

Ozon tedavisinin sıçan akut kas strain modelindeki etkinliği

Mehmet Murat Seven (*), Yavuz Yıldız (*), Turgut Topal (**), Ahmet Korkmaz (**), Ömer Aykutluğ (**), Türker Türker (***), Emin Özgür Akgül (****), Tevfik Honça (****), Nuri Yiğit (*****), Yıldırım Karslıoğlu (*****), Enis Macit (*****),

ÖZET

Kas dokusu hasarına yol açan spor yaralanmalarının %90'ı strain tipi zedelenmelerdir. Çalışmamızda; deneysel olarak sıçanlarda oluşturulan strain modelinde ozonun etkinliğinin araştırılması ve diklofenakın etkinliği ile karşılaştırılması amaçlanmıştır. Çalışmamız 200-250 gram ağırlığında 72 adet Sprague-Dawley türü erkek sıçan üzerinde gerçekleştirildi. Sıçanlar basit rastgele örnekleme yöntemiyle, strain yapılmadan ozon uygulanan, yalnızca strain, strain oluşturulup ozon uygulanan ve strain oluşturulup diklofenak uygulanan 4 ana gruba ayrıldı. Strain modelinde, anestezi altındaki her deneğin arka bacaklarından birine, tibialis anterior kasına germe kuvveti uygulanacak şekilde, deneğin vücut ağırlığının 1,5 katı ağırlık asıldı. İşlem, arasında 3 dakika dinlendirme periyodu olan 20'er dakikalık ardışık iki epizod halinde uygulandı. Uygulama sonrası, her gruptan 6'şar denek, sırasıyla 6ncı, 12nci ve 72nci saatlerde sakrifiye edilerek, biyokimyasal ve histolojik değişiklikler yönünden değerlendirildi. Bulgularımız, strain modelinin kas enzimlerinde belirgin bir artışa neden olduğunu göstermiştir. Enzimlerdeki artış, diklofenak ve ozon gruplarında daha az belirgindi. Sadece ozon grubunda ise, kas dokusu hasarına ait herhangi bir enzim seviyesi ve/veya histolojik değişikliğe rastlanmadı. Çalışma verilerimiz, hasarlı kas dokusu üzerinde ozonun, diklofenak ile benzer hatta bazı deneklerde daha iyi töröpötik sonuçlara sahip olduğuna işaret etmektedir. Araştırmamız ozonun strain hasarının yayılımını hafifletebileceğini ve klinik pratikte kullanılabilecek bir potansiyele sahip olduğunu göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Sıçan, Kas, Strain Hasarı, Ozon Tedavisi, Diklofenak.

SUMMARY

Efficacy of ozone therapy on acute muscle strain model of rat

Strain type injuries constitute about 90% of all sports injuries characterized by muscle tissue damage. We aimed to investigate the efficiency of ozone on strain injury on rats and to compare with effects of diclofenac. A total of 72 male Sprague-Dawley rats, weighing 200-250 gram were used in our study. All subjects were clustered into four main groups, as follows: ozone group, strain group, strain+ozone, strain+diclofenac. In strain model, a load of 1,5 times of subject's body weight was suspended to one of the hind legs of the anesthetized rat to overstretch the tibialis anterior muscle. The procedure repeated twice for 20 minutes episodes. The subjects were then sacrificed to see the biochemical and histological changes at end of the 6th, 12th, 72nd hours. Our findings showed that strain caused marked increase of muscle enzymes and the increases were less prominent in the diclofenac and ozone groups. We didn't notice enzyme and/or histological changes on muscle in the ozone group. Our data suggest that ozone have similar and sometimes even better therapeutic results to diclofenac on muscle tissue. We think that ozone might alleviate the extent of injury due to strain, like NSAID and could have a potential to be used in the clinical practice.

Keywords: Rat, Muscle, Strain injury, Ozone therapy, Diklofenak.

Giriş

Kas, kemik, tendon, ligament, eklem ve fasyayı içeren loko-motor sistem yapıları, vücut postürünün devamında, yürüme, koşma, durma ve hızlanmayı da içeren her türlü hareketin ve sportif aktivitenin yapılmasında anahtar rol oynar. Bu hareketler ve sportif aktiviteler sırasında, lokomotor sistemin anatomik özelliklerini ve biyomekanik sınırlarını zorlayan yüklenmeler olur. Kasın fizyolojik gerim sınırlarını zorlayan bu yüklenmeler sıklıkla kas strainine yol açar. Kas strainleri, hemen her zaman; anlık büyük güç üretimi gerektiren, sıçrama, hızlanma ve/veya herhangi bir dirence karşı kuvvet uygulamayı içeren aktiviteler sırasında oluşur. Kas kontüzyonları ise direk mekanik kuvvet etkisi ile oluşur ve daha az oranda görülür. Kas yaralanmaları günlük spor hekimliği pratiğinde, rekreasyonel, amatör ve profesyonel sporcularda en sık görülen spor yaralanmalarıdır. Tüm spor yaralanmalarının %10-55'ini kas-iskelet sistemi yaralanmaları; bu yaralanmalarının ise %90'dan fazlasını kas straini ve daha az oranda da kas kontüzyonları oluşturur (1,2).

Strain yaralanmasının anatomik lokalizasyonuna, derecesine ve yol açtığı kas fonksiyon kaybına göre; tedavide sıklıkla koruma, istirahat, buz, kompresyon, elevasyon ve destekten oluşan PRICE prensibi, ilaç tedavisi, fizik tedavi modaliteleri, lokal enjeksiyon tedavileri ve rehabilitasyon programı uygulanmaktadır (3). Bazı durumlarda; kas yaralanmasının tedavisinde bu tedavi yaklaşımları başarısız olmakta ve yeni tedavi modaliteleri gündeme gelmektedir. Son yıllarda, kas yaralanmalarının tedavisinde platelet zengin plazma, nöral terapi, proloterapi ve tedavisinin pratik uygulamaları yaygınlaşmıştır

NSAİ (Non-steroid antiinflamatuvar) ilaçlar spor hekimliği pratiğinde ve kas yaralanmalarının tedavisinde sıklıkla kullanılmaktadır. NSAİ ilaçların, iyileşmenin erken fazında inflamatuvar hücre reaksiyonunu azalttığı; kasın iyileşme sürecini, gerim kuvvetini ve kontraksiyon yeteneğini etkilemediği gösterilmiştir (4). Ancak uzun dönem kullanımlarında kas rejenerasyonunu olumsuz yönde etkilediği ve aktive olan satellit hücrelerinin ve miyotübüllerin proliferasyonunu bozduğu ortaya konmuştur (5). Bunun için; NSAİ ilaçların kas yaralanmasının erken fazında kullanılması önerilmektedir. NSAİ ilaçların kısa süreli kullanımı çoğu zaman yeterli klinik iyileşme sağlamamakta (6) ve hekimleri başka tedavi yöntemlerini denemeye zorlamaktadır.

Ozon molekülü (O₃) üç adet oksijen atomundan meydana gelir ve bilinen en güçlü oksidan maddedir. Doğada, ultraviyole (UV) ışınlarının etkisi ile ozon-oksijen döngüsü oluşmaktadır.

* GATA Spor Hekimliği AD.

** GATA Fizyoloji AD.

*** GATA Halk Sağlığı AD.

**** GATA Biyokimya AD.

***** GATA Patoloji AD.

***** GATA Toksikoloji BD.

Ayrı Basım İsteği: Mehmet Murat Seven
GATA Spor Hekimliği AD.
e-mail: mmuratseven@gata.edu.tr

Makalenin Geliş Tarihi: Dec 21, 2015 • Kabul Tarihi: Feb 03, 2016 • Çevrim İçi Basım Tarihi: 18 Mart 2016

Tedavide kullanılan ozon gazı ise, ozon jeneratörlerinde oksijen atomları üzerine uygulanan kuvvetli elektriksel etki ile elde edilir. Ozon gazı; uygulandığı alanda bulunan biyomoleküllerle reaksiyona girerek reaktif oksijen türevleri (ROT) ve lipid oksidasyon ürünlerinin (LOÜ) oluşmasına yol açar. Oksidatif stres kapasitesi oldukça yüksek olan bu ürünler vücudun antioksidatif kapasitesini artırır ve hücresel düzeyde fizyolojik değişikliklere yol açarak tedavi etkinliğini gösterir (7). Yine ROT ve LOÜ'nin, hasarlanmış dokudaki proinflatuar mikroçevreyi modüle ederek doku tamiri sürecine katkıda bulunduğu ileri sürülmektedir (8) .

Araştırmamızın amacı, sistemik ozon uygulamasının normal ve sağlıklı kas hücresi ve kas dokusu üzerindeki yan etkisinin araştırılması, sistemik ozon uygulamasının akut kas strain yaralanmalarında tedavi edici etkinliğinin değerlendirilmesi ve diklofenak tedavi etkinliğiyle karşılaştırılmasıdır.

Gereç ve Yöntem

Denekler ve Gruplar: Araştırmamız, GATA Komutanlığı Hayvan Deneyleri Etik Kurulu'nun, 22 Mayıs 2015 tarih ve 15/54 karar numaralı toplantı kararı ile onaylanmıştır. Çalışmamızda 200-250 g ağırlığındaki, toplam 72 adet Sprague-Dawley türü erkek sıçan kullanıldı. Sıçanlar basit rastgele örnekleme yöntemiyle aşağıda belirtilen 12 gruba ayrıldı:

- 1) Ozon grubu 6ncı saat (Ozon 6)
- 2) Ozon grubu 12nci saat (Ozon 12)
- 3) Ozon grubu 72nci saat (Ozon 72)
- 4) Strain grubu 6ncı saat (Strain 6)
- 5) Strain grubu 12nci saat (Strain 12)
- 6) Strain grubu 72nci saat (Strain 72)
- 7) Strain + Sistemik Ozon 6ncı saat (Strain+Ozon 6)
- 8) Strain + Sistemik Ozon 12nci saat (Strain+Ozon 12)
- 9) Strain + Sistemik Ozon 72nci saat (Strain+Ozon 72)
- 10) Strain + Diklofenak 6ncı saat (Strain+Diklofenak 6)
- 11) Strain + Diklofenak 12nci saat (Strain+Diklofenak 12)
- 12) Strain + Diklofenak 72nci saat (Strain+Diklofenak 72)

Sıçanlar, GATA - Araştırma ve Geliştirme Merkezi - Deney Hayvanları Bölümünden temin edilerek çalışma süresince aynı laboratuvar koşullarında tutuldu. Çalışmaya başlamadan önce 7 gün süreyle aklimatize edilen sıçanlar, 23-25 °C sıcaklıktaki ortamda tutularak, ticari sıçan yemi ve normal musluk suyuyla beslendi.

Modelin Oluşturulması: Strain modelinin neden olduğu klinik patolojiyi simüle etmek amacıyla Carvalho ve ark.'nın tarif ettiği "kas strain modeli" kullanıldı (9). Bu model ile strain oluşturulacak sıçanlara ilk olarak 45 mg/kg ketamin + 5 mg/kg ksilazin anestezi uygulandı. Daha sonra hazırlanan özel düzeneğe yardımıyla her bir sıçan ağırlığının 1,5 katı olacak şekilde sağ ayak bileklerine ağırlıklar bağlandı. Ağırlıklar bağlanıp serbest olarak sarkıtıldıktan sonra 20 dk süreyle beklendi. Bu sürenin sonunda 3 dk süreyle ağırlık uygulamasına ara ver-

ilerek bacak dinlenmeye alındı, sonrasında bir kez daha 20 dk süreyle ağırlık uygulamasına devam edilerek süre bitiminde sıçanlar düzenekten ayrılarak dinlenmeye alındı. Uygulamayı takiben uygun bir süre gözlem altında tutularak 15 dk sonra ilk tedavileri verilen sıçanlar kafeslerine alındı.

Tedaviler: Deney grubu ratlara her gruba farklı olmak üzere ozon ve/veya diklofenak tedavileri uygulandı. Ozon tedavisi uygulanacak gruplara ozon jeneratöründen (OZONOSAN, photonik 1014, Hansler GmbH, Nordring&Iffezheim, Germany) alınan ozon/oksijen karışımı intraperitoneal yolla 0,7 mg/kg uygulandı. Diklofenak tedavisi uygulanacak gruplara ise piyasadan temin edilen ampul formundaki diklofenak sodyum intraperitoneal yolla 0,1 mg/kg/gün olarak verildi. Tedavi gruplarında strain oluşturulmasından 15 dk sonra ilk dozlar uygulandı.

Doku ve Kan Örneklerinin Toplanması: Her bir grup için farklı olarak 6ncı, 12nci ve 72nci saatin sonunda sıçanlara ketamin (100 mg/kg) + ksilazin (5 mg/kg) anestezi uygulandı. Cerrahi yolla torasik kavite, sternum altından koltuk altına kadar açıldı. Toraksın açılarak ortaya konmasından sonra 10 cc'lik enjektör yardımıyla sağ atriumdan kan alındı. Kan örnekleri serum kreatin kinaz (CPK), aspartat amino transferaz (AST) ve laktat dehidrogenaz (LDH) değerlendirilmesi yapmak üzere kırmızı kapaklı rutin biyokimya tüpüne konarak taze örneklerde hemen ölçümler yapıldı. Sağ uyluk ve bacak, femur başına yakın bölgeden cerrahi makasla diseke edilerek çıkarıldı. Serum fizyolojik yıkandıktan sonra histopatolojik değerlendirme amacıyla %10'luk formaldehit içerisinde konuldu.

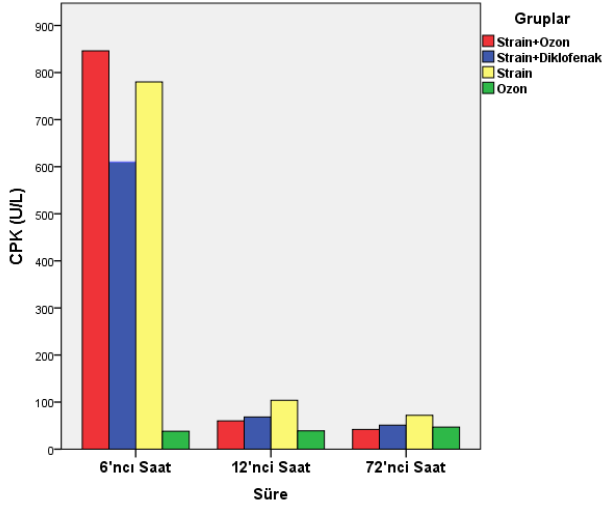
Histolojik ve Biyokimyasal Analizler: Hemotoksilen eozin (H&E) boyalı kas kesitleri başlıca ödem, inflamasyon ve nekroz durumları göz önüne alınarak ışık mikroskopunda aynı patolog tarafından değerlendirildi. Alınan kanlar santrifüj edilerek serumları çalışma için ayrıldı. Serum örneklerinden Olympus AU 2700 oto analizöründe (Beckman-CoulterInc, Fullerton, CA, ABD) Beckman Coulter ticari kitleri (Beckman-CoulterInc, Fullerton, CA, ABD) kullanılarak serum CPK, AST ve LDH enzim aktivitelerinin kantitatif tayinleri gerçekleştirildi. LDH ve AST ölçümleri 340 nm dalga boyunda, CPK ölçümleri ise 340/660 nm dalga boylarındaki absorbansdaki değişikliklerine göre yapıldı.

İstatistiksel Analizler: Verilerin tanımlanmasında ortalama±standart sapma, ortanca, minimum ve maksimum değerleri kullanıldı. Çoklu grup karşılaştırmalarında Kruskal-Wallis testi, posthoc test olarak Bonferroni düzeltmeli Mann-Whitney U testi kullanıldı. İstatistiksel olarak p<0,05 olması durumunda karşılaştırma sonucu anlamlı olarak kabul edildi. Tüm analizler SPSS 15.0 paket programı kullanılarak yapıldı.

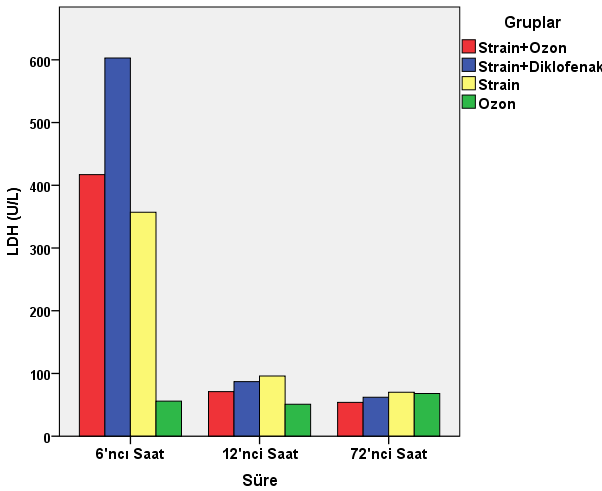
Bulgular

Biyokimyasal Bulgular: Ozon 6 grubuna ait CPK, LDH ve AST düzeyleri öngörüldüğü gibi normal sınırlarda saptanmıştır. 6ncı saate ait en yüksek CPK düzeylerini Strain+Ozon 6 grubunda saptanmıştır. Bu durum strain oluşturulmuş bölgede ozonun uygulanma sonrası ilk etkisi olarak, oksidatif stres enzimlerini, lipid oksidasyon ürünlerini ve reaktif oksijen türevlerini açığa çıkarmasıyla açıklanabilir. 6'ncı saate ait en yük-

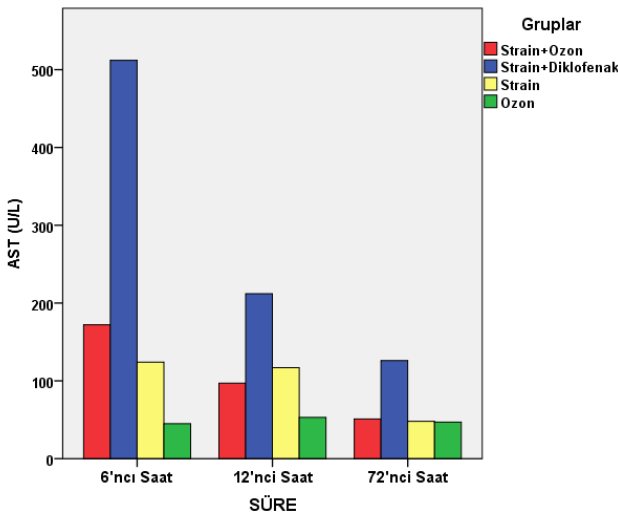
sek AST ve LDH düzeylerini ise Strain+Diklofenak 6 grubunda saptadık. Bu durum diklofenakin karaciğer ve kas üzerine olan etkisine bağlı olduğu değerlendirilmektedir (Tablo I) (Şekil 1,2,3).



Şekil 1. Grupların CPK yönünden karşılaştırılması



Şekil 2. Grupların LDH yönünden karşılaştırılması



Şekil 3. Grupların AST yönünden karşılaştırılması

Tablo I. Gruplara ait CPK, LDH ve AST enzim değerleri.

GRUP	Değerler	CPK (U/L)	LDH (U/L)	AST (U/L)
Ozon 6 grubu (n=6)	Ortalama	38,8	56,5	45,2
	Ortanca	37,5	57,0	45,0
	Standart Sapma	3,8	5,5	2,3
	Minimum	34,0	49,0	42,0
	Maksimum	43,0	63,0	48,0
Strain 6 grubu (n=6)	Ortalama	780,5	357,2	124,5
	Ortanca	770,0	358,0	120,5
	Standart Sapma	43,8	18,0	16,9
	Minimum	730,0	330,0	104,0
	Maksimum	850,0	384,0	151,0
Strain+Ozon 6 grubu (n=6)	Ortalama	846,2	417,3	172,4
	Ortanca	826,0	414,5	169,5
	Standart Sapma	77,5	14,1	15,2
	Minimum	776,0	400,0	152,0
	Maksimum	996,0	439,0	198,0
Strain+Diklofenak 6 grubu (n=6)	Ortalama	610,2	603,5	512,3
	Ortanca	612,5	604,5	506,5
	Standart Sapma	60,4	10,4	14,2
	Minimum	510,0	585,0	500,0
	Maksimum	700,0	616,0	534,0
Ozon 12 grubu (n=6)	Ortalama	39,2	51,6	53,4
	Ortanca	37,5	48,5	52,0
	Standart Sapma	5,8	10,6	11,0
	Minimum	33,0	41,0	43,0
	Maksimum	49,0	69,0	73,0
Strain 12 grubu (n=6)	Ortalama	104,0	96,0	117,0
	Ortanca	103,5	95,0	113,5
	Standart Sapma	8,1	5,2	10,4
	Minimum	93,0	89,0	107,0
	Maksimum	118,0	103,0	132,0
Strain+Ozon 12 grubu (n=6)	Ortalama	60,3	71,5	97,3
	Ortanca	60,5	73,5	97,5
	Standart Sapma	3,2	8,7	7,0
	Minimum	55,0	60,0	88,0
	Maksimum	64,0	81,0	106,0
Strain+Diklofenak 12 grubu (n=6)	Ortalama	68,3	87,0	212,2
	Ortanca	67,0	84,5	207
	Standart Sapma	6,4	10,1	26,7
	Minimum	61,0	77,0	182,8
	Maksimum	77,0	102,0	252,0
Ozon 72 grubu (n=6)	Ortalama	47,8	68,2	47,4
	Ortanca	46,5	67,0	46,5
	Standart Sapma	5,7	6,6	3,3
	Minimum	40,0	60,0	44,0
	Maksimum	55,0	78,0	53,0
Strain 72 grubu (n=6)	Ortalama	72,0	70,0	48,5
	Ortanca	74,0	70,5	46,0
	Standart Sapma	6,2	5,9	8,5
	Minimum	63,0	61,0	38,0
	Maksimum	78,0	79,0	62,0
Strain+Ozon 72 grubu (n=6)	Ortalama	42,2	54,5	51,5
	Ortanca	42,5	55,0	49,5
	Standart Sapma	3,0	3,7	9,1
	Minimum	38,0	49,0	41,0
	Maksimum	46,0	58,0	67,0
Strain+Diklofenak 72 grubu (n=6)	Ortalama	51,5	62,0	126,2
	Ortanca	52,0	60,5	123,5
	Standart Sapma	7,5	8,4	15,2
	Minimum	41,0	52,0	106
	Maksimum	61,0	75,0	146

Dört grup arasında 6ncı saat CPK, LDH ve AST düzeyleri yönünden istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmıştır ($p<0,001$). Yapılan ileri ikili karşılaştırmalarda bütün grupların CPK, LDH ve AST düzeyleri yönünden istatistiksel olarak birbirinden farklı olduğu saptanmıştır ($p<0,009$). (Tablo II). Bu durum kullanılan ozon ve diklofenakın bu enzimler üzerine etkisinin farklı düzeyde olduğunu göstermektedir.

Dört grup arasında 12nci saat CPK, LDH ve AST düzeyleri yönünden istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmıştır ($p<0,001$). Yapılan ileri ikili karşılaştırmalarda 12nci saat CPK düzeyleri yönünden sadece Strain+Ozon 12 grubu ile Strain+Diklofenak 12 grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamışken ($p>0,009$), diğer gruplar arasında 12nci saat CPK düzeyleri yönünden istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmıştır ($p<0,009$). Dört grup arasında 12nci saat CPK, LDH ve AST düzeyleri yönünden yapılan ileri ikili karşılaştırmalar Tablo II'de sunulmuştur.

Dört grup arasında 72nci saat CPK, LDH ve AST düzeyleri yönünden istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmıştır ($p<0,001$). Yapılan ileri ikili karşılaştırmalarda ozon 72 grubu ile Strain+Diklofenak 72 grubu arasında ve ozon 72 grubu ile Strain+Ozon 72 grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamış iken ($p>0,009$), diğer gruplar arasında 72nci saat CPK düzeyleri yönünden istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmıştır ($p<0,009$). Dört grup arasındaki 72nci saat CPK, LDH ve AST düzeyleri yönünden yapılan ileri ikili karşılaştırmalar Tablo II'de sunulmuştur.

Grup içi karşılaştırmalar (6nci, 12nci ve 72nci saat değerleri):

Strain+Ozon 6, Strain+Ozon 12 ve Strain+Ozon 72 grupları arasında CPK, LDH ve AST düzeyleri yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır ($p<0,001$). Yapılan ileri ikili karşılaştırmaların tamamında bütün değişkenler için (CPK, LDH ve AST) istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır ($p<0,017$) (Tablo III).

Strain+Diklofenak 6, Strain+Diklofenak 12 ve Strain+Diklofenak 72 gruplarının arasında CPK, LDH ve AST düzeyleri yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır ($p<0,001$). Yapılan ileri ikili karşılaştırmaların tamamında bütün değişkenler için (CPK, LDH ve AST) istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır ($p<0,017$) (Tablo III).

Strain 6, Strain 12 ve Strain 72 grupları arasında CPK, LDH ve AST düzeyleri yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır ($p<0,001$). Yapılan ileri ikili karşılaştırmalarda Strain 6 ve Strain 12 grupları arasında AST yönünden istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p=0,470$). Bunun haricindeki ikili karşılaştırmaların tamamında bütün değişkenler için (CPK, LDH ve AST) istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır ($p<0,017$) (Tablo III).

Ozon 6, Ozon 12 ve Ozon 72 gruplarının arasında CPK, LDH ve AST düzeyleri yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır ($p>0,05$) (Tablo III).

72nci saatin sonundaki enzim değerleri yorumlandığında, strain tedavisinde diklofenakın etkili olduğu, ancak ozonun dik-

Tablo II. CPK, LDH ve AST yönünden gruplar arası karşılaştırmalar

GRUPLAR	CPK Ortalama±SS	LDH Ortalama±SS	AST Ortalama±SS
Strain+Ozon 6 grubu	846,2±77,5	417,3±14,1	172,4±15,2
Strain+Diklofenak 6 grubu	610,2±60,4	603,5±10,4	512,3±14,2
p	<0,009	<0,009	<0,009
Strain+Ozon 6 grubu	846,2±77,5	417,3±14,1	172,4±15,2
Ozon 6 grubu	38,8±3,8	56,5±5,5	45,2±2,3
p	<0,009	<0,009	<0,009
Strain+Ozon 6 grubu	846,2±77,5	417,3±14,1	172,4±15,2
Strain 6 grubu	780,5±43,8	357,2±18,0	124,5±16,9
p	<0,009	<0,009	<0,009
Strain+Diklofenak 6 grubu	610,2±60,4	603,5±10,4	512,3±14,2
Ozon 6 grubu	38,8±3,8	56,5±5,5	45,2±2,3
p	<0,009	<0,009	<0,009
Strain+Diklofenak 6 grubu	610,2±60,4	603,5±10,4	512,3±14,2
Strain 6 grubu	780,5±43,8	357,2±18,0	124,5±16,9
p	<0,009	<0,009	<0,009
Strain 6 grubu	780,5±43,8	357,2±18,0	124,5±16,9
Ozon 6 grubu	38,8±3,8	56,5±5,5	45,2±2,3
p	<0,009	<0,009	<0,009
Strain+Ozon 12 grubu	60,3± ^{*,†}	71,5± ^{*,†}	97,3± ^{*,†}
Strain+Diklofenak 12 grubu	68,3±6,4	87,0±10,1	212,2±26,7
p	0.020	0.013	<0,009
Strain+Ozon 12 grubu	60,3± ^{*,†}	71,5± ^{*,†}	97,3± ^{*,†}
Ozon 12 grubu	39,2±5,8	51,6±10,6	53,4±11,0
p	<0,009	<0,009	<0,009
Strain+Ozon 12 grubu	60,3± ^{*,†}	71,5± ^{*,†}	97,3± ^{*,†}
Strain 12 grubu	104,0±8,1	96,0±5,2	117,0±10,4
p	<0,009	0.010	<0,009
Strain+Diklofenak 12 grubu	68,3± ^{*,†}	87,0± ^{*,†}	212,2± ^{*,†}
Ozon 12 grubu	39,2±5,8	51,6±10,6	53,4±11,0
p	<0,009	0.128	<0,009
Strain+Diklofenak 12 grubu	68,3± ^{*,†}	87,0± ^{*,†}	212,2± ^{*,†}
Strain 12 grubu	104,0±8,1	96,0±5,2	117,0±10,4
p	<0,009	<0,009	<0,009
Strain 12 grubu	104,0±8,1	96,0±5,2	117,0±10,4
Ozon 12 grubu	39,2±5,8	51,6±10,6	53,4±11,0
p	<0,009	<0,009	<0,009
Strain+Ozon 72 grubu	42,2±3,0	54,5± ^{*,†}	51,5± ^{*,†}
Strain+Diklofenak 72 grubu	51,5±7,5	62,0±8,4	126,2±15,2
p	<0,009	0.065	<0,009
Strain+Ozon 72 grubu	42,2±3,0	54,5± ^{*,†}	51,5± ^{*,†}
ozon 72 grubu	47,8± ^{*,†}	68,2± ^{*,†}	47,4± ^{*,†}
p	0.109	<0,009	0.470
Strain+ Ozon 72 grubu	42,2±3,0	54,5± ^{*,†}	51,5± ^{*,†}
Strain 72 grubu	72,0± ^{*,†}	70,0± ^{*,†}	48,5± ^{*,†}
p	<0,009	<0,009	0.377
Strain+Diklofenak 72 grubu	51,5±7,5	62,0±8,4	126,2±15,2
ozon 72 grubu	47,8± ^{*,†}	68,2± ^{*,†}	47,4± ^{*,†}
p	0.337	0.109	<0,009
Strain+Diklofenak 72 grubu	51,5±7,5	62,0±8,4	126,2±15,2
Strain 72 grubu	72,0± ^{*,†}	70,0± ^{*,†}	48,5± ^{*,†}
p	<0,009	0.173	<0,009
Strain 72 grubu	72,0± ^{*,†}	70,0± ^{*,†}	48,5± ^{*,†}
Ozon 72 grubu	47,8± ^{*,†}	68,2± ^{*,†}	47,4± ^{*,†}
p	<0,009	0.522	0.871

Bonferroni düzeltmeli Mann Whitney U testi kullanıldı.
İstatistiksel olarak anlamlılık düzeyi, $p<0,009$

Tablo III. CPK, LDH ve AST yönünden grup içi karşılaştırmalar			
GRUPLAR	CPK Ortalama±SS	LDH Ortalama±SS	AST Ortalama±SS
Strain+Ozon 6 grubu	846,2±77,5	417,3±14,1	172,4±15,2
Strain+Ozon 12 grubu	60,3± ^{*,†}	71,5± ^{*,†}	97,3± ^{*,†}
p	<0,017	<0,017	<0,017
Strain+Ozon 6 grubu	846,2±77,5	417,3±14,1	172,4±15,2
Strain+Ozon 72 grubu	42,2±3,0	54,5± ^{*,†}	51,5± ^{*,†}
p	<0,017	<0,017	<0,017
Strain+Ozon 12 grubu	60,3± ^{*,†}	71,5± ^{*,†}	97,3± ^{*,†}
Strain+Ozon 72 grubu	42,2±3,0	54,5± ^{*,†}	51,5± ^{*,†}
p	<0,017	<0,017	<0,017
Strain+Diklofenak 6 grubu	610,2±60,4	603,5±10,4	512,3±14,2
Strain+ Diklofenak 12 grubu	68,3± ^{*,†}	87,0± ^{*,†}	212,2± ^{*,†}
p	<0,017	<0,017	<0,017
Strain+Diklofenak 6 grubu	610,2±60,4	603,5±10,4	512,3±14,2
Strain+ Diklofenak 72 grubu	51,5±7,5	62,0±8,4	126,2±15,2
p	<0,017	<0,017	<0,017
Strain+Diklofenak 12 grubu	68,3± ^{*,†}	87,0± ^{*,†}	212,2± ^{*,†}
Strain+Diklofenak 72 grubu	51,5±7,5	62,0±8,4	126,2±15,2
p	<0,017	<0,017	<0,017
Ozon 6 grubu	38,8±3,8	56,5±5,5	45,2±2,3
Ozon 12 grubu	39,2±5,8	51,6±10,6	53,4±11,0
p	0.936	0.262	0.146
Ozon 6 grubu	38,8±3,8	56,5±5,5	45,2±2,3
Ozon 72 grubu	47,8± ^{*,†}	68,2± ^{*,†}	47,4± ^{*,†}
p	0.020	0.010	0.333
Ozon 12 grubu	39,2±5,8	51,6±10,6	53,4±11,0
Ozon 72 grubu	47,8± ^{*,†}	68,2± ^{*,†}	47,4± ^{*,†}
p	0.045	0.025	0.469
Strain 6 grubu	780,5±43,8	357,2±18,0	124,5±16,9
Strain 12 grubu	104,0±8,1	96,0±5,2	117,0±10,4
p	<0,017	<0,017	0.470
Strain 6 grubu	780,5±43,8	357,2±18,0	124,5±16,9
Strain 72 grubu	72,0± ^{*,†}	70,0± ^{*,†}	48,5± ^{*,†}
p	<0,017	<0,017	<0,017
Strain 12 grubu	104,0±8,1	96,0±5,2	117,0±10,4
Strain 72 grubu	72,0± ^{*,†}	70,0± ^{*,†}	48,5± ^{*,†}
p	<0,017	<0,017	<0,017

Bonferroni düzeltilmeli Mann Whitney U testi kullanıldı.
İstatistiksel olarak anlamlılık düzeyi, p<0.017

lofenaktan daha etkili olduğu söylenebilir. Normal kas dokusuna uygulanan ozonun enzimler üzerinde bir etkisi olmadığı tespit edilmiştir.

Tartışma

Literatürde, ozon tedavisi ile normal kas dokusu ve strain hasarı oluşmuş kas dokusu arasındaki ilişkiyi inceleyen deneysel bir çalışma bulunmamaktadır. Bu anlamda araştırmamız alanında yapılan ilk çalışma olma özelliğini taşımaktadır. Araştırmamızda, strain modelinin neden olduğu klinik patolojiyi simüle etmek amacıyla Carvalho ve ark.'nın tarif ettiği "kas strain modeli" kullanılmıştır (9). Bu model, sıçanların tibialis anterior kasında, uzun süreli ve sabit ağırlık asısı ile aşırı gerim kuvveti uygulayarak kas strain hasarı oluşturulmasını sağlamaktadır. Bunun dışında kas zedelenmesi oluşturan deneysel modeller de mevcuttur. Bunlar arasında özellikle ekzantrik egzersiz aracılı kas hasarı modelinde, histolojik olarak strain tipi zedelenmelerde görülenlere benzer değişiklikler tanımlanmıştır. Ancak, koşu bandında deneğin uzun süre (90 dk) koşturulması esasına dayanan bu modelin, strain hasarından farklı biyokimyasal ve hücrel mekanizmalarla zedelenmeye yol açtığı düşünüldüğünden çalışmamızda tercih edilmemiştir (10).

Egzersiz, elektriksel ve manyetik tedavi modalitelerinin kas yaralanmasının iyileşme sürecindeki etkisini gösteren bilimsel çalışmalar bulunmaktadır (11). İyileşme sürecine etki eden faktörler her grup için devre dışı bırakılarak; çalışmamızda yalnız ozon ve diklofenak etkinliğinin araştırılması sağlandı.

Kas yaralanmalarının tedavi sürecinde; hızlı ve etkin bir tedavinin yanı sıra üst düzey bir kas fonksiyonunun kazanılması da oldukça önemlidir (12,13). Bu çalışmada, strain tipi kas hasarı oluşturmaya yönelik standartize bir deneysel model uygulandı ve ozon ve diklofenak uygulanan gruplardaki hasar düzeyi değerlendirildi. Bu anlamda çalışmanın amacına uygun olarak kas fonksiyonu ölçümü ve değerlendirilmesi yapılmadı. Kalıcı kas fonksiyonun önlenmesi ve üst düzey kas fonksiyonunun kazanılmasına yönelik olarak standart deneysel hasar oluşturma modelleri üzerinde yapılacak karşılaştırmalı çalışmalara ihtiyaç olduğu düşünülmektedir.

Strain vakalarının tedavisinde NSAİİ ilaçların önemli bir yeri vardır ve tüm spor yaralanmalarında en çok kullanılan ilaç grubudur. NSAİİ kas yaralanmasındaki etkinliği bilimsel çalışmalarda gösterilmiştir. Bu çalışmada bu etkinlik bir kez daha irdelendi ve ozon tedavisi ile karşılaştırılması amaçlandı (4,6).

NSAİİ'ler strain türü kas hasarların erken dönemde ağrı kontrolü ve akut inflamasyonun lokal ve/veya sistemik etkilerini azaltmak amacıyla kullanılır. Uzun süreli kullanımı ise; kas dokusunun rejenerasyonu üzerindeki olumsuz etkileri ve sistemik yan etkilerinden dolayı önerilmemektedir (4-6). Kontüzyona bağlı kas hasarı modelinde; NSAİİ ilaçların topikal uygulamasının histolojik iyileşmeye etkisinin bulunmadığı bildirilmiştir. Ancak, diklofenak sodyumun sistemik yolla uygulanması durumunda; travma nedenli ödemi ve miyofibriler nekrozun neden olduğu inflamatuvar yanıtı azalttığı gösterilmiştir (14). Bu sistemik etkiden dolayı, araştırmamızda diklofenak ve ozonun, sistemik bir yol olan intraperitoneal uygulaması seçildi. Yine

deneyisel çalışmalarda, intraperitoneal uygulama yolunun güvenli ve kolay olarak tanımlanması da bu seçimde etkili oldu.

Diğer taraftan bizim de çalışmamızın dizaynında deneyisel modelini uyguladığımız Carvalho ve arkadaşları çalışmalarında, tek başına diklofenak tedavisinin (topikal ve intramusküler) PGE2 ve yürüme analizi (6ncı saatte) yönünden etkinliğinin olmadığını, ancak COX 1 ve 2 düzeylerini azalttığını saptamışlardır (3ncü ve 6ncı saatlerde) (15). Çalışmamızda diklofenak tedavisi uygulanan grupta 6ncı ve 12nci saat CPK, LDH ve AST düzeyleri yönünden anlamlı derecede azalma, 72. saatte ise CPK ve AST düzeyleri yönünden anlamlı derecede azalma olduğunu gördük. Kas strain yaralanması üzerindeki diklofenak tedavisinin olumlu katkılarını göstermesi bakımından sonuçlarımız ile yukarıda bahsedilen çalışmaya ait veriler benzerlik göstermektedir.

Sonuçlarımız, intraperitoneal diklofenak ve ozon uygulanan grupta, herhangi bir tedavi verilmeyen deneklerle kıyaslandığında, strain hasarına bağlı ödem ve miyofibrillerdeki yapısal bozulma şiddetinin daha hafif olduğunu göstermiştir. Ozon tedavisinin doku zedelenmesi ve yara modellerinde iyileşme sürecine katkısı çok sayıda bilimsel çalışma ile gösterilmiştir (16-20).

Çalışmamızda, strain oluşturulmadan sadece ozon uygulanan (0,7 mg/kg) grupta biyokimyasal belirteçler normal aralıkta ölçülmüş ve kas histolojisinde değişiklik olmadığı görülmüştür. Bu nedenle, sağlıklı deneklerde terapötik dozda uygulanan ozonun normal dokular üzerinde ve özellikle kas dokusunda, ROT ve/veya LOÜ gibi ozonun üretimini artırdığı bilinen oksidan bileşikler üzerinden herhangi bir doku zedelenmesine yol açmadığı; bu nedenle gözlemlenebilir yan etkisinin bulunmadığı diğer çalışmalara ait verilerden de anlaşılmaktadır (21,22). Ayrıca yakın zamanlarda yapılan bir çalışmada da sadece ozon uygulamasının dokularda ve serum CK, LDH seviyelerinde olumsuz değişikliğe yol açmadığı gösterilmiştir (23).

Kas hasarı için en güvenilir biyokimyasal parametre olan CPK'nın, strain oluşturulan ve hiçbir tedavi uygulanmayan grupta, 12nci ve 72nci saatlerde en yüksek düzeyde seyrettiği saptanmıştır. Bulgularımız, deneyisel modelimizin strain hasarı oluşturduğunu, oluşan hasarın gerek biyokimyasal, gerekse histopatolojik olarak görülebildiğini ortaya koymuştur.

Strain oluşturulan grupların tümünde, 6nci saatte CPK düzeyi belirgin biçimde yükselmiştir. CPK yüksekliği, Strain + Ozon uygulanan grupta 6 ncı saatte diğerlerine göre daha belirgindir. Hatta CPK düzeyinin, herhangi bir tedavi uygulanmayan strain grubundan da yüksek olduğu dikkati çekmektedir. Ozonun beklenen tedavi edici etkisi ile paradoks oluşturuyor gibi görünen bu fark, hasarlanmış dokuda ozon tarafından üretimi indüklenen ROT ve LOÜ aracılı oksidatif zedelenmeye bağlanabilir.

Ancak, ilgi çekici bir bulgu olarak, CPK düzeyinin, 12nci ve 72nci saatlerdeki seyri birlikte değerlendirildiğinde, Strain+Ozon grubunda, 6 ncı saattekinin aksine, geç dönemde diğer gruplara göre daha hızlı ve anlamlı bir düşüş olduğu görülmektedir. Başka bir tedavi uygulanmadığından, CPK düzeyindeki iyileşme, ozonun geç dönemde zedelenme alanın-

daki mikroçevreyi olumlu etkilemesi ve rejenerasyonu hızlandırması şeklinde yorumlanabilir (7,8,21,24). İlginc olarak, bir deneyisel çalışmada, çizgili kas dokusunda iskemi/reperfüzyon hasarı oluşumunun hem hiperbarik oksijen, hem de ozon "preconditioning" uygulanması ile azaltıldığı gösterilmiştir (25). Çalışmamızın sonuçları ile birlikte değerlendirildiğinde, ozon uygulanmasının, bazıları henüz aydınlatılamamış moleküler yollar ve özellikle oksidan/antioksidan mekanizmaların modülasyonu üzerinden hücre ve doku düzeyinde rejenerasyon ve tamir yönünde birçok karmaşık süreci etkilediği düşünülebilir.

Bulgularımız, gerek ozon, gerekse diklofenakın strain hasarını azaltmada etkinlik gösterdiklerini ortaya koymuştur. Biyokimyasal parametrelere dayalı değerlendirmede, ozonun istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte, geç dönemde CPK düzeyinin normale yaklaşmasında diklofenaktan daha olumlu etkileri olduğu saptanmıştır. Bu etkinin tekrarlanabilir olup olmadığı, daha geniş serilerde yapılacak deneyisel çalışmalarla test edilmelidir.

Dizayn olarak çalışmamıza benzer şekilde yapılmış başka çalışmalar bulunmamakla birlikte bazı çalışmalara ait veriler sonuçlarımız ile benzerlik göstermektedirler. Bunlardan birisinde akut bel ağrısı olan hastalarda paravertebral intramusküler ozon tedavisinin kontrol grubundaki hastalara göre gerek ağrı düzeylerinde gerekse de NSAİİ ihtiyacında anlamlı düzeyde azalmanın olduğu gösterilmiştir (26). Daha yakın bir zamanda yapılan diğer bir benzer çalışmada da komplike kronik bel ağrısı olan hastalarda paravertebral intramusküler ozon tedavisi ile postür eğitimi arasındaki farklıklar incelenmiştir. Çalışmanın sonunda verilerimiz ile benzer şekilde tedavi sonrası ağrı düzeyinin tedavi öncesine göre intramusküler ozon tedavisi yapılan gruplarda anlamlı derecede azaldığı ve bu etkinin de eğitim ve ozon tedavisi birlikte yapılan grupta daha da uzun süre devamlılık gösterdiği saptanmıştır (27). Bu bağlamda yan etki profili bakımından oldukça emniyetli bir tedavi yöntemi olan ozon tedavisini konvansiyonel tedavi ve rehabilitasyon modalitelerine eklenmesini önerebiliriz. LDH ve AST enzimlerinin seviyeleri, 12nci ve 72nci saatlerde genel olarak CPK'nın gösterdiği seyir ile uyumludur. 6nci saate ait en yüksek AST ve LDH düzeyleri ise Strain+Diklofenak uygulanan grupta görülmüştür. Bu durumun diklofenakın kas dokusundan çok, karaciğer üzerinde olası yan etkileri ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. 72nci saatin sonundaki enzim değerleri esas alındığında, strain hasarının tedavisinde diklofenakın etkili olduğu, ancak ozonun da diklofenak benzeri terapötik bir etkinlik gösterdiği söylenebilir.

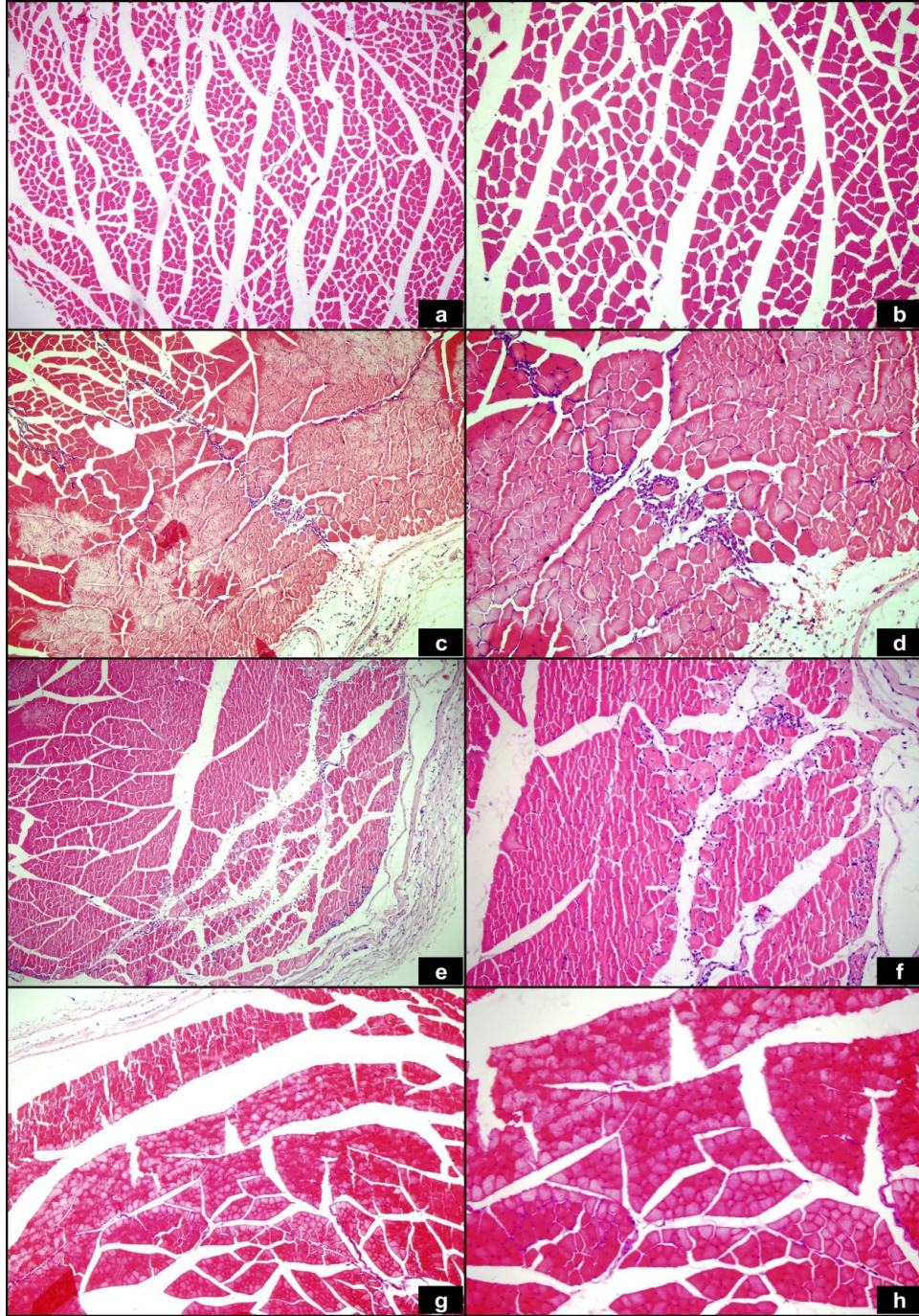
Çalışmamızdan farklı olarak, gastrokinezi kasını gerek oluşturulan strain hasarı modelinin kullanıldığı başka bir araştırmada, 3ncü gün (72nci saat) CPK ve LDH seviyelerinin, çalışmamızdaki kontrol grubu ve strain oluşturulan denekler ile benzer düzeylerde olduğu görülmektedir. Bu bulgu, farklı deneyisel modellerin kullanıldığı strain hasarı çalışmalarında, kas zedelenmesinin ortak patogenetik mekanizmalarla ve benzer şiddette ortaya çıktığını düşündürmektedir. Söz konusu çalışmada, ATP, Coenzim A, Coenzim Q10, Cytochrome C ve Vitamin B6 içeren bir enerji içeceği ve salın verilen grup, kontrol

grubu ile karşılaştırılmış; enerji içeceği verilen deneklerdeki strain hasarının daha hafif olduğu gözlenmiştir (28).

Histopatolojik değerlendirmede, strain hasarı oluşturulmadan yalnızca ozon uygulanan gruptaki deneklerin kas dokusunun morfolojik olarak normal sınırlarda bulunduğu görülmüştür. Strain hasarı sonucunda kas dokusundaki değişiklikler, kas liflerinde balonlaşma, belirgin ödem, seyrek miyofibriller nekroz ve nükleer santralizasyon gibi genel kas zedelenmesi bulguları biçiminde izlenmiştir. Strain uygulanan tüm deneklerde benzer morfolojik değişiklikler mevcut olmakla birlikte,

tedavi amacıyla ozon uygulanan bazı deneklerde kas dokusunun görece daha az etkilenmiş olduğu dikkati çekmektedir (Şekil 4).

Sonuç olarak kas strain hasarı, spor hekimliği pratiğinde sıklıkla görülen yaralanmalardandır. Kas hasarlanmasında etkin ve hızlı bir tedavi uygulanmadığında; kasın anatomik-biyomekanik özellikleri ve kas fonksiyon yeteneği bozulmakta; sportif performans da olumsuz yönde etkilenmektedir. Kas yaralanmalarının tedavisinde konservatif tedavi yöntemleri bazı durumlarda etkisiz kalabilmekte ve yeni tedavi modaliteleri



Şekil 4. 6ncı saat sonunda alınan tibialis anterior kası örnekleri. Yukarıdan aşağıya doğru sırasıyla normal (a-b), strain (c-d), strain+diklofenak (e-f) ve strain+ozon (g-h) gruplarını temsil eden örnekler görülmektedir.

gündeme gelmektedir. Ozon uygulaması bu yeni tedavi yöntemleri arasında bulunmaktadır. Bu yeni tedavi yöntemlerinin normal hücre ve dokular üzerindeki yan etkileri ve tedavi edici etkileri deneysel ve klinik çalışmalarda araştırılması gerekmektedir.

Bu çalışmada tedavi edici dozlarda ozon uygulanmasının normal kas dokusu üzerinde herhangi bir yan etkisinin olmadığı ve kas yaralanmasında diklofenak benzeri terapötik bir etkisinin olduğu gösterilmiştir. Bu yönü ile medikal ozonun kas strain yaralanmaları tedavisinde kullanılabileceği düşüncesindeyiz. Ancak bu konuda daha fazla deneysel ve klinik çalışmaların yapılması, tedavi edici doz aralığının belirlenmesi gerekmektedir.

Kaynaklar

1. Jarvinen TA, Jarvinen TL, Kaariainen M, et al. Muscle injuries: biology and treatment. *The American Journal of Sports Medicine* 2005; 33: 745-764.
2. Garrett WE. Muscle strain injuries. *The American Journal of Sports Medicine* 1996; 24: S2-S8.
3. Anderson M, Hall S & Martin M. *Sports Injury Management*. (2nd ed.). Philadelphia, PA, Lippincott Williams&Wilkins, 2000.
4. Obremsky WT, Seaber AV, Ribbeck BM, et al. Biomechanical and histologic assessment of a controlled muscle strain injury treated with piroxicam. *The American Journal of Sports Medicine* 1994; 22: 558-561.
5. Thorsson O, Rantanen J, Hurme T, et al. Effects of nonsteroidal antiinflammatory medication on satellite cell proliferation during muscle regeneration. *The American Journal of Sports Medicine* 1998; 26: 172-176.
6. Mishra DK, Friden J, Schmitz MC, et al. Anti-inflammatory medication after muscle injury. A treatment resulting in short-term improvement but subsequent loss of muscle function. *The Journal of Bone and Joint Surgery. American volume* 1995; 77: 1510-9.
7. Ajamieh H, Merino N, Candelario-Jalil E, et al. Similar protective effect of ischaemic and ozone oxidative preconditionings in liver ischaemia/reperfusion injury. *Pharmacological Research* 2002; 45: 333-339.
8. Bocci V, Valacchi G, Corradeschi F, et al. Studies on the biological effects of ozone: 7. Generation of reactive oxygen species (ROS) after exposure of human blood to ozone. *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents* 1998; 12: 67-75.
9. de Paiva Carvalho RL, Leal-Junior EC, Petrellis MC et al. Effects of low-level laser therapy (LLLT) and diclofenac (topical and intramuscular) as single and combined therapy in experimental model of controlled muscle strain in rats. *Photochemistry and Photobiology* 2013; 89: 508-512.
10. Armstrong RB, Ogilvie RW, Schwane JA. Eccentric exercise-induced injury to rat skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology: Respiratory, Environmental and Exercise Physiology* 1983; 54: 80-93.
11. Dale RB, Harrelson GL, Leaver-Dunn D. Principles of rehabilitation. In: Andrews JR, Harrelson GL, Wilk KE, (eds). *Physical rehabilitation of the injured athlete*. Philadelphia, Saunders, 2004.
12. Garrett WE. Muscle strain injuries: clinical and basic aspects. *Medicine and Science in Sports and Exercise* 1990; 22: 436-443.
13. Taylor DC, Dalton JD, Seaber AV, et al. Experimental muscle strain injury, early functional structural deficits and the increased risk for reinjury. *The American Journal of Sports Medicine* 1993; 21: 190-194.
14. de Almeida P, Lopes-Martins RÁ, Tomazoni SS, et al. Low-level laser therapy and sodium diclofenac in acute inflammatory response induced by skeletal muscle trauma: effects in muscle morphology and mRNA gene expression of inflammatory markers. *Photochemistry and Photobiology* 2013; 89: 501-507.
15. Feng X, Li GZ, Wang S. Effects of estrogen on gastrocnemius muscle strain injury and regeneration in female rats. *Acta Pharmacologica Sinica* 2004; 25: 1489-1494.
16. Beck EG, Wasser G, Viebahn-Hansler R. The current status of ozone therapy empirical developments and basic research. *Forschende Komplementarmedizin* 1989; 5: 61-75.
17. Bocci V. Biological and clinical effects of ozone. Has ozone therapy a future in medicine? *British Journal of Biomedical Science* 1999; 56: 270-279.
18. Kesik V, Uysal B, Kurt B, et al. Ozone ameliorates methotrexate-induced intestinal injury in rats. *Cancer Biology and Therapy* 2009; 8: 1623-1628.
19. Kim HS, Noh SU, Han YW, et al. Therapeutic effects of topical application of ozone on acute cutaneous wound healing. *Journal of Korean Medical Science* 2009; 24: 368-374.
20. Vaillant JD, Fraga A, Díaz MT, et al. Ozone oxidative postconditioning ameliorates joint damage and decreases pro-inflammatory cytokine levels and oxidative stress in PG/PS-induced arthritis in rats. *European Journal of Pharmacology* 2013; 714: 318-324.
21. Travagli V, Zanardi I, Silviotti A, et al. A physicochemical investigation on the effects of ozone on blood. *International Journal of Biological Macromolecules* 2007; 41: 5504-5511.
22. Bocci VA. Scientific and medical aspects of ozone therapy. State of the art. *Archives of Medical Research* 2006; 37: 425-435.
23. Wang G, Jiang R, Zhao Z, et al. Effects of ozone and fine particulate matter (PM(2.5)) on rat system inflammation and cardiac function. *Toxicology Letters* 2013; 217: 23-33.

24. Hernandez FA. To what extent does ozone therapy need a real biochemical control system? Assessment and importance of oxidative stress. *Archive of Medical Research* 2007; 38: 571-578.
25. Koca K, Yurttaş Y, Yıldız C, et al. Effect of hyperbaric oxygen and ozone preconditioning on oxidative/nitrosative stress induced by tourniquet ischemia/reperfusion in rat skeletal muscle. *Acta Orthopaedica et Traumatologica Turcica* 2010; 44: 476-483.
26. Paoloni M, Di Sante L, Cacchio A, et al. Intramuscular oxygen-ozone therapy in the treatment of acute back pain with lumbar disc herniation: a multicenter, randomized, double-blind, clinical trial of active and simulated lumbar paravertebral injection. *Spine* 2009; 34: 1337-1344.
27. Apuzzo D, Giotti C, Pasqualetti P, et al. An observational retrospective/horizontal study to compare oxygen-ozone therapy and/or global postural re-education in complicated chronic low back pain. *Functional Neurology* 2014; 29: 31-39.
28. He L, Li G, Feng X, et al. Effect of energy compound on skeletal muscle strain injury and regeneration in rats. *Industrial Health* 2008; 46: 506-512.