyicilerindedir. Na-K-ATPaz pompasının fonksiyonunda bozulma olması halinde Na^+ iyonları hücre içinde birikmeye başlar, bu normalden fazla su tutulmasına ve eritrositin şişmesine neden olur sonuç olarak bikonkav disk yapısı bozulur ve deformabilite azalır [74].

Eritrosit deformabilitesini düzenleyen diğer bir sistemde Ca^{+2} -ATPaz pompasıdır [56]. Hücre dışına Ca^{+2} iyonunu taşıyan bu pompanın işlevinde bir bozulma olması halinde Ca^{+2} hücre içinde birikecek ve hücre içindeki sıvı jel formunu alarak sitoplazmik viskoziteyi arttıracaktır. Bu da eritrositin deformabilite yeteneğinde bozulmaya yol açacaktır.

Bahsettiğimiz Na-K-ATPaz ve Ca^{+2} -ATPaz pompalarının fonksiyonlarını sürdürebilmesi için adenosin trifosfat (ATP) denilen enerji kaynağına ihtiyacı vardır. Bu ATP'nin kaynağı eritrositlerdeki glikolizdir ve bu glikolizin %90'ı anaerobik olarak gerçekleşmektedir [56]. Glikoliz için gereken glukoz depolanmaz ve dış çevreden sağlanır. Bu nedenle eritrosit metabolizması ve yapısı mikro ortamlarındaki glukoz durumuna bağlıdır. Aynı zamanda iskemik dokuda uzun süre tutulan eritrositlerde iskemiye bağlı olarak düşen pH eritrosit deformabilitesini etkileyebilir [56, 75].



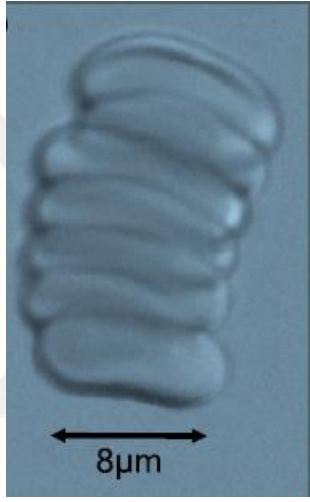
Şekil 10. Eritrosit Deformabilitesi Na-K-ATPaz Mekanizması

Eritrositlerin fizyolojik yaşlanması, deforme olabirliklerinde belirgin bir azalma ile ilişkilidir [76]. Ayrıca, enzim eksiklikleri, hemoglobinopatiler ve membran proteinlerindeki mutasyonlar gibi birçok eritrosit merkezli patoloji deformabilite özelliklerinde azalma ile ilişkilendirilmiştir [76-78]. Deformabilitedeki azalma, doku perfüzyonu ve oksijenlenmesinde azalmaya yol açarak patofizyolojiye katkı sağlayacaktır.

2.2.2.5 Eritrosit Agregasyonu

Düşük kayma geriliminde veya dış kuvvetlerin ortadan kalkması ile eritrositler rulo formasyonunda ve üç boyutlu agregatlar oluşturur [76]. Bu rulo formasyonunu

oluşumunun iki ana belirleyicisi, hematokrit ve fibrinojen konsantrasyonudur; her ikisinin de daha yüksek seviyeleri, daha belirgin bir rulo yapısı oluşumuna yol açar [67]. Eritrosit agregasyonunu etkileyen diğer bir önemli faktörde eritrositin yüzey yüküdür, normalde itici özellik gösteren eritrositlerin yüzey yükü arttıkça agregasyon oranı azalacaktır [67]. Ayrıca bikonkav yapıda bir bozukluk olması veya deformabilitede azalma da agregasyon yeteneğini azaltacaktır [79]. Agregat formasyonu doku perfüzyonuna etki eder ve trombositlerle lökositlerin akış şekillerini ve endotel ile interaksiyonlarını etkileyerek hemostaz üzerinde de etki gösterir [76, 80].



Şekil 11. Eritrosit Rulo Formasyonu

Eritrositlerin rulo oluşumunu yani agregasyonunu açıklamaya çalışan iki model vardır: köprüleme modeli ve deplesyon modeli [81]. Köprüleme modelinde, fibrinojen veya dekstran moleküllerinin spesifik olmayan bir şekilde hücre zarına adsorbe olduğu ve bitişik hücreye bir köprü oluşturduğu varsayılır [81, 82]. Buna karşılık olarak deplesyon modelinde karşıt bir görüş savunulur. Deplesyon modelinde, yakın çevredeki eritrosit yüzeylerinin yakınındaki makromoleküllerin konsantrasyonu, eritrosit yüzeyindeki yük fazının konsantrasyonuna kıyasla tükendiği ve net bir deplesyon kuvveti ile sonuçlandığı için agregasyon meydana geldiği düşünülür [81].

Agregasyonun tersinir ve fizyolojik bir süreç olduğuna inanılmaktadır [81]. Düşük kayma hızlarındaki viskozite, eritrosit agregasyon oranının dolaylı bir

göstergesidir [67]. Kayma hızı arttıkça agregasyon bozulur. Dolaşım sisteminde venöz yapılarda genel olarak düşük kayma hızları görüldüğünde venlerde agregasyon daha sık görülür.

2.2.2.5.1 Eritrosit Agregasyonunu Etkileyen Faktörler ve Fizyopatolojik Durumlar

Enfeksiyonlar, dolaşım ve metabolik bozukluklar, hematolojik patolojiler eritrosit agregasyonunda artış ile sonuçlanabilir [83]. Ortamdaki yüksek moleküler ağırlıklı, lifli biyomoleküllerin konsantrasyonu, agregasyonun önemli belirleyicileridir. Plazma fibrinojen düzeyi ile eritrosit agregasyonu arasında neredeyse lineer bir ilişki vardır bu nedenle fibrinojen düzeyinin agregasyonu etkileyen temel protein maddesi olduğu düşünülmektedir [83, 84]. Vücuttaki inflamasyon durumunda artış gösteren akut faz reaktanları protein yükünü arttırarak agregasyonun artışına neden olur [55].

2.2.2.6. Hemoreolojinin Klinikteki Yeri ve Önemi

Literatürde pek çok hastalık durumunda kanın akışında ve mikrosirkülasyonda değişiklik yaratan yani hemoreolojik parametrelerin etken olduğu noktalarda patolojiler olduğu bilinmektedir. Bu nedenle kanın akış özelliklerini, akışının kompozisyonuna ve eritrositlerin morfoloji ve özelliklerindeki varyasyonlara bağlayan, daha kantitatif bir anlayış, önemli teşhis potansiyeline sahiptir [67]. Hipertansiyon, hiperviskozite sendromları, orak hücreli anemi ve diyabetes mellitus gibi hastalıklarda eritrositlerin deformabilite yeteneklerinin azaldığı buna bağlı kan viskozitesinde değişiklikleri olduğu görülmüştür [67].

Enfeksiyon durumunda eritrositlerin agregasyonlarının artışı şeklinde etkilendiği bilinmektedir [83]. Ben Ami ve ark. [85]'nin yaptığı bir çalışmada eritrosit agregasyonundaki artışın yaklaşık %65'inin plazma faktörlerindeki değişikliklerle açıklanabileceği, kalan %35'in ise pnömoni, üriner enfeksiyonlar ve septisemi gibi ciddi bulaşıcı hastalıkları olan hastalardaki hücresel özelliklerdeki değişiklikleri yansıttığı tahmin edilmektedir [83, 85].

Miyokardiyal iskemi ve enfarktüs, serebral iskemi ve enfarktüs ve periferik vasküler hastalıklar gibi çeşitli organların akut dolaşım problemlerinin, artan eritrosit

agregasyonu ile karakterize olduğu bildirilmiştir [83]. Hipertansiyonda artan RBC agregasyonunu bildiren geniş bir klinik çalışma koleksiyonu vardır ve hipertansiyonun şiddeti ve tipi, değişen RBC agregasyonunun belirleyicileri olarak belirtilmektedir [83, 86-88].

Diyabette hemoreolojik değişiklikler çeşitli gruplar tarafından rapor edilmiştir ve kanın reolojik davranışındaki bu bozukluklar artmış eritrosit agregasyonunu içermektedir [83, 89, 90]. Glisemik kontrolün bir göstergesi olarak eritrosit agregasyon parametreleri ile HbA1C seviyeleri arasında anlamlı korelasyonlar bildirilmiştir [90]. Metabolik sendromlu hastalarda artmış eritrosit agregasyonu rapor edilmiştir ve agregasyonun kapsamı ile sendromun bileşenlerinin sayısı arasında korelasyonlar gösterilmiştir [83, 91-93].

Beta-Talasemi majör hastalarında artmış eritrosit agregasyonu bildirilmiştir [94]. Waltz ve ark. [95]'nin yaptığı çalışmada, orak hücreli anemisi olan hastalarda daha düşük bir eritrosit agregasyon indeksi olduğunu ve deagregasyon için de daha yüksek kayma hızı eşiği gerektiğini bildirdi .

Kronik inflamatuvar bozukluklar genellikle yüksek eritrosit agregasyonu ile ilişkilidir; romatoid artrit, kronik inflamasyona bağlı artmış eritrosit agregasyonunun klasik bir örneğidir [83]. Sistemik lupus eritematozus (SLE) gibi diğer otoimmün, inflamatuvar hastalıklarda da yüksek eritrosit agregasyonu görüldüğu bildirilmiştir [96, 97].

3. MATERYAL VE METOD

Sağlık Bilimleri Üniversitesi İstanbul Sultan 2. Abdülhamid Han Eğitim ve Araştırma Hastanesi Geleneksel ve Tamamlayıcı Tıp Klinik Uygulamaları Etik Kurulu (Onay no : 2023-045) onayı ile çalışma planlanmıştır.

3.1 Çalışmanın Planlanması ve Katılımcıların Seçimi

20 adet sağlıklı gönüllü çalışmaya dahil edildi. Çalışmamız 08.08.2023-10.08.2023 tarihleri arasında, Sultan 2. Abdülhamid Han Eğitim ve Araştırma Hastanesi Algoloji ve GETAT polikliniğinde yapıldı. Katılımcılara yapılacak işlemler ve çalışmanın içeriği ile ilgili gerekli açıklamalar yapıldı ve yazılı onam formu imzalatıldı.

Çalışmaya dahil edilme kriterleri:

1. Çalışmaya katılmaya gönüllü olan
2. ASA fiziksel durum sınıflaması I olan
3. ≥ 18 ve ≤ 35 yaş aralığında olan gönüllüler çalışmaya dahil edildi.

Çalışma dışı bırakılma kriterleri:

1. Araştırmaya katılmaya gönüllü olmayan
2. 18 yaşından küçük ve 35 yaşından büyük olan
3. Antiagregan ve antikoagülan ilaç kullanan
4. Hematolojik hastalık tanısı olan
5. Kontrolsüz Hipertansiyon tanısı olan
6. G6PD enzim eksikliği (Favizm) olan
7. Gebelik durumu olan gönüllüler çalışmaya dahil edilmedi.

3.2. Çalışma Protokolü

Çalışmaya katılan sağlıklı gönüllüler kapalı zarf yöntemi ile MOHT ve SF ozonlama olarak iki gruba ayrıldı. MOHT uygulanacak grup Grup M (n:10), ozonlanmış SF uygulanacak grup Grup S (n:10) olarak adlandırıldı. Her iki grupta da 20 gauge pembe anjiyoket ile antekübital bölgeden damar yolu açıldıktan sonra 6 ml kan ilk örneklem için EDTA'lı tüpe alındı.

1. Grup M (n:10): Antekübital bölgeden açılan i.v. yoldan 100 ml kan vakumlu sitratlı cam şişeye alındı. Cam şişe venöz ponksiyon yapılan seviyeden aşağıda tutularak yerçekimi ve negatif basınç etkileri ile kanın içeri dolması sağlandı. Kan miktarı şişe üstündeki seviyelerden 100 ml hizasına geldiğinde serum seti kilitlendi. Daha sonra medikal ozon jeneratöründen (SALUTEM Medikal Ozon Cihazı, Türkiye) 100 ml 14 mcg/ml ozon silikon ozon enjektörü ile alındı ve cam şişeye eklenerek gönüllüye 15-20 dk da retransfüze edildi.
2. Grup S (n:10): Medikal ozon jeneratöründen silikon ozon enjektörü ile alınan 5mcg/ kg dozda ozon 100 ml' de olacak şekilde 100 ml SF içerisine kabarcık yöntemi ile verildi. Ozonlanmış SF 15-20 dk da gönüllüye intravenöz infüze edildi.

Her iki grupta uygulama bitiminden 10 dk sonra işlem sonrası örneklem için 6 ml kan EDTA'lı tüpe alındı. Alınan numuneler uygun şartlarda Sağlık Bilimleri Üniversitesi Biyofizik Laboratuvarına gönderilerek koni-plak rotasyonel viskometresi ve laser-assisted optical rotational cell analyzer (LORCA) cihazlarında çalışıldı.



Şekil 12. Medikal Ozon Jeneratörü



Şekil 13. Vakumlu Sitratlı Şişe



Şekil 14. MOHT Uygulaması

3.3 Eritrosit Deformabilitesi Ölçümü

Eritrosit deformabilitesini gözlemlemek için yapılan ölçümlerde, ektasitometrik inceleme yöntemine göre ölçüm yapan “laser-assisted optical rotational cell analyzer” (LORCA, Mechatronics, Amsterdam, Hollanda) cihazı kullanılmıştır. Eritrosit süspansiyonları, aralarında 0.3 mm boşluk kalacak şekilde karşılıklı iki cam silindirden oluşan bir viskometre sistemine yerleştirilir. Dönen ve sabit kalan iki cam silindirden oluşan sistemde araştırmacının belirlediği hızda dönen dıştaki cam silindirin çapı daha geniştir. Cihaz dönme hızını girilmiş “shear stress” değerine göre ayarlar. Dıştaki cam silindir döndükçe iki cam silindir arasındaki süspansiyona bir kuvvet uygulanır. Eritrositler “shear stress” e maruz kaldıkça şekilleri bikonkav disk şeklinden elipsoid şekle dönüşmeye başlarlar. Sabit bir silindirin içinde yer alan bir

lazer kaynağından çıkan ışın, eritrosit süspansiyonuna ulaşır. Bu ışın süspansiyondaki eritrositlerin şeklini ve dönme hareketinin yarattığı akıma oryantasyonlarını gösteren bir difraksiyon paterni oluşturmak için bir ekrana yansır. Shear stress e maruz kaldıkça eritrositlerin bikonkavdan elipsoid şekle geçme derecesi ile deformabilitesi (şekil değiştirebilme yeteneği) arasında doğru orantı vardır. Cihaz eritrositin dönüştüğü elipsoid paternin uzun (A) ve kısa (B) eksenlerinin uzunlukları saptar ve $A-B/A+B=EI$ formülüyle elongasyon indeksi (EI) (Uzama İndeksi) hesaplanır. Uzama indeksi ve şekil değişikliğine neden olan maksimum uzama indeksi (EI_{max}) değerinin yarısı kadar olan "shear stress" değeri önemlidir. Bu değer, Linea Weaver-Burke analizi kullanılarak hesaplanan $SS_{1/2}$ olarak ifade edilir. $SS_{1/2}$ değerinin azalması ve maksimum uzama indeksi (EI_{max}) değerinin artması, eritrosit deformabilitesinde bir artış olduğunu gösterir.

Çalışmamızda sağlıklı gönüllülerden alınan 10ml kan, 29,4 mPa.sn viskoziteye sahip 5 ml PVP (polivinilpirolidon) solüsyonuna (Sigma PVP-360, RR Mechatronics, Hoorn, Hollanda) eklenip titreşim oluşturmadan karıştırıldı. Ölçümler için bu süspansiyonun 1ml'si kullanıldı. Ölçümler 37°C'de 0,30 ile 30 Pa arasında değişen kayma kuvvetlerinde gerçekleştirildi. Tüm kayma hızlarından elde edilen EI, EI_{max} ve $SS_{1/2}$ değerleri kaydedildi.



Şekil 15. Laser-assisted Optical Rotational Cell Analyzer” (LORCA, Mechatronics, Amsterdam, Hollanda)

3.4. Eritrosit Agregasyonu Ölçümü

Eritrosit agregasyonu ölçümünde de eritrosit deformabilitesini değerlendirmek için kullanılan cihaz (LORCA) kullanılmıştır (Şekil 15). Alınan kan örnekleri 15 dk oksijene maruz bırakıldıktan sonra örnekten 1 ml alınarak aralarında 0,3 mm boşluk kalacak uygun cam silindirler arasında yerleştirilir. LORCA cihazı ile 37°C’de ölçüm gerçekleştirilir. Numune üzerine lazer ışını tutulur. Lazer ışını kan örneği içine penetre olur ve bu sayede silindirin dışındaki alıcıya ulaşması engellenmiş olur. Agregasyon ölçümü, lazer ışığının silindirler arasındaki kanın içine girişi ve geriye saçılımı (back-scattering) prensibine dayandırılır. Silindirler arasından geriye saçılan lazer ışını miktarı, iç taraftaki sabit silindirde bulunan alıcı tarafından ölçülür. Cihaz, önceden belirlenen yüksek hızda döndürülerek eritrosit agregatlarını ayrıştırır. Sonra, döndürme işlemi aniden durdurulur ve hıza uyum sağlayarak uzayıp elipsoid hale gelmiş eritrositlerin normal bikonkav şekillerine dönmesi sağlanır. Bu şekil değişikliklerinin olduğu süreç geriye saçılan lazer ışığı yoğunluğunda artış yaratır. Lazerden geriye yansıyan ışık yoğunluğunda azalma olması bize agregasyon sürecinin başladığını gösterir. Bu geriye yansıyan lazer ışığın şiddetinin zamana göre değişimini gösteren eğriye “silektogram” adı verilir. Bu kaydın bilgisayar yazılımı tarafından hesaplanmasıyla eritrositlerin agregasyon özelliklerini gösteren agregasyon parametreleri elde edilir.

Agregasyon indeksi (AI) (%): Staz durumunda eritrositlerin agregasyon yüzdesi,

Agregasyon amplitüdü (AMP) (au): Agregasyonun toplam genliği,

Agregasyon yarı zamanı ($t_{1/2}$) (sn): Agregasyonun en yüksek genliğinin yarıya inmesi için gereken süre

Çalışmamızda eritrosit agregasyonu ölçümü yapmak için toplanan numunelerin içinden 1 ml tam kan numunesi ölçüm öncesi 15 dk oksijenlendi. Daha sonra bu numuneden ~900 µl alınarak cihaza ölçüm için yerleştirildi. Ölçüm 37 °C’de gerçekleştirildikten sonra AI, AMP ve $t_{1/2}$ parametrelerinin değerleri kaydedildi.

3.5. Tam Kan ve Plazma Viskozitesi Ölçümü

Alınan örneklerden kan ve plazma viskozitesi ölçümleri rotasyonel viskozimetre (Brookfield DV-III, Brookfield, Middleboro, MA, USA) cihazı ile yapılmıştır. Kan viskozitesi ölçümleri 75, 150, 300 ve 450 $1/s$ “shear rate” altında dört basamaklı olarak gerçekleştirildi. Elde edilen viskozite verileri cP (centipoise) olarak kaydedildi. Tam kan örnekleri 5 dakika santrifüj işlemine tabi tutulduktan sonra elde edilen plazmadan 550 μ l kullanılarak plazma viskozitesi ölçümleri yapıldı.

Plazma viskozitesi için 300 $1/s$ ve 450 $1/s$ “shear rate” te tek basamaklı viskozite ölçümü yapıldı ve sonuçlar cP (centipoise) olarak kaydedildi.



Şekil 16. Cone-plate viskozimetre cihazı

3.6 Veri Analizi

Veriler IBM SPSS Statistics 18 © Copyright SPSS Inc. 1989, 2010 yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir. Örneklem sayısının 30’dan küçük olması nedeniyle normal dağılım gösterilip gösterilmediğine bakılmadan, bağımsız iki grup analizlerinde Mann Whitney U testi kullanılmıştır. Bağımlı iki grup analizinde ise veriler Wilcoxon testi ile incelenmiştir. Çalışmada istatistiksel anlamlılık düzeyi 0,05 olarak kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

Çalışmamıza katılan gönüllülerimizin işlem öncesi ve işlem sonrası örneklem için alınan kanları biyofizik laboratuvarında çalışılmıştır. Yapılan çalışmalardan elde edilen bilgiler ile hemoreolojik parametreler değerlendirilmiştir. Eritrosit agregasyonunun değerlendirildiği Tablo 3'te Agregasyon genliği (AU), Agregasyon yüzdesi (%AI) ve Agregasyon genliğinin en yüksek değerinin yarıya inmesi ($t_{1/2}$) değişkenlerinin farklı zamanlarda yapılan ölçümlerinin SF ve MOHT gruplarında, grupların kendi içinde ve birbiriyle kıyaslanarak O₃ terapisi öncesi ve sonrasında ölçülen değerlerde farklılık gösterip göstermediğine ilişkin yapılan analizlerin sonuçları yer almaktadır. Buna göre, değişkenlere ilişkin tüm ölçümler, SF ve MOHT gruplar arası kıyaslamada benzer çıkmıştır ($p>0,05$). Başka bir ifadeyle, yapılan analiz sonucunda AU, %AI ve $t_{1/2}$ değişkenlerinin aldıkları değerler açısından iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır. Örneğin, O₃ terapisi öncesi değişkeni, SF grubundaki katılımcılar için 41,46 (35,5-43,49) ve MOHT grubundaki katılımcılar için 41,3 (38,9-43,09) ortanca değerini almıştır ($p=0,940$)

SF grubu için yapılan analizlerde, %AI parametresinde anlamlı değişim olmuştur ($Z=-2,090$; $p=0,037$). Bu parametrede, O₃ terapisi sonrası alınan örnek çalışıldığında O₃ terapisi öncesi örneğin sonuçlarına göre istatistiki açıdan anlamlı bir şekilde düşüş görülmüştür. 10 gönüllünün 9'unda %AI de uygulama öncesine göre düşüş, 1 gönüllüde artış gözlenmiştir.

Tablo 3. Agregasyon

	Agregasyon	SF Grubu (n=10)	MOHT Grubu (n=10)	p
Agregasyon genliği (AU)	O ₃ Öncesi	41,46(35,5-43,49)	41,3(38,9-43,09)	0,940
	O ₃ Sonrası	41,83(39,89-45,2)	43,35(41,4-45,05)	0,525
	p	0,285	0,508	
Agregasyon yüzdesi (%AI)	O ₃ Öncesi	64,46(57,13-67,81)	66,26(57,28-74,22)	0,450
	O ₃ Sonrası	56,3(55,65-60,79)	59,62(55,7-64,02)	0,406
	p	0,037 *	0,114	
T _{1/2} (s)	O ₃ Öncesi	2,22(1,81-3,05)	1,94(1,26-2,89)	0,406
	O ₃ Sonrası	3,1(2,61-3,33)	2,64(2,17-3,26)	0,406
	P	0,059	0,169	

*: $p < 0,05$ istatistiksel olarak farklı

Tablo 4’ te Deformabilite-Elongasyon (I) başlığında ele alınan elongasyon indeksi maksimum değeri (EI max) ve EI max’ın yarısının elde edildiği shear stress değeri ($SS_{1/2}$) değişkenleri yer almaktadır. SF ve MOHT gruplar arası kıyaslamada EI max değişkeninin O₃ terapisi sonrası SF grubunda aldığı ortalama değeri [0,66(0,65-0,67)], MOHT grubundaki değerden [0,65(0,63-0,66)] göre istatistiki açıdan anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (p=0,049). $SS_{1/2}$ (Pa) değişkeninin O₃ terapisi sonrası MOHT grubunda ölçülen ortalama değeri [1,63(1,32-1,79)], SF grubundaki katılımcıların ortalama değerinden [1,25(1,01-1,61)] anlamlı olarak yüksek çıkmıştır (p=0,049). Deformabilite-Elongasyon (I) başlığındaki değişkenlerin diğer ölçümlerine ilişkin değerleri ise iki grup arasında benzer bulunmuştur (p>0,05).

Grupların kendi içerisinde yapılan kıyaslamada O₃ terapisi öncesi ve sonrası değerlerde anlamlı bir değişiklik görülmemiştir. Örneğin SF grubunda O₃ terapisi öncesi ölçülen EI_{max} ortalama değeri 0,65 (0,65-0,67) iken O₃ terapisi sonrasında 0,66(0,65-0,67) ölçülmüştür (p=0,670)

Tablo 4.Deformabilite-Elongasyon (I)

	Deformabilite-Elongasyon	SF Grubu (n=10)	MOHT Grubu (n=10)	P
EI max	O ₃ Öncesi	0,65(0,65-0,67)	0,65(0,63-0,65)	0,062
	O ₃ Sonrası	0,66(0,65-0,67)	0,65(0,63-0,66)	0,049 *
	p	0,670	0,518	
SS _{1/2}	O ₃ Öncesi	1,23(1,13-1,7)	1,59(1,21-1,71)	0,364
	O ₃ Sonrası	1,25(1,01-1,61)	1,63(1,32-1,79)	0,049 *
	p	0,720	0,507	

*: p < 0,05 istatistiksel olarak farklı

Deformabilite-Elongasyon (II)- Shear Stres başlığında farklı Shear Stress değişkenlerinde Elongasyon İndeksine ilişkin dağılımlar Tablo 5’te yer almaktadır. 1,69 Pa Shear Stres O₃ terapisi sonrası değişkeninde de iki grup arasındaki kıyaslamada anlamlı bir farklılık tespit edilmiştir (p=0,025). SF grubunda yer alan katılımcıların 1,69 Pa Shear Stres O₃ terapisi sonrası değerinin [0,34(0,33-0,35)], MOHT grubuna [0,33(0,32-0,33)] göre yüksek olduğu görüldü. SF ve MOHT grubu

diğer tüm Shear Stress değişkeni ölçümlerinde birbirlerine benzer dağılımlar sergilemiştir ($p>0,05$).

Shear Stress değişkenlerinin öncesi ve sonrası ölçümleri, tüm gruplarda benzer ortanca değerlere sahip bulunmuştur ($p>0,05$). Örneğin, MOHT grubunda 3 Pa Shear Stres değişkeni için yapılan O₃ öncesi ölçümünde 0,42(0,41-0,42) olarak hesaplanan ortanca değer, O₃ sonrası ölçümünde 0,42(0,41-0,42) olmuştur. Söz konusu değerler istatistiki açıdan anlamlı bir farklılık göstermemektedir ($p=0,102$).

Tablo 5.Deformabilite-Elengasyon (II)- STR(Pa) Shear Stress

	EI Shear Stress (Pa)	SF Grubu (n=10)	MOHT Grubu (n=10)	P
EI 0,3Pa	O ₃ Öncesi	0,14(0,12-0,14)	0,11(0,1-0,12)	0,135
	O ₃ Sonrası	0,12(0,11-0,13)	0,11(0,1-0,12)	0,354
	p	0,303	>0,999	
EI 0,95 Pa	O ₃ Öncesi	0,27(0,25-0,28)	0,25(0,23-0,26)	0,208
	O ₃ Sonrası	0,26(0,24-0,27)	0,25(0,23-0,26)	0,205
	p	0,526	0,165	
EI 1,69 Pa	O ₃ Öncesi	0,36(0,32-0,37)	0,33(0,32-0,33)	0,084
	O ₃ Sonrası	0,34(0,33-0,35)	0,33(0,32-0,33)	0,025*
	p	0,524	0,739	
EI 3 Pa	O ₃ Öncesi	0,43(0,41-0,44)	0,42(0,41-0,42)	0,098
	O ₃ Sonrası	0,42(0,41-0,43)	0,42(0,4-0,42)	0,125
	p	0,395	0,102	

*: $p < 0,05$ istatistiksel olarak farklı

Plazma Viskozitesi (PV) (Cp) 300_{1/s} Shear Rate ve 450_{1/s} Shear Rate değişkenlerinin O₃ terapisi öncesi ve sonrası ölçümlerine ilişkin değerler Tablo 6' da yer almaktadır. Plazma Vizkozitesi başlığına ilişkin analiz sonuçları, SF ve MOHT grupları birbiriyle kıyaslandığında tüm değişkenlerde benzerlik göstermektedir ($p>0,05$). Örneğin, PV (Cp) 300_{1/s} O₃ terapisi sonrası değişkeninin SF grubundaki ortanca değeri 1,1 (0,9-1,23), MOHT grubundaki 1,03 (0,77-1,13) ölçülmüştür. İki grubun bu değişkene ilişkin aldığı değerler arasında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p=0,449$).

Tüm grupların kendi içlerinde yapılan ve Plazma Vizkozitesi değişkenlerinin ölçümler arasındaki değişimlerini inceleyen analiz sonucunda da anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir ($p>0,05$) (Tablo 6).

Tam Kan Viskozitesi başlığında ise, TKV' nin 75 1/s, 150 1/s, 300 1/s, 450 1/s share ratelerindeki değerlerine ilişkin O₃ terapisi öncesi ve sonrası ölçümleri yapılmış ve sonuçlar Tablo 7'de gösterilmiştir. Burada da gruplar arası kıyaslamada veya grupların kendi içlerinde herhangi bir farklılık görülmemiştir (p>0,05). Örneğin, SF grubunda 1,9 (1,71-2,04) olarak ölçülen TKV (cP) 450 1/s O₃ terapisi sonrası değişkeninin MOHT grubunda aldığı ortanca değer 1,5 (1,38-2,21)'tir. İki grup arasında, bu değişken kapsamında görülen bu farklılık istatistiki açıdan bir anlam ifade etmemektedir (p=0,273). Aynı şekilde, MOHT grubunda TKV (cP) 150 1/s değişkeni için yapılan O₃ terapisi öncesi ve sonrası ölçümlerinde, TKV (cP) 150 1/s O₃ terapisi sonrası ölçümünün aldığı ortanca değer [2,17(2,04-2,76)], TKV (cP) 150 1/s O₃ terapisi öncesi ölçümünde ortaya çıkan ortanca değerden [2,07(1,98-2,35)] yüksek görülse de bu değişim istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır (p=0,374).

Tablo 6.Plazma Viskozitesi

	Plazma Viskozitesi	SF Grubu (n=10)	MOHT Grubu (n=10)	p
PV (Cp) 300 1/s	O ₃ Öncesi	1,07(0,91-1,2)	1(0,89-1,15)	0,496
	O ₃ Sonrası	1,1(0,9-1,23)	1,03(0,77-1,13)	0,449
	p	0,838	0,799	
PV (Cp) 450 1/s	O ₃ Öncesi	1,05(0,94-1,18)	0,94(0,83-0,99)	0,064
	O ₃ Sonrası	1,03(0,89-1,14)	0,93(0,67-1,02)	0,150
	p	0,541	0,919	

Tablo 7.Tam Kan Viskozitesi

	Tam kan viskozitesi	SF Grubu (n=10)	MOHT Grubu (n=10)	p
TKV (cP) 75 1/s	O ₃ Öncesi	3,24(2,48-3,71)	2,93(2,42-3,68)	0,650
	O ₃ Sonrası	2,79(2,61-3,03)	3,12(3,03-3,46)	0,088
	p	0,202	0,541	
TKV (cP) 150 1/s	O ₃ Öncesi	2,48(2,16-2,85)	2,07(1,98-2,35)	0,212
	O ₃ Sonrası	2,32(2,15-2,76)	2,17(2,04-2,76)	0,734
	p	0,508	0,374	
TKV (cP) 300 1/s	O ₃ Öncesi	2,12(1,72-2,31)	1,8(1,42-1,89)	0,290
	O ₃ Sonrası	2,01(1,82-2,19)	1,75(1,62-2,36)	0,597
	p	0,799	0,241	
TKV (cP) 450 1/s	O ₃ Öncesi	1,91(1,47-2,18)	1,62(1,25-1,79)	0,151
	O ₃ Sonrası	1,9(1,71-2,04)	1,5(1,38-2,21)	0,273
	p	0,919	0,646	

5. TARTIŞMA

Ozonun glikolizi arttırması, eritrositlere ve hemoreolojiye etki etmesi, bakterisidal, fungusidal ve virüstatik özellik göstermesi, immünomodülatör etkisinin olması, analjezik ve antiinflamatuvar olması gibi birçok özelliği bilinmektedir [2]. Literatürde O₃ tedavisinin hemoreolojik parametrelere etkisinin incelendiği çalışmalar sınırlıdır [7, 8]. Yapılan çalışmalarda ise medikal O₃ uygulamasının in vitro şartlarda uygulandığı görüldü. İn vivo koşullarda etkinin değerlendirildiği çalışmaya rastlanmadı. Biz çalışmamızda O₃' ün kırmızı kan hücrelerine etkisini ve hemoreolojik etkilerini, in vivo O₃ terapisi uyguladığımız gönüllülerimizde değerlendirdik.

Çalışmamızda değerlendirilen hemoreolojik parametrelerden %AI' nın ozonlanmış SF uygulanan grubumuzda anlamlı olarak azaldığını gördük. MOHT uygulanan grupta fark görülmemiştir. %AI azalması bize eritrositlerin staz durumunda agregre olan yüzdesinde azalma olduğunu bu da kanın daha akışkan hale geldiğini gösterir. Kanın akışkan hale gelmesi ile dokulara ulaşması kolaylaşacak dolayısıyla bu dokularda oksijenlenme iyileşecektir. Akbudak ve ark. [7]' nin yaptıkları çalışmada 10 gönüllü üzerinde iki farklı dozda in vitro MOHT uygulaması ile eritrosit deformabilitesi ve agregasyonuna bakılmış ve bu çalışmada %AI de değişiklik görülmemiştir. Literatürdeki bu bilgi MOHT grubu ile ilgili bulgumuzu desteklemekte, ozonlanmış SF kullanımının MOHT' ye göre agregasyonu azaltmada etkili olabileceğini göstermektedir.

Eritrositlerin agregasyonun artışının bir çok enfektif hastalıkta ve dolaşım bozuklukları ile seyreden hastalıklarda önemli rol oynadığı gösterilmiştir [55, 75, 83, 85]. Bakteriyel ve viral enfeksiyonların tedavisinde O₃' ün yeri olduğu bilinmektedir, [3, 5, 98, 99]. Ayrıca Gülmen ve ark.[100]' nin ratlarla yaptıkları çalışmada Staphylococcus Aureus mediastinitinde vankomisine ek O₃ kullanımının enfekte sternal ve mediastinal dokularda bakteriyel eliminasyonu arttırdığını göstermiştir. Yapılan başka bir çalışmada ratlarda uygulanan O₃ tedavisinin inflamatuvar bir süreç olan endometriozis tedavisinde faydalı olduğu gösterilmiş [4]. Enfeksiyonların tedavisinde antiinflamatuvar, bakterisidal, fungusidal ve virüsidal özellikleri için kullanılan O₃' ün enfeksiyona bağlı agregasyon artışını azaltarak tedaviye katkı sağlayacağını düşünmekteyiz.

Literatürde, iskemi ve mikrosirkülasyondaki bozukluktan kaynaklanan hastalıkların tedavisinde O₃ terapisinin yeri olduğu gösterilmiştir [3, 5, 101, 102]. Liu ve ark. [103]' nın yaptıkları çalışmada O₃ terapisinin Tip 2 diyabetli hastalarda iskemik stroke oranını anlamlı şekilde düşürdüğü gösterilmiştir. Wainstein ve ark. [104]' nın yaptıkları çalışmada diyabetik ayak ülserlerinde konvansiyonel tedaviye ek O₃ terapisinin, tek başına konvansiyonel tedavi uygulananlara göre üstün olduğunu gösterilmiştir. İrban ve ark.[105] ' nın yaptığı çalışmada ise O₃ terapisinin VEGF gibi damar yapılanmasını etkileyen faktörleri ve dolaşımı arttırdığını gösterilmiştir. Ozonlanmış SF ile uygulanan O₃ terapisinin %AI azalması sağlayarak dolaşımı iyileştirmesinin bu patolojilerdeki endikasyonunu güçlendirdiğini düşünmekteyiz.

Çalışmamızda EI max değerinin, SF ozonlanması ile O₃ terapisi yapılan gönüllülerde MOHT yöntemi ile yapılan gönüllülere göre uygulama sonrasında daha yüksek olduğunu gördük. EI max değerinin elde edildiği shear stress değeri olan SS_{1/2} ise MOHT grubunda ozonlanmış SF grubuna göre yüksek çıkmıştır. Yine SF grubunda farklı shear stress değerlerinde bakılan EI değerinin 1,69 Pa shear stress değerinde MOHT grubuna göre O₃ terapisi sonrasında anlamlı yüksek bulunduğunu gördük. EI max değerindeki artışlar ve SS_{1/2} deki azalmalar eritrosit deformabilitesinde artış olduğunu gösterir. Eritrosit deformabilitesinin artışı ile, kanın doğal akışı esnasında hemolize olması azalır, oksijen taşıma kapasitesi iyileşir ve kanın mikrosirkülasyona geçişi kolaylaşır. Eritrosit deformabilitesi çeşitli patofizyolojik durumlarda bozulur veya azalır [55]. Tikhomirova ve ark. [106]' nın yaptığı çalışmada akut iskemik stroke hastalarında artmış eritrosit agregasyonun yanında eritrosit deformabilitesinde azalma olduğunu görülmüştür. Yine Moon ve ark. [107]' nın tip 2 diyabet hastalarında yaptıkları çalışmada düşük EI değerlerine sahip hastalarda daha yüksek HbA1c değerleri ölçülmüş olup diyabetik retinopati insidansında artış olduğu gözlenmiştir. İzadi ve ark. [108]' nın yaptığı yakın tarihli bir çalışmada O₃ terapisi diyabet hastalarının görme yollarındaki impulsların iletimini iyileştirmek için standart tedaviye ek tamamlayıcı bir tedavi olarak önerilmiştir. Çalışmamızda ozonlanmış SF uygulamasında MOHT'ye göre deformabiliteyi arttıracak olan EI max ta artış SS_{1/2}' de ise azalma gördük. Ozon; deformabilitenin azaldığı iskemik stroke, diyabet, diyabetik retinopati gibi hastalıklarda antioksidan, immünmodülatör, antiinflamatuvar

özelliklerinden faydalanılması amacıyla kullanılmaktadır. Deformabiliteyi iyileştirmesinin burdaki endikasyonunu güçlendirdiğini düşünmekteyiz.

SF ozonlama ve MOHT grupları arasında EI max ve SS $_{1/2}$ deki farkın serum fizyolojisinin O₃ için taşıyıcı olmasından kaynaklandığını düşünmekteyiz. MOHT’de O₃ kan içerisine verildiğinde ozon aracılı reaksiyonlar kan ile temas ettiği anda başlar, ozonlanmış SF grubunda ise serum fizyolojik taşıyıcı görev gördüğü için ozon aracılı reaksiyonlar farklı kan hücrelerine temas ettiği sürece yani infüzyon süresince devam eder. Sistemik dolaşıma verilen serum fizyolojik sadece 100 ml olduğu için parametreler üzerine etkisi olmayacağını düşünmekteyiz.

Çalışmamızda iki farklı shear stress değerlerinde O₃ terapisi öncesi ve sonrası bakılan plazma viskozitesi değerlerinde gruplar içinde ve gruplar arasında anlamlı bir farklılık görülmemiştir. Plazma viskozitesinin, hiperviskozite sendromlarında, romatoid artrit gibi inflamasyonun yüksek olduğu hastalıklarda arttığı bilinmektedir [109]. Aynı zamanda plazma viskozitesinin akut faz reaktanları ile yükseldiğinden ve inflamasyonun takibinde kullanılabildiği literatürde yer almaktadır[56, 63]. Tartari ve ark. [110]’nın ratlarla yaptıkları çalışmada romatoid artrit hastalarında O₃ tedavisinin proinflamatuvar süreci baskılayıp antiinflamatuvar etki gösterdiğini gösterilmiştir [110]. Bununla beraber literatürde in vivo O₃ terapisi sonrası plazma viskozitesi üzerine etkilerinin araştırıldığı çalışmalara rastlanmamıştır. Çalışmamızın plazma viskozitesi ve O₃ tedavisinin değerlendirilmesi için daha geniş katılımlı ve daha uzun süreli O₃ uygulamalarının yapıldığı araştırmalara yönelmesi için literatüre katkı yaptığımızı düşünmekteyiz.

Çalışmamızda dört farklı shear stress değerlerinde O₃ terapisi öncesi ve sonrası bakılan tam kan viskozitesi değerlerinde grupların kendi içinde ve gruplar arasında anlamlı farklılık bulunamadı. Tam kan viskozitesi; eritrosit agregasyonu, eritrosit deformabilitesi ve plazma viskozitesinde olan değişikliklerden etkilenmektedir. Bu nedenle O₃ ve tam kan viskozitesi arasındaki ilişkiyi araştırarak daha ileri çalışmaların yapılmasının literatür için faydalı olacağını düşünmekteyiz.

Literatürde, çalışmamızda MOHT grubunda kullanılan sitratın kırmızı kan hücreleri veya hemoreolojik parametreleri etkilediğine dair çalışmaya rastlanmamıştır.

Çalışmamızın kısıtlılıkları; düşük örneklem sayısı ve tek seans O₃ terapisi uygulama sonrası sonuçların incelenmesi olarak sayılabilir. O₃ terapisinin hemoreolojik parametreler üzerindeki etkisinin daha ayrıntılı araştırılması için daha büyük örneklemler ve çoklu seansların olduğu çalışmalara ihtiyaç olduğunu düşünmekteyiz.



6. SONUÇ

Çalışmamızda bir çok patofizyolojik klinik durumda tedavide yeri olan O₃ terapisinin; ozonlanmış SF uygulamasında hemoreolojik parametrelerden %AI' da azalma, ozonlanmış SF'te MOHT' ye göre hemoreolojik parametrelerden , Elmax' ta artış, SS_{1/2}' de azalma ve 1,69 Pa da EI' da artış sağladığı gözlemlendi.

Staz durumunda eritrositlerin agregasyon yüzdesindeki azalmaya bağlı eritrosit agregasyonunda azalma dokulara giden kan akımında iyileşme sağlayacaktır. Dokulara kan akışının iyileşmesi doku oksijenizasyonunu arttıracaktır. Özellikle mikrosirkülasyonun ve dokuya O₂ sunumunun azaldığı durumlarda, SF ozonlama yöntemi ile yapılacak O₃ terapisinin tedaviye eklenmesi iyileşmeyi hızlandıracaktır. O₃ terapisinin bilinen antiinflamatuvar, bakterisidal, virüsidal, antioksidan, antiinflamatuvar özelliklerine ek olarak agregasyonu azaltarak oksijen sunumu arttırması tedavideki yerini güçlendirmektedir. KOAH atak, Covid-19 gibi hipoksik solunum yetmezliği ile seyreden hastalıklar, sepsis – septik şok tablosundaki hastalıklar, periferik arter hastalıklarına yol açan diyabet gibi metabolik hastalıklarda, iskemi sonucu oluşan miyokardiyal infarktüs, inme gibi patolojilerde, dolaşım bozukluğuna bağlı cilt yaralarında, egzema vb doku hastalıklarında oksijen sunumunun artışı tedavide önemli bir parametre olacaktır. Bulgularımız sonucunda SF ozonlayarak yapılan O₃ terapisinin, %AI'yı azalttığı görüldüğünden uygulamada daha etkili olacağını düşünmekte ve önermekteyiz.

Eritrositlerin deformabilitesinin bozulduğu stroke, diyabetik hastalarda dolaşım bozuklukları ve görme bozuklukları gibi durumlarda O₃' ün VEGF uyarıcı vb etkileri ile tedavide yeri olduğunu biliyoruz. Deformabilitenin artışı ile eritrositler mikrosirkülasyona daha uyumlu hale gelecek ve daha periferdeki dokulara daha rahat ulaşabilecektir. Bu da periferik dokulara O₂' nin taşınmasını ve bu dokularda rejenarasyonu, beslenmeyi iyileştirecektir. Maküler dejenerasyon, diyabetik nefropati, romatolojik hastalıklar, diyabetik nöropatiye sekonder gelişen cilt yaralarında O₃ tedavisinin yerini güçlendirecektir. Çalışmamızda yaptığımız değerlendirmelerde ulaştığımız sonuç olan ozonlanmış SF'te MOHT ye göre EI max' ın yüksek SS_{1/2}' nin düşük olması O₃ terapisinin SF ile uygulandığında MOHT'ye göre deformabilitiyi iyileştireceğini göstermektedir. Bunun sonucunda özellikle deformabilitenin

bozulduğu hastalıklarda O₃ terapisinin MOHT yerinde SF ozonlayarak yapılmasının daha efektif olacağını düşünmekte ve önermekteyiz.



7. KAYNAKLAR

1. Elvis, A.M. and J.S. Ekta, *Ozone therapy: A clinical review*. J Nat Sci Biol Med, 2011. **2**(1): p. 66-70.
2. Emon, S.T., et al., *Effects of Ozone on Spinal Cord Recovery via the Wnt/ Β-Catenin Pathway Following Spinal Cord Injury in Rats*. Turk Neurosurg, 2017. **27**(6): p. 946-951.
3. Bocci, V.A., *Scientific and medical aspects of ozone therapy. State of the art*. 2005.
4. Gerçek İrban, A., et al., *Ozone (O₃)-oxygen mixture therapy inhibits endometrial implant growth*. 2016. **9**: p. 11590-11597.
5. Di Paolo, N., V. Bocci, and E. Gaggiotti, *Ozone therapy*. Int J Artif Organs, 2004. **27**(3): p. 168-75.
6. Ruef, P., et al., *Determination of whole blood and plasma viscosity by means of flow curve analysis*. Gen Physiol Biophys, 2014. **33**(3): p. 285-93.
7. Akbudak, I.H., et al., *Investigation of the effects of major ozone autohemotherapy application on erythrocyte deformability and aggregation*. Clin Hemorheol Microcirc, 2019. **71**(3): p. 365-372.
8. Artis, A.S., S. Aydogan, and M.G. Sahin, *The effects of colorectally insufflated oxygen-ozone on red blood cell rheology in rabbits*. Clin Hemorheol Microcirc, 2010. **45**(2-4): p. 329-36.
9. Boczkowska-Radziwon, B., et al., *Ozonation of Whole Blood Results in an Increased Release of Microparticles from Blood Cells*. Biomolecules, 2022. **12**(2).
10. Braidy, N., et al., *Therapeutic relevance of ozone therapy in degenerative diseases: Focus on diabetes and spinal pain*. J Cell Physiol, 2018. **233**(4): p. 2705-2714.
11. Wentworth, P., Jr., et al., *Evidence for antibody-catalyzed ozone formation in bacterial killing and inflammation*. Science, 2002. **298**(5601): p. 2195-9.
12. Rubin, M.B., *The History of Ozone; the Schonbein Period*. Bulletin for the History of Chemistry, 2001.
13. Bocci, V., et al., *The ozone paradox: ozone is a strong oxidant as well as a medical drug*. Med Res Rev, 2009. **29**(4): p. 646-82.
14. Travagli, V., et al., *A physicochemical investigation on the effects of ozone on blood*. Int J Biol Macromol, 2007. **41**(5): p. 504-11.
15. AKALIN, B., A. İRBAN, and G. ÖZARGUN, *Türkiye’de Geleneksel ve Tamamlayıcı Tıp Uygulamalarının Mevcut Standartları ve İyileştirme Önerileri*. Sağlık Profesyonelleri Araştırma Dergisi, 2023. **5**(1): p. 49-69.
16. Norval, M., et al., *The effects on human health from stratospheric ozone depletion and its interactions with climate change*. Photochemical & Photobiological Sciences, 2007. **6**(3): p. 232-251.
17. Kogelschatz, U., B. Eliasson, and M. Hirth, *Ozone Generation from Oxygen and Air: Discharge Physics and Reaction Mechanisms*. Ozone: Science & Engineering, 1988. **10**(4): p. 367-377.
18. Smith, N.L., et al., *Ozone therapy: an overview of pharmacodynamics, current research, and clinical utility*. Med Gas Res, 2017. **7**(3): p. 212-219.
19. Bocci, V., *Ozone as Janus: this controversial gas can be either toxic or medically useful*. Mediators Inflamm, 2004. **13**(1): p. 3-11.
20. Viebahn-Haensler, R. and O.S. Leon Fernandez, *Ozone in Medicine. The Low-Dose Ozone Concept and Its Basic Biochemical Mechanisms of Action in Chronic Inflammatory Diseases*. Int J Mol Sci, 2021. **22**(15).
21. Maslennikov, O.V., C.N. Kontorshchikova, and I.A. GRIBKOVA, *Ozone therapy in Practice*. Health Manual. Nizhny Novgorod, Russia. 42p, 2008.

22. Viebahn-Hänsler, R., O.S. León Fernández, and Z. Fahmy, *Ozone in Medicine: The Low-Dose Ozone Concept—Guidelines and Treatment Strategies*. Ozone: Science & Engineering, 2012. **34**(6): p. 408-424.
23. Bocci, V.A., I. Zanardi, and V. Travagli, *Ozone acting on human blood yields a hormetic dose-response relationship*. J Transl Med, 2011. **9**: p. 66.
24. Shinriki, N., et al., *Susceptibilities of plasma antioxidants and erythrocyte constituents to low levels of ozone*. Haematologia (Budap), 1998. **29**(3): p. 229-39.
25. Bocci, V., C. Aldinucci, and L. Bianchi, *The use of hydrogen peroxide as a medical drug*. Rivista Italiana di Ossigeno-Ozonoterapia, 2005. **4**: p. 30-39.
26. Giunta, R., et al., *Ozonized autohemotransfusion improves hemorheological parameters and oxygen delivery to tissues in patients with peripheral occlusive arterial disease*. Ann Hematol, 2001. **80**(12): p. 745-8.
27. Inal, M., et al., *The effects of ozone therapy and coenzyme Q(1)(0) combination on oxidative stress markers in healthy subjects*. Ir J Med Sci, 2011. **180**(3): p. 703-7.
28. Setyo Budi, D., et al., *Ozone as an adjuvant therapy for COVID-19: A systematic review and meta-analysis*. Int Immunopharmacol, 2022. **110**: p. 109014.
29. Cattel, F., et al., *Ozone therapy in COVID-19: A narrative review*. Virus Res, 2021. **291**: p. 198207.
30. Izadi, M., et al., *Ozone therapy for the treatment of COVID-19 pneumonia: A scoping review*. Int Immunopharmacol, 2021. **92**: p. 107307.
31. Hernandez, A., et al., *Potential Role of Oxygen-Ozone Therapy in Treatment of COVID-19 Pneumonia*. Am J Case Rep, 2020. **21**: p. e925849.
32. Skorup, P., et al., *Evaluation of an extracorporeal ozone-based bactericide system for the treatment of Escherichia coli sepsis*. Intensive Care Med Exp, 2022. **10**(1): p. 14.
33. Souza, Y.M., et al., *Evaluation of the effects of ozone therapy in the treatment of intra-abdominal infection in rats*. Clinics (Sao Paulo), 2010. **65**(2): p. 195-202.
34. Gracer, R.I. and V. Bocci, *Can the combination of localized "proliferative therapy" with "minor ozonated autohemotherapy" restore the natural healing process?* Med Hypotheses, 2005. **65**(4): p. 752-9.
35. Rilling, D., *The Basic Clinical Applications of Ozone Therapy*. Ozone Science & Engineering Vol. 7, 2008. **No. 4**: p. 259-274.
36. Raeissadat, S.A., et al., *Intra-articular ozone or hyaluronic acid injection: Which one is superior in patients with knee osteoarthritis? A 6-month randomized clinical trial*. J Pain Res, 2018. **11**: p. 111-117.
37. Al-Jaziri, A.A. and S.M. Mahmoodi, *Painkilling effect of ozone-oxygen injection on spine and joint osteoarthritis*. Saudi Med J, 2008. **29**(4): p. 553-7.
38. Buric, J., L. Rigobello, and D. Hooper, *Five and ten year follow-up on intradiscal ozone injection for disc herniation*. Int J Spine Surg, 2014. **8**.
39. Soltés, L., et al., *Degradative action of reactive oxygen species on hyaluronan*. Biomacromolecules, 2006. **7**(3): p. 659-68.
40. Lehnert, T., et al., *Analysis of disk volume before and after CT-guided intradiscal and periganglionic ozone-oxygen injection for the treatment of lumbar disk herniation*. J Vasc Interv Radiol, 2012. **23**(11): p. 1430-6.
41. Borrelli, E., et al., *Disc Herniation and Knee Arthritis as Chronic Oxidative Stress Diseases: The Therapeutic Role of Oxygen Ozone Therapy*. Journal of Arthritis, 2015. **4**: p. 1-6.
42. Bocci, V., *Oxygen-ozone therapy a critical evaluation*. 2002, London: Kluwer.
43. KUTLUBAY Z, E.B., SERDAROĞLU S, TÜZÜN Y., *Dermatolojide Ozon Tedavisi*. Dermatoz, 2010. **1**.

44. R. G, S.M., D. Singla, and A. Singh, *Ozone Revisited*. Journal of Advanced Oral Research, 2015. **6**(2): p. 5-9.
45. Sagai, M. and V. Bocci, *Mechanisms of Action Involved in Ozone Therapy: Is healing induced via a mild oxidative stress?* Med Gas Res, 2011. **1**: p. 29.
46. Fitzpatrick, E., O.J. Holland, and J.J. Vanderlelie, *Ozone therapy for the treatment of chronic wounds: A systematic review*. Int Wound J, 2018. **15**(4): p. 633-644.
47. de Sire, A., et al., *Oxygen-Ozone Therapy in the Rehabilitation Field: State of the Art on Mechanisms of Action, Safety and Effectiveness in Patients with Musculoskeletal Disorders*. Biomolecules, 2021. **11**(3).
48. Mustafa, M.G., *Biochemical basis of ozone toxicity*. Free Radic Biol Med, 1990. **9**(3): p. 245-65.
49. Wang, G., et al., *The effect of ozone exposure on the ability of human surfactant protein a variants to stimulate cytokine production*. Environ Health Perspect, 2002. **110**(1): p. 79-84.
50. Last, J.A., et al., *Systemic responses to inhaled ozone in mice: cachexia and down-regulation of liver xenobiotic metabolizing genes*. Toxicol Appl Pharmacol, 2005. **208**(2): p. 117-26.
51. Bocci, V., *Is it true that ozone is always toxic? The end of a dogma*. Toxicol Appl Pharmacol, 2006. **216**(3): p. 493-504.
52. Mehlman, M.A. and C. Borek, *Toxicity and biochemical mechanisms of ozone*. Environ Res, 1987. **42**(1): p. 36-53.
53. Schwartz, A., G.M. Sánchez, and F. Sabah, *Madrid declaration on ozone therapy*. ISCO3, 2010.
54. Copley, A.L., *Fluid mechanics and biorheology*. Biorheology, 1990. **27**(1): p. 3-19.
55. Sinan Mukaddes, E.N.Z., *Hemoreoloji ve Patofizyolojik Önemi*. 1, 2023.
56. Baskurt, O.K. and H.J. Meiselman, *Blood rheology and hemodynamics*. Semin Thromb Hemost, 2003. **29**(5): p. 435-50.
57. Matrai A, W.R., Skalak R, *Biophysics*, in *Clinical Hemorheology*, D.J. Chien S, Ernst E, Matrai A, Editor. 1987, Martinus Nijhoff: Dordecht. p. 9-71.
58. Thurston, G.B., *Viscoelasticity of human blood*. Biophys J, 1972. **12**(9): p. 1205-17.
59. Merrill, E.W., *Rheology of blood*. Physiol Rev, 1969. **49**(4): p. 863-88.
60. Lowe GDO, B.J., *Plasma and blood viscosity*, in *Clinical Blood Rheology*, L. GDO, Editor. 1988, CRC Press: Boca Raton, FL. p. 11-44.
61. Chien, S., *Biophysical Behavior of Red Cells in Suspensions*, in *Red Blood Cell*, S. DM, Editor. 1975, Academic Press: New York. p. 1031–1133.
62. GDO, L., *Rheology of paraproteinemias and leukemias*, in *Clinical Blood Rheology*, L. GDO, Editor. 1988, CRC Press: Boca Raton, FL. p. 67-88.
63. Somer, T. and H.J. Meiselman, *Disorders of blood viscosity*. Ann Med, 1993. **25**(1): p. 31-9.
64. Reinke, W., P. Gaehtgens, and P.C. Johnson, *Blood viscosity in small tubes: effect of shear rate, aggregation, and sedimentation*. Am J Physiol, 1987. **253**(3 Pt 2): p. H540-7.
65. Gaehtgens, P., *Flow of blood through narrow capillaries: rheological mechanisms determining capillary hematocrit and apparent viscosity*. Biorheology, 1980. **17**(1-2): p. 183-9.
66. Billett, H.H., *Hemoglobin and hematocrit*. Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations. 3rd edition, 1990.
67. Beris, A.N., et al., *Recent advances in blood rheology: a review*. Soft Matter, 2021. **17**(47): p. 10591-10613.

68. Cokelet, G.R., *Rheology and tube flow of blood*, in *Handbook of Engineering*, C.S. Skalak R, Editor. 1987, McGraw-Hill: New York. p. 14.1-14.17.
69. Stuart, J., *Erythrocyte rheology*. *J Clin Pathol*, 1985. **38**(9): p. 965-77.
70. Chien, S., *Red cell deformability and its relevance to blood flow*. *Annu Rev Physiol*, 1987. **49**: p. 177-92.
71. Wells, R. and H. Schmid-Schonbein, *Red cell deformation and fluidity of concentrated cell suspensions*. *J Appl Physiol*, 1969. **27**(2): p. 213-7.
72. Radosinska, J. and N. Vrbjar, *Erythrocyte Deformability and Na,K-ATPase Activity in Various Pathophysiological Situations and Their Protection by Selected Nutritional Antioxidants in Humans*. *Int J Mol Sci*, 2021. **22**(21).
73. Radosinska, J. and N. Vrbjar, *The role of red blood cell deformability and Na,K-ATPase function in selected risk factors of cardiovascular diseases in humans: focus on hypertension, diabetes mellitus and hypercholesterolemia*. *Physiol Res*, 2016. **65 Suppl 1**: p. S43-54.
74. Mohandas, N., J.A. Chasis, and S.B. Shohet, *The influence of membrane skeleton on red cell deformability, membrane material properties, and shape*. *Semin Hematol*, 1983. **20**(3): p. 225-42.
75. Kayar, E., et al., *Red blood cell rheological alterations in a rat model of ischemia-reperfusion injury*. *Biorheology*, 2001. **38**(5-6): p. 405-14.
76. Lazari, D., et al., *The Relationship Between Aggregation and Deformability of Red Blood Cells in Health and Disease*. *Front Physiol*, 2020. **11**: p. 288.
77. Alaarg, A., et al., *Red blood cell vesiculation in hereditary hemolytic anemia*. *Front Physiol*, 2013. **4**: p. 365.
78. Narla, J. and N. Mohandas, *Red cell membrane disorders*. *Int J Lab Hematol*, 2017. **39 Suppl 1**: p. 47-52.
79. Baskurt, O.K., et al., *New guidelines for hemorheological laboratory techniques*. *Clin Hemorheol Microcirc*, 2009. **42**(2): p. 75-97.
80. Baskurt, O.K. and H.J. Meiselman, *Data reduction methods for ektacytometry in clinical hemorheology*. *Clin Hemorheol Microcirc*, 2013. **54**(1): p. 99-107.
81. Wagner, C., P. Steffen, and S. Svetina, *Aggregation of red blood cells: From rouleaux to clot formation*. *Comptes Rendus Physique*, 2013. **14**(6): p. 459-469.
82. Brooks, D.E., *The effect of neutral polymers on the electrokinetic potential of cells and other charged particles: IV. Electrostatic effects in dextran-mediated cellular interactions*. *Journal of Colloid and Interface Science*, 1973. **43**(3): p. 714-726.
83. Baskurt, O.K. and H.J. Meiselman, *Erythrocyte aggregation: basic aspects and clinical importance*. *Clin Hemorheol Microcirc*, 2013. **53**(1-2): p. 23-37.
84. Rampling, M.W., *Red Cell Aggregation and Yield Stress*, in *Clinical Blood Rheology*, G.D.O. Lowe, Editor. 1988, CRC Press Inc.: Florida. p. 45-64.
85. Ami, R.B., et al., *Parameters of red blood cell aggregation as correlates of the inflammatory state*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2001. **280**(5): p. H1982-8.
86. Ajmani, R.S., *Hypertension and hemorheology*. *Clin Hemorheol Microcirc*, 1997. **17**(6): p. 397-420.
87. Leschke, M., et al., *Blood rheology in hypertension and hypertensive heart disease*. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1987. **10 Suppl 6**: p. S103-10.
88. Cicco, G. and A. Pirrelli, *Red blood cell (RBC) deformability, RBC aggregability and tissue oxygenation in hypertension*. *Clin Hemorheol Microcirc*, 1999. **21**(3-4): p. 169-77.
89. Bauersachs, R.M., et al., *Red blood cell aggregation and blood viscoelasticity in poorly controlled Type 2 diabetes mellitus*. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 1989. **9**: p. 935-952.

90. Zilberman-Kravits, D., et al., *Increased red cell aggregation is correlated with HbA1C and lipid levels in type 1 but not type 2 diabetes*. Clin Hemorheol Microcirc, 2006. **35**(4): p. 463-71.
91. Aloulou, I., et al., *Hemorheologic effects of low intensity endurance training in sedentary patients suffering from the metabolic syndrome*. Clin Hemorheol Microcirc, 2006. **35**(1-2): p. 333-9.
92. Toker, S., et al., *Association of components of the metabolic syndrome with the appearance of aggregated red blood cells in the peripheral blood. An unfavorable hemorheological finding*. Diabetes Metab Res Rev, 2005. **21**(2): p. 197-202.
93. Vayá, A., et al., *Association between hemorheological alterations and metabolic syndrome*. Clin Hemorheol Microcirc, 2011. **49**(1-4): p. 493-503.
94. Chen, S., et al., *Enhanced aggregability of red blood cells of beta-thalassemia major patients*. Am J Physiol, 1996. **270**(6 Pt 2): p. H1951-6.
95. Waltz, X., et al., *Delayed beneficial effect of acute exercise on red blood cell aggregate strength in patients with sickle cell anemia*. Clin Hemorheol Microcirc, 2012. **52**(1): p. 15-26.
96. Spengler, M.I., et al., *Erythrocyte aggregation in patients with systemic lupus erythematosus*. Clin Hemorheol Microcirc, 2011. **47**(4): p. 279-85.
97. Vayá, A., et al., *Rheological alterations and thrombotic events in patients with systemic lupus erythematosus*. Clin Hemorheol Microcirc, 2012. **51**(1): p. 51-8.
98. Baysan, A., R.A. Whiley, and E. Lynch, *Antimicrobial effect of a novel ozone-generating device on micro-organisms associated with primary root carious lesions in vitro*. Caries Res, 2000. **34**(6): p. 498-501.
99. Garber, G.E., et al., *The use of ozone-treated blood in the therapy of HIV infection and immune disease: a pilot study of safety and efficacy*. AIDS, 1991. **5**(8): p. 981-4.
100. Gulmen, S., et al., *Ozone therapy as an adjunct to vancomycin enhances bacterial elimination in methicillin resistant Staphylococcus aureus mediastinitis*. J Surg Res, 2013. **185**(1): p. 64-9.
101. de Monte, A., H. van der Zee, and V. Bocci, *Major ozonated autohemotherapy in chronic limb ischemia with ulcerations*. J Altern Complement Med, 2005. **11**(2): p. 363-7.
102. V., B., *OZONE. A New Medical Drug*. 2005, Dordrecht, The Netherlands: Springer.
103. Liu, X., et al., *The association between ozone and ischemic stroke morbidity among patients with type 2 diabetes in Beijing, China*. Science of The Total Environment, 2022. **818**: p. 151733.
104. Wainstein, J., et al., *Efficacy of ozone-oxygen therapy for the treatment of diabetic foot ulcers*. Diabetes Technol Ther, 2011. **13**(12): p. 1255-60.
105. Gerçek Irban, A., et al., *The effect of ozone therapy on experimental bone fracture healing in rats [abstract]*. Journal of Ozone Therapy, 2019. **3**.
106. Tikhomirova, I.A., A.O. Oslyakova, and S.G. Mikhailova, *Microcirculation and blood rheology in patients with cerebrovascular disorders*. Clinical Hemorheology and Microcirculation, 2011. **49**: p. 295-305.
107. Moon, J.S., et al., *Impaired RBC deformability is associated with diabetic retinopathy in patients with type 2 diabetes*. Diabetes & Metabolism, 2016. **42**(6): p. 448-452.
108. Izadi, M., et al., *Efficacy of ozone therapy on visual evoked potentials in diabetic patients*. Diabetol Metab Syndr, 2023. **15**(1): p. 140.
109. Kesmarky, G., et al., *Plasma viscosity: a forgotten variable*. Clin Hemorheol Microcirc, 2008. **39**(1-4): p. 243-6.
110. Tartari, A.P.S., et al., *Anti-inflammatory Effect of Ozone Therapy in an Experimental Model of Rheumatoid Arthritis*. Inflammation, 2020. **43**(3): p. 985-993.

