T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

MERAM TIP FAKÜLTESİ

KALP VE DAMAR CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

Prof. Dr. Tahir YÜKSEK

Anabilim Dalı Başkanı

İSKEMİ-REPERFÜZYON HASARINA MARUZ KALAN SIÇAN KALBİNDE MEDİKAL OZON İLE İSKEMİK PREKONDİSYONİNGİN ETKİLERİ (DENEYSEL ÇALIŞMA)

UZMANLIK TEZİ

Dr. Ömer TANYELİ

Prof. Dr. Tahir YÜKSEK

Tez Danışmanı

KONYA-2009

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ VE AMAÇ ……1

2. GENEL BİLGİLER ……2

2.1. Ozon ……...2

2.1.1. Doğada Ozon ve Etkileri ….……..…..2

2.1.2. Ozonun kullanım alanları …….……...…3

2.1.3. Medikal Ozon ……...……...5

2.1.4. Medikal ozonun elde edilmesi …….....6

2.1.5. Medikal ozonun uygulama biçimleri…..……..7

2.1.6. Medikal ozonun etki mekanizması ..…….10

2.1.7. Reaktif oksijen türleri ve lipid oksidasyon ürünleri ile ortaya çıkartılan biyolojik etkiler 13

2.2. Miyokardiyal İskemi ve Reperfüzyon Hasarı ……..……....15

2.2.1. Miyokardiyal iskemik prekondisyoning ……18

2.2.2. Kardiyak operasyonlar esnasında iskemi-reperfüzyon hasarı ...19

2.3. Serbest Radikaller ve Süperoksit Dismutaz (SOD)…… ……..…20

2.4. Malondialdehit (MDA) ve oksidatif stres ..…….21

3. GEREÇ VE YÖNTEM …...…….25

3.1. Cerrahi İşlemler ……...25

3.2. CK-MB Kütle Düzeyi Ölçümü ……30

3.3. Troponin I Düzeyi Ölçümü ……..30

3.4. Süperoksit Dismutaz Aktivitesinin (SOD) Ölçümü …….30

3.5. MDA düzeyi ölçümü ……30

3.6. Histopatolojik İnceleme ……...31

3.7. İstatistiksel Yöntem …….31

4. BULGULAR ……..……32

5. TARTIŞMA ……..……..37

6. ÖZET ……51

7. ABSTRACT ……...……52

8. KAYNAKLAR ……...53

9. TEŞEKKÜR ……...62

KISALTMALAR

AHT: otohemoterapi

AMP: adenozin monofosfat

ATP: adenozin trifosfat

Ca^{++}: Kalsiyum

cal: kalori

CAT: katalaz

CK-MB: kreatin kinaz MB

ClO^{-}: hipoklorit anyonu

CO: karbon monoksit

DNA: deoksiribonükleik asit

Fe^{++}: Ferröz iyonu

FGF: fibroblastik büyüme faktörü

G6PD: glukoz-6-fosfat dehidrogenaz

gr: gram

GSH: glutatyon

GSH-Px: GSH-peroksidazlar

GSH-Rd: GSH-redüktaz

GSH-Tr: GSH-transferaz

H_2O_2: hidrojen peroksit

H&E: hematoksilen-eozin

HDL: yüksek dansiteli lipoprotein

HNE: 4-hidroksi-2,3 transnonenal

HO-1: hem oksijenaz-I

HSP: ısı şok proteini

IL: interlökin

I/R: iskemi-reperfüzyon

IU: internasyonel ünite

K: potasyum

KAH: koroner arter hastalığı

km: kilometre

LAD: sol anterior inen arter

LDL: düşük dansiteli lipoprotein

$LO^{\cdot}$: alkoksil radikalleri

$LOO^{\cdot}$: lipoperoksitler

LOOH: lipohidroperoksitler

LOX-1: Lipoksijenaz-1

Lt: Lökotrien

MDA: malondialdehit

mg: miligram

µg: mikrogram

MI: miyokard enfarktüsü

ml: mililitre

N_2O_2: azot dioksit

NADP: nikotinamid adenin dinükleotid fosfat

NADPH: indirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid fosfat

ng: nanogram

nm: nanometre

NO: nitrik oksit

$NO^{\cdot}$: azot monoksit

NOS: nitrik oksit sentetaz

O^{2-}: süperoksit anyonu

O_2: oksijen

O_3: ozon

$OH^{\cdot}$: hidroksil radikali

RNA: ribonükleik asit

SH: sülfhidril

SOD: süperoksit dismutaz

TGF-β: transforme edici büyüme faktörü-beta

TNF-α: tümör-nekroz faktörü-alfa

Tn: Troponin

Tx: tromboksan

UV: ultraviyole

V: volt

TABLOLAR

Tablo-1. Ozonun kullanım alanları ve etkisi

Tablo 2: Deney gruplarında ölçülen kreatin kinaz MB (CK-MB), troponin I ve malondialdehit (MDA) düzeyleri ve süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktivitesi. Veriler ortalama±standart hata olarak sunulmuştur. n= herbir gruptaki denek sayısı, $^{*}P < 0.05$ Grup I ile karşılaştırıldığında, $^{\#}P < 0.05$ Grup III ile karşılaştırıldığında.

Tablo 3: Deney gruplarında kardiyak dokudaki iskemi-reperfüzyon hasarı.

ŞEKİLLER

Şekil 1: Oksijen ve ozonun formülü

Şekil 2: Medikal ozon jeneratörünün işleyiş ilkesi (Renate Viebahn-Haensler, Ozonun tıpta kullanımı, İngilizce 4. baskıdan (2002) çeviri, 1. Türkçe baskı, 2005.)

Şekil 3: Metil linoleattan malondialdehit öncülleri olduğu sanılan prostoglandin benzeri endoperoksitlerin oluşum mekanizması.

Şekil 4: Esterbauer ve arkadaşları tarafından önerilen iki mekanizma, hidroperoksialdehit vermek üzere hidroperoksit oluşumunun ardından yağ asidi zincirinin β-ayrışımına dayanır; daha sonra MDA β-kesimi ile veya sonuçta oluşan akrolein radikalinin hidroksil radikali ile reaksiyonunun ardından meydana gelir.

RESİMLER

Resim 1: Denekler sedasyon sonrası stabilizasyon amaçlı tahtalara sabitlendi ve cerrahi uygulanacak alan tıraş edildi. Ardından tıraşlanmış alanlar betadin solüsyonu ile temizlendi.

Resim 2: Denekler trakeotomi kanülü aracılığı ile solunum cihazına (SAR-830 Ventilator, CWE, Incorporated, Ardmore, PA) bağlandı ve 60 solunum sayısı/dakika ile 400 ml/dakika oda havası verilerek solunum desteği sağlandı.

Resim 3: Deneklerde sol torakotomi yolu ile kalbe ulaşılarak LAD trasesine uygun pozisyonda arter gözlendi ve küçük plastik buldog damar klempi kullanarak denekte 25 dakikalık iskemi uygulandı.

Resim 4: Deneyde medikal ozon, masaüstü ozon jeneratörü (Dr. Hánsler OZONOSAN, photonik) kullanılarak elde edildi. Medikal ozon cihazında ozon konsantrasyonu 50 μg/ml olarak ayarlandı.

Resim 5: Grade 0 (normal histomorfoloji) özelliğindeki miyositler (H&E, x100).

Resim 6: Grade 1 zedelenme özelliğindeki (striasyon kaybı ve sitoplazmik vakuolizasyon) miyositler (H&E, x100)

Resim 7: Miyositlerde intersellüler lenfositik infiltrasyon ve ödem. (H&E, x100).

Resim 8: Grade 2 zedelenme özelliğindeki miyositler (H&E, x100).

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Ozon (O_3), aktiflenmiş oksijenin üç atomlu halidir. Medikal uygulamalarda ozon O_2/O_3 karışım şeklinde kullanılır. Ozon ile karıştırılmış kanın reinfüzyonu ile nitrik oksit (NO) düzeylerinde artış, iskemik alanlarda vazodilatasyona neden olarak hipokside azalma, süperoksit dismutaz (SOD) aktivasyonu ve glutatyon seviyesinde azalma ile oksidatif stresin azaltıldığı gösterilmiştir (1,2). Eğer biz medikal ozonu tabletler halinde sıkıştırabilsek, düzgün dozajlarda paketleyebilsek veya kararlı infüzyon solüsyonları şeklinde saklayabilsek veya hatta tezgah üstü formlarında satışa sunabilsek, bazı hastalıklarla ilgili problemlerimizin çoğu çözümlenmiş olacaktır.

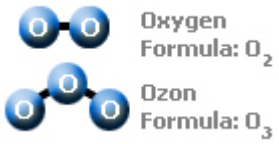
İskemi-reperfüzyon hasarı kalp cerrahisindeki en büyük sorunlardan biridir. Bu konuyla ilgili olarak literatürde yapılmış çok sayıda deneysel ve klinik araştırma ve denenmiş yüzlerce kimyasal madde ve çeşitli maddelerden yapılmış materyaller olmasına karşın sorun henüz tam olarak çözülememiş ve bunun sonucunda farklı maddelerle araştırmalar hızla devam etmektedir. İskemi-reperfüzyon hasarı ile ilgili olarak son yıllarda medikal ozonun diyabetik ayak yaralarının iyileşmesinde kolaylık sağladığı, periferik arter hastalıklarında kan akımını artırarak klaudikasyoyu azalttığı ve reperfüzyon hasarını azalttığı yönünde çalışmalar bulunmaktadır (3-5). Bununla birlikte ülkemiz de dahil olmak üzere birçok ülkede ozonterapi klinikleri açılmakta, etkinliği bilinmekte fakat etkinliği bilimsel veriler ışığında sunulamamaktadır. Medikal ozon tedavisinin yaygın klinik kullanımına rağmen kalp cerrahisi üzerine yeteri araştırma henüz yapılmamıştır. Bu çalışmada, koroner arter hastalığı (KAH) nedeniyle stenotik olan koronerlere uygulanan operasyon sonrasında kan akımının yeniden restorasyonu ile oluşabilecek reperfüzyon hasarının etkilerinin deneysel bir model grubunda medikal ozon ile prekondisyoning yapılarak azaltılması ve bunların etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Ozon

2.1.1. Doğada Ozon ve Etkileri

Ozon, üç oksijen atomundan oluşan bir kimyasal bileşendir (triatomik oksijen). Normal (diatomik) atmosferik oksijenin (O_2) çok enerji yüklü bir biçimidir (Şekil 1). Oda sıcaklığında ozon renksiz ama karakteristik kokusu olan (fırtına sonrasında, yüksek yerlerde veya deniz kenarında daha belirgin hissedilir) bir gazdır.



Şekil 1: Oksijen ve ozonun formülü

Ozonun adı, Yunanca "koklamak" anlamına gelen "ozein"den gelir. 1840 yılında Alman kimyacı Christian Friedrich Schönbein (1799-1868) tarafından keşfedilmiştir.

Ozon, stratosfer tabakasında bulunan en önemli gazlardan biridir. Azami konsantrasyonu 20-30 kilometre (km) yükseklikte yaklaşık 1000 $\mu g/m^3$ düzeyine ulaşmaktadır. Normal koşullara, yani 273 ^0K ısı ile 101.3 kPa basınç koşullarına geri döndüğümüzde, ozon tabakasının kalınlığı yalnızca birkaç milimetre (mm) olmaktadır.

200-300 nanometre (nm) dalga boyunda UV aralığındaki emilim kapasitesi sayesinde ozonosfer, güneşin yaydığı yüksek enerji yüklü ultraviyole ışınlara karşı koruyucu bir filtre mekanizması sunmakta ve biyosferdeki biyolojik dengeyi korumaya yardımcı olmaktadır. Bazı zamanlarda hava türbülansları sonucunda ozon, yeryüzüne daha yakın katmanlara küçük miktarlarda da olsa sızabilmektedir. Şimşekli fırtınalardan sonra ozonun kimi özelliklerini saptama şansı buluyoruz.

Ultraviyole ışığın sis ve dumanda bulunan çeşitli elemanlar (özellikle nitrojen oksitleri) üzerindeki etkisi altında ve oksijen basıncı koşulunda ozon oluşmaktadır.

Özetle ozon konsantrasyonu kirlilik ölçümünde kullanılmakta ve bu nedenle halk arasında yanlış anlama sonucu kirliliğin nedeni olduğundan hareketle kötü bir madde olarak algılanmaktadır.

Ozonosferde mevcut ozon tabakasının tahrip olmasına bağlı ozon konsantrasyonunda düşüş, güneş ışınlarının ultraviyole bileşenlerine karşı korumanın azalması anlamına gelmektedir. Bu sürecin temel sorunlarından biri ozon delinmesidir.

Ozon koku algılama eşiği 0.02 mg/m^3'tür ve bu durum burunlarımızın ozonun varlığı açısından hala son derece iyi bir gösterge oluşturduğu anlamına gelmektedir.

2.1.2. Ozonun kullanım alanları

Aşırı derecede oksidan bir madde ve ileri derecede etkin bir dezenfektan olması nedeniyle bütün dünyada su tesislerinde içme suyunun temizlenmesinde kullanılır.

Ozonu, önde gelen temizleyici ve dezenfekte edici maddelerden biri kılan özellikleri şunlardır:

- Güçlü oksidatif etkisi ile makromoleküller parçalanabilir.
- Biyolojik maddeler ile çözülemeyen bileşenler ile reaksiyona girme kapasitesi veya biyolojik işleme girerek bakteriler gibi başka işlem maddeleri üretme kapasitesi önem taşır.
- Yüksek derecede zehirli aromatik ve heteroaromatik maddeler flokülasyon yoluyla tahrip edilerek yok edilir ve filtrelenerek elimine olurlar.
- Her türlü bakteri ve virüsü öldürebilme yeteneği, ozonu artık suyun temizlenmesi ve yeniden işlenebilir hale getirmesinde en önemli araçlardan biri haline getirmektedir.

Bütün bu özellikleri neticesinde ozon hem sanayi, hem de biyoteknolojide yaygın bir kullanım alanı bulmuştur. Ozonun genel olarak kullanım alanları Tablo-1'de gösterilmiştir.

- Oksidanların aktivasyonu, uçaklarda ve klima sistemlerinde vb.

- Leke temizleme; tekstil malzemelerinde yağlar, istenmeyen maddelerin biyolojik olarak çözünmesi.

- Soğutma suyu, selüloz imalatı; istiridye, midye ve diğer deniz ürünlerinin kültürü.

- Dezenfeksiyon, deodorant etkisi; havanın dezenfekte edilmesi.

- Demir ve manganezin elimine edilmesi.

- Şişe dolumunda (örn. maden suları).

- Hidrokültür.

- Sınai uygulamalar, demirin yok edilmesi.

- Kaolin imalatı.

- Tıp, mikrobiyoloji, meteoroloji, mikro-klimatoloji, mikrobiyolojik ve farmasötik üretim süreçleri.

- Organik sentezlerde oksidasyon.

- Farmasötik üretim ve paketleme, foto-kimya, protein sentezi, pirojensiz su.

- Doğal artıkların yok edilmesi.

- Yüzme havuzları, uzay araştırmaları (mühendislik), sterilizasyon.

- Termal banyo havuzları, tat ve koku iyileştirmesi.

- Virüs deaktivasyonu.

- Su ve temizleme suyu, mum işleme.

Tablo-1. Ozonun kullanım alanları ve etkisi

2.1.3. Medikal Ozon

Teknik ozon ($TechO_3$) ozon ve havanın karışımı olup atmosferik havadan hazırlanır ve bütün dünyada ilke olarak su sterilizasyonunda (şehirlerde içme suyu tesisleri) ve kimyasal beyazlatma işlemlerinde kullanılır. Teknik ozonun tersine medikal ozon ($MedO_3$) sessiz elektrik deşarjı ile hazırlanır ve istenen doz ve konsantrasyonda ozon/oksijen karışımı elde edilir.

Medikal ozon her zaman saf ozonla saf oksijenin karışımıdır. Uygulanmasına bağlı olarak ozonun konsantrasyonu 1-100 μg/ml (% 0.05-5 O_3) arasında değişebilir.

Ozon molekülü sabit bir molekül değildir. Tıbbi amaçla kullanılacak olan ozon molekülü her zaman taze olarak özel bir jeneratör yardımıyla çalışma yerinde hazırlanır ve anında uygulanır, çünkü bir saatin sonunda orijinal ozonun yalnızca yarısı elimizde kalır; gerisi yeniden oksijen olarak ayrışmıştır.

Farklı teknik yapılarda ozon jeneratörleri piyasada bulunmaktadır. Örneğin, yüksek veya alçak frekanslı alternatif akımları temel alan, yüzey veya plazmik deşarjlı jeneratörler vardır.

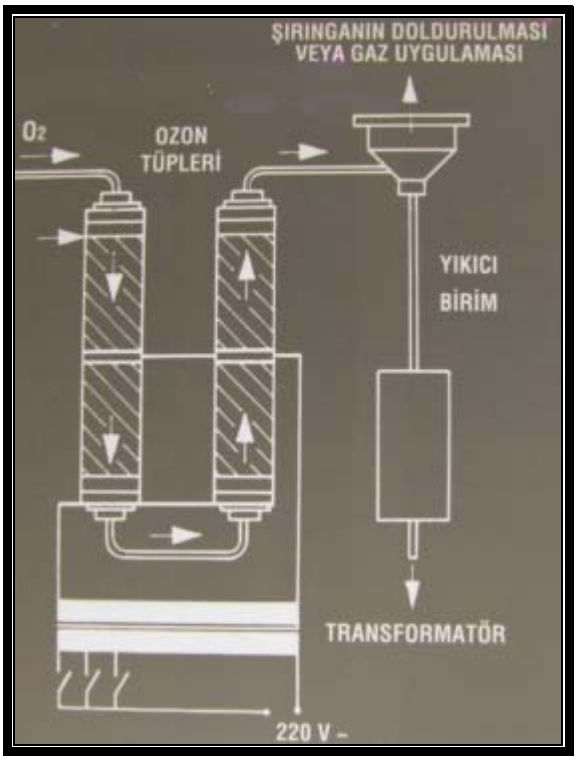
Jeneratörlerde enerji, tekil O_2 moleküllerinin oksijen atomlarına ayrışmasını sağlar. Atomlar, var olan bir O_2 molekülüyle birleşerek O_3 molekülünü oluşturur. Fazla veya kullanılmayan meta-stabil bir madde olan ozon, katalitik yolla (enerji açığa çıkartarak) yeniden oksijene dönüşür. Ozonun kendiliğinden saf ozon/oksijen karışımına ayrışması öncelikle sistemin sıcaklık derecesine bağlıdır ve ikinci derece bir reaksiyonla gerçekleşir. Ozonun ayrışması yalnızca sıcaklığa değil, sistemin bütününe bağlıdır. Konteynerin hacmi ne kadar küçük ve sıcaklık ne kadar yüksek olur ise, ozon/oksijen karışımının yarı ömrü daha az olur. Bunun yanında kullanılan konteynerin malzeme yapısı da yarı ömrü etkilemektedir. Örneğin 50 ml hacimli bir cam enjektörde 20 ^0C sıcaklık ve 760 Torr (101.3 kPa) basınç altında yarı ömür 45 dakikadır. Aynı dışsal koşullarda yarı ömür süresi 20 dakika ile 3 gün arasında değişmektedir.

2.1.4. Medikal ozonun elde edilmesi

Farklı teknik yapılarda ozon jeneratörleri piyasada bulunmaktadır. Örneğin, yüksek veya alçak frekanslı alternatif akımları temel alan, yüzey veya plazmik deşarjlı jeneratörler vardır.

Şekil 2'de düşük frekans voltajda plazmik deşarjlı medikal ozon jeneratörünün ilkesi açıklanmaktadır. Burada medikal ozon, seri bağlanmış iki yüksek voltaj tüpünden geçmektedir. Tüpler de yaklaşık 4000 ile 9000 V arasında değişen voltaja bağlıdır.

Enerji, tekil O_2 moleküllerinin, oksijen atomlarına ayrışmasını sağlar. Atomlar, var olan bir O_2 molekülü ile birleşerek O_3 molekülünü oluşturur. Fazla veya kullanılmayan ozon, katalitik yolla yeniden oksijene dönüştürülür.



Şekil 2: Medikal ozon jeneratörünün işleyiş ilkesi (Renate Viebahn-Haensler, Ozonun tıpta kullanımı, İngilizce 4. baskıdan (2002) çeviri, 1. Türkçe baskı, 2005.)

Kullanıcı kural olarak ozon konsantrasyonunu iki parametre ile değiştirebilir: voltaj ve gaz akım miktarı (gaz akışı). Uygulanan voltaj artırıldıkça ozon

konsantrasyonu da artar. Gaz akışı arttıkça, yani oksijenin deşarj bölgesinden akışı hızlandıkça, ayrışmamış O_2 moleküllerinin sayısı, yani ozon konsantrasyonu daha az olacaktır. Oksijen akışı çoğaldıkça ve daha fazla voltaj uygulandıkça, ozon konsantrasyonu da yükselir. Ancak yaklaşık olarak 1-10 litre/dakikadan daha yüksek bir değerin uygulanması pratik olarak mümkün değildir. Ozon konsantrasyonu voltaja ek olarak sıcaklık, basınç, akış hacmi gibi çeşitli parametrelere bağlı olduğu için ozon jeneratörlerinde O_3 konsantrasyonu sürekli olarak ölçülmelidir. Standart ölçüm olarak UV fotometresi, konsantrasyonun belirlenmesinde tercih edilen yöntemdir.

2.1.5. Medikal ozonun uygulama biçimleri

a. Sistemik uygulamalar

Majör otohemoterapi: Son yıllarda majör otohemoterapi, düşük riskli ozon uygulamalarının en önemli biçimi haline gelmiştir. "Ozon+kan reaksiyonu", hastanın vücudunun dışında gerçekleşmekte, bundan sonra hastanın kendi kanı aktif eritrositlerle reinfüzyona sokulmakta ve immüno-kompetan hücreler aktive olmaktadır.

Bu tedavide ilke olarak uygulama steril malzemeler kullanılarak kapalı, basıncı alınmış bir sistem içinde yapılır. Hastadan 50-100 ml kan alınır, organizma dışında ozon ile zenginleştirilir. Ozon/oksijen karışımı, kandan son derece ince kabarcıklar biçiminde geçirilir. Ozon oksijenle neredeyse anında reaksiyona girerek sıvının üzerinde toplanırsa da, reaksiyon ve reaksiyonla ortaya çıkan maddelerin herhangi bir etkisi olmaz. Kan daha sonra hastaya rutin transfüzyon işlemlerinde olduğu gibi tekrar infüze edilir.

Majör otohemoterapinin en önemli endikasyonları, arteriyel dolaşım bozuklukları, enfeksiyonlar, bağışıklık sistemi yetersizlikleri, kanser hastalıklarının adjuvan tedavileri ve romatizma/eklem iltihaplarıdır (6).

Rektal insüflasyon: En eski sistemik ve lokal uygulama yollarından biri, ozon gazının rektal uygulanmasıdır. Sistemik etkileri açısından majör otohemoterapiye

gerçek bir alternatif oluşturmuştur. Bu yöntemle, yaklaşık 10-12 insüflasyonluk bir uygulama dizisini takiben majör otohemoterapiye benzer sonuçlar elde edilebilir.

Rektal insüflasyon, katetere bağlı ozona dirençli bir enjektör yardımı ile veya bir ozon konteyneri ve silikon doz çantası kullanarak gerçekleştirilebilir. Kural olarak 150-300 ml ozon/oksijen karışımı tatbik edilir.

Bu uygulama yönteminin çocuklarda en uygunu ve pratiği olduğu gösterilmiştir. İnsüflasyon, hastaya yüzü koyun yatar pozisyonda uygulanmalıdır.

Genel olarak rektal insüflasyon, venöz yapılarının uygun olmadığı majör otohemoterapi endikasyonu olan hastalarda, bağırsaklarda proktit veya kolit gibi patolojik durumlarda veya immün sistemi zayıf pediatrik vakalarda rekürren enfeksiyonların tedavisinde kullanılabilir (6).

b. Topikal uygulamalar

Düşük basınçlı ozon gazı uygulaması: Lokal olarak sınırlı yaralarda ozon/oksijen karışımı plastik kap biçiminde bir cihazdan sürekli olarak tedavi edilecek olan bölgeye akıtılır. Bölge daha önce su ile ıslatılır, artık O_3 geriye çekilir ve tekrar O_2'ye dönüştürülür. Basınç, yani kısmi vakum, hastanın kendisini en az rahatsız hissedeceği biçimde ayarlanır. Uygulamanın, özellikle dekübit yaralarında, radyasyon hasarında ve fistüllerde yararlı olabileceği bildirilmektedir.

Diyabetik ayak yaralarında plastik bir bot kullanılır ve hastanın bacağı bot içine yerleştirildikten sonra botun üst kısmı gaz kaçırmayacak şekilde kapatılır. Bu tip lokal uygulamalar, emilim kabında olduğu gibi yapılmaktadır ve kural olarak tedavinin sistemik biçimi ile bağlandırılır (6).

Ozona dirençli plastik kaplarda transkütan ozon irrigasyonu: Venöz ülserler ve geniş alana yayılan aşırı enfekte olmuş yaraların tedavisinde ozona dirençli plastik çanta ve/veya torbaların kullanılması pratik olmaktadır.

Yara, uygulama öncesinde salin ile yıkanır; ardından bir velcro bandı ile gaz kaçırması önlenir. İçerisindeki hava önce açma-kapama musluğu ile çıkartılır ve ardından belirlenmiş oksijen/ozon karışımı ile doldurulur. Ülser veya yara bölgesi ile gaz karışımının teması sağlanır. Medikal ozon ortalama 10-15 dakika kadar süreyle

uygulanır. Artık ozon, katalizör kullanılarak oksijene dönüştürülür ve solunum yolu ile ortaya çıkabilecek bir sorun engellenmiş olunur (6).

Ozonize su uygulanması: Ozonize su, yeni veya yakın zamanda yapılmış cerrahi müdahaleler de dahil olmak üzere, enfekte olmuş her tür yaraya karşı topikal uygulama için endikedir. Ozonize su, kompresler biçiminde uygulanabilir. Aynı zamanda tamamlayıcı bir tedavidir. Çünkü ıslak bir ortam söz konusu olduğundan, polar O_3 molekülü, aynı yapıdaki H_2O molekülleri tarafından çevrilir; böylelikle enflamasyon, yanık ve diğer deri lezyonları gibi lokal uygulamalarda optimal bir konum sağlar. Ayrıca ozonize kompresler, ödem oluşumu gibi enflamatuar süreçlerin başlangıç aşamaları sırasında hızlı ve önemli ölçüde aoğrı kontrolü sağlar. Lokal ozon uygulanması, hücresel metabolizmayı aktive eder, Adenozin trifosfatta (ATP) artış sağlar ve lezyonun yakınındaki üreme yatkınlığını koruyan hücrelerin polarize olmalarına katkı yapar. Bu sayede ödemler iner.

Kural olarak ozonize su, çift damıtılmış sudan taze olarak hazırlanır. Bu su maksimum 20 µg/ml ozon absorbe eder ve oda sıcaklığında yarı ömrü yaklaşık 10 saattir. Pratik olarak herhangi bir gaz açığa çıkarmadığı için havaya ozon karışmaz. Kullanılan ozon miktarı suda erime özelliği ile orantılı olduğundan doz aşımı gözlenmez.

Ozonize su, enfekte yaraların tedavisinde, mantar enfeksiyonları, liken veya küflerde, zona, herpes tedavisinde ve diş hekimliğinde hem dezenfektan olarak, hem de diş çekimi sonrasındaki yaraların tedavisinde, bukkal kavitedeki iltihaplar, candida veya prodontitis vakalarında kullanılabilir (6).

Topikal uygulama olarak rektal insüflasyon: Sistemik etkisine ek olarak rektal ozon/oksijen gaz insüflasyonunun lokal etkisi de kolşit ve proktit tedavisinde önemli yer tutar. Fistül tedavisinde fistül içine ozon/oksijen infiltrasyonu için kateter ve emilim kabı birlikte kullanılır (6).

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

etkin olduğu kanıtlanmıştır. en önemli kullanım alanları gonartroz, akut/kronik ağrılı eklem rahatsızlıkları ve hareket kısıtlığı oluşturan eklem rahatsızlıklarıdır. İntraartiküler ozon uygulaması, ağrılı eklemlerin tedavisinde yardımcı bir tedavidir (6).

2.1.6. Medikal ozonun etki mekanizması

Ozon, siklik bir yapıda üç oksijen atomundan oluşur ve normalde gaz olarak bulunur. Ozon jeneratöründe yüksek bir voltaj gradiyentinden geçerken saf oksijenden üretilir:

$3O_2 + 68{,}400 \text{ cal} \rightarrow 2O_3$

Sonuç olarak her zaman %95'ten az olmayan oksijen ve %5'ten fazla olmayan ozondan oluşan bir gaz karışımı elde edilir. Havanın olmadığı mutlaka doğrulanmalıdır çünkü böyle bir durumda ozonla birlikte toksik azot dioksit (N_2O_2) gazı da üretilmiş olur. Bununla birlikte ozon jeneratörleri yüksek kaliteli ve paslanmaz çelik, doğal cam ve teflon gibi ozona dirençli maddelerden yapılmalıdır.

Ozon, oksijen ile kıyaslandığında 1.6 kat daha ağırdır ve suda 10 kat daha fazla çözünür. Her ne kadar ozon radikal bir molekül değilse de, fluorin ve persülfattan sonra üçüncü en potent oksidandır (E^o= +2.076 V). Ozon, saklanamayan ve kararlı olmayan bir gazdır ve 20^0C'de yarı ömrü 40 dakika olduğundan üretilir üretilmez kullanılmalıdır.

Ozonu tıpta kullanmak istiyorsak mutlaka toksisitesinden korunmamız gerekir ve bu da yalnızca iyi standardize olmuş bir fotometresi olan ozon jeneratörü ve daha önceden belirlenmiş gaz hacmini kullanarak sağlanabilir. Bunun yanında toksisite oluşturmadan terapötik etkinlik sağlayacak optimal dozu bilmeliyiz.

Değişen derecelerde göz ve akciğerler, ozona son derece duyarlıdır çünkü bu organların minimal nötralize edici kapasiteleri vardır ve bu yüzden ozon, bu organlarla asla temas etmemelidir.

Herhangi bir gaz gibi, sıcaklığa bağlı olarak ozon saf su içinde Henry kanununa göre fiziksel olarak çözünür. Sadece bu durumda ozon reaksiyona girmez ve sıkıca kapatılmış bir cam şişede ozonlu su birkaç gün boyunca aktif olarak kalır.

Diğer yandan, biyolojik sıvılarda (fizyolojik salin, plazma, lenf sıvısı, idrar) çözünür çözünmez reaksiyona girer:

O_3 + biyomoleküller → $O_2 + O^{\cdot}$

Burada atomik oksijen çok reaktif bir atom olarak davranır. Ozonun cilt ve mukozalardan penetre olduğu veya hücre içine girdiğine yönelik yanlış inanışların aksine, ozon daha sonrasında artık ortada yoktur.

Tercih sırasına göre ozon çoklu doymamış yağ asitleri, askorbik asit ve ürik asitler gibi antioksidanlarla, sistein gibi –SH grubu olan tiol bileşikleri ile, indirgenmiş glutatyon (GSH) ve albümin ile reaksiyona girer. Ozonun dozuna bağlı olarak karbonhidratlar, enzimler, deoksiribonükleik asit (DNA) ve ribonükleik asit (RNA) da etkilenebilir.

Bütün bu bileşikler, elektron vericisi olarak davranırlar ve oksidasyona uğrarlar. Asıl reaksiyon anında bir mol hidrojen peroksit (reaktif oksijen türü arasında yer alır) ve iki mol lipid oksidasyon ürününe dönüşümü gösterir:

R-CH = CH-R' + O_3 + H_2O → R-CH=O + R'-CH=O + H_2O_2

Temel reaktif oksijen türü molekülü, birçok biyolojik ve terapötik etkiden sorumlu olan, ozon mesajcısı gibi davranan ve radikal olmayan bir oksidan olan hidrojen peroksit molekülüdür (7,8). Reaktif oksijen türlerinin her zaman zararlı oldukları görüşü artık kabul görmemektedir çünkü fizyolojik miktarlarda, sinyal iletiminin düzenleyicisi olarak görev yaparlar ve savunma ve immün yanıtın önemli medyatörleridir.

Ferröz iyonu (Fe^{++}) varlığından şiddetle kaçınılmalıdır çünkü hidrojen peroksit varlığında, Fenton reaksiyonu yolu ile en reaktif madde olan $OH^{\cdot}$ (hidroksil radikali) oluşumunu katalize eder:

$Fe^{++} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{+++} + OH^{\cdot} + OH^{-}$

İlginç olarak, ozone seruma maruz kalan endotel hücrelerde azot monoksit ($NO^{\cdot}$) üretimi tespit edilmiştir (9). Fazla miktarda reaktif oksijen türlerinin varlığı peroksinitrit ($O=NOO^{-}$) ve hipoklorit anyonu (ClO^{-}) gibi diğer toksik bileşiklerin oluşumuna yol açacağından dikkat edilmelidir.

Her ne kadar reaktif oksijen türlerinin yarı ömürleri bir saniyeden daha az olsalar da, önemli hücresel bileşkeleri hasara uğratabilirler ve bu yüzden hasar

oluşturmaksızın biyolojik etki sağlayabilmeleri için dikkatlice kalibre edilmelidirler. Bu, kanın ölçülebilen antioksidan kapasitesine karşılık ozon dozunu ayarlayarak (1:1 oranda kanın her ml.si için ozon konsantrasyonu µg/ml olarak) sağlanabilir ve eğer gerekir ise ozon tedavisi öncesi veya süresince oral antioksidan verilmesi ile güçlendirilebilir.

Lipid oksidasyon ürünlerinin üretimi, plazmadaki mevcut çoklu doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonunu takip eder: bunlar heterojendirler ve lipoperoksitler ($LOO^{\cdot}$), alkoksil radikalleri ($LO^{\cdot}$), lipohidroperoksitler (LOOH), izoprostanlar ve aralarında 4-hidroksi-2,3 transnonenal (HNE) ve malonildialdehidlerin (MDA) bulunduğu alkenaller olarak sınıflandırılabilir. Radikaller ve aldehidler intrinsik olarak toksiktirler ve çok düşük konsantrasyonlarda ortaya çıkartılmalıdır. Reaktif oksijen türlerine göre in vitro koşullarda daha kararlıdırlar fakat kanın reinfüzyonu, safra ve idrardan atılımları ve GSH-transferaz (GSH-Tr) ve aldehid transferazlarla metabolize olmaları ile vücut sıvılarında belirgin bir dilüsyona giderler. Bu yüzden, yalnızca mikromolar düzeyin altında konsantrasyonları kemik iliği, karaciğer, santral sinir sistemi, endokrin bezler gibi organlara ulaşabilir ve buralarda devam eden akut oksidatif streste sinyal ileti molekülü olarak görev yaparlar (10).

Eğer hastalık durumu çok ileri boyutta değil ise, bu moleküller süperoksit dismutaz (SOD), GSH-peroksidazlar (GSH-Px), GSH-redüktaz (GSH-Rd) ve katalaz (CAT) gibi antioksidan enzimlerin upregülasyonunu sağlayabilirler. İlginç şekilde, Iles ve Lui, HNE'nin glutamat sistein ligaz sentezini indükleyerek antioksidan savunmada anahtar rol oynayan GSH'nin hücre içi artışına yol açtığını göstermiştir (11). Dahası, lipid oksidasyon ürünleri içlerinden bir tanesinin hem oksijenaz I (HO-1 veya HSP-32) olduğu oksidatif stres proteinlerini indüklerler ve hem molekülünü yıktıktan sonra CO ve bilirübin gibi son derece kullanışlı bileşikleri ortaya çıkartırlar (12). Bilirübin önemli bir lipofilik antioksidandır ve eser miktarda CO, NO ile birlikte çalışarak siklik GMP aktivasyonu ile vazodilatasyonu düzenler. Fe^{2+}, yükseltgenmiş ferritin ile kuvvetli şekilde şelasyona uğrar. Oksidatif stres sonrası HO-1'in indüksiyonu, en önemli antioksidan savunma ve koruyucu enzimlerden biridir. Dahası, lipid oksidasyon ürünleri, ozon tedavisi esnasında hastaların kendilerini iyi hissettikleri şeklinde bildirdikleri nöroimmün düzenleyici bir etki gösterirler.

Her ne kadar hipotez olarak kalsa da, lipid oksidasyon ürünleri tedavi süresince, metalloproteinazların salınımını aktive eder ve kemik iliğindeki hayati

hücrelerin ayrılmasını sağlayabilir. Bu hücreler bir kez dolaşıma girdiklerinde uyarılabilirler ve daha öncesinde hasarın ortaya çıktığı (travma veya iskemik-dejeneratif olay) yerlerde yerleşim gösterirler.

Mikromolar düzeylerin altındaki lipid oksidasyon ürünleri seviyelerinin uyarıcı ve yararlı, yüksek seviyelerin ise toksik olabileceği bildirilmiştir (10). Bir çok deneysel veriye dayandırılan bu sonuç, terapötik sonuca ulaşabilmek için ideal ozon konsantrasyonlarına ulaşmak gerektiği sonucunu kuvvetlendirmektedir: çok düşük konsantrasyonlar etkisizken (plasebo etkisi ortaya çıkartabilirler), çok yüksek dozlar negatif etki (halsizlik, yorgunluk) açığa çıkartabilirler. Bu yüzden toksisite ortaya çıkartmadan oksidatif etkiyi tetikleyerek biyolojik etki gösterebilmeleri için eşik seviyenin hemen üzerinde bir değere ulaşmalıdırlar.

2.1.7. Reaktif oksijen türleri ve lipid oksidasyon ürünleri ile ortaya çıkartılan biyolojik etkiler

Ozonasyon olayı iki fazda işleyen reaktif oksijen türleri ve lipid oksidasyon ürünleri oluşumu ile karakterizedir. Bu olay ya ex vivo (tipik örneğinde cam şişede toplanan kan) veya in vivo (ozonun intramusküler enjeksiyonu sonrasında) olur, fakat reaktif oksijen türleri anında etki gösterip kaybolduğundan (erken ve kısa etkili mesajcılar), dolaşım yolu ile lipid oksidasyon ürünleri dokulara dağılır ve sonunda yalnızca birkaç molekül hücre reseptörlerine bağlanır. Bunların farmakodinamileri, potansiyel toksisitelerini en aza indirgemelerine izin verir ve geç ve uzun etkili mesajcılar olarak davranmalarına olanak sağlar.

Plazmada reaktif oksijen türlerinin oluşumu son derece hızlıdır ve antioksidan kapasitesinde ozon dozuna bağlı geçici ve az miktarda (%5-25) bir azalmaya yol açar. Önemli olarak 15-20 dakika içinde sağlanan bu normale geri dönüş, dehidroaskorbatın askorbik asite olduğu gibi okside bileşiklerin yeniden etkin biçimde dolaşımını sağlar (13). H_2O_2 kolaylıkla plazmadan hücre içine difüze olur ve sitoplazma içinde aniden ortaya çıkması tetikleyici uyarıcıyı temsil eder: hücre tipine bağlı olarak eritrositler, lökositler ve trombositler içinde çeşitli biyokimyasal yollar aktive olur ve çok sayıda biyolojik etkinin ortaya çıkmasını sağlar. Hatırlanması gereken nokta plazma ve sitoplazma kompartmanları arasında gradiyentin olduğudur. Hücre içi H_2O_2 konsantrasyonu, plazmanınkinin yalnızca %10'udur (14). Suya hızlı

indirgeme yüksek GSH, CAT ve GSH-Px konsantrasyonları ile sağlanır: bununla birlikte birçok biyokimyasal yolun aktivasyonunun sağlanabilmesi için H_2O_2 eşik konsantrasyonun üzerinde olmalıdır.

Ana hücre içi sinyal moleküllerinden biri olarak tanımlanan hidrojen peroksitin nasıl değişik kan hücreleri üzerinde etki gösterdiğine bakacak olursak eritrositler hidrojen peroksit kütlesini temizlerler: GSH hızlıca GSSG'ye okside olur ve GSH/GSSG oranının indirgenmesine oldukça duyarlı olan hücre, bu dengesizliği ya GSSG'yi ihraç ederek ya da askorbat veya elektron alıcısı olarak işlev gören indirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) fazlalığında GSH-Rd ile indirgeyerek düzeltir. Ardından, okside NADP glukoz-6-fosfat dehidrogenazın (G6PD) anahtar enzim olarak rol aldığı pentoz fosfat yolunun aktivasyonu ile okside edilir. Bu esnada az, fakat önemli derecede ATP oluşumunda artış belirlenir fakat bunun pentoz döngüsüne mi yoksa fosfofruktokinaza mı, veya her ikisine birden mi bağlı olduğu netleştirilememiştir (15). Dahası, kısa bir süre için yeniden infüze edilen eritrositler, oksijen-hemoglobin disosiasyon eğrisindeki sağa kaymadan dolayı iskemik dokulara oksijen taşınmasını kolaylaştırılar. Açık olarak tek bir AHT tedavisinin minimal bir etkisi vardır ve 30-60 günlük bir süre içinde en azından 2.5-4 litrelik kanın ozonlanmasına ihtiyaç vardır. Bu süre zarfında, lipid oksidasyon ürünleri kemik iliği üzerinde tekrarlayan stresleyiciler olarak işlev görür ve bu sık uyarılar antioksidan enzimlerin düzenlenmesi sayesinde eritrogenez esnasında ozon stresine adaptasyonu sağlar. Sonuç olarak ozon tedavisi alan kronik bacak iskemisi olan bir hasta, iskemik dokulara daha fazla oksijen taşıma kapasitesine sahip eritrosit gruplarının oluşmasından dolayı klinik iyileşme sağlayabilir. Bununla birlikte, sonuç iyileşme trombosit ve endotel hücrelerinden bölgesel NO, CO ve büyüme faktörlerinin salınmasına da bağlıdır (16).

Her ne kadar ozon en potent dezenfektanlardan biri olsa da, in vivo bakteri, virüs veya mantarları inaktive edemez, çünkü patojenler paradoksik olarak güçlü antioksidan sistemler tarafından özellikle hücre içinde çok iyi korunurlar. Bu yüzden, ozon nötrofilleri aktive ederek ve bazı sitokinlerin sentezini uyararak immün sistemin çalışmasını artırarak etki gösterir (17). Ozonlanmış lökositler dolaşıma bir kez döndüklerinde, lenfoid mikroçevrede yerleşirler ve daha sonra sitokin salgılayarak komşu dokularda parakrin yolla baskılanmış olan immün sistemin yeniden aktivasyonunu sağlarlar. Fizyolojik sitokin cevabı olarak tanımlanan bu olay,

doğuştan gelen immün sistemin bir parçasıdır ve zararlı bir çevrede bizim hayatta kalmamıza yardımcı olur.

Kanın ozonlanması esnasında, özellikle heparin ile antikoagülasyon sağlandı ise, trombositlerde ozon dozuna bağlı şekilde bir aktivasyon artışı gözlenir ve takiben tipik büyüme faktörlerinin salgılanması yolu ile iskemik hastalarda kronik ülserlerin iyileşmesi hızlanmış olur. Mümkün olduğu durumlarda, antikoagülan olarak heparin kullanımı sodyum sitrata tercih edilir çünkü plazma Ca^{++} ile şelasyona uğramayarak biyokimyasal ve elektriksel olayları kuvvetlendirir (18).

Alıcıya ozonlanmış kanın verilmesi sırasında, endotel hücrelerinin çoğunluğu LOPs tarafından aktive edilir ve sonuçta NO, plazma S-nitrostiolleri ve S-nitrosohemoglobinin artışına yol açar. Her ne kadar NO'nun yarı ömrü 1 saniyeden kısa olsa da, proteine bağlanmış olan NO uzaktaki iskemik vasküler sahada vazodilatasyon etkisi açığa çıkartabilir (19).

2.2. Miyokardiyal İskemi ve Reperfüzyon Hasarı

İskemik kalp hastalığı, yüksek mortalite ve morbidite ile beraber seyreder ve prevalansı dünya genelinde her geçen gün daha da artmaktadır. İskemik kalp hastalığının en yaygın nedeni, koroner arterlerin aterosklerozu ile birlikte olan arteryel trombüs oluşumu, spazm ve koroner embolilerdir (20). Miyokardiyal iskemi, kalp dokusunun yavaş yavaş veya aniden oksijen ve diğer besleyici maddelerden yoksun kalması sonucu etkilenen kalp kasının ölmesidir. Hücre hasarının patogenezindeki temel faktörler oksijen ve enerji depolarının tükenmesidir. Miyokardiyal reperfüzyon, iskemik kalpteki kan akımının yeniden sağlanması olarak adlandırılır. Erken reperfüzyon, kalp kasındaki hasar oranını en aza indirger ve kalbin pompa fonksiyonunun korunmasını sağlar (21). Bununla birlikte uzamış iskemik süre sonrasında reperfüzyon sağlanması normal kardiyak fonksiyonların sağlanmasından ziyade miyokardiyumda belirgin bir hasara yol açar (22). Bu yüzden, iskemi-reperfüzyon (I/R) hasarı uzamış iskemi periyodu sonrasında kan akımının yeniden sağlanması ile oksidatif hasar, inflamasyon ve kardiyak disfonksiyonla sonuçlanan kalp hasarı olarak tanımlanabilir. Miyokardiyal prekondisyoning ve postkondisyoning yapılmasının kalbi I/R hasarlarına karşı koruduğu gösterilmiştir (23).

Fosfatidilinositol-3-kinaz (PI-3K) ve Akt/protein kinaz B gibi yaşam öncesi kinazların aktivasyonunun pre- ve postkondisyoning olaylarında rol aldığı gösterilmiştir (24).

Miyokardiyal iskemi bozulmuş membran potansiyeli ve iyon dağılımı, hücresel şişme ve hücresel iskeletin organizasyonunda bozulma gibi değişik hücresel olaylara yol açar (25). Normal hücresel fonksiyonlar için gerekli olan ATP'nin büyük kısmı intraselüler aerobik oksidatif mekanizmalar ile sağlanır. Bu mekanizmalar için gerekli temel faktör ise oksijendir. Bu sayede protein sentezi, membran bütünlüğü, iyon transportu, lipogenez ve fosfolipid çevrimi için gerekli açilasyon-deaçilasyon reaksiyonları gerçekleşir. İskeminin sebep olduğu hipoksi sonucunda ATP üretimi anaerobik yolla olur. Anaerobik metabolizmaya bağlı iskemi adenin nükleotidlerinde katabolizmaya yol açarak ATP'de azalmaya ve hücre içinde hipoksantin birikimine neden olur. İskemi ksantin dehidrogenazın proteolitik olarak ksantin oksidaza dönüşümü ile birliktedir ve reperfüzyon esnasında hipoksantin ve ksantini ürik asite metabolize eder ve yüksek miktarda süperoksit anyonu (O^{2-}), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikalleri (OH^-) gibi serbest oksijen türlerinin oluşmasına sebep olurlar (26). Reaktif oksijen türleri en dış yörüngesinde çiftlenmemiş elektron ihtiva eden oldukça reaktif moleküllerdir ve bu özelliklerinden dolayı molekül kararlı değildir ve sitotoksik özellik taşır. Membran hasarına yol açan ve hücre içi sinyal iletim yollarını aktive eden bu serbest radikaller, sonuçta miyokard hücresinin hasarına ve ölümüne yol açarlar. Reoksijenasyon sağlanan iskemik miyokardiyumda artmış reaktif oksijen türleri üretiminin olduğu gösterilmiştir ve bunların en fazla salınımı reperfüzyonun ilk 15 dakikasında olur (27). Miyokard iskemi-reperfüzyon hasarı daha önce iskemik kalan bir alanda kan akımının yeniden sağlanması ile birlikte kompleks patolojik olaylar neticesinde orjinal iskemik hasardan daha fazla doku hasarının ortaya çıkmasıdır. I/R kaskadı reperfüzyon aritmileri, miyokardiyal stunning, mikrovasküler hasar, miyokardiyal hibernasyon ve no-reflow fenomeni gibi değişik olayları içerir. Miyokardiyal stunning, uzun bir süre boyunca kontraktilitenin bozuk seyrettiği bir disfonksiyondur. Bu olaya insanlarda trombolitik tedavi, koroner anjiyoplasti ve koroner arter bypass cerrahisinde rastlanabilir. Reperfüzyon esnasında reaktif oksijen türlerinin üretimi ve geçici olarak kalsiyum yüklenmesinin kontraktil filamentlerin kalsiyuma olan cevap verme kapasitesini azaltarak miyokardiyal stunningte kontraktil disfonksiyon yarattığı bilinmektedir (28).

Miyokardiyal hibernasyon, azalmış koroner perfüzyona bağlı olarak kontraktil fonksiyonda geri dönüşümlü bir azalmadır. Hibernasyon, azalmış oksijen desteğine bağlı olarak en az ihtiyaçla miyokardiyumun hayatta kalabilmesi için metabolik ihtiyaçlarını ve kendi kontraktilitesini azalttığı endojen adaptif bir süreçtir. Bununla birlikte, kronik hibernasyonda koroner kan akımı normale dönse bile miyokard fonksiyonunun normale dönmesi ve iyileşmesi gecikebilir (29).

No-reflow fenomeni safen ven greftleri, aterektomi, perkütan transluminal koroner anjiyoplasti (PTCA) ve stent anjiyoplastisi gibi değişik durumlarda görülen bir durumdr. No-reflow fenomeni enfarkt boyutuna karşılık bir kardiyak cevap olarak no-reflowun derecesini belirler. No-reflow fenomeninin vazokonstriksiyon, interstisyel ödem oluşumu, lökosit yakalanması, bölgesel endotel şişme, mikroembolizasyon ve nötrofil tıkaçları ile ilişkili olduğu bulunmuştur (30). Dahası, no-reflow fenomeni endotel bozulması, trombosit kümeleşmesi, bölgesel endotelyal şişme, mikroembolizasyon ve nötrofil tıkacı oluşması gibi değişik patolojik olayları içine alır (31). Reperfüzyon ilişkili no-reflow alanlarının gelişmesi, koroner arterlerin yeniden açılmasını takiben bölgesel miyokard kan akımındaki azalma sonrasında ilk birkaç saat içinde ortaya çıkar. Yeni akım sonrası ortama gelen kan akımı ile taşınan beyaz küreler, iskemi-reperfüzyon hasarı esnasında çeşitli inflamatuar medyatörlerle birlikte serbest oksijen radikallerini salarlar (32). Yeniden sağlanan kan akımı hücre içine oksijeni ulaştırır ve hücresel proteinler, DNA ve plazma membranının hasara uğramasına yol açarak miyokard hasarı ile sonuçlanan bir dizi olaya sebep olur (33). Oksidatif stres, hücre içi kalsiyum fazlalığı, nötrofil ve lökosit aktivasyonu, adezyon kaskadı ve aşırı hücre içi ozmotik yükün iskemi-reperfüzyon hasarı patogenezinde rol aldıkları bildirilmiştir. Kaspaz-3, kaspaz-8, interlökin-6 (IL-6), kalpainler ve tümör-nekroz faktörü-alfa (TNF-α) gibi sinyal yollarının iskemi-reperfüzyon ilişkili miyokard hasarından sorumlu oldukları bildirilmiştir (34-37). Ek olarak p38α mitojen-aktive protein kinaz (p38α MAPK), poli (ADP-riboz) polimeraz (PARP), janus kinaz/sinyal transducer ve transkipsiyon aktivatörü (JAK/STAT), mitojen aktive protein kinaz (MEK1/2), c-jun-N-terminal kinaz (JNK1/2), poli (ADP-riboz) glikohidrolaz (PARG), kaspazların ikinci mitokondri kaynaklı aktivatörü/düşük pi ile birlikte apoptosis-bağlayıcı proteinin direkt inhibitörü (Smac/DIABLO) ve Rho-kinazların miyokard iskemi-reperfüzyon hasarının gelişmesi sürecindeki patogenezinde ve kardiyak disfonksiyonda rol aldıkları gösterilmiştir (21).

Lipoksijenaz-1 (LOX-1) okside LDL (düşük dansiteli lipoprotein) için yeni bir lektin-benzeri reseptördür ve iskemik miyokardiyumda normalden fazla sentezlendiği ve LOX-1'den yoksun iskemiye maruz kalmış farelerin, reperfüzyon sonrası miyokardiyumlarının daha az miyokardiyal hasara uğradıklarına dair yayınlar mevcuttur. Bu özellikleri ile LOX-1 miyokardiyal iskemik hasarı azaltmak için ilaç geliştirilmesinde potansiyel bir hedef özelliği taşımaktadır (38).

Son yapılan çalışmalar kardiyak mast hücrelerin inflamatuar medyatörlerin salgılanmasını sağlayarak miyokardiyal iskemi-reperfüzyon hasarına yol açtıklarını göstermektedir (39). Mast hücreleri TNF-α, IL-1, IL-6, transforme edici büyüme faktörü-beta (TGF-β) ve bazik fibroblastik büyüme faktörü (bFGF) gibi miyokard disfonksiyonu gelişmesinde rol aldığı öne sürülen sitokinler salgılarlar.

İskemi-reperfüzyon aracılı miyokard hasarını azaltmak için kullanılan tedavi yaklaşımları kontrollü reperfüzyon sağlanması, prekondisyoning, postkondisyoning yapılması ve kalsiyum antagonistleri, lökotrien-B4 (LTB-4) antagonistleri, kompleman inhibitörleri ve demir şelatörleri, vitamin E ve mannitol gibi çeşitli antioksidan maddelerin verilmesini kapsamaktadır.

2.2.1. Miyokardiyal iskemik prekondisyoning

İskemik prekondisyoning, kısa dönemli iskemi periyodlarının daha sonraki iskemi-reperfüzyon hasarından korumada rol oynadığına inanılan bir yaklaşımdır.

Sağlıklı hayvanlarda gözlenen pre- ve postkondisyoningin koruyucu etkileri, klinik senaryoda yeniden üretilemeyebilir; çünkü kalp cerrahisine giden çoğu hastada kalp yetmezliği, hipertansiyon, kardiyak hipertrofi, hiperkolesterolemi, hiperglisemi ve obezite gibi değişik yandaş sorunlar mevcuttur. Hiperglisemi, hiperkolesterolemi, hipertansiyon ve ateroskleroz, kalp yetmezliği ve yaşlanma gibi sistemik sorunların her birisinin prekondisyoning cevabını değiştirdiğine yönelik yorumlar mevcuttur (40).

Akut veya kronik hiperglisemi, iskemi sonrası gelişen reperfüzyon hasarını artırır. Hiperglisemik durumlarda endojen koruyucu sinyal yollarının fonksiyonunun bozulduğu ve iskemik miyokardiyuma olan koroner kan akımının azaldığı belirlenmiş, bunun sonucunda da prekondisyoningten beklenen kardiyoprotektif etkilerin azaldığı bulunmuştur (41). Hiperglisemik durumlarda prekondisyoningin

kardiyoprotektif etkilerinin azaldığı Sasaki ve ark. tarafından da kanıtlanmış ve yapılan çalışmada tip II diabetes mellituslu ratlarda iskemi-reperfüzyon hasarı sonrasında kalplerinin prekondisyoning ile korunamadıklarını göstermişlerdir (42).

Deneysel çalışmalar hiperkolesteroleminin NO aracılı biyokimyasal yolları hasara uğrattığı ve bunun sonucunda da prekondisyoning ile sağlanan karditoprotektif etkileri önlediğini göstermektedir (43). Dahası, insanlarda hiperkolesteroleminin miyokardiyal iskeminin progresyonunu hızlandırdığı, reperfüzyon iyileşmesini ve prekondisyoning ile sağlanan antiiskemik etkileri bozduğu belirlenmiştir (44). Hiperkolesterolemi, NOS için gerekli bir kofaktör olan miyokardiyal tetrahidropterinin upregülasyonunu engelleyerek prekondisyoningin kardiyoprotektif etkilerini bozguna uğratır (45). Hiperkolesteroleminin ayrıca kardiyoprotektif 70 kDa ısı şok proteini (HSP70) sentezini inhibe ederek, NO biyoyararlanımını azaltarak ve apoptotik hücre ölümünü kolaylaştırarak iskemi-reperfüzyon kaynaklı miyokardiyal hasarını daha da kötüleştirdiği gösterilmiştir (46,47).

2.2.2. Kardiyak operasyonlar esnasında iskemi-reperfüzyon hasarı

Kardiyak operasyonların seyri esnasında planlı olsun veya olmasın, iskemi ve takip eden reperfüzyon periyodu sık yaşanmaktadır. Bu periyotların her biri potansiyel olarak miyokard hasar nedeni olup genel olarak bakılacak olursa kardiyopulmoner bypass öncesi koroner oklüzyon veya sistemik hipotansiyona bağlı olarak gelişebilen iskemi, kardiyopulmoner bypass sırasında kardiyopleji solüsyonunun infüzyonları arasındaki dönemde veya kardiyopleji solüsyonunun uygunsuz/yetersiz dağılımına bağlı iskemi ve kardiyoplumoner bypass sırasında veya sonrasında reperfüzyon sonrası gelişen iskemi dönemlerinde oluşabilir.

Bu iskemik dönemlerin her biri miyokard hasarı oluşturabilir. Herhangi bir dönemde bu etkiler bağımsız karşımıza çıkabildiği gibi, bu etkilerin kümülatif bir yansıması ile de karşılaşabiliriz. Her iskemik dönem bir reperfüzyon süreci ile devam eder. Bu reperfüzyon dönemi de miyokardiyal hasar nedeni olabilir ve iskemi sırasında gelişmiş olan miyokardiyal hasarın ilerlemesi veya yeni bir hasarın meydana gelmesi ile sonuçlanabilir. Sonuç olarak reperfüzyon ile gelişebilecek ek hasar şu dönemlerde başlayabilir:

- Kardiyopulmoner bypass öncesi resusitasyon veya hemodinamik stabilizasyon

- Kardiyopulmoner bypass sırasında revaskülarize edilen segmente greft yolu ile kardiyopleji verilmesi, internal mammarian arter greftinin akımının başlatılması

- Aortik kros klempin kaldırılması

Ayrı ayrı veya tekrarlayan iskemi ve reperfüzyon dönemlerinin her biri kardiyak hasara neden olabilir. Bu hasar klinik olarak miyokardiyal stunning, miyokard enfarktüsü veya miyokardiyal apoptosis şeklinde bulgu verebilir. Bu hasarın miyositlerdeki etkisi miyokard nekrozu ve kontraktil disfonksiyon olarak karşımıza çıkar, fakat patoloji miyositlerle sınırlı kalmaz, aynı zamanda vasküler endoteli de etkileyerek nitrik oksit ve adenozin metabolizmalarında da bozulmaya neden olur. Fizyolojik şartlarda nötrofil ve süperoksit radikallerinin inhibisyonunu sağlayan nitrik oksit, özellikle reperfüzyon sırasında kardiyoprotektif etki göstermektedir (23). Bunların dışında kardiyoplumoner bypassın ve kardiyopulmoner bypass sırasındaki bazı teknik ve uygulanan medikasyonların da sitokin ve kompleman sistemindeki aktivasyon ile bu iskemi reperfüzyon hasarını artırıcı etkileri olabilir (48).

2.3. Serbest Radikaller ve Süperoksit Dismutaz (SOD)

Hücre zedelenmesinde önemli bir mekanizma kısmen oksijen türevleri ile aktifleşen, iskemik reperfüzyondaki serbest radikallere bağlı zedelenmedir. Serbest radikaller kimyasal, oksijen ve diğer gaz toksisiteleri, hücresel yaşlanma, fagositik hücrelerin mikropları öldürmesi, iltihabi hasarlar, makrofajların tümörü harabiyeti ve diğer olaylarda genel bir doku zedelenmesi yolu izleyerek etkili olurlar.

Radikaller hücre içinde ultraviyole veya X ışını gibi radyan enerjinin tutulumu veya normal fizyolojik olaylarda redoks reaksiyonları ile oluşurlar ve egzojen kimyasal maddelerin enzimatik metabolizmalarından türerler. Radyan enerji suyu eriterek $OH^{\cdot}$ (hidroksil iyonları) ve $H^{\cdot}$ iyonlarını serbestleştirir. Moleküler oksijenin redüksiyonundan türeyen diğer bir serbest radikal süperoksittir ($O_2^{\cdot -}$). Normal oksijen suya indirgenir, fakat mitokondriyonlar, lizozomlar, peroksizomlar ve plazma membranındaki ksantin oksidaz gibi bazı oksidazların etkisiyle bazı reaksiyonlarda $O_2^{\cdot -}$ oluşabilir. Değerlilikleri değiştiği için transisyonel olarak adlandırılan demir ve

bakır gibi bazı metaller serbest elektronları alıp vererek serbest radikal oluşumunu (Fenton reaksiyonu: $Fe^{++} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{+++} + OH^{\cdot} + OH^{-}$) katalizlerler. Demir, özellikle toksik olan OH oluşumuna yol açtığı için toksik oksijen zedelenmesinde önemlidir. Serbest demirin büyük kısmı ferrik (Fe^{+++}) biçimindedir. Fenton reaksiyonuyla aktif olan ferröz (Fe^{++}) iyonuna redüklenir. Bu reaksiyon süperoksit iyonuyla sağlanır ve demir kaynağı ve süperoksit maksimal oksidatif hücre hasarı için gereklidir.

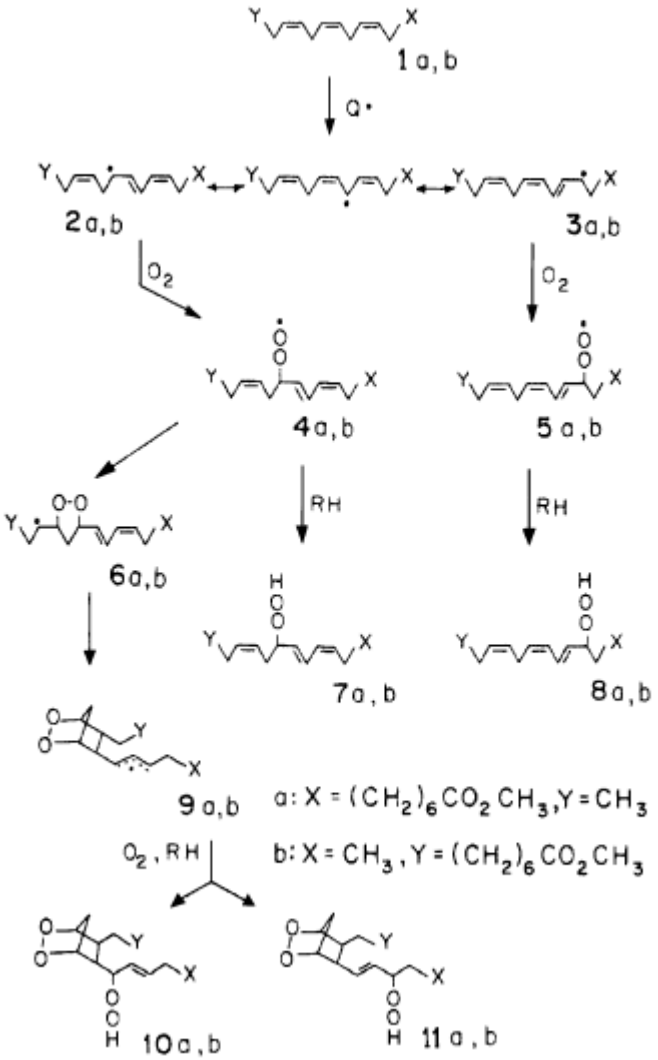
Vücutta serbest radikaller oluşunca organizma tarafından atılmaya çalışılır. Çoğu hücrede bulunan süperoksit dismutazların (SOD) katalitik etkisi ile kayıp hızı belirgin ölçüde artar ($O_2^{\cdot -} + O_2^{\cdot -} + 2H^{+} \xrightarrow{SOD} H_2O_2 + O_2$). SOD tarafından katalizlenen bu tepkime "dismutasyon tepkimesi" diye adlandırılır. Süperoksit, özellikle hafif asidik koşullarda SOD olmadan kendiliğinden dismutasyonla da H_2O_2'e çevrilebilir. SOD enziminin yüksek katalitik etkisi nedeniyle hücrelerde süperoksit birikimine izin verilmez.

Glutatyon peroksidaz gibi birçok enzim serbest radikallere karşı koruyucudur ($2OH^{\cdot} + 2GSH \rightarrow 2H_2O + GSSG$). Peroksizomda bulunan katalaz, H_2O_2'yi dekompoze eder ($2\ H_2O_2 \rightarrow O_2 + 2H2O$). Bu enzimler hücreleri serbest radikallere karşı korurlar. Alternatif olarak vitamin E, sistein, glutatyon ve seruloplazmin gibi sülfiridler serbest radikallerin oluşumunu engelleyerek veya onları inaktive ederek etkileyen endojen ya da ekzojen antioksidanlardır (49).

2.4. Malondialdehit (MDA) ve Oksidatif Stres

Oksidatif stres, birçok klinik hastalığın etiyopatogeneziyle ilişkilidir ve yaşlanma olayında önemli bir rol üstlenir. Oksidatif stresin birçok biyolojik hedefi arasında lipidler, en fazla olaya iştirak eden biyomolekül sınıfını oluştururlar. Lipid oksidasyonu, birçok ikincil molekül oluşmasına yol açar ve bu ürünler, esas olarak oksidatif hasarı artırma yeteneği olan aldehitlerdir (50). Uzun ömürlü olmaları ve yüksek reaktiviteleri, bu moleküllerin hücre içi ve dışında etki göstermelerine olanak sağlar ve nükleik asit ve proteinlerle ilişkiye girerek hücre fonksiyonelliği üzerinde etkisi olan mekanizmalar üzerinde geri dönüşümü olmayan hasarlara yol açar. MDA, çoklu doymamış yağ asidi peroksidasyonunun temel ve en fazla çalışılan ürünüdür (51).

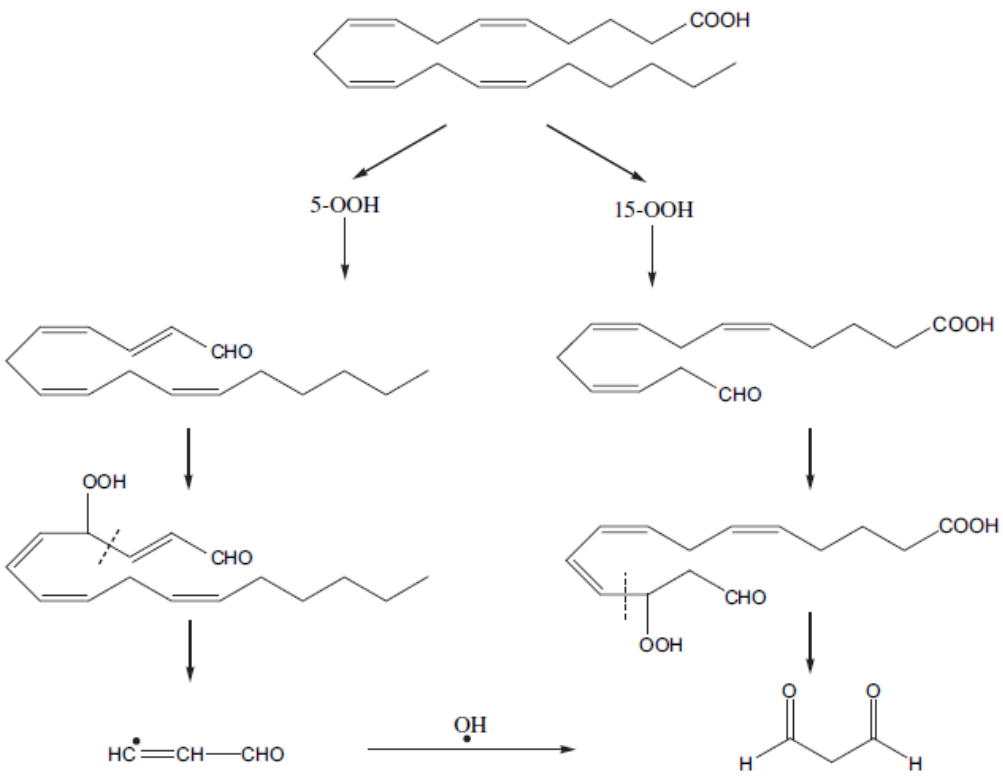
Biyolojik örneklerde MDA'nın esas kaynağı çoklu doymamış yağ asitlerinin bir veya daha fazla metilen-kesintili çift bağlarla peroksidasyonudur. MDA ile ilişkili olarak 3 farklı oluşum mekanizması bildirilmiştir. Pryer ve Stanley'in hipotezlerine göre asıl öncül madde, prostoglandin sentezi esnasında oluşturulana benzer bisiklik endoperoksittir (52). Reaksiyonda metil linoleat, prostoglandin benzeri endoperoksitlere dönüştürülür. MDA'nın bu öncül maddelerden, stres koşulları altında oluştuğuna inanılır (Şekil 3).



Şekil 3: Metil linoleattan malondialdehit öncülleri olduğu sanılan prostoglandin benzeri endoperoksitlerin oluşum mekanizması (52).

Diğer iki mekanizmaya göre takip eden hidroperoksit oluşumları esnasında, hidroperoksit vermek üzere yağ asidi zincirinde β-ayrışım olur; MDA daha sonra β-

kesimi ile veya sonuçta oluşan akrolein radikalinin hidroksil radikali ile reaksiyonu sonucunda oluşur (53) (Şekil 4) .



Şekil 4: Esterbauer ve arkadaşları tarafından önerilen iki mekanizma, hidroperoksialdehit vermek üzere hidroperoksit oluşumunun ardından yağ asidi zincirinin β-ayrışımına dayanır; daha sonra MDA β-kesimi ile veya sonuçta oluşan akrolein radikalinin hidroksil radikali ile reaksiyonunun ardından meydana gelir (53).

MDA, aynı zamanda çeşitli prostoglandinlerden in-vivo olarak enzimatik yollarla ortaya çıkartılabilir. Hecker ve Ullrich, tromboksan A_2 (TxA_2) biyosentezinin, MDA ve 12(S)-hidroksi-8,10(E,E)-heptadekadienoik asit (HHT) oluşumuna yol açtığını göstermiştir (54).

Fizyolojik durumda ve nötral pH'da, MDA enolat anyonu olarak bulunur ve düşük kimyasal reaktiviteye sahiptir (53). Bununla birlikte bu molekül, değişik bileşikler oluşturmak üzere nükleik asit bazları ile reaksiyona girebilir. MDA, potansiyel genotoksik aktivitesi ile birlikte mutasyonlara ve sonrasında kansere yol açabilir.

MDA toksisitesi, aynı zamanda kardiyovasküler stabilite üzerine de yönlenir.MDA'nın, primer aminlerle ilişki içinde bulunarak 1-amino-3-iminopropen ile lizin-lizin çapraz bağları yaptığı ve piridil-dihidropiridin tipi köprü oluşturduğu bilinmektedir. Bu reaksiyonun ürünleri, okside lipoproteinlerin (LDL) apo-B fraksiyonlarında tespit edilmiş ve modifiye lipoproteinlerle makrofajların bozulmuş ilişkilerinde rol almıştır. Bu olay, aterojenitenin temelini oluşturmaktadır (55).

Kardiyovasküler hastalıklar, serbest radikal ilişkili mekanizmalarla ve lipid peroksidasyonu ile yakından ilişkilidir. Palidori ve arkadaşları, konjestif kalp yetmezliği hastaları ile kıyaslandıklarında, sağlıklı bireylerde daha yüksek antioksidan ve daha düşük MDA seviyeleri tespit etmişlerdir. Aynı zamanda hemodiyaliz hastalarında kardiyovasküler hastalık prevalansının oksidatif strese bağlı olduğu düşünülerek, bu hastalarda ve kardiyovasküler komplikasyonları olan hemodiyaliz hastalarında MDA seviyelerinin daha yüksek oldukları bulunmuştur (56).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde gerçekleştirildi. Alınan biyokimyasal örnekler Meram Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'nda, patolojik örnekler de Patoloji Anabilim Dalı'nda incelendi.

Çalışmanın planlanmasını takiben Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi Deney Hayvanları Etik Kurulu onayı (22.12.2006 tarihli Etik Kurul, 2006-36 numaralı proje) alındı. Proje finansmanı için herhangi bir maddi destek alınmadı. Çalışmada kullanılan ozon jeneratörü için Medikal Oksijen Ozon Derneği'nden ekipman desteği alındı; alınan jeneratör deneyin tamamlanmasını müteakiben geri iade edildi.

Çalışmada, yerel etik komite tarafından sayıları belirlenen 37 adet Sprague-Dawley cinsi dişi erişkin sıçan (190-236 gram) kullanıldı. Denek hayvanlarının seçimi konusunda, etik kurulun da düşünceleri göz önünde bulundurularak ülke ve üniversitemiz koşulları doğrultusunda karar verildi.

3.1. Cerrahi İşlemler

Çalışma hayvanları dört ayrı gruba ayrıldı. Bu gruplar; **a)** sham-kontrol (Grup I), **b)** iskemi (Grup II), **c)** oksijen ile iskemik prekondisyoning yapılan (Grup III) ve **d)** ozon ile iskemik prekondisyoning yapılan grup (Grup IV) olarak adlandırıldı.

Hayvanlar cerrahi işlemlerden önce tartıldı ve sonrasında ketamin hidroklorür (60 mg/kg; intraperitoneal) anestezisi altında stabilizasyon amaçlı tahtalara sabitlenerek cerrahi uygulanacak alan tıraş edildi. Ardından tıraşlanmış alanlar betadin solüsyonu ile temizlendi (Resim 1).

Steril cerrahi teknik kullanılarak boyun önyüzünde yüzeyel cilt kesisi yapıldı ve ciltaltı dokular geçilerek trakeaya ulaşıldı. Trakea üzerinde 11 numara bistüri ile trakeotomi açıldı ve denek trakeotomi kanülü aracılığı ile solunum cihazına (SAR-830 Ventilator, CWE, Incorporated, Ardmore, PA) bağlandı ve 60 solunum sayısı/dakika ile 400 ml/dakika oda havası verilerek solunum desteği sağlandı (Resim 2).



Resim 1: Denekler sedasyon sonrası stabilizasyon amaçlı tahtalara sabitlendi ve cerrahi uygulanacak alan tıraş edildi. Ardından tıraşlanmış alanlar betadin solüsyonu ile temizlendi.

Daha sonra hayvana kuyruk veninden 50 IU heparin ve 1 ml izotonik sodyum (%0.9 NaCl) enjeksiyonu yapıldı. Steril cerrahi teknik kullanılarak sol 4. interkostal aralıktan girilerek kalbe ulaşıldı.

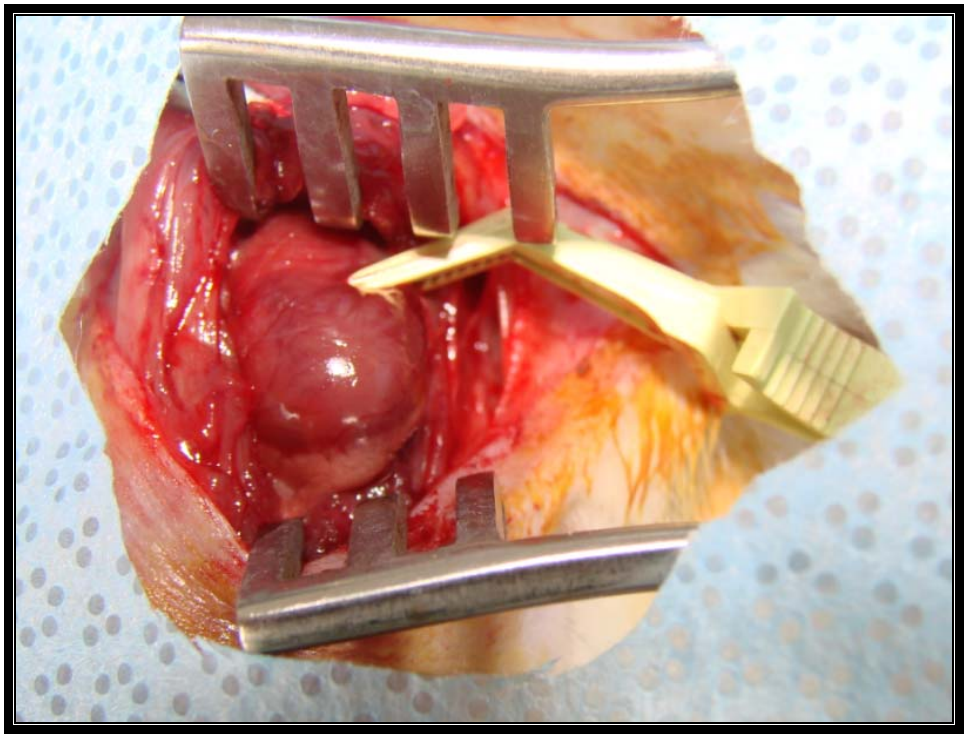


Resim 2: Denekler trakeotomi kanülü aracılığı ile solunum cihazına (SAR-830 Ventilator, CWE, Incorporated, Ardmore, PA) bağlandı ve 60 solunum sayısı/dakika ile 400 ml/dakika oda havası verilerek solunum desteği sağlandı.

Standart işlemlerden önce Grup I'deki deneklere 3 gün boyunca periton içine 5 ml oda koşullarında alınan serbest hava enjekte edildi. Üç günün sonunda standart işlemler yapıldıktan sonra sol torakotomi yapıldı ve perikard açılarak kalbe ulaşıldı, fakat deneklere iskemi uygulanmadı; 75 dakika boyunca denek takip edildi ve sonrasında sol ventrikülden kan örneği alındı; kardiyak doku örneklemesi için kalp eksize edilerek denek sakrifiye edildi ve işleme son verildi. Alınan kan örneği santrifüje edildi ve serumu ayrıştırılarak -80^0C'de saklandı.

Grup II'de Grup I'deki deneklere uygulandığı üzere 3 gün boyunca periton içine 5 ml oda koşullarında alınan serbest hava enjekte edildi. Standart işlemler yapıldıktan sonra sol torakotomi yapıldı ve sol akciğer ekarte edildi. Perikard açılarak kalbe ulaşıldı. LAD (sol anterior inen arter) trasesine uygun pozisyonda arter gözlenerek küçük plastik buldog damar klempi kullanarak denekte 25 dakikalık iskemi uygulandı (Resim 3). Bu esnada denek göz parlaklığı ve kardiyak atımı yakın takip edilerek vital fonksiyonları değerlendirildi. İskemi süresinin ardından buldog klemp kaldırılarak geçici iskemik duruma son verildi ve kalpte reperfüzyon sağlanmış oldu. Toplam 75 dakika süre ile LAD sahası reperfüzyona maruz bırakıldı. Bu süre sonunda ilk grupta olduğu gibi kan ve doku örneklemesi yapılarak denek sakrifiye edildi.

Grup III'te işlem öncesinde 3 gün süreyle oksijen tüpünden alınan 5 ml.lik %100'lük oksijen deneklere intraperitoneal olarak enjekte edildi. Bu süre sonunda standart işlemler yapılarak Grup II'de olduğu gibi sol torakotomi yapıldı ve sol akciğer ekarte edildi. Perikard açılarak kalbe ulaşıldı. LAD trasesine uygun pozisyonda arter gözlenerek küçük plastik buldog damar klempi kullanarak denekte 25 dakikalık iskemi uygulandı. Bu esnada denek göz parlaklığı ve kardiyak atımı yakın takip edilerek vital fonksiyonları değerlendirildi. İskemi süresinin ardından buldog klemp kaldırılarak geçici iskemik duruma son verildi ve kalpte reperfüzyon sağlanmış oldu. Toplam 75 dakika süre ile LAD sahası reperfüzyona maruz bırakıldı. Bu süre sonunda Grup I ve II'de olduğu gibi kan ve doku örneklemesi yapılarak denek sakrifiye edildi.



Resim 3: Deneklerde sol torakotomi yolu ile kalbe ulaşılarak LAD trasesine uygun pozisyonda arter gözlendi ve küçük plastik buldog damar klempi kullanarak denekte 25 dakikalık iskemi uygulandı.

Grup IV'te işlem öncesinde deneklere 3 gün süreyle intraperitoneal medikal ozon verilerek iskemik prekondisyoning yapıldı. Medikal ozon, masaüstü ozon jeneratörü (Dr. Hánsler OZONOSAN, photonik) kullanılarak elde edildi. Medikal ozon cihazında ozon konsantrasyonu 50 µg/ml olarak ayarlandı (Resim 4). Elde edilen medikal ozon ve oksijen karışımı, yıkımına müsaade edilmeden hemen deneklere intraperitoneal olarak enjekte edildi. Deneklere verilen medikal ozon miktarı 1 mg/kg dozundan hesaplanarak verildi. Deneklere, 50 µg/ml olacak şekilde ozon jeneratöründen elde edilen medikal ozon ve oksijen karışımı intraperitoneal olarak ağırlıklarına göre yaklaşık olarak 4,5-5 ml enjekte edilmiş oldu. Ardından Grup II ve III'te olduğu şekilde sol torakotomi yapıldı ve sol akciğer ekarte edildi. Perikard açılarak kalbe ulaşıldı. LAD trasesine uygun pozisyonda arter gözlenerek küçük plastik buldog damar klempi kullanarak denekte 25 dakikalık iskemi uygulandı. Bu esnada deneğin vital fonksiyonları yakın takip edildi. İskemi süresinin ardından buldog klemp kaldırılarak geçici iskemik duruma son verildi ve kalpte reperfüzyon sağlanmış oldu. Toplam 75 dakika süre ile LAD sahası reperfüzyona maruz bırakıldı.

Bu süre sonunda Grup I, II ve III'te olduğu gibi kan ve doku örneklemesi yapılarak denek sakrifiye edildi.



Resim 4: Deneyde medikal ozon, masaüstü ozon jeneratörü (Dr. Hánsler OZONOSAN, photonik) kullanılarak elde edildi. Medikal ozon cihazında ozon konsantrasyonu 50 μg/ml olarak ayarlandı.

Bütün alınan kan örnekleri, santrifüj cihazında 3500 devir/dakika ile santrifüje edilerek serumları ayrıldı. Alınan serum örnekleri, biyokimyasal analizlerin yapılacağı süreye kadar numaralandırılarak kapaklı Ependorf tüpleri içinde -80^0C'de saklandı. Patolojik inceleme için alınan kalp örnekleri numaralandırılarak %10'luk formaldehid solüsyonu içinde saklandı.

-80^0C'de saklanan serum örnekleri, çalışma için oda ısısında sıvı hale getirildi ve elde edilen serumlarda sırasıyla kreatin kinaz MB (CK-MB), troponin I (Tn-I), SOD ve MDA enzim aktiviteleri ölçüldü. Kalpte oluşturulan iskemi-reperfüzyon hasarı ışık mikroskopisi altında histopatolojik incelemeler ile tespit edildi.

3.2. CK-MB Kütle Düzeyi Ölçümü

CK-MB kütle düzeyleri, kemilüminesan yöntemle Siemens marka ticari kit kullanılarak IMMULITE 2000 (IMMULITE, SIEMENS, Germany) marka hormon analizöründe ölçüldü. Bu testin prensibi, ligand işaretli anti-CK-MB monoklonal antikor ve anti-ligand kaplı solid faz ile ayrımı esasına dayanır. Bağlı CK-MB kompleksi ve lüminometre ile ölçülen foton çıktısı örnekteki CK-MB konsantrasyonu ile orantılıdır. CK-MB konsantrasyonları ng/ml cinsinden verildi.

3.3. Troponin I Düzeyi Ölçümü

Troponin I düzeyleri, kemilüminesan yöntemle Siemens marka ticari kit kullanılarak IMMULITE 2000 (IMMULITE, SIEMENS, Germany) marka hormon analizöründe ölçüldü. Bu testin yöntemi , bir solid fazlı, enzim işaretli kemilüminesan immünometrik yöntemdir. Troponin I konsantrasyonları da ng/ml cinsinden verildi.

3.4. Süperoksit Dismutaz Aktivitesinin (SOD) Ölçümü

Bu amaçla süperoksit dismutaz aktivitesi ölçüm kiti (Cayman Superoxide Dismutase Assay Kit, Cayman Chemical Company, USA) kullanıldı. Yöntemin prensibi ksantin oksidaz ve hipoksantin tarafından üretilen süperoksit radikalinin tetrazolyum tuzu ile saptanması esasına dayanır. 1 Ünite SOD enzim aktivitesi süperoksit radikalinin % 50’ sinin dismutasyonu için gereken enzim miktarı olarak tanımlanır. Bu yöntemle SOD’ nin üç tipinin (Cu/Zn, Mn-, Fe-SOD) toplam aktivitesi ölçülür. SOD enzim aktivitesi U/mL cinsinden verildi.

3.5. MDA düzeyi ölçümü

MDA seviyelerinin ölçümü, Draper ve Hadley’in daha once tanımladığı metoda göre yapıldı. Metodun esası, tiobarbitürik asitin 532 nm dalga boyunda MDA ile reaksiyonu sonrasında oluşturulan rengin spektrofotometrik ölçümüne dayanmaktadır. Ölçüm sonrasında elde edilen değerler nmol/ml cinsinden verildi.

3.6. Histopatolojik İnceleme

Kardiyak dokudaki iskemi-reperfüzyon hasarı çalışmaya kör bırakılan bir patolog tarafından değerlendirildi, %10'luk formaldehid içerisinde bekletilen kalpler standart yöntemlere göre hazırlandıktan sonra hematoksilen eozin boyası ile boyanarak ışık mikroskobisi altında incelendi. Sol ventrikülde kardiyak hasarın olmadığı, normal histomorfolojik özellikteki kalp dokusu Grade 0, striasyon kaybı ve sitoplazmik vakuolizasyonların olduğu kas liflerini içeren, intersellüler lenfositik infiltrasyon ve intersellüler ödemin gözlendiği kalp dokusu Grade 1 ve son olarak nekroza uğrayan kas liflerinin bulunması da Grade 2 olarak sınıflandırıldı.

3.7. İstatistiksel Yöntem

Deneyden elde edilen veriler bilgisayar ortamında istatistik yazılım programı (SPSS for Windows v.16.0, SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA) kullanılarak analiz edildi Veriler ilk olarak normal dağılım yönünden değerlendirildi. Normal dağılıma uyan verilerde çoklu gruplar tek yönlü varyans analizi (One-way ANOVA) ve bunu takiben Tukey's post-hoc parametrik testleri ile, ikişerli gruplar Student-t testi ile karşılaştırıldı. Normal dağılıma uymayan veriler ve kalpte tespit edilen histopatolojik hasar ise çoklu gruplarda Kruskal Wallis testi, herbir grubun kontrol grubu ile ikişerli olarak karşılaştırılmasında Mann-Whitney U testi ile non-parametrik yöntemlerle değerlendirildi. $P<0.05$ değerlerinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar olduğu kabul edildi.

4. BULGULAR

Deney hayvanlarının vücut ağırlıkları benzerdi (Grup I: 218,28±15,42 gr, Grup II: 219,80±9,99 gr, Grup III: 217,10±12,13 gr ve Grup IV: 233,00±14,24 gr). Tümü sorunsuz bir şekilde deney protokolünü tamamladılar ve kardiyak doku incelemesi için kalbin çıkartılması ile sakrifiye edildiler.

CK-MB, troponin I ve MDA düzeyleri, SOD enzim aktivitesi Tablo 2'de gösterilmektedir. Gruplar arasında karşılaştırma yapıldığında, CK-MB düzeyleri ve SOD enzim aktivitesi açısından anlamlı bir fark saptanmadı ($P > 0.05$). Buna karşın Troponin I Grup III'te anlamlı olarak yüksek, MDA ise Grup IV'te kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu (***P* =0.005**). Ayrıca MDA düzeyi Grup IV'te, Grup III'e göre de anlamlı olarak düşüktü.

	Grup I (n=7)	**Grup II** (n=10)	**Grup III** (n=10)	**Grup IV** (n=10)
CK-MB (ng/ml)	0.66±0.25	0.59±0.25	0.55±0.18	0.89±1.01
Troponin I (ng/ml)	0.19±0.01	0.24±0.06	0.25±0.05*	0.26±0.01
SOD aktivitesi (U/ml)	4.01±0.76	3.50±0.30	3.50±0.18	4.35±0.24
MDA (nmol/l)	3.96±0.30	3.71±0.34	3.57±0.14	3.14±0.14*#

Tablo 2: Deney gruplarında ölçülen kreatin kinaz MB (CK-MB), troponin I ve malondialdehit (MDA) düzeyleri ve süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktivitesi. Veriler ortalama±standart hata olarak sunulmuştur. n= herbir gruptaki denek sayısı, *$P < 0.05$ Grup I ile karşılaştırıldığında, $^{\#}P < 0.05$ Grup III ile karşılaştırıldığında.

MDA açısından grupların ikili karşılaştırılmalarında grup I ve II için p=0.632, grup I ve III için p=0.20, grup I ve IV için p=0.015 **(p<0.05)**, grup II ve III için p=0.699, grup II ve IV için p=0.140 ve grup III ile IV için p=0.043 **(p<0.05)** olarak

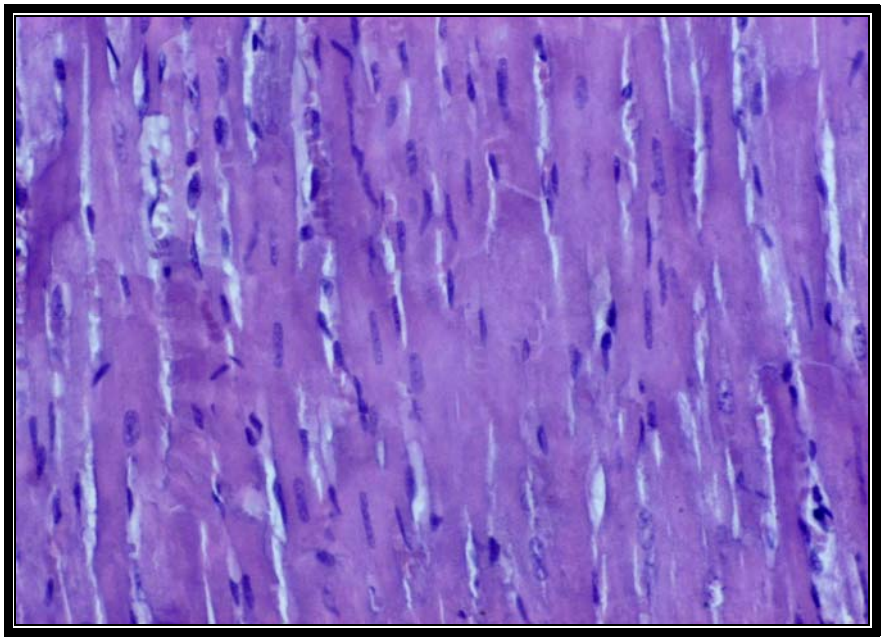
bulundu. Diğer bir deyişle kontrol grubu ile ozon grubu arasında ve oksijen grubu ile ozon grubu arasında anlamlı farklılıklar tespit edildi.

Bu sonuçlara göre beklentimizin aksine iskemi grubu ile ozon grubu arasında farklılıklar tespit edilememiştir. Her ne kadar oksijen grubu ile kıyaslandığında MDA seviyelerinin anlamlı olarak ozon grubunda daha düşük bulunması önemli olsa da, tek başına bu veriye dayanarak ozonun koruyucu özelliklerinin olduğunu söylemek güçtür.

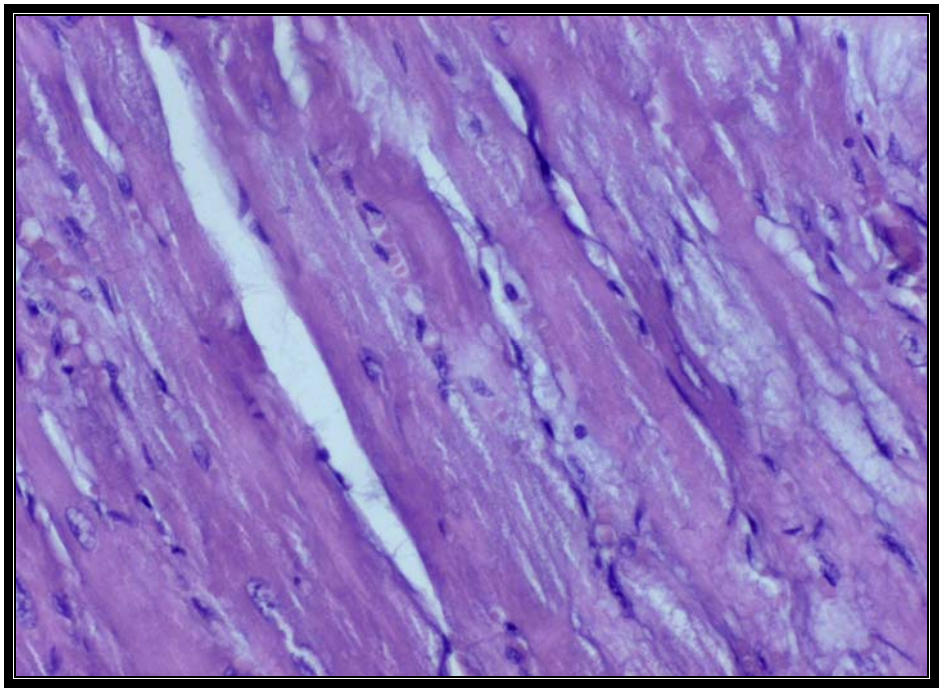
Histopatolojik ölçümler

Deneklerden alınan doku örnekleri hematoksilen-eozin (H&E) boyası ile boyandıktan sonra ışık mikroskobunda, gruplara kör bırakılan patolog tarafından x100 büyütme altında incelendi.

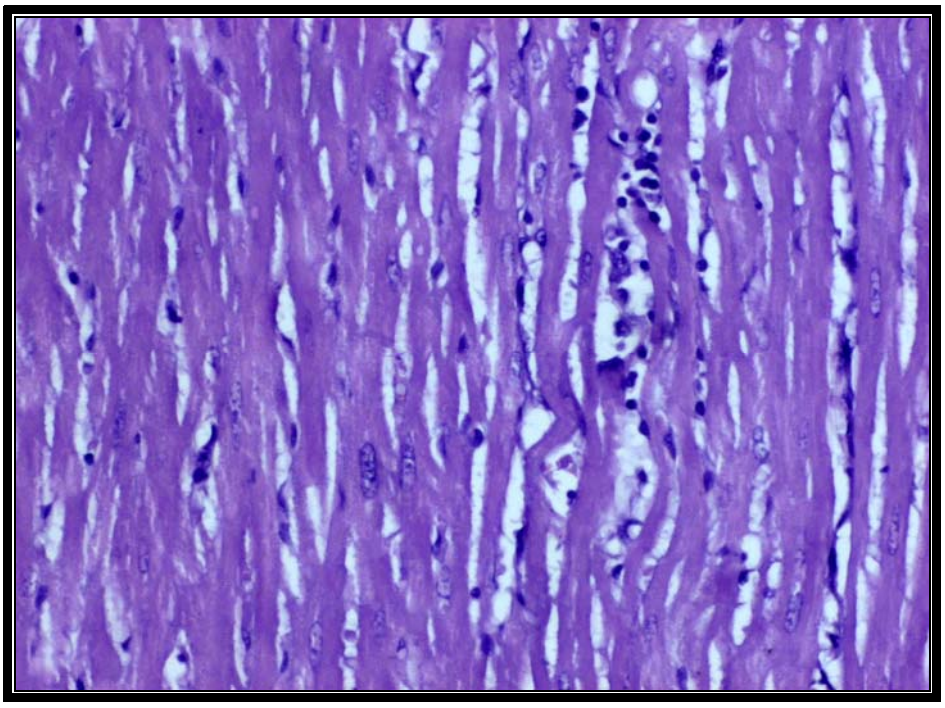
Resim 5'te normal histomorfolojik özellikteki kalp kası (Grade 0) görülmektedir. Resim 6'da Grade 1 zedelenme bulguları içeren kalp kası lifleri görülmektedir. Striasyon kaybı ve sitoplazmik vakuolizasyon dikkati çekmektedir. Resim 6'ya ilave olarak intersellüler lenfositik infiltrasyon ve intersellüler ödem gözlenmektedir (Resim 7). Resim 8'de ise kas liflerinin bir kısmının nekroza uğradığı, belirgin Grade 2 zedelenme gözlenmektedir.



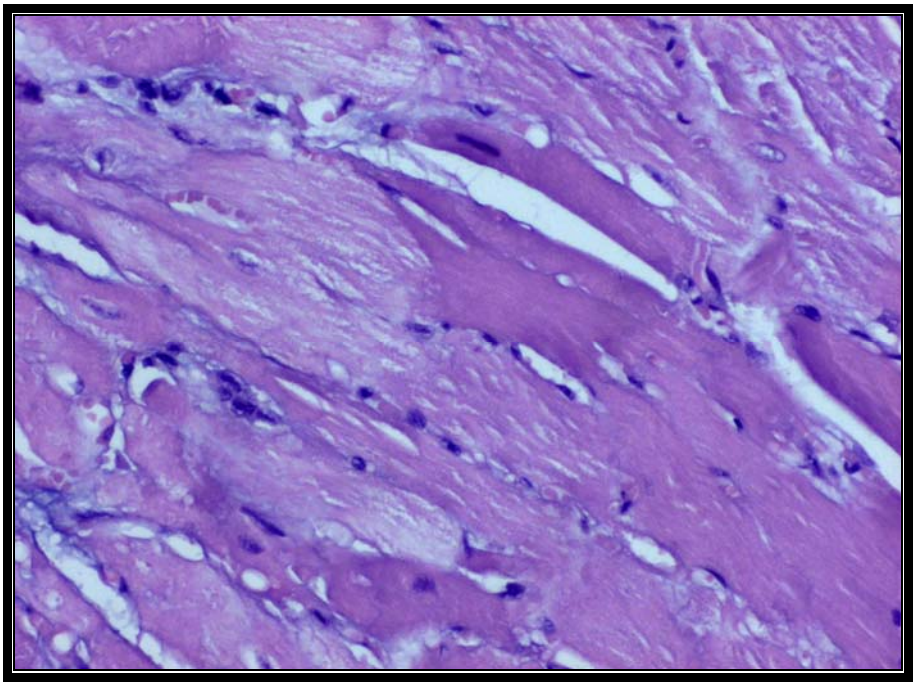
Resim 5: Grade 0 (normal histomorfoloji) özelliğindeki miyositler (H&E, x100).



Resim 6: Grade 1 zedelenme özelliğindeki (striasyon kaybı ve sitoplazmik vakuolizasyon) miyositler (H&E, x100)



Resim 7: Miyositlerde intersellüler lenfositik infiltrasyon ve ödem. (H&E, x100).



Resim 8: Grade 2 zedelenme özelliğindeki miyositler (H&E, x100).

Deney gruplarına ait histopatolojik sınıflandırma sonuçları Tablo 3'te gösterilmiştir. Bu verilere göre iskemi-reperfüzyon oluşturulan tüm gruplarda kalp dokusundaki hasarın kontrol grubuna göre anlamlı şekilde artmış olması ($P< 0.05$) deney esnasında başarılı bir iskemi-reperfüzyon modeli yaratıldığını göstermektedir.

Denek no	**Grup I** (n=7)	**Grup II** (n=10)	**Grup III** (n=10)	**Grup IV** (n=10)
1	0	2	2	1
2	0	2	1	1
3	0	2	0	1
4	0	2	1	2
5	0	1	2	1
6	1	2	1	1
7	1	2	1	0
8		2	1	1
9		2	1	2
10		1	2	1

Tablo 3: Deney gruplarında kardiyak dokudaki iskemi-reperfüzyon hasarı.

Grup I ve II karşılaştırıldığında $p<0.001$ **($p<0.05$)**, grup I ve III karşılaştırıldığında $p=0.014$ **($p<0.05$)**, grup I ve IV karşılaştırıldığında $p=0.019$ **($p<0.05$)**, grup II ve III karşılaştırıldığında $p=0.052$, grup II ve IV karşılaştırıldığında $p=0.019$ **($p<0.05$)**, grup III ve IV karşılaştırıldığında ise $p=0.739$ olarak bulundu.

Histopatolojik değerlendirmelere genel olarak bakacak olursak kontrol grubu ile diğer bütün gruplar arasında anlamlı farkın tespit edilmesi bizim deney esnasında başarılı bir MI (miyokard enfarktüsü) modeli oluşturduğumuzu göstermektedir.

Histopatolojik veriler daha önceki biyokimyasal parametreler ile birlikte ele alınacak olursa, biyokimyasal değerlerin yaklaşık 2 saat gibi kısa bir süre içerisinde yükselmesi beklenmeyebilir. Ama hücresel değişiklikler hemen erken dönemde ortaya çıkabildiklerinden bu açıdan patolojik değişiklikler önemli bir nokta haline gelmektedir. Patolojik incelemeler sonucunda medikal ozonun iskemik gruba kıyasla hücre korunması açısından anlamlı olarak olumlu etkileri gözükmektedir. Yalnız burada gruplar kendi içinde incelendiklerinde oksijen ve ozon grubu arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır. Her ne kadar oksijen ile iskemi grubu arasında anlamlı bir fark görülmemiş olsa da, ozon grubu ile oksijen grubu arasında da bir fark bulunamamış olması, bu etkinin tamamen doğruluğu açısından elimizdeki verilere güvenilirliği kısmen kısıtlamaktadır.

5. TARTIŞMA

Kalp cerrahisi pratiğinde en çok üzerinde durulan ve günümüzde dahi üzerinde en çok araştırma yapılan konulardan birisi de miyokardiyal korumadır. Şimdiye kadar temel pratikte kullanıma geçirilmiş olan Bigelow'un deneysel hipotermik arrest modelleri, Lewis'in hipotermik yöntemle atrial septal defekt onarımı, Melrose'un potasyumdan zengin kardiyoplejik solüsyonlarla kardiyak arrest çalışmalarının hepsinin temelinde iyi bir miyokardiyal koruma fikri yatmaktadır. Bütün bu metodlarda, kardiyak metabolizmayı yavaşlatan ve iskemi esnasında miyokardın beslenmesini sağlayan maddeler ve çevre şartları çeşitli kombinasyonlarla test edilmiştir. Bütün yapılan ve halen devam eden araştırmalara rağmen optimum miyokardiyal koruma sağlayan ve rutin olarak güvenle kullanılması önerilen bir yöntem konusunda bir fikir birliği sağlanamamıştır. Günümüzde cerrahi hastaya yaklaşım, daha önce yapılan çalışmaların ışığında, cerrahın bilgi birikimi ve kişisel tecrübesine kalmaktadır (57).

Miyokardiyal oksijen tüketimi, tüm vücuttaki oksijen tüketiminin yaklaşık %7'sinden fazlasını kapsamaktadır. İstirahat esnasında 100 gr sol ventrikül miyokardı, dakikada 8 ml oksijen tüketmektedir. Kalp dokusu, oksijen ihtiyacının arttığı durumlarda miyokardiyal kan akımını artırarak bu ihtiyacı karşılayabilmektedir. Kardiyak operasyonlarda uygulandığı şekilde potasyum ile sağlanan kardiyak arrest sırasında ise bu oran 1.5 ml.ye kadar inmektedir. Kalp cerrahisi esnasında kalbin oksijen tüketimi değişik koşullarda araştırılmış ve normotermik fibrilasyon esnasında oksijen tüketiminin en fazla olduğu, hipotermik, hiperkalemik arrest durumunda ise çok düşük miktarda olduğu bildirilmiştir (58).

Aortaya kros klemp konulması ile birlikte koroner kan akımı durur ve iskemi başlar. İskemiyi takip eden dakikalar içerisinde oksidatif fosforilasyon durur ve anaerobik metabolizma başlar. Fakat anaerobik metabolizma ile yeterli ATP sentezlenemediği için enerji depoları hızla boşalır. Laktik asit, inorganik fosfatlar gibi anaerobik metabolitler ve protonlar hücre içinde birikmeye başlarlar. Hücrenin ATP depolarında oluşan kayıp ve meydana gelen birikimler asidoza ve Na-K/ATPaz pompasının fonksiyonunda azalmaya neden olur. Böylece intrasellüler iyon konsantrasyonlarında bozulma meydana gelir ve ritm bozuklukları ortaya çıkar. İskemi devam ettiği sürece hücre içinde birikim yapan anaerobik metabolitlerin de etkisi ile intrasellüler kalsiyum ve ozmolarite artar, intrasellüler ödem meydana gelir,

intrasellüler lipaz ve hidrolitik enzimlerin de aktive olması ile membran bütünlüğü bozulur ve patoloji nekroza doğru ilerler (57).

Erken dönemde oluşan değişiklikler hücrede herhangi bir yapısal değişikliğe neden olmazken süre ilerledikçe ATP depolarının azalması ile birlikte patoloji gelişir. 10-15 dakikalık bir iskeminin ardından ATP depoları yarıya kadar düşer. Sonraki 1-2 dakika içerisinde miyokardiyal kontraktilite azalmaya başlar. Normotermik koşullarda 30-40 dakika içerisinde ATP düzeyleri normal seviyenin %10'una kadar düşer ve geri dönüşümsüz miyokardiyal hasar oluşmaya başlar. Yaklaşık 60 dakika sonrasında hücre membranı lizisi ile nekroz oluşur. Patoloji çalışmalarında iskemiden en erken 4 saat sonra miyokardiyal biyopsi örneklerinde koagülasyon nekrozu, ödem ve nötrofilik infiltrasyon saptanmıştır. 24 saat içerisinde nötrofil infiltrasyonu artar, miyositler parçalanır ve fibrositlerin proliferasyonu başlar. Miyokardiyal hasarın en önemli göstergelerinden biri olan miyokardiyal CK-MB, 24 saat içerisinde yükselmeye başlar. En erken belirteç olan Troponin I, hücre ölümünden sonraki 4 saat içerisinde yükselir ve ortalama 48 saat süreyle yüksek seyreder. ALT ve AST değerleri ise 4-5 gün süreyle yüksek seyreder. Miyokardiyal iskeminin tanısında günümüzde kardiyak Troponin I ve CK-MB düzeyleri, klinikte kullanılan en iyi göstergeler olarak kabul edilmiştir (59).

İskemik bir dokuda iskeminin sonlanmasından sonra tekrar oksijenasyonun olması durumu reperfüzyon olarak adlandırılır. Reperfüzon sonrasında iskemiye maruz kalmış dokunun eski fonksiyonlarını tekrar kazanması uzun bir süreçte gerçekleşir. Bu durumda gelişen geçici ve geri dönüşü olan, fakat inatçı özellikteki miyokard disfonksiyonu miyokardiyal stunning olarak bilinmektedir. Miyokard enfarktüslü veya anstabil anjina pektorisli olgularda ameliyat sonrası mortalite ve morbidite yüksektir. Bu durum miyokardiyal stunninge bağlı olabilir.

Erken reperfüzyon, kalp kasındaki hasar oranını en aza indirger ve kalbin pompa fonksiyonunun korunmasını sağlar (21). Bununla birlikte uzamış iskemik süre sonrasında reperfüzyon sağlanması normal kardiyak fonksiyonların sağlanmasından ziyade miyokardiyumda belirgin bir hasara yol açar (22). Bu yüzden, I/R hasarı uzamış iskemi periyodu sonrasında kan akımının yeniden sağlanması ile oksidatif hasar, enflamasyon ve kardiyak disfonksiyonla sonuçlanan kalp hasarı olarak tanımlanabilir.

Miyokardiyal hibernasyon, istirahat halinde kronik olarak miyokard kan akımının azaldığı, miyokard ve sol ventrikül fonksiyonlarının gerilediği patolojik bir tablo olarak tanımlanmıştır. Hibernasyon, azalmış oksijen desteğine bağlı olarak en az ihtiyaçla miyokardiyumun hayatta kalabilmesi için metabolik ihtiyaçlarını ve kendi kontraktilitesini azalttığı endojen adaptif bir süreçtir.

Kardiyak operasyonların seyri esnasında planlı olsun veya olmasın, iskemi ve takip eden reperfüzyon periyodu sık yaşanmaktadır. Bu periyotların her biri potansiyel olarak miyokard hasar nedeni olup genel olarak bakılacak olursa kardiyopulmoner bypass öncesi koroner oklüzyon veya sistemik hipotansiyona bağlı olarak gelişebilen iskemi, kardiyopulmoner bypass sırasında kardiyopleji solüsyonunun infüzyonları arasındaki dönemde veya kardiyopleji solüsyonunun uygunsuz/yetersiz dağılımına bağlı iskemi ve kardiyoplumoner bypass sırasında veya sonrasında reperfüzyon sonrası gelişen iskemi dönemlerinde oluşabilir.

Bu iskemik dönemlerin her biri miyokard hasarı oluşturabilir. Herhangi bir dönemde bu etkiler bağımsız karşımıza çıkabildiği gibi, bu etkilerin kümülatif bir yansıması ile de karşılaşabiliriz. Her iskemik dönem bir reperfüzyon süreci ile devam eder. Bu reperfüzyon dönemi de miyokardiyal hasar nedeni olabilir ve iskemi sırasında gelişmiş olan miyokardiyal hasarın ilerlemesi veya yeni bir hasarın meydana gelmesi ile sonuçlanabilir.

Günümüzde iskemi-reperfüzyon hasarının etiyopatogenezinde oksijen serbest radikallerinin rol oynadığını söylemek mümkündür. Bu radikaller etkilerini sarkolemma fosfolipidlerinin oksidasyonu ve bunun sonucunda membran bütünlüğünün bozulması ile göstermektedirler. SOD, glutatyon peroksidaz ve katalaz gibi serbest radikal hasarını azaltan enzimlerin iskemi sonrasında miktarlarının azalmış olduğu tespit edilmiş, aynı zamanda ciddi endotel hasarına yol açan endarterektomi işleminden sonra reperfüzyon hasarının belirgin olarak arttığı ortaya konmuştur (60).

İskemik prekondisyoning, ilk olarak kısa süreli iskemi ve reperfüzyona maruz bırakıldığında, kalbin uzamış iskemi periyotlarına daha dayanıklı hale geldiği adaptif, biyolojik bir olaydır. İskemiye karşı oluşan bu adaptasyon, ilk olarak Murray ve arkadaşları tarafından tanımlanmış ve klasik veya erken-faz prekondisyoning tanımlanmıştır (61). İskemiye bu artmış tolerans, enfarkt boyutu, apoptosis ve

reperfüzyon ilişkili aritmilerde azalma ile birliktedir (62). Bu, çalışılan bütün hayvan türlerinde gösterilmiştir ve iskemik precoditioning uyarısından sonra 1 ila 2 saate kadar sürüyor gibi gözükmektedir. İskemik olayın 3 saati aştığı durumlarda, etkisiz hale gelmektedir (63). Bu da, devam eden iskeminin yalnızca ve yalnızca uygun zamanda reperfüzyon sağlanması ile koruma sağlayabileceğini göstermektedir (64).

Prekondisyoningin akut fazı ortadan kalktıktan sonra, 24 saat sonrasında korumanın ikinci penceresi, geç-faz prekondisyoning veya gecikmiş prekondisyoning gibi farklı isimlerle adlandırılan ikinci bir dönem koruma ortaya çıkar. Sadece enfarktı önleyen klasik prekondisyoningin aksine, geç dönem hem enfarktı, hem de miyokardiyal stunningi engeller (65). Bu bildirilerle birlikte ortaya çıkan bir diğer gözlem de, uzak veya organlar arası prekondisyoning olarak adlandırılan, diğer organlarda ortaya çıkartılan iskeminin (renal ve mezenterik arterler, iskelet kas iskemisi) kalbin prekondisyoningine yardımcı olması olayıdır (66).

Daha yeni çalışmalar, uzamış iskemiyi takiben reperfüzyonun ilk dakikalarında yapılan kısa süreli koroner oklüzyonların, iskemik prekondisyoninge benzer şekilde miyokardiyal enfarkt boyutlarını azaltabileceğini göstermiştir (23). Bu adaptif cevap, iskemik postkondisyoning olarak adlandırılır.

Bu mekanizmaların daha iyi anlaşılması, iskemi-reperfüzyon hasarının zararlı etkilerine yönelik etkili yeni tedavi seçeneklerinin geliştirilmesini sağlayabilir. İlk olarak öne sürülen hipotezlerden bir tanesi, kardiyomiyosit adenozin A_1 ve/veya A_3 reseptörlerinin uyarılmasının, akut iskemik prekondisyoningin primer mediyatörü olduğu yönündeydi (67). Bununla birlikte takip eden çalışmalar, adenozine ek olarak, aktive edildiklerinde iskemik prekondisyoningin enfarkt boyutlarında küçülme etkilerine benzer etkiler gösteren birçok guanin nükleotid bağlayıcı protein bağlantılı reseptörler olduklarını (örn. bradikinin, endotelin, α_1-adrenerjik, muskarinik, anjiyotensin II ve delta-opioid reseptörler) göstermiştir (68). İskemik prekondisyoningi taklit eden eksojen ajanların geçici süreyle infüzyonuna farmakolojik prekondisyoning adı verilir. Endojen prekondisyoningi sağlamada bu reseptörlerin hangilerinin en önemli oldukları tam olarak bilinmemektedir; çünkü türler arasında farklılıklar olduğu göze çarpmaktadır. Her ne olursa olsun, iskemik prekondisyoning olayını tetikleyenlerin tirozin kinaz, protein kinaz C izoformları ve mitojenle aktiflenen protein kinazlar gibi enzimlerde değişikliklere yol açtığı ve uzamış iskeminin başlangıcından önce geri dönüşümsüz hasara karşı koruyucu etkide

rol aldığı düşünülmektedir (68). Her ne kadar korumayı sağlayan esas etkileyiciler belirlenemese de, bu korumayı sağlamada kardiyomiyosit mitokondrilerinin primer rol oynadığına ve prekondisyoning ilişkili koruma sağlanacaksa asıl hedefin olması gerektiğine yönelik belirgin ölçüde kanıt mevcuttur (69).

Her ne kadar bazı bulgular çelişkili olsa da, iskemik prekondisyoning ve postkondisyoningin insan kalbi üzerinde de olabileceğine dair artan kanıtlar vardır. Bazı araştırmacılar, MI öncesinde göğüs ağrısı olan hastaların, daha iyi hastane içi prognozuna sahip olduklarını ve daha az kardiyojenik şok insidansına, daha az şiddette konjestif kalp yetmezliği epizotlarına ve kardiyak enzimlerle değerlendirildiği kadarıyla daha küçük enfarktlara sahip olduklarını bildirmişlerdir (70). Bunun yanında, enfarkt öncesinde anjinası olan hastaların daha iyi uzun dönem hayatta kalım oranlarına sahip olduklarını gösteren takip çalışmaları mevcuttur (71).

Perkütan koroner girişim uygulanan hastalarda, hayvan çalışmalarında prekondisyoningi indüklediği gösterilen sonuçlara benzer şekilde, farmakolojik ajan verilmesi ile prekondisyoninge benzer etkiler olduğu gözlemlenmiştir. Örneğin girişim öncesinde adenozin verilmesinin, ilk balon şişirilmesi esnasında miyokardiyal iskemik indekslerini iyileştirdiği bildirilmiştir (72). Bradikinin ve nikorandil (K_{ATP} açıcısı) gibi diğer ajanların verilmesinin de benzer etkilere yol açtığı bildirilmiştir. Tersi olarak, aminofilin (non-selektif adenozin reseptör antagonisti) veya glibenklamid (K_{ATP} kanal blokörü) verilmesi veya nalokson, perkütan koroner girişim esnasında iskemik prekondisyoning etkilerini geri döndürür (73).

Leesar ve arkadaşları, nitrogliserinin (NO salınımı ile) 4 saatlik IV infüzyonunun, perkütan koroner girişimden 24 saat önce verilmesinin, ST-segment değişikliklerini azalttığını ve salin ile tedavi edilen hastalar ile kıyaslandığında ilk balon oklüzyonu sırasındaki göğüs ağrısını azalttığını bildirmişlerdir (74).

İskemik prekondisyoning ile ilgili olarak şimdiye kadar bahsedilen bütün bu uygulamaların yer aldığı gözlemsel çalışmalar, miyokardiyal korumanın yapılabildiği ve hayvan çalışmalarındaki bu mediyatörlerin insanlara da uygulanabilir olduğu hipotezini desteklemektedir. Bununla birlikte, hayvanlarda gözlenen klasik veya erken iskemik prekondisyoningin stunningi değil, enfarkt boyutlarında azalma ile ilişkili olduğunu belirtmekte fayda vardır.

Kalp cerrahisi açısından bakmak gerekirse, insanlarda prekondisyoningin yapılabildiğini gösteren ilk çalışma, Yellon ve arkadaşları tarafından 1993 yılında yürütülmüştür (75). Bu çalışmada, kalp cerrahisine giden hastalara, 2 siklus boyunca 3'er dakikalık global iskemi uygulanmış ve aralıklı olarak aortaya kros klemp konularak ve kalp 90/dk ile pace edilerek iskemi indüklenmiştir. Bunu, 10 dakikalık global iskemi ve ventriküler fibrilasyonu periyodu öncesinde 2 dakikalık reperfüzyon takip etmiştir. Global iskeminin olduğu 10 dakikalık periyodlar esnasında miyokardiyal doku örneklemesi yapılmış ve ATP doku içeriği ölçülmüştür. Sonuçlar, prekondisyoninge benzer şekilde protokole maruz bırakılan bireylerin biyopsilerinde, ATP seviyelerinin daha yüksek olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte, ATP miktarı nekrozun bir belirleyicisi olmadığından, bir takip çalışması yapılmış ve serum troponin T seviyeleri ölçülmüş, prekondisyoning protokolü uygulananlarda nekroz belirleyicisi olarak troponin T seviyelerinin bu bireylerde daha düşük olduğu bulunmuştur.

Yakın gelecek için, kalbi iskemi-reperfüzyon hasarından korumak amacıyla yeni geliştirilecek metodlarda en önemli strateji, geç faz iskemik prekondisyoningin altında yatan hücre içi olaylara yönelik müdahaleler olacaktır.

Sinyal iletiminde önemli rolü olan nitrik oksitin (NO), kalbin iskemiye toleransını düzenlemeye yönelik önemli rol oynadığına dair artan miktarda kanıtlar mevcuttur. Bununla birlikte, yarı ömrünün kısa olması, NOS izoformlarının hücre altı düzeyde kompartmantalizasyonu ve etkisine yönelik olarak çok sayıda hedef oluşturması, iskemi-reperfüzyon hasarını düzenlemedeki spesifik rolünün belirlenmesini engellemiştir (76). Bu, kısmen de olsa neden NO ve onunla ilişkili reaktif azot türlerinin hem hasarı artırabildiğini, hem de kardiyoprotektif bir etki gösterdiğini açıklar. Fakat in-vivo preparatlar kullanılarak yapılan çalışmaların büyük çoğunluğunda, NO vericilerin kullanılmasının enfarkt boyutlarını azalttığı gösterilmiştir (77). Aynı zamanda, reperfüzyon esnasında NOS inhibitörlerinin verilmesinin de iskemi-reperfüzyon hasarını artırdığı bildirilmiştir (78). Bu bulgular, NO'nun koroner kan akımını düzenlediği ve endotele nötrofil adezyonunu engellediği ve trombosit kümeleşmesini engellediğini bildiren bulgularla desteklenmiştir. Aynı zamanda, reperfüzyon sırasında oluşturulan oksijen serbest radikali süperoksiti (O_2^-) engellediği konusunda kanıtlar vardır (79).

Ozon, üç oksijen atomundan oluşan bir kimyasal bileşiktir. İki atomlu normal atmosferik oksijenin çok yüksek enerji taşıyan bir şeklidir. Medikal uygulamalarda ozon O_2/O_3 karışım şeklinde kullanılır. Son yıllarda medikal ozonun kullanımı hızla yaygınlaşmaktadır. Bu yaygınlaşma sadece kullanım hızındaki artışta değil, aynı zamanda tıbbi branşlarda da olmaktadır. Ozon ile karıştırılmış kanın reinfüzyonu ile NO düzeylerinde artış, iskemik alanlarda vazodilatasyona neden olarak hipokside azalma, süperoksit dismutaz aktivasyonu ve glutatyon seviyesinde azalma ile oksidatif stresin azaltıldığı gösterilmiştir (1,2).

Medikal ozonun kullanıldığı ana branşları nöroloji, ortopedi, dahiliye, spor hekimliği, endokrinoloji şeklinde kabaca verebiliriz. Bütün bu branşlarda kullanılmasına rağmen ozonun terapötik bir ajan olarak sınıflandırılması henüz günümüzde bazı zorluklar taşımaktadır. Çünkü hastalara uygulanan tedaviye verdikleri yanıtlardaki farklılıklar, standardize edilmiş çalışmaların yapılmasını zorlaştırmaktadır (16).

Son zamanlarda yapılan farmakolojik çalışmaların ışığında ozon, bir ön-ilaç olarak kabul edilebilir. Belirli toksik olmayan dozlarda biyokimyasal yolların yeniden düzenlenmesini indükleyebilir ve birçok sistemde ikincil mesajcıların aktivasyonunu sağlayabilir. Bu bağlamda iskemik prekondisyoning en iyi örneği teşkil eder.

Günümüzde düşük doz ozon ile antioksidan enzimlerin, nitrik oksit yolunun ve diğer hücresel aktivitelerin düzenlenebileceği kanıtlanmıştır ve birçok patolojik durumda ozonun şaşırtan etkilerini desteklemektedir (80).

Diyabet, düz kasların ve endotelin reaktivitesini etkileyen, damarlarda çok sayıda değişikliklere yol açan bir hastalıktır. Vasküler endotel, hiperglisemi ile indüklenen metabolik değişikliklere yatkın bir hedef gibi gözükmektedir. Poliol yolunun aktivasyonu, proteinlerin enzimatik olmayan glikozilasyonu ve reaktif oksijen türlerindeki artışın diyabetin komplikasyonları içinde önemli bir rolü vardır. Ozon tedavi edici bir ajan olarak kullanılmış ve faydalı etkileri gözlenmiştir. Bununla birlikte günümüze kadar yalnızca birkaç biyokimyasal ve farmakodinamik mekanizma gösterilebilmiştir (2,81,82).

Ozonun kronik oksidatif stresine yönelik adaptasyonu indüklediği 1996 yılında tanımlamıştır (81). Diğer çalışmalar da kontrollü ozon verilmesinin oksidatif

prekondisyoningi veya oksidatif strese adaptasyonu sağlayarak reaktif oksijen türleri ile indüklenen hasarı azaltabileceğini göstermiştir (2,82).

Diabetes mellitusun oksidatif stres ile ilişkili bir rahatsızlık olduğu düşüncesiyle, ozon tedavisinin antioksidan sistemleri koruyabileceği ve diyabetik komplikasyonlarla ilişkili olan endotel hücre hasarının diğer belirleyicilerini fizyolojik seviyelerde tutabileceği öne sürülmüştür (83).

Sanchez ve ark.nın yaptıkları bir çalışmada tip 2 diabetes mellitusu olan ve nöroenfeksiyöz diyabetik ayağı bulunan hastalarda ozon tedavisinin hiperglisemiyi azaltarak glisemik kontrolü iyileştirdiği, insülin duyarlılığını artırdığı ve diabetes mellitus ve komplikasyonları ile ilişkili oksidatif stresi iyileştirerek yara iyileşmesinde rol oynadığı öne sürülmüştür (3). Bu çalışmada ozonun farmakodinamik etkilerinin süperoksitler üzerine olan etkilerine dayandığı belirtilmiştir. Ozon ile medikal tedavi alan grupta kontrol grubuna kıyasla lezyonlarda iyileşmenin daha fazla olduğu ve amputasyonların daha az oranda görüldüğü belirtilmiş, bu özelliklerine dayanarak diabetes mellitus ve komplikasyonlarına yönelik alternatif bir tedavi metodu olabileceği belirtilmiştir.

Diabetes mellitusu olan ratlarda yapılan deneysel bir çalışmada kontrollü ozon verilmesinin oksidatif prekondisyoningi kolaylaştırdığı ve oksidatif strese adaptasyon sağlayarak reaktif oksijen türleri ile indüklenen hasarı engellediği, ozon tedavi grubunda glisemik kontrolün daha iyi sağlandığı gösterilmiştir. Ayrıca aldoz redüktazda, fruktolizin içeriği ve oksidasyon protein ürünlerindeki artışı da engellediği tespit edilmiş, bu etkilerin de endotel hasarı engellemeye yönelik olduğu sonucuna varılmıştır (83).

Birçok çalışma karaciğerin yeniden oksijenasyonunu takiben oksijen serbest radikallerinin oluşmasının karaciğer hücre kasarı, nekroz/apoptoz ve sonrasında enflamatuar hücre infiltrasyonu kaskadını başlatabileceğini göstermiştir. Her ne kadar reaktif oksijen türleri birçok kaynaktan türeyebilirse de, ksantin oksidaz bu toksik oksijen türlerinin belirgin bir kaynağı olarak gösterilmiştir. İskemik prekondisyoning, tekrarlanan kısa süreli iskemi/reperfüzyon ile ardından gelen iskemi reperfüzyona karşı koruma sağladığına inanılan potent, endojen bir mekanizmadır. Diğer yandan, düşük dozlarda ozonun endojen antioksidan sistemlerin korunması ve aktive edilmesini sağlayarak oksidatif prekondisyoningi sağlayabildiği gösterilmiştir (80).

Süperoksit, biyolojik düzenleme içerisinden yaygın bulunan radikallerden birisidir. Birçok düzenleyici etkileri hidrojen peroksit veya süperoksitten kimyasal olarak elde edilen diğer reaktif oksijen türleri aracılığıyla sağlanır (84).

Her ne kadar SOD karaciğeri iskemi reperfüzyon hasarına karşı korursa da, SOD'nin verilmesi karaciğeri korumaz (85). SOD proteini, parenteral olarak verilmesinin ardından hızlıca yıkıma uğrar. Genetik yolla hücrelerde protein sentezinin artırılması kullanılmaktadır.

Her ne kadar karaciğerde iskemik prekondisyoningin faydaları bildirilse de moleküler mekanizma hakkında bilgi sınırlıdır. Birçok merkezde aralıklı klemp uygulaması pratikte yapılmaktadır. Aralıklı klempleme ile koruyucu mekanizmanın işleyişi bilinmese de, esas olarak apoptosisi engelleyecek şekilde iskemik prekondisyoningde tanımlanan mekanizmaya benzer olduğu düşünülmektedir (86). Ozon ile oksidatif prekondisyoning yapılması, orta dereceli oksidatif stres yaratarak karaciğer hasarına karşı endojen antioksidan sistemleri uyarabilir (82). Ozon oksidatif prekondisyoningi ile yürütülen koruyucu mekanizma protein sentezini içerebilir. Artmış reaktif oksijen türlerin konsantrasyonları, birçok hücrede genetik yolla sentezi indükler ve bunların ürünleri antioksidan aktivite gösterir. Ratlarda yapılan bir hepatik iskemi-reperfüzyon modelinde, ozon ile oksidatif prekondisyoningin Mn-SOD izoformunu artırdığı ve mitokondriyal hasarı engellediği gösterilmiştir. Tersi olarak sikloheksimid ozon ile sağlanan korumayı engellemiş ve hücresel redoks dengesi sikloheksimid verildiğinde bozulmuştur. Bu yüzden, ozon oksidatif prekondisyoningi ile sağlanan koruyucu mekanizmalar, protein sentezi ile sağlanmaktadır ve ozon tedavisi bu yolla mitokondriyal fonksiyonları ve hücresel redoks dengesini korumaktadır (87).

Günümüzde son dönem karaciğer yetmezliği için karaciğer transplantasyonu en iyi tedavi olarak kabul edilmektedir. Bununla birlikte transplantasyonda karşılaşılan hepatik iskemi reperfüzyon hasarı ve hepatik rezeksiyonlar klinik uygulamada çözülememiş problemlerden birisidir. Birçok çalışma karaciğerin reoksijenasyonunu takiben oluşan oksijen serbest radikal oluşumunun karaciğer hücre hasarındaki kaskadı başlatabileceğini göstermiştir (1). Ozonun oksidatif prekondisyoninginin NO oluşumu ve hücresel redoks dengesi üzerine olan etkileri NO sentezi inhibitörü olan N-nitro-L-arginin metil ester (L-NAME) kullanılarak çalışılmıştır. Karaciğer hasarı ile NO, katalaz, toplam hidroperoksitler, glutatyon ve

MDA konsantrasyonlarında artış ile birlikte SOD aktivitesinde azalma arasında bir ilişki tespit edilmiştir. Ozon ile yapılmış oksidatif prekondisyoning, iskemi reperfüzyon yapılmış ve L-NAME ile birlikte iskemi reperfüzyon hasarı yapılmış gruplarda yukarıda bahsedilen parametreler ışığında karaciğer hasarı oluşmasını engellemiştir. Çalışmada, ozonun karaciğeri endojen NO konsantrasyonunu düzenleyen mekanizmalar aracılığıyla ve hücresel redoks dengesini sağlaması yoluyla koruduğu gösterilmiştir. Bu açıdan ozon tedavisi, özellikle karaciğer transplantasyon programlarının başarısını artırmaya yönelik önemli klinik uygulamalar bulabilir (1).

Karaciğerde yapılan çalışmalara ek olarak Calunga ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada sıcak iskemiye maruz bırakılan ratlarda, böbreklerin ozona karşı biyolojik cevapları test edilmiş ve ozon tedavisi ile antioksidan enzim aktivitelerinin artırıldığı ve reaktif oksijen türlerinin toksik etkilerine karşı böbreklerde etkili bir savunma mekanizması oluşturulduğu bulunmuştur. Burada yapılan histolojik çalışmalarda ozona ilişkin en iyi sonuçlar, iskemi-reperfüzyon hasarı oluşumundan önce en az 10 veya daha üzeri kürde ozon tedavisi alan ratlarda gözlenmiştir (88). Bizim çalışmamızda ratlara toplam 3 gün süreyle medikal ozon intraperitoneal olarak verilmiş ve sonrasında yapılan biyokimyasal parametrelerde istatistiksel olarak anlamlı değişiklik bulunamamıştır. Bu çalışmamızın ışığında vermiş olduğumuz ozon, kardiyak açıdan koruyucu etki sağlamamış olabilir veya koruyucu olsa bile bu parametrelerde yeterli artış veya azalmalara yol açabilecek süreye ulaşmayı engellemiş olabilir. Bu yüzden deneysel düzeneğimizde histopatolojik inceleme de yapılmış ve burada yapılan değerlendirmede medikal ozonun hücresel düzeyde iskemi grubuna kıyasla daha olumlu sonuçlara yol açtığı bulunmuştur.

Polonya'dan yapılan bir çalışmada periferik damar hastalığı olan 100 hastaya intraarteryel ozon uygulanmış ve ayak bileği/kol indeksinde iyileşme ile birlikte intermitan klodikasyoda anlamlı iyileşme tespit edilmiştir (89). Yine bir diğer çalışmada intermitan klodikasyosu olan hemodiyaliz hastalarında, medikal ozon ile otohemoterapi yapılmış ve ağrısız yürüme mesafesi ile maksimum yürüme mesafesi ölçülmüştür. Oksijen ile kıyaslandığında, ozon ile otohemoterapi yapılan periferik arter hastalarında yürüme mesafesinin arttığı, iskeminin subjektif klinik bulgularının azaldığı gösterilmiştir (4). Yine periferik arter hastalığı ve diabetes mellitusu olan hastalarda yapılan bir çalışmada ozon terapisi yapılanlarda maksimum ağrısız yürüme mesafesinin uzadığı tespit edilmiş, aynı zamanda kan ve plazma viskozitesinde de

anlamlı azalmalar tespit edilmiştir. Burada intermitan klodikasyoda azalmanın derecesi, ozon terapisi sonrasında kan viskozitesindeki azalma ile korele bulunmuştur (90). Bir diğer çalışmada ozonun tedavi edici etkisi, kronik bacak iskemisi ve ülsere lezyonları olan hastalarda değerlendirilmiş, ileri derecede ağrı nedeniyle ağrı kliniğine başvuran ve kimyasal lomber sempatektomi ve epidural blokaja rağmen ağrıları geçmeyen hastalarda ozon otohemoterapisi ile tatmin edici iyileşme bulguları ve ağrıda ciddi miktarda azalma olduğu gösterilmiştir (91).

Hemodiyaliz hastalarında yapılan bir diğer çalışmada ozon otohemoterapisinin lipid profili ve endotel üzerine olan etkileri incelenmiş ve serum lipidleri ile von Willebrand faktörünün plazma aktivitesi ölçülmüş. Burada endotel üzerinde belirgin bir etki saptanamazken total kolesterol ve LDL-kolesterol seviyelerinde anlamlı azalmalara sebep olduğu bildirilmiştir (92). Ayrıca HDL (yüksek dansiteli lipoprotein) ve LDL oranında iyileşmeye yol açarak ateroskleroz sürecinin gerilemesinde olumlu etkilerinin olabileceği vurgulanmıştır.

Medikal ozon kullanımı ile kalp konusunda şimdiye kadar yapılmış olan çalışmalar oldukça sınırlıdır. Miyokardiyal iskemi, kalp dokusunun yavaş yavaş veya aniden oksijen ve diğer besleyici maddelerden yoksun kalması sonucu etkilenen kalp kasının ölmesidir. Hücre hasarının patogenezindeki temel faktörler oksijen ve enerji depolarının tükenmesidir. Miyokardiyal reperfüzyon, iskemik kalpteki kan akımının yeniden sağlanması olarak adlandırılır. Erken reperfüzyon, kalp kasındaki hasar oranını en aza indirger ve kalbin pompa fonksiyonunun korunmasını sağlar (21). Bununla birlikte uzamış iskemik süre sonrasında reperfüzyon sağlanması normal kardiyak fonksiyonların sağlanmasından ziyade miyokardiyumda belirgin bir hasara yol açar (22). Bu yüzden, iskemi-reperfüzyon hasarı uzamış iskemi periyodu sonrasında kan akımının yeniden sağlanması ile oksidatif hasar, inflamasyon ve kardiyak disfonksiyonla sonuçlanan kalp hasarı olarak tanımlanabilir. Miyokardiyal prekondisyoning ve postkondisyoning yapılmasının kalbi iskemi-repefüzyon hasarlarına karşı koruduğu gösterilmiştir (23).

İskemi-reperfüzyon aracılı miyokard hasarını azaltmak için kullanılan tedavi yaklaşımları kontrollü reperfüzyon sağlanması, prekondisyoning, postkondisyoning yapılması ve kalsiyum antagonistleri, lökotrien-B4 (LTB-4) antagonistleri, kompleman inhibitörleri ve demir şelatörleri, vitamin E ve mannitol gibi çeşitli antioksidan maddelerin verilmesini kapsamaktadır.

Merin O. ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada izole rat kalbinde ozon verilmesinin reperfüzyon hasarını azalttığı bildirilmiştir. Bu çalışmada izole rat kalpleri asendan aort kanülasyonu aracılığı ile Krebs-Hanseleit tampon solüsyonu ile perfüze edilmişler ve 15 dakika sonra perfüzyon sonlandırılarak 30 dakika boyunca global iskemi sağlanmış ve ardından perfüzyon tekrar başlanarak 40 dakika boyunca devam edilmiştir. Bazal hemodinamik parametreler iskemi öncesinde ve reperfüzyon başladıktan sonra her 10 dakikada bir alınmıştır. Reperfüzyon esnasında ozon ile tedavi edilen grup kontrol grubu ile kıyaslanmıştır. Tedavi grubunda, reperfüzyondan 5 dakika sonra ozon distile su içerisinde kollardan verilmiştir. Çalışma sonrasında reperfüzyon esnasında ozon ile tedavi edilen grupta iyileşmenin daha iyi olduğu (sol ventrikül sistolik ve diastolik basınçları arasındaki fark, dP/dt (kontraksiyon esnasındaki maksimum basınç türevi), koroner kan akımı ve kalp hızı parametreleri bakılarak) bildirilmiştir (93).

Bizim çalışmamızda kalp cerrahisi prensipleri göz önünde bulundurularak akut MI ile gelen bir hastanın revaskülarizasyon ile operasyona alınması durumunda oluşabilecek olayları demonstre etmek ve başarılı bir operasyon sonrasında reperfüze edilmiş kalp dokusunda ozonun koruyuculuğunu değerlendirmek için bir deneysel model oluşturuldu. Burada biyokimyasal parametrelerin (CK-MB ve Tn-I) erken dönemde yükselmiş olmaması, bu MI belirleyicilerinin yükselmesi için en azından 4 saatlik bir sürece ihtiyaç duymaları ile açıklanabilir. Fakat eş zamanlı olarak deney sonrasında aldığımız dokuların histopatolojik incelenmesinde iskemiye maruz bırakılan rat kalplerinde başarılı bir iskemi yarattığımızı teyit ediyoruz. Merin O. ve ark.nın yaptığı çalışmanın aksine bizim çalışmamızda, rat kalplerinde, aynı insandakine benzer şekilde bir MI modeli oluşturulmuş, sanki operasyon öncesinde hasta operasyona hazırlanırken medikal ozon ile prekondisyoning yapılmış, operasyon sonrasında da reperfüzyon sağlandıktan sonra doku üzerine olan etkileri incelenmiştir. İncelendiği zaman iskemi için sağlanmış olan süre (25 dakika), hem MI için doku perfüzyonu sonrasında gelişebilecek hasarın ortaya çıkmasında yeterli iken, hem de kalp cerrahisi için değerlendirdiğimizde intraoperatif olarak kardiyopleji verilme süreleri arasındaki süreyle de benzerlik göstermektedir. Cerrahi ile arasındaki en temel fark, olay, MI geçiren modelde normotermik vücut ısılarında gerçekleşirken, cerrahi esnasında hipotermik (ortalama 28-32 ^{o}C) bir ortamın yaratılmasıdır. Yapılan düzenekte eğer hipotermik bir ortam sağlansa idi, belki de daha iyi sonuçlar elde

edilebilirdi. Bunun yanında bir diğer önemli nokta da, bizim deneysel modelimizde reperfüzyon sağlandıktan yaklaşık 75 dakika sonra kalp dokusunun eksize edilerek biyokimyasal ve histopatolojik incelemesinin yapılmasıdır. Buradaki süre dikkate alınırken de yaklaşık 3-4 damarda oklüzyonu olan ve operasyonda bu 3-4 damara by-pass yapılması ve sonrasında reperfüzyon sağlanıncaya kadar geçen süre dikkate alınmıştır. Yalnız biyokimyasal parametreler içerisinde SOD açısından ciddi farklılıkların olmaması, bu süre içerisinde bu biyokimyasal markerin oluşması için yeterli bir süre olmaması ile açıklanabilir. MDA açısından incelediğimizde, kontrol grubu ile ozon grubu arasında ve oksijen grubu ile ozon grubu arasında anlamlı farklılıklar tespit edildi. Beklentilerimiz MDA'nın kontrol grubu ile farklılık göstermeyerek ozonun reperfüzyon hasarına karşı koruyucu olması, iskemi grubu ile farklılık göstererek bu koruyuculuğun gösterilmesi idi. Burada hipotezimize uygun olan tek sonuç, ozonun oksijen grubu ile kıyaslandığında anlamlı olarak reperfüzyon hasarına karşı koruyucu olduğudur. Bu da genel olarak iskemi yaratırken, cerrahiden farklı olarak, daha önce belirttiğimiz miyokardiyal koruma yöntemlerinin eksikliklerinin bir sonucu olarak, bütün iskemi uygulanılan gruplarda (Grup II, III ve IV) iyi bir miyokard koruması sağlanamaması ile açıklanabilir.

Bu deneysel modelde, tıpkı operasyon sonrasında olduğu gibi, daha uzun bir süre kalp dokusu canlılığı sağlanarak bu markerlerin tekrar kontrolü sağlanabilse idi, hem erken post-operatif, hem de geç post-operatif dönem şeklinde medikal ozonun koruyuculuğu hakkında daha ayrıntılı bir fikir elde edilebilirdi.

Erken post-operatif dönem olarak adlandırabileceğimiz 75 dakika sonrasında eksize edilen kalp dokularının histopatolojik inceleme sonuçları, diğer markerlerden farklı olarak hücre değişikliklerinin hemen ortaya çıkmasından ötürü, bize muhtemelen diğer biyokimyasal parametrelerden daha iyi bilgi sağlamaktadır. Çalışmamızda medikal ozon verilirken karışımında bulunan %95 O_2 etkisini de ölçmek açısından Grup III ile ayrı bir deney grubu oluşturulmuştur. Histopatolojik incelemede en önemli sorun, değerlendirmenin subjektif olarak yapılmasıdır. Bu amaçla histopatolojik incelemeyi yapacak olan patolog, gruplara kör bırakılmış, böylece kısmen subjektif olan bu parametrenin değerlendirmesinde oluşabilecek önyargı ortadan kaldırılmaya çalışılmıştır. Patolojik incelemeler sonucunda medikal ozonun iskemik gruba kıyasla hücre korunması açısından olumlu etkileri gözükmektedir. Yalnız burada gruplar kendi içinde incelendiklerinde oksijen ve ozon

grubu arasında anlamlı bir fark tespit edilememesi, bu korunmanın sadece ozona bağlı olduğu konusundaki hipotezimizin doğruluğu açısından elimizdeki verilere güvenilirliğini kısmen kısıtlamaktadır.

Sonuç olarak, ozon kolaylıkla elde edilebilen, güvenli ve pahalı olmayan, tedavi edici özelliği olan bir materyaldir. Ülkemiz de dahil olmak üzere birçok ülkede ozonterapi klinikleri açılmakta, etkinliği bilinmesine rağmen bu özelliği bilimsel veriler ışığında sunulamamaktadır. Yaptığımız bu çalışmada medikal ozonun reperfüzyon hasarını engellemedeki rolü açıkça ortaya konamasa da, hem biyokimyasal parametreler, hem de histopatolojik incelemeler sonucunda bazı yararlı etkileri olduğu gözükmektedir. Literatürdeki diğer çalışmaların ışığında medikal ozonun birçok sistem üzerindeki olumlu etkileri düşünülecek olursa, miyokardiyal korunma sağlanmasında da medikal ozonun faydalı etkileri olabilir. Fakat bunların ortaya konabilmesi için, belki de aynı deneysel gruplar kullanılarak, daha iyi miyokardiyal korunma sağlanarak, deney öncesinde medikal ozon verilme süresi daha uzun tutularak veya reperfüzyon sonrası kardiyak dokunun daha uzun süre canlılığı sağlanarak farklı çalışmalar yapılabilir. Farklı türlerde farklı reaksiyonlar sonucu ortaya çıkabilecek değişik doku cevapları değerlendirilecek olursa, hayvansal çalışmalarda elde edilebilecek sonuçların illa ki insanlara da uygulanabilirliğini beklemek anlamsızdır. Fakat diğer çalışmalarda ortaya konan medikal ozon ile ilgili başarılı klinik uygulamalar göz önüne alınacak olursa, başarılı hayvan modellerinde test edildikten sonra uygun deneysel modellerde yapılacak insan çalışmalarına da ihtiyaç vardır. Her ne kadar medikal ozon tedavisi başarılı örneklere sahip olsa da, kanıta dayalı tıp kapsamında etkinliği mutlaka bilimsel verilerle doğrulanmalıdır.

6. ÖZET

İskemi-Reperfüzyon Hasarına Maruz Kalan Sıçan Kalbinde Medikal Ozon İle İskemik Prekondisyoningin Etkileri (Deneysel Çalışma)

Amaç: Bu çalışmada, koroner arter hastalığı nedeniyle stenotik olan koronerlere uygulanan operasyon sonrasında oluşabilecek reperfüzyon hasarını medikal ozon ile prekondisyoning yaparak etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. **Gereç ve Yöntem:** Otuz yedi adet dişi erişkin sıçan sham-kontrol (Grup I), iskemi (Grup II), oksijen ile iskemik prekondisyoning yapılan (Grup III) ve medikal ozon ile iskemik prekondisyoning yapılan grup (Grup IV) olarak dörde ayrıldı. Deneklerde sol torakotomi ile LAD'de 25 dakikalık iskemi uygulandı ve ardından 75 dakika süre ile reperfüzyon sağlandı. Bu süre sonunda CK-MB, Troponin-I, süperoksit dismutaz (SOD) ve malondialdehit (MDA) için serum ve histopatolojik inceleme için doku örneklemesi yapıldı. Patolojik inceleme ile sonuçlar hücresel hasara göre 3 ayrı sınıfa ayrıldı. **Bulgular:** Gruplar arasında, istatistiksel olarak CK-MB düzeyleri ve SOD enzim aktivitesi açısından anlamlı bir fark yoktu (P>0.05). Buna karşın Troponin I Grup III'te anlamlı olarak yüksek, MDA ise Grup IV'te kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu (***P* =0.005**). Ayrıca MDA düzeyi Grup IV'te, Grup III'e göre de anlamlı olarak düşüktü. Bu sonuçlarla iskemi grubu ile ozon grubu arasında ciddi farklılıklar tespit edilememiştir. Oksijen grubu ile kıyaslandığında MDA seviyelerinin anlamlı olarak ozon grubunda daha düşük bulunması önemli olsa da, sadece bu veriyle ozonun koruyucu özelliklerinin olduğunu söylemek güçtür. Histopatolojik incelemede ise kontrol grubu ile diğer bütün gruplar arasında anlamlı farkın tespit edilmesi bizim başarılı bir MI modeli oluşturduğumuzu göstermektedir. Ayrıca medikal ozonun iskemik gruba kıyasla hücre korunması açısından anlamlı olarak olumlu etkileri gözükmektedir. Yalnız burada gruplar kendi içinde incelendiklerinde oksijen ve ozon grubu arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır. **Sonuç:** Bu çalışmada medikal ozonun reperfüzyon hasarını engellemedeki rolü açıkça ortaya konamasa da, biyokimyasal ve histopatolojik incelemeler sonucunda bazı yararlı etkileri olduğu gözükmektedir. Bu yararların ortaya konabilmesi için daha farklı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: medikal ozon tedavisi, iskemi-reperfüzyon hasarı, iskemik prekondisyoning.

7. ABSTRACT

The effects of medical ozone on ishemic preconditioning in rat heart exposed to ischemia-reperfusion injury (Experimental Study)

Background: In this study, it is intended to investigate the effect of preconditioning with medical ozone on possible reperfusion injury, in whom patients undergoing the operation performed on the stenotic coronary vessels due to coronary artery disease. **Material and Methods:** Thirty-seven female mature rats are categorized into 4 groups either as sham-control (Group I), ischemia (Group II), ischemic preconditioning by oxygen (Group III) or by medical ozone (Group IV). Through left thoracotomy, rats were subjected to 25 minutes of ischemia on LAD and after that, reperfusion was provided for 75 minutes. At the end of this period, serum sampling for CK-MB, Troponin-I, superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) and tissue sampling for histopathological examinations were performed. The results of pathological examination were divided into 3 groups according to cellular damage. **Results:** Statistically, there was no meaningful difference between the groups in case of CK-MB levels and SOD enzymatic activity ($P>0.05$). Nevertheless, Troponin-I was higher in Group III, and MDA was meaningfully less in Group IV in respect to control group (***P* =0.005**). Moreover, MDA levels were meaningfully less in Group IV, when compared to Group III. With these results, no significant differences were detected between ischemia and ozone group. Although it is important to detect lower MDA levels in ozone group when compared to oxygen group, it is hard to talk about protective affects of ozone depending just on this data. In histopathological examination, the meaningful difference between the control group and all other groups, showed us that we created a successful MI model. Also it seemed that, medical ozone had positive effects on cellular protection when compared to ischemic group; but when the groups are examined, no meaningful differences could be found between oxygen and ozone groups. **Conclusion:** In this study, although the role of medical ozone on the prevention of reperfusion damage could not be demonstrated clearly, it seemed that it might have some beneficial effects after biochemical and histopathological evaluation. To be able to show these effects clearly, more studies are needed to be performed.

Keywords: medical ozone treatment, ischemia-reperfusion injury, ischemic preconditioning.

8. KAYNAKLAR

1. Ajamieh HH, Menéndez S, Martínez-Sánchez G, Candelario-Jalil E, Re L, Giuliani A, et al. Effects of ozone oxidative preconditioning on nitric oxide generation and cellular redox balance in a rat model of hepatic ischaemia-reperfusion. Liver Int. 2004 Feb;24(1):55-62.
2. Peralta C, Leon OS, Xaus C, Prats N, Jalil EC, Planell ES, et al. Protective effect of ozone treatment on the injury associated with hepatic ischemia-reperfusion: antioxidant-prooxidant balance. Free Radic Res 1999;31(3):191-196.
3. Sanchez GM, Al-Dalain SM, Menendez S, Re L, Giuliani A, Jalil EC, et al.. Therapeutic efficacy of ozone in patients with diabetic foot. Eur J Pharmacol 2005;523:151-161.
4. Biedunkiewicz B, Tylicki L, Nieweglowski T, Butakowski S, Rutkowski B. Clinical efficacy of ozonated autohemotherapy in hemodialyzed patients with intermittent claudication: an oxygen-controlled study. Int J Artif Organs 2004;27:29-34.
5. Ajamieh H, Menendez S, Merino N, Sanchez GM, Re L, Leon OS. İschemic and ozone preconditioning in the protection against ischemic-reperfusion injury. Ozone Sci Eng 2002;25:241-250.
6. Ozonun tıpta kullanımı. Renate Viebahn-Haensler, İngilizce 4. baskıdan (2002) çeviri, 1. Türkçe baskı, 2005.
7. Halliwell B, Clement MV, Long LH. Hydrogen peroxide in the human body. FEBS Lett 2000;486:10-13.
8. Bocci V, Aldinucci C, Bianchi L. The use of hydrogen peroxide as a medical drug. Riv Ital Ossigeno Ozonoterapia 2005;4:30-39.
9. Valacchi G, Bocci V. Studies on the biological effects of ozone: 11. Release of factors from human endothelial cells. Mediat Inflamm 2000;9:271-276.
10. Dianzani MU. 4-Hydroxynonenal and cell signalling. Free Radic Res 1998;28:553-560.

11. Iles KE, Liu R-M. Mechanisms of glutamate cysteine ligase (GCL) induction by 4-hydroxynonenal. Free Radic Biol Med 2005;38: 547-556.

12. Snyder SH, Baranano DE. Heme oxygenase: a font of multiple messengers. Neuropsychopharmacology 2001;5:294-298.

13. Mendiratta S, Qu Z-C, May JM. Erythrocyte ascorbate recycling: antioxidant effects in blood. Free Radic Biol Med 1998;24:789-797.

14. Stone JR, Collins T. The role of hydrogen peroxide in endothelial proliferative responses. Endothelium 2002;9:231-238.

15. Bocci V. Ozone. A new medical drug. Dordrecht, The Netherlands: Springer;2005.

16. Bocci V. Scientific and Medical Aspects of Ozone Therapy. State of the Art Archives of Medical Research 2006;37:425-435.

17. Bocci V. Autohaemotherapy after treatment of blood with ozone. A reappraisal. J Intern Med Res 1994;22:131–144.

18. Valacchi G, Bocci V. Studies on the biological effects of ozone: 10: Release of factors from ozonated human platelets. Mediat Inflamm 1999;8:205–209.

19. Frehm EJ, Bonaventura J, Gow AJ. S-nitrosohemoglobin: an allosteric mediator of NO group function in mammalian vasculature. Free Radic Biol Med 2004;37:442-453.

20. Libby P, Thersoux P. Pathophysiology of coronary artery disease. Circulation 2005;111:3481-3488.

21. Balakumar P, Rohilla A, Singh M. Pharmacological Research 2008;57:403-412.

22. Kloner RA. Does reperfusion injury exist in humans? J Am Coll Cardiol 1993;21:537-545.

23. Zhao ZQ, Corvera JS, Halkos ME, Kerendi F, Wang NP, Guyton RA, et al. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. Am J Physiol Circ Physiol 2003;285:H579-588.

24. Tong H, Chen W, Steenbergen C, Murphy E. Ischemic preconditioning activates phosphatidylinositol-3-kinase upstream of protein kinase C. Circ Res 2000;87:309-315.

25. Collard CD, Gelman S. Pathophysiology, clinical manifstations and prevention of ischemia-reperfusion injury. Anesthesiology 2001;94:1133-1138.

26. Szocs K. Endothelial dysfunction and reactive oxygen species production in ischemia/reperfusion and nitrate tolerance. Gen Physiol Biophys 2004;23:265-295.

27. Bertuglia S, Giusti A, Del Soldato P. Antioxidant activity of a nitro derivative of aspirin against ischemia-reperfusion in hamster cheek pouch microcirculation. Am J Gastroint Liver Physiol 2004;286:G437-443.

28. Bolli R, Marban E. Molecular and cellular mechanisms of myocardial stunning. Physiol Rev 1999;79:609-634.

29. Ytrehus K. Models of myocardial ischemia. Drug Discov Today Dis Models 2006;3:263-271.

30. Eckhout E, Kern MJ. The coronary no-reflow phenomenon: a review of mechanism and therapies. Eur Heart J 2001;22:729-739.

31. Reffelmann T, Kloner RA. The “no-reflow” phenomenon: basic science and clinical correlates. Heart 2002;87:162-168.

32. Reffelman T, Kloner RA. The no-reflow phenomeon: a basic mechanism of myocardial ischemia and reperfusion. Basic Res Cardiol 2006;101:359-372.

33. Mustoe T. Understanding chronic wounds: a unifying hypothesis on their pathogenesis and implications for therapy. Am J Surg 2004;187:65S-70S.

34. Mocanu MM, Baxter GF, Yellon DM. Caspase inhibition and limitation of myocardial infarct size: protection against lethal reperfusion injury. Br J Pharmacol 2000;130:197-200.

35. Aktan AO, Yalcin AS. Isshemia-reperfusion injury, reactive oxygen metabolites and the surgeon. Turk J Med Sci 1998;28:1-5.

36. Krajewski S, Chen M, Won D-J, Gottlieb RA. Calpain and mitochondria in ischemia-reperfusion injury. J Biol Chem 2002;277:29181-6.

37. Zhang M, Xu Y-J, Saini HK, Turan B, Liu PP, Dhalla NS. Pentoxifylline attenuates cardiac dysfunction and reduces TNF-α level in ischemic-reperfused heart. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2005;289-H832-839.

38. Hu C, Chen J, Dandapat A, Fujita Y, Inoue N, Kawase Y, et al. LOX-1 abrogation reduces myocardial ischemia-reperfusion injury in mice. J Mol Cell Cardiol 2008;44:76-83.

39. Singh M, Saini HK. Resident crdiac mast cells and ischemia-reperfusion injury. J Cardiovasc Pharmacol Ther 2003;8:135-148.

40. Ferdinandy P, Szilvassy Z, Baxter GF. Adaptation to myocardial stress in disease states: is preconditioning a healthy heart phenomenon. Trends Pharmacol Sci 1998;19:223-229.

41. Gu W, Pagel PS, Warltier DC, Kersten JR. Modifying cardiovascular risk in diabetes mellitus. Anesthesiology 2003;98:774-779.

42. Sasaki H, Ogawa K, Shimizu M, Mori C, Takatsuka H, Okazaki F, et al. The insulin sensitizer pioglitazone improves the deterioration of ischemic pre-conditining in type 2 diabetes mellitus rats. Int Heart J 2007;48:623-635.

43. Tang XL, Stein AB, Shirk G, Bolli R. Hypercholesterolemia blunts NO donor-induced late preconditioning against myocardial infarction in conscious rabbits. Basic Res Cardiol 2004;99:395-403.

44. Ungi I, Ungi T, Ruzsa S, Nagy E, Zimmermann Z, Csont T, et al. Hypercholesterolemia attenuates the anti-ischemic effect of preconditioning during coronary angioplasty. Chest 2005;128:1623-8.

45. Tang X-L, Takano H, Xuan Y-T, Sato H, Kodani E, Dawn B, et al. Hypercholesterolemia abrogates late preconditioning via tetrahydrobiopterin-dependent mechanism in conscious rabbits. Circulation 2005;112:2149-2156.

46. Csont T, Balogh G, Csonka C, Boros I, Horváth I, Vigh L, et al. Hyperlipidemia induced by high cholesterol diet inhibits heat shock response in rat hearts. Biochem Biophys Res Commun 2002;290:1535-1538.

47. Ferdinandy P, Szilvassy Z, Horvath LI, Csont T, Csonka C, Nagy E, et al. Loss of pacing-induced preconditioning in rat hearts: role of nitric oxide and cholesterol-enriched diet. J mol Cell Cardiol 1997;29:3321-3333.

48. Demirkılıç U. Ekstrakorporeal Dolaşım. Eflatun Yayınevi, 2008; 86-88.

49. Kumar V, Cotran RS, Robbins SL. Temel Patoloji, Çeviri Editörü Çevikbaş U. İkinci baskı; 1995: 7-9.

50. Uchida K. Role of reactive aldehyde in cardiovascular diseases. Free Radic Biol Med 2000;28:1685-1696.

51. Del Rio D, Stewart AJ, Pellegrini N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress Nutri Met Card Dis 2005;15:316-328.

52. Pryor WA, Stanley JP. A suggested mechanism for the production of malonaldehyde during the autoxidation of polyunsaturated fatty acids. Nonenzymatic production of prostaglandin endoperoxides during autoxidation (Letter). J Org Chem 1975;40:3615-3617.

53. Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. Free Radic Biol Med 1991;11:81-128.

54. Hecker M, Ullrich V. On the mechanism of prostacyclin and thromboxane A2 biosynthesis. J Biol Chem 1989;264:141-150.

55. Palinski W, Ord VA, Plump AS, Breslow JL, Steinberg D, Witztum JL. ApoE-deficient mice are a model of lipoprotein oxidation in atherogenesis. Demonstration of oxidation-specific epitopes in lesions and high titers of autoantibodies to malondialdehyde-lysine in serum. Arterioscler Thromb 1994;14:605-616.

56. Boaz M, Matas Z, Biro A, Katzir Z, Green M, Fainaru M, et al. Comparison of hemostatic factors and serum malondialdehyde as predictive factors for cardiovascular disease in hemodialysis patients. Am J Kidney Dis 1999;34:438-444.

57. Saçar M, Güler A. Kalp cerrahisinde miyokardiyal koruma yöntemleri Anatol J Clin Investig 2008;2(1):47-57.

58. Buckberg GD, Brazier JR, Nelson RL. Studies of the effects of hypothermia on regional myocardial flow and metabolism during cardiopulmonary bypass. The adequately perfused beating, fibrilating and arrested heart. J Thorac Cardiovas Surg. 1977;73:87-94.

59. Akgün S. Erişkin kalp cerrahisinde miyokard koruması. In: Duran E, eds. Kalp ve Damar Cerrahisi. İstanbul: Çapa Tıp Kitapevi, Cilt II, 2004;1:1091-1106.

60. Weman SM, Karhunen PJ, Pentilla A, Jarvinen AA, Salminen US. Reperfusion injury associated with one-fourth of deaths after coronary artery bypass grafting. Ann Thorac Surg. 2000;70:807-812.

61. Murray CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: A delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. Circulation 1986; 74:1124.

62. Shiki K, Hearse DJ: Preconditioning of the ischemic myocardium: Reperfusion-induced arrhythmias. Am J Physiol 1987; 253:H1470.

63. Yellon DM, Baxter GF, Garcia-Dorado D, Heusch G, Sumeray MS. Ischaemic preconditioning: Present position and future directions. Cardiovasc Res 1998; 37:21.

64. Yellon DM, Dana A: The preconditioning phenomenon: A tool for the scientist or a clinical reality? Circ Res 2000; 87:543.

65. Bolli R: The late phase of preconditioning. Circ Res 2000; 87:972.

66. Przyklenek K, Darling CA, Dickson EW, Whittaker P. Cardioprotection "outside the box": The evolving paradigm of remote preconditioning. Basic Res Cardiol. 2003 May;98(3):149-157.

67. Schulz R, Cohen MV, Behrends M, Downey JM, Heusch G. Signal transduction of ischemic preconditioning. Cardiovasc Res 2001; 52:181.

68. Downey JM, Cohen MV, Ytrehus K, Liu Y. Cellular mechanisms in ischemic preconditioning: The role of adenosine and protein kinase C. Ann NY Acad Sci 1994; 723:82.

69. Yellon DM, Downey JM: Preconditioning the myocardium: From cellular physiology to clinical cardiology. Physiol Rev 2003; 83:1113.

70. Kloner RA, Shook T, Przyklenk K, Davis VG, Junio L, Matthews RV, et al: Previous angina alters in-hospital outcome in TIMI 4: A clinical correlate to preconditioning? Circulation 1995; 91:37.

71. Ottani F, Galvani M, Ferrini D, Sorbello F, Limonetti P, Pantoli D, et al: Prodromal angina limits infarct size: A role for ischemic preconditioning. Circulation 1995; 91:291.

72. Airaksinen KE, Huikuri HV: Antiarrhythmic effect of repeated coronary occlusion during balloon angioplasty. J Am Coll Cardiol 1997; 29:1035.

73. Jneid H, Leessar M, Bolli R: Cardiac preconditioning during percutaneous coronary interventions. Cardiovasc Drugs Ther 2005; 19:211.

74. Leesar MA, Stoddard MF, Dawn B, Jasti VG, Masden R, Bolli R. Delayed preconditioning mimetic action of nitroglycerin in patients undergoing coronary angioplasty. Circulation 2001; 103:2935.

75. Yellon DM, Alkjulaifi AM, Puglesy WB: Preconditioning the human myocardium. Lancet 1993; 342:276.

76. Schulz R, Kelm M, Heusch G. Nitric oxide in myocardial ischemia/reperfusion injury. Cardiovasc Res 2004; 61:402.

77. Bolli R: Cardioprotective function of inducible nitric oxide synthase and role of nitric oxide in myocardial ischemia and preconditioning: An overview of a decade of research. J Mol Cell Cardiol 2001; 33:1897.

78. Weyrich AS, Lefer DJ, Lefer AM. Diminished basal nitric oxide release after myocardial ischemia and reperfusion promotes neutrophil adherence to coronary endothelium. Circ Res 1993; 72:403.

79. Wink DA, Hanbauer I, Krishna MC, DeGraff W, Gamson J, Mitchell JB. Nitric oxide protects against cellular damage and cytotoxicity from reactive oxygen species. Proc Natl Acad Sci USA 1993; 90:9813.

80. Re L, Mawsouf MN, Menendez S, Leon OS, Sanchez GM, Hernandez F. Ozone therapy: Clinical and basic evidence of it's therapeutic potential. Arch Med Res 2008; 39:17-26.

81. Bocci V. Does ozone therapy normalize the cellular redox balance? Implications for therapy of human immunodeficiency virus infection and several other diseases. Med Hypotheses 1996; 46:150-154.

82. Leon OS, Menendez S, Merino N, Castillo R, Sam S, Perez L, et al. Ozone oxidative preconditioning: a protection against cellular damage by free radicals. Mediat Inflamm 1998; 7:289-294.

83. Al Dalain SM, Martinez G, Jalil EC, Menendez S, Re L, Giuliani A, et al. Ozone treatment reduces markers of oxidative and endothelial damage in an experimental diabetes model in rats. Pharmacol Res 2001; 44(5):391-396.

84. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. Physiol Rev 2002; 82:47-95.

85. Mizoe A, Kondo S, Azuma T, Fujioka H, Tanaka K, Hashida M, et al. Preventive effects of superoxide dismutase derivatives modified with monosaccharides on reperfusion injury in rat liver transplantation. J Surg Res 1997; 73:160-165.

86. Rudiger HA, Kang KJ, Sindram D, Riehle HM, Clavien PA. Comparison of ischemic preconditioning and intermittent and continuous inflow occlusion in the liver. Ann Surg 2002; 235:400-407.

87. Ajamieh HH, Berlanga J, Merino N, Martinez-Sa´nchez G, Carmona AM, Menendez-Cepero S, et al. Role of protein synthesis in the protection conferred by ozone-oxidative-preconditioning in hepatic ischaemia/reperfusion. Transplant Int 2005; 18:604-612.

88. Calunga JL, Menendez S, Barber E, Merino N, Cruz E. Ozone biological response in kidneys of rats submitted to warm ischemia. Ozone Sci Eng. 2003; 25:233-240.

89. Sroczynski J, Antoszewski Z, Matyszczyk B, Krupa G, Rudzki H, Zbrońska H, et al. Clinical assessment of treatment results for atherosclerotic ischemia of the lower extremities with intraarterial ozone injections. [Article in Polish] Pol Tyg Lek 1992 Oct 19-26; 47 (42-43):964-966.

90. Turczynski B, Sroczynski J, Antoszewski Z, Matyszczyk B, Krupa G, Mlynarski J, et al. Ozone therapy and viscosity of blood and plasma, distance

of intermittent claudication and certain biochemical components in patients with diabetes type II and ischemia of the lower extremities. [Article in Polish] Pol Tyg Lek. 1991 Sep 9-30; 46(37-39):708-710.

91. de Monte A, van der Zee H, Bocci V. Major ozonated autohemotherapy in chronic limb ischemia with ulcerations. J Altern Complement Med. 2005 Apr; 11(2):363-367.

92. Tylicki L, Biedunkiewicz B, Nieweglowski T, Chamienia A, Slizien AD, Luty J, et al. Ozonated autohemotherapy in patients on maintenance hemodialysis: influence on lipid profile and endothelium. Artif Organs 2004 Feb; 28(2):234-237.

93. Merin O, Atiias E, Elstein D, Schwalb H, Bitran D, Zimran A, et al. Ozone administration reduces reperfusion injury in an isolated rat heart model. J Card Surg 2007; 22:339-342.

9. TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca yetişmemde ve meslek sahibi olmamda büyük emekleri olan sayın hocalarım Prof.Dr.Hasan SOLAK, Prof.Dr.Tahir YÜKSEK, Prof.Dr.Cevat ÖZPINAR, Prof.Dr.Mehmet YENİTERZİ, Prof.Dr.Ali SARIGÜL, Doç.Dr.Ufuk ÖZERGİN, Doç.Dr.Kadir DURGUT, Doç.Dr.Erdal EGE, Doç.Dr.Niyazi GÖRMÜŞ, Doç.Dr.Ahmet ÖZKARA ve Yrd.Doç.Dr.Cüneyt NARİN'e, cerrahi asistanlığım esnasında bilgi ve birikimlerini aktararak cerrahi nosyon edindiren kıdemlilerime ve bir ekip ruhu ile özveri içinde beraber çalıştığımız asistan arkadaşlarım ve klinik çalışanlarına teşekkür ederim.

Bu çalışmanın yürütülmesinde desteklerini esirgemeyen, meslek pratiğim içerisinde her zaman bilgi, beceri ve meslek etiği ile örnek alacağım tez danışmanım Prof.Dr.Tahir YÜKSEK'e ayrıca, biyokimyasal değerlendirmeler için Doç.Dr.Aysel KIYICI'ya, histopatolojik derlendirmeler için Yrd.Doç.Dr.H.Hasan ESEN ve biyoistatistiksel incelemeler için değerli dostum Dr.Nadir ULU'ya, medikal ekipman desteğini sağlayan Medikal Oksijen Ozon Derneği (MoDer) Yönetim Kurulu'na ve Deneysel Tıp Araştırma Merkezi personellerine teşekkür ederim.

İnsan olmam için emek veren, değer veren ve yetişmemde hiçbir zaman desteklerini esirgemeyen anne ve babama; gece ve gündüzü beraber yaşayıp, benimle birlikte mesleğimin cefalarına katlanmak zorunda kalan, hayat arkadaşım, değerli eşim Çağlar ve neşemiz, geleceğimiz, kızımız Defne Mina'ya sevgilerimi sunarım.

Dr. Ömer TANYELİ

Konya – 2009