



Hiperbarik oksijen ve ozon ön-uygulamasının sıçan iskelet kasında turnikenin neden olduğu iskemi-reperfüzyona bağlı oluşan oksidatif/nitrosatif stres üzerine etkisi

Kenan KOCA,* Yüksel YURTTAŞ,* Cemil YILDIZ,* Tuncer ÇAYCI,# Bülent UYSAL,† Ahmet KORKMAZ†

GATA,*Ortopedi ve Travmatoloji; #Klinik Biyokimya; ve †Fizyoloji Anabilim Dalları, Ankara

Amaç: Bu çalışmanın amacı hiperbarik oksijen (HBO-PC) ve ozon ön-uygulamasının (O₃-PC) sıçanların iskelet kasında turnike ile iskemi-reperfüzyon (I/R) sonucunda oluşan oksidatif/nitrosatif stres üzerine etkisini araştırmaktır.

Çalışma planı: Otuziki adet Wistar-Albino tipi erkek sıçan çalışmaya dahil edildi ve eşit sayıda dört gruba ayrıldı; 1) sham operasyonu, 2) I/R, 3) I/R+HBO-PC veya 4) I/R+O₃-PC. ATA altında ve dakikada 3-4 L olmak üzere 60 dakika %100 oksijen uygulaması bir doz HBO olarak tanımlandı ve toplam 7 doz HBO ön-uygulaması yapıldı. İntraperitoneal yapılan 0.7 mg/kg ozon/oksijen karışımı bir doz O₃ olarak tanımlandı ve toplam 4 doz O₃ ön-uygulaması yapıldı. İskemi-reperfüzyon modeli, anestezi altındaki sıçanların sağ arka bacadaki femoral arterlerinin oklüzyonu ile 2 saatlik iskemi ve takiben 22 saatlik bir reperfüzyon ile oluşturuldu. Sağ gastrokinemius kası ve venöz kan örnekleri alınarak uygun şartlarda saklandı. Doku örneklerinde malondialdehit (MDA) seviyesi ile glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve süperoksit dismutaz (SOD) aktiviteleri ölçüldü ve indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) boyaması yapıldı. Serumda nitrit-nitrat (NOx) ölçüldü.

Sonuçlar: I/R grubunda doku MDA seviyesi ile SOD aktivitesi ve serum NOx seviyesi arttı. Bu grupta GSH-Px aktivitesi azaldı. I/R+HBO-PC ve I/R+O₃-PC gruplarında MDA and NOx seviyeleri azalırken, GSH-Px aktivitesi arttı. I/R+O₃-PC grubunda SOD aktivitesi artarken, I/R+HBO-PC grubunda SOD aktivitesi değişmedi. I/R+HBO-PC ve I/R+O₃-PC gruplarındaki iNOS boyama skoru ve yoğunluğu I/R grubundan daha düşük olarak tespit edildi.

Çıkarımlar: HBO ve O₃ ön-uygulamaları, sıçan iskelet kasında deneysel I/R modelinde lipid peroksidasyonunu, NOx seviyesini ve iNOS boyama skorunu azaltmaktadır. HBO ve O₃ ön-uygulamalarının sıçan iskelet kasında I/R ile oluşan oksidatif/nitrosatif strese karşı koruyucu etkisi olabilir.

Anahtar sözcükler: Hiperbarik oksijenasyon; iskemi-reperfüzyon yaralanması; oksidatif stres; ozon; sıçan.

İskemi/reperfüzyon (I/R) hasarı, miyokardiyal infarktüs, serebrovasküler oklüzyon ve organ nakilleri gibi önemli durumlarda görülen ciddi bir sorundur. Kas iskelet sisteminde, ekstremitelerin travması sonrası ve ameliyat içinde turnike kullanımına bağlı sıklıkla oluşur.^[1] Reperfüzyon hasarı, iskemi sonrasında

dokulara kan akımının tekrar sağlanması ile oluşur. Dokuların bir süre sonra kandaki oksijen ve besinle tekrar karşılaşması ile normal fonksiyonların geri gelmesinden ziyade inflamasyon, oksidatif ve nitrosatif hasara neden olan oksidatif stres uyarılır.^[2] Bu hasardan reaktif oksijen ürünlerini (ROS) oluşturan

süperoksit anyonu (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali (OH) ile reaktif nitrojen ürünlerini (RNS) oluşturan peroksinitrit ($ONOO^-$) sorumlu tutulmaktadır. Normal koşullar altında, bu reaktif oksijen türleri, süperoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) gibi antioksidan enzimler tarafından etkisiz hale getirilir.^[3] Ancak vücudun antioksidan enzim mekanizması I/R hasarı gibi aşırı ROS ve RNS oluştuğu durumlarda yetersiz kalır.^[4]

I/R hasarını azaltmak için çeşitli yöntemler uygulanmış olup bunlardan biri de hiperbarik oksijen (HBO) uygulamasıdır. HBO uygulamasının etki mekanizması tam olarak açıklanamamakla birlikte dokularda oksijen yoğunluğunu, anjiogenezi, SOD'yi ve lökosit faaliyetlerini artırdığı bilinmektedir.^[5] HBO ön-uygulanması (*preconditioning*, PC) I/R modellerinin oluşturulduğu pek çok çalışmada lokal iskemik hasarı azaltmak için kullanılmıştır.^[6] Çeşitli dokularda uygulanan I/R çalışmaları, HBO'nun apoptozu ve iskemik hasarı azalttığını göstermiştir.^[7,8] HBO'nun I/R vakalarındaki etki mekanizması aydınlatılmamıştır, ancak uygulamanın iskemik alandaki antioksidan enzimleri ve hipoksi-indüsiibl faktör-1 alfa'yı kontrol ettiği ileri sürülmüştür.^[6,9,10]

Ozon (O_3) ilk olarak, 1. Dünya Savaşı'nda infeksiyon tedavisinde kullanılmış ve son derece başarılı sonuçlar elde edilmiştir.^[11] İskemi, inflamasyon ve infeksiyon oluşturularak yapılan deneysel çalışmalarda O_3 ile başarılı sonuçlar alındığı bildirilmiştir.^[12] O_3 'ün güçlü oksidan etkisi olmakla birlikte, tedavideki etki mekanizmasının bu oksidan etki ile ortaya çıktığı ileri sürülmektedir. Ayrıca, O_3 ön-uygulamasının (O_3 -PC), iskemik ön-uygulama (IPC) mekanizmasına benzer etki ile I/R hasarını azalttığı gösterilmiştir.^[13]

İskelet kaslarındaki I/R hasarına karşı HBO ve O_3 ön-uygulamasının etkisine yönelik çalışmalar sınırlı sayıdadır. Bu nedenle ortopedik cerrahi müdahalelerde turnike uygulamasına bağlı sıklıkla ortaya çıkan I/R hasarında HBO ve O_3 ön-uygulamasının sıçan iskelet sistemindeki etkisi oksidatif ve nitrosatif stresler yönünden araştırıldı.

Gereç ve yöntem

Hayvanlar

Deneysel çalışma, kurumumuzun yerel etik kurulu tarafından onaylanmıştır (GATA Etik Kurulu). Ağırlıkları 280-340 g arasında değişen 32 erişkin erkek Wistar-Albino sıçan GATA Araştırma Merkezi'nden temin edildi ve standart koşullarda ayrı kafeslerde muhafaza edildi. Bu hayvanlar, standart diyet ile beslendi ve 12 saatlik aydınlık-karanlık döngüsünde yaşatıldılar. Hayvanlar dört eşit gruba ayrıldı: sham operasyon grubu (n=8), I/R grubu (n=8), I/R+HBO-PC grubu (n=8) ve I/R+ O_3 -PC (n=8) grubu.

HBO ön-uygulanması

HBO ön-uygulanması için özel olarak üretilen hayvan hiperbarik odası (Etimesgut Askeri Ekipman Fabrikası, Ankara, Türkiye) kullanıldı. Üç ATA altında, dakikada 3-4 litre %100 oksijenin 60 dakika uygulanması tek doz HBO olarak belirlendi. İlk doz HBO iskemiden 72 saat önce uygulandı. HBO dozları, iskemi zamanına kadar günde iki defa sabah ve akşam 08.00'de uygulanmıştır. Toplamda 7 doz HBO ön-uygulanması yapıldı. Odanın kompresyon ve dekompresyonu 5-10 dakikada tedricen tamamlandı.

Tablo 1

iNOS immün boyama değerleri [ortanca (dağılım)]

Çalışma grubu	Boyama yoğunluğu	Boyama genişliği	Boyama skoru
Sham	0.5 (0-2)	0.5 (0-1)	0.5 (0-2)
IR	2 (2-3)*	3 (2-4)*	6 (4-9)*
IR+ O_3 -PC	1 (1-2)†	2 (2-3)	3 (2-6)†
IR+HBO-PC	1 (1-3)	2 (2-3)	3 (2-6)†

*I/R ile sham grubu karşılaştırması için p<0.01, †IR+ O_3 -PC ve IR+HBO-PC grupları ile I/R grubu karşılaştırması için p<0.01.

Ozon ön-uygulaması

Intraperitoneal (ip) uygulanan 0.7 mgr/kg ozon/oksijen karışımı bir doz O₃ olarak tanımlandı. Her bir hayvana tatbik edilen gaz karışımının hacmi yaklaşık 60 µgr/mL'de 2.3-3.0 mL'dir. İlk doz O₃ iskemiden 72 saat önce uygulandı. Bütün dozlar her sabah 08.00'de olmak üzere toplam 4 doz O₃ ön-uygulaması yapıldı. Ozon, medikal-grade oksijenden O₃ jeneratörü ile (model OZONOSAN Photonik 1014, Hansler GmbH, Nordring 8, Iffezheim, Almanya) elektrikli korona ark deşarjı kullanılarak elde edilmiştir. Bu şekilde Uluslararası Ozon Derneği'nin Standardizasyon Komitesi tarafından önerildiği gibi fotometrik belirlemelerle ozon konsantrasyonu ve gaz akış hızı kontrol edildi. O₃ akış hızı bütün deneylerde 3 L/dakika olarak tutulmuştur ve bu bütün gazın (O₂+O₃) yalnızca yaklaşık %3'lük kısmını teşkil etmektedir. O₃ içeriğini ve konsantrasyonlarda tutarlılığı sağlamak için reaksiyon süresince Tygon polimer tüpler ve tek kullanımlık silikon şırıngalar (ozona dirençli) kullanıldı.

İskemi-reperfüzyon modeli

Bütün sıçanların anestezisi, sıçan anestezik karışımının (ketamin ve ksilazin, 5:1 mg/mL) 50 mg/kg ve 10 mg/kg dozunda intramüsküler uygulanması ile yapıldı. İşlem süresince karışımın ilave dozları ile anestezinin devamı sağlandı. Cerrahi işlem bölgesi traş edildi ve cilt %10'luk povidon-iyodin çözeltisi (Betadin, Purdue Products, Stamford, CT, ABD) ile boyanarak steril ortam sağlandı. Vücut sıcaklığı rektal prob ile ölçüldü ve sıcak pad ile yaklaşık 36.5-37.5°C arasında tutuldu. Sağ taraftan yüksek inguinal insizyon ile girilerek ana (*common*) iliak arter bulundu. Ana iliak artere damar klemp uygulandı. Kollateral kan akımı uyluğun proksimal 1/3 kısmına yerleştirilen lastik arter turnikesi ile engellendi. İki saat sonra klemp ve lastik turnike çıkartılarak ekstremitenin 22 saat reperfüzyonu sağlandı. Sham operasyon grubunda iskemi oluşturulmadan bütün işlem tam olarak yapıldı.

Doku örneğinin elde edilmesi

I/R periyodu sonunda (2 saat iskemi ve 22 saat reperfüzyon) hayvanlara ötenazi uygulandı. Sağ kruris bölgesine derin insizyon uygulanarak soleus kasına ulaşıldı. Kas dokusu zaman geçirmeden serum fizyolojik ile yıkanarak kanları temizlendi. Dokular tüplere yerleştirilerek likit nitrojen ile dondurularak

-70°C buzdolabında veya %10'luk formalin çözeltisinde saklandı.

Doku örneğinin hazırlanması

Dondurulan dokular tartılarak plastik tüp içerisine konulmuş, 20 mM fosfat tampon (pH 7.4) çözeltinin her mL'si için 100 mg doku konsantrasyonunda buz küpünde homojenizatör (Heidolph DiAx 900i Heidolph Elektro GmbH, Kelheim, Almanya) ile 10 üzerinden 8 ayarında 30-s atımlarda homojenize edilmiştir. Homojenize doku, 2500 gr'de 10 dakika süre ile santrifüjlenmiştir ve pellet çıkarılmıştır. Örnek dokular 2-3 ayrı tüpe ayrılmış ve biyokimyasal deneylerde kullanılmıştır.

Biyokimyasal analiz

Doku protein düzeyi

Önce, doku homojenatının protein içeriği standart olarak bovin serum albumininin kullanıldığı Lowry metoduna^[14] göre ölçülmüştür. Doku lipid peroksidasyon (MDA) seviyeleri Ohkawa^[15] metodu kullanılarak tiobarbitürik asit (TBA) reaksiyonu ile ölçülmüştür. Bu yöntem, MDA varlığında TBA reaksiyonunda 535 nm seviyesinde elde edilen rengin spektrofotometrik ölçümü için kullanılmaktadır. Bu amaçla 2.5 mL (100 gr/L) trikloroasetatik asit çözeltisi ve 0.5 mL homojenatın her biri santrifüj tüpüne eklenmiş ve 15 dakika boyunca kaynar su banyosuna konmuştur. Karışım ardından soğutulmuş ve 10 dakika süre ile 1000 gr'de santrifüje edilmiştir. Ardından, 2 mL süpernatant, 1 mL (6.7 gr/L) TBA çözeltisi test tüpüne eklenmiş ve 15 dakika süreliğine kaynar su banyosuna konmuştur. Ardından, çözelti soğutulmuş ve spektrofotometre (Helios Epsilon, Thermo Electron Corporation, Pittsford, NY, ABD) ile 535 nm'deki değer ölçülmüştür. MDA seviyeleri, mmol/gr protein olarak belirtilmiştir.

Doku süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi

SOD aktivitesi, Sun ve ark.^[16] tarafından tanımlanan nitroblue tetrazolium (NBT) yöntemi ile ölçülmüştür. NBT, süperoksit ile 560 nm'de yüksek emilim gösteren mavi formazana indirgenmiştir. Bir birim (U) SOD, NBT redüksiyon hızını %50 oranında azaltan protein miktarı olarak tanımlanmıştır. Hesaplanan SOD aktivitesi U/gr protein olarak ifade edilmiştir.

Doku glutatyon peroksidaz (GSH-Px) aktivitesi

GSH-Px aktivitesi, Paglia ve Valentine^[17] tarafından tanımlanan, GSH-Px aktivitesinin NADPH'nin

glutasyon redüktaz ile oksidasyonunu temel alan yöntem kullanılarak ölçülmüştür. NADPH oksidasyonu, 340 nm'de 37°C'de spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Beş dakika süre ile 340 nm'deki absorban değişimi kaydedilmiştir. Aktivite, dakikada oksitlenen NADPH doğrularının eğimidir. GSH-Px aktivitesi, GSH-Px U/gr protein olarak ifade edilmiştir.

Serum nitrit-nitrat (NOx)

Serum örnekleri, nitrit-nitrat (NOx) analizinden önce 0.45 µm kutuplu membran nitroselülözden geçirilmiştir. NOx seviyeleri, bir iyon kromatografi (Dionex ICS-1000, Sunnyvale, CA, ABD) ile ölçülmüştür. Anyon ve koruma sütunları (AS-9HC/AG-9HC, CS12A/CG12A, Sunnyvale, CA, ABD) ve otomatik supresyon bu yöntemde kullanılmıştır. NOx sonuçlarının nicel incelemesi, aracın dahili yazılımında her bir iyon için ayrı standart çözüm biçiminde yapılmıştır.^[18]

Histopatoloji

Uyarılabilir nitrik oksit sentazın (iNOS) immüno-histokimyasal boyaması

Dokular 24 saat süre ile %10'luk formaldehit çözeltilisinde fikse edilmiştir ve ardından rutin gecelik işlemler uygulanmış ve parafine gömülmüştür. Kalınlığı 5 µm olan kesitler alındıktan sonra, iNOS'a özgü antikorlarla immünohistokimyasal olarak boyanmıştır. Boyama işlemi, Özcan ve ark.^[19] tarafından tanımlanan yöntem ile yapılmıştır. Teknik nedenlerden dolayı ortaya çıkan boyama yoğunlukları arasındaki farkları gidermek için otomatik bir cihaz (Autostainer-480-LV1, Labvision, Fremont, CA, ABD) kullanılmış ve bütün kısımlar iki seansta boyanmıştır. Değerlendirmeler ışık mikroskobu (Nikon E-600, Tokyo, Japonya) ile yapılmıştır. Boyanma skorlaması, boyanma yoğunluğu ve genişliğinin çarpılması ile hesaplanmıştır. Boyanma yoğunluğu şu şekilde skorlanmıştır: 0 (boyanma yok), 1+ (zayıf), 2+ (orta) ve 3+ (güçlü). Boyanma genişliği ise şu şekilde skorlanmıştır: 1 (%1-25), 2+ (%25-50), 3+ (%50-75) ve 4+ (%75-100). Yani, boyanma skorunun en düşük değeri 0 iken en yüksek değer 12 olmuştur.

İstatistiksel analiz

Bütün istatistik analizleri SPSS istatistik yazılımı (Windows için SPSS, versiyon 11.0, Chicago, IL, ABD) kullanılarak yapıldı. Bütün sayısal veriler öncelikle gruplar arasındaki farklılıkları belirlemek için Kruskal-Wallis testi uygulanarak değerlendiril-

di. Mann-Whitney U testi de ardışık iki grubu analiz etmek için kullanıldı. İstatistiksel olarak anlamlılık sınırı p<0.01 kabul edildi.

Sonuçlar

Doku lipid peroksidasyonu

I/R grubundaki MDA seviyesi sham grubuna göre artmıştır. HBO ve O₃ ön-uygulamaları MDA seviyesini I/R grubuna göre anlamlı ölçüde azaltmıştır (Şekil 1).

Antioksidan enzimler (SOD, GSH-Px)

I/R grubundaki SOD aktivitesi sham grubuna göre artmıştır (p<0.01). O₃ ön-uygulaması SOD aktivitesini anlamlı ölçüde artırdı, ancak HBO ön-uygulamasının SOD aktivitesi üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir etkisi olmadı. SOD'un tersine, I/R grubundaki GSH-Px aktivitesi sham grubuna göre azaldı (p<0.01). O₃ ve HBO ön-uygulamaları GSH-Px aktivitesini anlamlı ölçüde artırdı (Şekil 1).

Serum nitrit-nitratı

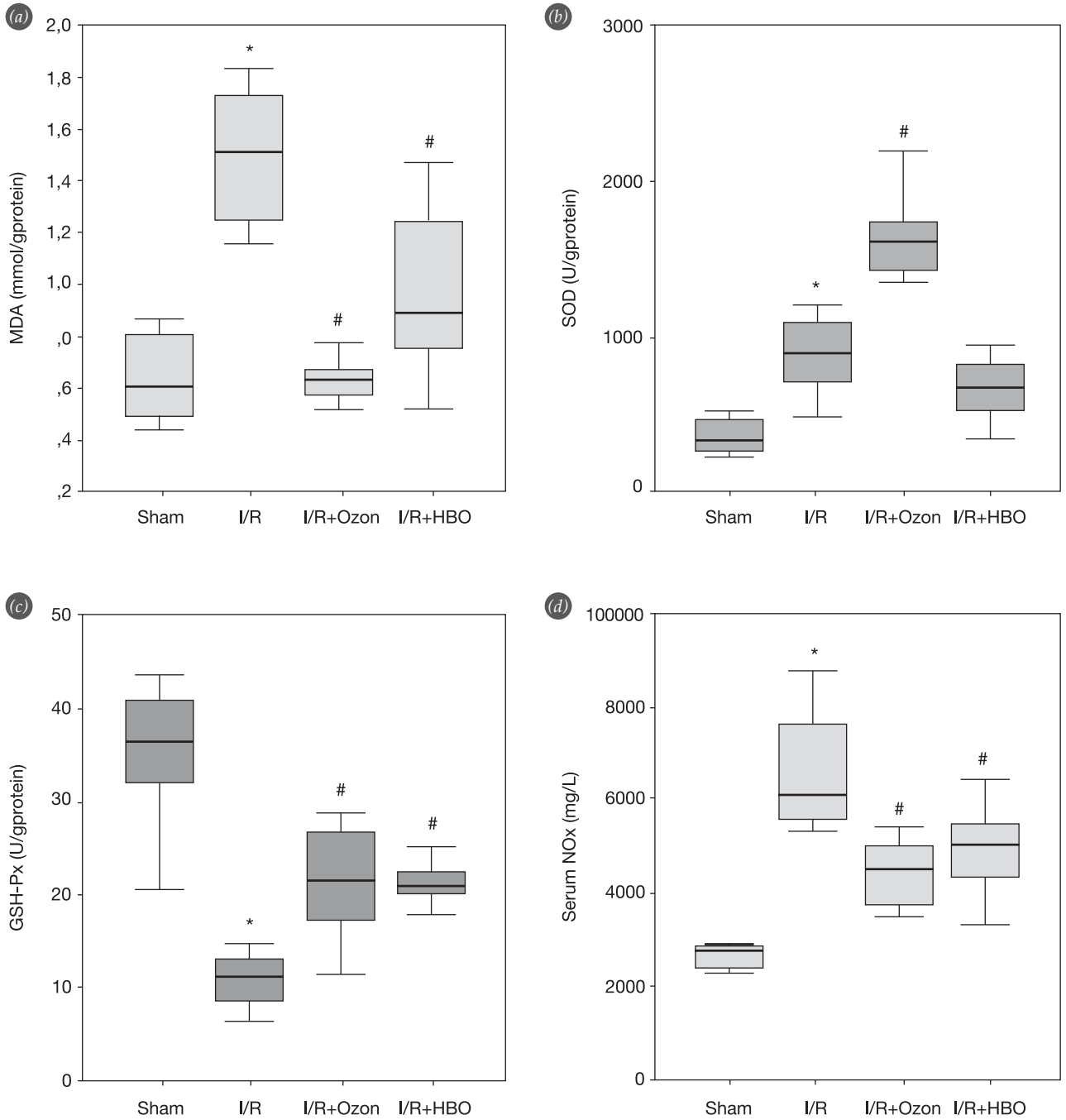
I/R grubundaki serum NOx seviyesi sham operasyon grubuna göre anlamlı bir artış göstermiştir (p<0.01). O₃ ve HBO ön-uygulamaları NOx seviyesini istatistiksel olarak anlamlı derecede azaltmıştır (Şekil 1).

iNOS immünohistokimyasal boyaması

I/R grubundaki ortalama iNOS boyanma skorları (genişlik ve yoğunluk çarpımı) diğer gruplardan yüksektir. Sham operasyon grubunda neredeyse hiçbir boyanma gözlenmemiştir. O₃ ve HBO ön-uygulamaları, boyama skorlarını azaltmıştır. Fakat, skordaki bu azalma daha çok yoğunluk üzerinden olmuş, genişlik üzerinde anlamlı bir değişiklik olmamıştır (Tablo 1 ve Şekil 2).

Tartışma

Bu çalışmada hem O₃ hem de HBO ön-uygulamasının sıçan iskelet sisteminde turnike ile yapılan iskelem-reperfüzyonu sonrası meydana gelen oksidatif/nitrosatif strese etkisi araştırıldı. Sonuçlar, O₃ ve HBO ön-uygulaması ile iskelet kaslarında oksidatif/nitrosatif stresin azaldığını ve iNOS immün boyanma skorlarının düştüğünü göstermektedir. Dolayısıyla, bu yöntemlerin I/R kaynaklı oksidatif/nitrosatif stres nedeniyle oluşabilecek olası doku hasarlarını azaltabilecekleri düşünülebilir. O₃ ve HBO ön-uygulamasında antioksidan enzim sistemi uyarılarak, iske-

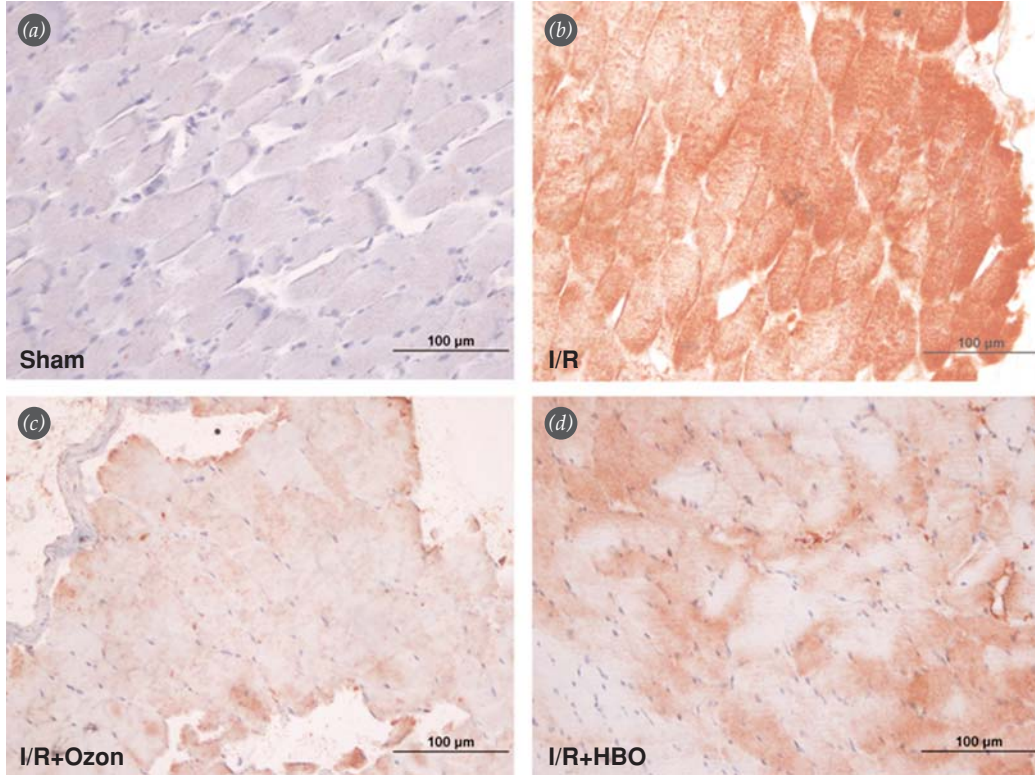


Şekil 1. Tüm grupların doku (a) MDA, (b) SOD, (c) GSH-Px ve (d) serum NOx seviyeleri (ortanca±standart sapma). *I/R ile sham karşılaştırması için $p<0.01$, #I/R+O₃-PC ve I/R+HBO-PC grupları ile I/R grubu karşılaştırması için $p<0.01$.

mi-reperfüzyon sonrası gelişen oksidatif/nitrosatif stres ve iNOS oluşumu azaltılarak oluşabilecek ciddi doku hasarının önlenmesi sağlanabilir.

Oksidatif stres göstergesi olan MDA ile nitrosatif stres göstergesi olan serum NOx seviyelerinin I/R grubu sıçanlarda daha yüksek olduğu görüldü. Aynı

grupta, antioksidan enzim aktivitelerinde (SOD ve GSH-Px) anlamlı düzeyde artış tespit edildi. Ayrıca iNOS immün boyamanın skoru, genişliği ve yoğunluğu diğer gruplara göre daha yüksek bulundu. Bu sonuçlar literatür bilgileri ile uyumlu olarak değerlendirildi.^[20,21]



Şekil 2. (a) Sham, (b) I/R, (c) I/R+O₃ ve (d) I/R+HBO gruplarında iskelet kas dokusunun immün boyama görüntüleri.

HBO uygulaması pek çok faydalı farmakolojik etkiye sahiptir. Bunlar ödem ve lökosit adezyonunun azaltılması, antibakteriyel etkinin güçlendirilmesi, fibroblast proliferasyonunun ve kollateral oluşumunun artırılmasıdır.^[5] HBO ön-uygulaması, iskemik ön-uygulamaya benzer bir şekilde reaktif oksijen moleküllerinin oluşmasına neden olur.^[22] Artmış reaktif oksijen molekülleri vücudun savunma sisteminin gelişmesi için uyarıcı sinyaller olarak görev yaparlar.^[23] Ayrıca HBO'nun bazı faydalı etkileri özellikle H₂O₂ olmak üzere reaktif oksijen molekülleri aracılığıyla gerçekleşmektedir.^[24] HBO kendisi güçlü bir oksidan olmakla birlikte mevcut olan oksidatif stresi azaltarak çift yönlü hareket eder.^[25] HBO sistit, sepsis, nefrit ve kolit gibi oksidatif stresten kaynaklanan hastalıklarda kullanılmaktadır. Bu çalışmalarda, HBO'nun artan oksidatif stresi baskıladığı gösterilmiştir.^[26-29] Ayrıca akut pankreatit tedavisinde, HBO ön-uygulamasının oksidatif stresi azaltarak etkili olduğu bildirilmiştir.^[30] Li ve ark.^[9] tarafından HBO ön-uygulamasının beyin dokusunun I/R hasarında katalaz (CAT) ve SOD aktivitesini artırdığı, MDA seviyesini azalttığı bildirilmiştir. Busco ve ark.^[31] is-

kelet kas sisteminde I/R sonrası artan CAT ve SOD aktivitesinin HBO ön-uygulaması ile azaldığını bildirmişlerdir. Akgül ve ark.^[32] tarafından yapılan bir başka çalışmada HBO'nun beyin dokusunda asimetrik dimetilarginin (ADMA) seviyesini azalttığı ve aynı zamanda nitrik oksit sentaz (NOS) enzimini inhibe ettiği ve buna bağlı olarak NOx seviyesini azalttığı bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda HBO ön-uygulaması ile MDA ve serum NOx seviyelerinin azalmış olduğu ve GSH-Px enzim aktivitesinin artmış olduğu görüldü. Ancak SOD aktivitesinde anlamlı bir değişiklik olmadığı belirlendi. MDA ve serum NOx seviyelerinin azalması literatür bilgileri ile uyum gösterirken, antioksidan enzim aktivitesindeki farklılığın HBO'nun doz ve uygulama sayısından, I/R periyodunun süresinden kaynaklanmış olabileceği değerlendirilmektedir.

O₃ plazma, lenf ve idrar gibi biyolojik sıvılarda çözünür ve hızla çoklu doymamış yağ asitleriyle, antioksidanlarla, indirgenmiş glutatyonla ve albuminle reaksiyona girer. Bütün bu bileşenler elektron verici olarak davranarak ve oksidasyona uğrayarak H₂O₂ ve lipid oksidasyon ürünlerini (LOPs) oluşturur. Te-

mel reaktif oksijen molekülü olan H₂O₂, O₃'ün çeşitli biyolojik ve terapötik etkilerini göstermesi için haberci olarak görev yapar.^[33,34] H₂O₂'nin zararlı olduğuna yönelik yaygın kanıya rağmen, sinyal iletiminin düzenleyicisi olarak hareket ettiği, savunma ve immün cevapta önemli aracı olarak rol oynadığı bilinmektedir.^[9,35] H₂O₂ hızlı etki gösterip erken atılırken (erken ve kısa etkili aracı) LOPs'lar dolaşım aracılığıyla dokulara ulaşmakta olup geç ve uzun etkili aracı olarak çalışmaktadır.^[30] Bu süreç doğal immün sistemi uyarmakta ve hasar oluştuğunda hücrenin başa çıkmasına yardımcı olmaktadır. Ayrıca O₃ ön-uygulamasının GSH-Px, SOD gibi hücre antioksidan sistemlerini desteklediği ve enzimatik reaksiyonları hızlandırdığı, bireyi oksidatif/nitrosatif stres ve septik şokta meydana gelen fizyopatolojik koşullara hazırladığı gösterilmiştir.^[36,37] Ayrıca O₃'ün karaciğer ve böbrek dokularında oluşan I/R hasarını azalttığı bildirilmiştir.^[32,38] Bu çalışmada O₃ ön-uygulaması ile I/R periyodu sonrasında iskelet kasında artmış MDA ve NOx seviyelerinin azaldığı, SOD ve GSH-Px aktivitelerinin arttığı gözlemlendi. Aynı zamanda iNOS immün boyamada skorun ve yoğunluğunun azaldığı görüldü. Bu bulgular literatür bilgileri ile uyumlu olarak değerlendirildi.

Sonuç olarak, hem O₃ hem de HBO ön-uygulaması oksidatif stresin göstergesi olan lipid peroksidasyonunu, nitrosatif stresin göstergesi olan serum NOx seviyesini ve iNOS immün boyama skorunu deneysel I/R'de düşürmüştür. O₃ ve HBO ön-uygulamasının etkileri istatistiksel olarak farklılık göstermemektedir. Bu bulgular hem O₃ hem de HBO ön-uygulamasının sıçan iskelet kasında I/R kaynaklı oksidatif/nitrosatif strese karşı koruyucu etkisinin olabileceğini göstermektedir.

Kaynaklar

- Sirsjö A, Lewis DH, Nylander G. The accumulation of polymorphonuclear leukocytes in post-ischemic skeletal muscle in the rat, measured by quantitating tissue myeloperoxidase. *Int J Microcirc Clin Exp* 1990;9:163-73.
- Cerqueira NF, Hussni CA, Yoshida WB. Pathophysiology of mesenteric ischemia/reperfusion: a review. *Acta Cir Bras* 2005;20:336-43.
- Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol* 1996;271:C1424-37.
- Tunç T, Öter S, Güven A, Topal T, Kul M, Korkmaz A, et al. Protective effect of sulfhydryl-containing antioxidants against ischemia/reperfusion injury of prepubertal rat intestine. *J Gastroenterol Hepatol* 2009;24:681-7.
- Gill AL, Bell CN. Hyperbaric oxygen: its uses, mechanisms of action and outcomes. *QJM* 2004;97:385-95.
- Koca K, Yurttaş Y, Bilgiç S, Çaycı T, Topal T, Durusu M, et al. Effect of preconditioned hyperbaric oxygen and ozone on ischemia-reperfusion induced tourniquet in skeletal bone of rats. *J Surg Res* 2010;164:e83-9.
- Wang L, Li W, Kang Z, Liu Y, Deng X, Tao H, et al. Hyperbaric oxygen preconditioning attenuates early apoptosis after spinal cord ischemia in rats. *J Neurotrauma* 2009;26:55-66.
- Han C, Lin L, Zhang W, Zhang L, Lv S, Sun Q, et al. Hyperbaric oxygen preconditioning alleviates myocardial ischemic injury in rats. *Exp Biol Med (Maywood)* 2008;233:1448-53.
- Li J, Liu W, Ding S, Xu W, Guan Y, Zhang JH, et al. Hyperbaric oxygen preconditioning induces tolerance against brain ischemia-reperfusion injury by upregulation of antioxidant enzymes in rats. *Brain Res* 2008;1210:223-9.
- Peng Z, Ren P, Kang Z, Du J, Lian Q, Liu Y, et al. Up-regulated HIF-1alpha is involved in the hypoxic tolerance induced by hyperbaric oxygen preconditioning. *Brain Res* 2008;1212:71-8.
- Beck EG, Viebahn-Hänsler J. *Ozon-Handbuch. Grundlagen, Prävention, Therapie.* Landsberg: Ecomed; 1995.
- Bocci V. Ozone as Janus: this controversial gas can be either toxic or medically useful. *Mediators Inflamm* 2004;13:3-11.
- Chen H, Xing B, Liu X, Zhan B, Zhou J, Zhu H, et al. Ozone oxidative preconditioning protects the rat kidney from reperfusion injury: the role of nitric oxide. *J Surg Res* 2008;149:287-95.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-75.
- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979;95:351-8.
- Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem* 1988;34:497-500.
- Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967;70:158-69.
- Göçgeldi E, Uysal B, Korkmaz A, Ogur R, Reiter RJ, Kurt B, et al. Establishing the use of melatonin as an adjuvant therapeutic against paraquat-induced lung toxicity in rats. *Exp Biol Med (Maywood)* 2008;233:1133-41.
- Özcan A, Karslıoğlu Y, Kurt B, Öngürü O, Günhan O. Quantitative evaluation of immunohistochemical staining

- in gastrointestinal stromal tumors. *Anal Quant Cytol Histol* 2007;29:159-65.
20. Özyurt H, Özyurt B, Koca K, Özgöçmen S. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) protects rat skeletal muscle against ischemia-reperfusion-induced oxidative stress. *Vascul Pharmacol* 2007;47:108-12.
 21. Yan Z, Chen Z, Chen Z. Modulation of nitric oxide synthase isoenzymes in reperfused skeletal muscle. *Chin J Traumatol* 2000;3:76-80.
 22. Korkmaz A, Öter S, Sadir S, Topal T, Uysal B, Özler M, et al. Exposure time related oxidative action of hyperbaric oxygen in rat brain. *Neurochem Res* 2008;33:160-6.
 23. Suzuki YJ, Forman HJ, Sevanian A. Oxidants as stimulators of signal transduction. *Free Radic Biol Med* 1997;22:269-85.
 24. Hink J, Jansen E. Are superoxide and/or hydrogen peroxide responsible for some of the beneficial effects of hyperbaric oxygen therapy? *Med Hypotheses* 2001;57:764-9.
 25. Buras J. Basic mechanisms of hyperbaric oxygen in the treatment of ischemia-reperfusion injury. *Int Anesthesiol Clin* 2000;38:91-109.
 26. Korkmaz A, Öter S, Devenci S, Özgürtaş T, Topal T, Sadir S, et al. Involvement of nitric oxide and hyperbaric oxygen in the pathogenesis of cyclophosphamide induced hemorrhagic cystitis in rats. *J Urol* 2003;170:2498-502.
 27. Öter S, Edremitlioğlu M, Korkmaz A, Coşkun O, Kılıç D, Kısa U, et al. Effects of hyperbaric oxygen treatment on liver functions, oxidative status and histology in septic rats. *Intensive Care Med* 2005;31:1262-8.
 28. Yılmaz MI, Korkmaz A, Kaya A, Sönmez A, Çağlar K, Topal T, et al. Hyperbaric oxygen treatment augments the efficacy of a losartan regime in an experimental nephrotic syndrome model. *Nephron Exp Nephrol*. 2006;104:e15-22.
 29. Güleç B, Yaşar M, Yıldız S, Öter S, Akay C, Devenci S, et al. Effect of hyperbaric oxygen on experimental acute distal colitis. *Physiol Res* 2004;53:493-9.
 30. Yaşar M, Yıldız S, Mas R, Dündar K, Yıldırım A, Korkmaz A, et al. The effect of hyperbaric oxygen treatment on oxidative stress in experimental acute necrotizing pancreatitis. *Physiol Res* 2003;52:111-6.
 31. Bosco G, Yang ZJ, Nandi J, Wang J, Chen C, Camporesi EM. Effects of hyperbaric oxygen on glucose, lactate, glycerol and anti-oxidant enzymes in the skeletal muscle of rats during ischaemia and reperfusion. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2007;34:70-6.
 32. Akgül EO, Çakır E, Özcan O, Yaman H, Kurt YG, Öter S, et al. Pressure-related increase of asymmetric dimethylarginine caused by hyperbaric oxygen in the rat brain: a possible neuroprotective mechanism. *Neurochem Res* 2007;32:1586-91.
 33. Bocci VA. Scientific and medical aspects of ozone therapy. State of the art. *Arch Med Res* 2006;37:425-35.
 34. Zamora ZB, Borrego A, López OY, Delgado R, González R, Menéndez S, et al. Effects of ozone oxidative preconditioning on TNF-alpha release and antioxidant-prooxidant intracellular balance in mice during endotoxic shock. *Mediators Inflamm* 2005;24:16-22.
 35. Reth M. Hydrogen peroxide as second messenger in lymphocyte activation. *Nat Immunol* 2002;3:1129-34.
 36. Ajamieh H, Merino N, Candelario-Jalil E, Menéndez S, Martinez-Sanchez G, Re L, et al. Similar protective effect of ischaemic and ozone oxidative preconditionings in liver ischaemia/reperfusion injury. *Pharmacol Res* 2002;45:333-9.
 37. Madej P, Plewka A, Madej JA, Nowak M, Plewka D, Franik G, et al. Ozonotherapy in an induced septic shock. I. Effect of ozonotherapy on rat organs in evaluation of free radical reactions and selected enzymatic systems. *Inflammation* 2007;30:52-8.
 38. Chen H, Xing B, Liu X, Zhan B, Zhou J, Zhu H, et al. Similarities between ozone oxidative preconditioning and ischemic preconditioning in renal ischemia/reperfusion injury. *Arch Med Res* 2008;39:169-78.