



Ozonun Romatoid Artrit Hayvan Modelinde Kemik Dayanıklılığı Üzerine Olan Etkisi

The Effect of Ozone on Bone Strength in Animal Model of Rheumatoid Arthritis

Gülnur Taşçı Bozbaş, Figen Sevil Kilimci*, Mustafa Yılmaz, Gülcan Gürer, Buket Demirci*****

Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon Anabilim Dalı, Aydın, Türkiye

**Adnan Menderes Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi, Anatomi Anabilim Dalı, Aydın, Türkiye*

***Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Klinik Biyokimya Anabilim Dalı, Aydın, Türkiye*

****Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Klinik Farmakoloji Anabilim Dalı, Aydın, Türkiye*

Öz

Amaç: Romatoid artrit (RA) periartiküler ve sistemik osteoporozdan normal popülasyondan daha sık rastlanmaktadır. Bu çalışmada RA hayvan modeli olarak kabul edilen Freund's complete adjuvan (FCA) artritinde ozonun kemik dayanıklılığı üzerine olan etkisini araştırmayı amaçladık.

Gereç ve Yöntem: Çalışmada 28 adet erkek Wistar sıçan kullanıldı. Sıçanlardan 14 tanesinin arka pençesine salin, kalan 14'ünün arka pençesine de ise FCA subkutan olarak enjekte edildi. İki haftanın sonunda her bir gruptan 7 sıçana, üç hafta boyunca toplam 6 kez 40 µg/kg ozon (intraperitoneal olarak) uygulandı. Altıncı haftada sıçanların kan örneklerinde interlökin-1 (IL-1), IL-6 ve tümör nekroz faktör-alfa (TNF-α) düzeyleri değerlendirildi. Üç-nokta eğme testi uygulanmak üzere sağ femurları çıkarıldı.

Bulgular: TNF-α düzeyi FCA artrit grubunda sağlıklı gruptan istatistiksel olarak anlamlı oranda yüksek bulunurken (p<0,05), FCA artrit-ozon grubunda bu değerler kontrol grubundan farklı bulunmadı (p>0,05). IL-1 ve IL-6 düzeylerinde ise gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı (p>0,05). Kemik dayanıklılığını değerlendirmede kullanılan parametreler arasında maksimum kuvvet ve atalet momenti FCA artrit-ozon grubunda FCA artrit grubuna göre yükselme eğilimi göstermesine rağmen bu değişiklikler istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (p>0,05). Dayanım ve sertlikte ise gruplar arasında anlamlı farklılık saptanmamıştır (p>0,05).

Sonuç: Bu çalışma bildiğimiz kadarıyla RA'da kemik dayanıklılığı üzerine ozonun etkisinin değerlendirildiği ilk çalışmadır. Ozonun RA hayvan modeli olan FCA artritinde kemik dayanıklılığı üzerine yeterince etkili olmadığı, ancak zarar da vermediği görülmüştür. Ancak ozonun farklı doz ve sürelerde uygulanması sonuçları değiştirebilir. Bu nedenle, bu konuda ilave çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar kelimeler: Freund's complet adjuvan artrit, romatoid artrit, ozon

Summary

Objective: Periarticular and systemic osteoporosis are more common in rheumatoid arthritis (RA) than normal population. In this study, we aimed to investigate the effectiveness of ozone on bone strength in Freund's complete adjuvant (FCA) arthritis, which is considered as the animal model for RA.

Materials and Methods: In this study, 28 male Wistar rats were used. Saline was injected into the hindpaws of 14 rats, and Freund's complete adjuvant was injected into the hindpaws of the other 14 rats, subcutaneously. At the end of two weeks, 40 µg/ml ozone was administered intraperitoneally to 7 of the rats in each group for 6 times totally within duration of three weeks. At the 6th week, serum interleukin-1 (IL-1), IL-6 and tumor necrosis factor-alpha (TNF-α) levels were measured. Right femurs were separated for 3-point flexure test.

Results: TNF-α levels of FCA arthritis were significantly higher than that of the control group (p<0.05), however FCA arthritis-ozone group's level was not (p>0.05). Serum levels of IL-1 and IL-6 were not statistically significant among all groups (p>0.05). Maximum force and moment of inertia tended to increase in FCA arthritis-ozone group compare to the FCA arthritis group (p>0.05). The stiffness and toughness were similar in the all groups (p>0.05).

Conclusion: To the best of our knowledge, this is the first study in which the effects of ozone on bone strength of RA were investigated. It is determined that ozone is not effective enough, but not harmful on bone strength of FCA arthritis. It is clear that further studies are required with ozone treatment and its use in RA when administrated in different doses and time courses.

Keywords: Freund's complet adjuvan arthritis, rheumatoid arthritis, ozone

Giriş

Romatoid artrit (RA), özellikle periferik sinovyal eklemleri tutan, sinovyal hücre proliferasyon ve inflamasyonunun eklemde destrüksiyon yapması ile karakterize, etiyojisi bilinmeyen otoimmün bir hastalıktır (1). Doğrudan eklemlerin hastalığı olarak düşünülmesine rağmen eklem dışı çeşitli sorunlara da yol açabilmektedir. Osteoporoz RA'da sık rastlanan eklem dışı sorunlardandır. Hastalığın seyri sırasında periartiküler ya da sistemik osteoporoz görülebilmektedir (2). RA patogenezinde rol oynayan çeşitli proinflamatuvar sitokinlerin osteoblast ve osteoklastlar arasındaki dengeyi bozarak kemik kaybına yol açtığı düşünülmektedir. Steroid kullanımı ve immobilizasyon gibi faktörler de kemik kaybını artırmaktadır (1). RA'da kemik kaybına bağlı olarak kırık riskinin de arttığı gösterilmiştir. Bu durum mortalitede artışa da yol açmaktadır (3-5).

Kemik dayanıklılığını kemiğin boyutu, şekli ve içeriği belirlemektedir. Kemiğin bu özelliklerini ve bunların birbiriyle olan etkisini açıklamada kemik kalitesi terimi kullanılmaktadır. Kemik kalitesindeki klinik olarak anlamlı bir değişiklik, kemiğin biyomekanik performansını değiştirmektedir. Üç nokta bükme testi gibi kemiğe yönelik biyomekanik testler kemik kalitesinin direkt göstergesidir (6).

Freud's complete adjuvan (FCA) artrit deneysel hayvan çalışmalarında RA modeli olarak kabul edilmektedir (7,8). FCA artritinde osteoklast aktivitesinin arttığı ve rezorpsiyon lagünlerinin oluştuğu gösterilmiştir. Bu nedenle RA'ya bağlı kırık riskini değerlendirmek için de uygun bir modeldir (9-11).

Ozon doğada bulunan 3 oksijen atomundan oluşan, renksiz ve keskin kokulu bir gazdır. Medikal ozon terapisi ise saf oksijenden jeneratör yardımı ile belirli oranlarda elde edilen ozon-oksijen karışımının (%0,05-5 O₃; %95-99,95 O₂) değişik yöntemlerle hastaya uygulanmasını içeren bir tedavi yöntemidir (12). Ozonun RA'daki eklem bulguları üzerine olan etkinliği çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (13-16). RA'ya bağlı gelişen kemik kırık riskini azaltmak için bugüne kadar pek çok farmakolojik ya da kimyasal ajan incelenmiştir (17,18). Biz de çalışmamızda, RA hayvan modelinde ozonun kemik dayanıklılığı üzerine olan etkisini araştırmayı amaçladık.

Gereç ve Yöntem

Çalışmada 4-5 aylık toplam 28 adet erkek Wistar sıçan kullanıldı. Sıçanlar Adnan Menderes Üniversitesi (ADU) Deney Hayvanları Araştırma Merkezi'nden temin edildi ve tüm çalışma ADU Hayvan Etik Komitesi'nin kurallarına uygun olarak yapıldı (HADYEK; 64583101/2014/084). Sıçanlar her bir grupta 7 sıçan olacak şekilde dört gruba ayrılarak işaretlendi.

Kontrol (K) grubu: Sıçanların sol arka pençelerinin palmar yüzüne 0,1 mL serum fizyolojik enjekte edildi.

Ozon (O₃) grubu: Sıçanların sol arka pençelerinin palmar yüzüne 0,1 mL serum fizyolojik enjekte edildi. Çalışmanın 2. haftasından itibaren 3 hafta boyunca haftada 2 gün 40 µg/mL ozon (Photonik, Dr. Hänslers Ozonosan, Germany) intraperitoneal (ip) olarak uygulandı.

Freud's Complete Adjuvan Artriti (FCAA) Grubu: Sıçanların sol arka pençe palmar yüzüne 0,1 mL mineral yağ içinde ısıda öldürülmüş Mycobacterium tuberculosis içeren FCA (Sigma-Aldrich Chemical Co, Interlab, İstanbul, Türkiye) enjekte edilerek artrit oluşturuldu.

Freud's Complete Adjuvan Artriti-Ozon (FCAA-O₃) Grubu: Sıçanların sol arka pençelerinin palmar yüzüne 0,1 mL FCA enjekte edildi. Sıçanlara ikinci haftadan itibaren 3 hafta boyunca haftada 2 gün 40 µg/mL O₃ (ip) uygulandı.

Tüm gruplara aynı çevresel koşullar sağlandı (24 °C, 12 saat gece ve 12 saat gündüz). Haftalık olarak sıçanların ağırlık takipleri ve muayeneleri yapıldı. Çalışmanın başlangıcında, ozon uygulaması öncesi ve çalışmanın sonunda kaliper ile pençe çapı ölçümleri yapılarak, başlangıçtan itibaren çap değişim oranları hesaplandı. Altıncı haftada ketamin (50 mg/kg) ve ksilazin (5 mg/kg) anestezisi altında sıçanlar sakrifiye edildi. Kan örnekleri alınarak 1000 xg'da 10 dakika santrifüj edildi. Hazırlanan serum örneklerinde tümör nekroz faktör-alfa (TNF-α), interlekin-1 (IL-1) ve IL-6 düzeyleri enzime bağlı immüno-sorbent testi yöntemi ile değerlendirildi.

Sıçanların femurları periostlarına zarar verilmeden çıkarılarak serum fizyolojik ile ıslatılmış gazlı bezlere sarıldı ve -25 °C'de derin dondurucuda muhafaza edildi. Mekanik test öncesi oda sıcaklığında çözdürüldü (19,20). Üç nokta bükme testi, Adnan Menderes Üniversitesi Tarımsal Biyoteknoloji ve Gıda Güvenliği Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde bulunan Zwick-Roell cihazı kullanılarak yapıldı (Resim 1). Üç nokta bükme testi için kemikler cihaz üzerine, her bir kemik için ayrı ayrı belirlenen mesnet aralığında ve kaudo-kraniyal yönde yük uygulanacak şekilde yerleştirildi (21). Sonrasında 2 N ön yükleme ile 2 mm/dakika hızında kemik kırılıncaya kadar yükleme yapıldı. Test öncesi kemiklerin uzunlukları ve mekanik test sonrasında kraniyo-kaudal, medio-lateral endosteal ve periosteal çap ölçümleri yapıldı. Ölçülen bu çaplar kullanılarak atalet momenti (I_{max}) değeri hesaplandı (20,22). Kemik kırıldıktan sonra maksimum kırılma kuvveti kuvvet-deformasyon eğrisinden elde edildi. Bu eğri kullanılarak maksimum kuvvet (F_{max}), katılık ve dayanım değerleri hesaplandı (22,23). İstatistiksel analizler SPSS 18.0 (SPSS Inc., Chica-go, IL, USA) kullanılarak student t test ve Mann-Whitney U test ile yapıldı. P değerinin 0,05'den düşük olması anlamlı olarak kabul edildi.

Bulgular

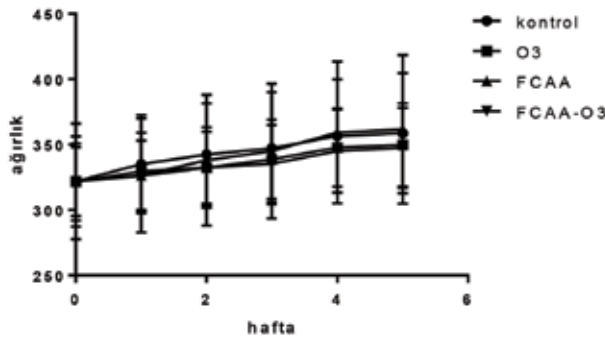
Sıçanların haftalık ağırlık takiplerinde gruplar arasında istatistiksel farklılık saptanmadı (p<0,05) (Şekil 1). Sıçanların başlangıçtan ozon uygulaması öncesi 2. haftaya kadar olan pençe çapı değişiklikleri incelendiğinde; FCAA ve FCAA-O₃ gruplarında kontrol grubuna göre belirgin artış saptandı (p<0,001). Ozon uygulanan ve uygulanmayan FCAA'lı sıçanlar arasında istatistiksel anlamlı farklılık görülmedi (p>0,05). Tedavi sonrasında ise FCAA-O₃ grubunda çalışma başlangıcına göre sadece %9,6'lık çap farkı saptanırken, bu oran FCAA grubuna göre (%35,2) belirgin şekilde düşüktü (p<0,001) (Tablo 1).

FCAA grubunda serum TNF- α düzeyi kontrol grubuna göre istatistiksel olarak yüksek bulunmasına karşılık ($p<0,05$), FCAA-O₃ grubundaki düzeyler kontrol grubuna benzer bulundu ($p>0,05$). O₃ grubunda da serum TNF- α düzeyleri kontrol grubuna benzerdi ($p>0,05$). Serum IL-1 ve IL-6 düzeylerinde ise gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı ($p>0,05$) (Şekil 2).

FCAA grubunda kemik dayanıklılığı parametrelerinden Fmax'ın kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düşük olduğu ($p<0,05$), Imax'te düşme eğilimi olduğu ancak bunun istatistiksel anlamlı olmadığı görüldü ($p>0,05$). FCAA-O₃ grubunda ise gerek Fmax, gerekse Imax'te FCAA grubuna göre yükselme eğilimi görülmesine rağmen, bu değişiklikler istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0,05$). Dayanım ve katılık değerlerinde gruplar arasında anlamlı farklılık saptanmadı ($p>0,05$) (Tablo 2).

Tartışma

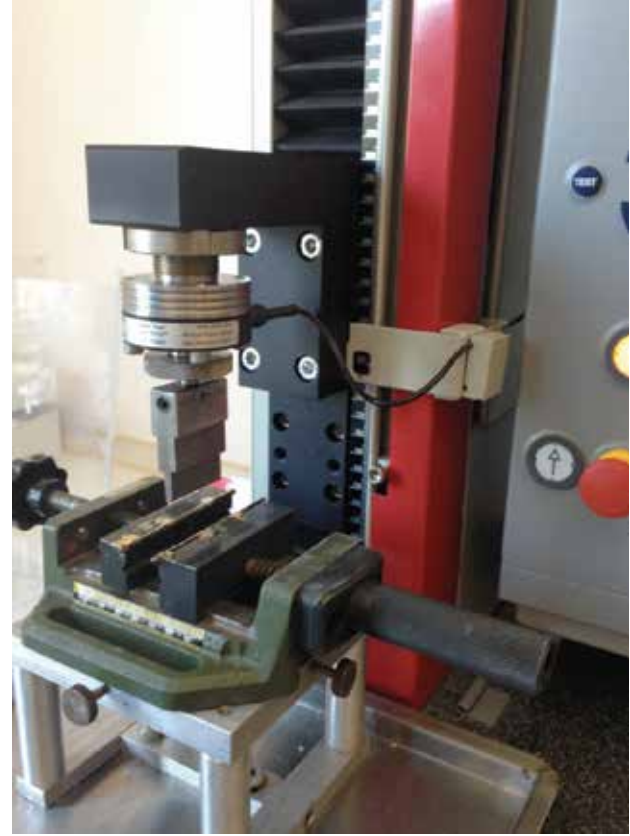
Ozon tedavisi ilk kez 1974'de Wolf (24) tarafından rapor edilmiştir ve son 40 yıldır Avrupa'da pek çok hastalığın tedavisinde destekleyici tedavi yöntemi olarak kullanılmaktadır (25). Antimikrobiyal, antihipoksik, immünmodülatör, antiinflamatuvar ve yara iyileştirici etkilerinin olduğu düşünülmektedir (12). Ozonun hem hücre sel, hem humoral immün sistemi etkilediği, immüno kompetan hücrelerin proliferasyonunu ve immünglobulinlerin sentezini stimüle ettiği saptanmıştır (26). Enfeksiyon varlığında ozon uygulaması sonrasında sitokinlerde artış olduğu bildirilmiştir (27). Ozon uygulamasından 8-9 saat sonra kanda sitokin seviyelerinde minimal artışlar saptanmıştır (28). Her uygulama sonrası ozona maruz kalan kandaki monosit ve lenfositlerin yaklaşık %4'ünde immünmodülasyon görüldü (29). Bu nedenle tekrarlayan tedaviler immünmodülasyonu



Şekil 1. Sıçanların vücut ağırlığındaki değişimler
FCAA: Freud's complete adjuvan artrit, O₃: Ozon

sağlar (28). Bizim çalışmamızda ozon uygulanan sağlıklı sıçanlarda serum TNF- α , IL-1 ve IL-6 düzeylerinde kontrol grubundan farklı olmayan minimal yükselme saptanmıştır. Bu sonuç ozonun organizma için sitokinler üzerinden zararlı bir etki oluşturmadığını da göstermektedir.

RA sinovyal inflamasyonla karakterize, kemik ve kıkırdakta destrüksiyona yol açan otoimmün bir hastalıktır (30). Hastalığın



Resim 1. Üç nokta bükme testi için kullanılan Zwick-Roell cihazı

Tablo 1. Grupların pençe çapı değişim oranları (%)

	Tedavi öncesi (%)	Tedavi sonrası (%)
Kontrol	0,2±0,6	2,5±1,8
O ₃	0,2±0,6**	4,1±2,0**
FCAA	35,7±8,9*	29,4±10,4*
FCAA-O ₃	35,2±6,5*,b	9,6±9,1#,a

*<0,001, #<0,05, **>0,05; kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, a<0,001, b>0,05; FCAA grubu ile karşılaştırıldığında, FCAA: Freud's complete adjuvan artrit, O₃: Ozon

Tablo 2. Kemik dayanıklılık parametrelerindeki değişiklikler (Fmax; maksimum kuvvet, Imax; atalet momenti)

	Kontrol (n=7)	O ₃ (n=7)	FCAA (n=7)	FCAA-O ₃ (n=7)
Fmax	101,7±8,8	91,4±16,9**	86,3±11,6*	97,1±6,6**,b
Imax	6,7±1,6	5,3±0,5**	5,6±1,5**	7,1±1,5**,b
Dayanım	118±13,0	131,7±15,9**	127,3±13,7**	111,8±19,3**,b
Katılık	116,6±28,6	116±33,6**	128,4±38,2**	112,9±23,2**,b

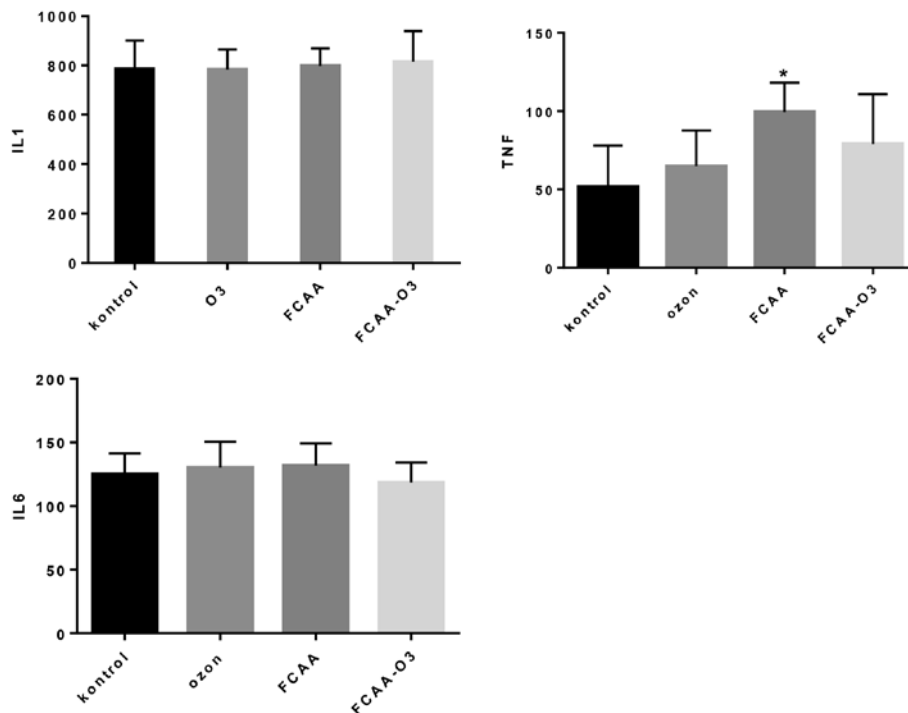
*<0,05, **>0,05; kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, a<0,001, b>0,05; FCAA grubu ile karşılaştırıldığında, FCAA: Freud's complete adjuvan artrit, O₃: Ozon

etiolojisi kesin olarak bilinmemekle birlikte hücrel ve humoral immünitadaki birtakım bozukluklara bağlı olarak ortaya çıktığı düşünülmektedir. Özellikle T lenfositler, makrofajlar ve proliferatif sinovyal hücrelerden üretilen IL-1, IL-6 ve TNF- α gibi proinflatuvar sitokinlerin hastalığın başlaması ve ilerlemesinden sorumlu olduğu gösterilmiştir (1,31,32). Bunlar arasında TNF- α 'nın etkisinin diğer sitokinlerden 2-7 kat daha fazla olduğu ve RA'lı hastaların %50'sinin sinovyal doku ve serumunda TNF- α artışı olduğu gösterilmiştir (14,33). RA hayvan modeli olarak kabul edilen FCAA'da inflamasyonun ortaya çıkmasında sitokinlerin rol oynadığı pek çok çalışma ile gösterilmiştir (34-36). Chen ve ark. (14) bu modelin ortaya çıkmasında özellikle TNF- α 'nın önemli olduğunu belirtmişlerdir. TNF- α , siklooksijenaz ve eikozoidlerin ana üreticisi olarak gösterilmiştir ve bu, inflamasyonda önemli rol oynayan prostaglandin E'lerde artışa yol açar (37). Bu çalışmada da FCA artritli grupta serum TNF- α düzeylerinde belirgin yükseklik saptandı. Bu sonuç FCAA'nın oluşmasından sorumlu temel sitokinin TNF- α olduğunu desteklemektedir.

RA'da ozonun etkinlik ve güvenilirliği çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (13-16). Akut artrit tedavisinde en etkin ve güvenilir doz 40 μ g/mL olarak belirlenmiştir (23). Bu çalışmada da 40 μ g/mL ozonun artrit semptomlarını iyileştirdiği ve herhangi bir advers etkiye yol açmadığı görülmüştür. Çalışmamızda aynı zamanda FCAA'lı sıçanlarda serum TNF- α düzeyinin yükseldiği ve ozon uygulaması (40 μ g/ml) sonrasında TNF- α seviyelerinin kontrol grubundaki düzeylere düştüğü gösterilmiştir. Vaillant ve ark. (13) adjuvan uygulamasından itibaren 10 gün boyunca

uygulanan 20 μ g/mL ozon ile serum TNF- α düzeylerinin bizim çalışmamızda olduğu gibi, kontrol grubuna benzer seviyelerine indiğini gözlemişlerdir. Chen ve ark. (14) ise ozon tedavisi sonrasında serum TNF- α düzeylerinde değişiklik olmadığını, ancak intraartiküler TNF- α düzeylerinin azaldığını saptamışlar. Sonucun bizim çalışmadan farklı olması bu çalışmada ozonun intraartiküler olarak uygulanmasından kaynaklanıyor olabilir. Patogenezinde sitokinlerin rol oynadığı bilinen, RA dışındaki bazı hastalıklarda da sistemik yolla uygulanan ozonun serum TNF- α düzeylerini düşürdüğü gösterilmiştir (38,39). Ozonun artritteki etkisini sadece sitokinler üzerinden göstermediği, aynı zamanda antioksidanların, çeşitli büyüme faktörlerinin (trombosit türevli büyüme faktörü- α , transforme edici büyüme faktörü- β gibi) ve otokoidlerin salınımını artırdığı, dokuların dolaşımını ve oksijen kullanımını düzenlediği ve trofik süreci iyileştirdiği de düşünülmektedir (12,40). Bunun yanı sıra ozonun nöro-endokrin aksı stimüle ederek tedavi süresince hastanın kendisini daha iyi hissetmesini sağladığı da gösterilmiştir (40).

RA'da periartiküler ve sistemik osteoporoz normal popülasyondan daha fazladır (30). FCAA'nın RA'ya bağlı osteoporozu belirlemede uygun bir model olduğu önceki çalışmalarla gösterilmiştir (30,40-42). Bu çalışmada FCAA grubunun Fmax değerlerinin kontrol grubuna göre belirgin düşük olduğu, Imax değerlerinde ise düşme eğilimi olduğu gözlenmiştir. Bu sonuçlar RA hayvan modelimizde kemik dayanıklılığının azalmaya başladığının bir göstergesidir. FCA uygulaması sonrasında kemik kaybının ne kadar sürede başlayacağına dair farklı görüşler vardır. Hanyu ve ark. (43)



Şekil 2. Serum TNF- α , IL-1 ve IL-6 düzeyleri (ng/ml)

TNF: Tümör nekroz faktör, IL: İnterlökin, FCAA: Freud's complete adjuvan aritri, O₃: Ozon

14. günden itibaren kemik kaybının başladığını belirtirken, Wu ve ark. (30) ise adjuvan uygulaması sonrasında en az 28 gün geçmesi gerektiğini belirtmiş ve bu nedenle incelemelerin 30. günden sonra yapılmasını önermişlerdir. Bu verilere dayanarak çalışmamızda kemik dayanıklılığı FCA uygulamasından sonraki 6. haftada değerlendirilmiştir. Ancak Enokida ve ark. (44) adjuvana bağlı artritte ilk 8 haftada sadece periartiküler kemik kaybının oluştuğunu, sistemik kaybın ise hastalığın ileri evrelerinde ortaya çıktığını saptamışlar. Hastalık ilerledikçe kaybın da giderek arttığı belirtilmiştir (30). Çalışmamızda Fmax değerlerinin belirgin etkilenmesi kemik kaybının başladığının bir göstergesidir ancak diğer parametrelerde anlamlı değişikliklerin oluşmaması modelin tam yerleşmemesinden kaynaklanmış olabilir. Ancak bu çalışma ile ozonun kemik dayanıklılığını olumsuz etkilemediği de görülmüştür.

Bu çalışmada FCAA'lı sıçanların kemik dayanıklılık parametrelerinde ozon tedavisi sonrasında anlamlı bir iyileşme saptanmamıştır. RA'ya bağlı kemik kaybında makrofajlardan üretilen sitokinler olan TNF- α , IL-6 ve IL-1 önemli rol oynamaktadır (45,46). Polzer ve ark.'na (47) göre ise primer sorumlu sitokin TNF- α 'dır. Bu proinflatuvar sitokinlerin osteoblast matürasyonunu inhibe ettiği, osteoklast farklılaşmasını ve aktivitesini artırdığı gösterilmiştir. Böylelikle osteoblast ve osteoklastlar arasındaki denge bozulurken kemik kalitesinde bozulmaya yol açmaktadır (30,46). Gerek bu, gerekse önceki çalışmalarda ozon uygulamasının özellikle serum TNF- α düzeylerini olumlu etkilediği gösterilmiştir (13,14,38,39). TNF- α kemik kaybında önemli rol oynadığı için ozonun kemik dayanıklılığı üzerine etkili olması beklenmektedir. Bu çalışma ozonun kemik dayanıklılığı üzerine etkinliğinin değerlendirildiği ilk çalışmadır. Mevcut kırıklara ya da kemik greterine ozonun uygulandığı önceki çalışmalarda bu bölgelerde yeni kemik oluşumunu arttırdığı gösterilmiştir (26,48,49). Agrillo ve ark. (50) bifosfonata bağlı osteonekrozda ozonun etkinliğini göstermiştir. Çalışmamızda ozonun kemik dayanıklılığına etkisiz bulunması osteoporoz modelimizin tam yerleşmemesinden kaynaklanabileceği gibi, ozonun bu uygulama doz ve süresinin yeterli olmamasından da kaynaklanabilir. Bu nedenle daha uzun süreli ve farklı ozon dozlarının da değerlendirildiği yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.

Sonuç

Bu çalışmada RA hayvan modelinde kemik dayanıklılığı üzerine ozonun etkinliği gösterilememiş olmasına rağmen, TNF- α düzeylerini azalttığı ve semptomlarda düzelme sağladığı görülmüştür. Günümüzde TNF- α inhibitörlerinin de içinde bulunduğu biyolojik ajanlarla tedavide hastalığın iyileştiği ve erozyonların önlenildiği gösterilmiştir (51). Bu nedenle ozon TNF- α düzeylerini düşürerek medikal tedavilere destek sağlayabilir.

Teşekkür

Bu çalışmaya verdikleri desteklerden dolayı Prof. Dr. Erkut Kara, Prof. Dr. Hüseyin Nazlıkul ve Dr. Rasime İvgin'e teşekkür ederiz.

Etik

Etik Kurul Onayı: Adnan Menderes Üniversitesi Hayvan Etik Komitesi'nden onay alındı (HADYEK; 64583101/2014/084). Hakem Değerlendirmesi: Editörler kurulu tarafından değerlendirilmiştir.

Yazarlık Katkıları

Cerrahi ve Medikal Uygulama: Gülnur Taşçı Bozbaş, Buket Demirci, Konsept: Gülnur Taşçı Bozbaş, Gülcan Gürer, Dizayn: Gülnur Taşçı Bozbaş, Buket Demirci, Veri Toplama veya İşleme: Gülnur Taşçı Bozbaş, Figen Sevil Kilimci, Mustafa Yılmaz, Analiz veya Yorumlama: Gülnur Taşçı Bozbaş, Gülcan Gürer, Literatür Arama: Gülnur Taşçı Bozbaş, Yazan: Gülnur Taşçı Bozbaş. Çıkar Çatışması: Yazarlar tarafından çıkar çatışması bildirilmemiştir.

Finansal Destek: Çalışma Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından desteklenmiştir [ADU Research Funding (TPF-15047)].

Kaynaklar

1. Firestein GS. Etiology and pathogenesis of rheumatoid arthritis. In: Ruddy S, Harris ED, Sledge CB, Kelley WN, editors. Kelley's Textbook of Rheumatology. 7th ed. Philadelphia, PA: WB. Saunders; 2005:996-1042.
2. Akiyama T, Mori S, Mashiba T, Miyamoto K, Komatsubara S, Cao Y, et al. Incadronate disodium inhibits joint destruction and periarticular bone loss only in the early phase of rat adjuvant-induced arthritis. J Bone Miner Metab 2005;23:295-301.
3. van Staa TP, Geusens P, Bijlsma JW, Leufkens HG, Cooper C. Clinical assessment of the long-term risk of fracture in patients with rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 2006;54:3104-12.
4. Ørstavik RE, Haugeberg G, Mowinckel P, Høiseith A, Uhlig T, Falch JA, et al. Vertebral deformities in rheumatoid arthritis: a comparison with population based controls. Arch Int Med 2004;164:420-5.
5. Gough AK, Lilley J, Eyre S, Holder RL, Emery P. Generalised bone loss in patients with early rheumatoid arthritis. Lancet 1994;344:23-7.
6. Hernandez CJ, Keaveny TM. A biomechanical perspective on bone quality. Bone 2006;39:1173-81.
7. Demirci B, Uysal A, Ulker Goksel S. Alterations in the vascular reactivity of aorta in the early and late phase of adjuvant-induced arthritis in rat. Vascular Disease Prevention 2007;4:11-9.
8. Snehalatha U, Anburajan M, Venkatraman B, Menaka M. Evaluation of complete Freund's adjuvant-induced arthritis in a Wistar rat model. Comparison of thermography and histopathology. Z Rheumatol 2013;72:375-82.
9. Enokida M, Yamasaki D, Okano T, Hagino H, Morio Y, Teshima R. Bone mass changes of tibial and vertebral bones in young and adult rats with collagen-induced arthritis. Bone 2001;28:87-93.
10. Suzuki Y, Tanihara M, Ichikawa Y, Osanai A, Nakagawa M, Ide M, et al. Periarticular osteopenia in adjuvant induced arthritis: role of interleukin-1 in decreased osteogenic and increased resorptive potential of bone marrow cells. Ann Rheum Dis 1995;54:484-90.
11. Bonnet J, Zerath E, Picard N, Lesur C, Mattio A, Tordjman C, et al. Bone morphometric changes in adjuvant-induced polyarthritic osteopenia in rats: evidence for an early bone formation defect. J Bone Miner Res 1993;8:659-68.
12. Bocci VA. Scientific and medical aspects of ozone therapy. State of the art. Arch Med Res 2006;37:425-35.
13. Vaillant JD, Fraga A, Diaz MT, Mallok A, Viebahn-Hänsler R, Fahmy Z, et al. Ozone oxidative postconditioning ameliorates joint damage and decreases proinflammatory cytokine levels and oxidative stress in PG/PS-induced arthritis in rats. Eur J Pharmacol 2013;15:318-24.

14. Chen H, Yu B, Lu C, Lin Q. The effect of intra-articular injection of different concentrations of ozone on the level of TNF- α , TNF-R1, and TNF-R2 in rats with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* 2013;33:1223-7.
15. Chang JD, Lu HS, Chang YF, Wang D. Ameliorative effect of ozone on cytokine production in mice injected with human rheumatoid arthritis synovial fibroblast cells. *Rheumatol Int* 2005;26:142-51.
16. Olivieri O, Girelli D, Trevisan MT, Bassi A, Zorzan P, Bambara LM, et al. Red blood cell susceptibility to lipid peroxidation, membrane lipid composition and antioxidant enzymes in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1991;18:1263-4.
17. Seferos N, Pantopoulou A, Kotsiou A, Rallis G, Tesseromatis C. The influence of simvastatin in rats mandible and femur bone mass under Freund's adjuvant arthritis. *Stomatologija* 2012;14:46-52.
18. Andersson A, Bernardi AI, Nurkkala-Karlsson M, Stubelius A, Grahemo L, Ohlsson C, et al. Suppression of experimental arthritis and associated bone loss by a tissue-selective estrogen complex. *Endocrinology* 2016;157:1013-20.
19. Turner CH, Burr DB. Basic biomechanical measurements of bone: a tutorial. *Bone* 1993;14:595-608.
20. An YH, Draughon RA. Mechanical Properties and Testing Method of Bone. In: An YH, Friedman RJ, editors. *Animal models in orthopaedic research*. Boca Raton: CRC Press;1999. p. 139-68.
21. Saffar KPA, Pour NJ, Rajaai SM. How does the bone shaft geometry affect its bending properties? *Am J Applied Sci* 2009;6:463-70.
22. Sevil F, Kara ME. The effects of ovariectomy on bone mineral density, geometrical, and biomechanical characteristics in the rabbit femur. *Vet Comp Orthop Traumatol* 2010;23:31-6.
23. Hirano T, Burr DB, Turner CH, Sato M, Cain RL, Hock JM. Anabolic effects of human biosynthetic parathyroid hormone fragment (1-34), LY333334, on remodeling and mechanical properties of cortical bone in rabbits. *J Bone Miner Res* 1999;14:536-45.
24. Wolff HH. Die Behandlung peripherer Durchblutungsstörungen mit Ozon. *Erfahr Hk* 1974;23:181-4.
25. Nabil Mawsouf M, Maha El-Sawalhi M, Martínez-Sánchez G, Hebatalla Darwish A, Amira Shaheen A. Effect of ozone therapy on redox status in experimentally induced arthritis. *Revista Española de Ozonoterapia* 2011;1:32-43.
26. Buyuk SK, Ramoglu SI, Sonmez MF. The effect of different concentrations of topical ozone administration on bone formation in orthopedically expanded suture in rats. *Eur J Orthod* 2016;38:281-5.
27. Smith-Garvin JE, Koretzky GA, Jordan MS. T cell activation. *Annu Rev Immunol* 2009;27:591-619.
28. Sagai M, Bocci V. Mechanisms of action involved in ozone therapy: is healing induced via a mild oxidative stress? *Med Gas Res* 2011;1:29.
29. Bocci V. *Ozone A new medical drug*. Dordrecht, The Netherlands: Springer Publ; 2011.
30. Wu Q, Xiong X, Zhang X, Lu J, Zhang X, Chen W, et al. Secondary osteoporosis in collagen-induced arthritis rats. *J Bone Miner Metab* 2015 Jul 26. Epub ahead of print.
31. Pasi S, Kant R, Gupta S, Suroli A. Novel multimeric IL-1 receptor antagonist for the treatment of rheumatoid arthritis. *Biomaterials* 2015;42:121-33.
32. Hong S, Kim EJ, Lee EJ, San Koo B, Min Ahn S, Bae SH, et al. TNF- α confers resistance to Fas-mediated apoptosis in rheumatoid arthritis through the induction of soluble Fas. *Life Sci* 2015;122:37-41.
33. Nanes MS. Tumour necrosis factor- α : molecular and cellular mechanisms in skeletal pathology. *Gene* 2003;321:1-15.
34. Azuma Y, Kaji K, Katogi R, Takeshita S, Kudo A. Tumour necrosis factor- α induces differentiation of and bone resorption by osteoclasts. *J Biol Chem* 2000;18:4858-64.
35. Fujimoto M, Hayashida K, Ochi T, Owaki H, Shimaoka Y, Okamura M, et al. Fluctuation of interleukin-1 and -6 activity in bone marrow serum in collagen-induced arthritis in rats. *Biomed Res* 1992;13:243-51.
36. Kobayashi K, Takahashi N, Jimi E, Udagawa N, Takami M, Kotake S, et al. Tumour necrosis factor- α stimulates osteoclast differentiation by a mechanism independent of the ODF/RANKL-RANK interaction. *J Exp Med* 2000;17:275-86.
37. Heirman I, Ginneberge D, Brigelius-Flohe R, Hendrickx N, Agostinis P, Brouckaert P, et al. Blocking tumour cell eicosanoid synthesis by GP x 4 impedes tumour growth and malignancy. *Free Radic Biol Med* 2006;40:285-94.
38. Cho H, Morgan DL, Bauer AK, Kleeberger SR. Signal transduction pathways of tumour necrosis factor-mediated lung injury induced by ozone in mice. *Am J Resp Crit Care* 2007;175:829-39.
39. Fakhzadeh L, Laskin JD, Laskin DL. Ozone-induced production of nitric oxide and TNF- α and tissue injury are dependent on NF- κ B p50. *AM J Physiol-Lung Cell Mol Physiol* 2004;287:279-85.
40. Bocci V, Zanardia I, Valacchi G, Borrelli E, Travagli V. Validity of oxygen-ozone therapy as integrated medication form in chronic inflammatory diseases. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets* 2015;15:127-38.
41. Alves CH, Farrell E, Vis M, Colin EM, Lubberts E. Animal models of bone loss in inflammatory arthritis: from cytokines in the bench to novel treatments for bone loss in the bedside-a comprehensive review. *Clin Rev Allergy Immunol* 2015 Dec 3. Epub ahead of print.
42. Geboes L, De Klerck B, Van Balen M, Kelchtermans H, Mitera T, Boon L, et al. Freund's complete adjuvant induces arthritis in mice lacking a functional interferon-gamma receptor by triggering tumour necrosis factor- α -driven osteoclastogenesis. *Arthritis Rheum* 2007;56:2595-607.
43. Hanyu T, Chotanaphuti T, Arai K, Tanaka T, Takahashi HE. Histomorphometric assessment of bone changes in rats with type II collagen-induced arthritis. *Bone* 1999;24:485-90.
44. Enokida M, Yamasaki D, Okano T, Hagino H, Morio Y, Teshima R. Bone mass changes of tibial and vertebral bones in young and adult rats with collagen-induced arthritis. *Bone* 2001;28:87-93.
45. Jochems C, Islander U, Erlandsson M, Verdrengh M, Ohlsson C, Carlsten H. Osteoporosis in experimental postmenopausal polyarthritis: the relative contributions of estrogen deficiency and inflammation. *Arthritis Res Ther* 2005;7:837-43.
46. Baum R, Gravalles EM. Impact of inflammation on the osteoblast in rheumatic diseases. *Curr Osteoporos Rep* 2014;12:9-16.
47. Polzer K, Joosten L, Gasser J, Distler JH, Ruiz G, Baum W, et al. Interleukin-1 is essential for systemic inflammatory bone loss. *Ann Rheum Dis* 2010;69:284-90.
48. Alan H, Vardi N, Özgür C, Acar AH, Yolcu Ü, Doğan DO. Comparison of the effects of low-level laser therapy and ozone therapy on bone healing. *J Craniofac Surg* 2015;26:396-400.
49. Kazancioglu HO, Ezirganli S, Aydin MS. Effects of laser and ozone therapies on bone healing in the calvarial defects. *J Craniofac Surg* 2013;24:2141-6.
50. Agrillo AM, Ungari C, Filiaci F, Priore P, Iannetti G. Ozone therapy in the treatment of avascular bisphosphonate-related jaw osteonecrosis. *J Craniofac Surg* 2007;18:1071-5.
51. Zampeli E, Vlachoyiannopoulos PG, Tzioufas AG. Treatment of rheumatoid arthritis: Unraveling the conundrum. *J Autoimmun* 2015;65:1-18.