



T.C.

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ

KALP VE DAMAR CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

**RATLARDA DENEYSEL ALT EKSTREMİTE
İSKEMİ -REPERFÜZYON MODELİNDE OZON TEDAVİSİNİN
ANTİOKSİDAN ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

Uzmanlık Tezi

Dr. Zuhall TORLAK

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Ufuk ALPAGUT

İSTANBUL 2014

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

RATLARDA DENEYSEL ALT EKSTREMİTE İSKEMİ -REPERFÜZYON
MODELİNDE OZON TEDAVİSİNİN ANTİOKSİDAN ETKİNLİĞİNİN
ARAŞTIRILMASI

UZMANLIK TEZİ

Dr. Zuhall TORLAK

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Ufuk Alpagut

İSTANBUL
Haziran-2014

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince her türlü konuda, her zaman asistanlarının ve tüm öğrencilerin yanında olan ve yardımını hiçbir zaman esirgemeyen kendisinden çok şey öğrendiğimiz Kalp ve Damar Cerrahisi ABD Başkanı Prof. Dr. Enver DAYIOĞLU'na,

Tez Danışmanım Prof. Dr. Ufuk Alpagut'a ,

Tez çalışması sırasında yardımlarını esirgemeyen Doç.Dr.Onur Göksel'e,

Prof. Dr. EminTireli, Prof. Dr.Türkan Tansel, Uzm. Dr. Ömer Ali Sayın ve Uzm. Dr. Murat Uğurlucan'a,

Tez çalışmamın uygulaması ve yazımı aşamasında değerli yardımlarından dolayı biyokimya ABD öğretim üyesi Canan Başaran Küçükgergin ve Prof.Dr. Şule Seckin'e

Yardımlarını ve dostluğunu esirgemeyen Uzm. Dr. Burçe GÖKTAŞ'a,

Uzmanlık eğitimim süresince benimle birlikte çalışan araştırma görevlisi meslektaşlarıma ve Kalp ve Damar Cerrahisi kliniği tüm çalışanlarına,

Sevgilerimi, Saygılarımı ve Tesekkürlerimi sunarım.

Dr. Zuhel TORLAK

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR

İÇİNDEKİLER

TABLolar LİSTESİ

ŞEKİLLER VE RESİMLER LİSTESİ

KISALTMALAR LİSTESİ

ÖZET

ABSTRACT

1.GİRİŞ VE AMAÇ

2.GENEL BİLGİLER

2.1.İskemi

2.2.Reperfüzyon

2.3.Serbest Radikaller

2.4.Polimorf Nüveli Lökositler

2.5.Kompleman Sistemi

2.6.Endotel Hücresinin Rolü

2.7.Antioksidanlar

2.7.1.Endojen antioksidanlar

2.7.1.1.Enzim olan endojen antioksidanlar

2.7.1.2.Enzim olmayan endojen antioksidanlar

2.7.2.Ekzojen antioksidanlar

2.7.2.1. Vitamin eksojen antioksidanlar

2.7.2.2. İlaç olarak kullanılan eksojen antioksidanlar

2.8. İskelet Kası İskemi-reperfüzyon hasarının etkileri

2.9. Alt Ekstremitte İskemi-Reperfüzyon hasarına Bağlı Gelişen Uzak Organ Hasarı

2.10. Ozon

2.10.1. Etki Mekanizması

2.10.2. Ozon'un öne sürülen etki mekanizmaları

2.10.3. Endikasyonlar

2.10.4. Doz

2.10.5. Uygulama yöntemleri

2.10.6. Yan Etki Ve Kontrendikasyonları

2.10.7. Ozonun iskemi –reperfüzyon hasarına etkisi

3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1.Deney Hayvanları

3.2. Anestezi

3.3. Cerrahi Prosedür

3.3.1.Turnike yöntemi ve iskemi –reperfüzyon modeli

3.3.2. Ozon hazırlama

3.4. Deney Grupları

3.5. Biyokimyasal işlemler

3.5.1. Kullanılan aletler

3.5.2. Kullanılan Kimyasal Malzemeler

3.5.3. Serumda Yapılan İncelemeler

3.5.4. Karaciğer, Kalp, Akciğer, Böbrek ve Kalp dokularında yapılan incelemeler

3.5.5. Doku homojenatlarının hazırlanması ve postmitokondri fraksiyonlarının eldesi

3.5.6. Malondialdehit düzeylerinin ölçülmesi

3.5.7. Glutasyon düzeylerinin ölçülmesi

3.5.8. Total SH düzeylerinin ölçülmesi

3.5.9. Süperoksit dismutaz aktivitesinin ölçülmesi

3.5.10. Glutasyon peroksidaz aktivitesinin ölçülmesi

3.5.11. Miyeloperoksidaz aktivitesinin ölçülmesi

3.5.12. Katalaz aktivitesinin ölçülmesi

3.5.13. Protein tayini

3.6. İstatiksel Analiz

4.BULGULAR

4.1.Biyokimyasal Bulgular

4.1.1. Serum değerleri biyokimyasal değerlendirme sonuçları

4.2. Doku grupları Biyokimyasal değerlendirme sonuçları

5.TARTIŞMA

6.SONUÇ

KAYNAKLAR

ETİK KURUL ONAY EK-1

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 3-1. Total –SH düzeyi ölçüm işlemi

Tablo 4-1. Kontrol grubu serum biyokimyasal değerlendirme sonuçları

Tablo 4-2. İR+SF grubu serum biyokimyasal sonuçları

Tablo 4-3. Ozon grubu Serum biyokimyasal sonuçları

Tablo 4-4. Kontrol, İskemi-Reperfüzyon+SF, Ozon tedavisi yapılan sıçanlarda serum MDA ve total-SH düzeyleri ve süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz, Katalaz aktiviteleri (ortalama $\pm$ SD).

Tablo 4-5. Kontrol grubu KC dokusu biyokimyasal değerlendirme sonuçları

Tablo 4-6. Kontrol Grubu miyokard dokusu biyokimyasal değerlendirme sonuçları

Tablo 4-7. Kontrol Grubu akciğer dokusu biyokimyasal değerlendirme sonuçları

Tablo 4-8. Kontrol grubu böbrek dokusu biyokimyasal değerlendirme sonuçları

Tablo 4-9. Kontrol grubu kas dokusu biyokimyasal değerlendirme sonuçları

Tablo 4-10. İ/R + SF grubu KC dokusu biyokimyasal değerlendirme sonuçları

Tablo 4-11. İ/R + SF grubu miyokard dokusu biyokimyasal değerlendirme sonuçları

Tablo 4-12. İ/R+SF grubu akciğer dokusu biyokimyasal değerlendirme sonuçları

Tablo 4-13. İ/R +SF grubu böbrek dokusu biyokimyasal değerlendirme sonuçları

Tablo 4-14. İ/R +SF grubu kas dokusu biyokimyasal değerlendirme sonuçları

Tablo 4-15. Ozon grubu KC dokusu biyokimyasal değerlendirme sonuçları

Tablo 4-16. Ozon grubu miyokard dokusu biyokimyasal değerlendirme sonuçları

Tablo 4-17. Ozon grubu akciğer dokusu biyokimyasal değerlendirme sonuçları

Tablo 4-18. Ozon grubu böbrek dokusu biyokimyasal değerlendirme sonuçları

Tablo 4-19. Ozon grubu kas dokusu biyokimyasal değerlendirme sonuçları

Tablo 4-20. Kontrol, iskemi-reperfüzyon, Ozon tedavisi yapılan sıçanlarda karaciğer, kalp, akciğer, böbrek, kas dokularında süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz, katalaz, miyeloperoksidaz aktiviteleri (ortalama $\pm$ SD).

Tablo 4-21. Kontrol, iskemi-reperfüzyon, ozon tedavisi yapılan sıçanlarda karaciğer, kalp, akciğer, böbrek, kas dokularında malondialdehit ve glutatyon düzeyleri (ortalama $\pm$ SD).

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. Hücre zedelenmesinde sitoplazmik kalsiyum artışının kaynakları ve sonuçları.

(21)

Şekil 2.2. İskemi-Reperfüzyon Sürecinde Serbest Oksijen Radikallerinin Oluşumu

Şekil 2.3. Ozonun eritrosit hcrelerindeki etkisi

Şekil 2.4. Medikal Ozon uygulaması sonrası ortaya çıkan temel biyolojik etkiler (69).

Şekil 4-1. MDA'nın ($\mu\text{mol/L}$) gruplar arası değerlerinin grafiksel analizi

Şekil 4-2. Total -SH ($\mu\text{M/L}$), SOD (U/ml), Glutasyon peroksidaz (nmol/dak/ml), Katalaz enziminin ($\mu\text{mol/ml}$) plazma değerlerinin gruplar arası grafiksel analizi

Şekil 4-3. SOD (U/ml) düzeyinin KC, Kalp, Akc, Böbrek, Kas dokularında gruplar arası değerlerinin grafiksel analizi

Şekil 4-4. Glutasyon peroksidaz (nmol/dak/mg protein) düzeyinin KC, Kalp, Akc, Böbrek, Kas dokularında gruplar arası değerlerinin grafiksel analizi

Şekil 4-5. Katalaz ($\mu\text{mol/dak/mg}$ protein) düzeyinin KC, Kalp, Akc, Böbrek, Kas dokularında gruplar arası değerlerinin grafiksel analizi

Şekil 4-6. MPO ($\mu\text{mol/dak/mg}$ protein) düzeyinin KC, Kalp, Akc, Böbrek, Kas dokularında gruplar arası değerlerinin grafiksel analizi

Şekil 4-7. MDA (nmol/mgprotein) düzeyinin KC, Kalp, Akc, Böbrek, Kas dokularında gruplar arası değerlerinin grafiksel analizi

Şekil 4-8. Glutasyon (nmol/mgprotein) düzeyinin KC, Kalp, Akc, Böbrek, Kas dokularında gruplar arası değerlerinin grafiksel analizi

RESİMLER LİSTESİ

Resim 3-1. İntraperitoneal anestezi uygulanması

Resim 3-2. Alt ekstremiteye turnike uygulanan rat

Resim 3-3. Turnike uygulanan ekstremita ile uygulanmayan ekstremita arasındaki fark

Resim 3-4. İntraperitoneal ozon uygulanması

Resim 3-5. Ozon Jenaratörü

Resim 3-6. Ozon Jenaratör monitörü

Resim 3-7. Ozona dayanıklı, silikonlanmış tek kullanımlık polipropilen enjektör

Resim 3-8. Ozona dayanıklı bakteri filtreleri

SİMGELER VE KISALTMALAR

ATP	:Adenozin trifosfat
Ca ⁺⁺	: Kalsiyum
CO ₂	: Karbondioksit
GSH-R	:Glutasyon Redüktaz
GSH-Px	: Glutasyon Peroksidaz
GSH	: Glutasyon
GST	: Glutasyon-S-Transferaz
GSSG	: Okside Glutasyon
GM-CSF	:Granülosit-makrofaj Koloni-Stimulan faktör
H ₂ O ₂	: Hidrojen Peroksit
HT	: Otohemoterapi
HOCL	: Hipoklorik Asit
I/R	: İskemi – Reperfüzyon
IP	: İntraperitoneal
IL	:İnterlökin
KAT	: Katalaz
KC	: Karaciğer
KCL	: Potasyum Klorür
MDA	: Malondialdehit
MODS	: Multiple Organ Disfonksiyonu
MPO	: Miyeloperoksidaz
Na ⁺	: Sodyum

NAD	: Nikotinamid adenine dinükleotid
NADPH	: Nikotinamid adenine dinükleotid fosfat
NO	: Nitrik Oksit
N ₂ O ₂	: Nitrojen Dioksit
OH ⁻	: Hidroksil Radikali
O ₂	: Oksijen molekülü
O ₂ ⁻	: Süperoksit Radikali
O ₃	: Ozon
PMNL	: Polimorf Nüveli Lökositler
PG	: Prostaglandin
PAF	: Trombosit Aktive edici Faktör
SF	: Serum Fizyolojik
SIRS	: Sistemik inflamatuvar yanıt sendromu
SOD	: Superoksit Dismutaz
SR	: Serbest Radikal
SH	: Sülfidril
SOR	: Serbest Oksijen Radikali
Total-SH	: Total Sülfidril
Tx	: Tromboksan
TNF	: Tümör Nekrozis faktör
UV	: Ultraviole

ÖZET

RATLARDA DENEYSEL ALT EKSTREMİTE İSKEMİ -REPERFÜZYON

MODELİNDE OZON TEDAVİSİNİN ANTİOKSİDAN

ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

Amaç: Bu çalışmanın amacı, ratlarda deneysel olarak oluşturulan alt ekstremitte iskemi reperfüzyon hasarının lokal ve sistemik etkileri üzerine ozon tedavisinin antioksidan etkinliğini araştırmaktır.

Materyal ve Metod: Ağırlıkları 200-300 gram arasında değişen, toplam 24 adet Sprague-Dawley cinsi rat, eşit sayıda ($n = 8$) ve rastgele olarak 3 deney grubuna ayrıldı. Kontrol grubunda sadece anestezi uygulandı. İskemi-reperfüzyon (İR+SF) ve ozon gruplarında sağ alt ekstremitteye turnike ile 4 saat iskemi ve 2 saat reperfüzyon uygulandı. Ozon grubunda turnikenin açılmasıyla birlikte reperfüzyon sırasında 0.5mg\ kg ozon\ oksijen karışımı İP olarak uygulandı. İ/R +SF ve ozon gruplarında reperfüzyon döneminin sonunda, kontrol grubunda ise aynı süre tamamlandıktan sonra, tüm ratlardan intrakardiyak 4-5cc kan, akciğer, sağ gastroknemius kası, karaciğer, kalp, böbrek doku örnekleri alınarak sakrifiye edildi. Doku gruplarında biyokimyasal yöntemlerle malondialdehit (MDA), redükte glutatyon (GSH) düzeyleri ve süperoksit Dismutaz (SOD), katalaz (KAT), miyeloperoksidaz (MPO), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) aktivitesi çalışıldı. Serum da ise MDA, total sülfidril (total -SH) düzeyleri ve SOD, KAT, GSH- Px aktivitesi ölçüldü.

Bulgular: İR+SF grubunda plazma ve doku gruplarında MDA düzeyi kontrol grubundaki değerlere göre anlamlı artmış olarak bulundu ($p<0.05$). Ozon grubunda ise MDA düzeyi plazma ve böbrek dokusu hariç diğer dokularda İR+SF grubuna göre anlamlı azaldığı ($p<0.05$) tespit edildi. Doku grupları SOD aktivitesi değerlendirilmesinde İR+SF grubuna göre ozon grubunda anlamlı azalma ($p<0.05$) tespit edildi. Doku grupları KAT enzim aktivitesinde kontrol, İR+SF ve ozon grupları arasında anlamlı fark tespit edilemedi ($p>0.05$). KC, kalp, böbrek ve gastroknemius kas dokusunun ozon grubunda glutatyon düzeyi İR+SF grubuna göre anlamlı artmış olduğu ($p<0.05$) saptandı. KC ve gastroknemius kas dokusunun ozon grubunda MPO düzeyi İR+SF grubuna göre anlamlı

azaldığı ($p<0.05$) tespit edildi. GSH-Px aktivitesi , KC ve kalp dokularının ozon grubunda İR+SF grubuna göre anlamlı arttığı ($p<0.05$) saptandı.

Sonuç: Bu çalışmanın sonuçlarına dayanarak, alt ekstremitte iskemi reperfüzyon hasarına bağlı lokal ve sistemik etkilerin azaltılmasında ozon tedavisinin etkili olduğu düşünülmektedir. Ancak Ozon tedavisinin yararlı etkilerinin hangi mekanizmalar ile oluştuğu ve bu tedavinin etkin olması için uygun dozun ayarlanabilmesi için yeni deneysel ve klinik çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar kelimeler :İskemi reperfüzyon hasarı;ozon tedavisi;rat;antioksidan

ABSTRACT

ANTIOXIDANT EFFECT OF OZONE THERAPY ON EXPERIMENTAL LOWER EXTREMITY ISCHEMIA REPERFUSION INJURY IN RATS.

Objective

The aim of this study was to examine the antioxidant effect of ozone therapy on local and systemic effects in experimental rat model of ischemia-reperfusion injury on lower extremity.

Material-Method

24 Female Sprague-Dawley rats, averaging 200-250 gm, in weight were used in this study. The rats were divided randomly into three equal (n:8) groups. Anesthesia was performed in the control group. Two hours reperfusion was carried out after four hours of right lower extremity ischemia using an established tourniquet model of limb ischemia in ischemia-reperfusion+ serum physiologic solution group (IR+SF) and ozone group. 0.5 mg/kg ozone\oxygen mixture was given by intraperitoneally during reperfusion period in ozone group. At the end of the reperfusion period, all rats were sacrificed after blood and right gastrocnemius muscle, lung and liver, kidney and myokard tissue were harvested for biochemical examinations. Malondialdehit (MDA) and reduced glutathione (GSH) levels, myeloperoxidase (MPO), catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px) activities were studied with biochemical methods. The levels of MDA and total sulfhydryl, activities of GSH-Px, KAT, SOD were studied in serum.

Results

Plasma and tissue groups MDA levels were increased in IR+SF group as compared with control group ($p<0.05$). Liver, miyokard, lung and gastrocnemius muscle MDA levels were decreased in ozone group as compared with IR+SF group ($p<0.05$). Evaluation of the tissue activities of SOD in ozone group were significantly lower than the activities in IR+SF group ($p<0.05$). Tissue and plasma activities of CAT enzyme of control, IR+SF and ozone groups were compared, there was no found statistically

significant difference ($p>0.05$). Liver, miyokard, kidney, gastrocnemius muscle glutatyon levels of ozone group were increased significantly as compared with IR+SF group ($p>0.05$). Liver and gastrocnemius muscle MPO levels were decreased significantly in ozone group as compared with IR+SF group ($p<0.05$). The GSH-Px activity of liver and miyokard tissue in ozone group were significantly higher than the activities in IR+SF group ($p<0.05$).

Conclusion

The results of this study indicate that ozone therapy has protective effects on local and systemic damage of ischemia/reperfusion injury of lower extremity. Further experimental and clinical studies related to the mechanisms of action of ozone therapy are needed.

Key words: Ischemia-reperfusion injury; antioxidant; ozone; rats.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

İskelet kasındaki iskemi, akut ve kronik olmak üzere ikiye ayrılır, alt ekstremitte iskelet kası iskemisi; aort cerrahisinde abdominal aortaya geçişi süre kros-klemp uygulanması sonrasında, tek veya çift taraflı akut femoral arter tıkanıklıklarında, travmada, damar tıkanıklığı ve tromboembolik olaylarda görülür (1).

İskelet kasında, iskemi sonrası reperfüzyona maruz kalan dokuda erken dönemde lokal komplikasyonlar (massif ödem, kas nekrozu) ortaya çıkarken, ilerleyen saatlerde sistemik inflamatuvar yanıt ve uzak organ hasarı (akciğer,böbrek, karaciğer, kalp..vb) gibi sorunlar ortaya çıkabilir (2, 3, 4,5).

İskemi Reperfüzyon Hasarı (İRH) 'nın fizyopatolojisini anlamak için deneysel ve klinik çalışmalar yapılmış olup bu çalışmalarda, iskemi reperfüzyon hasarından korunma ve oluşan hasarı giderme amacıyla bir çok farmakolojik ajan ve yöntem denenmiştir (6,7,8).

Ozon, üç oksijen atomundan oluşan bir kimyasal bileşendir (triatomik oksijen). Normal atmosferik oksijenin çok enerji yüklü bir biçimidir. Klinikte Ozon tedavisi ; iskemi, enflamasyon ve infeksiyon tedavisinde terapotik bir ajan olarak başarıyla kullanılmaktadır. Özellikle böbrek ve karaciğerin IRH'nda koruyucu etkiyi indüklediği ve hasarlanmayı azalttığıyla ilgili çalışmalar bulunmaktadır (9,10,11). Ozon tedavisinin koruyucu etkinliği, ozonun güçlü antioksidan kapasitesinden kaynaklanmaktadır. Yapılan literatür araştırmalarında ozon tedavisinin alt ekstremitte İ/R modelinde, etkilenen iskelet kası ve uzak organlardaki antioksidan etkiliğinin araştırıldığı bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışma, ozon terapi tedavisinin böbrek ve karaciğerin İ/R hasarındaki koruyucu etkisini, alt ekstremitte İ/R modelinde de sergileyebileceği varsayımından yola çıkılarak planlanmıştır.

Bu çalışmadaki amacımız, ratlarda alt ekstremitteye turnike uygulanarak oluşturulan İ/R modelinde, intraperitoneal (İP) yolla 0.5 mg/ kg dozlarında verilen ozon tedavisinin İRH'nı önlemeye ya da azaltmaya yönelik etkisinin olup olmadığını değerlendirmektir. İRH' ını belirlemede, gastroknemius kası (Kas), böbrek, akciğer, kalp ve karaciğer dokuları, lipid peroksidasyonunun son ürünü olan malondialdehit (MDA) düzeyi , antioksidan mekanizmanın belirleyicisi olarak redükte glutatyon (GSH) düzeyi, katalaz (KAT), glutatyon peroksidaz (GSH-PX), Süperoksit Dismutaz (SOD), polimorfonukleer

lökosit birikiminin göstergesi olarak miyeloperoksidaz (MPO) aktivitesi ölçümü için çıkarıldı. Serum MDA düzeyi , KAT , GSH- PX, SOD aktivitesi , oksidatif stres ve oksidatif protein hasarının göstergesi olarak total sülfidril (total –SH) düzeyleri çalışıldı.

Ozon tedavisinin , alt extremitte iskemi reperfüzyon modelinde, iskelet kas dokusunda ve uzak organlarda oluşan değişikliklere olan etkisi henüz yeterince araştırılmamıştır. Ozon tedavisinin, alt ekstremitede ortaya çıkan İRH'ından koruyucu etkisi ortaya konulabilirse, abdominal aort anevrizma cerrahisi gibi infrarenal aortaya kros klempin uygulandığı girişimlerde, travma ve tromboembolik olaylarda reperfüzyon sonrası alt ekstremitede ve uzak organlarda meydana gelebilecek olumsuz etkilerin önlenmesinde, ozon tedavisinin bu etkisinden yararlanılabilir.

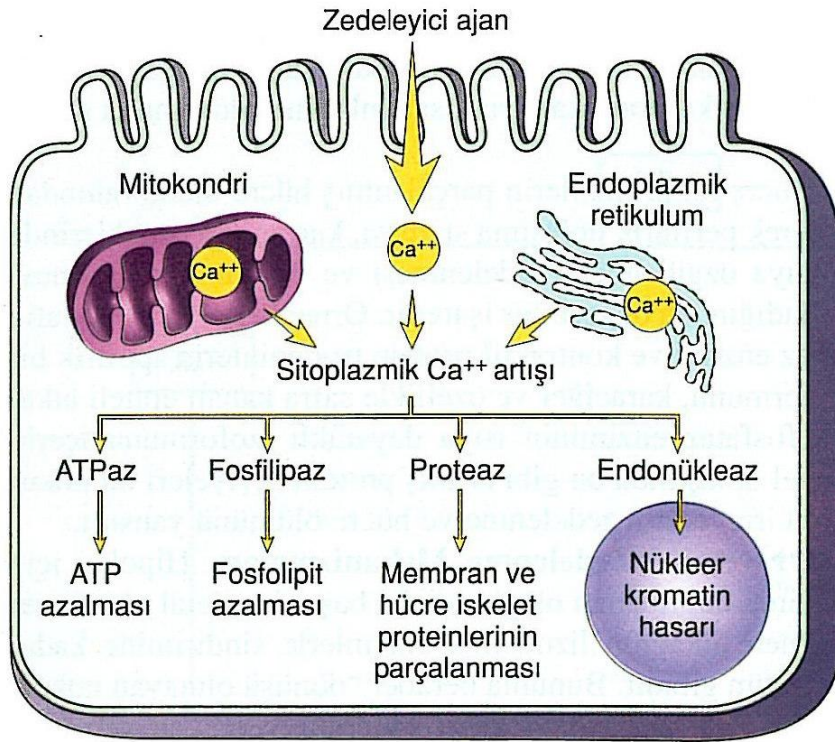
2. GENEL BİLGİLER

2.1. İskemi

Dokuya giden kan akımı azaldığı zaman, doku hücresel fonksiyonlarını sürdürebilmesi için gerekli olan maddelerden yoksun kalır ve oluşan artık metabolitleri de dokudan uzaklaştıramaz.

İskeminin erken fazında hücre içinde metabolik ve yapısal değişiklikler başlar, hücresel oksidatif fosforilasyon azalır, anaerobik metabolizma başlar, hızla birçok kimyasal mediyatör ve hücre hasarını içeren patofizyolojik olaylar kaskadı ortaya çıkar (12,13). Kısa surede glikojen depoları boşalır, adenosin trifosfat (ATP) tüketimi artar, laktat ve diğer toksik metabolitler birikmeye başlar. Hücre membran potansiyeli değişir, hücre içi kalsiyum/ sodyum (Ca^{++}/Na^{+}) oranı artar, hücre organizasyonu bozularak şişmeye başlar (14,15) (Şekil 1). Hücre içinde hipoksantin ve Ca^{++} seviyesi artarken ATP, fosfokreatin ve glutatyon seviyesi hızla düşer. Bu durum fosfolipaz A₂, proteazlar, serbest yağ asitleri, lizozimleri de içeren kimyasal mediyatörlerin ve enzimlerin oluşmasını tetikler. Hücre içi Ca^{++} artışı ile aktive olan fosfolipaz A₂, membran fosfolipitlerini lökotrien ve prostaglandin gibi inflamatuvar mediatörlerin prekürsörü olan araşidonik asite dönüştürür (6,16, 17,18,19, şekil 2-1).

Araşidonik asitten lipoksijenaz yollarıyla oluşan metabolitlerden özellikle lökotrienler, lökositlerin vasküler endotele yapışmasını hızlandırır ve reperfüzyon hasarının derecesini belirleyen postkapiller permeabiliteyi artırır. İskemi devam ederse lizozimler aracılığı ile hücre nekrozu ortaya çıkar (20).

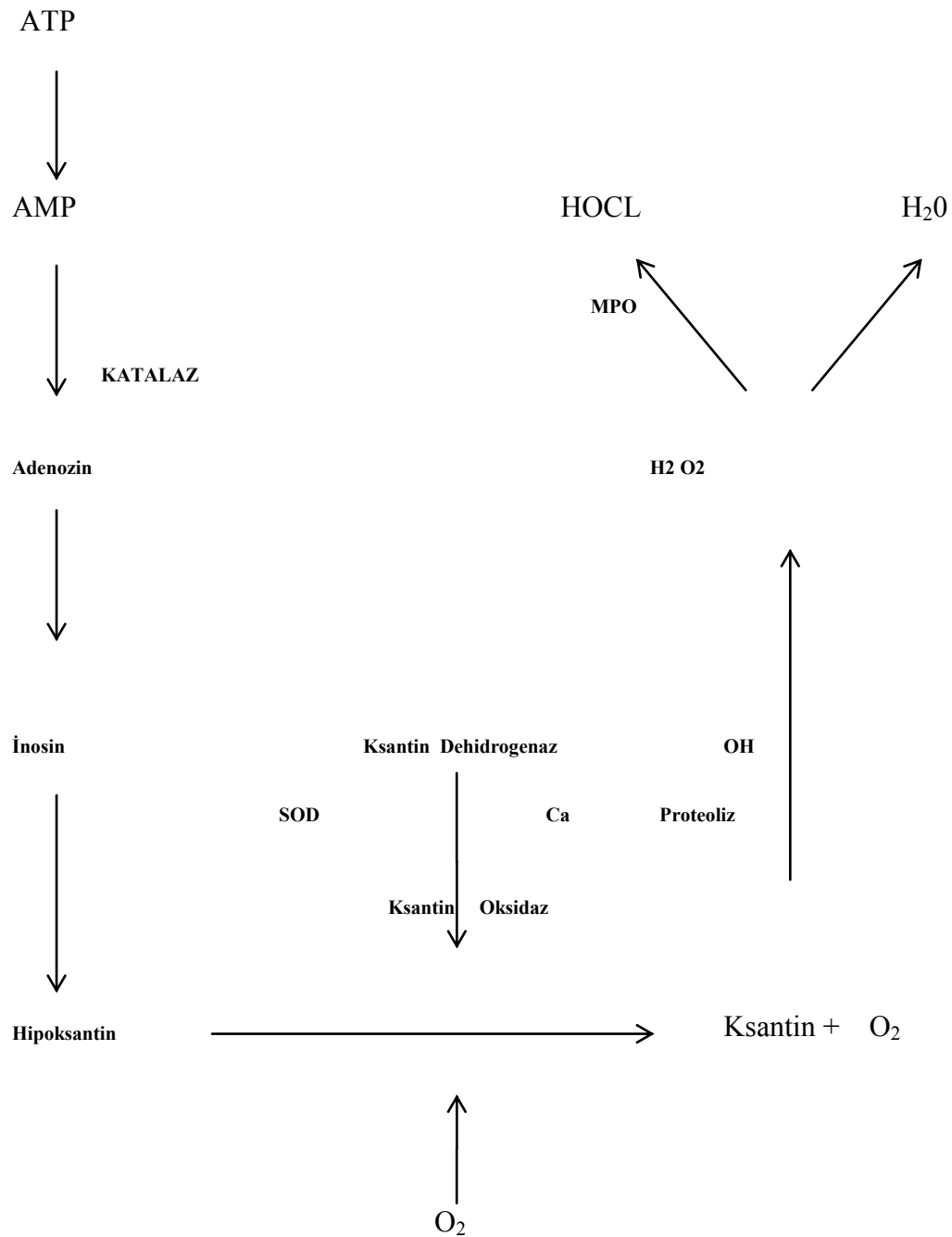


Şekil 2.1. Hücre zedelenmesinde sitoplazmik kalsiyum artışının kaynakları ve sonuçları.
(21)

2.2. Reperfüzyon

İskemik dokuya hem hücrenin rejenerasyonu, hem de toksik metabolitlerin temizlenmesi için yeniden kan akımının sağlanmasıdır. Ancak, iskemik dokunun reperfüzyonu dokuda paradoksal olarak sadece iskemi ile oluşan hasara göre çok daha ciddi bir hasara yol açar (22).

İskemi sonucu artmış ATP yıkımı dokuda ksantin ve hipoksantin gibi pürin metabolitlerinin birikimine ve Ksantin Dehidrogenazın ksantin oksidaza dönüşümüne yol açar. Normal şartlarda hipoksantin urik aside metabolize olur. İskemi sonrasında ise reperfüzyon ile dokuya gelen O_2 molekülünden bu reaksiyonlar sırasında serbest oksijen radikaller (SOR)' i superoksit ve hidrojen peroksit (O_2^- , H_2O_2) oluşur (Şekil 2-2). Reperfüzyon döneminde gözlenen hasarda hızla oluşan bu serbest oksijen radikal türevleri, Polimorf nüveli lökositler (PMNL), Kompleman Sistemi ve Endotel hücreleri rol oynamaktadır. Reperfüzyon hasarına en fazla duyarlı olan hücresel yapılar, zar lipidleri, proteinler, nükleik asitler ve deoksiribonükleik asit molekülleridir (23).



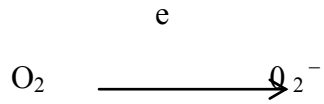
Şekil 2.2. İskemi-Reperfüzyon Sürecinde Serbest Oksijen Radikallerinin Oluşumu

2.3. Serbest Radikaller

Serbest radikal, eşlenmemiş elektron içeren atom veya moleküldür. Genelde elektronlar atom veya molekülde eşlenik olarak bulunmaları nedeniyle molekül stabildir ve reaktif değildir. Ancak, moleküle bir elektron ilavesi ya da bir elektron kaybı onu reaktif hale getirir (12).

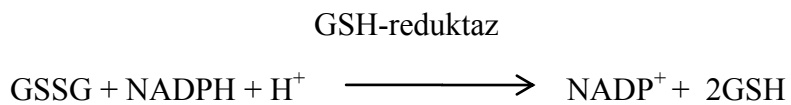
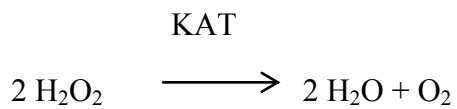
Organizma sürekli olarak serbest radikal ataklarıyla karşı karşıyadır. Atmosferin %21'ini teşkil eden oksijenin aerobik organizmanın yaşamı için gerekliliği kaçınılmazdır. Serbest radikaller fizyolojik şartlarda ve dış etkenlere karşı organizmanın savunmasında da belirli oranda oluşur ve içsel mekanizmalarla organizmaya olabilecek zararlı etkileri önlenir. Biyolojik sistemlerde oluşan serbest radikallerin endojen kaynakları oksijen, nitrik oksit (NO), uyarılmış nötrofil, mitokondriyal elektron transport sistemi, endoplazmik retikulum, peroksizom ve plazma membranı olarak sayılabilir. Solunan oksijenin % 95'inden fazlası mitokondrilerde ATP şeklinde enerji oluşumunda kullanılırken, yaklaşık %5 'i de son yörüngelerinde ortaklanmamış elektron içeren ve bu özellikleri nedeniyle de toksik serbest radikallere dönüşmektedir (19).

Süperoksit radikali, oksijen molekülüne bir elektron ilavesi ile oluşur ve serbest radikal hasarına karşı koruyucu antioksidan bir enzim olan ve oksidan hasar oluşumu ile birlikte artan *süperoksit dismutaz (SOD)* aracılığı ile hidrojen peroksit (H_2O_2)'e indirgenir. Hidrojen peroksit eşlenmemiş elektron içermediği için tek başına radikal değildir (24).

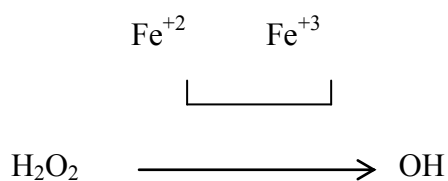


Hidrojen peroksitin hücre içinde metabolizması birkaç şekilde olabilir.

- H_2O_2 , *katalaz (KAT)* veya *glutatyon peroksidaz (GSH-Px)* tarafından toksik olmayan ürünlere dönüşür:



- H_2O_2 geçiş metallerinin varlığında toksik OH radikaline dönüşür:
Fenton reaksiyonu.

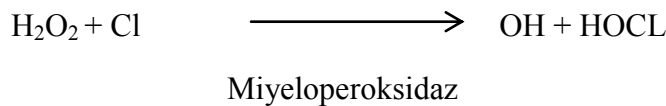


Hidroksil radikali (OH) oldukça reaktif ve toksik bir radikaldır; ilk karşılaştığı molekül ile 10-16 s içinde, 14 Å mesafesinde reaksiyona girer. Hidroksil radikali büyük molekül yapısı ve elektronegativitesi nedeni ile DNA, protein, karbonhidrat ve lipitler gibi makromoleküllerle reaksiyona girerek bu yapılarda oksidatif hasara neden olur. Makromoleküller hücrelerde kısıtlı miktarlarda bulunduklarından bu yapılarda oluşan hasar oldukça önemlidir. İn vivo herhangi bir OH radikal süpürücüsünün etkili olabilmesi için mevcut hedef moleküllerin önemli bir bölümünü kapsayacak kadar yüksek konsantrasyonda bulunması gerekir. Bu nedenle OH radikalının oluşumunun önlenmesi, bu radikalın süpürülmesinden daha etkilidir (25).

2.4. Polimorf nüveli lökositler (PMNL)

İskemi-reperfüzyon ile lökositlerin aktivasyonu gerçekleşir, kemotaksis oluşur ve endotel düzeyindeki patolojik değişiklikler ile membran permeabilitesi artar, bu da nötrofillerin infiltrasyonuna yol açar. Nötrofil infiltrasyonu İRH' nın patofizyolojisinde önemli bir rol oynar (26) .

Nötrofiller , serbest radikallerin oluşumunda ve İRH'da önemli bir kaynaktır, azurofilik granüllerinde oksidan etkili NADPH oksidaz, elastaz ve '*miyeloperoksidaz*' enzimlerini içerirler. Bu enzimler oksidan doku hasarında önemli roller üstlenir; aktive nötrofillerde ksantin-oksidad'ın artması ile SOR'un salınması “solunum patlaması” olayını meydana getirir. İskemi sonrası reperfüzyonun başlaması ile birlikte, dokuya sunulan oksijenin yaklaşık %70'i NADPH-bağımlı oksidaz ile süperoksit iyonlarına oksitlenmektedir. Süperoksit iyonu, çoğu kez spontan dismutasyonla hidrojen peroksit'e dönüşür. Hidrojen peroksit ise klorür iyonlarının varlığında *miyeloperoksidaz* enzimi aracılığı ile hipoklorik aside indirgenir. Hipoklorik asit (HOCL) güçlü bir oksidandır ve birçok biyolojik molekülle kolayca reaksiyona girebilir (17) .



Dokudaki nötrofil birikimi, dokunun miyeloperoksidaz (MPO) aktivitesi ölçülerek saptanabilmektedir. MPO enzimi, nötrofillerin sitozolik granüllerinden salınmaktadır ve indirekt olarak nötrofil birikimini yansıtmaktadır (27).

Nötrofillerin aktivasyonu ile nötrofil sekonder granüllerden salıverilen apolaktoferrin, plazminojen aktivatörü, komplemanı aktive eden enzim ve elastaz, kolajenaz, ve jelatinaz gibi proteolitik enzimler damar endotelinde hasara neden olmaktadır. Proteinazların etkisi ile damar duvarında yapının değişimi ve duvar yapısının gevşemesi ile nötrofillerin dokuya göçü kolaylaşır (17).

2.5. Kompleman Sistemi

İskemi reperfüzyon hasarında kompleman sisteminin rolü tam olarak açıklığa kavuşmamıştır. Reperfüzyon döneminde açığa çıkan SOR, kompleman sisteminin aktivasyonuna neden olur. Bu aktivasyon klasik yol, alternatif yol veya lektin yolu üzerinden olabilir (28). Kompleman sisteminin aktivasyonu sonunda proinflamatuvar komponentler oluşur. Bunlar C3a, C5a, C3b ve C5b-9'dur. C3a ve C5a anaflatoksinlerdir ve lökositleri aktive ederler. Kompleman komponentleri içinde özellikle anaflatoksinler (C3a ve C5a) ve membran atak kompleksi (C5b-9) reperfüzyon hasarında önemli rol oynar. Anaflatoksinler, sitokin sentezini uyararak inflamatuvar yanıtı daha da arttırmırlar. C5b-9 ve C3bi vasküler tonusu düzenleyerek iskemik dokuya kan akımını ve bu sayede lökosit-endotel adezyonunu artırır (28,29).

2.6. Endotel Hücresinin rolü

İ/R hasarının oluşmasında endotel hücreleri önemli role sahiptir. Oksidatif stres endotel hücrelerinin aktivasyonuna ve işlevlerinin bozulmasına neden olur. Endotel hücreleri SOR için potansiyel hedef konumundayken diğer taraftan da SOR üretim kaynağıdır (30) .

Endotel hücrelerinin oksidatif stresi sonucu kompleman aktive edilir; lökosit adhezyon moleküllerinin üretimi artar. SOR etkisi ile endotel hücreleri hasara yanıt olarak İL-1, PAF, prostaglandinler (PG I2, PG E2), GM-CSF, büyüme faktörleri, endotelin, NO ve tromboksan A2 (Tx A2) salgırlar. Aktive olan endotel hücreleri ek olarak kendi bazal membranlarını sindiren kollajenazlar salgılama yeteneğindedir (31).

2.7.Antioksidanlar

Organizmanın pro-oksidan/antioksidan dengesi sağlıklı bir yaşam sürdürebilmek için çok önemlidir. SOR'ların oluşumunu ve meydana getirdikleri hasarları önlemek ve detoksifikasyonu sağlamak üzere organizmayı koruyan “*antioksidan savunma sistemi*” dört yolla etki göstermektedir

2.7.1. Serbest oksijen radikallerini etkileyerek onları tutma, yok etme, “süpürücü etki”. Antioksidan enzimler, küçük moleküller bu yolla etki gösterirler.(19,32)

2.7.2. Serbest oksijen radikalleriyle etkileşip onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltma veya “inaktif şekle dönüştürücü etki”. Vitaminler, flavanoidler bu tarz bir etkiye sahiptirler. (33)

2.7.3. Serbest oksijen radikallerini bağlayarak zincirlerini kırıp fonksiyonlarını engelleyici etki zincir kırıcı etkidir. Hemogloblin, seruloplazmin ve mineraller “zincir kırıcı etki” gösterirler.(34)

2.7.4. Serbest radikallerin oluşturdukları hasarın onarılması şeklinde “onarıcı etki” gösterirler. (35)

Endojen kaynaklı veya eksojen kaynaklı olan antioksidanların tanımlanmasında ve etkinliklerinin ortaya konmasında İRH modelleri önemli katkı sağlamıştır. Antioksidan özelliği öne sürülmüş pek çok madde çeşitli İ/R modellerinde test edilerek değerlendirilmiştir

2.7.1. Endojen antioksidanlar

Enzim ve enzim olmayanlar olmak üzere iki sınıfa ayrılırlar.

2.7.1.1. Enzim olan endojen antioksidanlar: (36)

Süperoksit dismutaz (SOD), Glutasyon peroksidaz (GSH-Px), Glutasyon S-Transferaz (GST), Katalaz, Mitokondriyal sitokrom oksidaz sistemi, Hidroperoksidaz.

2.7.1.2. Enzim olmayan endojen antioksidanlar: (37)

Melatonin, Serüloplazmin, Transferin, Miyogloblin, Hemogloblin, Ferritin, Bilirubin, *Glutasyon, Sistein, Metiyonin, Ürat, Laktoferrin, Albumin*

2.7.2. Eksojen antioksidanlar

2.7.2.1. Vitamin eksojen antioksidanlar:

α -tokoferol (vitamin E), β -karoten, Askorbik asit (vitamin C), Folik asit (folat).

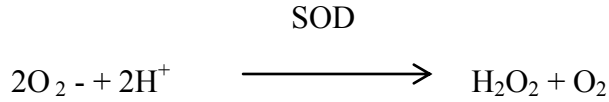
2.7.2.2. İlaç olarak kullanılan eksojen antioksidanlar: (38)

Ksantin oksidaz inhibitörleri (allopurinol, oksipurinol, pterin aldehit, tungsten), NADPH oksidaz inhibitörleri (adenozin, lokal anestezikler, kalsiyum kanal blokerleri, nonsteroid antiinflamatuvar ilaçlar), rekombinant süperoksit dismutaz trolox-C (vitamin E analogu), endojen antioksidan aktiviteyi artıranlar (GSH-Px aktivitesini artıran ebselen ve asetilsistein), nonenzimatik serbest radikal toplayıcılar (mannitol, albumin), demir redoks döngüsü inhibitörleri (desferroksamin) nötrofil adezyon inhibitörleri, sitokinler (TNF ve IL-1),

‘Ozon’

- **Süperoksit dismutaz (SOD)**

Süperoksit dismutaz (SOD) süperoksit serbest radikalının (O_2^-) hidrojen peroksit (H_2O_2) ve moleküler oksijene (O_2) dönüşümünü katalizleyen antioksidan enzimdir.



Normal metabolizma sırasında hücreler tarafından yüksek oranda O_2 üretilmesine rağmen hücre içi düzeyi SOD tarafında düşük tutulur. Ancak, H_2O_2 geçiş metalleri varlığında Fenton ve Haber- Weiss reaksiyonu ile son derece aktif OH radikaline dönüşmektedir. Bu durumda KAT ve GSH-Px enzimlerinin aktivitesi artarak H_2O_2 düzeylerini kontrol altına almaktadır (39).

- **Katalaz**

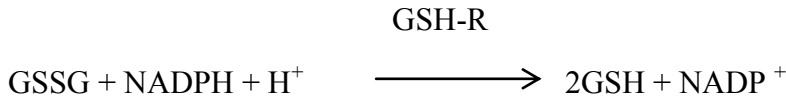
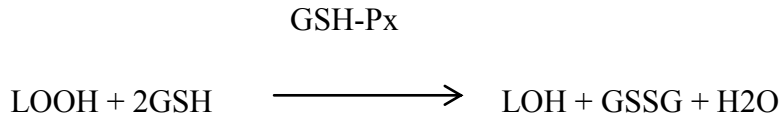
Katalaz esas olarak peroksizomlarda, daha az olarak sitozolde ve mikrozomal fraksiyonda bulunur. H_2O_2 'yi oksijen ve suya parçalar. Böylece H_2O_2 'nin OH oluşumunu önlemek için ortadan kalkmasını sağlar (39).



- **Glutasyon peroksidaz (GSH-Px) ve Glutasyon reduktaz (GSH-R)**

Gerek H_2O_2 ve gerekse LOOH 'leri metabolize etmektedir. Selenyum-bağımlı ve Selenyum-bağımsız iki farklı tipi vardır. Selenyum-bağımlı tipi H_2O_2 ve LOOH 'leri, Selenyum-bağımsız tipi sadece LOOH 'leri metabolize eder.

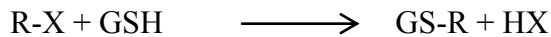
Bu reaksiyonlar esnasında GSH hidrojen verici olarak görev yaptığından H_2O_2 ve LOOH indirgenirken GSH ise okside şekline (GSSG) dönüşür. Okside Glutasyon ise NADPH bağımlı Glutasyon reduktaz (GSH-R) tarafından tekrar GSH'a indirgenir.



GSH-Px'in fagositik hücrelerde de önemli fonksiyonları vardır. Diğer antioksidanlarla birlikte GSH-Px, solunum patlaması sırasında serbest radikal etkisi ile fagositik hücrelerin zarar görmesini önler. GSH-Px eritrositlerde oksidatif strese karşı en etkili antioksidandır (37). Eritrosit GSH-Px aktivitesi yaşlılarda ve Down sendromlu hastalarda yüksek, prematürelerde düşük bulunmuştur. Lökosit GSH-Px aktivitesi ise yaşlılarda ve hipertansiyonlu hastalarda yüksek bulunmuştur. (40)

- **Glutasyon S-Transferaz (GST)**

Glutasyon S-transferaz dimerik yapıda olup sitozolde bulunmaktadır. Yabancı maddelerin biyotransformasyonunda rolleri olan GST'ler çeşitli endojen ve eksojen bileşiklerin GSH ile konjugasyonunu katalize eder (40).



- **Glutasyon (GSH)**

GSH, hücreleri oksidan hasara karşı koruyan hücre içindeki de en önemli antioksidan bileşiktir. Karaciğer başta olmak üzere pek çok dokuda glutasyon, sistein ve glisinden sentezlenir. Sentezde γ –glutamil sistein sentaz ve GSH sentaz enzimleri katalizördür. Hemoglobinin oksitlenerek methemoglobine dönüşümünün engellenmesinde rol alır.

Ayrıca proteinlerdeki sülfhidril (-SH) gruplarını redükte halde tutar ve bu grupları oksidasyona karşı korur, böylece fonksiyonel proteinlerin ve enzimlerin inaktivasyonunu engeller. GSH yabancı bileşiklerin detoksifikasyonu ve amino asitlerin membranlardan transportunu da sağlar.

GSH eritrositleri, lökositleri ve göz merceğini oksidatif strese karşı korumada hayati öneme sahiptir (39). GSH homeostazı için diyetle yeterli protein alınmasının gerekli olduğu ve enteral veya parenteral alınan sistin, metiyonin ve N-asetilsistein'in GSH biyosentezinde sisteinin prekürsörü olarak önemli rol oynadığı çeşitli deneysel çalışmalarda gösterilmiştir. Yaşamsal fonksiyonlarda öneme sahip GSH'nın hayvan çalışmalarında yeterli konsantrasyonlarda lenfositlerin ve ince barsak epitel hücrelerinin proliferasyonu için gerekli olduğu belirtilmiştir. Spermatojenez ve sperm olgunlaşmasında önemli rol oynadığı, influenza enfeksiyonunu inhibe ettiği, T-lenfositlerin, PMNL'lerin ve sitokinlerin aktivasyonu için gerekli olduğu ve immün sistemin önemli bir elemanı olarak fonksiyon gösterdiği ortaya konmuştur. Yapılan araştırmalar GSH eksikliğinin oksidatif strese yol açtığını ve Alzheimer, Parkinson, epilepsi, karaciğer hastalıkları, kistik fibrozis, orak hücreli anemi, AIDS, kanser, koroner kalp hastalığı, inme, diyabet gibi pek çok hastalığın nedeni olabileceğini ortaya koymaktadır (41).

- **Total sülfidril**

Sülfidril grupları, Glutasyon ve serbest sistein gibi protein olmayan ve thioeredoksin, glutaredoksin ve albumin gibi protein grubu olmak üzere ikiye ayrılırlar. Bu sülfidril grupları vücudu oksidatif stresten korumaya çalışan doğal antioksidanlardır ve oksidanların etkisi ile kolayca disülfidlere okside olurlar. Bu yüzden oksidatif stresin önemli bir göstergesidir (42,43).

2.8. İskelet Kası İskemi-Reperfüzyon hasarının etkileri

Organizmanın iskeleme verdiği yanıt, hücre ve doku tipi ile süreye bağlı olarak değişir. Örneğin insan kas dokusunda normal sıcaklıkta histolojik değişikliklerin başladığı iskeleme süresi 2 saatten fazla iken, jejunumda bu değişiklikler yaklaşık 30 dakikalık iskeminin ardından başlar (2,16,20,44).

İskemik hasarın derecesini belirleyen iki önemli faktör iskeminin genişliği ve suresidir. Fizyolojik ve deneysel çalışmalarda kas dokusunda 3 saatlik iskeleme sonrası geri dönüşümsüz hücresel hasarın başladığı ve 6. saatte neredeyse tamamlandığı görülmüştür (45).

İskeleme sonrası reperfüzyon sağlandığında lökosit aktivasyonu ve iltihabi cevap gelişir. Aktive olmuş lökositler mikrodolaşımda birikerek kollaps ve tıkanıklığa neden olurlar. Dolayısıyla lökosit-platelet ve lökositendotel hücre etkileşimleri ana mekanizma olup, interstisyel sıvı birikimi ve azalmış endotel bağımlı vazodilatasyon bu duruma katkıda bulunur (46). Bu durum ilk kez 1967 yılında Majno tarafından “no reflow” fenomeni olarak tanımlanmıştır (47).

Reperfüzyon ile birlikte mikrosirkulatuar düzeyde bozukluklar gelişir ve buna bağlı doku ödemi oluşur. Oluşan bu ödem reperfüzyon geri sağlansa bile hücre beslenmesini daha da bozar (2). Antitrombotik, antiinflamatuvar tedavi ve etkilenen ekstremiteye fasyotomi uygulaması ile geri dönüşümlü mikrovasküler disfonksiyonun tedavisi amaçlanır (3,27).

2.9. Alt Ekstremitte İskeleme-Reperfüzyon hasarına Bağlı Gelişen Uzak Organ Hasarı

Alt ekstremitte İskeleme-reperfüzyon hasarı sonucunda vücutta lokal ve sistemik inflamatuvar yanıt oluşmaktadır. Magdi M ve ark (48), ratların alt ekstremitelerinde uygulanan bir İ/R çalışmasında ortaya çıkan tumor nekrozis faktör- α (TNF- α), interlökin-1- β (IL-1- β), IL-6, IL-8 ve trombosit aktive edici faktör (PAF) gibi mediyatörlerin serbest oksijen radikali ve lökositler aracılığı ile, hem lokal dokuda hem de uzak organlarda hasara neden olduğunu saptamışlardır.

Ekstremitenin akut iskemisinde Haimovici H. ‘*Miyonefropatik –Metabolik Sendromu*’ tanımlamıştır. 6- 8 saat arasında akut iskemik ekstremitte revaskularize edildiğinde, hiperkalemi, artan Kreatin fosfokinaz ve serum glutamik-oksaloasetik

transaminaz seviyeleri ,miyoglobini-miyoglobineri, böbrek yetmezliği, pulmoner yetmezlik gibi sistemik etkiler (4).

İskemi-reperfüzyon hasarı sonucunda oluşan sistemik inflamasyon hemen her organda hasar oluştururken ilk gözlenen, genelde 24-72 saat içinde oluşan, akciğer yetmezliğidir. Sistemik inflamasyona bağlı oluşan akciğer hasarı, hafiften (akut akciğer hasarı) şiddetliye (akut respiratuar distress sendromu) doğru seyreden bir klinik spektruma sahip olup, oluşum mekanizması '*wash-out fenomeni*'; dolaşıma katılan mediyatörler sonucunda mikrovasküler geçirgenlik artışı ve alveol sıvısı nötrofil birikimi ile açıklanmaktadır (49).

Böbrek hasarının ise miyoglobulin birikimine bağlı olarak gelişen endotel hasarı sonucunda, nötrofil birikimine yol açtığı ve sonucunda akut tübüler nekroz geliştiği düşünülmektedir (24,50).

Oluşan sistemik inflamasyona bağlı olarak KC, santral sinir sistemi ve miyokard disfonksiyonunda içine alan multiple organ disfonksiyonu (MODS) gelişebilir (51,52).

2.10. OZON

Ozon (O₃) üç oksijen atomunun birleşiminden oluşan gaz halinde bir moleküldür. Oksijen molekülünün (O₂) kararlı haline karşın, ozon, kararsız bir moleküldür. Ozon gazı Alman kimyacı Christian Friedrich Schönbein tarafından 1839 yılında keşfedilmiştir. Oda sıcaklığında renksiz ve keskin kokulu bir gazdır (fırtınalı havalardan sonra, yüksek yerlerde veya deniz kıyısında hissedilir). İsmi Yunanca "koklamak" manasına gelen "ozein"den gelir. Çok güçlü okside ve etkili dezenfekte etme özelliği sayesinde, halen dünya çapında içme suyu sağlayan arıtma tesislerinde yaygın olarak kullanılır. Keşfinden sonraki ilk yıllarda dezenfeksiyon amacıyla kullanılmıştır (53). 1860 yılında Monako şehrinin su arıtma tesisinde dezenfeksiyon amacıyla ozon kullanılmaya başlanmıştır. Ozonun bu dezenfekte edici etkisi güçlü okside edici özelliğinden kaynaklanmaktadır. Sadece virus ve bakterileri öldürmekle kalmaz tüm mikroorganizmalar ve toksinlerini de okside edebilir. Ozon ayrıca fenoller, pestisidler, deterjanlar, kimyasal atıkları ve aromatik bileşikler de etkili şekilde nötralize edebilir. Ozon kimyasal yapısı itibarıyla radikal özelliği taşımamakla birlikte, florin ve persülfattan sonra, bilinen üçüncü en güçlü oksidan maddedir (54). Stabil olmayan kimyasal yapısı nedeniyle ozon güçlü bir oksidasyon aracıdır. İlâveten gıda maddelerinin konservasyonunda, ağartıcı olarak ve

zararlı maddelerin parçalanmasında kullanılır. Ozon aynı zamanda pek çok gelişmiş ülkede bir hava kirliliği kriteri olarak kullanılır. Normal havada düşük miktarda ozon mevcuttur. Ham maddesi oksijen olan ozon depolanamayan, stoklama imkanı olmayan tek gazdır. Ozonun stoklanamamasının sebebi bulunduğu ortamın sıcaklığı ile doğru orantıda ozon gazı bir süre sonra ham maddesi olan oksijene hiçbir uygulamaya maruz kalmadan dönmektedir. Bu nedenle uygulamalarda ozon jeneratörleri gereklidir. Nikola Tesla 1896'da ABD'de ilk ozon jeneratörünün patentini almıştır. Ozon, ultraviyole ışın (UV)'ları ile veya oksijen atomlarının üzerine uygulanan kuvvetli elektriksel akım ile oluşturulur.

Gökyüzünün mavi renkte görünmesi bu gaz sayesinde olmaktadır. Sıvı halde lacivert renge dönüşen ozon gazı, dünyayı güneşten gelen morötesi radyasyona karşı korumaktadır. Ozon özellikle atmosferin üst tabakalarında oldukça bol bulunan bir moleküldür. Atmosferdeki ozonun %90'ına yakını, yer yüzeyinden yaklaşık 20–50 km yüksekte bulunan stratosfer tabakası içinde yer alır. Atmosferin üst katmanlarında UV ışınları, alt katmanlarında yıldırım çakması sonucu oluşan elektrik arkının oksijeni parçalaması ile oluşan ozon, havanın temizlenmesinde çok önemli bir rol oynamaktadır. Ozon tabakası özellikle 290-320 nm aralığındaki UV ışınları absorbe eder.

Normal şartlarda havadaki konsantrasyonu 0.02 ppm dir. 100 ppm üzeri toksik dozdur. Akciğer ve gözler ozonun toksik etkisine en hassas organlardır. Gözdeki irritasyonu ve akciğere etkileri konsantrasyon, sıcaklık, nem ve maruz kalınan süreye bağlı olarak değişir. Düşük konsantrasyonda ozon inhalasyonu, boğazda irritasyon ve buna bağlı öksürüğe; yüksek konsantrasyonlardaki inhalasyon ise akciğer ödemiye neden olabilir (55, 56).

Ozonun Kabul edilen ilk tıbbi kullanımı Birinci Dünya Savaşı sırasında Alman askerlerinin anaerobic Clostridium bakterisi enfeksiyonunu tedavi eden Dr. Albert Wolff 'a dayanır (7). Bilimsel bir toplantıda ozonun tedavi edici bir ajan olarak gündeme alındığı ilk önemli organizasyon ise 1935 yılında Berlin'de toplanan 59. Alman Cerrahi Birliği (59th Meeting of the German Surgical Society) toplantısı olup, burada Dr. Erwin Payr "Cerrahi'de Ozon Uygulamaları" başlığı altında kendi vakalarından oluşan derleme türünde bir sunum yapmıştır (53). Bu tarihten sonra 80'li yıllara kadar, ozon tedavisini uygulayan çeşitli hekimler ve araştırmacılar bulunmaktadır. 1980'li yıllardan itibaren ise tıbbi amaçla ozon kullanımına yönelik gerek bilimsel çalışmalar, gerekse vaka serileri

literatürde artmaya başlamıştır.

Ozon tedavisi, %3-5 oranında ozon içeren oksijen/ozon karışımının vücut boşluklarına ya da dolaşım sistemine uygulanmasıdır; bu karışım intravenöz, intramusküler, intraartiküler, intraplevral, intrarektal ve intradiskal uygulanabildiği gibi topikal de uygulanabilir (54). Ozon tedavisinin klasik uygulaması haline gelmiş olan yöntem 1974 yılında Wolff tarafından tarif edilmiştir. Bu yöntemde; bir miktar kan (50–270 ml) vücut dışına alınarak, ozona dayanıklı bir şişede 5-10 dakika oksijen/ozon karışımıyla temas ettikten sonra tekrar aynı kişiye geri verilir (ototransfüzyon). Bu uygulama şekli major otohemoterapi (HT) olarak adlandırılmaktadır (54, 57).

2.10.1 Etki Mekanizması

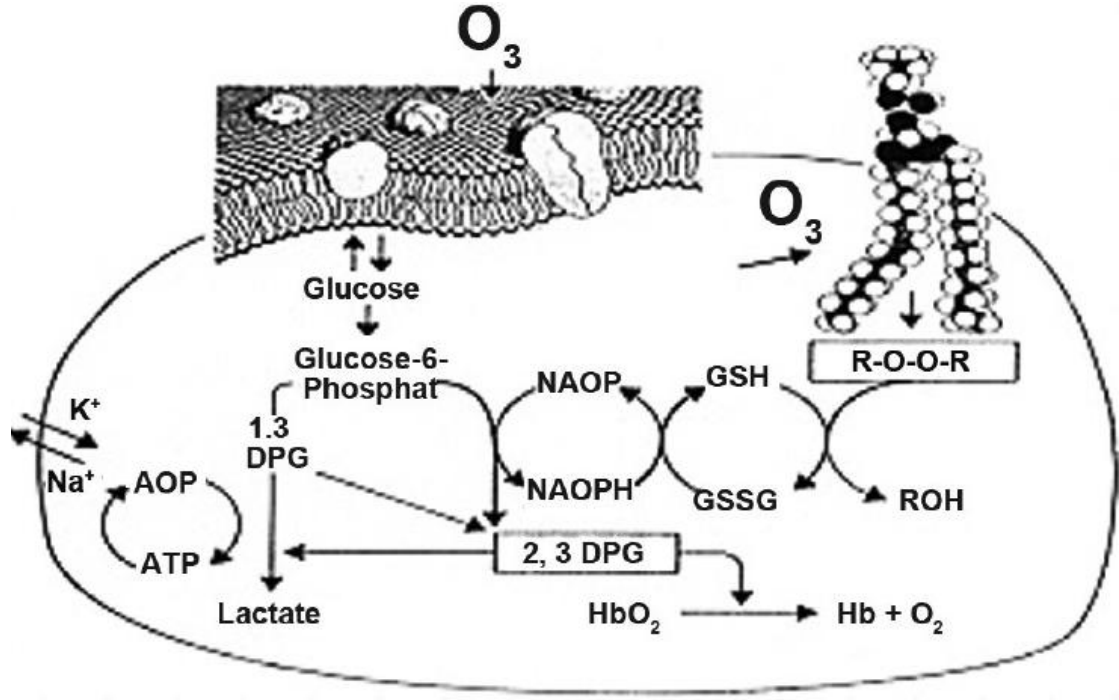
Ozon tedavisi bir paradoks tedavidir. Uygun dozda verildiği takdirde tedavi etkisi ortaya çıkarken, doz aşımı olduğu zaman güçlü bir oksidan olabilir (58). Ozon reaktif bir molekül olduğu için tıbbi amaçlı kullanımında dikkat edilmesi gereken bazı durumlar vardır: ozon, hiçbir zaman saf olarak verilmemelidir, belli oranda oksijenle karıştırmak gereklidir. Bu karışımda oksijen %95'den az, ozon %5'ten fazla olmamalıdır. Normal atmosfer havasının bu karışıma girmesi engellenmelidir. Çünkü ozonun reaktif özelliğinden dolayı hava ile teması sonucu toksik bir gaz olan nitrojen dioksit (N_2O_2) oluşabilmektedir. Ayrıca emboliye sebep olmaması için ozon gaz olarak damar içerisine verilmemelidir. Tüm işlemler sırasında ozona dayanıklı malzemenin (paslanmaz çelik, nötral cam ve teflon) kullanılması gerekmektedir.

Ozon, diğer gazlar (O_2 , CO_2) gibi suda çözünebilir. Ozon oksijene göre 1,6 kat daha yoğun ve suda çözünürlüğü 10 kat daha fazla olan bir moleküldür. Biyolojik sıvılarda ise ozon oksijenden farklı olarak hızlıca biyomoleküller ile reaksiyona girer. Dolayısı ile HT sırasında uygulanan ozon/oksijen karışımındaki ozon afinite sırasıyla çoklu doymamış yağ asitleriyle, antioksidanlarla ve sistein gibi sülfhidril grubu taşıyan tiyol bileşikler ile reaksiyona girer. Ozonun miktarına bağlı olarak karbonhidratlar, proteinler (dolayısıyla da enzimler), DNA ve RNA da bu reaksiyondan etkilenebilir. Tüm bu bileşikler ozon karşısında elektron donörü gibi davranarak oksitlenirler. Sonuçta süperoksit (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hipoklorik asit ($HOCl$) gibi serbest oksijen radikalleri oluşur. Bu reaksiyonlardan en önemlisi doymamış yağ asitlerinin

oksidasyonudur (54,55,59,60).

Ozonun biyolojik etkilerini açıklamak için yapılan çalışmalarda daha çok HT tedavisi model alınmıştır. HT esnasında uygulanan ozon/oksijen karışımındaki ozon plazmada hızla çözünür (61). Daha önce bahsedildiği gibi sıvılardaki çözünürlüğü fazla olan ozonun bir kısmı plazmada bulunan antioksidanlar ile reaksiyona girerek bunların miktarlarını azaltır. Bu anlık olaylar sırasında çeşitli SOR' de oluşabilmektedir. Bu radikallerin yarı ömrü çok kısa olduğu için, daha kan hastaya geri verilemeden, yani ototransfüzyondan önce bunlar ortadan kalkarak yerlerini lipid oksidasyon ürünlerine bırakırlar. Bu ürünler, eritrosit membranlarının oksidasyonu ile ortaya çıkar. Eritrosit membranındaki doymamış yağ asitleri oksidasyona çok duyarlıdır. Bu reaksiyonlar sırasında ortaya çıkan hidrojen peroksit, molekül yapısı itibarıyla radikal olmayan oksitleyici bir moleküldür (12,19,62)

Eritrositlerde 'ozon' hücre çeperinin fosfolipidleri ile reaksiyona girer. Eritrositlerde glikoliz hızının artmasına neden olarak, 2-3 difosfoglisaratın sentezini stimüle eder, bu madde hemoglobinin strüktürünü modifiye eder ve böylece oksijenin açığa çıkmasına yol açar ve hastalıklı dokuda trofik etkiyi destekler (Şekil 2-3). Aynı zamanda piruvatin karboksilasyonunu arttırarak Krebs siklusunu aktive eder ve ATP üretimini arttırır. Bu olay aynı zamanda NADH redüksiyonuna neden olur ve sitokrom c'nin oksidasyonuna yardımcı olur (63). Serbest radikalleri temizleyen ve hücre duvarını koruyan Glutatyon peroksidaz, KAT, SOD'un üretimini artırır. Vazodilatatör olan Prostatiklini indükler. Endotelial hücrelerde ozon, nitrikoksit (NO) sentezini arttırır ve açığa çıkmasını ve endojen bir vazodilatasyona yol açar (64,65).



Şekil 2.3. Ozonun eritrosit hücrelerindeki etki mekanizması (63)

Kanda ozon interaksiyonunun direkt sonucu, periferik dokuda daha iyi bir oksijen beslenmesidir (ötrofik etki). Bunun dışında metabolik asitlerin azalmasına yol açar. İmmün stimülasyon yoluyla immün kompetan hücreler ve medyatörler aktive edilir. İnterferonlar (IFN- β), interlökinler (IL-1), tümör nekroz faktörü (TNF- α), granülosit-makrofaj koloni stimulan faktör (GM-CSF), transforme edici büyüme faktörü (TGF- β) serbest kalır (54,55,61,64).

Ozonun diğer bir uygulama şekli olan minör hemoterapide ise hastadan alınan 5 ml kan ile aynı miktarda 80-100 $\mu\text{l}/\text{mL}$ konsantrasyonundaki oksijen/ozon karışımı bir dakika inkübe edilir. Bu süre zarfında ozonunun, yine aynı şekilde kanda önce çözünüp sonra da biyolojik moleküller ile reaksiyona girmesi beklenir. Sonrasında bu kan, gluteus kasına yavaşça enjekte edilir. Bu uygulama sonrasında kas içine enjekte edilen kanın doku derinliklerine ilerlerken pıhtılaşmasına rağmen hastalardan çok azı hafif şişme ve ağrıdan yakınmaktadır. Bu işlem esnasında anesteziye gerek yoktur. Tartışmalı olmakla birlikte, bu uygulamanın immünmodülatuar bir etkisinin olduğu iddia edilmekte ve etki mekanizması şu şekilde açıklanmaktadır; Enjeksiyon yerinde hafif derecede steril inflamasyon meydana gelmekte, bölgeye nötrofil ve monositler gelerek denatüre

proteinleri ve parçalanmış eritrositleri fagosit etmektedir. Eğer kan içinde HCV, HBV ve HIV gibi virüsler var ise ozon tarafından inaktive edilip parçalanmış bu virüs atıkları bölgeye gelen bu immün hücreler tarafından ortadan kaldırılır (54,70).

2.10.2. Ozon'un öne sürülen etki mekanizmaları :

2.10.2.1. Glutasyon peroksidaz, katalaz, süperoksit dismutaz gibi, serbest radikallerin eliminasyonunda etkili olan enzimleri aktive eder (9,10).

2.10.2.2. Glikolizi aktive eder, böylece (66) :

2.10.2.2.1. Oksijenin hemoglobinden ayrılmasını sağlar, yani doku oksijenizasyonunu artırır.

2.10.2.2.2. Metabolik detoksifikasyonda çok önemli bir rolü olan acetyl-coenzyme-A'nın oluşumunu artırır.

2.10.2.2.3. Mitokondriyal transport sistemini aktive ederek tüm hücrelerin metabolizmasını artırır ve bu sayede mutajenik değişimlere karşı hücre savunmasını güçlendirir.

2.10.2.2.4. Eritrositlerin esnekliğini, kanın akışkanlığını ve arteriyel oksijen basıncını (PO_2) artırır (64).

2.10.2.2.5. Eritrositlerdeki rulo formasyonunu azaltır.

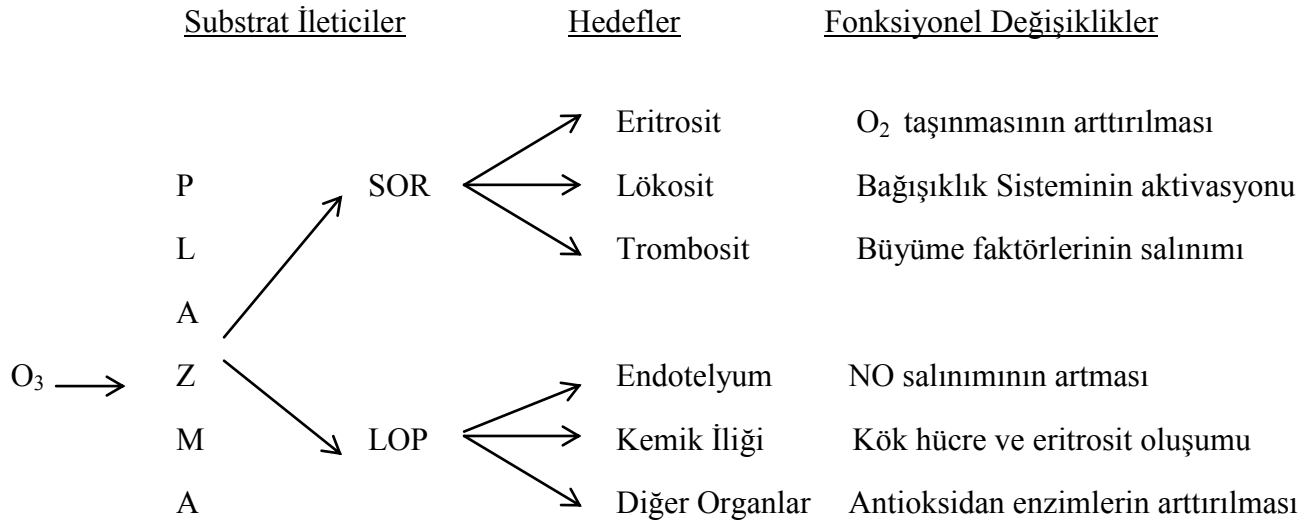
2.10.2.3. Düşük dozlarda lökositöz ve fagositöz indükleyerek immün sistemi stimüle eder. Ancak yüksek dozlarda immün sistemi inhibe eder (67).

2.10.2.4. Retikulo-endotelial sistemi stimüle ederek dokuların tamir mekanizmasını destekler (67).

2.10.2.5. Güçlü germisid aktivitesi vardır ve birçok patojen mikroorganizmanın hücre duvarını parçalayabilir. Bu sayede enterovirüsler, koliform bakteriler, Staphylococcus aureus ve Aeromona hydrophilia infeksiyonlarında etkindir (68) .

2.10.2.6. Sirküler plazmid DNA' yı açarak bakteriyel proliferasyonu azaltır.

2.10.2.7. Fungisit etkilidir , Candida büyümesini inhibe eder (68) .



Şekil 2.4. Medikal Ozon uygulaması sonrası ortaya çıkan temel biyolojik etkiler (69).

2.10.3. Endikasyonlar

Ozon tedavisi hiçbir zaman hastalara verilen ilaçların kesilmesini veya tedavinin değiştirilmesini gerektirmez. Ozon tedavisi organizmanın antioksidan ve antiinflamatuvar savunma sistemlerini destekleyen, dokulara oksijenin daha kolay bırakılmasını sağlayan fizyolojik alt yapıya yönelik bir destek tedavisidir.

2.10.3.1. Özellikle diyabetik ülser olmak üzere tüm zor iyileşen ülserlerin tedavisinde (66,68)

- Diyabetik ayak
- Ulkus kruris
- Dekubitüs ülserleri
- İltihabi barsak hastalıkları (Crohn, ülseratif kolit, proktit)
- Yanıklar
- Bakteri ve mantar infeksiyonları
- Vasküler oklüzyona bağlı özellikle bacaklarda ortaya çıkan ülserler

2.10.3.2. Virüslere bağlı hastalıklar (70,71)

- Viral hepatitler (hepatit B ve C)
- Herpes ve Papillomavirus infeksiyonları
- Çok sık gribal infeksiyon geçirme

2.10.3.3. Geriatrik Şikayetlerde (72)

- Kronik yorgunluk, halsizlik, genel vücut ağrısı
- Egzersiz yaparken ortaya çıkan yorgunluk ve bacaklarda dolaşım bozukluğuna bağlı ortaya çıkan ağrı ve ödem
- Eklem hasarının azaltılmasına yardımcı olarak
- Yaşa bağlı maküler dejenerasyonda

2.10.3.4. Cinsel fonksiyonların desteklenmesi (73)

- Diyabetin erken evrelerindeki ereksiyon kaybının tedavisinde
- Depresyon ve duygu durum bozukluklarına bağlı cinsel isteksizliklerin ve ereksiyon sorunlarının giderilmesi

2.10.3.5. Otoimmün hastalıklarda non-spesifik immunmodölasyon amacıyla (67)

- Romatoid artrit, Multipl skleroz, Sistemik Lupus Eritromotozis, Behçet hastalığı gibi hastalıklarda yardımcı tedavi olarak

2.10.3.6. Kalp yetmezliği olan hastalarda non-spesifik immunmodölasyon (minor AHT) ve antioksidan sistemi desteklemek (major AHT) amacı ile (74)

2.10.3.7. Vasküler bozukluklar ve damar endotel hasarına bağlı durumlarda (75)

- Diyabet hastalarında damarların hasarlanması sonucu ortaya çıkan dolaşım bozuklukları ve doku hasarının (göz, böbrek, sinir) azaltılmasında
- Fibromiyaljide ortaya çıkan bölgesel dolaşım bozukluğunun giderilmesinde
- Özellikle sigara içimine bağlı dolaşım bozukluklarının giderilmesinde

2.10.3.8. Kronik inflamasyon ile seyreden solunum sistemi hastalıklarında (76)

- Astım
- Kronik obstrüktif akciğer hastalığı

2.10.3.9. Kronik yorgunluk sendromu, depresyon ve duygu-durum bozukluklarına bağlı

ikincil şikayetlerde vücudun savunma sistemlerinin desteklenmesi amacı ile (77).

2.10.3.10. Kanser tedavisinde kullanılan kemoterapi ve radyoterapinin etkinliğini artırmak ve savunma sistemini desteklemek amacı ile (64).

2.10.3.11. Alzheimer, Parkinsonizm, trigeminal nevralji, migren ve senil demans gibi yaşa bağlı hastalıkların tedavisinde yardımcı olarak ve şikayetlerin azaltılması ve genel iyilik halinin sağlanması amacı ile (78).

2.10.3.12. Oral mukoza hastalıklarında: Gingivit, periodontit, aftöz stomatit, erozif liken planus, oral kandidoz, herpetik gingivostomatit, diş çürüğü, kanal tedavileri, kavite dezenfeksiyonunda başarı ile kullanılmaktadır (79) .

Ozon uygulamaları yara iyileşmesi, yaşa bağlı maküler dejenerasyon, iskemik, basit diş ve ağız infeksiyonlarından hepatitlere kadar uzanan geniş bir aralıktaki çeşitli infeksiyon hastalıklarında yapılan vaka analiz çalışmalarında olumlu etkiler göstermiştir. Martinez-Sanchez ve arkadaşları diyabetik ayak gelişmiş hastalarda yaptıkları çalışmada ozon tedavisinin etkinliğini değerlendirmişlerdir. Bu çalışmada ozon tedavisi uygulanan hastalarda antibiyotik tedavisi alanlara göre yara iyileşmesi hızlanmış, hastanede kalma süreleri kısalmış, glisemi düzeyleri daha iyi kontrol edilebilmiş ve antioksidan enzim düzeyleri artmış olarak bulunmuştur (68).

2.10.4. Doz

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

Ozon tedavisinin 10-80 µl/ml doz aralığı uygulamalarında herhangi bir yan etki oluşturmadığı ayrıca bu doz aralığındaki uygulamaların eritrosit ve lökosit fonksiyonları üzerine olumsuz etkisinin bulunmadığını bildiren yayınlar bulunmaktadır (61,64).

2.10.5. Uygulama yöntemleri

Ozon tedavisinin uluslararası kabul görmüş on civarında uygulama şekli bulunmaktadır.

2.10.5.1. Majör otohemoterapi: En sık tercih edilen uygulama yöntemidir. Hastanın damarından alınan bir miktar kanın (50-270ml) ozona dayanıklı şişe içinde uygun ozon/oksijen karışımı (ozon en çok %5, oksijen en az %95) ile muamele edildikten sonra aynı damardan geri verilmesi esasına dayanır. Tüm tedavilerin temel uygulama yöntemidir. Çoğunlukla planlanan ozon tedavisi protokollerinde yer alır (54).

2.10.5.2. Minör otohemoterapi: Hastadan alınan bir miktar kanın (5-10 ml) ozona dayanıklı enjektör içerisinde uygun ozon/oksijen karışımı (ozon en çok %5, oksijen en az %95) ile muamele edildikten sonra kas içine uygulanması esasına dayanır. Non-spesifik immunmodülasyon için önerilen temel uygulama şeklidir. Marfella ve arkadaşlarının yaptığı çoğu diyabet, hipertansiyon ve koroner arter hastası olan ve bozulmuş periferik kan akımından dolayı iyileşmeyen yaralara sahip 151 hastanın dahil edildiği randomize, plasebo kontrollü bir klinik çalışmanın sonuçlarına göre, 22 hafta boyunca, haftada bir kez yapılan minör ozon tedavisi belirgin tedavi edici özellik göstermiştir. Tedavi kriteri olarak lezyon çapındaki küçülme ve kapanmaların yanında dokuda transkütan parsiyel oksijen basıncı artışı ve yara iyileşmesini geciktirdiği bilinen TNF-alfa düzeyleri değerlendirmeye alınmıştır. Uygulanan tedavi ile her iki kriterde de anlamlı düzelmeler gözlenmiştir (81).

2.10.5.3. Rektal insuflasyon: Uygun ozon/oksijen karışımı (ozon en çok %5, oksijen en az %95) ile üretilmiş gazın anüs yolu ile rektum içerisine verilmesi esasına dayanır. Kulağa hoş gelmemekle birlikte etkin, ucuz ve kolay uygulanabilir bir tedavi yöntemidir. Damar yolu açmanın zor olduğu bazı vakalarda (ileri düzey diyabet, kanser tedavisi görenler vb.) majör otohemoterapinin en güçlü alternatifidir. Bazı vakalarda direkt gaz yerine ozonize serum fizyolojik uygulaması tek başına veya gaz uygulamasından önce tedavi etkinliğini artırır. Ülseratif kolit, proktit, anal fistül ve anal fissür tedavisinde kullanılır (82).

2.10.5.4. Vajinal insuflasyon: Uygun ozon/oksijen karışımı (ozon en çok %5, oksijen en az %95) ile üretilmiş gazın vajina içerisine verilmesi esasına dayanır. Tecrübeli hekimler tarafından uygulanması kolay ve etkin bir yöntemdir. Benzer uygulama ozonize

serum fizyolojik ile de yapılabilir (83).

2.10.5.5. Lokal uygulamalar: Uygun ozon/oksijen karışımı (ozon en çok %5, oksijen en az %95) ile üretilmiş gazın kas, eklem, disk, tetik noktalar, tendon, deri içine veya vücut boşluklarına uygulanması esasına dayanır (84,85).

2.10.5.6. Topikal uygulamalar: Uygun ozon/oksijen karışımı (ozon en çok %5, oksijen en az %95) ile üretilmiş gazın veya ozonlu sıvıların (su, yağ) cilt üzerine doğrudan uygulanması esasına dayanır. Ozonlu serum fizyolojik güçlü ve etkin bir antiseptiktir (86, 87).

2.10.5.7. Torbalama: Özellikle ekstremitelerdeki infeksiyon, ülser ve lokal deri lezyonlarında uygulanan etkin bir yöntemdir. Deri ıslatıldıktan sonra özel dizayn edilmiş bir torba ile lezyonun olduğu bölge çevrelenir. Torbanın gaz karışımını torba içine veren ve gazı emen giriş ve çıkışları bulunur. Torbalama tedavisi boyunca gaz giriş ve çıkışı aynı hızda devam eder (67).

2.10.5.8. Diğer uygulamalar: Sinüzit, otit vb. vakalarda da lokal uygulamalar yapılmaktadır (88,89). Ozon sauna daha çok kozmetik amaçlarla kullanılan ancak özel bir cihaz isteyen uygulama şeklidir (87).

HT tedavisi yapılmadan önce kanın antikoagülan verilerek hazırlanması gerekir. Çünkü ozon doza bağlı olarak trombosit fonksiyonlarının artışına neden olmaktadır. Trombosit fonksiyonlarındaki artışın bazı yararlı sonuçları da olmaktadır. Aktive olmuş trombositler içlerinde bulunan büyüme faktörlerini salarak iskemi ve ülserli hastalarda iyileşmeye olumlu katkı sağlar (81).

2.10.6. Yan Etki Ve Kontrendikasyonları

Ozon tedavisinin yan etkisi yok denecek kadar azdır. Şimdiye kadar bildirilen yan etkiler uygulama hatalarına bağlı lokal komplikasyonlardır. Bazı durumlarda ozon terapisi uygulanması sakıncalı olabilir. Bu durumlar: Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enzim eksikliği, özellikle erken dönem olmak üzere hamilelik, anjiyotensin çevirici enzim (ACE) inhibitörü tedavisi görenler, hipertiroidi, kanama bozukluğu, kronik pankreatit, yeni geçirilmiş kalp krizi, kontrol altına alınamayan kardiyovasküler hastalıklar ve ozona reaksiyon gösteren astım hastaları olarak sıralanabilir (72).

2.10.7. Ozonun iskemi –reperfüzyon hasarına etkisi

İskemi-reperfüzyon hasarında oluşan serbest oksijen radikalleri lokal ve sistemik

hasarda major patofizyolojik komponentlerdir (12,14). Optimal terapötik tedavi ise SOR'unin oluşumunun önlenmesi ve nötröle edilmesidir. Ozon biyolojik etkisinin ortaya çıkabilmesi için serbest oksijen radikallerinin oluşması gerekmektedir.

Ozon uygulandıktan sonra hızlıca plazma, lenf ve idrar sıvılarına dağılır. Tedavi etkinliğine aracılık eden iki ana molekül grubu ortaya çıkar. Bunlardan bir tanesi hidrojen peroksit (H_2O_2), ikincisi ise Lipid peroksidasyon ile oluşan ürünlerdir (60). H_2O_2 en önemli hücresel ikinci habercilerden bir tanesidir. Ozon tedavisi esnasında ex vivo olarak, ozonun plazma ile reaksiyonu sonucu oluşur ve ozonun önemli biyolojik ve terapötik etkilerini ortaya çıkarır. En önemli etkilerinden biri, eritrositlerde 2,3-difosfoglisarat düzeyini artırma yoluyla hemoglobin-oksijen ayrışma eğrisinin sağa kaymasına ve böylece oksijenin dokulara daha kolay bırakılmasına neden olmasıdır (62, 63). H_2O_2 kısa etkilidir ve hızlıca kaybolur. Lipid peroksidasyon ile oluşan ürünler ; ozonun plazmadaki çoklu doymamış yağ asitleri başta olmak üzere askorbik asit, ürik asit, sistein ve indirgenmiş glutatyonun (GSH) tiyol yapılarındaki –SH grupları ile ve albumin ile reaksiyona girmesi sonucu oluşur. Bu ürünler dolaşım ile dokulara dağılır, geç ve uzun etkili ikincil haberci olarak etki gösterir. Bu sürecin sonucunda, bağışıklık sistemi aktive olur ve zarar görmüş hücrenin yaşamasına yardımcı olur (89, 90). Ek olarak, Ozon endogen antioksidan olan Süperoksid dismutaz (SOD), Glutatyon (GSH) ve Katalazın hücre içinde artmasına yardımcı olarak İRH sonucu zarar görmüş hücrenin iyileşmesine yardımcı olur (9,10,11).

Ozon uygulamaları sonucunda oluşması beklenen SOR ve lipid oksidasyon ürünlerinin terapötik etki gösterebilmesi için belli bir konsantrasyonda olması gerekir. Bocci ve Carlo yaptıkları çalışmada değişik dozlarda (20,40,60,80 $\mu g/ml$) ozon uygulamış, kanlarda dozla doğru orantılı olarak glutatyon ve total antioksidan seviyesinde azalma, lipid peroksidasyonu ve okside glutatyon düzeyinde artma olduğunu göstermiş, uygulamanın 20 dakika sonrasında ise antioksidan düzeylerinin eski haline döndüğünü tespit etmişlerdir (61,64,80).

Halen ozon tedavisinin etki mekanizmasının bir çok yönden açıklanmaya ihtiyacı vardır. Tüm dünyada devam eden deneysel ve klinik ozon tedavisi çalışmalarının, yakın gelecekte mekanizmanın daha ayrıntılı olarak açıklanmasına katkıda bulunacağına inanıyoruz.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi ve Biyokimya Anabilim Dalları tarafından Ekim 2011-Temmuz 2014 tarihleri arasında İstanbul Tıp Fakültesi Deneysel Tıp Araştırma Uygulama Enstitüsünde yapıldı. Çalışma öncesinde, İstanbul Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunun (İ.Ü. HADYEK), 30 Ocak 2012 tarihli oturumunda onay alındı. (Ek-1)

3.1. Deney Hayvanları

Çalışmada Deneysel Tıp Araştırma Uygulama Enstitüsü laboratuvarlarında üretilen ortalama ağırlıkları 200-250 gram olan, 24 adet dişi Sprague-Dawley cinsi sıçan kullanıldı. Sıçanlar rastgele ve eşit sayıda (n:8) olacak şekilde 3 gruba ayrıldı. Sıçanlar, deneyden önceki 7 gün tel kafeslerde, 12 saat gece 12 saat gündüz sirkadiyan ritimde, ortam sıcaklığı 24-26 °C ve nem oranı % 50-60 olacak şekilde tutuldu. Sıçanların beslenmesinde, standart ticari pellet yemi ve şehir içme suyu kullanıldı. Tüm sıçanların bakımları, Tıbbi Araştırmalar Ulusal Derneği tarafından biçimlendirilen ‘Deney Hayvanlarının Bakım Prensipleri’ ne ve Laboratuvar Hayvanı Kaynakları Enstitüsü tarafından yeniden düzenlenen ‘Laboratuvar Hayvanlarının Bakım ve Kullanımı için Kılavuz’ una uygun olarak yapılmıştır.

3.2. Anestezi

Çalışma öncesinde sıçanlar 12 saat süreyle aç bırakıldı. Bu süre içinde su içmelerine izin verildi. Anestezi amacıyla intraperitoneal yoldan 50 mg/kg ketamine hydrochloride (Ketalar®, Parke-Dawis, Pfizer, İstanbul, Türkiye) ve 10 mg/kg xylazine hydrochloride (Rompun®, Bayer AG, Leverkusen, Almanya) uygulandı (Resim 3.1). Bu dozun 1/3’ ü gerektiğinde intramusküler olarak tekrarlandı. Anestezi sonrasında 500 Ünite heparin (Nevparin®, Mustafa Nevzat, İstanbul, Türkiye) İP olarak uygulandı. Cerrahi girişim, enjeksiyonlar ve kan alınması anestezi altında yapıldı. Anestezi süresince denekler, solunum desteğine ihtiyaç duymadan, oda havasında izlendiler. Deney sırasında gelişebilecek hipotermiyi önlemek amacıyla, cerrahi girişim ısıtıcı lamba altında yapıldı.

3.3. Cerrahi Prosedür

3.3.1. Turnike yöntemi ve İskemi –reperfüzyon modeli

Çalışmada İskemi - reperfüzyon modeli, Hardy ve Goughy’in yöntemine benzer

şekilde turnike yöntemiyle yapıldı (91). Anestezi sonrası sağ uyluk üst 1/3 kısmından bir turnike yardımıyla femoral arter sıkıştırılarak tek taraflı alt ekstremitte iskemisi yaratıldı (Resim 3-2). Distal nabızların alınamaması ve bacak renginin soluklaşması iske mi olarak değerlendirildi (Resim 3-2). İR gruplarında 4 saat iskemiden sonra turnike kesilerek sağ arka ekstremitte 2 saatlik reperfüzyona bırakıldı. İşlemler tamamlandıktan sonra tüm deneklerden intrakardiyak 4-5 cc. kan alınarak sakrifiye edildi ve kalp, akciğer, karaciğer, böbrek ile etkilenen extremiteden gastroknemius kası enzimatik inceleme için çıkartıldı.

3.3.2. Ozon hazırlama

0.5 mg/kg ozon/oksijen karışımı, tek doz ve intraperitoneal (İP) olarak uygulandı. Her bir rat için İP olarak uygulanan %95 oksijen, % 5 ozon gaz karışımının hacmi yaklaşık 2.1-2.8 mL (25 µg/mL) di. Ozon uygulaması, turnike açılmasıyla birlikte reperfüzyon sırasında gerçekleştirildi. Ozon, Uluslararası Ozon derneği standardizasyon komitesinin önerdiği, fotometrik tespit ile ozon konsantrasyonun ve gaz akımının hızının belirlendiği Ozon jeneratoru (model OZONOSAN Photonik 1014, Hansler GmbH, Nordring 8, Iffezheim, Germany) ve medikal oksijen kullanılarak ile oluşturuldu (Resim 3-5, 3-6). Ozona dayanıklı, silikonlanmış tek kullanımlık polipropilen enjektörler ve bakteri filtresi kullanıldı (Resim 3-7, 3-8).



Resim 3-1: İntraperitoneal anestezi uygulanması.



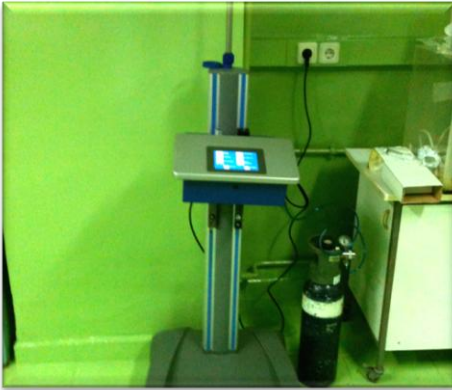
Resim 3-2: Alt ekstremiteye turnike uygulanan rat.



Resim 3-3 : Turnike uygulanan ekstremit ile uygulanmayan ekstremit arasındaki fark.



Resim 3-4: İntraperitoneal ozon uygulanması.



Resim 3-5: Ozon Jenaratörü.



Resim 3-6: Ozon Jenaratör monitörü.



Resim 3-7: Ozona dayanıklı, silikonlanmış tek kullanımlık polipropilen enjektör.



Resim 3-8: Ozona dayanıklı bakteri filtreleri.

3.4. Deney Grupları

Ağırlıkları 200-300 gram arasında değişen, dişi, toplam 24 adet Sprague-Dawley cinsi rat, eşit sayıda ($n = 8$) ve rastgele olarak 3 deney grubuna ayrıldı.

Grup 1: Kontrol ($n = 8$)

Grup 2: İ/R + serum fizyolojik ($n = 8$)

Grup 3: İ/R + Ozon ($n = 8$)

Birinci grup '*Kontrol grubu*' olarak belirlendi. Sadece anestezi uygulandı. Diğer gruplara uygulanan toplam 6 saatlik işlem süresinin sonunda intrakardiyak kan alındı ve karaciğer, kalp, böbrek, akciğer, sağ gastroknemius kası dokuları çıkarıldı.

İkinci grup '*İR+SF grubu*' olarak belirlendi. Anestezi sonrası sağ alt ekstremiteye turnike ile 4 saat iskemi ve 2 saat reperfüzyon uygulandı. Turnike kaldırıldıktan hemen sonra reperfüzyon sırasında intraperitoneal serum fizyolojik (uygulanan ozonun miktarı kadar, yaklaşık 2.5 mL) uygulandı, Reperfüzyon süresinin tamamlanmasıyla intrakardiyak kan alındı ve karaciğer, kalp, böbrek, akciğer, sağ gastroknemius kası doku örnekleri alındı.

Üçüncü grup '*İR\ Ozon terapi grubu*' (*ozon grubu*) olarak belirlendi. Anestezi sonrası sağ alt ekstremiteye turnike ile 4 saat iskemi ve 2 saat reperfüzyon uygulandı. Turnikenin açılmasıyla birlikte reperfüzyon sırasında 0.5mg\ kg ozon\oksijen karışımı İP olarak

uygulandı. Reperfüzyon süresinin tamamlanmasıyla intrakardiyak kan alındı ve karaciğer, kalp, böbrek, akciğer, sağ gastroknemius kası doku örnekleri alındı.

İskemi-reperfüzyon gruplarında İ/R süresi sonunda, kontrol grubunda ise aynı süre tamamlandıktan sonra, tüm ratlardan intrakardiyak 4-5cc kan, akciğer, gastroknemius kası, karaciğer, kalp, böbrek doku örnekleri alınarak sakrifiye edildi. Çalışma sırasında mortalite saptanmadı.

3.5. Biyokimyasal işlemler

3.5.1. Kullanılan aletler :

3.5.1.1. Spektrofotometre (Ultraspec 3000, Pharmacia Biotech).

3.5.1.2. pH metre (HANNA Instruments, Portugal).

3.5.1.3. Vorteks (MS 2 Minishaker, İKA).

3.5.1.4. Santrifüj (Megafuge 1.0 R, Heraeus; Mikro 24-48 R, Hettich).

3.5.1.5. Su banyosu (BM 101, Nüve).

3.5.1.6. Manyetik karıştırıcı (İKAMAG RH, İKA basic labortechnic).

3.5.1.7. Pipet takımı (Biohit, Proline).

3.5.1.8. ELISA (Elx800, Bio-Tek)

3.5.1.9. Homojenizasyon aleti

3.5.1.10. Sonikasyon aleti

3.5.2. Kullanılan Kimyasal Malzemeler

3.5.2.1. Sodyumdodesil sülfat (SDS)

3.5.2.2. Sodyum hidroksit

- 3.5.2.3.Sodyum klorür
- 3.5.2.4. Tris (hidroksimetil) aminometan (Tris baz)
- 3.5.2.5. 5, 5'-Dithio-bis 2-nitrobenzoik asid (DTNB)
- 3.5.2.6. Triklorasetik asit
- 3.5.2.7. Tiyobarbitürik asit
- 3.5.2.8. Hidroklorik asit
- 3.5.2.9. 1,1,3,3-tetraetoksipropan (TEP) standardı
- 3.5.2.10. Potasyum fosfat
- 3.5.2.11. Riboflavin
- 3.5.2.12. o-dianisidin
- 3.5.2.13. SOD standardı (100 IU/ml)
- 3.5.2.14. Sodyum azid
- 3.5.2.15. NADPH
- 3.5.2.16. Glutasyon
- 3.5.2.17. Glutasyon redüktaz
- 3.5.2.18. Kumen hidroperoksit
- 3.5.2.19. Hidrojen peroksit
- 3.5.2.20. Glasiyal metafosforik asit
- 3.5.2.21. Absölü metanol
- 3.5.2.22. Hexadecyltrimethlammanium bromide
- 3.5.2.23. Bişiklinik asit

3.5.3. Serumda Yapılan İncelemeler

Serumda MDA ve total-SH düzeyleri ile GSH-Px, SOD ve KAT aktiviteleri ölçüldü.

3.5.4. Karaciğer, Kalp, Akciğer, Böbrek, Gastroknemius kası ve Kalp dokularında yapılan incelemeler

Sıçanların Karaciğer, kalp, akciğer, böbrek ve gastroknemius kası dokularında MDA ve GSH düzeyleri ile SOD, GSH-Px, katalaz, miyeloperoksidaz aktiviteleri ölçüldü. MDA ve GSH düzeyleri dokuların 0.15 M KCl (Potasyum klorür) 'de hazırlanan %10'luk (w/v) doku homojenatlarında tayin edildi. SOD ve GSH-Px aktiviteleri ise bu homojenatlardan kademeli santrifüj yapılarak elde edilen postmitokondri fraksiyonunda belirlendi. Katalaz aktivitesi dokuların 50mM potasyum fosfat tamponunda (%10'luk (w/v) doku homejenatlarında tayin edildi.

Miyeloperoksidaz aktivitesi ise %1 hexadecyltrimethylammonium bromid (HTAB) tamponunda hazırlanarak tayin edildi.

3.5.5. Doku homojenatlarının hazırlanması ve postmitokondri fraksiyonlarının eldesi

İşlem: Karaciğer, kalp, akciğer, böbrek ve gastroknemius kas dokuları tartıldı ve Potter-Elvehjem doku homojenizatöründe soğuk 0.15 M KCl çözeltisi ile homojenize edilerek %10'luk homojenatları (w/v) hazırlandı.

Postmitokondri fraksiyonu eldesi için, doku homojenatları öncelikle 4°C ayarlanmış soğuk santrifüjde 600 x g'de 10 dakika santrifüj edildi. Daha sonra süpernatant alınarak ependorf santrifüjünde 10000 x g'de 20 dakika santrifüj edildi, süpernatant alındı ve -80°C'de derin dondurucuda saklandı.

3.5.6. Malondialdehit (MDA) düzeylerinin ölçülmesi (92):

Prensip: Oksidatif stresi belirlemede, lipid peroksidasyonunun göstergesi olarak MDA düzeyleri ölçülür. Oluşan MDA, 100°C'de tiyobarbitürik asit (TBA) ile reaksiyona girer ve 535 nm'de spektrofotometrik olarak absorbans veren renkli bir ürün oluşur.

İşlem: 0.5ml örnek üzerine 0.5ml distile su ve 2ml TCA-TBA-HCl ayıracı eklendi. 15dk 100°C'deki su banyosunda kaynatıldıktan sonra soğutuldu ve 10dk 3000 rpm santrifüj edilerek elde edilen süpernatantın absorbansı köre karşı okundu.

Ayırıcılar: Triklorasetik asit-tiyobarbitürik asit-hidroklorik asit ayıracı (TCA-TBA-HCl): 375 mg TBA, 15ml %100'lük TCA ve 2.1ml derişik HCl karıştırılarak 100ml'ye distile su ile tamamlandı.

1,1,3,3-tetraetoksipropan (TEP) standardı:10mM stok standard:22mg TEP 10ml distile suda çözüldü. 10nmol/ml çalışma standardı: 10mM stok standarttan 100µl alındı ve 100ml'ye distile su ile tamamlandı.

Sonuçların hesaplanmasında ekstinksiyon katsayısı ($\epsilon = 1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) kullanıldı ve sonuçlar nmol MDA/mgprotein , serum için nmol/ml olarak verildi.

3.5.7. Glutasyon (GSH) düzeylerinin ölçülmesi (93):

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

İşlem: Dokuların 0.15 M KCl'deki %10'luk homojenatlarından 0.5 ml alındı. Hacimler 0.15M KCl ile 2 ml'ye tamamlandı. Daha sonra 3 ml proteinsizleştirme çözeltisi eklendi ve bu karışım 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. 0.5 ml supernatan alınarak üzerine 2 ml 0.3 M Na₂HPO₄ ve 0.5 ml Ellman ayıracı ilave edildi. Oluşan renk 412 nm'de ayıraç körüne karşı okundu.

Ayırıcılar:

- Proteinsizleştirme çözeltisi: 1.67 g glasiyal metafosforik asit, 200 mg Na-EDTA ve 30 g NaCl 100 ml distile suda çözüldü.
- 0.3 M Na₂HPO₄: 42.6 g Na₂HPO₄ 1000 ml distile suda çözüldü.
- Ellman Renk Ayıracı: 4 mg 5,5'-ditiyobis-(2-nitrobenzoik asit) 10 ml % 1'lik sodyum sitrat çözeltisinde çözüldü.
- GSH standardı: (0.1 mg/ml)

Hesap: GSH düzeyleri ekstinksiyon katsayısı $13600 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ ve standart kullanılarak hesaplandı ve sonuçlar nmol GSH/mg protein olarak tanımlandı.

3.5.8.Total -SH düzeylerinin ölçülmesi (94):

Plazma total tiyol seviyesi glutatyon, sistein, albümin ve diğer protein yapılarıdaki SH grupları tarafından oluşturulmaktadır. Bu tiyol grupları vücudu oksidatif strese korumaya çalışan doğal antioksidanlardır ve oksidatif stresin değerlendirilmesinde kullanılmaktadır. -SH grupları DTNB reaktifi ile alkali ortamda kromojen bileşik meydana getirmektedir. Bu bileşiğin 412 nm’de verdiği absorbansın örnek körüne karşı okunmasıyla total-SH düzeyi belirlenmektedir.

İşlem aşağıda Tablo 3.4.3’te gösterildiği gibi gerçekleştirildi. Her bir örnek için ayrı kör yapıldı. Tüm tüpler karıştırıldıktan sonra ağzları kapatıldı ve 15-20 dk oda sıcaklığında bekletildi. 3000 g’de 10 dk santrifüj edildi ve süpernatant 412 nm’de köre karşı okundu.

Tablo3.1. Total –SH düzeyi ölçüm işlemi

	Kör	Deney
Plazma	0,1 ml	0,1 ml
Tampon	0,3 ml	0,3 ml
DTNB	-	0,02 ml
Absolü metanol	1,6 ml	1,58 ml

Ayırıcılar:

- 10 mM DTNB (5,5'-Dithio-bis 2-nitrobenzoik asid): 4 mg DTNB 1 ml absolü metanolde çözöldü.
- 0,25 M Tris-HCl, 3mM EDTA tamponu (pH:8.2): 30,275 g Tris 7,4 g EDTA 800 ml distile suda çözölür HCl ile pH 8,2’ye ayarlanır ve 1 litreye tamamlanır.
- Absolü metanol

Hesap: Sonuçların hesaplanmasında ekstinksiyon katsayısı ($\epsilon = 13,6 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

kullanıldı. Sonuçlar $\mu\text{mol/ml}$ serum olarak verildi.

3.5.9. Süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesinin ölçülmesi (95):

SOD aktivitesi, riboflavin ile duyarlandırılmış o-dianisidinin fotooksidasyon hızını artırma yeteneği olarak ölçülür. Riboflavinin floresans ışığı etkisiyle oluşturduğu süperoksit radikali, ortamdaki SOD'un etkisiyle hidrojen peroksit'e dönüşür. Hidrojen peroksit ise o-dianisidin ile reaksiyona girerek renkli ürün oluşturur. SOD aktivitesi ne kadar çok ise renkli ürün oluşumu o kadar fazla olur. Oluşan renkli ürün 460 nm'de spektrofotometrik olarak saptanır.

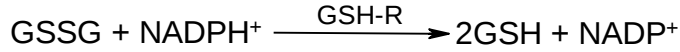
İşlem: Kör, standart ve deney tüplerine sırası ile 2.6 ml 50 mM potasyum fosfat tamponu (pH:7.8), 0.1 ml o-dianisidin ilave edilir. Kör tüpüne 0.1 ml distile su; standard tüpüne 0.1 ml standart; deney tüpüne 0.05 ml postmitokondri fraksiyonu eklendi ve her tüpe 30 saniye ara ile 0.2 ml riboflavin kondu, karıştırıldı ve 460 nm'deki absorbans değerleri okundu. Tüpler 20W floresans lamba içeren 37°C'ye ayarlanmış özel bir kutuya yerleştirildi ve tam 8 dakika süre ile floresans ışığa maruz bırakıldı. Sürenin bitiminde tüplerin absorbansı tekrar 460 nm'de okundu ve iki absorbans arasındaki fark alındı. Ayrıca deney körü ve standart için de aynı işlemler yapıldı.

Ayırıcılar:

- 0.1 mM EDTA içeren 50 mM Potasyum fosfat tamponu (pH 7.8)
- 0.2 mM riboflavin: 7.3 mg riboflavin 100 ml 10 mM potasyum fosfat tamponunda (pH 7.5)' de çözündü.
- 6 mM o-dianisidin: 19 mg o-dianisidin 10 ml distile suda çözündü.
- SOD (100 IU/ml) standardı: Sigma firmasından sağlanan SOD standardı 100 IU/ml olacak şekilde soğuk distile su ile sulandırıldı. Daha sonra bu ana standarttan 0.1 ve 0.05 ml alınarak deney ortamında 10 ve 5 IU SOD standardının bulunması sağlandı.

3.5.10. Glutatyon peroksidaz (GSH-Px) aktivitesinin ölçülmesi (96):

GSH-Px aktivite tayini iki reaksiyon ile gerçekleşir. Birinci reaksiyonda H_2O_2 veya organik hidroperoksitler (ROOH) GSH-Px etkisi ile indirgenirken, ortamdaki GSH oksitlenmiş GSH'a (GSSG) dönüşür. İkinci reaksiyonda GSSG, GSH- redüktaz (GSH-R) etkisi ile tekrar GSH'a, NADPH ise NADP^{+} 'ye oksitlenmektedir. Bu dönüşüm 340 nm'de absorbansda azalma olarak izlenir, çünkü NADPH 340 nm'de bir absorbans verdiği halde, NADP^{+} bu dalga boyunda absorbans vermemektedir.



İşlem: GSH-Px aktivitesi, 1 ml'lik hacimde son konsantrasyonlar 50 mM potasyum fosfat tamponu (pH 7.0), 1 mM EDTA, 1 mM sodyum azid, 0.2 mM NADPH, 1 mM GSH, 0.5 IU/ml glutatyon redüktaz, 1.2 mM kümen hidroperoksit, ve değişik oranlarda sulandırılmış post mitokondri fraksiyonu içerecek şekilde hazırlanmış ortamda tayin edildi. Bu amaçla post mitokondri fraksiyonu sulandırıldı ve ortama 0.05 ml konuldu. Küvetler 37°C'ye ayarlanmış termostatlı spektrofotometreye yerleştirildi ve 1'er dakika arayla spektrofotometrede 340nm'de absorbans değişimi izlendi. Ayrıca post mitokondri fraksiyonu içermeyen ortamda da reaksiyon izlenerek enzimatik olmayan değişim kayıt edildi (kör deney).

Hesap: Sonuçlar NADPH'in ekstinksiyon katsayısı olan $6.22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ 'den yararlanılarak hesaplandı sonuçlar nmol NADPH/mg protein/dakika, serum için nmol/ml olarak belirtildi.

3.5.11. Miyeloperoksidaz (MPO) aktivitesinin ölçülmesi (97):

Reaksiyon peroksidaz içeren bir solüsyonla okside olabilen bir substrat (o-dianisidine dihidrochloride) ve H_2O_2 varlığında gerçekleşir. Peroksidaz enzimi H_2O_2 varlığında o-dianisidine dihidrochlorid ışığı 460 nm'de absorblayan bir chromophor'a oksitler.

Ayırıcılar:

- % 0.5 HTAB (Hexadecyltrimethylammonium bromide)
- 100 mM Potasyum fosfat tamponu (pH: 6.0)
- O-dianisidine dihydrochloride
- Hidrojen peroksit (H_2O_2)
- Çalışma ayırıcı: o-dianisidine/%0.0005 H_2O_2 : taze hazırlanır. 16.7 mg o-dianisidine 100 ml 50 mM fosfat tamponunda çözülür ve 200 µl %0.3 H_2O_2 eklenir.

İşlem: Dokudaki mieloperoksidaz aktivitesi o-dianisidine yöntemi ile ölçüldü. Doku örnekleri potasyum fosfat tamponu içeren pH'ın 6.0 olduğu 100 mmol/L hacminde

%1 'lik hekzadekiltrimetilamonyum bromid tamponunda homojenize edildi. Homojenat örnekleri 10 sn boyunca sonikasyon edildikten sonra 3 kere dondurulup çözündürüldü. Daha sonra 4 °C 'de 15.000 xg 'de 15 dakika boyunca santrifüj edildi. Oluşan süpernatantın 100 µL üzerinede 2.9 ml o- dianisidine çalışma ayıracı eklendi. Absorbanstaki değişiklikler 460 nm'de belirli aralıklarla 3 dk süresince izlendi. 1 ünite miyeloperoksidaz 25 °C sıcaklıkta 1µmol/dk/g yaş doku H₂O₂ 'nin parçalanmasını sağlayan aktivite birimidir.

Hesap: Sonuçlar MPO'nun ekstinksiyon katsayısı olan 1.0062x10⁴ M⁻¹x cm⁻¹'den yararlanılarak hesaplandı sonuçlar U/mg protein/dakika olarak belirtildi.

3.5.12. Katalaz (KAT) aktivitesinin ölçülmesi (98):

Bir ünite katalazın 1 nmol hidrojen peroksiti bir dakikada ayrıştırması prensibine dayanılarak, meydana gelen renk değişimi spektrofotometrik olarak saptanmaktadır.

İşlem: Hazırlanan postmitokondriden termostatlı spektrofotometrede 37 °C 'lık deney ortamına 30 µl örnek üzerine 670 µl H₂O₂ , serum için 5 µl serum üzerine 690 µl H₂O₂ konulduktan sonra absorbanstaki renk değişimi 240 nm de spektrofotometrede ölçüldü.

Ayırıcılar:

- 50mM Potasyum fosfat tamponu (pH: 7.4)
- 14 mM H₂O₂ (Potasyum fosfat tamponunda hazırlanır)

Hesap: H₂O₂'nin ekstinksiyon katsayısı olan 40 M⁻¹xcm⁻¹'den yararlanılarak hesaplandı ve µmol /mgprotein doku ve µmol/ml plazma olarak tanımlandı.

3.5.13. Protein tayini (99):

Doku homojenatlarında ve postmitokondri fraksiyonlarında protein miktarı bişikoninik asit metodu ile belirlendi.

İşlem: 200 µl protein renklendirici ayırıcı üzerine değişik oranda sulandırılmış doku homojenatlarından veya post mitokondri fraksiyonlarından 10 µl ilave edildi. Karıştırıldıktan sonra 37⁰ C'de 30 dakika beklendi. Oda ısısında soğutuldu ve oluşan rengin absorbansı 562 nm'de ELİSA'da okundu.

Ayır  lar:

- Bi ikonik asit (Bicinchoninic acid solution=Sigma B 9643)
- %4 CuSO₄
- Protein renklendirme ayır  :10 ml bi ikonik asit   z ltesi üzerine 0.2 ml %4 Cu SO₄ ekleyerek hazırlandı.

3.6.İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizin yapılmasında bilgisayar programı olarak SPSS 15 kullanıldı. Sayısal değişkenler ‘ortalama ± standart sapma’ şeklinde sunuldu. İstatiksel değerlendirmeler için One-Way ANOVA (post-hoc Turkey) testi kullanıldı. Biyokimyasal bulguların istatistiksel değerlendirilmesi sırasında gruplar arasındaki anlamlı farkların belirlenmesinde Kruskal-Wallis testi, iki grup arasındaki farkın belirlenmesinde de Mann- Whitney U testi kullanıldı. Kruskal- Wallis testi için $p < 0.01$ değerleri ve Mann-Whitney U testi için $p < 0.05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4.BULGULAR

4.1.Biyokimyasal Bulgular

4.1.1. Serum değerleri biyokimyasal değerlendirme sonuçları

Deney gruplarının Serum MDA,Total-SH GSH, SOD, GSH-PX, KAT, değerleri sırasıyla Tablo 4.1, 4.2 ve 4.3'te; bu değerlerin gruplara göre ortalama ve standart sapmaları Tablo 4.4'te gösterilmiştir.

Tablo 4-1: Kontrol grubu serum biyokimyasal değerlendirme sonuçları

Kontrol serum	mda nmol/ml	gshnmol/ml	sodU/ml	gpxnmol/ml	Katalaz mikromol/ ml
1	3.1104	294	13.5108	420.8	118.125
2	3.7632	279.3	10.7586	353.6	73.125
3	4.3008	269.01	12.0096	321.6	88.125
4	3.6864	273.42	11.5092	307.2	125.625
5	5.0304	260.19	12.51	312	133.125
6	4.608	271.95	14.0112	308.8	130
7	4.5312	235.2	9.0072	281.6	102.5
8	3.2256	294	11.0088	308.8	120.625

Tablo 4-2 : IR+SF grubu serum biyokimyasal sonuçları

I/R+ SF serum	mda nmol/ml	gshnmol/ml	sodU/ml	gpxnmol/ml	Katalaz mikromol/ ml
1	2.3808	296.94	11.5092	484.8	153.75
2	2.6112	244.02	10.7586	374.4	99.375
3	2.0736	277.83	13.5108	334.4	110.625
4	2.3424	295.47	12.2598	336	148.75
5	2.2272	258.72	14.5116	337.6	93.75
6	2.5728	224.91	14.0112	377.6	127.5
7	2.6112	174.93	11.7594	299.2	132.5
8	2.3040	288.12	12.0096	372.8	133.125

Tablo 4-3: Ozon grubu Serum biyokimyasal sonuçları

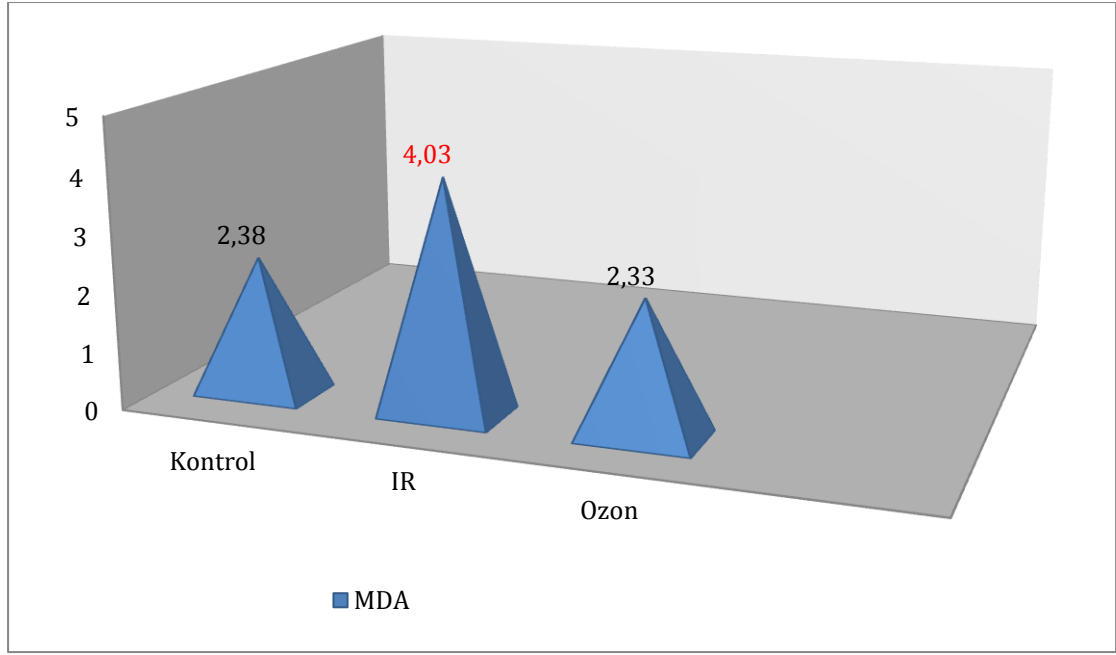
Ozon serum	mda nmol/ml	Gsh nmol/ml	Sod U/ml	Gpx nmol/ml	Katalaz mikromol/ ml
1	2.3808	267.54	13.2606	356.8	100
2	2.6112	261.66	10.008	265.6	127.5
3	2.3808	264.6	10.5084	296	88.75
4	2.4576	270.48	13.5108	235.2	93.75
5	2.0736	273.42	13.5108	460.8	190
6	2.3808	258.72	10.5084	254.4	121.25
7	2.2656	249.9	10.5084	353.6	128.125
8	2.0352	219.03	11.7594	350.4	141.25

Tablo 4-4: Kontrol, İskemi-Reperfüzyon+SF, Ozon tedavisi yapılan sıçanlarda serum MDA ve total-SH düzeyleri ve süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz, Katalaz aktiviteleri (ortalama $\pm$ SD).

	MALONDİA LDEHİT (nmol/ml) (n=8)	Total -SH (μM/L) (n=8)	SÜPEROKSİT DİSMUTAZ (U/ml) (n=8)	GLUTATYON PEROKSİDAZ (nmol/dak/ml) (n=8)	KATALAZ μmol/ml (n=8)
SERUM					
KONTROL	2.38 $\pm$ 0.19 ^a	257.61 $\pm$ 42.10 ^a	12.54 $\pm$ 1.32 ^a	364.60 $\pm$ 55.44 ^a	124.92 $\pm$ 21.90 ^a
İ/R+SF	4.02 $\pm$ 0.68 ^b	272.13 $\pm$ 18.99 ^a	11.79 $\pm$ 1.60 ^a	326.80 $\pm$ 42.88 ^a	111.40 $\pm$ 21.50 ^a
OZON	2.33 $\pm$ 0.19 ^a	258.16 $\pm$ 17.42 ^a	11.69 $\pm$ 1.51 ^a	321.60 $\pm$ 73.91 ^a	123.82 $\pm$ 32.55 ^a

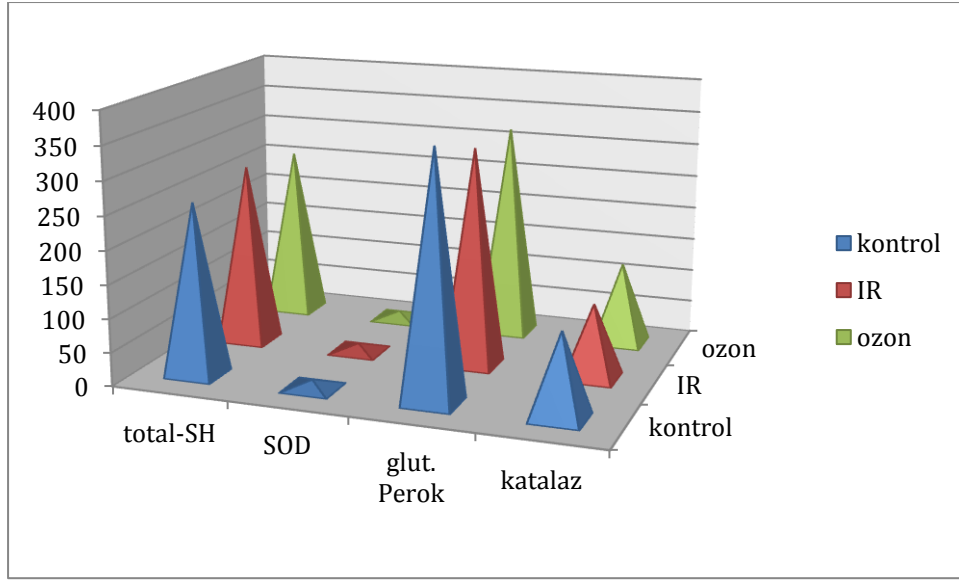
Aynı harfi paylaşmayan değerler istatistiksel olarak anlamlıdır

MDA plazma değeri, İR+SF grubunda kontrol grubu plazma değerine göre anlamlı olarak arttığı ($p < 0.05$), Ozon grubunda ise plazma MDA değeri İR+SF grubu plazma değerine göre anlamlı olarak azaldığı ($p < 0.05$) saptandı. Total-SH, SOD, Glutatyon peroksidaz, katalaz plazma düzeyleri Kontrol, İR+SF ve Ozon gruplarının plazma değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı (Tablo 4-4).



Şekil 4-1: MDA'nın (μmol/L) gruplar arası değerlerinin grafiksel analizi

İR+SF grubunda plazma MDA değerinin kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde arttığı bulundu. Ozon grubu plazma MDA değerlerinin ise İ/R + SF grubuna göre anlamlı düzeyde azaldığı bulundu ($p < 0.05$). Kontrol grubu plazma MDA değerleri ile Ozon grubu plazma MDA değerleri arasında anlamlı fark bulunamadı ($p > 0.05$) (Tablo 4-4, şekil 4-1).



Şekil 4-2: Total –SH ($\mu\text{M/L}$) , SOD (U/ml), Glutasyon peroksidaz (nmol/dak/ml), Katalaz enziminin ($\mu\text{mol/ml}$) plazma değerlerinin gruplar arası grafiksel analizi

Gruplara ait Total –SH , SOD, Glutasyon peroksidaz, Katalaz enziminin plazma değerlerinin gruplar arası karşılaştırılmasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p>0.05$) (Tablo 4-4, şekil 4- 2).

4.2. Doku grupları biyokimyasal değerlendirme sonuçları

Tablo 4-5: Kontrol grubu KC dokusu biyokimyasal değerlendirme sonuçları

KC	mda nmol/ml	mda nmol/ mgpro o	Gsh nmol/ml	Gsh nmol/mg protein	Sod U/ml	SODU/m g protein	Gpx nmol/ml	Gpx nmol/mgf protein	Kat mmol/ ml	kat mm ol/m gpr/ dk	mpo nmol/ml	mpon mol/m gpr	mpo için pr	kat için pr
1	11.0	0.63	401.40	22.96	149.37	10.37	6016.	417.80	11.37	0.65	691.20	90.0	7.68	17.48
2	10.3	0.61	546.96	32.17	142.10	10.52	4888.	361.80	6.46	0.38	967.95	83.9	11.54	17
3	8.8	0.48	538.14	29.50	137.11	9.38	5944.	406.80	6.12	0.34	766.80	64.0	11.98	18.24
4	8.2	0.40	577.84	28.33	142.56	11.21	6528.	513.20	7.66	0.38	689.85	62.5	11.04	20.4
5	10.1	0.56	502.85	27.75	138.47	9.07	5000.	327.40	6.37	0.35	697.95	50.7	13.76	18.12
6	11.6	0.67	388.17	22.41	133.48	9.73	7040.	513.10	5.54	0.32	405.00	29.3	13.82	17.32
7	12.4	0.68	383.76	21.23	142.56	10.11	6880.	487.90	9.41	0.52	371.25	24.8	14.96	18.08
8	9.8	0.55	419.05	23.54	134.84	9.01	5256.	351.10	11.33	0.64	633.15	37.1	17.08	17.8

Tablo 4-6: Kontrol grubu miyokard dokusu biyokimyasal değerlendirme sonuçları

Myokd	mda nmo l/ml	mda nmol/ mgpr o	Gsh nmol/ml	Gsh nmol/m g protein	sodU/ml	SOD U/mg protei n	Gpx nmol/m l	Gpx nmol/m gfpptei n	katm mol/ ml	kat mmol /mgpr /dk	mpo nmol/ml	Mpo nmol/m gpr	mpo için pr	kat için pr
1	3.9	0.26	458.74	30.83	53.12	7.04	2624.	347.5	5.00	0.34	564.30	42.00	13.44	14.88
2	4.0	0.34	485.21	40.71	74.00	10.1	2192.	301.1	1.50	0.13	772.20	60.20	12.82	11.92
3	5.9	0.32	621.95	33.73	70.82	8.74	1920.	237.0	2.58	0.14	579.15	40.20	14.42	18.44
4	4.1	0.29	361.70	25.76	62.65	7.16	1928.	220.3	1.67	0.12	558.90	64.80	8.62	14.04
5	4.2	0.31	494.03	36.87	63.11	7.17	1776.	201.8	1.17	0.09	607.50	39.70	15.30	13.4
6	3.5	0.24	511.68	35.34	63.11	7.79	2344.	289.4	1.00	0.07	666.90	58.90	11.32	14.48
7	3.1	0.31	414.63	40.65	67.19	8.90	2000.	264.9	1.50	0.15	441.45	35.80	12.32	10.2
8	6.4	0.31	617.54	29.63	49.94	6.32	1696.	214.7	1.33	0.06	756.00	54.30	13.92	20.84

Tablo 4-7: Kontrol Grubu akciğer dokusu biyokimyasal değerlendirme sonuçları

A	mda	mda	Gsh	Gsh	sodU/ml	SODU	Gpx	Gpx	Kat	kat	mpo	mpon	mpo	kat için
k	nmol	nmol/	nmol	nmol/m		/mg	nmol/ml	nmol/m	mmol/	mmol/	nmol/ml	mol/m	 için pr	pr
c	/ml	mgpr	ml	g		protei		gfprtein	ml	mgpr/		gpr		
		o		protein		n				dk				
1	6.4	0.35	617.54	33.78	53.12	5.74	2392.0	258.6	1.17	0.06	426.6	40.9	10.44	18.28
2	5.3	0.30	476.39	26.41	42.22	4.47	1320.0	139.8	1.67	0.09	251.1	29.8	8.44	18.04
3	7.0	0.34	458.74	22.49	33.60	3.54	1096.0	115.4	3.21	0.16	378.0	33.2	11.40	20.4
4	6.5	0.43	480.80	31.55	41.31	4.86	1176.0	138.4	1.67	0.11	450.9	46.4	9.72	15.24
5	7.6	0.48	467.57	29.67	29.51	4.07	1096.0	151.2	1.71	0.11	356.4	43.9	8.12	15.76
6	5.3	0.47	582.25	51.62	37.23	7.74	1232.0	256.1	1.67	0.15	253.8	38.9	6.52	11.28
7	6.8	0.34	361.70	18.16	61.74	7.14	1024.0	118.4	4.41	0.22	307.8	28.4	10.82	19.92
8	4.8	0.37	361.70	28.17	66.28	8.39	1088.0	137.7	2.79	0.22	140.4	25.4	5.52	12.84

Tablo 4-8: Kontrol grubu böbrek dokusu biyokimyasal değerlendirme sonuçları

B o b r	mda nmol/ ml	mda nmol/ mgpr o	Gsh nmol ml	Gsh nmol/m g protein	sodU/ml	SODU/ mg protein	gpxnmol/ ml	Gpx nmol/m g prtein	Kat mmol/ ml	kat mmol/ mgpr/ dk	mpo nmol/ml	mpon mol/ mgpr	mpo için pr	kat için pr
1	21.7	2.00	361.70	33.24	101.70	13.93	1360.0	186.3	2.92	0.27	280.80	24.9	11.26	10.88
2	19.6	1.19	401.40	24.48	84.44	11.26	920.0	122.7	2.21	0.13	307.80	26.5	11.62	16.4
3	22.5	1.47	613.13	40.13	88.98	11.12	1264.0	158.0	2.12	0.14	481.95	42.4	11.38	15.28
4	16.7	1.12	661.65	44.47	92.62	11.58	1016.0	127.0	1.83	0.12	286.20	16.8	17.08	14.88
5	16.6	1.60	546.96	53.00	103.51	11.88	1472.0	169.0	2.58	0.25	257.85	22.3	11.54	10.32
6	15.9	1.23	560.20	43.09	101.7	11.56	1560.0	177.3	2.29	0.18	302.40	26.0	11.62	13
7	20.4	1.21	635.18	37.72	99.88	14.27	1440.0	205.7	3.46	0.21	252.45	20.3	12.42	16.84
8	16.5	1.21	577.84	42.24	85.35	11.77	2552.0	352.0	2.12	0.16	241.65	21.7	11.12	13.68

Tablo 4-9: Kontrol grubu gastrocnemius kas dokusu biyokimyasal değerlendirme sonuçları

Kas Knt	mda nmol/ ml	mda nmol/ mgpro	gshnmolml	gshnmol/ mg protein	sodU/ml	SODU/ mg protei n	gpxnmol/ ml	gpxnmol /mgf prtein	Kat mmol/ ml	kat mmol/ mgpr/d k	mpo nmol/ml	Mpo nmol/mg pr	mpo için pr	kat için pr
1	7.4	0.44	573.43	33.57	29.06	6.40	1024.0	225.6	1.08	0.06	95.85	11.80	8.12	17.08
2	3.8	0.36	432.28	41.09	25.42	5.98	1504.0	353.9	0.96	0.09	110.70	10.20	10.82	10.52
3	3.5	0.34	494.03	47.14	43.13	8.56	1704.0	338.1	0.92	0.09	66.15	5.50	12.06	10.48
4	4.0	0.34	339.65	28.69	39.50	8.14	1560.0	321.6	0.87	0.07	66.15	6.90	9.60	11.84
5	2.5	0.24	357.29	35.17	36.32	7.90	1632.0	354.8	0.96	0.09	76.95	8.90	8.62	10.16
6	4.8	0.23	392.58	18.91	23.15	5.79	1392.0	348.0	1.12	0.05	103.95	12.70	8.18	20.76
7	4.4	0.24	374.94	20.74	31.33	5.80	1680.0	311.1	0.83	0.05	49.95	8.60	5.84	18.08
8	6.3	0.35	396.99	22.01	28.15	4.73	1744.0	293.1	0.92	0.05	101.25	23.40	4.32	18.04

Tablo 4-10 : İ/R + SF grubu KC dokusu biyokimyasal değerlendirme sonuçları

İ / R + S F	mda nmol/m l	mda nmo l/mg pro	gshnmol ml	gshnmo l/mg protein	sodU/ml	SODU/ mg protein	gpxnmo l/ml	gpxnm ol/mgf prtein	katm mol/ ml	kat mmol/ mgpr/ dk	mpo nmol/m l	mponm ol/mgpr	mpo için pr	kat için pr
1	12.6	1.22	299.95	29.06	127.12	14.65	1856.0	213.8	7.87	0.76	889.65	64.5	13.80	10.32
2	18.0	1.09	216.14	13.02	162.53	18.06	1464.0	162.7	4.58	0.28	918.00	74.5	12.32	16.6
3	11.7	0.90	229.37	17.64	207.93	16.63	1792.0	143.4	10.04	0.77	1111.05	99.4	11.18	13
4	17.5	0.80	269.07	12.21	174.34	15.85	1808.0	164.4	7.16	0.33	1032.75	82.0	12.60	22.04
5	12.7	0.66	317.59	16.58	169.80	16.98	1880.0	188.0	7.16	0.37	1620.0	160.1	10.12	19.16
6	11.1	0.76	361.70	24.77	155.27	16.12	1048.0	108.8	7.71	0.53	873.45	70.6	12.38	14.6
7	16.8	0.82	401.40	19.60	109.87	10.77	3064.0	300.4	6.50	0.32	1547.1	158.5	9.76	20.48
8	10.6	0.51	410.22	19.57	145.28	15.36	1656.0	175.1	7.91	0.38	1493.1	188.5	7.92	20.96

Tablo 4-11: İ/R + SF grubu miyokard dokusu biyokimyasal değerlendirme sonuçları

İ/ R + SF	mda nmol/ ml	mda nmol/ mg pr	Gsh nmolml	Gsh nmol/ mg protein	Sod U/ml	SODU /mg protei n	gpxnmo l/ml	Gpx nmol/ mgfpr	kat mm ol/ml	kat mm ol/m gpr/ dk	mpo nmol/ml	Mpo nmol/mgp r	mpo için pr	kat için pr
1	7.80	0.43	361.70	19.83	182.51	26.07	1736.0	248.0	1.83	0.10	1769.85	120.10	14.74	18.24
2	6.50	0.45	330.83	23.17	167.07	28.08	1216.0	204.4	3.17	0.22	2012.85	224.60	8.96	14.28
3	7.10	0.50	366.11	26.08	148.91	27.07	1256.0	228.4	2.17	0.15	1489.05	121.90	12.22	14.04
4	6.30	0.43	335.24	23.02	362.29	35.87	1232.0	122.0	1.21	0.08	0.00	118.00	11.08	14.56
5	4.80	0.30	414.63	25.85	150.73	22.17	1280.0	188.2	2.62	0.16	0.00	121.00	11.24	16.04
6	7.30	0.62	361.70	30.65	131.66	21.94	1184.0	197.3	1.96	0.17	1170.45	148.50	7.88	11.8
7	5.10	0.39	335.24	25.63	141.65	23.03	744.0	121.0	1.54	0.12	0.00	114.00	7.76	13.08
8	6.20	0.49	295.54	23.23	108.05	19.12	1184.0	209.6	1.17	0.09	0.00	124.00	6.44	12.72

Not: Tabloda ki 0.00 yazılan parametreler teknik nedenlerle biyokimyasal değerlendirmelerin yapılamadığı veya hatalı çıkan sonuçları göstermekte olup istatistiksel değerlendirme dışında tutulmuştur.

Tablo 4-12: İ/R+SF grubu akciğer dokusu biyokimyasal değerlendirme sonuçları

İ/ R +S F	mda nmol/ ml	mda nmol/ mg pr	Gsh nmolml	Gsh nmol/ mg protei n	Sod U/ml	SOD U/mg protei n	Gpx nmol/m l	Gpx nmol/ mgfpr	Kat mmol/ ml	kat mmol/ mgpr/ dk	mpo nmol/m l	Mpo nmol/m gpr	mpo için pr	kat için pr
1	7.20	0.78	238.19	26.00	82.63	11.80	1200.0	171.4	1.71	0.19	244.35	26.40	9.26	9.16
2	5.90	1.14	295.54	56.83	77.18	13.19	1064.0	181.9	1.37	0.26	170.10	19.90	8.54	5.2
3	6.00	1.03	242.61	41.83	60.84	9.16	1240.0	186.7	2.58	0.45	359.10	40.70	8.82	5.8
4	6.20	1.24	220.55	44.11	54.48	10.18	864.0	161.5	1.75	0.35	184.95	27.80	6.66	5
5	5.70	0.61	291.13	30.84	42.68	6.94	960.0	156.1	1.33	0.14	205.20	28.20	7.28	9.44
6	6.60	1.25	194.08	36.76	43.58	8.38	712.0	136.9	1.62	0.31	175.50	23.60	7.44	5.28
7	7.40	1.35	163.21	29.57	40.86	6.68	848.0	138.6	0.75	0.14	252.45	38.50	6.56	5.52
8	9.80	0.93	220.55	20.96	37.23	7.09	888.0	169.1	0.75	0.07	247.05	33.50	7.38	10.52

Tablo 4-13: İ/R +SF grubu böbrek dokusu biyokimyasal değerlendirme sonuçları

İ/R + SF	mda nmol/ml	mda nmol/ mg pr	Gsh nmolml	Gsh nmol/ mg protei n	Sod U/ml	SODU /mg protei n	Gpx nmol/ml	Gpx nmol/m gfpr	Kat mmo l/ml	kat mmo l/mg pr/d k	mpo nmol/m l	Mpo nmol/ mgpr	mpo için pr	kat için pr
1	28.80	2.13	247.02	18.27	67.19	12.13	880.00	158.8	2.71	0.20	160.65	21.9	7.34	13.52
2	24.70	2.26	295.54	27.06	75.36	13.65	1072.0	194.2	2.83	0.26	118.80	19.0	6.24	10.92
3	28.50	1.85	361.70	23.55	77.18	18.73	1216.0	295.1	2.04	0.13	72.90	11.7	6.24	15.36
4	25.30	2.32	282.30	25.95	71.73	11.04	1344.0	206.8	2.46	0.23	155.25	17.3	8.98	10.88
5	22.70	1.75	211.73	16.39	58.11	9.77	664.00	111.6	3.25	0.25	178.20	11.6	15.34	12.92
6	24.40	1.61	383.76	25.31	72.64	13.16	1248.0	226.1	3.25	0.21	198.45	26.0	7.64	15.16
7	23.60	1.42	286.71	17.27	49.94	8.98	1168.0	210.1	3.00	0.18	162.00	16.1	10.08	16.6
8	23.80	1.79	348.47	26.16	56.30	11.70	1424.0	296.0	4.75	0.36	149.85	15.0	9.98	13.32

Tablo 4-14: İ/R +SF grubu gastroknemius kas dokusu biyokimyasal değerlendirme sonuçları

Kas	mda nmol/ml	mda nmol/mg pr	Gsh nmol/ml	Gsh nmol/mg protein	Sod U/ml	SODU/mg protein	Gpx nmol/ml	Gpx nmol/mgpr	Kat mmol/ml	kat mmol/mgpr/dk	mpo nmol/ml	Mpo nmol/mgpr	mpo için pr	kat için pr
1	4.7	0.32	264.6	18.1	35.87	9.41	688.0	180.6	0.71	0.05	464.4	44.7	10.4	14.56
2	7.6	0.53	194.0	13.5	35.87	8.71	648.0	157.3	2.04	0.14	248.4	32.5	7.64	14.28
3	5.9	0.39	220.5	14.5	26.79	8.50	544.0	172.7	1.21	0.08	521.1	53.5	9.74	15.16
4	7.5	0.70	189.6	17.7	39.50	8.55	664.0	143.7	0.67	0.06	330.75	32.4	10.2	10.68
5	8.4	0.82	202.9	19.8	34.96	9.20	568.0	149.5	1.00	0.10	434.7	38.1	11.40	10.24
6	8.2	0.86	242.6	25.3	37.68	10.05	560.0	149.3	0.92	0.10	479.2	43.3	11.08	9.56
7	6.0	0.45	282.3	21.0	39.04	9.27	712.0	169.1	0.87	0.07	487.3	57.7	8.44	13.44
8	4.2	0.39	264.6	24.4	39.04	8.54	864.0	189.1	1.17	0.11	457.6	54.7	8.36	10.84

Tablo 4-15: Ozon grubu KC dokusu biyokimyasal değerlendirme sonuçları

Ozon KC	mda nmol/ ml	mda nmol/ mg pr	Gsh nmolml	Gsh nmol/m g protein	Sod U/ml	SODU/ mg protein	Gpx nmol/m l	Gpx nmol/m gfpr	Kat mmol /ml	kat mmol/ mgpr/ dk	mpo nmol/ml	Mpo nmol/m gpr	mpo için pr	kat için pr
1	12.4	0.75	485.2	29.44	92.62	9.40	3424.	347.6	9.5	0.58	832.95	98.90	8.42	16.48
2	12.3	0.59	467.5	22.44	107.6	10.63	3696.	365.2	9.8	0.47	1193.4	114.1	10.46	20.84
3	14.1	0.66	520.5	24.46	98.52	10.83	3424.	376.3	10.33	0.49	687.15	80.50	8.54	21.28
4	12.9	0.61	467.5	22.31	98.97	8.84	3536.	315.7	3.96	0.19	1046.2	136.6	7.66	20.96
5	14.0	0.66	516.0	24.25	115.77	11.12	2640.	253.6	9.50	0.45	1053.0	84.40	12.48	21.28
6	12.4	0.59	538.1	25.43	122.58	7.91	5880.	379.4	10.4	0.49	903.15	94.30	9.58	21.16
7	12.2	0.48	661.6	26.21	118.49	9.01	4120.	313.3	12.3	0.49	615.6	69.00	8.92	25.24
8	12.5	0.52	507.2	21.10	115.32	10.37	2920.	262.6	7.58	0.32	718.2	104.1	6.90	24.04

Tablo 4-16: Ozon grubu miyokard dokusu biyokimyasal değerlendirme sonuçları

Ozon	mda nmol/ml	mda nmol/mg pr	Gsh nmol/ml	Gsh nmol/mg protein	Sod U/ml	SODU /mg protein	Gpx nmol/ml	Gpx nmol/mg pr	Kat mmol/ml	kat mmol/mg pr/dk	mpo nmol/ml	Mpo nmol/mg pr	mpo için pr	kat için pr
1	5.60	0.35	485.21	30.48	63.56	7.95	1928.0	241.0	2.62	0.16	965.25	137.90	7.00	15.92
2	5.90	0.26	467.57	20.80	50.85	6.73	1504.0	199.2	1.62	0.07	1167.75	154.90	7.54	22.48
3	4.80	0.22	529.32	24.92	37.23	5.55	1360.0	202.7	2.17	0.10	857.25	137.80	6.22	21.24
4	4.30	0.19	595.49	26.44	34.96	6.83	1336.0	260.9	1.96	0.09	1004.40	150.40	6.68	22.52
5	4.60	0.22	494.03	23.13	28.60	6.30	1040.0	229.1	2.33	0.11	1048.95	121.10	8.66	21.36
6	3.60	0.25	529.32	36.76	21.79	4.25	1472.0	286.9	4.62	0.32	1491.75	165.40	9.02	14.4
7	7.20	0.26	573.43	20.69	20.88	4.14	1472.0	292.1	4.29	0.15	1436.40	175.20	8.20	27.72
8	7.60	0.53	573.43	40.27	41.77	7.31	1216.0	213.0	4.58	0.32	1151.55	148.40	7.76	14.24

Tablo 4-17: Ozon grubu akciğer dokusu biyokimyasal değerlendirme sonuçları

Ozon akc	mda nmol/ ml	mda nmol/ mg pr	Gsh nmolml	Gsh nmol/m g protein	Sod U/ml	SODU /mg protei n	Gpx nmol/ml	Gpx nmol/m gfpr	Kat mmol/ ml	kat mmol/ mgpr/ dk	mpo nmol/ml	Mpo nmol/ mgpr	mpo için pr	kat için pr
1	5.20	0.38	449.92	32.89	43.13	7.83	592.0	107.4	1.50	0.11	340.20	36.7	9.26	13.68
2	4.60	0.40	485.21	41.83	39.50	8.68	816.0	179.3	1.12	0.10	255.15	27.6	9.24	11.6
3	4.40	0.55	286.71	36.02	43.13	7.83	896.0	162.6	1.08	0.14	270.00	29.0	9.32	7.96
4	5.50	0.44	247.02	20.12	36.32	6.32	864.0	150.3	1.50	0.12	280.80	37.8	7.42	12.28
5	5.90	0.50	326.41	28.04	39.95	6.55	656.0	107.5	3.29	0.28	243.00	23.5	10.34	11.64
6	6.10	0.58	396.99	37.45	32.69	5.02	992.0	152.4	1.42	0.13	233.55	24.0	9.74	10.6
7	6.40	0.62	366.11	35.34	24.97	3.12	1344.	168.0	2.25	0.22	226.80	24.5	9.26	10.36
8	6.60	0.65	370.52	36.47	8.17	1.17	1096.	156.6	1.21	0.12	303.75	38.1	7.98	10.16

Tablo 4-18: Ozon grubu böbrek dokusu biyokimyasal değerlendirme sonuçları

B ö b r e k	mda nmol/ ml	mda nmol/ mg pr	Gsh nmolml	Gsh nmol/m g protein	Sod U/ml	SODU /mg protei n	Gpx nmol/ml	Gpx nmol/m gfpr	Kat mmol/ ml	kat mmol/ mgpr/ dk	mpo nmol/ml	Mpo nmol/ mgpr	mpo için pr	kat için pr
1	16.3	1.46	330.83	29.64	46.76	6.23	1264.	168.3	2.42	0.22	118.80	15.9	7.48	11.16
2	16.1	1.60	286.71	28.56	56.30	7.37	1728.	226.2	3.29	0.33	167.40	22.4	7.48	10.04
3	20.0	1.53	414.63	31.80	49.03	6.49	1520.	201.1	4.12	0.32	132.30	18.1	7.32	13.04
4	23.6	1.46	502.85	31.19	44.49	7.16	1424.	229.3	4.58	0.28	217.35	24.8	8.76	16.12
5	19.1	1.06	494.03	27.39	51.76	8.48	1232.	202.0	1.46	0.08	143.10	27.5	5.20	18.04
6	20.0	1.08	494.03	26.56	40.41	6.36	1184.	186.5	2.42	0.13	129.60	18.0	6.54	18.6
7	21.3	1.12	608.72	32.17	48.58	6.23	1528.	195.9	2.92	0.15	140.40	16.0	7.86	18.92
8	22.9	1.27	485.21	26.90	48.58	7.66	1296.	204.4	4.50	0.25	175.50	17.0	10.4	18.04

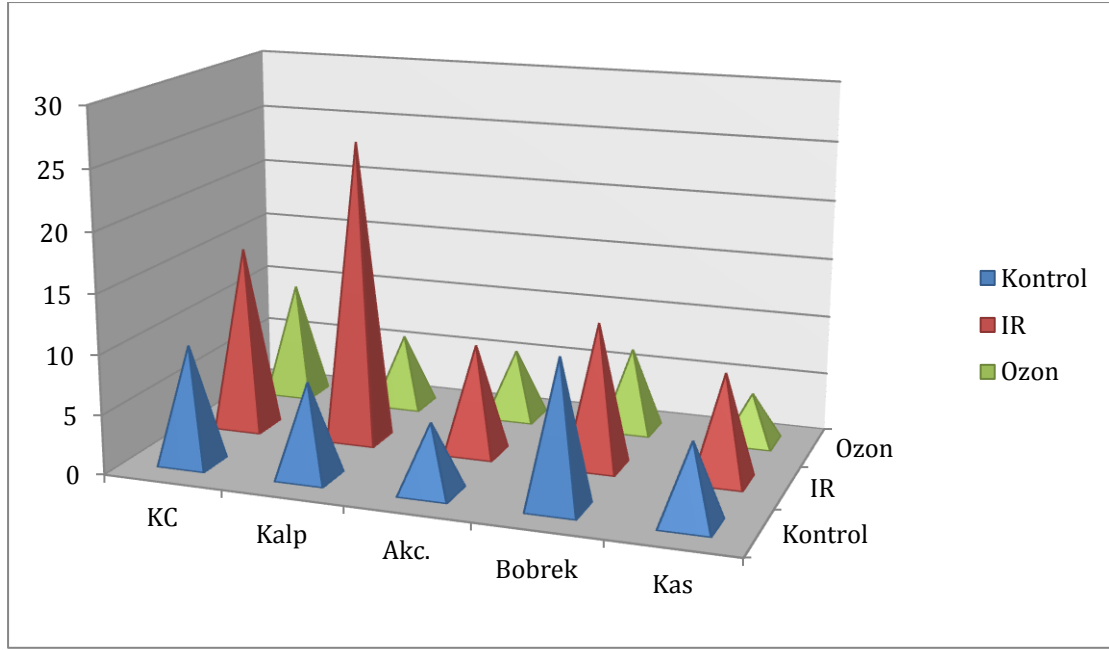
Tablo 4-19: Ozon grubu gastrocnemius kas dokusu biyokimyasal değerlendirme sonuçları

Kas	mda nmol/ml	mda nmol/mg pr	Gsh nmolml	Gsh nmol/mg protein	Sod U/ml	SODU /mg protein	Gpx nmol/ml	Gpx nmol/mgpr	Kat mmol/ml	kat mmol/mgpr/dk	mpo nmol/ml	Mpo nmol/mgpr	mpo için pr	kat için pr
1	3.9	0.21	388.17	20.91	18.16	3.63	800.0	160.0	1.00	0.05	102.6	13.3	7.70	18.56
2	3.6	0.22	370.52	22.54	16.57	3.60	648.0	140.9	2.79	0.17	112.05	12.3	9.14	16.44
3	4.5	0.26	330.83	18.93	27.24	4.54	768.0	128.0	0.92	0.05	63.45	6.5	9.70	17.48
4	4.8	0.26	379.35	20.94	23.84	6.71	648.0	182.5	1.08	0.06	66.15	7.0	9.46	18.12
5	3.1	0.20	361.70	23.19	18.61	3.58	1688.0	324.6	1.37	0.09	79.65	7.1	11.22	15.6
6	4.2	0.31	361.70	26.60	18.61	3.21	1072.0	184.8	0.79	0.06	105.3	12.5	8.44	13.6
7	4.3	0.23	344.06	18.42	23.15	5.09	1216.0	267.3	1.46	0.08	52.65	6.1	8.68	18.68
8	4.0	0.21	313.18	16.55	12.71	3.06	1192.0	287.2	1.92	0.10	89.10	10.1	8.82	18.92

Tablo 4-20: Kontrol, iskemi-reperfüzyon, Ozon tedavisi yapılan sıçanlarda karaciğer, kalp, akciğer, böbrek, kas dokularında süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz, katalaz, miyeloperoksidaz aktiviteleri (ortalama $\pm$ SD).

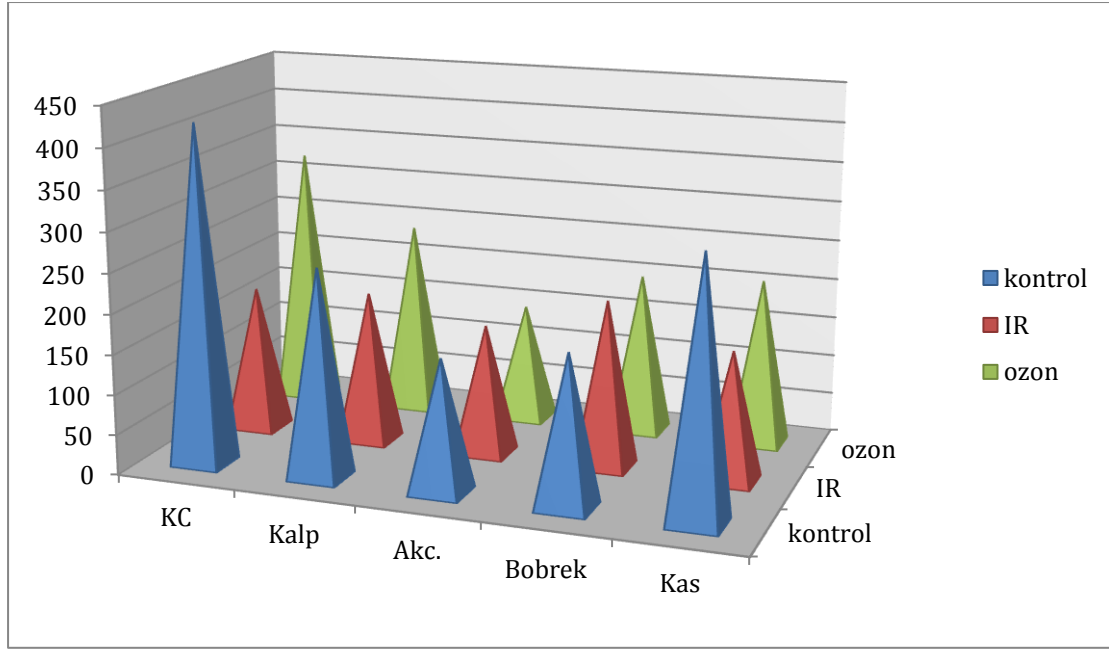
	SÜPEROKSİT DİSMUTAZ (U/mg protein) (n=8)	GLUTATYON PEROKSİDAZ (nmol/dak/mg protein) (n=8)	KATALAZ (μmol/dak/mg protein) (n=8)	MİYELOPEROKS İDAZ (μmol /dak/mg protein) (n=8)
KARACİĞE R				
KONTROL	9.92 $\pm$ 0.76 ^a	422.38 $\pm$ 74.84 ^a	0.44 $\pm$ 0.13 ^a	55.28 $\pm$ 24.22 ^a
İR+SF	15.55 $\pm$ 2.19 ^b	182.07 $\pm$ 56.87 ^b	0.46 $\pm$ 0.19 ^a	112.26 $\pm$ 48.93 ^b
OZON	9.76 $\pm$ 1.13 ^a	326.71 $\pm$ 49.14 ^a	0.43 $\pm$ 0.12 ^a	97.73 $\pm$ 21.15 ^{a,b}
KALP				
KONTROL	7.91 $\pm$ 1.26 ^a	259.58 $\pm$ 50.39 ^a	0.13 $\pm$ 0.08 ^a	49.48 $\pm$ 11.25 ^a
İR+SF	25.42 $\pm$ 5.17 ^b	189.86 $\pm$ 46.09 ^b	0.13 $\pm$ 0.04 ^a	136.51 $\pm$ 37.05 ^b
OZON	6.13 $\pm$ 1.38 ^a	240.62 $\pm$ 36.35 ^{a,b}	0.16 $\pm$ 0.10 ^a	148.88 $\pm$ 16.98 ^{c,b}
AKCİĞER				
KONTROL	5.74 $\pm$ 1.81 ^a	164.45 $\pm$ 58.51 ^a	0.14 $\pm$ 0.05 ^a	35.86 $\pm$ 7.73 ^a
İR+SF	9.17 $\pm$ 2.39 ^b	162.77 $\pm$ 18.33 ^a	0.23 $\pm$ 0.12 ^a	29.82 $\pm$ 7.19 ^a
OZON	5.81 $\pm$ 2.57 ^a	148.01 $\pm$ 26.67 ^b	0.15 $\pm$ 0.06 ^a	30.15 $\pm$ 6.39 ^a
BÖBREK				
KONTROL	12.17 $\pm$ 1.21 ^a	187.25 $\pm$ 72.27 ^a	0.18 $\pm$ 0.05 ^a	25.11 $\pm$ 7.68 ^a
İR+ SF	12.06 $\pm$ 2.98 ^a	208.8 $\pm$ 59.41 ^a	0.20 $\pm$ 0.08 ^a	20.36 $\pm$ 10.22 ^a
OZON	6.99 $\pm$ 0.81 ^b	201.71 $\pm$ 19.82 ^a	0.22 $\pm$ 0.09 ^a	19.96 $\pm$ 4.38 ^a
KAS				
KONTROL	6.66 $\pm$ 1.36 ^a	318.27 $\pm$ 43.36 ^a	0.06 $\pm$ 0.01 ^a	11.00 $\pm$ 5.54 ^a
İR+SF	8.97 $\pm$ 0.57 ^b	161.52 $\pm$ 16.18 ^a	0.09 $\pm$ 0.02 ^a	44.60 $\pm$ 10.73 ^b
OZON	4.17 $\pm$ 1.22 ^c	209.41 $\pm$ 73.44 ^a	0.08 $\pm$ 0.03 ^a	9.36 $\pm$ 3.02 ^a

Doku grupları değerlendirilmesinde ise KC, kalp, akciğer, gastrocnemius kasında SOD aktivitesi İR+SF grubunda kontrol grubuna göre anlamlı arttığı ($p < 0.05$), Ozon grubunda ise İR+SF grubuna göre anlamlı olarak azaldığı ($p < 0.05$) saptandı. Böbrek dokusunda İR+SF grubunda SOD aktivitesinde kontrol grubuna göre anlamlı değişiklik tespit edilmezken, ozon grubunda kontrol grubu ve İR+SF grubuna göre SOD düzeyi anlamlı olarak azalmıştır. Glutasyon peroksidaz aktivitesi KC ve kalp dokusunun İR+SF grubunda kontrol grubuna göre anlamlı azaldığı, ozon grubunda ise İR+SF grubuna göre anlamlı arttığı saptandı. Akciğer dokusu, Glutasyon peroksidaz aktivitesi ise kontrol ve İR+SF grupları arasında anlamlı fark saptanmazken, Ozon grubunda Glutasyon peroksidaz aktivitesinin kontrol ve İR+SF grubuna göre anlamlı azaldığı tespit edildi. Böbrek ve kas dokusunda ise kontrol, İR+SF ve ozon gruplarında Glutasyon peroksidaz aktivitesi istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı. Katalaz enzim düzeyinde doku gruplarında kontrol, İR+SF ve ozon grupları arasında anlamlı fark tespit edilemedi. MPO aktivitesi, KC dokusunun İR+SF grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak artarken, Ozon grubunda İR+SF grubuna göre anlamlı azaldığı tespit edildi. Kalp dokusunda MPO aktivitesinin İR+SF grubunda kontrol grubuna göre anlamlı arttığı tespit edilirken, Ozon grubunda ise İR+SF grubuna göre anlamlı olarak arttığı tespit edilmiştir. Akciğer ve böbrek dokularında MPO aktivitesi gruplar arasında anlamlı farklılık tespit edilememiştir. Kas dokusunda MPO aktivitesi kontrol grubuna göre İR+SF grubunda artmış olarak tespit edilirken, Ozon grubunda ise İR+SF grubuna göre anlamlı azaldığı tespit edilmiştir (Tablo 4-20).



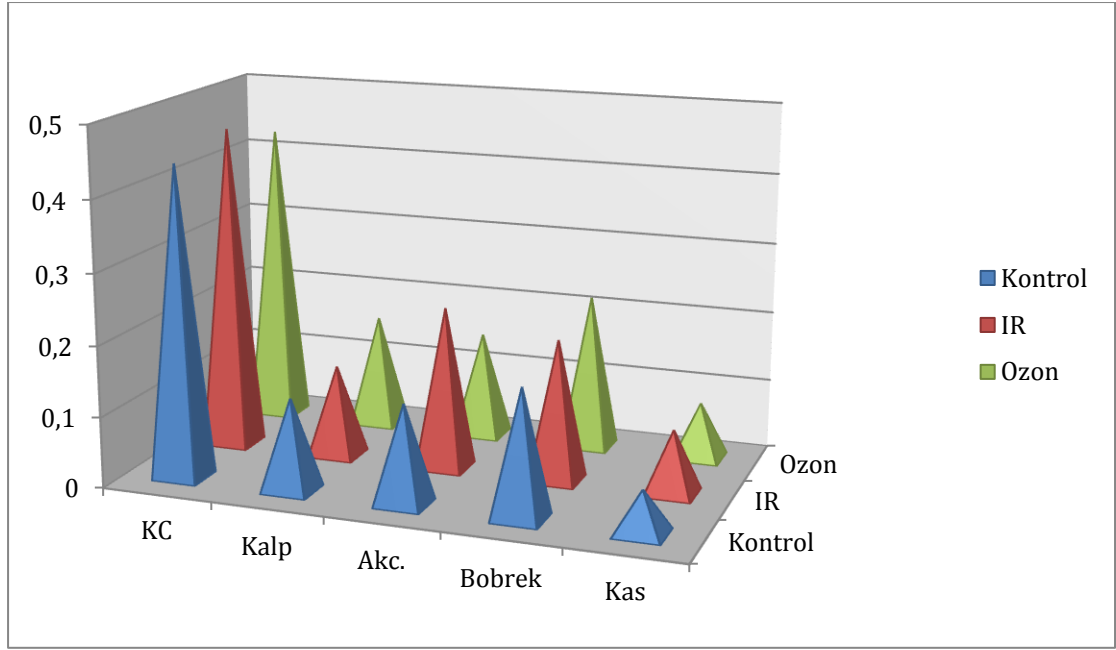
Şekil 4-3: SOD (U/ml) aktivitesinin KC, Kalp, Akc, Böbrek, Kas dokularında gruplar arası değerlerinin grafiksel analizi

KC, akciğer, kas, özellikle kalp dokusunda SOD aktivitesi İR+SF grubunda kontrol grubuna göre anlamlı arttığı ($p < 0.05$), Ozon grubunda ise SOD aktivitesi İR +SF grubuna göre anlamlı olarak azaldığı ($p < 0.05$) saptandı. Böbrek dokusunda SOD aktivitesi İR +SF grubunda, kontrol grubuna göre anlamlı bir değişiklik tespit edilmedi. SOD aktivitesi Ozon grubunda, İR+SF ve kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaldığı tespit edildi (Tablo 4-20, şekil 4-3).



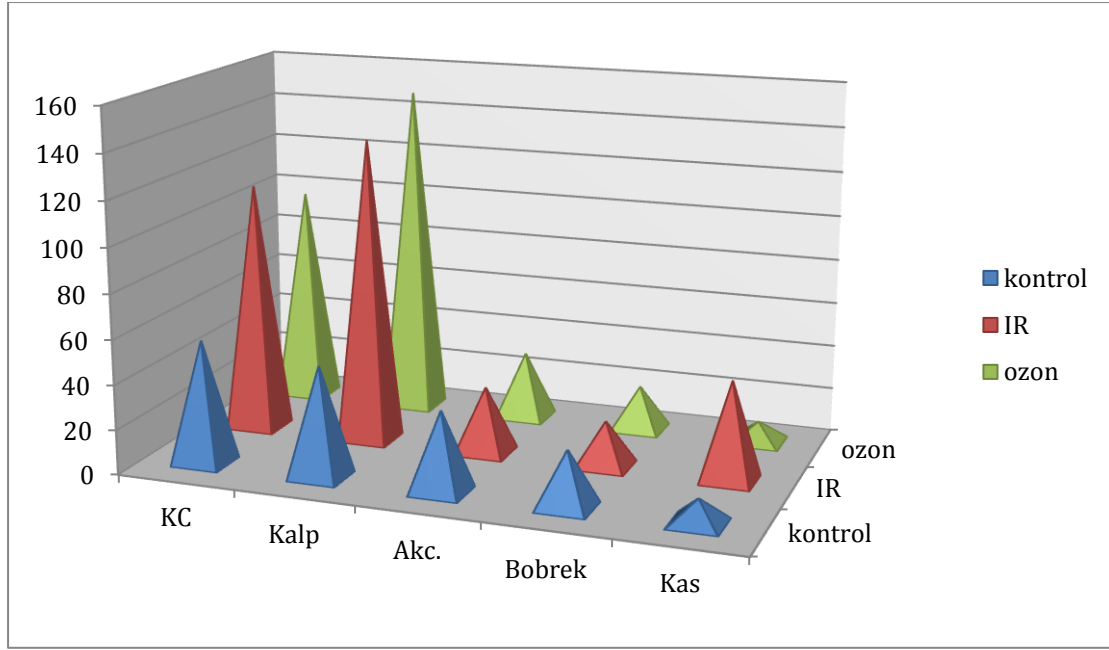
Sekil 4-4: Glutasyon peroksidaz (nmol/dak/mg protein) aktivitesinin KC, Kalp, Akc, Böbrek, Kas dokularında gruplar arası değerlerinin grafiksel analizi

Glutasyon peroksidaz aktivitesi KC ve kalp dokularında , kontrol grubu ile karşılaştırıldığında İR+SF grubunda anlamlı olarak azaldığı, ozon grubunda ise İR+SF grubuna göre anlamlı arttığı saptandı. Akciğer dokusu Glutasyon peroksidaz aktivisinde ise kontrol ve İR gruplar arasında anlamlı fark saptanmazken, Ozon grubunda Glutasyon peroksidaz aktivitesi kontrol ve İR+SF gruplarına göre anlamlı azaldığı tespit edildi. Böbrek ve kas dokusunda ise kontrol, İR+SF ve ozon grupları arasında Glutasyon peroksidaz aktivitesi istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı (Tablo 4-20, şekil 4-4).



Şekil 4-5: Katalaz ($\mu\text{mol/dak/mg}$ protein) aktivitesi KC, Kalp, Akc, Böbrek, Kas dokularında gruplar arası değerlerinin grafiksel analizi

Katalaz enzim aktivitesi , KC, kalp, akciğer, böbrek, kas dokularında kontrol, İR+SF ve ozon grupları arasında değerlendirildiğinde anlamlı fark tespit edilemedi (Tablo 4-20, şekil 4-5).



Şekil 4-6: MPO ($\mu\text{mol/dak/mg protein}$) düzeyinin KC, Kalp, Akc., Böbrek, Kas dokularında gruplar arası değerlerinin grafiksel analizi

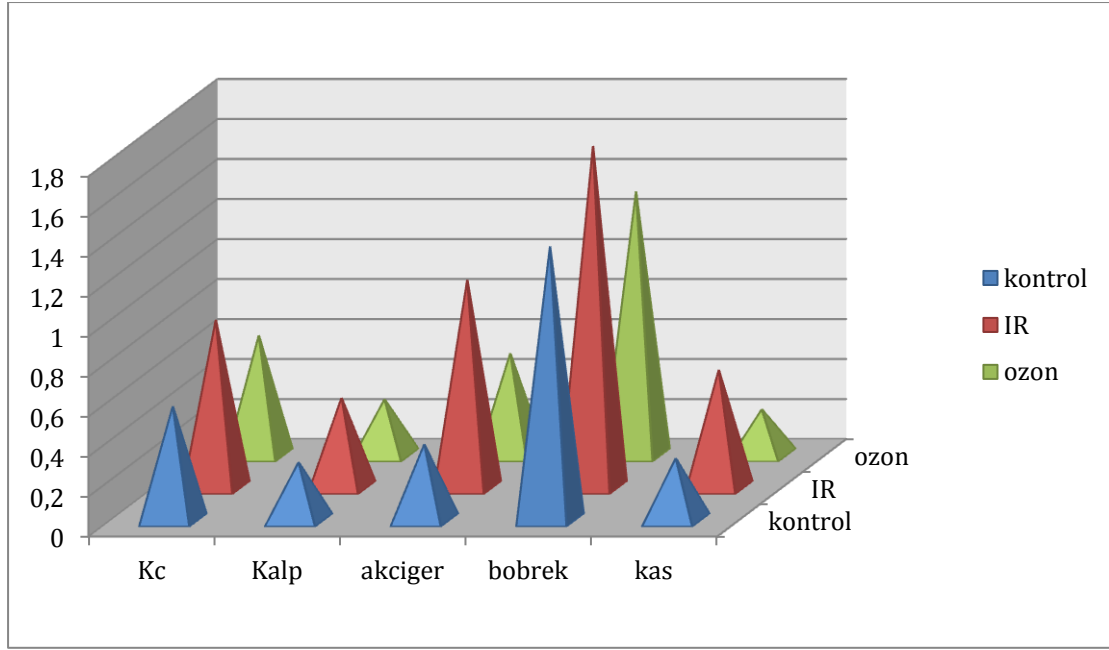
MPO aktivitesi, KC dokusunun İR+SF grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttığı tespit edildi, Ozon grubunda ise İR+SF grubuna göre anlamlı azaldığı tespit edildi. Kalp dokusunda, İR+SF grubunda MPO aktivitesi kontrol grubuna göre anlamlı arttığı tespit edilirken, Ozon grubunda ise İR+SF ve kontrol grupları ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak arttığı tespit edilmiştir. Akciğer ve böbrek dokularında gruplar arasında anlamlı farklılık tespit edilememiştir. Kas dokusunda kontrol grubuna göre, İR+SF grubunda artmış olarak tespit edilirken, Ozon grubunda ise İR+SF grubuna göre anlamlı azaldığı ve kontrol grubu değerinin de altına düştüğü tespit edilmiştir (Tablo 4-20, şekil 4-6).

Tablo 4-21: Kontrol, iskemi-reperfüzyon, ozon tedavisi yapılan sıçanlarda karaciğer, kalp, akciğer, böbrek, kas dokularında malondialdehit ve glutatyon düzeyleri (ortalama $\pm$ SD).

	MALONDİALDEHİT (nmol/mgprotein) (n=8)	GLUTATYON (nmol/mgprotein) (n=8)
KARACİĞE R KONTROL İR+SF OZON	0.57 $\pm$ 0.09 ^a 0.84 $\pm$ 0.22 ^b 0.60 $\pm$ 0.08 ^a	25.98 $\pm$ 3.95 ^a 19.05 $\pm$ 5.66 ^b 24.45 $\pm$ 2.64 ^a
KALP KONTROL İR+ SF OZON	0.29 $\pm$ 0.03 ^a 0.45 $\pm$ 0.09 ^b 0.28 $\pm$ 0.10 ^a	34.18 $\pm$ 5.29 ^a 24.68 $\pm$ 3.17 ^b 27.93 $\pm$ 7.31 ^{a,b}
AKCİĞER KONTROL İR+SF OZON	0.38 $\pm$ 0.06 ^a 1.04 $\pm$ 0.25 ^b 0.51 $\pm$ 0.10 ^a	30.22 $\pm$ 9.97 ^a 35.86 $\pm$ 11.51 ^a 33.51 $\pm$ 6.68 ^a
BÖBREK KONTROL İR+SF OZON	1.37 $\pm$ 0.29 ^a 1.71 $\pm$ 0.60 ^a 1.32 $\pm$ 0.21 ^a	39.79 $\pm$ 8.40 ^a 22.01 $\pm$ 4.39 ^b 29.27 $\pm$ 2.25 ^a
KAS KONTROL İR+SF OZON	0.31 $\pm$ 0.07 ^a 0.59 $\pm$ 0.20 ^b 0.23 $\pm$ 0.03 ^a	30.81 $\pm$ 10.16 ^a 19.50 $\pm$ 4.53 ^b 21.00 $\pm$ 3.14 ^{a,b}

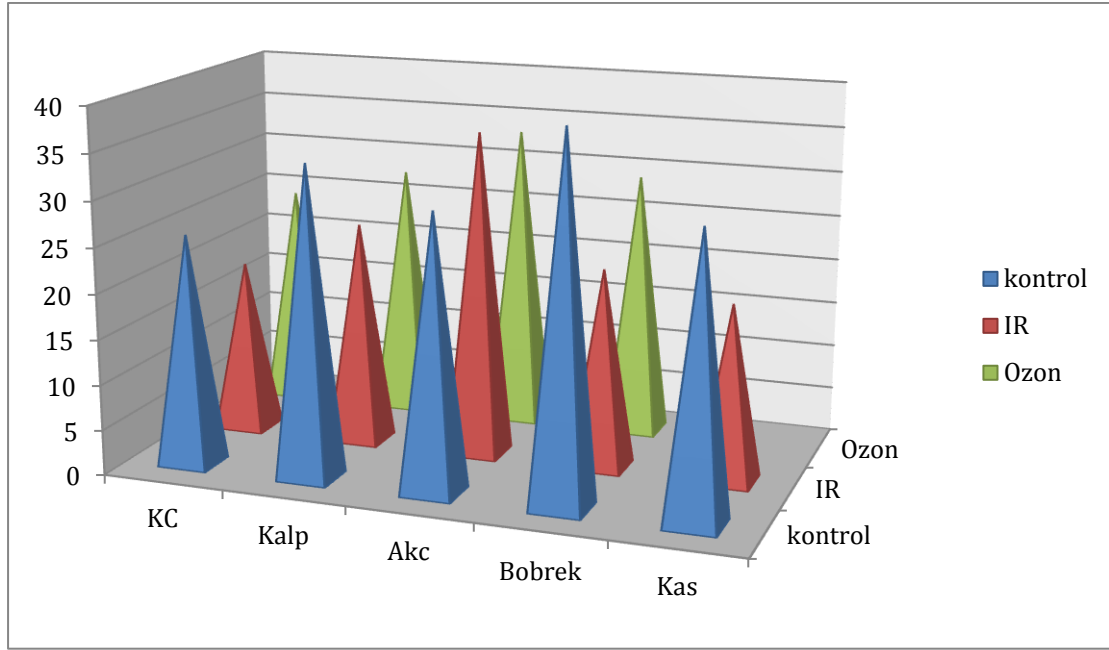
Aynı harfi paylaşmayan değerler istatistiksel olarak anlamlıdır.

KC, kalp, akciğer, kas doku değerlendirilmesinde, MDA düzeyi İR+SF grubunda kontrol grubuna göre anlamlı arttığı ($p < 0.05$), Ozon grubunda ise İR+SF grubuna göre anlamlı olarak azaldığı ($p < 0.05$) saptandı. Böbrek dokusunda MDA düzeyinde İR+SF ve ozon gruplarında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilemedi. Glutasyon düzeyi, KC ve kalp dokusunun İR+SF grubunda, kontrol grubuna göre anlamlı azaldığı ($p < 0.05$), ozon grubunda ise İR+SF grubuna göre anlamlı arttığı ($p < 0.05$) saptandı. Akciğer dokusu Glutasyon düzeyinde ise kontrol, İR+SF grupları ve ozon grupları arasında anlamlı fark saptanmadı. Böbrek ve kas doku gruplarının İR+SF gruplarında, kontrol gruplarına göre anlamlı olarak azalma tespit edilirken, ozon gruplarında ise İR+SF grubuna göre anlamlı artış tespit edildi (Tablo 4-21).



Şekil 4-7: MDA (nmol/mgprotein) düzeyinin KC, Kalp, Akc, Bobrek, Kas dokularında gruplar arası degerlerinin grafiksel analizi

KC, Kalp, Akciğer, Kas dokularının MDA düzeyi, İR+SF grubunda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, anlamlı arttığı ($p < 0.05$), Ozon grubunda ise İR+SF grubuna göre anlamlı olarak azaldığı ($p < 0.05$) saptandı. Böbrek dokusunda MDA düzeyinde İR+SF ve ozon gruplarında kontrol gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilemedi (Tablo 4-21, şekil 4-7).



Şekil 4-8: Glutasyon (nmol/mg protein) düzeyinin KC, Kalp, Akc, Böbrek, Kas dokularında gruplar arası değerlerinin grafiksel analizi

Glutasyon düzeyi, KC ve kalp dokularında, İR+SF grubunda kontrol grubuna göre anlamlı azaldığı, ozon grubunda ise İR+SF grubuna göre ise anlamlı arttığı saptandı. Akciğer dokusu Glutasyon düzeyinde ise kontrol, İR+SF grupları ve ozon grupları arasında anlamlı fark saptanmadı. Böbrek ve kas dokularında ise kontrol grupları ile karşılaştırıldığında Glutasyon düzeyi, İR+SF gruplarında anlamlı olarak azalma tespit edilirken, ozon gruplarında ise İR+SF gruplarına göre anlamlı artış tespit edildi (Tablo 4-21, şekil 4-8).

5.TARTIŞMA

İskemi-reperfüzyon hasarı, klinikte kardiyak cerrahi operasyonlarında, abdominal aort cerrahisinde, organ transplantasyonunda , koroner anjioplasti ve trombolitik tedavi sonrasında dokunun reperfüzyonu ile oluşabilmektedir. İskemik dokunun reperfüzyonuyla birlikte lokal ve sistemik etkiler ortaya çıkmaktadır ve beraberinde bir çok dokuda örneğin; kalp, akciğer, böbrek, iskelet kası, santral sinir sistemi ve gastrointestinal sistemde iskemi-reperfüzyon hasarının geliştiğini bildiren yayınlar mevcuttur (100, 101,102,103).

Alt ekstremiti iskemisi klinikte akut ve kronik olarak karşımıza çıkmaktadır. Akut alt ekstremiti iskemisinde, ekstremitiyi koruyabilmek için, hızlı tanı ve tedavi uygulamak gereklidir. Erken tedavi, iskeminin süresini kısaltmakla birlikte hastanın prognozunu etkilemektedir. Akut alt ekstremiti iskemisi sonrasında oluşan hasar, iskeminin ekstremiteye verdiği zarar kadar reperfüzyon ile de ilişkilidir (52,104,105). Reperfüzyon sonrasında lokal ve sistemik inflamatuvar yanıt oluşmaktadır ve yaygın mikrovasküler disfonksiyon ve doku bariyerinin fonksiyonun değişmesi ile sonuçlanabilmektedir. Eğer reperfüzyona verilen yanıtın şiddeti fazla ise İ/R sonrasında oluşan inflamatuvar yanıt sistemik inflamatuvar yanıt sendromu veya multiple organ disfonksiyonu ile sonuçlanabilir. Deneysel araştırmalarda ekstremiti iskemisinin oluşturulabilmesi için çok sayıda model geliştirilmiştir. Bunlardan birisi de rat çalışma modellerinde alt ekstremiteye turnike uygulama yöntemidir ve İ/R hasarının sistemik etkilerinin araştırılacağı çalışmalarda sıklıkla kullanılır (91,44).

Biz de çalışmamızda sağ alt ekstremiteye turnike uygulama yöntemi ile 4 saatlik iskemi, 2 saatlik reperfüzyon uyguladık ve gastroknemius kası, böbrek, akciğer, kalp, karaciğer dokularında ve serumda iskemi reperfüzyon hasarının etkilerini araştırdık. Alt ekstremitenin iskemi-reperfüzyonun uzak organ hasarı üzerine olumsuz etkilerinin mannitol, allopürinol, askorbik asit, SOD gibi bazı maddeler ile azaltıldığı deneysel araştırmalarla gösterilmesine rağmen ‘Ozon’ un alt ekstremiti iskemi reperfüzyon hasarının neden olduğu lokal ve sistemik hasarı azalttığı ile ilgili çok az çalışma bulunmaktadır (106, 107, 108).

İskemi - Reperfüzyon hasarındaki temel mekanizma iskemi sonrası reperfüzyon geliştiğinde dokulara oksijenin ulaşması ile serbest oksijen radikallerinin oluşmasıdır, oluşan serbest oksijen radikalleri, nötrofil, endotel hücreleri ve hasarlanmış hücre membranındaki yağ asit radikalleri ile etkileşerek lipid peroksidasyon reaksiyonunu artırır

ve üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonundan MDA meydana gelir (36). Stabil bir molekül olan MDA düzeyi ölçümü ile membran hasarı derecesi hakkında fikir sahibi olunabilir. Bu yüzden oksidatif stres durumlarında biyomarker olarak MDA kullanılır (109). Çalışmamızda plazma MDA düzeyinin İR+SF grubunda anlamlı derecede yükseldiği ve Ozon grubunda ise plazma MDA düzeyinin İR+SF grubundaki düzeye göre anlamlı derecede düşük olduğunu bulduk. Doku gruplarında ise karaciğer, akciğer, kalp, kas dokularında MDA değerleri İR+SF gruplarında anlamlı derecede yükseldiği ve Ozon gruplarında ise MDA değerlerinin İR+SF gruplarına göre anlamlı azaldığını bulduk. Böbrek dokusunda ise İR+SF ve Ozon grupları arasında anlamlı fark tespit edemedik.

Atahan ve ark. (8) alt ekstremitte İR' unun kas, kalp, akciğer üzerindeki hasarını göstermek için kanda ve dokularda MDA düzeyi bakmışlar ve MDA düzeyinin artmış olduğunu tespit etmişler. Antioksidan olarak çinko aspartat kullanmışlar ve çinko aspartat verilen grupta MDA düzeyinin azaldığını tespit etmişler. Çalışmamızda Ozon grubu MDA değerlerinin, İR +SF grubuna göre düşük olması ozon'unun İR sonrası oluşan lipid peroksidasyonu miktarını azalttığını düşündürmektedir.

Serbest oksijen radikallerinin diğer bir hedefi, solubl ve protein bağlı sülfidril gruplarıdır. Özellikle serum albumin yapısındaki serbest sülfidril grupları nedeniyle SOR' ine karşı çok duyarlıdır (42,43). Buna dayanarak, proteinlere bağlı sülfidril grubunu ölçmenin İR hasarını belirlemede önemli bir gösterge olabileceğini düşünerek, çalışmamızda plazma total sülfidril (Total-SH) düzeyini değerlendirdik. Gruplar arasında plazma Total-SH düzeylerinde anlamlı fark tespit edilemedi. İR+SF grubu plazma Total-SH düzeyi, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olmayan bir artış tespit edildi. Ozon grubunda ise kontrol grubu ile karşılaştırıldığında plazma total-SH düzeyinde değişiklik tespit edilmedi. İRH'nin sonucunda, serum total-SH düzeyinde anlamlı azalma olduğunu bildiren yayınlar bulunmaktadır (110,111). Bizim çalışmamızda, Ozon grubunda, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında total -SH düzeyinde anlamlı değişiklik tespit edilmemesini, Ozonun İRH'da total-SH içeren proteinleri irreversible oksidasyon etkisiyle sülfanik asit içeren gruplara dönüştürerek serbest oksijen radikallerinin etkisinden korumaya yönelik etkisi ile ilgili olabileceğini düşündük.

Reaktif oksijen türleri (ROS), normal oksijen metabolizması sırasında az miktarda oluşan süperoksit radikali (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali (OH^-) 'dir (12). Oluşan bu ürünlerin güçlü reaktif özellikleri vardır ve hücrede ciddi hasarlar

meydana getirirler. Bu ürünlerin oluşturduğu hasarı önlemek için bir çok savunma sistemi vardır. Bu savunma sistemleri ‘antioksidan savunma sistemi’ veya kısaca antioksidanlar olarak bilinirler (14,15).

Antioksidanlar, enzimatik veya non enzimatik mekanizmalarla etkilerini gösterirler. SOD, KAT, Glutasyon, GSH-Px, MPO gibi antioksidan ajanlar arasında sayılabilir (32,33).

Bu ajanların, alt ekstremitte İR hasarının neden olduğu doku hasarı ve uzak organ hasarını azalttığı ile ilgili klinik ve deneysel ortamlarda gerçekleştirilmiş çalışmalar bulunmaktadır (2,17,27,108).

Süperoksit dismutaz, süperoksit serbest radikalının (O_2^-) hidrojen peroksit (H_2O_2) ve moleküler oksijene (O_2) dönüşümünü katalizleyen antioksidan enzimdir (38). SOD' ın fizyolojik fonksiyonu oksijeni metabolize eden hücreleri süperoksit serbest radikalının (O_2^-) lipid peroksidasyonu gibi zararlı etkilerine karşı korumaktır. SOD' ın ekstrasellüler aktivitesi çok düşüktür. Çalışmamızda İR+SF grubunda KC, kalp, kas, akciğer, böbrek dokularının SOD enzim aktivitesinde anlamlı artış tespit edildi. Ozon grubunda ise, SOD enzim aktivitesinde KC, kalp, kas, akciğer, böbrek dokularında İR+SF grubuna göre anlamlı azalma tespit edildi. Bu anlamlı azalmayı ozon tedavisinin süperoksit serbest radikalının oluşumunu azaltarak SOD enzim aktivitesinin artmasına gerek kalmamasına bağladık.

Serum SOD aktivitesi düzeyinde ise gruplar arasında anlamlı değişiklik tespit edilmedi. Çalışmamızda serum SOD aktivitesindeki anlamlı değişiklik olmamasının nedeni, eritrosit SOD aktivitesinin ölçülmesi nedeniyledir. Eritrosit SOD aktivitesinin kandaki serbest oksijen radikallerine karşı reaksiyon oluşturması için daha uzun bir süre gerekmektedir. Bunun nedeni ise eritrosit enzimlerinin patolojik olaylara karşı uzun süreli adaptasyon göstermesinden kaynaklanmaktadır. Biz de çalışmamızda serum SOD aktivitesi düzeyinin değişmemesini bu durum ile açıkladık. Muzakova ve ark. (112) iskemi sonrası reperfüzyon gerçekleştirdikleri çalışmada, serum SOD aktivitesinde anlamlı değişiklik tespit etmemişlerdir.

Süperoksit serbest radikali (O_2^-), SOD enzimi tarafından H_2O_2 ve moleküler oksijene dönüşümü katalizlendikten sonra oluşan H_2O_2 , hücre içinde katalaz ve glutasyon peroksidaz (GSH-Px) tarafından hücre için toksik olmayan ürünlere dönüştürülür (38).

Katalaz, yapısında dört tane hem grubu bulunan hemoproteindir. Peroksizomlarda daha az olarak sitozolde ve mikrozomal fraksiyonda bulunur. Hücrede oluşan hidrojen

peroksidi (H_2O_2) hidroksil serbest radikali ($OH^\bullet$) oluşumunu önlemek için ortadan kaldırır (114). Çalışmamızda gruplar arasında, doku ve serum örneklerinde KAT enzim düzeyleri arasında anlamlı fark tespitlemedi. Bu durumun sebebi ise İRH oluşumu sırasında meydana gelen süperoksit anyonunun yeterli derecede elimine edilerek KAT enziminin aktivitesinin artmasına gerek kalmaması olabilir.

Glutasyon peroksidaz, enzim sistemi içerisinde SOD enzim aktivitesi sonrasında KAT ile birlikte yer alır ve H_2O_2 'i substrat olarak kullanır ve H_2O oluşumunu katalizler. Selenyum bağımlı ve selenyum bağımsız iki farklı tipi bulunmaktadır. Spesifik hidrojen verici olarak glutasyonu kullanır. İndirgenmiş Glutasyon tarafından hidrojen peroksit ve lipid peroksitlerin parçalanmasını katalize eder. Böylelikle membran lipidlerinin oksidasyonunu önler. Eritrositlerde oksidatif strese karşı en önemli antioksidandır (115). Çalışmamızda serum, kas ve böbrek GSH-Px enzim düzeylerinde gruplar arasında anlamlı fark tespit edilmezken, KC ve kalp dokularında İR+SF grubunda, kontrol grubuna göre anlamlı azalma tespit edildi. KC ve kalp dokularının ozon gruplarında ise kontrol gruplarına göre anlamlı bir fark tespit edilmedi. Akciğer dokusunda ise GSH-Px enzim düzeyi İR+SF grubunda kontrol grubuna göre anlamlı fark tespit edilmezken, ozon grubunda anlamlı olarak düşük tespit edilmiştir. Çalışmamızda serum, kas ve böbrek doku gruplarındaki GSH-Px enzim düzeylerinde anlamlı değişiklik olmamasını İRH oluşumu sırasında meydana gelen süperoksit anyonunun yeterli derece elimine edilerek GSH-Px enzim aktivitesinde değişiklik olmasına gerek kalmamasına bağladık. Doku grupları arasında GSH-Px aktivitelerinin farklı olmamasını dokuların oksidatif strese karşı yanıtlarının farklı olmasıyla ilgili olabileceği düşüncesindeyiz.

Nonenzimatik antioksidan olan Glutasyon, hücre içinde tripeptik (glutamik asit, sistein glisin) olarak sentezlenir ve hücre içinde indirgenmiş şekilde (GSH) bulunur. Glutasyon (GSH) çok önemli bir antioksidandır, serbest radikaller ve peroksitlerle reaksiyona girerek hücreleri oksidatif hasara karşı korur. İskemi – reperfüzyon hasarında doku GSH'in tüketildiği ile ilgili yayınlar bulunmaktadır (116,117). Nijmeh ve ark.nın (118) iskeminin indüklediği angiogenesis çalışmasında Glutasyon düzeyinin azaldığını tespit etmişlerdir. Azalan GSH düzeyine bağlı olarak patolojik durumlar ortaya çıkmaktadır. Bizim çalışmamızda KC, kalp, böbrek ve kas dokularında İR+SF grubunda, kontrol grubuna göre Glutasyon düzeyinin anlamlı azaldığı tespit edilmiştir. Ozon grubunda ise İR+SF grubu ile karşılaştırıldığında Glutasyon düzeyi anlamlı olarak yüksek bulunmuş olup, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ise Glutasyon düzeylerinin altında

değerler ortaya çıkmıştır. Peralta ve ark.nın (9) ratlarda KC İ/R hasarında Ozon etkinliğinin araştırıldığı çalışmada İR grubunda Glutasyon düzeyinin anlamlı derecede azaldığı saptanmıştır. Ozon+İR grubunda ise kontrol grubu ile karşılaştırıldığında Glutasyon düzeyinin değişmediği tespit edilmiştir. Ozon tedavisi, serbest radikaller ve peroksitlerle reaksiyona girerek , glutasyonun reaksiyona girmesini engelleyerek, hucreyi oksidatif hasardan korudugu dusuncesindeyiz.

Kanko ve ark. (113) ratlarda alt iskemi-reperfüzyon deney modeli oluşturarak, klopidoğrel'in antioksidan etkinliğini araştırmışlardır.İR hasarının göstergesi olarak serumda ve KC, kas ve akciğer dokusunda MDA, GSH düzeyini değerlendirmişlerdir. İR hasarının önlenmesi için klopidoğrel verilen grupta İR sonrası MDA seviyeleri yükselmezken, GSH düzeyi azalmıştır. Bu sonuçlarla klopidoğrel'in postiskemik hasara karşı koruyucu etkisinin olduğunu savunmuşlardır.

Miyeloperoksidaz enzimi (MPO), oksidatif strese yanıt olarak lökositlerden salgılanan lizozomal bir enzimdir (17,27). Çalışmamızda doku nötrofil aktivasyonunun bir göstergesi olarak MPO enzim düzeyleri ölçülmüştür. Doku gruplarından KC, kalp ve kas dokularında MPO enzim düzeyleri İR+SF gruplarında kontrol gruplarına göre yüksek bulunmuştur. Akciğer ve böbrek dokularında ise MPO enzim düzeyi İR+SF grubunda kontrol grubuna göre anlamlı bir değişiklik tespit edilmemiştir. Fakat İR+SF gruplarında kontrol grubuna göre düşük düzeyler bulunmuştur. Ozon gruplarında ise KC ve kalp dokularında kontrol gruplarına göre anlamlı yüksek bulunmuştur. Akciğer ve böbrek dokularında ise kontrol gruplarına göre anlamlı bir fark tespit edilememesine rağmen MPO düzeyleri düşük bulunmuştur. Kas dokusunda ise MPO düzeyi kontrol grubuna göre anlamlı düşük tespit edilmiştir. Bu dokular arasındaki farklılık olmasını ozonun dokular üzerindeki etkisinin ortaya çıkabilmesi için farklı dozlarda kullanılmasına bağladık. Ozonun İ/R hasarında MPO düzeylerini düşürerek dokulara olan nötrofil infiltrasyonunu ve aktivasyonunu engellediği ve reperfüzyon hasarından dokuları koruduğu görüldü.

6. SONUÇ

Çalışmamızda deneysel alt ekstremitte iskemi-reperfüzyon modelinde ozon tedavisinin lokal ve uzak organ hasarındaki etkisini araştırdık. Klinik uygulamalarda akut ve kronik alt ekstremitte iskemi tedavilerinden sonra uzak organ hasarı , MODS ve SIRS' e kadar gelişen bir tablonun oluştuğu bilinmektedir (3,5). İR+SF grubundaki serum ve doku MDA değerlerindeki anlamlı artış KC, kalp, akciğer, böbrek, kas dokularında oksidatif stresin göstergesi olabilir ve çalışmamız sırasında elde edilen bu sonuçlar ile alt ekstremitte iskemi-reperfüzyonun uzak organ hasarına yol açtığı bulunmuştur. Çalışmamızda Ozon grubunun doku gruplarında ve serum değerlendirilmesinde MDA değerlerinin anlamlı olarak azalmış saptanması oksidatif stresin azaldığına işaret etmektedir. KAT enzim aktivitesinin serum ve doku gruplarında birbirlerinden anlamlı derecede farklı olmamaları, KAT enziminin aktive olmasına gerek kalmadan İR hasarının SOD tarafından durdurulmuş olmasına bağlanabilir. Doku gruplarında GSH düzeyini incelediğimizde İ/R gruplarında GSH düzeyi akciğer dokusu hariç diğer doku gruplarında düşük bulunmuş olup, ozon gruplarında ise kontrol grupları ile karşılaştırıldığında anlamlı fark tespit edilememiştir. Bu bulgular ozon tedavisinin İ/R hasarında GSH düzeyinin azalmasını engellediği veya artmasını sağlayarak oksidatif stresi en az düzeye indirdiğini göstermektedir. MPO düzeyleri doku gruplarında akciğer ve böbrek dokuları hariç ozon tedavi gruplarında İR+SF grubuna göre anlamlı azalma tespit edilmiştir. Bu durum ozon tedavisinin, uzak organ hasarında nötrofil aracılı sistemik inflamatuvar yanıtı inhibe ettiğini işaret etmektedir.

Bu çalışmanın sonuçlarına dayanarak, alt ekstremitte iskemisinde perfüzyonun tekrar oluşturulması sonrası oluşabilecek özellikle lokal ve sistemik etkilerin azaltılmasında ozon tedavisinin kullanımının faydalı olabileceği düşünülmektedir. Ancak bu konuda Ozon tedavisinin yararlı etkilerinin hangi mekanizmalar ile oluştuğu ve bu tedavinin etkin olması için uygun dozun ayarlanabilmesi için yeni deneysel çalışmalara ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

1. Dimakakos PB, Kotsis T, Kondi-Pafiti A, Katsenis K, Doufas A, Chondros K, Kouskouni E. Oxygen free radicals in abdominal aortic surgery. An experimental study. *J Cardiovasc Surg*. 2002; Feb; 43;1:77-82.
2. Blaisdell FW. The pathophysiology of skeletal muscle ischemia and the reperfusion syndrome: a review. *Cardiovasc Surg* 2002; 10: 620-30.
3. Turchanyı B, Toth B, Racz I. Ischemia reperfusion Injury of skeletal muscle after selective deafferantation. *Physiol Res* 2005; 54: 25–31.
4. Haimovici H. Muscular, renal, and metabolic complications of acute arterial occlusions: myoneuropathic-metabolic syndrome. *Surgery*. 1979; Apr;85;4:461-468.
5. Homer-Vanniasinkam S, Crinnion JN, Gough MJ. Post-ischaemic organ dysfunction: a review. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 1997 ;14:195-203.
6. Phillips L, Toledo AH, Lopez-Neblina F, Anaya-Prado R, Toledo- Pereyra LH. Nitric oxide mechanism of protection in ischemia and reperfusion injury. *J Invest Surg* 2009; 22: 46-55.
7. Mickle DA, Weisel RD. Future directions of vitamin E and its analogues in minimizing myocardial ischemia-reperfusion injury. *Can J Cardiol* 1993; 9: 89-93.
8. Atahan E, Ergun Y, Belge Kurutas E, Cetinus E, Guney Ergun U. Ischemia-reperfusion injury in rat skeletal muscle is attenuated by zinc aspartate. *J Surg Res*. 2007 Jan;137;1:109-116.
9. Peralta C1, León OS, Xaus C, Prats N, Jalil EC, Planell ES, Puig-Parellada P, Gelpí E, Roselló-Catafau J. Protective effect of ozone treatment on the injury associated with hepatic ischemia-reperfusion: antioxidant-prooxidant balance. *Free Radic Res*. 1999 Sep;31;3:191-196.
10. Ajamieh H, Merino N, Candelario-Jalil E, Menéndez S, Martinez-Sanchez G, Re L, Giuliani A, Leon OS. Similar protective effect of ischaemic and ozone oxidative preconditionings in liver ischaemia/reperfusion injury. *Pharmacol Res*. 2002 Apr; 45 ;4: 333-339.
11. Hui Chen, Bianzhi Xing, Xiuheng Liu, Bingyan Zhan , Jiangqiao Zhou , Hengcheng

Zhu , Zhiyuan Chen. Ozone oxidative preconditioning inhibits inflammation and apoptosis in a rat model of renal ischemia / reperfusion injury. *European Journal of Pharmacology*.2008 ;581:306–314

12. Acworth IN, Bailey B. Reactive Oxygen Species. In: *The handbook of oxidative metabolism*. Massachusetts: ESA Inc., 1997, p. 1-1 to 4-4

13. Jennings RB, Reimer KA. The cell biology of acute myocardial ischemia. *Annu Rev Med* 1991; 42: 225-246.

14. Green CJ, Gower JD, Healing G, Cotterill LA, Fuller BJ, Simpkin S. The importance of iron, calcium and free radicals in reperfusion injury: an overview of studies in ischaemic rabbit kidneys. *Free Radic Res Commun* 1989;7: 255-264.

15. Orrenius S, Burkitt MJ, Kass GE, Dypbukt JM, Nicotera P. Calcium ions and oxidative cell injury. *Ann Neurol* 1992; 32 Suppl: S33- 42.

16. Gute DC, Ishida T, Yarimizu K, Korthuis RJ. Inflammatory responses to ischemia and reperfusion in skeletal muscle. *Mol Cell Biochem* 1998; 179:169–187.

17. Korthuis RJ, Granger DN. Reactive oxygen metabolites, neutrophils, and the pathogenesis of ischemic-tissue/reperfusion. *Clin Cardiol*. 1993; 16:1: 119-126.

18. Thrane AS, Skehan JD, Thrane PS. A novel interpretation of immune redundancy and duality in reperfusion injury with important implications for intervention in ischaemic disease. *Med Hypotheses* 2007; 68: 1363-1370.

19. Reiter RJ. Oxidative processes and antioxidant defense mechanisms in the aging brain. *FASEB J* 1995; 9: 526-533.

20. Alizan A, Khalil C, Farah A, John C. Reperfusion injury. *Plast. Reconstr Surg*. 2006;117: 1024–1033.

21. Kumar V, Cotran R, Robbins SL. *Temel patoloji (Basic Pathology)*, 6. edisyon ,Temmuz 2000 (6-10, 30-36)

22. Zimmerman BJ, Granger DN. Reperfusion injury. *Surg Clin North Am* 1992; 72: 65-83.

23. Wilhelm J. Metabolic aspects of membrane lipid peroxidation. *Acta Univ Carol Med Monogr* 1990; 137:1-53.
24. Davies SJ, Reichardt-Pascal SY, Vaughan D, Russel GI. Differential effect of ischemia-reperfusion injury on anti-oxidant enzyme activity in the rat kidney. *Exp Nephrol* 1995; 3: 348-354.
25. Reiter RJ, Acuna-Castroviejo D, Tan DX, Burkhardt S. Free radical mediated molecular damage. Mechanisms for the protective actions of melatonin in the central nervous system. *Ann N Y Acad Sci* 2001;939: 200-215.
26. Frangogiannis NG. Chemokines in ischemia and reperfusion. *Thromb Haemost.* 2007; 97: 738-747.
27. Duru S, Koca U, Öztekin S, Olguner Ç, Elar Z. Antithrombin III pretreatment reduces neutrophil recruitment into the lung and skeletal muscle tissues in the rat model of bilateral lower limb and reperfusion: A pilot study. *Acta Anaesthesiol Scand* 2005; 49: 1142–1148)
28. Gwendolyn M, Diepenhorst P, van Gulik T, Hack E. Complement Mediated Ischemia Reperfusion Injury. *Ann Surg* 2009; 249: 889-899.
29. Monsinjon T, Richard V, Fontaine M. Complement and its implications in cardiac ischemia/reperfusion: strategies to inhibit complement. *Fundam Clin Pharmacol* 2001; 15: 293-306.
30. Weight SC, Bell PR, Nicholson ML. Renal ischaemia-reperfusion injury. *Br J Surg* 1996; 83: 162-170.
31. Mackman N. The role of tissue factor and factor VIIa in hemostasis. *Anesth Analg* 2009; 108: 1447-1452
32. Karihtala P, Soini Y. Reactive oxygen species and antioxidant mechanisms in human tissues and their relation to malignancies. *APMIS* 2007;115:81-103.
33. Cherubini A, Ruggiero C, Morand C, Lattanzio F, Dell'aquila G, Zuliani G, Di Iorio A, Andres-Lacueva C. Dietary antioxidants as potential pharmacological agents for ischemic stroke. *Curr Med Chem.* 2008; 15: 1236-1248.

34. Mickle DA, Weisel RD. Future directions of vitamin E and its analogues in minimizing myocardial ischemia-reperfusion injury. *Can J Cardiol* 1993; 9: 89-93.
35. Virág L, Szabó C. The therapeutic potential of poly (ADP-ribose) polymerase inhibitors. *Pharmacol Rev* 2002; 54: 375-429.
36. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39: 44-84.
37. Şehirli AO. Renal İskemi/Reperfuzyon Hasarında Melatonin'in Koruyucu Etkisi. Yüksek Lisans Tezi. T.C. Marmara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü. 2001.
38. Akkuş İ, 1995. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. 1. Baskı, Mimoza Yayınları, s.1-60.
39. Rodriguez C, Mayo JC, Sainz RM, Antolín I, Herrera F, Martín V, Reiter RJ. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *J Pineal Res* 2004; 36: 1-9.
40. Reiter RJ, Melchiorri D, Sewerynek E, Poeggeler B, Barlow-Walden L, Chuang J, Ortiz GG, Acuña-Castroviejo D. A review of the evidence supporting melatonin's role as an antioxidant. *J Pineal Res* 1995; 18: 1-11.
41. Ross D. Glutathione, free radicals and chemotherapeutic agents. *Pharmacol Ther* 1988; 37: 231-249.
42. Kanbağlı O, Doğru-abbasoğlu S, Özdemirler G, Aykac- Toker G, Uysal M. Oksidatif stres belirtisi olarak serumda total sülfidril düzeyleri ve glutatyon peroksidaz aktivitesi. *Ist. Tıp. Fak. Mecmuası*. 2000; 264-267
43. Hu ML. Measurement of protein thiol groups and glutathione in plasma 1994; *Method Enzymol* 233- 380
44. Ostman B, Michaelsson K, Rahme H ve ark. Tourniquet induced ischemia and reperfusion in human skeletal muscle. *Clin Orthop* 2004; 418: 260-265.
45. Arasa O, Dilsizian V. Targeting ischemic memory. *Curr Opin in Biotechnol* 2007; 18: 46- 51.

46. Reffelmann T, Hale SL, Dow JS, Kloner RA. No-reflow phenomenon persists long-term after ischemia/reperfusion in the rat and predicts infarct expansion. *Circulation*, 2003; 108, 2911–2917
47. Majno G, Ames A, Chaing J, Wright RL. No reflow after cerebral ischemia. *Lancet* 1967; 2: 569–570.
48. Magdi M I Yassin, Denis W Harkin, Aires A B Barros D'Sa, M Isla Halliday, Brian J Rowlands. Lower limb ischemia-reperfusion injury triggers a systemic inflammatory response and multiple organ dysfunction. *World J Surg* 2002 Jan 25;26 :1:115-121
49. Goldman G, Welbourn R, Klausner JM, Kobzik L, Valeri CR, Shepro D. Mast cells and leukotrienes mediate neutrophil sequestration and lung edema after remote ischemia in rodents. *Surgery* 1992;112:578-586.
50. Nelson P,J. Renal ischemia–reperfusion injury: Renal dendritic cells loudly sound the alarm. *Kidney International* 2007; 71: 604–605.
51. Ross D. Glutathione, free radicals and chemotherapeutic agents. *Pharmacol Ther* 1988; 37: 231–249.
52. Kuzu MA, Koksoy C, Kale İT, Tanık A, Terzi C, Elhan AH, Reperfusion injury delays healing of intestinal anastomosis in a rat. *Am J of Surgery* 1998; 176: 348-351.
53. Rubin MB. The history of ozone. *Bull Hist Chem*. 2001;26;1:40-56.
54. Bocci V. Scientific and medical aspects of ozone therapy. State of the art. *Archives of Medical Research*. 2006;37:425–435.
55. Wright ES, Dziedzic D, Wheeler CS. Cellular, biochemical and functional effects of ozone: new research and perspectives on ozone health effects. *Toxicol Lett*. 1990;51:2:125-45 6.
56. Sanhueza PA, Reed GD, Davis WT, Miller TL. An environmental decision-making tool for evaluating ground-level ozone-related health effects. *J Air Waste Manag Assoc*. 2003;53:12:1448-59.
57. Wolff HH. Die Behandlung peripherer Durchblutungsstörungen mit Ozon. *Erfahr-Heilkd*. 1974;23:181-184.
58. Bocci V. Ozone as Janus: this controversial gas can be either toxic or medically useful. *Mediators Inflamm*. 2004;13:3-11.
59. Bocci V. Does ozone therapy normalize the cellular redox balance? Implications for

the therapy of human immunodeficiency virus and several other diseases. *Med Hypotheses* 1996; 46 :150-154

60. Bocci V, Aldinucci C, Bianchi L. The use of hydrogen peroxide as a medical drug. *Riv Ital Ossigeno Ozonoterapia*. 2005;4:30-39.

61. Bocci V, Aldinucci C. Biochemical modifications induced in human blood by oxygenation-ozonation. *J Biochem Mol Toxicol*. 2006;20:3:133-138.

62. Tylicki L, Biedunkiewicz B, Rachon D, 2004. No effects of ozonated autohemotherapy on inflammation response in hemodialyzed patients. *Mediators of Inflammation* :13;377- 380.

63. Viebahn-Hänsler R. The use of ozone in medicine: Mechanisms of action. Munich. 2003;5; 23-25

64. Travagli V, Zanardi I, Silvietti A, Bocci V. A physicochemical investigation on the effects of ozone on blood. *Int J Biol Macromol*. 2007;41:5;504-511.

65. Gornicki A, GutszeA, 2000. In vitro effects of ozone on human erythrocyte membranes: An EPR study. *Acta Biochimica Polonica* 47 :4; 963-971.

66. Bocci V. The case for oxygen-ozonotherapy. *Br J Biomed Sci*. 2007;64;1:44-9. 42.

67. Kesik V, Uysal B, Kurt B, Kismet E and Koseoglu V. Ozone ameliorates methotrexate-induced intestinal injury in rats. *Cancer Biol Ther*, 2009; 8: 1623-1628

68. Martinez-Sanchez G, Al-Dalain SM, Menéndez S, Re L, Giuliani A, Candelario-Jalil E, Alvarez H, Fernández-Montequín JI, León OS. Therapeutic efficacy of ozone in patients with diabetic foot. *Eur J Pharmacol*. 2005;523:1-3:151-161.

69. Bocci, V. Is it true that ozone is always toxic? The end of a dogma. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2006; 216;3: 493-504.

70. Bocci V. Oxygen-ozone therapy: a critical evaluation. Springer, 2002:1-8

71. Tseng C, Li C. Inactivation of surface viruses by gaseous ozone. *J Environ Health*. 2008 Jun;70:10;56-62.

72. Bolarin D M, Bhalla D K, Kleinman M T. Effects of repeated exposures of geriatric rats to ozone and particle-containing atmospheres: an analysis of bronchoalveolar lavage and plasma proteins. 1997; 9: 5 : 423-434
73. Bocci V, Ozone a new medical drug. published by Springer, Dordrecht, The Netherlands. 2005: 75-85
74. Bocci V, Travagli V, Zanardi I. May oxygen-ozone therapy improves cardiovascular disorders? Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets. 2009; Jun;9:2:78-85.
75. de Monte A, van der Zee H, Bocci V. Major ozonated autohemotherapy in chronic limb ischemia with ulcerations. J Altern Complement Med. 2005;11:2:363-367.
76. Solic JJ, Hazucha MJ, Bromberg PA. The acute effects of 0.2 ppm ozone in patients with chronic obstructive pulmonary disease. Am Rev Respir Dis. 1982;125:6: 664-669.
77. Mc Lean L. The miracle of ozone therapy. 2009; 6.
78. Clavo B1, Suarez G, Aguilar Y, Gutierrez D, Ponce P, Cubero A, Robaina F, Carreras JL. Brain ischemia and hypometabolism treated by ozone therapy. Forsch Komplementmed. 2011;18:5:283-287.
79. Stübinger S, Sader R, Filippi A. The use of ozone in dentistry and maxillofacial surgery: a review. Quintessence Int. 2006 ;37:5;353-359.
80. Bocci V, Can ozonotherapy be performed if the biochemistry of the process cannot be controlled? Archives of Medical Research. 2007; 38: 584-585.
81. Bocci V, Biological and clinical effects of ozone. Has ozone therapy a future in medicine ? Br J Biomed Sci. 1999 ;56:270-279
82. Saady Z, Fouad EA, Kotb MIH. The effect of rectal ozone on the portal vein oxygenation and pharmacokinetics of propranolol in liver cirrhosis (a preliminary human study). Br J Clin Pharmacol. Mar 2011; 71:3: 411–415.
83. Bocci V, Zanardi L, Travagli V. Oxygen/ozone as a medical gas mixture. A critical evaluation of the various methods clarifies positive and negative aspects Med Gas Res. 2011; 1: 6.
84. Andreula CF, Simonetti L, De Santis F, Agati R, Ricci R, Leonardi M. Minimally invasive oxygen-ozone therapy for lumbar disk herniation. AJNR Am J Neuroradiol. 2003;24:996–1000.

85. D'Erme M, Scarchilli A, Artale AM. Ozone therapy in lumbar sciatic pain. *Radiol Med.* 1998;95:21–24
86. Kim H S , Noh S U, Han Y W, Kim K M, Kang H , Kim H O, Park Y M. Therapeutic effects of topical application of ozone on acute cutaneous wound healing. *Journal of Korean Medical Science.* 2009; 24:368-374.
87. Valacchi G, Fortino V, Bocci V. 2005. The dual action of ozone on the skin. *The British Journal Dermatology.* 153; 6: 1096-1100.
88. Stoker G. Ozone in chronic middle ear deafness. *Lancet.* 1902;160:1187–1188.
89. Pryor WA, Squadrito GL, Friedman M. The cascade mechanism to explain ozone toxicity: the role of lipid ozonation products. *Free Radic Biol Med.* 1995;19(6):935-941.
90. Di Paolo N, Gaggiotti E, Galli F. Extracorporeal blood oxygenation and ozonation: clinical and biological implications of ozone therapy. *Redox Rep.* 2005;10(3):121-130.
91. Hardy SC, Gough MJ. Pharmacological manipulation of gastrocnemius muscle blood flow in an animal model of reperfusion injury. *J Biomed Eng* 1991;13:263-266.
- 92-Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 1978; 52:302-310.
93. Beutler E, Duron O, Kelly BM. Improved method for the determination of blood glutathione. *J Lab Clin Med* 1963; 61: 882–888.
94. Hu, M. L. Measurement of protein thiol groups and glutathione in plasma . *Methods Enzymol.*1994; 233:380-382
95. Mylorie AA, Collins H, Umbles C, Kyle J. Erythrocyte superoxide dismutase activity and other parameters of copper status in rats ingesting lead acetate. *Toxicol Appl Pharmacol* 1986; 82: 512-520.
96. Lawrence RA, Burk RF. Glutathione peroxidase activity in selenium deficient rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 1976; 71: 952–958.
97. Rachmilewitz D, Stamler JS, Karmeli F, Mullins ME, Singel DJ, Loscalzo JL, Xavier RJ, Podolsky DK. Peroxynitrite- induced rat coliti A new model of colonic inflammation. *Gastroenterology.* 1993; 105: 1689-1697.

98. Yasmineh, W. G.; Kaur, T. P.; Blazar, B. R.; Theologides, A. Serum catalase as marker of graft-vs-host disease in allogenic bone marrow transplant recipients: Pilot Study. *Clin Chem.* 1995; 41: 1574-1580.
99. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 1985; 150: 76-85.
100. Okutan H, Ozcelik N, Yılmaz HR, Uz E. Effects of caffeic acid phenethyl ester on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in diabetic rat heart. *Clin Biochem.* 2005;38;2:191-196
101. Roberts AJ, Nora JD, Hughes WA, Quintanilla AP, Ganote CE, Sanders JH Jr, Moran JM, Michaelis LL. Cardiac and renal responses to cross-clamping of the descending thoracic aorta. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1983;86:5:732-741.
102. Fyman PN, Reynolds JR, Moser F, Avitable M, Casthely PA, Butt K. Pharmacokinetics of sufentanil in patients undergoing renal transplantation. *Can J Anaesth.* 1988;35:3:312-315.
103. Klausner JM, Paterson IS, Goldman G, Kobzik L, Valeri CR, Shepro D, Hechtman HB. Thromboxane A2 mediates increased pulmonary microvascular permeability following limb ischemia. *Circ Res.* 1989;64:6:1178-1189.
104. Cohen IK, Diegelmann RF, Yager DR, Wornum III IL, Graham MF, Crossland MC. Wound care and wound healing. Schwartz SI , Principles of Surgery. Mc Graw-Hill 7.th edition 1999; Cilt 1: 263-295.
105. Terzi C, Kuzu A, Tanık A, Kale T, Aşlar K, Elhan A. Sıçanlarda intestinal iskemi modelinde profilaktik kısa ve uzun süreli yüksek doz Allopürinol kullanımının mortaliteye etkisi. *Klinik ve Deneysel Cerrahi* 2000, 8;1: 10-16.
106. Shah DM, Bock DE, Darling RC, Chang BB, Kapinski AM, Leather RP: Beneficial effects of hypertonic mannitol in acute ischemia-reperfusion injuries in humans. *Cardiovasc Surg.* 1996; 4: 97-100
107. Smeets HJ, Camps J, Van Milligen de Wit AW, et al. Influence of low dose allopurinol on ischemia-reperfusion injury during abdominal aortic surgery. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 1995;9:162-169
108. Genç F, Tütüncü A. Alt ekstremitenin deneysel iskemi-reperfüzyon modelinde

süperoksit dismutazın lokal-sistemik etkileri engellemedeki yeri. Klinik ve deneysel Cerrahi 1998;6:211-217

109. Giera M, Lingeman H, Niessen WM. Recent Advancements in the LC- and GC-Based Analysis of Malondialdehyde (MDA): A Brief Overview. Chromatographia 2012;75:9:433-440.

110. Somuncu S, Cakmak M, Erdogan S, Caglayan O, Akman H, Kaya M. Protective effects of trapidil in ischemia-reperfusion injury due to testicular torsion and detorsion: an experimental study. Int J Urol. 2006 May;13:5:601-605.

111. Zucchi R, Yu G, Galbani P, Mariani M, Ronca G, Ronca-Testoni S. Sulfhydryl redox state affects susceptibility to ischemia and sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release in rat heart. Circ. Res. 1998; 83: 908–915.

112. Muzakova V, Kandar R, Vojtisek P, Skalicky J, Cervinkova Z. Selective antioxidant enzymes during ischemia/Reperfusion in myocardial infarction. Physiol. Res. 2000; 49:315-322

113. Kanko M, Maral H, Akbaş MH, Özden M, Bulbul S, Omay O, Yavuz S, Berki KT. Protective Effects of Clopidogrel on Oxidant Damage in A Rat Model of Acute Ischemia. The Tohoku Journal of Experimental Medicine . 2005;205: 133-139

114. Aebi H. Catalase in vitro. Methods Enzymol. 1984;105:121-126.

115. Masella R, Di Benedetto R, Vari R, Filesi C, Giovannini C. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. J Nutr Biochem 2005;16: 577-586.

116. Blaustein A, Deneke SM, Stolz RI, Baxter D. Myocardial Glutathione Depletion Impairs Recovery After Short Periods of Ischemia. Circulation 1989; 80: 1449-1457.

117. Manukyan MN, Yavuz Y, Erbarut I, Velioğlu Öğünç A, Ataizi-Çelikel C, Yalçın AS, Güllüoğlu BM. Sıçanlarda whey proteini ile oluşturulan glutatyon önkoşullandırmasının karaciğer sıcak iskemi/reperfüzyon hasarında hem oksijenaz-1 sistemi üzerine etkisi. Ulusal Cerrahi Dergisi 2008; 24:3:137-144

118. Nijmeh J, Moldobaeva A, Wagner E. Glutathione levels in ischemia-induced angiogenesis. The FASEB Journal 2009;23:1:592-595



T.C
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU



Sayı: 2012/ 13

30/01/ 2012

Sn: Doç. Dr. Onur Selçuk GÖKSEL
İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi

Karar No : 2012/ 13
Başvuru :20.01.2012

Sorumluluğunu üstlendiğiniz,Tıpta Uzm.Öğr. Zühal TORLAK'a ait "Ratlarda Alt Ekstremitte İskemi Reperfüzyon Modelinde Ozon Tedavisinin Antioksidan Etkinliğinin Araştırılması" isimli projeniz Kurulumuz tarafından incelenmiş ve Etik Kurul ilkelerine uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Alev AKDOĞAN KAYMAZ
İ.Ü.HADYEK Başkanı

Prof. Dr. Mehmet YALTIRIK
Üye

Prof. Dr. Pınar YAMANTÜRK ÇELİK
Üye

Doç.Dr.Ufuk ÇAKATAY
Üye

Yard.Doç.Dr.Alper OKYAR
Üye

Yard.Doç.Dr Altan ARMUTAK
Üye

Uzm.Vet.Hek.Fatma TEKELİ
Üye

Avukat Selma DEMİR
Üye

Mak.Yük.Müh. Dr.Burak OLGUN
Üye

İstanbul Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı İ.Ü. Veteriner Fakültesi Dekanlık katı A
221 nolu Oda Avcılar -İSTANBUL TEL : (0 212) 4737070/ 17031 E mail : hadyek@istanbul.edu.tr