

T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

DENEYSEL OTOİMMÜN MİYOKARDİT MODELİNDE
OZONUN TEDAVİ EDİCİ ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

UZMANLIK TEZİ
DR. ALİ RIZA ÇİFTÇİOĞLU

DANIŞMAN
PROF.DR. DOLUNAY GÜRSES

DENİZLİ - 2019

T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

DENEYSEL OTOİMMÜN MİYOKARDİT MODELİNDE
OZONUN TEDAVİ EDİCİ ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

UZMANLIK TEZİ
DR. ALİ RIZA ÇİFTÇİOĞLU

DANIŞMAN
PROF.DR. DOLUNAY GÜRSES

Bu çalışma Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'nin 25.08.2018 tarih ve 2018TIPF041 nolu kararı ile desteklenmiştir.

DENİZLİ - 2019

Prof. Dr. Dolunay GÜRSES danışmanlığında Dr. Ali Rıza ÇİFTÇİOĞLU tarafından yapılan “Deneysel Otoimmün Miyokardit Modelinde Ozonun Tedavi Edici Etkisinin Araştırılması” başlıklı tez çalışması gün 08/11/2019 tarihinde yapılan tez savunma sınavı sonrası yapılan değerlendirme sonucu jürimiz tarafından Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı’nda TIPTA UZMANLIK TEZİ olarak kabul edilmiştir.

BAŞKAN: Prof. Dr. Dolunay GÜRSES

ÜYE: Prof.Dr. Ertürk LEVENT

ÜYE: Dr. Öğr. Üyesi Münevver YILMAZ

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım. 13/11/19

Prof. Dr. Osman Çiftçi
Pamukkale Üniversitesi
Tıp Fakültesi Dekanı

TEŞEKKÜR

Asistanlığım süresince eğitimimde bana büyük katkıları olan, hoşgörü ve desteğini esirgemeyen saygıdeğer hocam Prof. Dr. Dolunay GÜRSES'e,

Asistanlığım boyunca bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım, bana pediatriyi sevdiren saygıdeğer Pediatri Anabilim Dalı Öğretim Üyelerine,

Tez hazırlık aşamasında her türlü desteğini gördüğüm Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Gülçin ABBAN METE'ye, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Dr. Öğr. Üyesi Esin AVCI'ya ve Veterinerlik Bölümü Dr. Öğr. Üyesi Barbaros ŞAHİN'e,

Çalışmamız için medikal ozon jenaratörü desteğini sağlayan Medikal Ozon ve Oksijen Derneği Başkanı Uzm. Dr. Lale YEPREM'e

Asistanlığım süresince sıcak ve dostça bir çalışma ortamını paylaştığım, her türlü destek ve yardımlarını gördüğüm, acı tatlı anılarımızı paylaştığımız tüm asistan arkadaşlarıma, hemşirelere ve diğer yardımcı personele,

Hayatım boyunca her zaman arkamda olduklarını bildiğim, sevgiyle, özveriyle ve sabırla bana büyük destek olan, beni yetiştiren annem ve babama,

Hayatımda başıma gelen en güzel şey olan ve her anımda yanımda olarak bana destek veren, en kıymetlim, yol arkadaşım, canım eşim Dr. Seçkin ÇİFTÇİOĞLU'na TEŞEKKÜR EDERİM.

Dr. Ali Rıza ÇİFTÇİOĞLU

SİMGELER VE KISALTMALAR

ACE	: Anjiotenin Dönüştürücü Enzim
ANT	: Adenin Nükleotid Translokator
ARB	: Anjiotensin Reseptör Blokörü
BNP	: Brain Natriüretik Peptit
CFA	: " <i>Complete Freund's Adjuvant</i> "
CK	: Kreatin Kinaz
CO₂	: Karbondioksit
DNA	: Deoksiribo Nükleik asit
DOM	: Deneysel Otoimmün Miyokardit
ECMO	: Ekstrakorporeal Membran Oksijenizasyonu
EKG	: Elektrokardiyografi
EMB	: Endomiyokardiyal Biyopsi
EMB	: Endomiyokardiyal Biyopsi
HHV-6	: Human Herpes Virüs 6
HIV	: Human Immunodeficiency Virus
IFN-γ	: İnterferon Gamma
IL-10	: İnterlokın 10
IL-1β	: İnterlokın 1 Beta
IL-2	: İnterlokın 2
IL-3	: İnterlokın 3
IL-4	: İnterlokın 4
IL-6	: İnterlokın 6
IVIG	: İntravenöz İmmünglobulin
iNOS	: Nitrik oksit sentaz

İP	: İntraperitoneal
LOPs	: Lipit Oksidasyon Ürünleri
MRI	: Manyetik Rezonans Görüntüleme
NO₂	: Azot dioksit
O₂	: Oksijen
O₃	: Ozon
RNA	: Ribo Nükleik asit
RSV	: Respiratuvar Sinsityal Virüs
SC	: Subkutan
SOR	: Serbest Oksijen Radikalleri
TGF-β1	: Transforme Edici Büyüme Faktör Beta 1
TLR	: Toll Like Reseptör
TNF- α	: Tümör Nekroz Faktör Alfa
VAD	: Ventriküler Yardımcı Cihazlar
VİP	: Vazoaktif İntestinal Peptid

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
SİMGELER VE KISALTMALAR	iii
İÇİNDEKİLER	v
TABLolar DİZİNİ.....	vii
ŞEKİL VE RESİM DİZİNİ.....	viii
ÖZET	x
SUMMARY	xii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. MİYOKARDİT.....	3
2.1.1. Epidemiyoloji.....	3
2.1.2. Etiyoloji.....	3
2.1.3. Klinik.....	4
2.1.4. Tanı.....	6
2.1.5. Patofizyoloji.....	10
2.1.6. Patoloji	11
2.1.7. Tedavi.....	16
2.1.8. Prognoz	20
2.2. OZON.....	21
2.2.1. Medikal Ozon Tarihçesi.....	21
2.2.2. Medikal Ozonun Elde Edilmesi.....	22
2.2.3. Medikal Ozonun Etki Mekanizması	23
2.2.4. Medikal Ozon Uygulamaları.....	26
2.2.5. Medikal Ozonun Klinikte Uygulama Dozları.....	29
2.2.6. Medikal Ozon Tedavisinin Klinik Uygulamaları	29
2.2.7. Medikal Ozon Tedavisinin Deneysel Çalışmalarda Uygulamaları	30
2.2.8. Medikal Ozon Tedavisinin Yan Etki ve Kontrendikasyonları	31
3. GEREÇ VE YÖNTEM	32
3.1. ÇALIŞMA GRUPLARININ OLUŞTURULMASI	33
3.2. DENEYSEL OTOİMMÜN MİYOKARDİT MODELİ OLUŞTURULMASI	36
3.3. OZON VERİLMESİ.....	37
3.4. HASTALIK BELİRTİLERİNİN İZLENMESİ VE ANTROPOMETRİK ÖLÇÜMLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ.....	38

3.5. FARELERİN SAKRİFİKASYONU	40
3.6. KALBİN HİSTOLOJİK DEĞERLENDİRİLMESİ.....	42
3.7. BİYOKİMYASAL BELİRTEÇLERİN ÇALIŞILMASI.....	43
3.8. İSTATİSTİKSEL ANALİZ.....	43
4. BULGULAR.....	44
4.1. ANTROPOMETRİK ÖLÇÜMLER.....	44
4.2. HASTALIK BELİRTİLERİNİN İZLENMESİ	47
4.3. BİYOKİMYASAL BELİRTEÇLER.....	47
4.3.1 Troponin T Düzeyi	47
4.3.2 Enflamatuvar Sitokin Seviyeleri	49
4.3.3 Anti-enflamatuvar Sitokin Seviyeleri.....	52
4.4. KALBİN MAKROSKOBİK İNCELENMESİ	54
4.5. KALBİN HİSTOLOJİK İNCELENMESİ	56
5. TARTIŞMA.....	75
6. SONUÇLAR.....	87
KAYNAKLAR	90

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1. Miyokardit nedenleri.....	5
Tablo 2. Endomiyokardiyal biyopsi endikasyonları.....	10
Tablo 3. Çalışma grupları	34
Tablo 4. Enflamasyon ve fibrozis skalaları	42
Tablo 5. Gruplara göre başlangıç vücut ağırlığı, son vücut ağırlığı, kalp ağırlığı, kilo alımı ve kalp ağırlığının son vücut ağırlığına oranı	45
Tablo 6. Grupların troponin T düzeylerinin karşılaştırılması	48
Tablo 7. Grupların TNF- α , IL-1 β ve IL-6 düzeylerinin karşılaştırılması	50
Tablo 8. Grupların IL-10 düzeylerinin karşılaştırılması	52
Tablo 9. Grupların TGF- β 1 düzeylerinin karşılaştırılması	54
Tablo 10. Grupların diskolorasyon evrelerinin karşılaştırılması	55
Tablo 11. Grupların enflamasyon şiddetinin karşılaştırılması.....	57
Tablo 12. Grupların fibrozis düzeylerinin karşılaştırılması	58

ŞEKİL VE RESİM DİZİNİ

Şekil 1. Miyokardit seyri.....	13
Şekil 2. Bir medikal ozon jeneratörünün çalışma ilkesi.....	23
Şekil 3. Ozonun Terapötik Etkileri	25
Şekil 4. Çalışmanın zaman çizelgesi.....	33
Şekil 5. Grupların kilo alım (son vücut ağırlığı - ilk vücut ağırlığı) farkları.....	44
Şekil 6. Grupların kalp ağırlıkları	46
Şekil 7. Grupların kalp ağırlığı/son vücut ağırlığı oranı.....	46
Şekil 8. Grupların troponin T düzeyleri.....	48
Şekil 9. Grupların TNF- α düzeyleri	50
Şekil 10. Grupların IL-1 β düzeyleri	51
Şekil 11. Grupların IL-6 düzeyleri	51
Şekil 12. Grupların IL-10 düzeyleri.....	53
Şekil 13. Troponin T düzeyi ile kilo farkı (son VA- ilk VA) arasındaki ilişki	61
Şekil 14. Troponin T düzeyi ile kalp ağırlığı arasındaki ilişki.....	62
Şekil 15. Troponin T düzeyi ile Kalp ağırlığı/ son VA arasındaki ilişki.....	62
Şekil 16. Troponin T düzeyi ile TNF- α düzeyi arasındaki ilişki	63
Şekil 17. Troponin T düzeyi ile IL-1 β düzeyi arasındaki ilişki	64
Şekil 18. Troponin T düzeyi ile IL-6 düzeyi arasındaki ilişki.....	64
Şekil 19. Troponin T ile enflamasyon şiddeti ile arasındaki ilişki	65
Şekil 20. Troponin T ile fibrozis düzeyi arasındaki ilişki	65
Şekil 21. Enflamasyon şiddeti ile kalp ağırlığı arasındaki ilişki.....	66
Şekil 22. Enflamasyon şiddeti ile kalp ağırlığı/son VA arasındaki ilişki.....	66
Şekil 23. Enflamasyon şiddeti ile TNF- α düzeyi arasındaki ilişki	67
Şekil 24. Enflamasyon şiddeti ile IL-1 β düzeyi arasındaki ilişki.....	67
Şekil 25. Enflamasyon şiddeti ile IL-6 düzeyi arasındaki ilişki.....	68
Şekil 26. Enflamasyon şiddeti ile IL-10 düzeyi arasındaki ilişki.....	69
Şekil 27. Fibrozis düzeyi ile son VA- ilk VA arasındaki ilişki	69
Şekil 28. Fibrozis düzeyi ile kalp ağırlığı arasındaki ilişki.....	70
Şekil 29. Fibrozis düzeyi ile kalp ağırlığı/son VA arasındaki ilişki	70
Şekil 30. Fibrozis düzeyi ile TNF- α arasındaki ilişki	71
Şekil 31. Fibrozis düzeyi ile IL-1 β arasındaki ilişki	72
Şekil 32. Fibrozis düzeyi ile IL- 6 arasındaki ilişki	72

Şekil 33. Fibrozis düzeyi ile IL-10 arasındaki ilişki	73
Şekil 34. Enflamasyon şiddeti ile fibrozis düzeyi arasındaki ilişki	74

ÖZET

Deneyisel Otoimmün Miyokardit Modelinde Ozonun Tedavi Edici Etkisinin Araştırılması

Dr. Ali Rıza ÇİFTÇİOĞLU

Miyokardit; çocukluk ve genç erişkinlik döneminde mortalite ve morbiditeye yol açabilen, miyozit hasarı ve nekrozu ile karakterize miyokardın enflamatuvar hastalığıdır. Ozon; anti-enflamatuvar ve immünmodüler etkileri nedeniyle çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılan medikal bir ajandır. Bu çalışmanın amacı, günümüzde halen spesifik bir tedavisi olmayan miyokardit üzerinde ozonun olası etkilerini araştırmaktır.

Bu amaçla 6-8 haftalık, erkek Balb/c cinsi farelerde deneyisel otoimmün miyokardit modeli oluşturuldu. Toplam 49 adet fare, her grupta yedi adet olmak üzere yedi gruba ayrıldı. Miyokardit oluşturulacak farelere deneyin 0. ve 7. günlerinde eşit miktardaki domuz kardiyak miyozin ve CFA karışımı subkutan uygulandı. Ozonun etkinliğini araştırmak üzere farelere 20, 30, 40, 50 ve 60 µg/ml konsantrasyondan ozon, deneyin 8. gününden deneyin sonlandırıldığı 22. güne kadar her gün intraperitoneal olarak uygulandı. Fareler 22. günde sakrifiye edildi. Tüm farelerin başlangıç vücut ağırlıkları, sakrifikasyon öncesi vücut ağırlıkları ve sakrifikasyon sonrası kalp ağırlıkları ölçüldü. Sakrifiye işlemi öncesinde intrakardiyak kan örnekleri alınarak serum troponin T, TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10 ve TGF- β 1 düzeyleri ELİSA yöntemiyle ölçüldü. Çıkarılan kalp dokuları histolojik incelemeye tabi tutularak, diskolorasyon, enflamasyon ve fibrozis yönünden incelendi.

İlk ve son vücut ağırlıkları açısından gruplar arasında istatistiksel olarak farklılık saptanmadı ($p>0,05$). Tüm gruplardaki farelerin deney süresindeki 22 günlük izlemi boyunca kilo aldığı görüldü ($p=0,003$). Kilo alımı ve kalp ağırlıkları, DOM grubunda kontrol grubu ve ozon verilen gruplara göre daha azdı ($p<0,004$). Kalp ağırlığı/son vücut ağırlığı oranının DOM grubunda arttığı saptandı ($p=0,000$). Troponin T, TNF- α , IL-1 β ve IL-6 düzeyleri DOM grubunda kontrol grubuna göre yüksek bulundu ($p<0,005$). Troponin T düzeyleri, 50 ve 60 µg/ml konsantrasyondan ozon verilen gruplarda DOM grubuna göre belirgin azalmıştı ($p=0,001$). TNF- α ve IL-1 β düzeyleri ozon verilen tüm gruplarda DOM grubuna göre düşüktü ($p=0,000$). Anti-enflamatuvar sitokinlerden IL-10 düzeyleri açısından gruplar arasında farklılık saptanırken ($p=0,005$), TGF- β 1 düzeyleri ozon verilen gruplarda artmış saptanmakla birlikte farklılık istatistiksel olarak anlamsızdı ($p>0,05$). Histolojik olarak

diskolorasyon, enflamasyon ve fibrozis düzeyleri DOM grubunda diğer gruplara göre belirgin fazlaydı ($p=0,0001$). Enflamasyon şiddeti ve fibrozis düzeylerinin $60 \mu\text{g/ml}$ konsantrasyondan ozon verilen grupta belirgin olarak azaldığı görüldü ($p=0,0001$). Sonuçlarımız, ozonun anti-enflamatuvar ve immünmodülatör etkisinin miyokardit tedavisinde umut verici olabileceğini göstermektedir.

Anahtar kelimeler: Deneysel otoimmün miyokardit, ozon, tedavi, fare

SUMMARY

Research Of The Therapeutic Effect Of Ozone In Experimental Autoimmune Myocarditis Model

Dr. Ali Rıza ÇİFTÇİOĞLU

Myocarditis; is an inflammatory disease of the myocardium characterized by myositis damage and necrosis, which can lead to mortality and morbidity in childhood and adolescence. Ozone; It is a medical agent used in the treatment of various diseases due to its anti-inflammatory and immunomodulatory effects. The aim of this study was to investigate the possible effects of ozone on myocarditis, which currently has no specific treatment.

For this purpose, experimental autoimmune myocarditis model was created in 6-8 week old male Balb/c mice. A total of 49 mice were divided into seven groups, seven in each group. An equal amount of porcine cardiac myosin and CFA mixture was administered subcutaneously to mice which induced myocarditis on days 0 and 7 of the experiment. To investigate the efficacy of ozone, ozone at a concentration of 20, 30, 40, 50 and 60 µg/ml was administered intraperitoneally to mice every day from day 8 to day 22 of the experiment. Mice were sacrificed on day 22. The initial body weights, pre-sacrification body weights, and post-sacrification heart weights of all mice were measured. Serum troponin T, TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10 and TGF- β 1 levels were measured by intracardiac blood samples before sacrifice. There was no statistically significant difference between the groups in terms of first and last body weights ($p > 0.05$). Mice in all groups gained weight during the 22-day follow-up period of the experiment ($p = 0.003$). Weight gain and heart weights were lower in the DOM group than in the control and ozone treated groups ($p < 0.004$). The heart weight/final body weight ratio was found to be increased in the DOM group ($p = 0.000$). Troponin T, TNF- α , IL-1 β and IL-6 levels were higher in the DOM group compared to the control group ($p < 0.005$). Troponin T levels were significantly reduced in the ozone-treated groups at 50 and 60 µg/ml compared to the DOM group ($p = 0.001$). TNF- α and IL-1 β levels were lower in all ozone-treated groups than in the DOM group ($p = 0.000$). Among the anti-inflammatory cytokines, IL-10 levels were different between the groups ($p = 0.005$) while TGF- β 1 levels were increased in ozone-treated groups, but the difference was not statistically significant ($p > 0.05$).

Histologically, discoloration, inflammation and fibrosis levels were significantly higher in the DOM group compared to the other groups ($p=0.0001$). Inflammation severity and fibrosis levels were significantly decreased in the ozone-treated group at a concentration of 60 $\mu\text{g/ml}$ ($p=0.0001$).

Our results show that the anti-inflammatory and immunomodulatory effect of ozone may be promising in the treatment of myocarditis.

Keywords: Experimental autoimmune myocarditis, ozone, treatment, mice

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Miyokardit; kalp kası hücrelerinin nekroz ve dejenerasyonu ile karakterize enfeksiyöz veya nonenfeksiyöz enflamasyonudur. Çocuklarda önemli bir morbidite ve mortalite sebebidir ve sağlıklı çocuklarda kalp yetersizliğinin en sık nedenidir (1,2). Üçüncü basamak hastanelere başvuran hastaların %0,05'inde miyokardit olduğu bildirilmiş olup; çocuklarda tahmin edilen miyokardit insidansı 1/100.000'dir (3). Klinik olarak karşımıza, asemptomatik hastalıktan kardiyojenik şoka, aritmilere ve ani ölüme kadar geniş bir yelpazede çıkabilmektedir.

Miyokarditin etyolojisi oldukça geniş olup çoğunlukla viral enfeksiyonlar, ilaç toksisite/ilaç hipersensitivite reaksiyonları ve sistemik lupus eritromatozis gibi otoimmün hastalıklardan kaynaklanır. Patogenezinde; virüsler veya otoantijenler, immün sistemi aktive ederek kompleks bir immün yanıt oluşturur. Oluşan bu immün yanıt; miyozitlerde infiltrasyona ve nekroza neden olur (4). Tanı için telekardiyografi, elektrokardiyografi, biyokimyasal kardiyak hasar belirteçleri, ekokardiyografi, kardiyak manyetik rezonans görüntüleme ve viral seroloji gibi noninvaziv tetkikler yapılmaktadır. Ancak, patolojik olaylar hücresele düzeyde geliştiği için kesin tanı endomiyokardiyal biyopsidir (5).

Miyokarditin tedavisi altta yatan nedene göre değişir. Çoğu olguda altta yatan etiyoloji belirlenemez ve sadece destekleyici tedavi uygulanır (3). IVIG veya kortikosteroidler gibi immünsüpresiflerin ve monoklonal antikolar gibi immünmodüle edici tedavilerin faydalı olduğu gösterilmişse de, sonuçlar çoğunlukla tartışmalıdır (6).

Ozon (O₃) üç oksijen atomundan oluşan atmosferde bulunan kararsız, güçlü okside edici bir gazdır. Medikal ozon, ozonun tıp alanında kullanılan şekli olup; oksijen ile belirli oranlarda karıştırılarak dolaşım sistemine veya vücut boşluklarına uygulanmaktadır. Keşfedildiği günden bu yana çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılan ozonun; anti-enflamatuvar, anit-oksidan, anti-mikrobiyal ve immünmodülatör etkilerinin olduğu bilinmektedir (7). Ozon uygulamalarının özellikle enflamatuvar sürecin yoğun olarak yaşandığı ve immün sistemin ön planda olduğu osteoartrit, romatoid artrit, Crohn hastalığı, ülseratif kolit ve atopik dermatit gibi hastalıklarda etkili olduğu bildirilmiştir (7,8). Ancak literatürde miyokardit ile ozon arasındaki ilişkiyi gösteren herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamızda;

patogenezinde enflamatuvar ve immün mekanizmaların rol oynadığı miyokardit tedavisinde ozonun etkin olup olmadığını araştırmayı planladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. MİYOKARDİT

Miyokardit, İlk olarak 19. Yüzyılın başlarında Fransız hekim Jean-Nicolas Corvisart tarafından tanımlanmıştır (9). Dünya Sağlık Örgütü/Uluslararası Kardiyoloji Derneği ve Uluslararası Kardiyoloji Federasyonu tarafından 1995 yılında, kalp kasının enflamatuvar bir hastalığı olarak kabul edilmiş olup; histolojik, immünolojik ve immünohistokimyasal kriterleri bildirilmiştir (10).

2.1.1. Epidemiyoloji

Miyokardit insidansını saptamak oldukça zordur çünkü hastalığın klinik bulguları çok çeşitlidir ve tanıyı doğrulamak için kalbin histopatolojik incelemesi gerekmektedir (2,5,11,12). Epidemiyoloji ile ilgili ipuçları otopsi çalışmaları ile sağlanmaktadır. İtalya'da yapılan bir otopsi çalışmasında miyokardit sıklığı %0,1-5,6 arasında bildirilmiştir (13).

Üçüncü basamak hastanelere başvuran çocuk hastaların yaklaşık %0,05'i miyokardit tanısı almaktadır. Çocuklarda miyokardit prevalansı düşük olmasına rağmen; konjestif kalp yetersizliği ve dilate kardiyomyopatiye yol açan nedenler arasında yaygın olarak yer almaktadır ve kalp transplantasyonu listesine alınan nonkonjenital pediatrik vakaların çoğunu oluşturmaktadır (3).

2.1.2. Etiyoloji

Etiyolojide en sık enfeksiyöz nedenler rol oynamaktadır. Bunların içerisinde de en sık viral etkenler yer alır. Çocuk ve yetişkin merkezlerinin verilerine göre; endomiyokardiyal biyopsi yapılan hastalarda onar yıllık periyodlar içerisinde yapılan değerlendirmede etiyojide yer alan viral etkenlerde değişiklik olduğu görülmüştür. Buna göre; 1970'li ve 1980'li yıllara *Coxsackievirus* çocuk ve yetişkinlerde en sık viral etken olarak saptanırken; 1990 ve 2000'li yıllarda en sık etken, *Adenovirus* (özellikle serotip 2 ve 5) ve *Enterovirus* (*Coxsackieviruses* A ve B, *Echovirus* ve *Poliovirus*) olmuştur. Son yıllarda ise; en sık viral etkenin *Parvovirus* B19 olduğu bildirilmiştir. İzole diyastolik disfonksiyonu olan yetişkinlerin %50'sinde

endomyokardiyal biyopside *Parvovirus* B19 saptanmıştır (5,14). Birçok virüs miyokardite neden olmaktadır. Bunlardan bazıları *influenza A*, *influenza H1N1*, *Cytomegalovirus*, *Herpes simplex* virüs tip 2, *Hepatit C* virüsü, *Rubella*, *Rubeola*, *Respiratuar Sinsityal virüs* (RSV), *Varicella*, *Epstein-Barr virüs*, *HIV*, *Human Herpes virüs* (HHV 6) ve kabakulak virüsüdür (5).

Bakteriler, riketsialar, protozalar, parazitler, mantarlar gibi çeşitli enfeksiyöz ajanlar da miyokardite neden olan etkenlerdir. Çeşitli ilaçlar, hipersensivite reaksiyonları, otoimmün veya kollojen hastalıkları (konnektif bağ doku hastalıkları, romatizmal ateş, romatoid artrit, Kawasaki, skleroderma ve sarkoidoz vb.) ve enfeksiyöz ajanlara karşı gelişen toksik reaksiyonlar etiyolojide yer alan diğer nedenlerdir (5). Miyokardit nedenleri Tablo 1'de verilmiştir.

2.1.3. Klinik

Miyokardit kliniği hastanın yaşına bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Genel olarak kırgınlık, halsizlik gibi grip benzeri ya da bulantı kusma gibi gastrointestinal belirtilerle karşımıza çıkabilmektedir (5).

Yenidoğan ve süt çocukluğu döneminde hastalar iştahsızlık, ateş, huzursuzluk, çevreye karşı ilgisizlik, solukluk ve terleme gibi spesifik olmayan bulgular gösterirler. Fizik muayenede solukluğa ek olarak hepatomegali, takipne ve taşikardi gibi konjestif kalp yetersizliği bulgularına sık rastlanılır. Bu dönemdeki hastaların bir kısmının intrauterin bir miyokarditin devamı şeklinde olduğu akılda tutulmalıdır (5).

Çocuk ve adölesanlarda genelde 10 ile 14 gün öncesine ait bir viral hastalık öyküsü vardır. Başlangıç semptomları halsizlik, subfebril ateş ve solukluk olabilir. Genelde iştahsızlık ve bazen karın ağrısı şikayetleri olabilir. Terleme, çarpıntı, cilt döküntüsü, egzersiz intoleransı ve genel bir yorgunluk hali görülür. Hastalığın ilerlemesiyle solunumsal problemler belirgin hale gelmeye başlar. Senkop ve kardiyak kollapsa bağlı ani ölümler görülebilir. Konjestif kalp yetersizliğinin bulguları saptanabilir. Yenidoğanların aksine, juguler venöz dolgunluk ve istirahat taşikardisi daha belirgindir. Atriyal fibrilasyon, supraventriküler taşikardi, ventriküler taşikardi ve atriyoventriküler bloklar gözlenebilen ritim bozukluklarıdır (2,5,15).

Tablo 1. Miyokardit nedenleri (5)

Enfeksiyöz etkenler	Enfeksiyöz dışı etkenler
<p><u>Viral:</u> Enterovirüsler (<i>Coxsackie A, Coxsackie B, Echovirüs, Poliovirüs</i>) <i>Adenovirüs</i> <i>Parvovirüs B19</i> <i>Cytomegalovirüs</i> <i>Herpes virüs</i> İnfluenza A ve H1N1 <i>Human Herpes Virüs 6</i> Suçiçeği Kabakulak Kızamık Kızamıkçık Kuduz Hepatit virüs B,C <i>Respiratuvar Sinsitiyal Virüs</i> <i>Human Immunodeficiency Virüs</i> <i>Epstein-Barr Virüsü</i></p> <p><u>Viral olmayan:</u> <i>Rickettsia rickettsii</i> <i>Rickettsia tsutsugamushi</i> Meningokoklar <i>Klebsiella</i> Leptospira Mycoplasma <i>Salmonella</i> <i>Clostridia</i> <i>Tuberculosis</i> <i>Trypanosoma cruzi</i> <i>Brucella</i> <i>Legionella pneumophila</i> Streptokoklar Tokso plazmozis Amebiasis <i>Toxocara canis</i> <i>Echinococcus</i> Cysticercosis <i>Trishinosis</i> <i>Actinomycosis</i> <i>Candida</i> <i>Hystoplasmosis</i></p>	<p><u>İlaçlar:</u> Sülfanamidler Fenilbütazon Siklofosfamid Asetezolamid Amfoterisin B Endometazin Tetrasiklin İzoniazid Metildopa Fenitoin Penislin Karbimazol Antrasiklinler</p> <p><u>Otoimmün hastalıklar:</u> Romatoidi artrit Romatizmal ateş Kawasaki hastalığı Sarkoidoz Ülseratif kolit Sistemik lupus eritromatozis Bağ dokusu hastalıkları Skleroderma Whipple hastalığı Sarkoidoz</p> <p><u>Toksinler:</u> Akrep Difteri</p>

2.1.4. Tanı

Miyokarditin kesin tanısı oldukça güç olup; nedeni açıklanamayan konjestif kalp yetersizliği veya ventriküler taşikardi ile başvuran çocuklarda şüphelenilmesi gerekmektedir. Miyokardit şüphesi olan hastalarda ilk olarak kardiyak hasar göstergeleri olan kardiyak enzimler ve kalp kasının sinirsel ileti sistemini gösteren elektrokardiyografi değerlendirilmelidir. Kardiyak enzimlerde artış ve/veya elektrokardiyografide miyokarditi düşündürülen bulguları olan hastalarda, miyokardit tanısını destekleyici olarak; telekardiyografi, ekokardiyografi ve kardiyak manyetik rezonans görüntüleme gibi görüntüleme araçları ve etiyolojiye yönelik olarak viral seroloji belirteçleri kullanılmalıdır. Bununla beraber; invaziv yöntem olan endomiyokardiyal biyopsi, günümüzde miyokardit tanısında altın standarttır (2,5). Ancak yöntemin komplikasyona açık olması ve duyarlılığının düşük olması nedeniyle, günümüzde sık başvuru alan bir yöntem değildir (16).

Telekardiyografi:

Miyokarditten şüphelenilen her hastada istenmelidir. Telekardiyografide pulmoner damarlanmada belirginleşme, pulmoner ödem veya kardiyomegali görülebilirken; miyokarditin erken evreslerinde normal olabilir. Asemptomatik hastalarda sadece telekardiyografide kardiyomegali saptanmasıyla miyokarditten şüphelenilebilmektedir (2,5).

Elektrokardiyografi (EKG):

Akut miyokarditin başlarında, spesifik olmamakla beraber; düşük voltajlı QRS kompleksleri, nonspesifik T dalga değişiklikleri ve sinüs taşikardisi görülebilir. EKG'de zaman zaman akut miyokard enfarktüsünde görülen bir paterne benzeyen ST segmentinde azalma veya yükselme görülebilir (2,5). Yaygın olarak bir tarama aracı olmasına rağmen, elektrokardiyografinin çocuk hastalarda miyokardit tanısı için %47 duyarlılığa sahip olduğu bildirilmiştir (17). Durani ve arkadaşları miyokarditi olan çocuk hastaların %93-100'ünde anormal EKG bulguları olduğunu bildirmişlerdir (15). Bununla birlikte; normal bir EKG, hastalık olasılığını dışlamaz.

Ekokardiyografi:

Ekokardiyografi; sol ventrikül yapısını, duvar hareket anormalliklerini, bölgesel veya yaygın ventrikül disfonksiyonunu ve kapak yetmezliğini değerlendirmek için şüpheli vakalarda yapılacak en faydalı görüntüleme yöntemidir (2,5). Miyokarditte, sol ventrikül dilatasyonu, sol ventrikül hipertrofisi, sol ventrikül fonksiyonlarında bozukluk, segmental duvar hareket bozukluğu ve yaygın bir hipokinezi görülebilir. Özellikle miyoperkardit seyrinde perikardiyal effüzyon gelişimi görülebilir. Doppler ekokardiyografide mitral kapakta yetmezlik saptanabilir. Ekokardiyografi bulguları değişken olup miyokardite spesifik değildir, bu nedenle özellikle tedaviye yanıtın değerlendirilmesinde daha yararlıdır (5).

Laboratuvar:

Klinik olarak akut miyokarditten şüphelenildiğinde; kardiyak hasar belirteçlerine ek olarak akut faz reaktanları, ventrikül fonksiyonu testleri ve viral seroloji değerlendirilmelidir (2).

Serolojik belirteçler miyokard hasarının belirlenmesinde yaygın olarak kullanıldığı gibi prognoz hakkında bilgi sağlamak için kullanılabilir. Bununla birlikte; miyokarditi, akut koroner sendromlardan ayırabilen serolojik belirteçler bulunmamaktadır. Klasik miyokardiyal hücre hasar belirteçleri olan troponin ve kreatin kinaz (CK); miyokarditte yükselmektedir (5). Yüksek troponin düzeyleri, çocuklarda miyokarditin tanısında kullanılırken; erişkin hastalardaki gibi prognozu belirlemek için yeterli değildir. Troponin düzeyleri biyopsi ile kanıtlanmış vakaların %35-45'inde yükselmiş saptanmaktadır (18). Miyokarditli çocuklarda seri NT-proBNP ölçümlerinin, tedavi yanıtını değerlendirmede yararlı olacağı gösterilmiştir (19).

Troponin T'nin eşik değeri 0,1 ng/ml olarak kabul edildiğinde; miyokardit tanısında duyarlılığı %53 ve özgüllüğü %94'tür (18). Troponin I'nin ise; miyokardit tanısında duyarlılığı %34, özgüllüğü %89'dur. Duyarlılık değerleri düşük olduğu için birçok merkezde troponin T ve troponin I birlikte çalışılmaktadır (20). Troponin T miyokard hasarından 4-8 saat sonra kanda yükselmeye başlamakta, 12-24 saatte pik yapmakta ve 10-14 günde normale dönmektedir (21). Kreatin kinazın (CK); CK-MB, CK-BB, CK-MM olmak üzere 3 izoformu vardır. CK-MB izoformu miyokard

hasarına daha özgündür. Miyokard hasarından sonra 4-10 saat içerisinde yükselmekte, 24 saatte pik yapmakta ve 2-3 günde normale dönmektedir (22).

Kalp yetersizliğinin erken tanısında ise brain natriüretik peptid (BNP) önemli bir belirteçtir (5). BNP; kardiyak duvar kaslarından hücre içine büyük bir molekül salgılanır ve bu büyük molekül ikiye parçalanır. Parçadan bir tanesi pro-BNP'dir. Miyokard hücresindeki pro-BNP kalbin gerilmesiyle birlikte kana verilir. Pro-BNP, NT-proBNP ve BNP olarak 2 farklı yapıya parçalanır. BNP'nin depolandığı yer ventriküllerdir. Bu nedenle ventriküler bozukluklarda BNP diğer natriüretik peptitlere göre daha duyarlı ve özgüdür. Ventriküllerdeki volüm genişlemesi ve basınç yükselmesiyle doğru orantılı olarak salınan BNP miktarı da artış göstermektedir (23). BNP düzeyi, sistolik fonksiyonları bozulmuş olan hastalarda normal sistolik fonksiyonlu hastalara göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (24,25).

Etiyolojiye yönelik olarak; kan, idrar, gaita gibi periferik örneklerde viral kültürler; miyokardite neden olan etkeni saptamakta güvenilir değildir (5). Miyokardiyal doku örneğinde moleküler çalışmalarla tanıya gidilebilmektedir. Polimeraz zincir reaksiyonu, viral genomu miyokardiyal dokuda göstermek için kullanılan, özgüllüğü ve duyarlılığı yüksek bir yöntemdir. Enterovirüsler, *Adenovirüs*, *Cytomegalovirüs*, *Parvovirüs*, *Respiratuar Sinsisyal virüs*, *Epstein-Barr virüs*, *Herpes Simpleks Virüs*, *Influenza A virüs* ve kabakulak virüsünün viral genomları polimeraz zincir reaksiyonu ile gösterilebilmektedir. Viral genom periferik kan örneğinde genellikle gösterilemezken; entübe hastalardaki trakeal aspirat örneklerinde daha kolay gösterilebilmektedir. Bu durum tanı için endomiyokardiyal biyopsi ihtiyacını azaltmaktadır (26).

Kardiyak Magnetik Rezonans Görüntüleme (MRG):

Anatomik ve morfolojik bilgi verme açısından oldukça yararlıdır. Enflamasyonun başlarında, miyokard dokusundaki ödem tespit edebilir. Acil durumlarda ve küçük çocuklarda genel anestezi gereksinimi nedeniyle kullanımı sınırlıdır (27). Kardiyak MRG özellikle semptomların başlamasından sonraki 14 gün içinde miyokard enflamasyonunun ve miyozit hasarının teşhisinde en önemli görüntüleme aracı olduğunu gösterilmiştir (28).

Endomiyokardiyal Biyopsi (EMB):

Endomiyokardiyal biyopsinin miyokardit tanısı için klinikte rutin olarak kullanımı önerilmese de, tanı için altın standarttır (2,5,29). "Avrupa Kardiyoloji Derneği Miyokardiyal ve Perikardiyal Hastalıkları Çalışma Grubu" 2013 yılında, klinik olarak şüpheli miyokarditi olan tüm hastalara selektif koroner anjiyografi ve endomiyokardiyal biyopsi yapılmasını önermiştir (30). Endomiyokardiyal biyopsi endikasyonları Tablo 2'de gösterilmiştir (31).

Kardiyak kateterizasyon sırasında sağ ventrikülden endomiyokardiyal biyopsi alınır (5). Alınan biyopsi materyali Dallas Kriterleri'ne göre enflamasyon yönünden değerlendirilir. Buna göre; miyokardit, koroner arter ya da başka bir hastalığa bağlı olmadan miyokardın enflamasyonu ile birlikte miyozitlerin nekroz ve/veya dejenerasyonlarını içeren bir süreç olarak tanımlanmaktadır. Biyopsi örnekleri enflamasyon ve nekrozun birlikte olduğu olgularda *aktif miyokardit*, miyozit nekrozu olmadan yalnızca enflamatuvar hücre infiltrasyonu varsa *borderline miyokardit* ya da ikisi de yoksa *negatif* olmak üzere üçe ayrılır. Enflamatuvar hücreler ise; lenfositik, eozinofilik ya da granülomatoz olarak tanımlanır (12).

Biyopsinin özgüllüğü %3-63 arasında değişkenlik göstermektedir. Olguların %80'ine tanı koyabilmek için 17 veya daha fazla biyopsi örneği alınması gerekmektedir (5). Duyarlılığı, örnekleme hatası nedeniyle sınırlıdır ve bu prosedürle ilişkili majör komplikasyonların oranı, deneyimli merkezlerde yapıldığında %1-5 arasında değişmektedir (32). Çocuk hastalarda EMB ile ilişkili komplikasyonlarından bazıları; atriyal taşiaritmi, anestezinin neden olduğu aritmi, geçici hipotansiyon, geçici ST-T dalga değişiklikleri, elektriksel kardiyoversiyon gerektiren ventriküler fibrilasyon ve miyokardiyal perforasyondur (33).

Tablo 2. Endomiyokardiyal biyopsi endikasyonları (31)

1.Standart tedaviye yanıt alınamayan akut ya da subakut kalp yetmezliği bulguları
2.Uygun farmakolojik tedaviye rağmen ejeksiyon fraksiyonunun giderek azalması
3.Hemodinamik olarak önemli aritmilerin gelişmesi, özellikle ilerleyici kalp blokları ve ventriküler taşikardi
4.Kalp yetmezliği ile birlikte döküntü, ateş ve periferik eozinofili varlığı
5.Sistemik lupus eritematozus, skleroderma, poliarteritis nodosum gibi kollajen doku hastalığı varlığı
6.Amiloidozis, sarkoidozis veya hemakromatozis gibi bilinen bir hastalığı olan çocukta yeni ortaya çıkan kalp yetmezliği
7.Dev hücreli miyokardit varlığından şüphelenilmesi (genç yaş, yeni subakut kalp yetmezliği veya etiyojisi açıklanamayan ilerleyici aritmiler)

2.1.5. Patofizyoloji

Etiyolojide yer alan en sık etkenlerden olan viral enfeksiyonlar, miyokardiyal enflamasyonu ve miyokardiyal hasarı tetikleyerek kalpte büyümeye ve sol ventrikülde diyastol sonu çap artışına neden olurlar. Normalde "*Frank-Starling yasasına*" göre ventkül çapındaki genişleme, volüm artışına dolayısıyla kalbin kasılma gücünde ve kardiyak debide artışa neden olmalıdır. Ancak miyokardit varlığında kalp kası, bu uyarıya kasılma gücünün artışı şeklinde yanıt veremez ve kalp debisi düşer. Pozitif inotropik etki ile sistemik kan akımını sağlamak için sempatik sinir sistemi aktive olur ve bu durum periferik vazokonstrüksiyona, dolayısıyla da kalbin ön yük artışına yol açar. Sonuçta konjestif kalp yetersizliği tablosu belirginleşir. Ventrikül diyastol sonu hacim ve basıncında artış olur, bu artış sırasıyla sol atriyumda ve pulmoner venöz sistemde basınç artışına yol açar. Venöz vasküler hidrostatik basınçtaki artış kapiller membranlardan sıvı transüstasyonuna, sonuçta akciğerlerde ve vücutta ödeme neden olur. Miyokarditin iyileşme fazında hasarlı miyozitlerin yerini fibroblastların alması ile skar dokusu gelişir. Skarlaşmanın derecesi yetersizlik tablosunun devamını veya düzelmesini belirler (5).

2.1.6. Patoloji

Makroskopik ve Mikroskopik Bulgular

Patolojik bulgular nonspesifik olup, etiyolojiden bağımsızdır. Kalp ağırlığı artmış ve tüm odalar büyümüştür. Ventrikül duvarlarında genellikle hipertrofi görülür. Miyokard dokusu gevşek ve soluk olup, epikardiyal yüzeyde genellikle peteşiyal kanamalar vardır. Perikardiyal effüzyon daha ziyade, miyoperikarditte görülür. Kapaklar ve endokard genellikle sürece katılmaz (5).

Sol ventrikül içinde mural trombüsler görülebilirken; koroner ve serebral damarlarda küçük emboliler izlenebilir. Koroner emboliler nadir olarak iskemik hasar sonucunda, aritmilere neden olabilir. *Parvovirüs B19* koroner endotel dahil olmak üzere tüm endoteli enfekte ettiği için *Parvovirüs B19* miyokarditli çocuklarda koroner yetmezlik sık görülmektedir (5).

Miyokarditin erken döneminde miyokardda sıklıkla lenfosit, plasma hücresi ve eozinofil gibi mononükleer hücrelerin infiltrasyonu olur. Polimorfonükleer hücreler ve viral partiküller ise seyrekir. Özellikle *Coxsackievirüs* gibi ağır enfeksiyonlarda ciddi miyokardiyal nekroz ve ödem görülür. *Cytomegalovirüs* miyokarditinde perivasküler lenfosit ve plasma hücresi görülebilir. *Rickettsiae*, *Varicella*, *Trypanosoma*, diğer parazitler ve sülfonamidlere karşı gelişen reaksiyonlarda perivasküler lenfosit ve plasma hücresi infiltrasyonu daha belirgindir (5).

Bakteriyel miyokardit, mikroabseler oluşturarak süpüratif değişikliklere sebep olur. Çoğunlukla perikardiyal tutulumunda eşlik ettiği miyoperikardit tablosu görülür. Difteri ekzotoksinin sinirsel ileti sisteminde hasara yol açması nedeniyle, Difteri miyokarditinde aritmiler ve tam atrioventriküler bloklar sık görülür. Ayrıca mikroskopik olarak trigliserid birikimi ile miyofibrillerde yağsı değişiklikler görülebilir. *Trichinella*'nın neden olduğu parazitik miyokarditte ise; infiltrasyon odaklarında lenfosit ve eozinofillere rastlanmasına rağmen genellikle larvalar tespit edilemez (5).

Dev hücreli miyokardit nadir olarak görülmekle birlikte, genellikle çocuklar ve genç erişkinlerde görülebilen ve mortalite riski yüksek olan bir hastalıktır. Romatoid artirit, romatizmal kalp hastalığı, sarkoidoz, timoma, ilaç hipersensitivitesi ve diğer otoimmün hastalıklarda dev hücreli miyokarditin görülmesi hastalığın otoimmünite ile yakından ilişkili olduğu düşündürmektedir (5).

İmmünoloji

Coxsackievirüs B miyokarditinin immünopatogenezi deneysel modellerden öğrenilmiştir. *Coxsackievirüs B* enfeksiyonundan 24-72 saat sonra viremi gözlenmektedir. İnokulasyondan (deney hayvanına hastalık etkeninin ekleme işlemi) sonra virüs titresi giderek azalmakta ve 7-10 gün sonra viral organizmaya rastlanması mümkün olmamaktadır. Virüs titresi azalırken antikor konsantrasyonunun artması, antikorların viral eliminasyonundaki rolünü göstermektedir. *Coxsackievirüs B* aracılı miyokardit modelinde aktif enfeksiyondan 5-10 gün sonra makrofajlar görünmeye başlar (5).

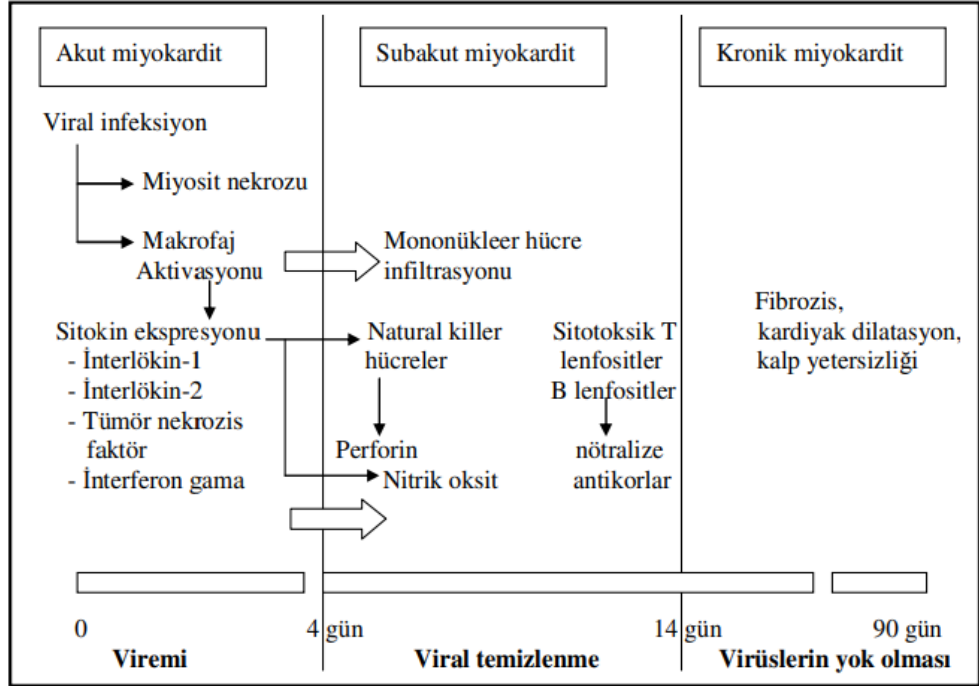
Deneysel modellerde miyokarditin prognozu, farenin cinsine, yaşına, cinsiyetine, egzersiz durumuna ve viral patojene bağlıdır. Patogenezde önemli olan iki unsur; virüsün direk olarak miyozitlerde yaptığı hasar ve sitotoksik T lenfositlerin aktivasyonu sonucunda konağın verdiği immün yanıtıdır. T hücre aracılı enflamasyon; antikor ve kompleman aracılı sitotoksikite sonucu gerçekleşir. Balb/c farelerde yapılan çalışmalarda östrojenin anti-enflamatuvar etkisi ve testosteronun pro-enflamatuvar etkisi sonucunda erkek farelerde miyokarditin daha hızlı ve ağır seyrettiği gözlemlenmiştir (5).

Otoimmünite

Viral miyokarditte otoimmünite; adenin nükleotid translokator (ANT) ve miyozine karşı üretilen otoantikorlar nedeniyle ilişkilidir. ANT enerjiyi mitokondriden hücreye aktaran bir otoantijendir. Anti-ANT antikorları kardiyak disfonksiyonla yakından ilişkilidir (5). Kardiyomiyopati farelerde ANT-1 geninin olması, ANT-1 geninin kardiyak disfonksiyondaki rolünü desteklemektedir (34). Miyokarditli hastalarda yeni otoantikorlar tanımlanmaktadır. Bunlar, dihidrolipoamid dehidrogenaz ve sarkomer spesifik kreatin kinazdır (35). Ancak, otoantijenlerin patogenez açısından önemi hala bilinmemektedir.

Miyokarditten Dilate Kardiyomyopatiye İlerleyiş ve Sitokilerin Rolü

Viral miyokardit patogeneziindeki bilgiler deneysel hayvan modellerinden elde edilmektedir. Viral miyokarditten sonra dilate kardiyomyopati geliştiği ve viral ajanların otoimmüniteyi tetiklediği bilinmektedir. Çeşitli deneysel çalışmalar, sitokin aracılı immün cevabın kronik miyokardite sebep olduğunu göstermektedir (36,37). Sitokinler, antikor üretiminin düzenlenmesine katkıda bulunur. Viral miyokarditin akut hasarlanmadan kronik dilate kardiyomyopatiye ilerleyiş; üç fazda oluşmaktadır ve Şekil 1’de gösterilmiştir (38).



Şekil 1. Miyokardit seyri (38)

1.Akut Miyokardit, Viral Faz: Miyokardit çoğunlukla, patojenik potansiyeli olan virüsün (Örn. *Coxsackievirüs*, *Parvovirüs* B19) vücuda girmesiyle başlar, genellikle 3-4 gün sürer. Virüs duyarlı konakta; uygun dokularda çoğalarak, hematojen ve/veya lenfojen yolla miyokarda ulaşır. Virüs; hedef hücrelere ulaşınca, spesifik reseptör veya reseptör komplekslerini kullanarak hücreye girer (5,39,40). *Coxsackievirüs*; bir junction proteini olan ve hücreleri birbirine bağlayan coxsackie-adenoviral reseptörü kullanır. Virüsün hücreye girişi, hücre içi sinyal yolları olan tirozin kinazları (*p56*, *Fyn*, *Abl*) aktive eder. Bu sinyal yollarının aktivasyonu, konak hücreye daha fazla virüsün girişine neden olur ve aynı zamanda *p56* ve *Fyn* üzerinden immün hücreleri aktive eder. Miyozit içine giren virüsler replike olarak doğrudan miyozitlerin hasarına ve akut enflamasyona neden olarak makrofaj hücrelerinin aktivasyonuna neden olur. Makrofajların aktivasyonu sonucunda; TNF- α , IFN-y, IL-1 β ve IL-6 gibi enflamatuvar sitokinler salınarak viral eliminasyon başlar. Ancak bazen virüs eliminasyonu uzayarak ikinci faz olan otoimmün miyokardit fazı gelişir (4,9,38,39,41).

IL-1 ve TNF- α miyozitlerin β -adrenerjik cevaplarını inhibe ederler. TNF- α immün cevabı güçlendirerek hücre apoptozisini uyarır. Miyokardit, dilate kardiyomiyopati ve kronik kalp hastalığı olan hastalarda TNF- α , IL-1 ve granülosit koloni edici faktör gibi enflamatuvar sitokinlerin düzeyleri yüksektir ve bu enflamatuvar sitokinler negatif inotropik etki gösterirler (5).

2.Subakut Miyokardit, Otoimmün Faz: Subakut miyokardit fazı, viral patojenin vücuda girmesini takiben 4. günden sonra başlar ve 14 gün boyunca devam eder. Bu fazda virüsle enfekte miyozitlere karşı immün yanıt oluşurken; öte yandan doku hasarını engellemek üzere enflamasyon sınırlandırılmaya çalışılır. Ancak bazen viral antijenler kronik olarak enflamasyonu tetikler ve kronik miyokardite neden olur. Örneğin; *Coxsackievirüs* gibi bir viral genom varlığı hücre içinde yeniden yapılanmaya sebep olarak kronik süreçte dilate kardiyomiyopatiye sebep olabilir (5). Miyozitlerin üzerinde "toll-like" reseptörler (TLR) bulunur. Bu reseptörler virüs, bakteri, yabancı nükleik asitlerin antijenik yapısını tanıyan ve nükleer transkripsiyon faktörlerinin aktiflendiği kaskadı tetikler. Böylece enflamatuvar sitokin üretimi ve immün aktivasyon başlamış olur. Doğal bağışıklığın bu şekilde tetiklenmesinden sonra; T hücrelerinin aktivasyonu, devamında B hücrelerinin uyarılması ve viral antijenlere karşı antikor üretimi ile sonuçlanan kazanılmış

bağışıklık da uyarılmış olur. Subakut süreçte gelişen bu olaylar bazen kronik enflamasyona dönüşerek miyozitlerde nekroz, fibroz ve yeniden yapılanmaya sebep olabilir (4,9,38,39).

Kazanılmış bağışıklık sisteminde önemli bir rol alan IL-2; T hücreleri için ana büyüme faktörü olup, doğal öldürücü hücreleri ve monositleri aktive eder. Ayrıca T hücreleri üzerinde otokrin etkileri vardır; akut viral fazda, doğal öldürücü hücrelerin aktive ederek miyokard hasarını azaltırken; subakut ve non viremik fazda T hücre infiltrasyonunu artırır. Bu da hastalığın prognozunu ağırlaştırır. IL-12, Th1-spesifik immün yanıtla sitotoksik aktiviteyi artırır (5,42).

Nitrik oksit sentaz (iNOS) sitokinlerin etkisini arttırabilir. iNOS üretimi otoimmün miyokardit patogenezi de önemli role sahiptir (5). Aminoguanidine (iNOS inhibitörü) verilen sıçanlarda sadece fokal infiltrasyona rastlanırken; aminoguanidine verilmeyen sıçanlarda ise önemli düzeyde enflamatuvar infiltrasyona ve miyozit hasarına rastlanmıştır. Ek olarak iNOS inhibitörü verilen sıçanlarda CK seviyeleri azalma ve enflamasyonun en yoğun olduğu dönemde IL-2, IL-3, TNF- α ve iNOS düzeylerinde artış olduğu gösterilmiştir. IL-10 artışı ise; enflamasyonun yatışıp iyileşme dönemine girdiğinde dönemde görülmüştür (43).

3.Dilate Kardiyomiyopati, Kronik Miyokardit Fazı: Viral patojenin vücuda girmesinden 2 hafta sonra hala virüs eliminasyonunun devam etmesi ile oluşan kompleks immün yanıt ile oluşur. Enflamasyon sırasında açığa çıkan sitokinler, matriks metalloproteinazları aktifleyerek kalp interstisyumundaki kollajen ve elastinin erimesine ve ürokinaz-tip plazminojen aktivatörünü tetikleyerek kardiyak dilatasyona sebep olur. Açığa çıkan sitokinlerden "*transforming growth factor*" (TGF), patolojik fibrozise yol açar. Kronik enflamatuvar süreç kalpte yeniden yapılanmaya, dolayısıyla yapısal bozulmaya ek olarak fonksiyonel kalp yetersizliğine neden olabilir (4,9,38,39).

2.1.7. Tedavi

Günümüzde miyokardite özgü spesifik bir tedavi yöntemi olmamakla birlikte, destek tedavisi ve semptomatik tedaviler uygulanmaktadır. Tedavide ilk yapılması gereken aktivite kısıtlamasıdır (2). Miyokardiyal enflamasyon ve nekroza bağlı olarak gelişen miyokard hasarından dolayı ortaya çıkan ventriküler aritmiler, egzersizle tetiklenebilmektedir. "Bedhesta Konferansı" ve "Avrupa Kardiyoloji Derneği" semptomlar başladığı andan itibaren altı ay boyunca rekabetçi sporlardan kaçınılmasını önermektedir (30,44).

Medikal tedavi hastaların klinik bulgularına göre düzenlenmelidir. Dekompanse kalp yetersizliğinde; diüretikler standart tedavi olup gecikmeden başlanmalıdır. Hemodinamik olarak stabil olan hastalar, anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE) inhibitörlerinden ve anjiyotensin reseptör blokerlerinden (ARB) fayda görebilmektedir (5). ACE inhibitörleri ve ARB'ler; kardiyak fonksiyonları düzeltmekte, yeniden yapılanmayı yavaşlatmakta, hastane yatış süresini ve mortaliteyi azaltmaktadır (5,45). "Uluslararası Kalp ve Akciğer Transplantasyon Topluluğu" ve "Kanada Kardiyovasküler Cemiyeti" konjesyon ve kalp yetmezliği bulguları olan hastalara loop diüretikleri verilmesini önermektedir (46,47).

Artmış olan sol ventrikül dolum basıncı vazodilatörlerle (intravenöz nitroprussid veya nitroglicerol gibi) ve diüretiklerle tedavi edilmelidir. Dekompanse kalp yetmezliği ve düşük kan basıncı olan bazı hastalar vazodilatörlerden yeterince fayda görmemekte ve inotrop desteği gerekmektedir. İnotropik ajanlar dolaşımı sürdürmek, semptomları düzeltmek ve hedef organ fonksiyonlarını düzeltmek için gereklidir (48). Pozitif inotropik ajanlar dopamin, dobutamin, epinefrin ve milrinondur. Dopamin; dopaminerjik ve adrenerjik reseptörler üzerinden norepinefrin salınımını artırarak pozitif inotropik etki gösterir. Dobutamin; bir semptomimetik olup, miyokard dokusundaki beta reseptörlerini uyararak pozitif inotropik etkiye yol açar. Pulmoner ve periferel vasküler direnci azaltır. Epinefrin, miyokartta hem alfa hem de beta reseptörleri uyarmaktadır. Kardiyojenik şok ve hayatı tehdit eden durumlarda intravenöz infüzyon şeklinde verilebilmektedir. Epinefrin; kan basıncını, kalp hızını ve kontraktileti yükseltmektedir (48). Milrinon ise, fosfodiesteraz inhibitörü olup; artıyüğü düşürerek inotropik etki yapmaktadır. Aynı zamanda pulmoner vasküler direnci azaltmakta ve diğer inotropiklere göre daha az taşikardi yapmaktadır (49).

Beta-blokerler, kalp yetersizliğine bağlı mortalite ve morbiditeyi azaltmaktadır. Deneysel otoimmün miyokardit modelleri incelendiğinde karvedilolün kardiyoprotektif etkileri olduğu ve enflamatuvar sitokinleri baskıladığı bulunmuştur (50,51).

Spironolakton ve eplerenon gibi aldosteron antagonistleri miyokarditin akut fazından sonra kalıcı kalp yetersizliği gelişen çocuklarda kullanılmaktadır (52). ACE inhibitörleriyle birlikte kullanıldığı zaman böbrek fonksiyonlarını ve serum potasyum düzeyini yakından takip etmek gerekir. Selektif aldosteron antagonisti olan eplerenonla ilgili viral miyokarditli farelerde yapılan bir çalışmada, eplerenon tedavisi almış farelerin yaşam oranının arttığı, miyokardiyal fibrozis alanlarının küçüldüğü, enflamatuvar sitokinlerin ve kardiyak yeniden yapılanma faktörlerinin azaldığı görülmüştür (53).

İnsan B tipi natriüretik peptidin rekombinant formu olan nesiritidin; çocuklarda dekompanse kalp yetmezliğinde güvenli olup, kardiyak dolum basınçlarını düşürdüğü gösterilmiştir (54).

Bazı hastalar uygun medikal tedaviye rağmen, son dönem kalp yetersizliğine ilerlemektedir. Bu durumda mekanik dolaşım desteği tek seçenektir (48). ECMO (Ekstrakorporeal Membran Oksijenasyonu) ve VAD (ventriküler destek cihazları) kullanımına bağlı yaşam oranı %25-83 arasında bildirilmiştir (55). Kardiyojenik şok tanısında en sık kullanılan mekanik cihaz ECMO'dur (55). "Amerikan Pediatrik Sağlık Bilgi Sistemi" verilerine göre miyokarditli hastaların %18,9'unda ECMO kullanılmış ve ECMO kullanılan 97 hastadan %25,8'i eksitus olmuş, %13,4'ü kalp nakline gitmiştir (56). "Ekstrakorporal Yaşam Desteği Topluluğu" kayıtlarına göre 1995-2006 yılları arasında ECMO uygulanan hastaların %1,3'ü miyokardit hastasıdır (57). Bebek, çocuk ve genç erişkinlerde yapılan bir kohort çalışmada (58), ECMO kullanan hastaların %61'inin hastaneden taburcu edildiği gösterilmiştir. ECMO uygulamasında morbidite; enfeksiyon, kanama, aritmiler, tromboz ve renal yetmezlikle yakından ilişkilidir. Bu cihazlar hastaların kardiyak fonksiyonları geri dönene kadar kullanılmaktadır. VAD; venöz sisteme perkütan olarak yerleştirilen ventrikülleri boşaltan geçici dolaşım desteği cihazıdır. Bu cihazlar transplantasyona gidene kadar zaman kazanmak için kullanılmaktadır (55).

Viral miyokarditte, virüsün yok edilmesinde immünitenin rolü nedeniyle, konak immün sistemini hedef alan immünmodülatör tedavilerin etkili olabileceği düşünülmüştür. Bu konuda çalışmalar kısıtlı sayıdadır ve halen tartışmalıdır. Uygulanan bazı immünomodülatör stratejiler arasında kortikosteroidler, intravenöz immünoglobulin (IVIG), azatioprin ve siklosporin ile immünsüpresyon vardır (59). Miyokarditli çocuklarda yapılan bir çalışmada, kombine siklosporin ve steroid kullanımının prognozu iyileştirdiği bildirilmiştir (60). Üç kronik miyokarditli bebekte yapılan farklı bir çalışmada (61), azatioprin ve prednizolon ile immünosüpresif tedavi sonucunda ekokardiyografi bulgularının düzeldiği gösterilmiştir. Miyokarditli çocuklarda kortikosteroid tedavisinin faydası tartışmalıdır (62). Son zamanlarda yapılan çalışmalar kortikosteroidler ve/veya siklosporin gibi diğer immünosüpresif ajanlarla tedavi edilen çocukların sol ventrikül ejeksiyon fraksiyonunda ve semptomlarında düzelme olduğunu bildirilse de, nihai sonuçta hiçbir farklılık olmadığını göstermiştir (63-65). Akut miyokarditli çocuklarda immünsüpresif tedavi kullanımının sistematik olarak gözden geçirmesinde araştırmacılar; bu tedavilerin tedavi rejimindeki rolünü daha net tanımlamak için çok merkezli, randomize, kontrollü çalışmaların yapılması gerektiğini bildirmişlerdir (66).

IVIG'in miyokardit tedavisindeki etkinliğine dair değişken sonuçlar olsa da; birçok merkez akut miyokarditli çocukların tedavisinde 24 saatte 2 g/kg'lık yüksek dozda IVIG'i rutin immünmodülatör tedavinin bir parçası olarak kullanmaktadır (27). Yapılan bir çalışmada, IVIG ile tedavi edilen miyokarditli çocukların bir yıllık sağkalım ve sol ventrikül fonksiyonlarında iyileşme olduğu gösterilmiştir (67). Ancak yetişkin hastalarda yapılan randomize kontrollü bir çalışmada ise, IVIG ile tedavi edilen hastalarda sağkalımda veya sol ventrikül fonksiyonunda önemli bir değişiklik bulunamamıştır (68). Robinson ve arkadaşları (69), 2005 yılında çocuk ve yetişkin hastalarda yapılan tüm çalışmaları gözden geçirdikleri meta-analizde; akut miyokardit tedavisinde IVIG'in rutin kullanımını desteklemek için yeterli kanıt olmadığı sonucuna varmışlardır. Diğer bir çalışmada ise (70); IVIG tedavisi ile sağkalım oranının daha yüksek olduğu, ancak tedavi edilen çocuk hastaların sol ventrikül fonksiyonlarında anlamlı bir değişiklik olmadığı gösterilmiştir. Cochrane meta-analizinde (2015); çocuk hastaların IVIG tedavisine yetişkin hastalara göre daha iyi yanıt verdiği bildirilmiştir (71).

Miyokarditin özgün bir tedavisi olmadığı için yeni tedavi arayışları devam etmektedir. Çin'de yapılan 2177 kişiyi kapsayan 20 klinik çalışma sonucunda bitkisel

ilaçlardan özellikle ginseng enjeksiyonundan sonra semptomlarda düzelme izlenmiş ancak anlamlı sonuçlar bulunamamıştır (72).

Literatürde hayvanlarda (fare ve sıçan) yapılan deneysel otoimmün miyokardit modellerinde tedaviye yönelik çok sayıda çalışma karşımıza çıkmaktadır (50,51,53,73-86). Pamukçu ve arkadaşları (73); sıçanlarda oluşturdukları deneysel otoimmün miyokarditte, obestatinin anti-enflamatuvar etkisinin miyokardit üzerinde araştırmışlar, histolojik olarak iyileşmeye ek olarak sol ventrikül fonksiyonlarında ve anti-enflamatuvar sitokin seviyelerinde artış, enflamatuvar sitokinler ve kardiyak hasar göstergesi olan troponin düzeylerinde azalma olduğunu bildirmişlerdir. Bir beta-bloker olan karvedilol ile yapılan çalışmalarda (50,51); karvedilolün enflamatuvar sitokinleri baskılayarak kardiyoprotektif etkilerinin olduğu, ventrikül fonksiyonları düzelttiği ve troponin düzeylerini azalttığı gösterilmiştir. Kalp yetersizliği ve hipertansiyon tedavisinde kullanılan ACE inhibitörü olan lisinoprilin de sıçanlarda kardiyoprotektif etkisi gösterilmiştir (74). Yuan Z. ve arkadaşları (75), diğer bir ACE inhibitörü olan temokaprilin; sıçanlarda otoimmün miyokardit üzerine etkisini araştırmış ve histolojik olarak iyileşme olduğunu bildirmişlerdir. Bir ARB olan olmesartanın sıçanlarda otoimmün miyokardit üzerine etkilerinin araştırıldığı çalışmada ise (76), olmesartanın otoimmün miyokarditte enflamasyonu baskılayıp, hemodinamik fonksiyonları düzelterek kardiyoprotektif etkilerinin olduğu gösterilmiştir. Selektif aldosteron antagonisti olan eplerenonun; miyokarditli farelerde yaşam oranını arttırdığı, miyokardiyal fibrozis alanlarını küçülttüğü, enflamatuvar sitokinlerin ve kardiyak yeniden yapılanma faktörlerini azaldığı bildirilmiştir (53). Li WM. ve arkadaşları (77), atorvastatinin; otoimmün miyokarditli sıçanlarda, immünmodulatör etki yaparak enflamatuvar sitokin olan interferon gama (IFN- γ) ve IL-2 düzeylerinde azalma; anti-enflamatuvar sitokinler olan IL-4 ve IL-10 düzeylerinde artma olduğunu göstermişlerdir. Sitokin düzeylerindeki bu değişime eşlik eden histopatolojik iyileşmenin de olduğunu bildirmişlerdir. Hücreler arası sinyal iletimini sağlayan protein kinaz enzimlerinden Protein Kinaz C'nin inhibisyonunu sağlayarak yapılan bir çalışmada, Protein Kinaz C inhibisyonunun miyokardit gelişimini önlediği gösterilmiştir (78). Lu ve arkadaşları tarafından yarı esansiyel aminoasit olan taurinin miyokardit üzerine olumlu etkileri gösterilmiştir (79). Başka bir çalışmada ise; 1,25-OH₂ vitamin D3'ün deneysel otoimmün miyokardit oluşturulan farelerde sol ventrikül enjeksiyon fraksiyonunda artış ve histolojik olarak düzelme sağladığı bulunmuştur (80). D vitamini öncülü olan

kolekalsiferolün, otoimmün miyokarditli Balb/c farelerde kalp ağırlığını ve apoptozisi azalttığı gösterilmiştir (81). Benitez ve arkadaşları (82), bir nöropepit olan Vazokaktif İntestinal Peptit (VIP)'in enflamatuvar ve otoimmün yanıtları düzenleyerek akut miyokardit ve ateroskleroza iyileştirdiğini bildirmişlerdir. Akut dekompanse konjestif kalp yetersizliği tedavisinde kullanılan, kalsiyum duyarlaştırıcı bir inotropik ajan olan levosimendanın; viral miyokardit geliştirilen farelerde, miyozitlerdeki enflamasyonu ve apoptozisi azaltarak sol ventrikül fonksiyonlarını düzelttiği gösterilmiştir (83). Milenkovic M. ve arkadaşlarının otoimmün miyokarditli sıçanlarda fusidik asitin etkilerini araştırdıkları bir çalışmada (84), fusidik asitin enflamatuvar sitokinleri baskılayarak hem klinik, hem de histolojik iyileşme sağladığı gösterilmiştir. Mito ve arkadaşları (85), Hint ve Çin tıbbında sıklıkla kullanılan bir bitki olan zerdeçalın (kurkumin), sıçanlarda oluşturulan otoimmün miyokarditte enflamasyonu azalttığını saptamışlardır. Liu ve arkadaşları da (86), Çin tıbbında yaygın olarak kullanılan berberinin; miyokarditli sıçanlarda enflamasyonu baskılayarak kalbi koruduğunu göstermişlerdir.

2.1.8. Prognoz

Çocukluk çağı miyokarditlerinde prognoz; çocuğun yaşına ve altta yatan enflamatuvar süreçlere bağlı olarak değişir (2). Akut miyokardit, özellikle yenidoğanlarda ve ilk bir yaşta ciddi hemodinamik bozukluklara yol açarak erken mortaliteye neden olur. Akut tablo geriledikten sonra kronik hastalık gelişme riski her zaman mevcuttur. Dilate kardiyomyopati ölümcül ve riskli bir tablo olsa da; miyokardit sonrası dilate kardiyomyopati gelişen hastaların %50-80'inin akut tablodan sonra iki yıl içinde düzelebildiğini gösteren veriler bulunmaktadır (29).

2.2. OZON

Ozon (O_3), üç oksijen atomundan oluşan oda sıcaklığında renksiz, karakteristik kokusu olan bir gazdır. İsmi Yunanca “koklamak” manasına gelir. Atmosferi oluşturan diğer gazlara göre, atmosferde oldukça düşük oranda bulunan ozon; iklim ve canlıların korunmasında önemli rol oynamaktadır. Ozon, dünyanın 25-30 km üzerinde ozonosfer katmanında yer alır ve zararlı ultraviyole ışınların dünyaya gelmesini engeller. Ozon tükenmesinin sonucu olarak, dünyaya erişen ek ultraviyole - B ışınları bütün canlılar üzerinde zararlı etkiler oluşturmaktadır (87-89). Kimyasal yapısı itibariyle radikal özelliği taşımamakla birlikte, florin ve persülfattan sonra bilinen üçüncü en güçlü oksidan maddedir (7).

Ozon, keşfinden sonra dezenfeksiyon amacıyla kullanılmış olup; güçlü okside edici özelliği nedeniyle virüs ve bakteri gibi mikroorganizmaları, toksinleriyle birlikte yok edebilmesi; birçok kimyasal zararlı atıkları (deterjan, pestisit) hızla okside ederek nötralize etmesi ve insan cildine zarar vermemesi nedeniyle, günümüzde kimyasal sanayide ve tıp alanında yaygın olarak kullanılmaktadır. Tıpta, medikal ozon adı altında; özellikle antiseptik, antioksidan, anti-enflamatuvar, antimikrobiyal ve immünmodülatör etkisi nedeniyle kullanılmaktadır (8,90).

2.2.1. Medikal Ozon Tarihçesi

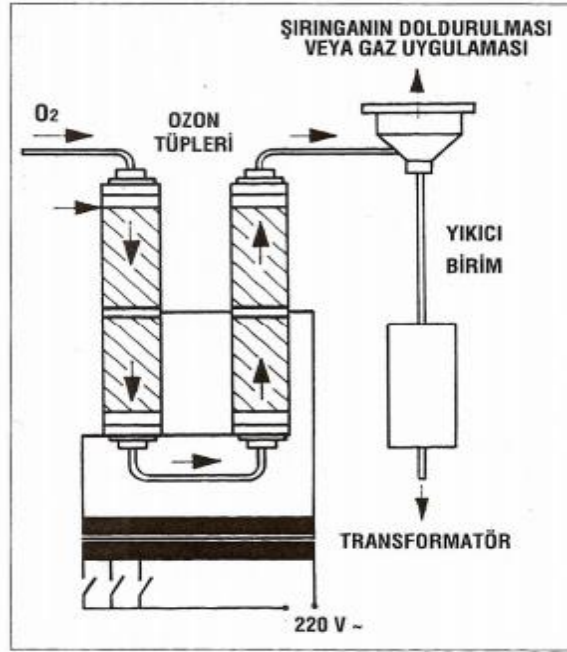
Ozon 1840 yılında, Christian Friedrich Schönbein tarafından keşfedilmiştir. Ozonun tıbbi amaçla kullanımının ilk olarak 1880 yılında Dr. John Harvey Kellogg tarafından gerçekleştirildiğini yazan kaynaklar bulunmakla birlikte, daha yaygın görüşe göre kabul edilen ilk tıbbi kullanımı Birinci Dünya Savaşı sırasında Alman askerlerinin kangren ve benzeri ciddi yaralanmalarını tedavi eden Dr. Albert Wolff'a dayanmaktadır. Dr. Erwin Payr 1932'de geçirdiği bir hastalık nedeni ile kendi vücuduna ozon tedavisini denemiştir. Bilimsel bir toplantıda, ozonun tedavi edici bir ajan olarak gündeme alındığı ilk önemli organizasyon ise; 1935 yılında Berlin'de toplanan 59. Alman Cerrahi Birliği toplantısı olup, burada Dr. Erwin Payr “Cerrahi'de Ozon Uygulamaları” başlığı altında kendi vakalarından oluşan derleme türünde bir sunum yapmıştır. İlk kez 1950 yılında, E. A. Fisch ozon tedavisini diş hekimliği alanında uygulamıştır. Joachim Hänslar, Hans Wolff ile birlikte 1972 yılında Tıbbi

Ozon Derneği'ni kurmuştur. Bu kuruluşun adı 1973 yılında "Hastalıkların Önlenmesi ve Tedavisinde Ozon Uygulamaları Tıp Derneği" olarak değiştirilmiştir. Bu tarihten sonra 1980'li yıllara kadar, ozon tedavisini münferit olarak uygulayan çeşitli hekimler ve araştırmacılar bulunmaktadır. Tıbbi amaçla ozon kullanımına yönelik bilimsel çalışmaların sayısı 1980'li yıllardan sonra artmıştır. Dolaşım sistemine veya vücut boşluklarına oksijen/ozon karışımının uygulanması tedavinin temelini oluşturur. Elde edilen karışım; intravenöz, intramuskuler, intraartiküler, intraplevral, intrarektal ve intradiskal olarak uygulanabildiği gibi, topikal olarak da uygulanabilir (90-92).

Ozon tedavisinin klasik uygulaması haline gelmiş olan yöntem 1974 yılında Hans Wolff tarafından tarif edilmiştir. Bu yöntemde bir miktar kan (50–270 ml) vücut dışına alınır ve ozona dayanıklı bir şişede 5-10 dakika oksijen/ozon karışımıyla temas ettikten sonra tekrar aynı kişiye geri verilir (ototransfüzyon). Bu uygulama majör otohemoterapi olarak adlandırılır (90,91,93).

2.2.2. Medikal Ozonun Elde Edilmesi

Medikal ozon, ozon jenartörü ile oksijen molekülünün (O_2) çift bağını elektrik akımı verilmesiyle bozarak, diğer bir oksijen atomu ile birleşmesi sonucu oluşturulmaktadır. Burada medikal ozon, seri bağlanmış iki yüksek voltaj tüpünden geçmektedir. Tüpler de yaklaşık 4000 ile 9000 V arasında değişen voltaja bağlıdır. Enerji, O_2 moleküllerinin oksijen atomlarına ayrışmasını sağlar. Atomlar var olan bir O_2 molekülüyle birleşerek O_3 ozon molekülünü oluşturur. Fazla veya kullanılmayan ozon katalitik yolla yeniden oksijene dönüştürülür. Düşük frekans voltajda plazmik deşarjlı medikal ozon jeneratörünün çalışma ilkesi Şekil 2'de gösterilmiştir. Ozon oluşumu; $3O_2 + 68,4 \text{ Kcal} \rightarrow 2O_3$ tepkimesi ile gerçekleşir (91-93).



Şekil 2. Bir medikal ozon jeneratörünün çalışma ilkesi

Elde edilen ozon, saf olarak verilmemeli ve belli oranda oksijenle karıştırılarak uygulanmalıdır. Bu karışımda oksijen %95'ten az, ozon %5'ten fazla olmamalıdır. Normal atmosfer havasının bu karışıma girmesi engellenmelidir. Çünkü ozonun reaktif özelliğinden dolayı hava ile teması sonucu toksik bir gaz olan azot dioksit (NO₂) oluşabilmektedir. Toksikiteye en duyarlı dokular akciğer ve gözlerdir. Düşük dozda inhalasyonu, hafif irritasyon ve öksürük oluştururken daha yüksek konsantrasyonlarda akciğerde meydana gelen hücre hasarına bağlı ödeme sebep olabilir. Ayrıca emboliye sebep olmaması için ozon gaz olarak dolaşım sistemi içerisine verilmemelidir. Tüm işlemler sırasında ozona dayanaklı malzemelerin (paslanmaz çelik, nötral cam ve teflon) kullanılması gerekmektedir (8,90).

2.2.3. Medikal Ozonun Etki Mekanizması

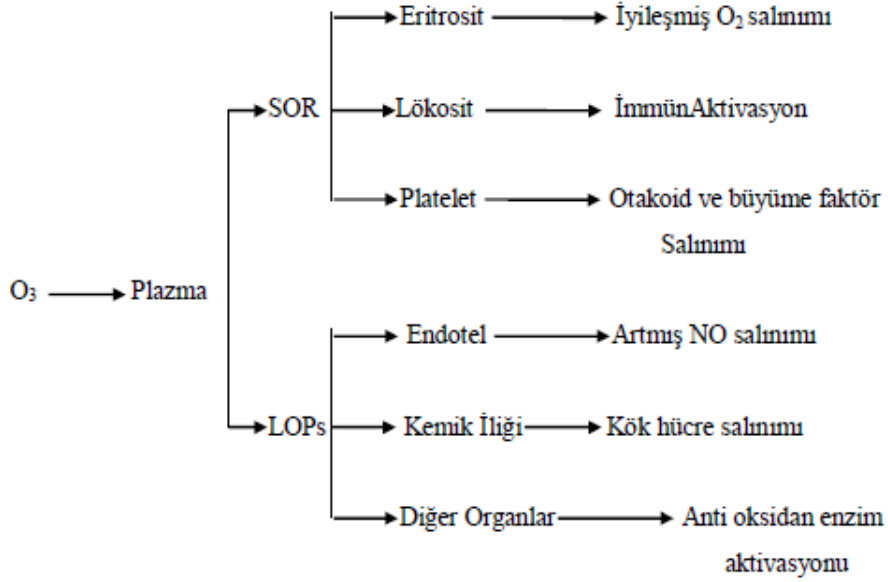
Ozon, diğer gazlar (O₂, CO₂) gibi suda çözünebilir. Oksijene göre 1,6 kat daha yoğun ve suda çözünürlüğü 10 kat daha fazla olan bir moleküldür. Saf suda diğer gazlar gibi "Henry kanununa" göre çözünür. Çözünmesi ısıya, basınca ve konsantrasyonuna bağlıdır. Biyolojik sıvılarda ise; oksijenden farklı olarak hızlıca biyomoleküller ile reaksiyona girer. Dolayısıyla, majör otohemoterapi esnasında

uygulanan ozon/oksijen karışımındaki ozon; çoklu doymamış yağ asitleriyle, antioksidanlarla ve sistein gibi sülfhidril grubu taşıyan tiyol bileşikleriyle reaksiyona girer. Ozonun miktarına bağlı olarak karbonhidratlar, proteinler (dolayısıyla da enzimler), DNA ve RNA da bu reaksiyondan etkilenebilir. Tüm bu bileşikler ozon karşısında elektron donörü gibi davranarak oksitlenirler. Sonuçta süperoksit (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hipoklorik asit ($HOCl$) gibi serbest oksijen radikalleri (SOR) oluşur. Bu reaksiyonlardan en önemlisi doymamış yağ asitlerinin oksidasyonudur. Ana reaksiyon $R-CH=CH-R'+O_3+H_2O \rightarrow R-CH=O+R'-CH=O+H_2O_2$ şeklindedir (8,93,94).

Ozonun biyolojik etkilerinin anlaşılmasında, daha çok otohemoterapi tedavisi model olarak alınmıştır. Majör otohemoterapi esnasında uygulanan ozon/oksijen karışımındaki ozon plazmada hızla çözünür. Daha önce bahsedildiği gibi sıvılardaki çözünürlüğü fazla olan ozonun bir kısmı plazmada bulunan antioksidanlar ile reaksiyona girerek antioksidanların miktarlarını azaltır. Bu anlık olaylar sırasında çeşitli serbest oksijen radikalleri oluşabilmektedir. Oluşan serbest oksijen radikallerin yarı ömrü çok kısa olduğu için, kan hastaya geri verilemeden, yani ototransfüzyondan önce ortadan kalkarak yerlerini lipit oksidasyon ürünlerine (LOPs) bırakırlar. Serbest oksijen radikalleri, büyük oranda eritrositlerin membranlarının oksidasyonu ile oluşur. Eritrosit membranındaki doymamış yağ asitleri oksidasyona çok duyarlıdır. Bu reaksiyonlar sırasında ortaya çıkan hidrojen peroksit, molekül yapısı itibariyle radikal olmayan oksitleyici bir moleküldür (8,94-96). Hidrojen peroksit; ozonun tedavi edici etkilerinin bir kısmından sorumludur. İlk etkilerinden biri eritrositlerde 2,3-difosfogliserat düzeyini artırma yoluyla hemoglobin-oksijen dissosiasyon eğrisinin sağa kaymasına ve böylece oksijenin dokulara daha kolay bırakılmasına neden olmasıdır. Plazmada konsantasyonu artan hidrojen peroksit kolayca hücrelerin içine diffüze olarak; lökosit ve endotelial hücrelerde çeşitli interferon, interlökin ve TGF yapımını da artıran uyarıları tetikler. Uzun yarı ömürlerinden dolayı bu ürünler ototransfüzyon yoluyla dokulara ulaşarak çeşitli biyolojik etkiler gösterirler (90,91,94).

Otohemoterapi uygulaması yapılmadan önce kanın antikoagülan verilerek hazırlanması gerekir. Çünkü; ozon doza bağlı olarak trombosit fonksiyonlarının artışına neden olmaktadır. Trombosit fonksiyonlarındaki artışın bazı yararlı sonuçları da olmaktadır. Aktive olmuş trombositler, içlerindeki büyüme faktörlerini salarak iskemi ve ülserli hastalarda iyileşmeye olumlu katkı sağlarlar (94,95). Majör

otohemoterapi sonrası ozonlanmış kanın vücuda geri verilmesi sonucunda oluşan terapötik etkileri Şekil 3'de belirtilmiştir (93,94,96).



Şekil 3. Ozonun Terapötik Etkileri (93)

Ozonun konsantrasyonuna bağlı olarak (kuvvetli okside edici özelliği nedeniyle) belli bir orandan sonra vücut için toksik olabileceği unutulmamalıdır. Plazmanın sahip olduğu geniş antioksidan kapasite ve eritrositlerdeki antioksidan enzimler nedeniyle, kan ozon toksisitesine karşı en dirençli dokudur. Otohemoterapi uygulamaları sırasında plazmada çözünen ozonun burada bulunan antioksidanlar (bilirubin, askorbik asit, SH grubu taşıyan glutatyon ve albumin) ile reaksiyona girerek bu bileşiklerin konsantrasyonunu azaltmaktadır (93,96). Diğer taraftan, majör otohemoterapi sonucu ortaya çıkan serbest oksijen radikallerinin artışı ve antioksidanların azalması geçici bir durumdur. Bocci ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada yaptıkları bir çalışmada (8); değişik dozlarda (20, 40, 60, 80 µg/ml) ozon uygulanmış kanlarda, dozla doğru orantılı olarak glutatyon ve total antioksidan seviyesinde azalma, lipit peroksidasyonu ve okside glutatyon düzeyinde artış olduğunu bildirmişler, uygulamanın 20 dakika sonrasında ise antioksidan düzeylerinin eski haline döndüğünü tespit etmişlerdir.

Ozon uygulamaları sonucunda oluşması beklenen serbest oksijen radikalleri ve lipid oksidasyon ürünlerinin, terapötik etki gösterebilmesi için belli bir konsantrasyonda olması gerekir (8,93,94). Kanın antioksidan kapasitesinin önemini belirten bir çalışmada (97); eritrositler kandan ayrıştırılmış ve sonrasında belirlenen farklı dozlarda ozon verilmiş yapılan değerlendirmelerde düşük (10-20 µg/ml) ozon dozlarındaki uygulamalarda bile eritrositlerin hemen tümünde hemoliz meydana geldiği görülmüştür.

Ozon uygulaması ile hem oksijenaz-1 (HO-1) enziminin de uyarıldığı bildirilmiştir. Bu enzimin artışından gerek serbest oksijen radikalleri gerekse eritrositlerin hemolizi sorumlu olabilir. Hem oksijenaz-1, hem halkasının yıkım yolunda görev alan mikrozomal bir enzimdir ve yapımı oksidatif stres artışı, pro-enflamatuvar sitokinler ve NO ile uyarılabilmektedir. Bu enzim hem molekülünü biliverdin ve karbonmonoksit parçalar. Son yıllarda HO-1 ile yapılmış birçok çalışmada bu enzimin; antioksidan, antiapoptotik, antiinflamatuvar etkilerinin olduğu gösterilmiştir. Ozon uygulaması sonucu görülen en etkin HO-1 artışının aynı zamanda ozonun terapötik doz aralığı olarak da vurgulanan 20-80 µg/ml arasında ortaya çıktığı gösterilmiştir (94,98,99).

2.2.4. Medikal Ozon Uygulamaları

Ozon, sistemik veya lokal yolla uygulanabilir.

1.Sistemik Uygulamalar:

Major Otohemoterapi: Son 10 yılda majör otohemoterapi, düşük riskli ozon uygulamalarının en önemli biçimi haline gelmiştir. “Ozon+kan” reaksiyonu hastanın vücudu dışında gerçekleşmekte; bundan sonra hastanın “kendi kanı” aktif alyuvar hücreleri ile re-infüzyona sokulmakta ve immunkompetan hücreler aktive olmaktadır. Bu tedavide ilke olarak yalnızca steril tek kullanımlık malzeme kullanılır. Uygulama kapalı, basıncı alınmış bir sistem içinde yapılır. Hastanın 50-100 ml kanı alınır, organizma dışında tam olarak doğru dozda ozon ile zenginleştirilir. Kan daha sonra hastaya, transfüzyon işlemlerinde tıbbi olarak önerilen hız olan dakikada 60-90 damla şeklinde verilir. Major otohemoterapinin en önemli endikasyonları; arteriyel dolaşım bozuklukları, enfeksiyonlar, bağışıklık yetersizliğinden kaynaklanan hastalıklar, kanser hastalarının ek tedavisi, romatizmal eklem hastalıklarıdır (8,90,92,100,101).

Minör Otohemoterapi: Bu yöntemde; ozona dirençli 30 ml tek kullanımlık şırıngaya 10 ml ozon/oksijen karışımı doldurulur ve hastanın 3-5 ml kanına 20 µg/ml eklenir ve karıştırıldıktan sonra intramusküler olarak yeniden enjekte edilir. Bu süre zarfında ozonunun, kanda önce çözünüp sonra da biyolojik moleküller ile reaksiyona girmesi beklenir. Sonrasında bu kan, gluteus kasına yavaşca enjekte edilir. Temel endikasyonları; alerjik vakalar, akne ve fronkülozistir (8,93,101,102).

Rektal insüflasyon: Ozonun en eski sistemik ve lokal uygulama yollarından biri rektal uygulanmasıdır. Sistemik etkileri açısından majör otohemoterapiye alternatiftir. Bu yöntemle yaklaşık 10-12 insüflasyonluk bir dizinin uygulanmasını takiben majör otohemoterapinin sonuçlarına benzer bir metabolik değişim (ATP artışı ve 2,3-DPG) elde edilir. Rektal insüflasyon, katetere bağlı ozona dirençli şırınga yardımıyla veya bir ozon konteyneri ile silikon doz çantası kullanılarak gerçekleştirilir. Kural olarak 150-300 ml ozon/oksijen karışımı tatbik edilir. Kapatma musluğu bulunan konteyner doğrudan jeneratörden doldurulur ve 150 ml hacmi olan doz çantasına bağlıdır. Doz çantası bir tüp sistemi aracılığıyla katetere de bağlıdır. Doz çantasına giden ve gelen her iki hat açılmayan musluklarla emniyet altına alınmıştır. Ampirik açıdan rektal insüflasyonun en fazla kanıtlanan endikasyonları; sistemik olarak majör otohemoterapide, özellikle de intravenöz reinfüzyonun damarların uygun olmaması nedeniyle uygulanamadığı yaşlı hastalar; topikal olarak bağırsaklarda proktit ve kolit gibi patolojik durumlar ve bağışıklık sisteminin yetersiz kaldığı sistemik enfeksiyonlardır (90,91,101,103).

Periton İçi Uygulama: Bu yöntem; insanlarda, periton boşluğuna sabitlenen bir silikon kateterle 10-20 µg/ml arasındaki bir konsantrasyon ve 200-300 ml arasındaki bir hacimde ozonlanmış suyla peritonun yıkanması suretiyle peritonitin tedavisinde kullanılmaktadır. Ayrıca deneysel hayvan çalışmalarında da, sistemik ve lokal etkileri nedeniyle kullanılmaktadır (90).

2.Lokal Uygulamalar

Düşük Basınçlı Ozon Uygulaması: Düşük basınç terimi normal atmosfer basıncının altındaki değerler için kullanılmaktadır. Burada ozon/oksijen karışımı plastik kap biçimindeki cihazdan sürekli olarak tedavi edilecek bölgeye akıtılır. Bölge daha önce suyla ıslatılır, artık O₃ geri çekilir ve kataliz aracılığıyla yeniden O₂'ye

dönüştürülür. Basınç, hastanın kendisini en az rahatsız hissedeceği şekilde ayarlanabilir ve lezyonun ciddiyetini esas alır. Uygulamanın özellikle dekübitis, radyasyon tahribatında ve fistüllerde yararlı olduğu bilinmektedir (92,104).

Transkutanöz Ozon İmersiyonu: Bu yöntem; varis ülserleri ve geniş alana yayılan enfekte olmuş yaraların tedavisinde kullanılır. Bu uygulamada, yara ozon uygulama işlemi öncesinde bol suyla yıkanır. Plastik çanta yara üzerine dikkatle yerleştirilir. Bir bandaj yardımı ile gaz kaçağı önlenir. Hava, önce açma/kapama musluğu kullanılarak çantadan çıkarılır ve belirlenmiş konsantrasyondaki ozon/oksijen karışımı ile doldurulur. Ülser veya yara bölgesinin 15 dakika boyunca karışım ile temas etmesi sağlanır. Kalan atık ozon katalizör kullanılarak oksijene dönüştürülür ve solunum yoluyla ilgili her türlü sorun elimine edilmiş olunur (104,105).

Intraartiküler Ozon Enjeksiyonu: İntraartiküler ozon enjeksiyonunun, başta diz ve omuz eklemleri olmak üzere; akut ve kronik ağrılı eklem rahatsızlıklarında yararlı ve etkin olduğu kanıtlanmıştır. Bu uygulamanın en önemli endikasyonları; romatoid artrit, osteoartrit ve gonartrozdur (8,90,92,102).

Ozonize Su Uygulaması: Ozonize su yeni veya yakın zamanda yapılmış cerrahi müdahaleler de dahil olmak üzere enfekte olmuş her türlü yaraya karşı topikal uygulama için endikedir. Ozonize su kompresler biçiminde uygulanabilir. Ozonize su kompresleri, özellikle ödem oluşumu gibi enflamatuvar süreçlerin başlangıç aşamalarında, hızlı ve önemli ölçüde ağrı gidericidir. Bu uygulama; hücresel metabolizmayı aktive eder, ATP'de artış sağlar ve lezyonun en yakınında olupta henüz üremeye yatkınlığını koruyan hücrelerin yeniden polarize olmalarına katkı sağlar. Kural olarak ozonize su çift damıtılmış sudan taze olarak hazırlanır. Bu suyun her 1 ml'si azami 20 µg ozon absorbe eder ve oda sıcaklığında yarı ömrü yaklaşık 10 saattir. Ozonize su tamamen güvenli bir maddedir. Ozonize su, krem ve yağların içerisine eklenerek de kullanılabilir. Bu tedavinin en önemli endikasyonları; diş ve diş eti yaraları, enfekte cilt yaraları, mantar enfeksiyonları, zona ve otitis eksternadır (8,92,102).

2.2.5. Medikal Ozonun Klinikte Uygulama Dozları

Medikal ozon kullanım ilkeleri; “*Uluslararası Ozon Tedavisi Okulları*”nın 2010 yılında gerçekleştirdiği Madrid ozon deklarasyonunda güncellenmiştir. Buna göre; ozonun, terapötik konsantrasyonların 5-60 µg/ml arasında olduğu kabul edilmiştir. Bu aralık lokal ve sistemik uygulama tekniklerinde geçerlidir. Terapötik ozon konsantrasyonları düşük, orta ve yüksek olarak üçe ayrılmıştır (106).

1. Düşük konsantrasyonlar: Bu dozlar 10-20 µg/ml olup; immünomodülatör etkiye sahiptir. Bağışıklık sisteminin etkilendiği hastalıklarda kullanılmaktadır.

2. Orta konsantrasyonlar: Bu dozlar 20-30 µg/ml olup; immünmodülatuar ve antioksidandır. Nörodejeneratif hastalıklar (Alzheimer, Parkinson, demans), akciğer hastalıkları (amfizem, kronik obstruktif akciğer hastalığı, akut respiratuar stres sendromu), oftalmolojik hastalıklar (retinosis pigmentarias, katarak, glokom, yaşa bağlı maküler dejenerasyon), hematolojik hastalıklar (talasemiler, orak hücreli anemi) ve vasküler hastalıklarda (hipertansiyon, venöz yetmezlik, periferik arteriyel hastalık, kardiyak iskemi, venöz staz) kullanılmaktadır.

3. Yüksek konsantrasyonlar: Bu dozlar 30-60 µg/ml olup; anti-enflamatuvar etkiye sahiptir. Enfeksiyöz hastalıkların (*HIV, Herpes Simplex Virüs, Human Papilloma Virüs, Hepatit A, B, C, zona, giardiazis, candidiazis*), dermatolojik hastalıkların, eklem hastalıklarının (osteoartrit, gonartroz), alerjik hastalıkların ve sistemik enflamatuvar hastalıkların (SLE, romatoid artit, Crohn hastalığı) tedavisinde kullanılmaktadır.

2.2.6. Medikal Ozon Tedavisinin Klinik Uygulamaları

Medikal ozon, özellikle enflamatuvar sürecin yoğun olarak yaşandığı ve immün sistemin ön planda olduğu fizyopatolojik durumların tedavisinde faydalı olduğu bildirilmiştir olup; basit enfeksiyonlardan, komplike vakalara kadar çeşitli hastalıkların tedavisinde etkin olarak kullanılmaktadır (90,92,94,104,107). Diş hekimliğinde de yaygın olarak kullanılan ozonun; anti-mikrobiyal ve anti-enflamatuvar etkileri gösterilmiştir (108).

Martinez-Sanchez ve arkadaşları (109), diyabetik ayaklı hastalarda ozonun etkinliğini değerlendirmişler; ozon tedavisinin antibiyotik tedavisine oranla yara iyileşmesini hızlandırdığını, hastanede yatış süresini kısalttığını, kan şekerini daha

kolay kontrol altına alındığını ve antioksidan düzeylerinde artışa yol açtığını bildirmişlerdir. Mutu ve arkadaşları da (110), lomber disk hernisi olan hastalara disk içine uygulanan oksijen/ozon karışımının faydalı olduğunu göstermişlerdir. Osteoartritli 428 hastada yapılan bir çalışmada (111), intraartiküler ozon enjeksiyonu yapılan hastaların ağrı skorunun kontrol grubuna göre daha düşük olduğu bildirilmiştir. Bu nedenle hafif ve orta derecede osteoartriti olan hastalarda cerrahi öncesinde ozon kullanılabiliceği önerilmiştir. Periferik vestibülokoklear sendromlu hastalarda yapılan bir çalışmada ise (112), 20 seans boyunca C2-C3 servikal bölgesine ozon enjekte edilmiş ve vertigo, işitme kaybı, kulak çınlaması ve nistagmus yakınmaları değerlendirilmiştir. Hastaların şikayetlerinde sırasıyla %90, %80, %65 ve %100 oranında gerileme olduğunu gösterilmiş olup, hiçbir yan etki görülmemiştir. Fibromiyalji hastalar üzerinde yapılan bir çalışmada (113), diğer tedavilerden yeterli sonuç alamayan hastalarda tamamlayıcı/bütünleyici ilaç olarak kabul edilebileceği bildirilmiştir.

Dermatolojik hastalıkların tedavisinde anti-enflamatuvar, immünmodülatör ve antimikrobiyal etkilerinden dolayı ozon kullanılmaktadır. Psöriasis Vulgaris'li hastalarda yapılan bir çalışmada, ozonlanmış yağlı kremlerin etkili olduğu gösterilmiştir (114). İnfantil atopik dermatitli hastalarla yapılan çalışmada ise; topikal ozon uygulanmasının güvenli ve etkili olduğu bildirilmiştir (115). Başka bir çalışmada da, Herpes Zoster'li hastalarda topikal ozon tedavisinin, hiçbir yan etki olmadan ağrı şikayetlerini azaltarak klinik iyileşme sağladığı bildirilmiştir (116).

2.2.7. Medikal Ozon Tedavisinin Deneysel Çalışmalarda Uygulamaları

Medikal ozon; antioksidan, anti-enflamatuvar, immunmodülatör ve anti-mikrobiyal özelliklerinden dolayı çok sayıda deneysel çalışmada kullanılmıştır (117-124). Ekici ve arkadaşları (117), sıçanlarda testis torsiyonunu takiben kullanılan ozonun; iskemi/reperfüzyon hasarının önlenmesinde faydalı olduğunu bildirmişlerdir. Güven ve arkadaşları (118), yenidoğan sıçanlarda oluşturulan nekrotizan enterokolit modelinde ozonun oksidatif stresi ve intestinal hasarı azalttığını bildirmişlerdir. Uysal ve arkadaşları (119), Sprague-Dawley cinsi sıçanlarda oluşturdukları nekrotizan pankreatit modelinde 60 µg/ml konsantrasyonda intraperitoneal uyguladıkları ozon tedavisinin pankreas dokusu üzerinde olumlu etkileri olduğunu göstermişlerdir. Balb/c cinsi farelerde yapılan bir çalışmada (120), endotoksik şok sırasında ozon

uygulamasının TNF- α salınımını azalttığı bildirilmiştir. Başka bir çalışmada ise (121), İsveç albino cinsi farelerde asetaminofen ile indüklenen hepatotoksitede ozon tedavisinin histopatolojik ve biyokimyasal düzelme sağladığı bildirilmiştir. Çeşitli kanser tedavi protokollerinde sıklıkla kullanılan doksurobusinin; oksidatif stres sonucu neden olduğu kardiyak toksitede, ozon tedavisinin etkisi araştırılmış ve ozon tedavisinin kardiyoprotektif etkilerinin olduğu gösterilmiştir (122). Romatoid artritli sıçanlarda yapılan bir çalışmada ise (123), farklı konsantrasyonlarda (10-20-30-40-50 $\mu\text{g/ml}$) intraartiküler uygulanan ozonun enflamasyonu azalttığı ve en etkin konsantrasyonun 40 $\mu\text{g/ml}$ olduğu bildirilmiştir. Kaya ve arkadaşları da (124), sıçanlarda oluşturdukları deneysel otoimmün üveit modeline 60 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonunda intraperitoneal uygulanan ozon tedavisinin; infliksimab tedavisiyle benzer etkiye sahip olduğunu göstermişlerdir.

2.2.8. Medikal Ozon Tedavisinin Yan Etki ve Kontrendikasyonları

Ozon tedavisi güvenli doz aralığında kullanıldığında, yan etkileri oldukça azdır. Günümüze kadar gözlemlenmiş yan etkiler hatalı uygulamalar sonucunda gelişen lokal komplikasyonlardan ve yüksek konsantrasyonda inhale edilmesinden kaynaklanmaktadır (93). Ozon tedavisi sırasında, vitamin C ve vitamin E içeren tüm antioksidan takviyelerinin bırakılması gereklidir. Kanda bu bileşiklerin yüksek konsantrasyonlarda bulunması bir oksidan madde olan ozonun etkinliğini ve dolayısıyla tedavinin seyrini etkiler. Ozon tedavisinin kontrendike olduğu durumlar; glukoz 6 fosfat dehidrogenaz enzim eksikliği, özellikle erken dönemdeki gebelik, ACE inhibitörü tedavisi almak, hipertiroidi, kanama bozukluğu ve ozon ile tetiklenen astım hastalığı olarak sıralanabilir (90,93,94).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamız Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Kardiyoloji Bilim Dalı tarafından otoimmün miyokarditte ozonun etkisini araştırmak üzere planlandı. Çalışma öncesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu'nun 31.07.2018 tarih ve 60758568-020/53656 sayılı onayı alındı. Çalışma, Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'nin 25.08.2018 tarih ve 2018TIPF041 nolu kararı ile desteklendi.

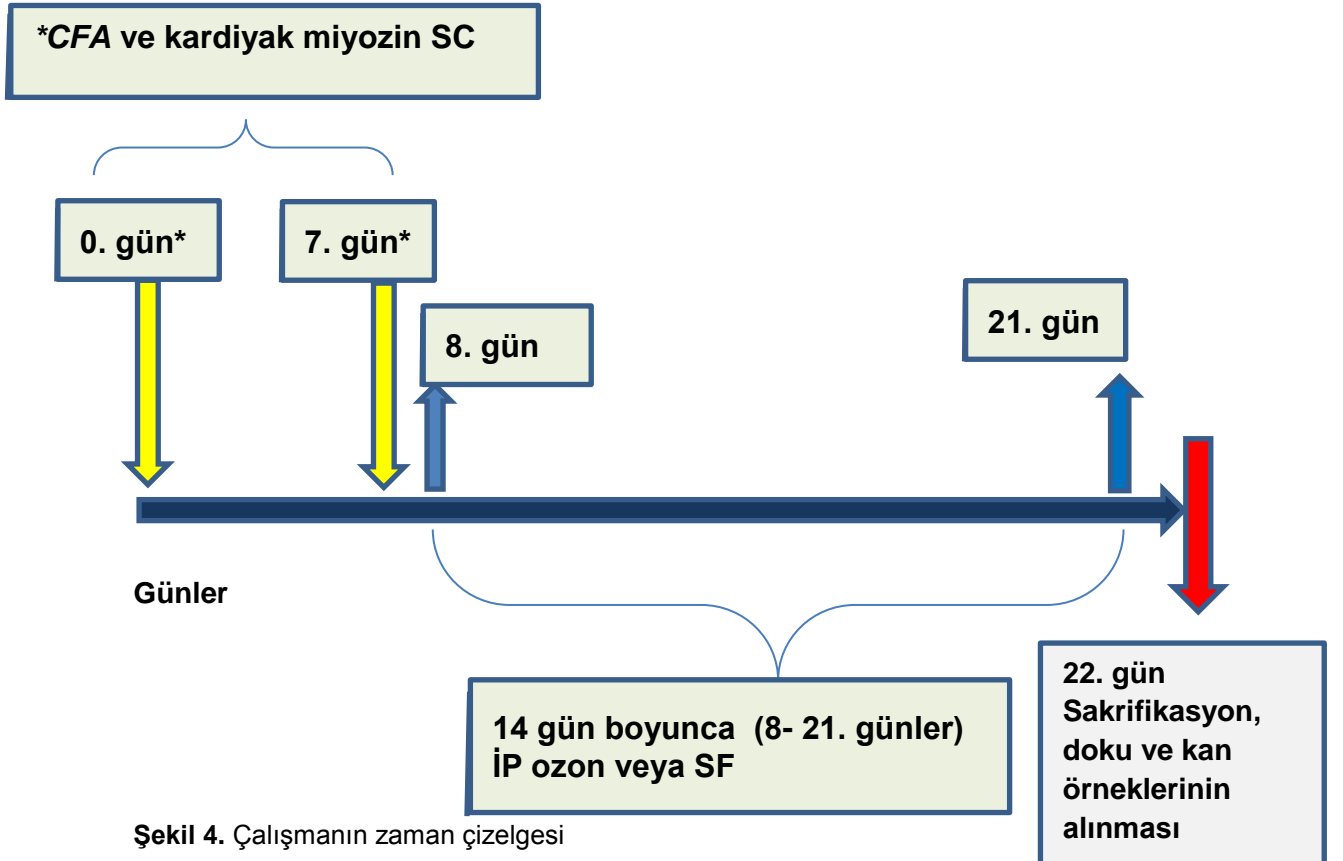
Çalışma, Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarı'nda yürütüldü ve ağırlıkları 19 ile 30 gram arasında değişen, 6-8 haftalık erkek Balb/c cinsi toplam 49 fare ile yapıldı. Çalışmaya alınan fareler her grupta 7 fare olacak şekilde rastgele 7 gruba ayrıldı. Her grup kendi özel kafesinde izlendi (Resim 1). Çalışma süresince tüm farelere standart diyet ve su verildi. Tüm fareler, deney sonuçlanana kadar 22 gün boyunca 12 saat ışıklı, 12 saat ışısız ortamda ve 20-25°C arasındaki oda sıcaklığında izlendi.



Resim 1. Pamukkale Üniversitesi Deney Hayvanları Laboratuvarı fare bakım odası ve kafesleri

3.1. ÇALIŞMA GRUPLARININ OLUŞTURULMASI

Çalışmanın başlangıcında, tüm farelerin vücut ağırlıkları ölçülerek kaydedildi. Çalışmaya alınan toplam 49 fare her grupta 7 fare olacak şekilde 7 gruba ayrıldı. Kontrol grubu ve deneysel otoimmün miyokardit (DOM) oluşturulacak gruplar rastgele belirlendi. Deneysel otoimmün miyokardit oluşturulacak gruplara çalışmanın 0. ve 7. günlerinde “*Complete Freund's Adjuvant*” (CFA) ve domuz kardiyak miyozini karışımı subkutan (SC) yoldan uygulandı. Kontrol grubuna ise 0. ve 7. günlerde 5 ml/kg serum fizyolojik (SF) subkutan yoldan uygulandı. DOM oluşturulup ozon verilecek gruplara çalışmanın 8. ile 21. günleri arasında; 14 gün boyunca her gün belirlenen konsantrasyonlarda intraperitoneal (İP) yoldan ozon uygulandı. Ozon verilmeyen gruplara (kontrol ve DOM) ise; çalışmanın 8 ile 21. günleri arasında 5 ml/kg serum fizyolojik (SF) intraperitoneal yoldan uygulandı. Çalışmanın zaman çizelgesi Şekil 4’de gösterilmiştir. Çalışma grupları ve gruplara yapılan işlemler Tablo 3’de verilmiştir.



Şekil 4. Çalışmanın zaman çizelgesi

Tablo 3. Çalışma grupları

Gruplar	Kardiyak miyozin+CFA uygulama günleri/veriliş yolu	Ozon konsantrasyonu $\mu\text{g/ml}$	Ozon uygulama günleri/ veriliş yolu
Grup 1 (Kontrol) (n=6)	*	-	**
Grup 2 (DOM) (n=7)	0. ve 7. günde/SC	-	**
Grup 3 (DOM+O20) (n=7)	0. ve 7. günde/SC	20	8-21. günleri arasında/İP
Grup 4 (DOM+O30) (n=4)	0. ve 7. günde/SC	30	8-21. günleri arasında/İP
Grup 5 (DOM+O40) (n=6)	0. ve 7. günde/SC	40	8-21. günleri arasında/İP
Grup 6 (DOM+O50) (n=6)	0. ve 7. günde/SC	50	8-21. günleri arasında/İP
Grup 7 (DOM+O60) (n=5)	0. ve 7. günde/SC	60	8-21. günleri arasında/İP

*Çalışmanın 0. ve 7. günlerinde 5 ml/kg SF uygulanması SC. **Çalışmanın 8-21. günlerinde 5 ml/kg SF uygulanması İP.

Grup 1 (Kontrol grubu, n=6): Bu gruptaki farelere, çalışmanın 0. ve 7. günlerinde 5 ml/kg SF subkutan, çalışmanın 8-21. günleri arasında ise, 5 ml/kg SF intraperitoneal olarak uygulandı.

Grup 2 (DOM grubu, n=7): Bu gruptaki farelere çalışmanın 0. ve 7. günlerinde CFA ve domuz kardiyak miyozin karışımı subkutan yoldan uygulandı, çalışmanın 8-21. günleri arasında ise, 5 ml/kg SF intraperitoneal olarak her gün uygulandı.

Grup 3 (DOM+O20 grubu, n=7): DOM oluşturulduktan sonra, çalışmanın 8-21. günleri arasında ise, 20 g/ml konsantrasyon dozunda ozon intraperitoneal olarak her gün uygulandı.

Grup 4 (DOM+O30 grubu, n=4): DOM oluşturulduktan sonra, çalışmanın 8-21. günleri arasında ise, 30 g/ml konsantrasyon dozunda ozon intraperitoneal olarak her gün uygulandı.

Grup 5 (DOM+O40 grubu, n=6): DOM oluşturulduktan sonra, çalışmanın 8-21. günleri arasında ise, 40 g/ml konsantrasyon dozunda ozon intraperitoneal olarak her gün uygulandı.

Grup 6 (DOM+O50 grubu, n=6): DOM oluşturulduktan sonra, çalışmanın 8-21. günleri arasında ise, 50 g/ml konsantrasyon dozunda ozon intraperitoneal olarak her gün uygulandı.

Grup 7 (DOM+O60 grubu, n=5): DOM oluşturulduktan sonra, çalışmanın 8-21. günleri arasında ise, 60 g/ml konsantrasyon dozunda ozon intraperitoneal olarak her gün uygulandı.

Çalışma süresince kontrol grubundan 1, DOM+O30 grubundan 3, DOM+O40 grubundan 1, DOM+O50 grubundan 1 ve DOM+O60 grubundan 2 fare olmak üzere toplamda 8 fare kaybedildi ve çalışma toplam 41 fare ile tamamlandı.

3.2. DENEYSEL OTOİMMÜN MİYOKARDİT MODELİ OLUŞTURULMASI

Deneysel otoimmün miyokardit, domuz kardiyak miyozini ile beraberinde *Mycobacterium tuberculosis* ile desteklenmiş "Complete Freund's Adjuvant" (CFA) karışımı kullanılarak oluşturulan önemli bir modeldir. Kardiyak miyozin ve CFA, T hücreleri tarafından hedef antijen olarak kullanılmakta ve bu model; insan dev hücreli (giant cell) miyokarditine patofizyolojik olarak benzemektedir. İlk olarak 1990 yılında Kodama tarafından (125) tanımlanan model, Lewis cinsi erkek sıçanlarda oluşturulmuştur. Miyokardit, 7 gün arayla yapılan kardiyak miyozin ve CFA karışımının enjeksiyonun ilk dozundan 2 hafta sonra gelişmeye başlar ve 3 hafta sonunda en üst düzeye ulaşır. Üçüncü haftadan sonra; dilate kardiyomiyopati gelişmektedir (11). Balb/c cinsi farelerde ise, deneysel otoimmün miyokardit modeli; ilk olarak Pummerer tarafından (126) 1996 yılında tanımlanmış olup; Lewis cinsi sıçanlardaki gibi domuz kardiyak miyozini ile beraberinde CFA karışımı kullanılarak oluşturulmuştur.

Çalışmamızda fareler üzerinde oluşturulan DOM modeli literatürde yapılan çalışmalara benzer şekilde yapıldı (80-82,126). DOM modeli oluşması için eşit miktarda *Mycobacterium tuberculosis*, H37Ra suşu ile desteklenmiş "Complete Freund's Adjuvant " (F5881, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ABD) ve 10 mg/mL saflaştırılmış domuz kardiyak miyozini (M0531, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ABD) kullanıldı. Enjeksiyon öncesi son emülsiyon konsantrasyonu 2 mg/ml olacak şekilde; adjuvan ve miyozin 4°C'de emülsiyon haline getirildi. Oluşturulan emülsiyon farelere çalışmanın 0. ve 7. günlerinde 200 ug dozunda subkutan olarak uygulandı.

3.3. OZON VERİLMESİ

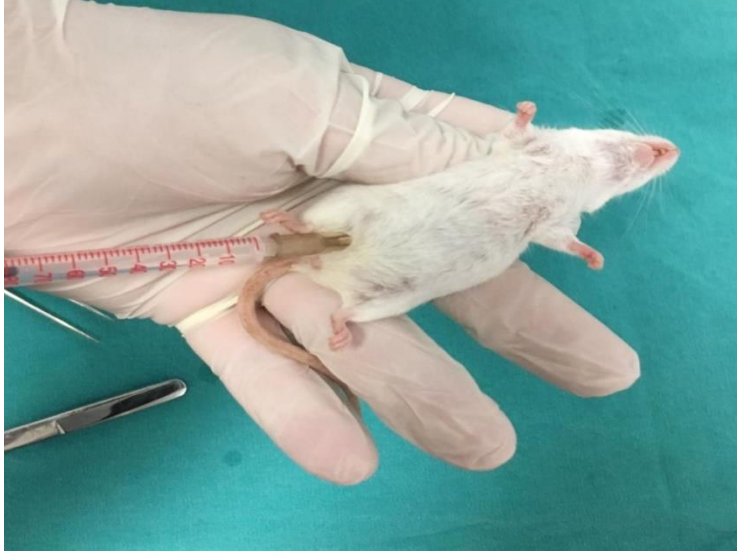
Çalışmamızda kullanılan ozon, ozon jeneratörü (Turkozone Blue S, Medikal ozon jeneratör, Telendyne Instruments 454/374, OGB-19-018, Ozon Sağlık Hizmetleri Ltd. Şti. Türkiye) ile elde edildi (Resim 2).



Resim 2. Ozon jeneratörü

Ozon konsantrasyonu ve akış hızı, jeneratörün UV spektrometresi ile gerçek zamanlı olarak ölçüldü. Ozon akış hızı, 1 mg/kg dozunda 20, 30, 40, 50 ve 60 µg/ml konsantrasyonda ve %97 oksijen + %3 ozon gaz karışımını temsil eden 3 L/dk idi.

Ozon, otoimmün miyokardit modeli oluşturulan gruplarda CFA ve kardiyak miyozin uygulamasının son dozundan (çalışmanın 7. günü) sonraki 14 gün boyunca her gün belirlenen konsantrasyonlarda intraperitoneal olarak verildi (Resim 3). Ozon içeriğini ve konsantrasyonların tutarlılığını sağlamak için ozon dirençli polipropilen şırıngalar ve Tygon polimer tüpleri kullanıldı.



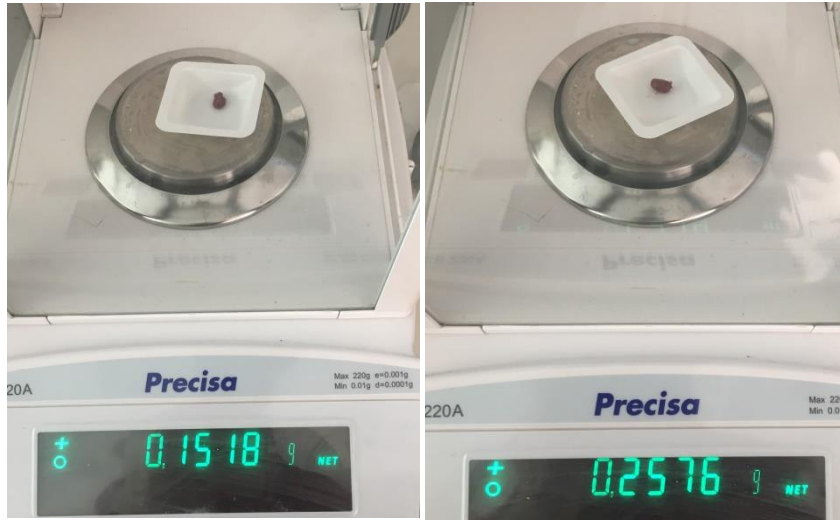
Resim 3. Intraperitoneal ozon uygulaması

3.4. HASTALIK BELİRTİLERİNİN İZLENMESİ VE ANTROPOMETRİK ÖLÇÜMLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Tüm farelerin çalışmanın başladığı günden itibaren aktiviteleri izlenerek, klinik olarak hastalık geliştirip geliştirmediği kaydedildi. Bütün farelerin başlangıç vücut ağırlıkları, sakrifiye edilmeden önceki vücut ağırlıkları ve sakrifiye edildikten sonra ise kalp ağırlıkları ölçüldü (Resim 4-5). Başlangıç ve son vücut ağırlıkları arasındaki fark ve kalp ağırlığı/vücut ağırlığı oranları hesaplanarak kaydedildi.



Resim 4. Kontrol grubundan bir deneğin ilk vücut ağırlığının ölçülmesi



Resim 5. Kontrol grubu (sol) ve DOM grubunda (sağ) yer alan birer deneğin kalp ağırlıklarının ölçülmesi

3.5. FARELERİN SAKRİFİKASYONU

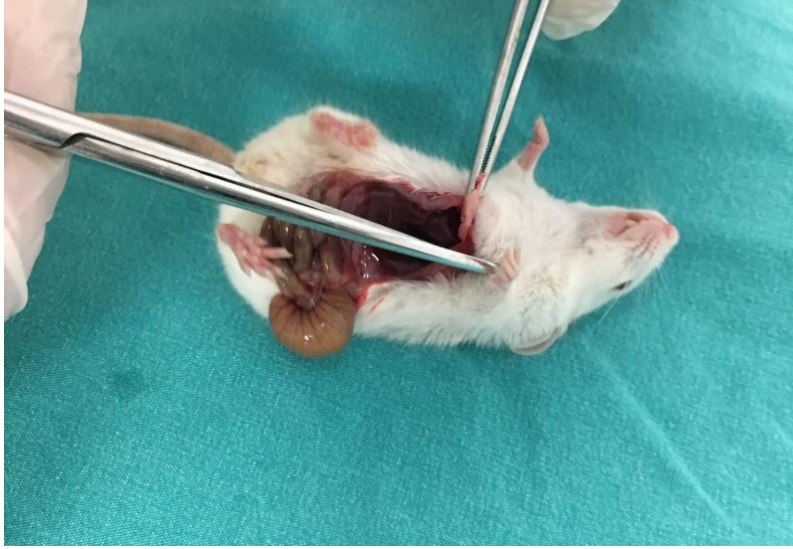
Tüm farelere prosedürün 22. gününde (son ozon veya serum fizyolojik dozundan 24 saat sonra), ketamin (%10 Ketasol®) 90 mg/kg ve xylazine (%2 Xylazinbio®) 10 mg/kg karışımı ile intraperitoneal anestezi verildi ve ardından anterior torakotomi yapıldı (Resim 6). Biyokimyasal analizler için tüm farelerden intrakardiyak kan örnekleri alındı (Resim 7). Sakrifiye edilen farelerin sakrifikasyon sonrası kalpleri çıkarıldı (Resim 8) ve kalp ağırlığı tartılarak morfolojik olarak incelemeye tabi tutuldu (Resim 5). Kalplerin morfolojik değişiklikleri aşağıdaki skala (84,125,127) kullanılarak derecelendirildi.

Evre 0: Normal görünüm

Evre 1: Küçük, fokal diskolorasyon alanı

Evre 2: Kalp yüzeyinin yarısından azını kaplayan, yaygın diskolore alan

Evre 3: Kalp yüzeyinin yarıdan fazlasını kaplayan, yaygın diskolore alan



Resim 6. Anterior torakotomi işlemi



Resim 7. İtrakardiyak kan alınması



Resim 8. Kalbin çıkarılması ve değerlendirilmesi

3.6. KALBİN HİSTOLOJİK DEĞERLENDİRİLMESİ

Çıkarılan kalplerin morfolojik incelemeleri yapıldıktan sonra %10 formalin solüsyonu içerisine alındı. Örnekler daha sonra parafin bloklar içerisine gömüldü. Parafin bloklardan dört mikrometre kalınlığında kesitler elde edilerek Hematoksilen Eosin (H&E) ve Masson Trikrom ile boyandı ve Olympus BX51 mikroskop ile $\times 40$, $\times 100$, $\times 200$ ve $\times 400$ merceklerle ışık mikroskopunda incelendi ve resimlendi. Histopatolojik değerlendirme aynı histolog tarafından çalışma gruplarına kör olarak yapıldı.

Tüm preparatlar polimorfonükleer ve mononükleer hücre infiltrasyonu, nekroz ve fibrozis yönünden incelendi. Miyokardiyal hasar ve hücreyel infiltrasyon 0-4 arasında daha önce tanımlanmış olan aşağıdaki skala (80,128,129) kullanılarak derecelendirildi ve mikroskopik skor verildi (Tablo 4). Fibrozis değerlendirilmesi ise; daha önceden tanımlanmış olan aşağıda gösterilen skala (130) kullanılarak yapıldı (Tablo 4).

Tablo 4. Enflamasyon ve fibrozis skalaları

Enflamasyon Şiddeti	İnfiltrasyon Alanı	Fibrozis Düzeyi	Fibrosiz Alanı
0. Derece	-	0.Derece	%0-1
1. Derece	<%25	1.Derece	%1-2
2. Derece	%25-50	2.Derece	%2-3
3. Derece	%50-75	3.Derece	%3-4
4. Derece	>%75	4.Derece	%4-5
		5.Derece	>%5

3.7.BİYOKİMYASAL BELİRTEÇLERİN ÇALIŞILMASI

Çalışmanın 22. gününde sakrifikasyonun ardından tüm farelerden intrakardiyak olarak yaklaşık 0,6-0,9 ml kan alındı (Resim 7). Alınan kanlar serum ayırıcı jelli tüpe aktarıldıktan sonra 3500 devirde 10 dakika santrifüj edildi. Elde edilen serum örnekleri analiz gününe dek -80°C'de saklandı. Çalışma günü oda sıcaklığına getirilen serumlardan Troponin T, TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10 ve TGF- β 1 analizi sandviç prensibine bağlı immün ölçüm yöntemi (ELISA) ile YL Biont (Shangai YL Biotech Co. Ltd. China) ticari kitleri kullanılarak analiz edildi.

Troponin T, TNF- α , IL-1 β ve IL-6 analizleri ng/L, IL-10 ve TGF- β 1 analizleri ise pg/ml biriminde elde edildi. Yöntemlerin çalışma içi CV değeri <%5 ve çalışmalar arası CV değeri <%8 idi. Çalışmalar enzimatik yöntem ile çalışılarak spektrofotometrik olarak tayin edildi. Tüm vitroz numuneler ayrı ayrı değerlendirildi ve deney grupları içinde toplanmadı.

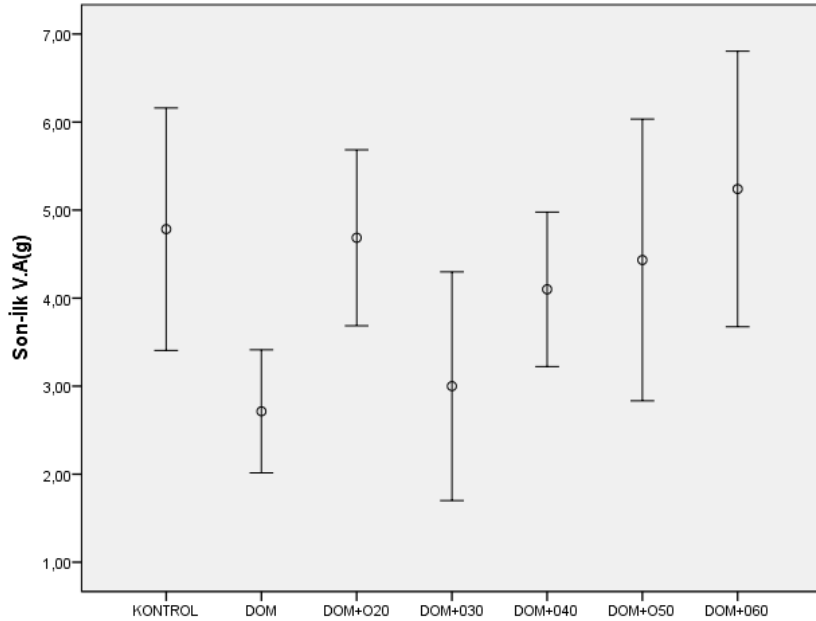
3.8. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Verilerin istatistiksel değerlendirilmesinde "*Statistical Package for Social Sciences*" (SPSS 25.0, Inc, Chicago, IL, USA) paket programı kullanıldı. Sürekli değişkenler ortalama \pm standart sapma, kategorik değişkenler sayı ve yüzde olarak verildi. Verilerin normal dağılıma uygunluğunun incelenmesinde Shapiro Wilk testi kullanıldı. Parametrik test varsayımları sağlandığında bağımsız grup farklılıklarının karşılaştırılmasında Tek Yönlü Varyans Analizi (post hoc olarak Tukey testi); parametrik test varsayımları sağlanmadığında ise, bağımsız grup farklılıklarının karşılaştırılmasında Kruskal Wallis Varyans Analizi (post hoc olarak Bonferroni düzeltilmeli Mann Whitney U testi) kullanıldı. Değişkenlerin aralarındaki ilişkilerin değerlendirilmesi Spearman veya Pearson korelasyon analizleri ile yapıldı.

4. BULGULAR

4.1. ANTROPOMETRİK ÖLÇÜMLER

Tüm gruptaki farelerin deney başlangıcındaki vücut ağırlıkları ve deney sonlandırılmadan önceki son vücut ağırlıkları (fareler sakrifiye edilmeden önceki) değerlendirildi. İlk ve son vücut ağırlıkları açısından gruplar arasında istatistiksel olarak farklılık saptanmadı ($p>0,05$), (Tablo 5). Tüm gruptaki farelerin deney süresindeki 22 günlük izlemi boyunca kilo aldığı görüldü. Kontrol grubunda ortalama $4,78\pm 1,31$, DOM grubunda $2,71\pm 0,75$, DOM+O20 grubunda $1,71\pm 0,19$, DOM+O30 grubunda $3\pm 0,81$, DOM+O40 grubunda $4,1\pm 0,83$, DOM+O50 grubunda $4,43\pm 1,52$ ve DOM+O60 grubunda $5,24\pm 1,26$ gram kilo alımı olduğu izlendi. Son ve ilk vücut ağırlıklarına göre farelerin kilo alım miktarı değerlendirildiğinde; gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptandı ($p=0,003$), (Tablo 5). Deneysel otoimmün miyokardit oluşturulan farelerde kilo alımının kontrol grubu ve ozon verilen gruplara göre daha az olduğu görüldü. Farklılık DOM grubu ile kontrol grubu, DOM grubu ile DOM+O20 grubu ve DOM grubu ile DOM+O60 grubu arasında istatistiksel olarak anlamlıydı ($p=0,003$), (Tablo 5, Şekil 5).



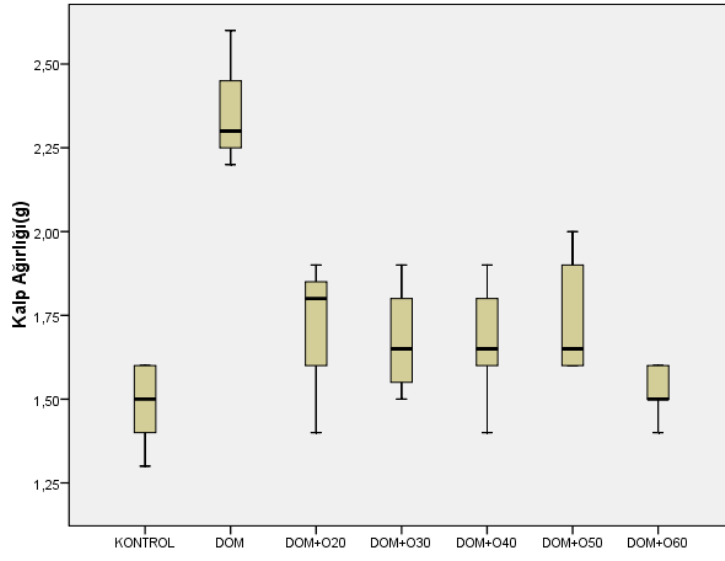
Şekil 5. Grupların kilo alım (son vücut ağırlığı - ilk vücut ağırlığı) farkları

Tablo 5. Gruplara göre başlangıç vücut ağırlığı, son vücut ağırlığı, kalp ağırlığı, kilo alımı ve kalp ağırlığının son vücut ağırlığına oranı

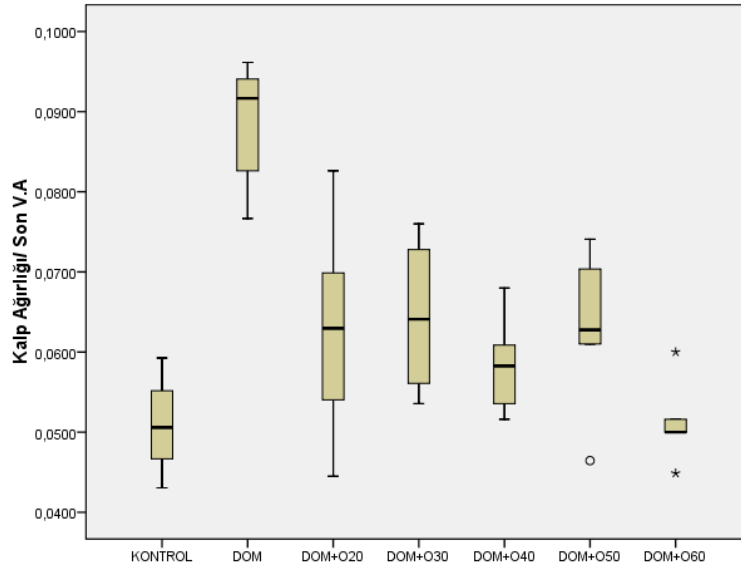
	İlk VA (g)	Son VA (g)	Son VA-İlk VA (g)	Kalp A (g)	Kalp A/Son VA
n=41	Ort ± SS (Min-Maks)	Ort ± SS (Min-Maks)	Ort ± SS (Min-Maks)	Ort ± SS (Min-Maks)	Ort ± SS (Min-Maks)
KONTROL (1) (n=6)	24,5±1,5 (22-26)	29,28±1,6 (27-31,5)	4,78±1,31 (3,00-6,50)	1,48±0,11 (1,30-1,60)	0,05±0,006 (0,04-0,05)
DOM (2) (n=7)	24,14±2,5 (21-28)	26,85±2,5 (24-30)	2,71±0,75 (2,00-4,00)	2,35±0,15 (2,20-2,60)	0,088±0,007 (0,07-0,09)
DOM+O20 (3) (n=7)	23,28±2,4 (20-28)	27,97±3,3 (23-33,70)	4,68±1,08 (3,00-6,10)	1,71±0,19 (1,40-1,90)	0,062±0,013 (0,04-0,08)
DOM+030 (4) (n=4)	23,25±3,4 (19-26)	26,25±2,7 (23-29)	3±0,81 (2,00-4,00)	1,67±0,17 (1,50-1,90)	0,064±0,010 (0,05-0,07)
DOM+040 (5) (n=6)	24,6±3,55 (20-28)	28,76±4,1 (23-33,60)	4,1±0,83 (3,00-5,60)	1,66±0,17 (1,40-1,90)	0,058±0,0058 (0,05-0,06)
DOM+O50 (6) (n=6)	23,5±3,6 (19-30)	27,93±4,3 (25-36,60)	4,43±1,52 (3,00-6,60)	1,73±0,17 (1,60-2,00)	0,062±0,0095 (0,04-0,07)
DOM+060 (7) (n=5)	24,6±3,3 (19-27)	29,84±2,7 (25-32)	5,24±1,26 (4,00-7,00)	1,52±0,08 (1,40-1,60)	0,051±0,0054 (0,04-0,06)
Gruplar arası p	>0,05	>0,05	0,003	0,000	0,000
İkili Farklılıklar			2-1,2-3,2-7	2-1,2-3,2-4,2-5,2-6,2-7	2-1,2-3,2-4,2-5,2-6,2-7

VA: Vücut ağırlığı, Kalp A: Kalp ağırlığı, DOM: Deneysel otoimmün miyokardit, Ort: Aritmetik ortalama, SS: Standart sapma, Min: Minimum, Maks: Maksimum

Fareler sakrifiye edildikten sonra kalp ağırlıkları değerlendirildi. DOM grubunda kalp ağırlığının, kontrol grubu ve ozon verilen diğer gruplara göre belirgin olarak arttığı görüldü (p=0,000), (Tablo 5, Şekil 6). Kalp ağırlığının son vücut ağırlığına oranına bakıldığında; gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu görüldü (p=0,000), (Tablo 5). DOM grubunda kalp ağırlığı/son vücut ağırlığı oranı diğer gruplara göre belirgin artmıştı (Tablo 5, Şekil 7).



Şekil 6. Grupların kalp ağırlıkları



Şekil 7. Grupların kalp ağırlığı/son vücut ağırlığı oranı

4.2. HASTALIK BELİRTİLERİNİN İZLENMESİ

Tüm deney süresince deneysel otoimmün miyokardit gurubuna ait farelerde tüy yapısında belirgin bozulma ve yer yer dökülmeye ek olarak bu gruptaki hayvanlarda iştahta azalma, hareket yeteneğinde kısıtlanma gibi kalp hastalığını düşündüren bulgular gözlemlendi.

4.3. BİYOKİMYASAL BELİRTEÇLER

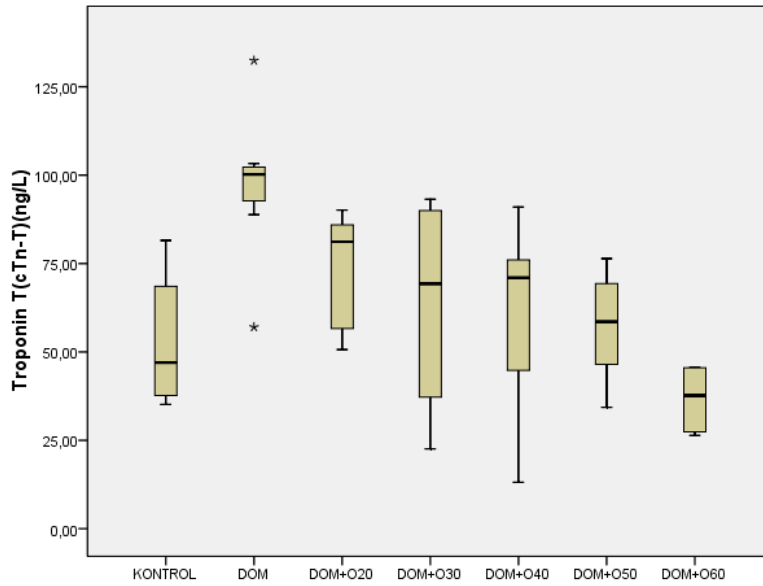
4.3.1 Troponin T Düzeyi

Kardiyak hasar göstergesi olan troponin T düzeyleri açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptandı ($p=0,001$). Troponin T; DOM grubunda $97,1\pm 22,31$ ng/L, kontrol grubunda $52,8\pm 18,79$ ng/L, ozon verilen DOM+O20, DOM+O30, DOM+O40, DOM+O50 ve DOM+O60 gruplarında ise sırasıyla $72,44\pm 17,07$, $63,6\pm 32,82$, $61,16\pm 27,97$, $57,02\pm 17,01$ ve $36,52\pm 9,38$ ng/L olarak bulundu (Tablo 6). Troponin T düzeyi DOM grubunda, tüm gruplara göre belirgin artmış olmakla birlikte; farklılık; DOM grubu ile kontrol grubu, DOM grubu ile DOM+O50 grubu ve DOM grubu ile DOM+O60 grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı idi ($p=0,001$), (Tablo 6, Şekil 8).

Tablo 6. Grupların troponin T düzeylerinin karşılaştırılması

Troponin T(ng/L)		
n= 40	Ort ± S.S	Min - Maks
KONTROL (1) (n=6)	52,8 ± 18,79	35,13-81,53
DOM (2) (n=7)	97,1 ± 22,31	57,03-132,42
DOM+O20 (3) (n=7)	72,44 ± 17,07	50,66-90,14
DOM+O30 (4) (n=4)	63,6 ± 32,82	22,58-93,21
DOM+O40 (5) (n=6)	61,16 ± 27,97	13,13-90,99
DOM+O50 (6) (n=5)	57,02 ± 17,01	34,31-76,42
DOM+O60 (7) (n=5)	36,52 ± 9,38	26,37-45,66
Gruplar arası p	0,001	
İkili Farklılıklar	2-1,2-6,2-7	

DOM: Deneysel otoimmün miyokardit, Ort: Aritmetik ortalama, SS: Standart sapma, Min: Minimum, Maks: Maksimum



Şekil 8. Grupların troponin T düzeyleri

4.3.2 Enflamatuvar Sitokin Seviyeleri

Enflamatuvar sitokinlerden; TNF- α , IL-1 β ve IL-6 düzeyleri değerlendirildi. Gruplar arasında TNF- α düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptandı ($p=0,0000$). TNF- α , DOM grubunda $96,44\pm 28,03$ ng/L, kontrol grubunda $68,86\pm 17,57$ ng/L, ozon verilen DOM+O20, DOM+O30, DOM+O40, DOM+O50 ve DOM+O60 gruplarında ise sırasıyla $66,29\pm 5,57$, $59,04\pm 4,62$, $60,83\pm 3,86$, $59\pm 5,39$ ve $52,76\pm 5$ ng/L olarak bulundu. TNF- α seviyesi DOM grubunda, tüm gruplara göre belirgin artmış olmakla birlikte; farklılık; DOM grubu ile kontrol grubu, DOM grubu ile DOM+O20 grubu, DOM grubu ile DOM+O30 grubu, DOM grubu ile DOM+O40, DOM grubu ile DOM+O50 grubu ve DOM grubu ile DOM+O60 grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı saptandı ($p=0,0000$), (Tablo 7, Şekil 9).

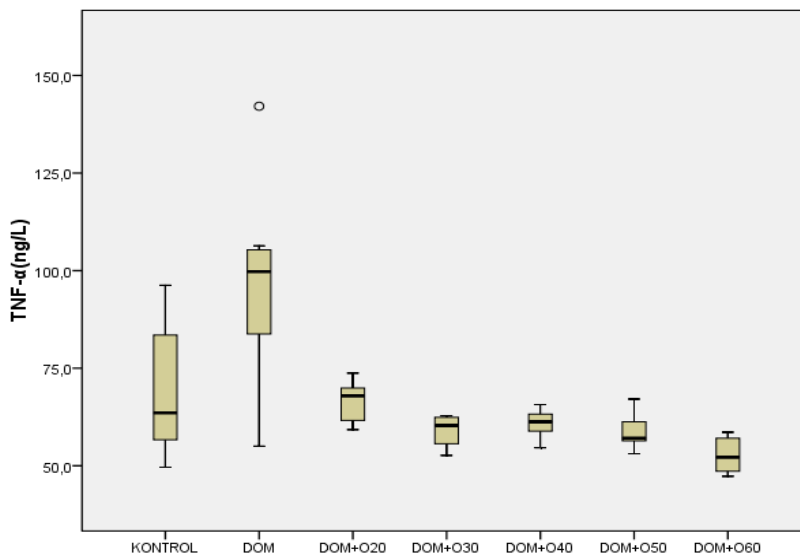
IL-1 β düzeyleri açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık vardı ($p=0,000$). IL-1 β , DOM grubunda $6,41\pm 0,41$ ng/L, kontrol grubunda $4,47\pm 0,71$ ng/L, ozon verilen DOM+O20, DOM+O30, DOM+O40, DOM+O50 ve DOM+O60 gruplarında ise sırasıyla $5,22\pm 0,99$, $5,01\pm 0,88$, $5,1\pm 0,43$, $4,23\pm 0,44$ ve $4,49\pm 0,33$ ng/L olarak bulundu. IL-1 β düzeyi DOM grubunda, tüm gruplara göre belirgin artmış olmakla birlikte; farklılık; DOM grubu ile kontrol grubu, DOM grubu ile DOM+O20 grubu, DOM grubu ile DOM+O30 grubu, DOM grubu ile DOM+O40, DOM grubu ile DOM+O50 grubu ve DOM grubu ile DOM+O60 grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı idi ($p=0,000$), (Tablo 7, Şekil 10).

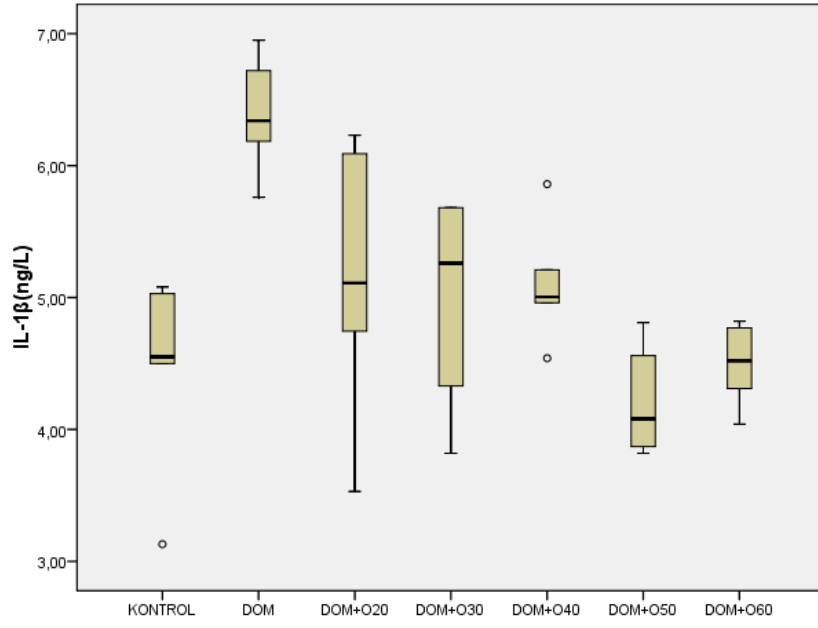
IL-6 düzeyleri açısından da gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulundu ($p=0,004$). IL-6, DOM grubunda $59,85\pm 18,75$ ng/L, kontrol grubunda $32,83\pm 8,17$ ng/L, ozon verilen DOM+O20, DOM+O30, DOM+O40, DOM+O50 ve DOM+O60 gruplarında ise sırasıyla $64,76\pm 9,03$, $49,41\pm 14,22$, $51,01\pm 12,01$, $53,19\pm 2,43$ ve $36,47\pm 23$ ng/L idi. IL-6 düzeyi kontrol grubunda, tüm gruplara göre en düşük seviyede olmakla birlikte; farklılık; kontrol grubu ile DOM grubu ve kontrol grubu ile DOM+O20 grupları arasında istatistiksel olarak anlamlıydı ($p=0,004$), (Tablo 7, Şekil 11).

Tablo 7. Grupların TNF- α , IL-1 β ve IL-6 düzeylerinin karşılaştırılması

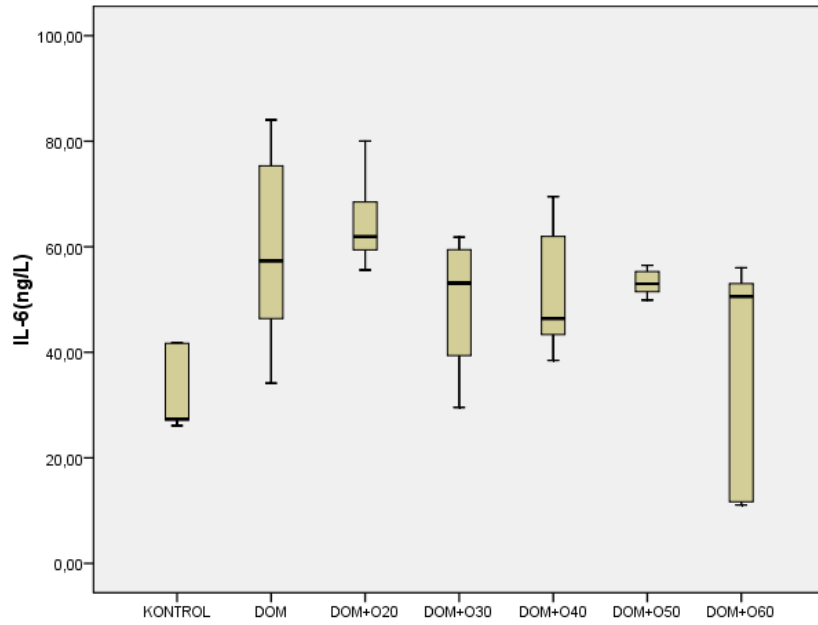
	TNF- α (ng/L)	IL-1 β (ng/L)	IL-6 (ng/L)
	Ort \pm SS	Ort \pm SS	Ort \pm SS
n=40	(Min – Maks)	(Min – Maks)	(Min – Maks)
KONTROL (1) (n=6)	68,86 \pm 17,57 (49,64 - 96,23)	4,47 \pm 0,71 (3,13 - 5,08)	32,83 \pm 8,17 (26,11-41,83)
DOM (2) (n=7)	96,44 \pm 28,03 (55,02 - 142,11)	6,41 \pm 0,41 (5,76 - 6,95)	59,85 \pm 18,75 (34,17-84,04)
DOM+O20 (3) (n=7)	66,29 \pm 5,57 (59,26 - 73,74)	5,22 \pm 0,99 (3,53 - 6,23)	64,76 \pm 9,03 (55,58-80,05)
DOM+O30 (4) (n=4)	59,04 \pm 4,62 (52,66 - 62,81)	5,01 \pm 0,88 (3,82 - 5,68)	49,41 \pm 14,22 (29,56-61,84)
DOM+O40 (5) (n=6)	60,83 \pm 3,86 (54,63 - 65,7)	5,1 \pm 0,43 (4,54 - 5,86)	51,01 \pm 12,01 (38,47-69,50)
DOM+O50 (6) (n=5)	59 \pm 5,39 (53,1 - 67,11)	4,23 \pm 0,44 (3,82 - 4,81)	53,19 \pm 2,43 (49,88-56,47)
DOM+O60(7) (n=5)	52,76 \pm 5 (47,32 - 58,62)	4,49 \pm 0,33 (4,04 - 4,82)	36,47 \pm 23 (11,06-56,02)
Gruplar arası p	0,000	0,000	0,004
İkili Farklılıklar	2-1,2-3,2-4,2-5,2-6,2-7	2-1,2-3,2-4,2-5,2-6,2-7	2-1, 1-3

DOM: Deneysel otoimmün miyokardit, Ort: Aritmetik ortalama, SS: Standart sapma, Min: Minimum, Maks: Maksimum

**Şekil 9.** Grupların TNF- α düzeyleri



Şekil 10. Grupların IL-1 β düzeyleri



Şekil 11. Grupların IL-6 düzeyleri

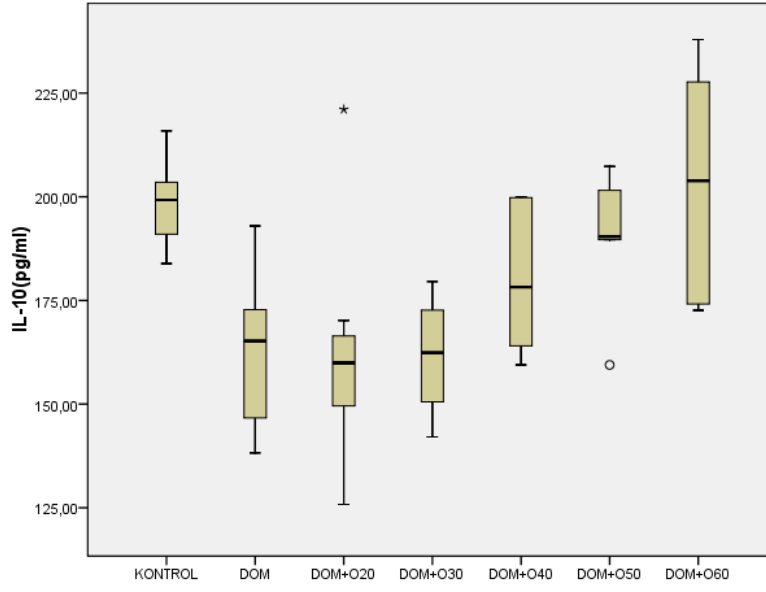
4.3.3 Anti-enflamatuvar Sitokin Seviyeleri

Anti-enflamatuvar sitokinlerden IL-10 ve TGF- β 1 düzeyleri değerlendirildi. IL-10 düzeyleri açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu görüldü ($p=0,005$). IL-10, DOM grubunda $162,18 \pm 19,4$ pg/ml, kontrol grubunda $198,79 \pm 11,24$ pg/ml, ozon verilen DOM+O20, DOM+O30, DOM+O40, DOM+O50 ve DOM+O60 gruplarında ise sırasıyla $162,69 \pm 29,37$, $161,6 \pm 15,58$, $179,95 \pm 18,45$, $189,69 \pm 18,5$ ve $203,25 \pm 29,95$ pg/ml olarak bulundu. Farklılık; DOM grubu ile DOM+O60 grubu ve DOM+O20 ile DOM+O60 grubu arasında istatistiksel olarak anlamlıydı ($p=0,005$), (Tablo 8, Şekil 12).

Tablo 8. Grupların IL-10 düzeylerinin karşılaştırılması

n=40	IL-10 (pg/ml)	
	Ort \pm SS	Min - Maks
KONTROL (1) (n=6)	198,79 \pm 11,24	183,89 - 215,89
DOM (2) (n=7)	162,18 \pm 19,4	138,19 - 192,99
DOM+O20 (3) (n=7)	162,69 \pm 29,37	125,81 - 221,08
DOM+O30 (4) (n=4)	161,6 \pm 15,58	142,07 - 179,54
DOM+O40 (5) (n=6)	179,95 \pm 18,45	159,45 - 200,02
DOM+O50 (6) (n=5)	189,69 \pm 18,5	159,45 - 207,36
DOM+O60 (7) (n=5)	203,25 \pm 29,95	172,61 - 237,93
Gruplar arası p	0,005	
İkili Farklılıklar	2-7,3-7	

DOM: Deneysel otoimmün miyokardit, Ort: Aritmetik ortalama, SS: Standart sapma, Min: Minimum, Maks: Maksimum



Şekil 12. Grupların IL-10 düzeyleri

TGF- β 1 düzeyleri DOM grubunda kontrol grubu ve ozon verilen gruplara gruplara göre düşük olmakla birlikte; gruplar arasında TGF- β 1 düzeyleri açısından istatistiksel olarak farklılık saptanmadı ($p>0,05$), (Tablo 9).

Tablo 9. Grupların TGF- β 1 düzeylerinin karşılaştırılması

n= 34	TGF- β 1 (pg/ml)	
	Ort \pm SS	Min - Maks
KONTROL (1) (n=5)	287,2 \pm 13,26	267,15-299,32
DOM (2) (n=5)	257,9 \pm 32,38	223,20-296,40
DOM+O20 (3) (n=7)	280,33 \pm 9,9	263,73-296,40
DOM+O30 (4) (n=4)	291,25 \pm 21,22	274,12-318,75
DOM+O40 (5) (n=5)	264,37 \pm 31,79	220,82-299,66
DOM+O50 (6) (n=4)	267,65 \pm 41,36	228,72-309,84
DOM+O60 (7) (n=4)	268,02 \pm 70,14	226,76-372-75
Gruplar arası p	>0,05	

DOM: Deneysel otoimmün miyokardit, Ort: Aritmetik ortalama, S.S: Standart sapma, Min: Minimum, Maks: Maksimum

4.4. KALBİN MAKROSKOBİK İNCELENMESİ

Fareler sakrifiye edilip kalpleri çıkarıldıktan sonra makroskopik incelemesinde kalp yüzeylerinin diskolorasyon alanları incelendi. Normal görünüm evre 0, küçük diskolorasyon alanı evre 1, kalp yüzeyinin yarısından azını kaplayan yaygın diskolore alan evre 2 ve kalp yüzeyinin yarıdan fazlasını kaplayan yaygın diskolore alan ise evre 3 olarak değerlendirildi (84,125,127). Diskolorasyon evreleri açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptandı ($p=0,0001$). Kontrol grubundaki farelerde diskolore alan saptanmazken, DOM grubundaki farelerin hepsinde (%28,6 evre 2, %71,4 evre 3) diskolore alan mevcuttu (Tablo 10).

Tablo 10. Grupların diskolorasyon evrelerinin karşılaştırılması

DİSKOLORASYON			
n=41	EVRE	SAYI	YÜZDE %
KONTROL (1) (n=6)	0	n=6	100
	1	n=0	-
	2	n=0	-
	3	n=0	-
DOM (2) (n=7)	0	n=0	-
	1	n=0	-
	2	n=2	28,6
	3	n=5	71,4
DOM+O20 (3) (n=7)	0	n=0	-
	1	n=3	42,9
	2	n=4	57,1
	3	n=0	-
DOM+O30 (4) (n=4)	0	n=0	-
	1	n=2	50,0
	2	n=2	50,0
	3	n=0	-
DOM+O40 (5) (n=6)	0	n=0	-
	1	n=3	50,0
	2	n=2	33,3
	3	n=1	16,7
DOM+O50 (6) (n=6)	0	n=1	16,7
	1	n=2	33,3
	2	n=2	33,3
	3	n=1	16,7
DOM+O60 (7) (n=5)	0	n=1	20,0
	1	n=1	20,0
	2	n=3	60,0
	3	n=0	-
Gruplar arası p		0,0001	
İkili farklılıklar		1-2	

4.5. KALBİN HİSTOLOJİK İNCELENMESİ

Kalbin histolojik incelemesinde; mikroskopik olarak enflamasyon ve fibrozis dereceleri değerlendirildi.

Enflamasyon şiddeti, infiltrasyon alanına göre belirlendi. Buna göre; normal 0. derece; %25'in altındaki infiltrasyon 1. derece; %25 ile %50 arasındaki infiltrasyon 2. derece; %50 ile %75 arasındaki infiltrasyon 3. derece ve %75'in üzerindeki infiltrasyon 4. derece olarak tanımlandı (80,128,129). Enflamasyon şiddeti incelendiğinde, gruplar arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0,0001$), (Tablo 11). Farklılığın; DOM grubu ile kontrol grubu ve DOM grubu ile DOM+O60 grubu arasından kaynaklandığı görüldü. DOM grubundaki farelerin hepsinde 3. ve 4. derecede enflamasyon varken; kontrol grubu ve DOM+O60 grubunda 0. ve 1. derece enflamasyon saptandı.

Fibrozis düzeyi; fibrozis alanına göre belirlendi. Buna göre; %1'lik alanın altındaki fibrozis 0. derece, %1-2'lik alandaki fibrozis 1. derece, %2-3'lük alandaki fibrozis 2. derece, %3-4'lük alandaki fibrozis 3. derece, %4-5'lik alandaki fibrozis 4. derece ve %5'in üzerindeki alandaki fibrozis 5. derece olarak tanımlandı (130). Fibrozis düzeyleri açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptandı ($p=0,0001$), (Tablo 12). Farklılığın; DOM grubu ile kontrol grubu ve DOM grubu ile DOM+O60 grubu arasından kaynaklandığı görüldü. DOM grubundaki farelerin hepsinde 2. derece ve üzerinde fibrozis varken; kontrol grubu ve DOM+O60 grubundaki farelerin hiçbirinde 2. derece ve üzerinde fibrozis saptanmadı.

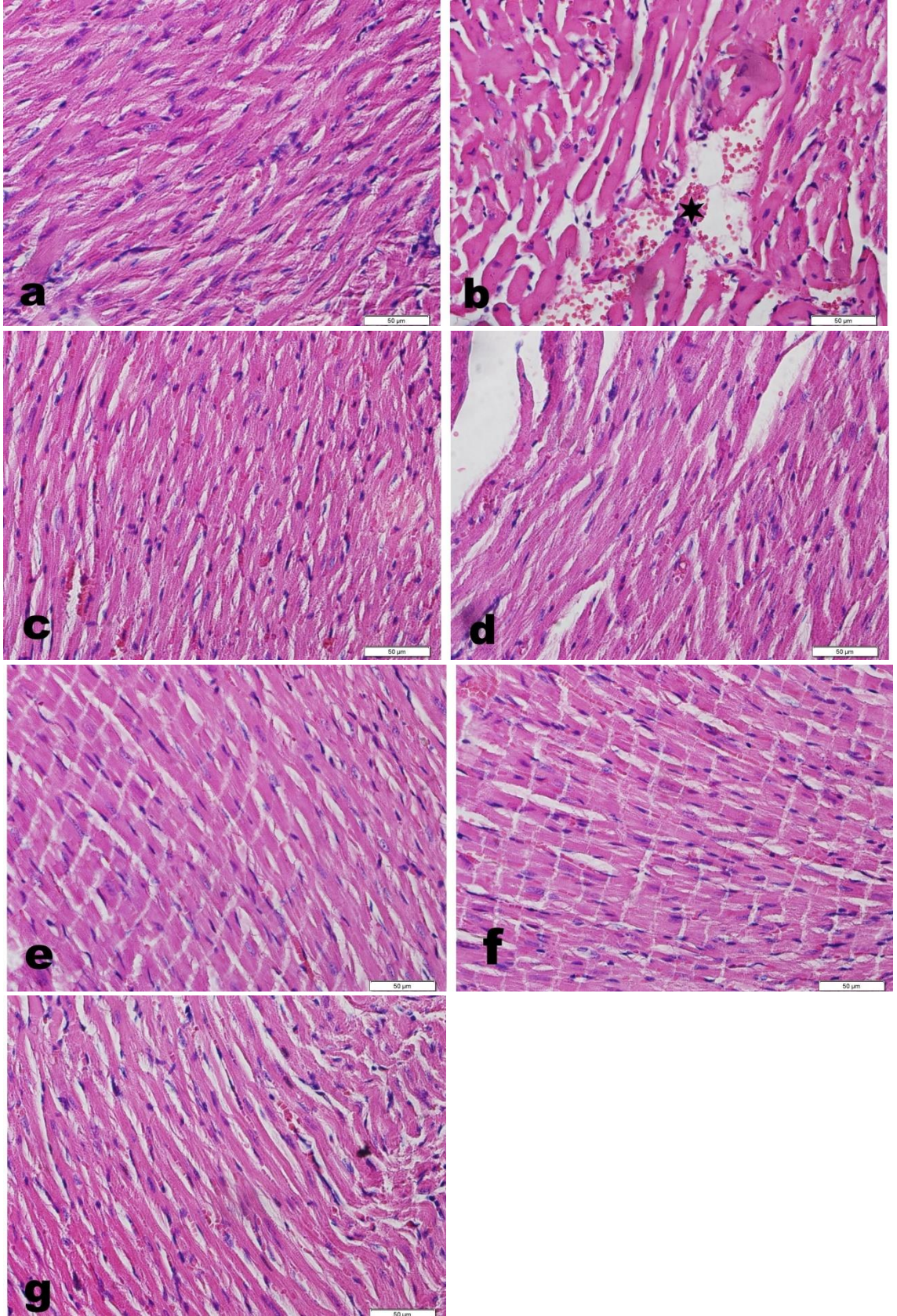
Miyokardın histolojik preparatlarının Hemotoksilen-Eozin ve Massom-Trikrom boyanma görünümleri Resim 9 ve 10'da verilmiştir.

Tablo 11. Grupların enflamasyon şiddetinin karşılaştırılması

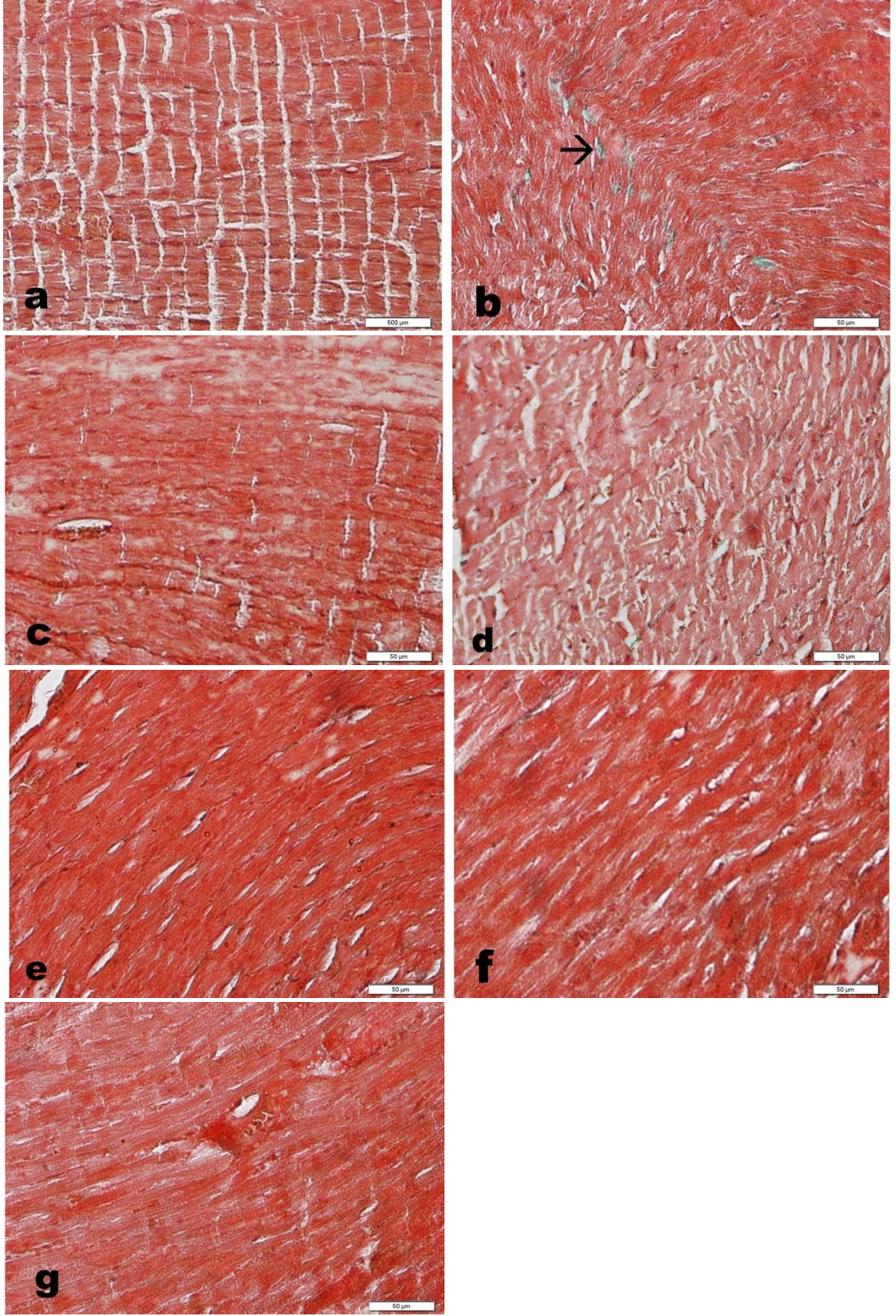
		ENFLAMASYON		
		DERECE	SAYI	YÜZDE %
KONTROL (1)	(n=6)	0	n=5	83,3
		1	n=1	16,6
		2	n=0	-
		3	n=0	-
		4	n=0	-
DOM (2)	(n=7)	0	n=0	-
		1	n=0	-
		2	n=0	-
		3	n=2	28,6
		4	n=5	71,4
DOM+O20 (3)	(n=7)	0	n=0	-
		1	n=0	-
		2	n=0	-
		3	n=3	42,9
		4	n=4	57,1
DOM+O30 (4)	(n=4)	0	n=0	-
		1	n=0	-
		2	n=2	50,0
		3	n=2	50,0
		4	n=0	-
DOM+O40 (5)	(n=6)	0	n=0	-
		1	n=1	16,7
		2	n=3	50,0
		3	n=2	33,3
		4	n=0	-
DOM+O50 (6)	(n=6)	0	n=0	-
		1	n=0	-
		2	n=4	66,7
		3	n=2	33,3
		4	n=0	-
DOM+O60 (7)	(n=5)	0	n=2	40,0
		1	n=3	60,0
		2	n=0	-
		3	n=0	-
		4	n=0	-
Gruplar arası p			0,0001	
İkili farklılıklar			1-2, 2-7	

Tablo 12. Grupların fibrozis düzeylerinin karşılaştırılması

n=41	FİBROZİS		
	DERECE	SAYI	YÜZDE %
KONTROL (1) (n=6)	0	n=4	66,7
	1	n=2	33,3
	2	n=0	-
	3	n=0	-
	4	n=0	-
	5	n=0	-
DOM (2) (n=7)	0	n=0	-
	1	n=0	-
	2	n=1	14,3
	3	n=1	14,3
	4	n=4	57,1
	5	n=1	14,3
DOM+O20 (3) (n=7)	0	n=0	-
	1	n=4	57,1
	2	n=2	28,6
	3	n=0	-
	4	n=1	14,3
	5	n=0	-
DOM+O30 (4) (n=4)	0	n=0	-
	1	n=0	--
	2	n=2	50,0
	3	n=1	25,0
	4	n=1	25,0
	5	n=0	-
DOM+O40 (5) (n=5)	0	n=2	33,3
	1	n=1	16,7
	2	n=2	33,3
	3	n=1	16,7
	4	n:0	-
	5	n:0	-
DOM+O50 (6) (n=6)	0	n=0	-
	1	n=1	16,7
	2	n=4	66,7
	3	n=1	16,7
	4	n=0	-
	5	n=0	-
DOM+O60 (7) (n=5)	0	n=3	60,0
	1	n=2	40,0
	2	n=0	-
	3	n=0	-
	4	n=0	-
	5	n=0	-
Gruplar arası p		0,0001	
İkili farklılıklar		1-2, 2-7	

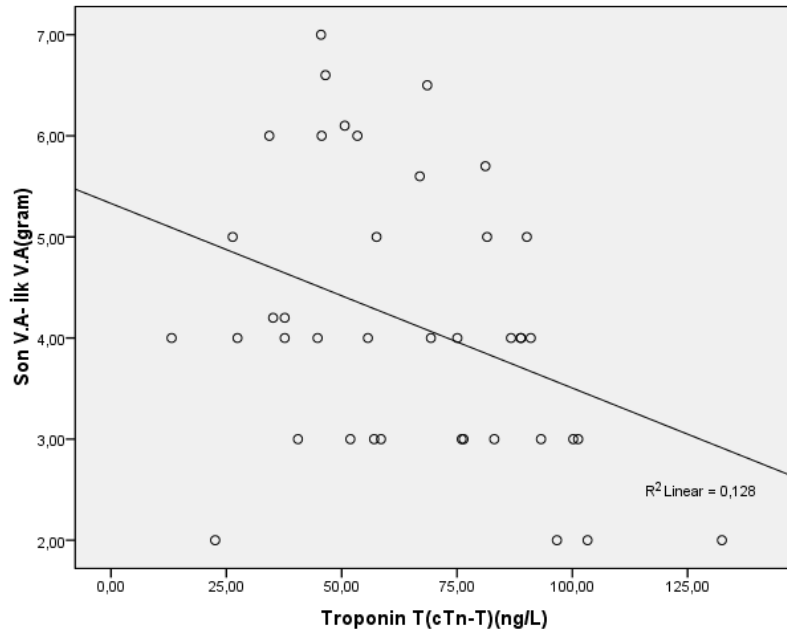


Resim 9. Hematoksilen-Eosin boyanmış miyokard kesitlerinde hücre infiltrasyonları. A: Kontrol grubu, B: DOM Grubu C: DOM+O20 grubu, D: DOM+O30 grubu, E: DOM+O40 grubu F: DOM+O50 grubu, G: DOM+O60 grubu. İnfiltrasyon (yıldız). Bar: 50µm

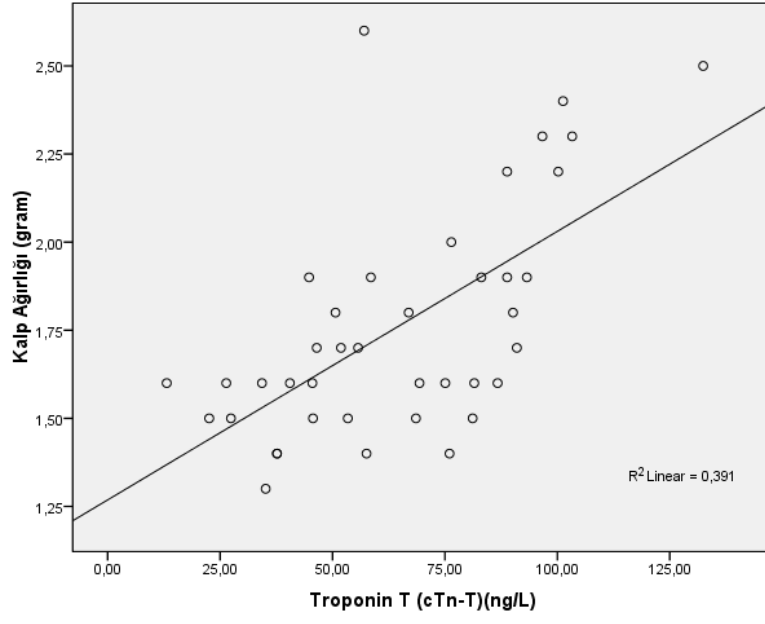


Resim 10. Masson Trikrom ile boyanmış miyokard dokusu kesitlerinde fibrozis. A: Kontrol grubu, B: DOM Grubu C: DOM+O20 grubu, D: DOM+O30 grubu, E: DOM+O40 grubu F: DOM+O50 grubu, G: DOM+O60 grubu. Fibrozis (ok). Bar: 50µm.

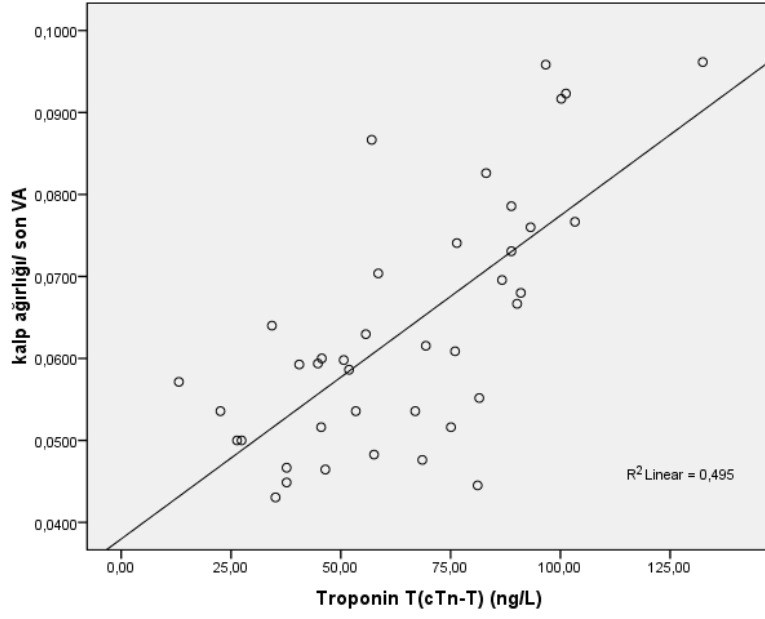
Kardiyak hasarlanma göstergesi olan troponin T düzeyleri ile kilo alım farkı (son vücut ağırlığı ile ilk vücut ağırlığı arasındaki fark) arasında istatistiksel olarak anlamlı negatif korelasyon saptandı ($p=0,023$, $r=-0,358$), (Şekil 13). Troponin T düzeyleri ile kalp ağırlığı ve kalp ağırlığı/son vücut ağırlığı arasında ise istatistiksel olarak pozitif korelasyon saptandı ($p=0,000$, $r= 0,625$ ve $0,703$), (Şekil 14-15). Troponin T düzeylerindeki artışla kalp ağırlığı ve kalp ağırlığı/son vücut ağırlığının arttığı görüldü.



Şekil 13. Troponin T düzeyi ile kilo farkı (son VA- ilk VA) arasındaki ilişki ($p=0,023$ $r=-0,358$)



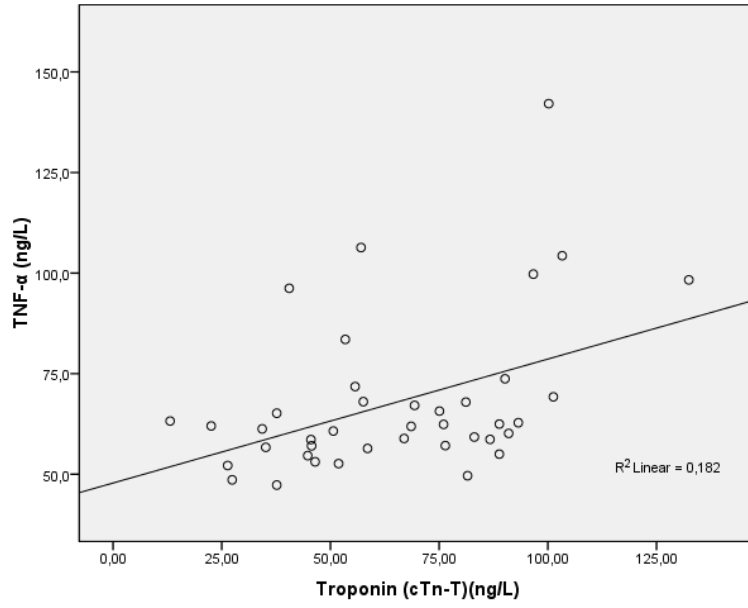
Şekil 14. Troponin T düzeyi ile kalp ağırlığı arasındaki ilişki ($p=0,000$ $r=0,625$)



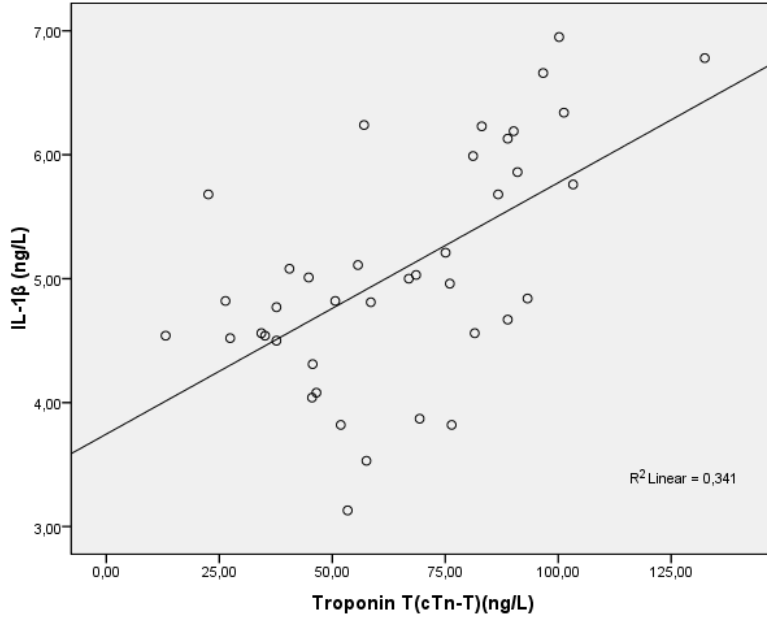
Şekil 15. Troponin T düzeyi ile Kalp ağırlığı/ son VA arasındaki ilişki ($p=0,000$ $r=0,703$)

Kardiyak hasarlanmanın şiddeti ile enflamatuvar sitokinler olan TNF- α , IL-1 β ve IL-6 arasındaki ilişki varlığı değerlendirildiğinde; troponin T ile TNF- α , IL-1 β ve IL-6 arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif ilişki saptandı (p ve r değerleri sırasıyla TNF- α için p=0,006 r=0,426; IL-1 β için p=0,000 r=0,584; IL-6 için p=0,048 r=0,318), (Şekil 16-17-18).

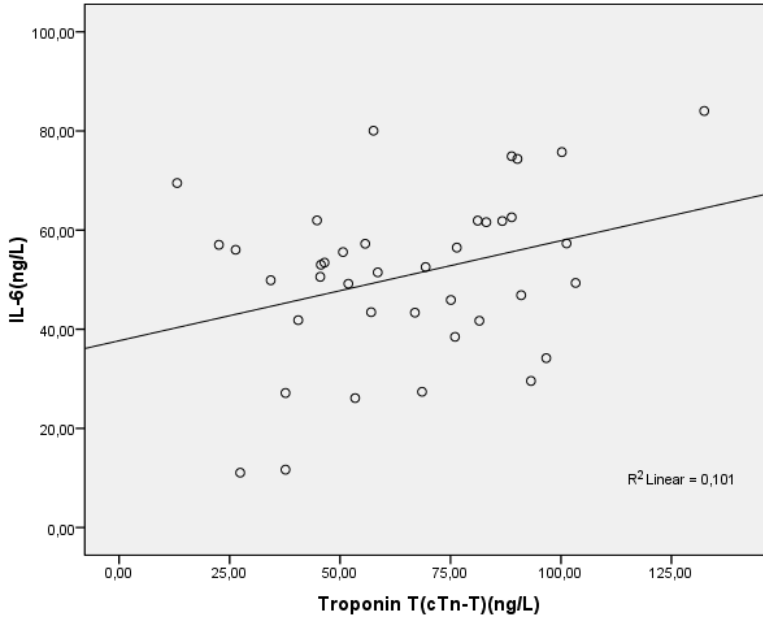
Troponin T düzeyleri ile anti-enflamatuvar sitokin olan IL-10 ve TGF- β 1 arasında ise anlamlı bir ilişki saptanmadı (p>0,05).



Şekil 16. Troponin T düzeyi ile TNF- α düzeyi arasındaki ilişki (p=0,006 r=0,426)

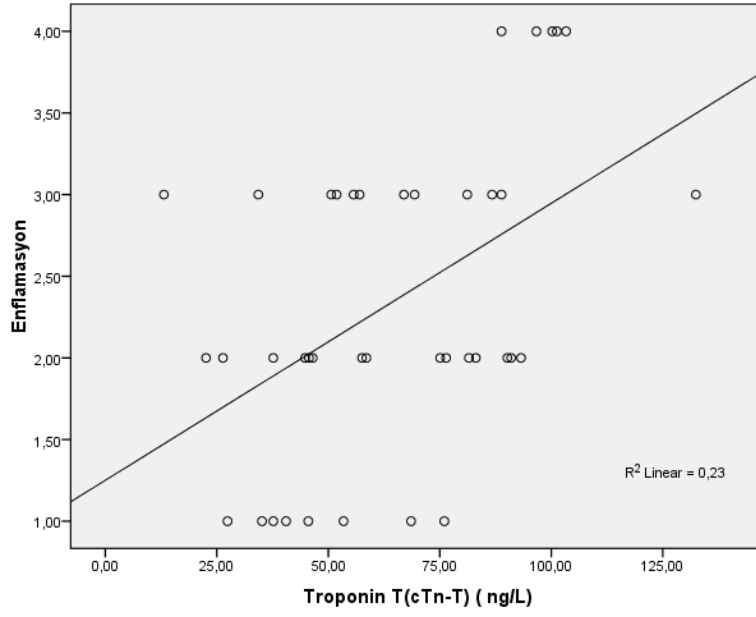


Şekil 17. Troponin T düzeyi ile IL-1β düzeyi arasındaki ilişki (p=0,000 r=0,584)

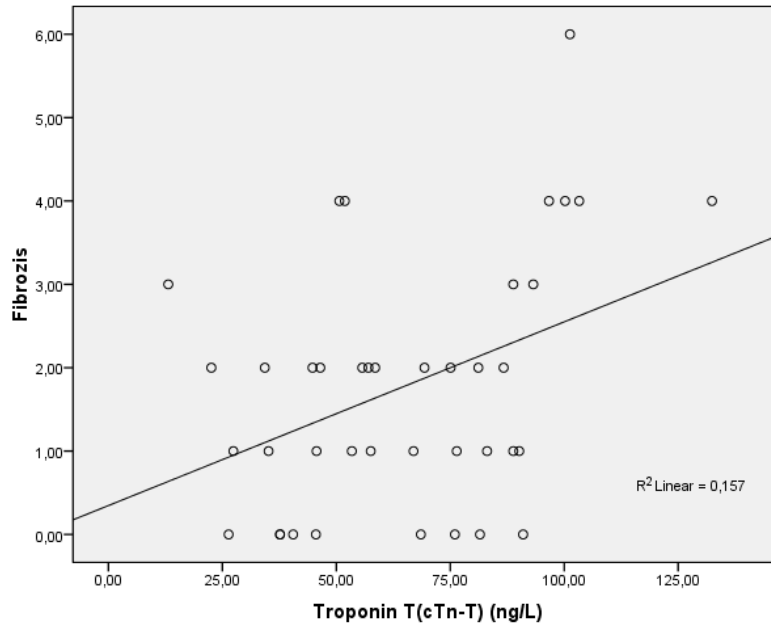


Şekil 18. Troponin T düzeyi ile IL-6 düzeyi arasındaki ilişki (p=0,048 r=0,318)

Troponin T düzeyleri ile histolojik bulgular arasındaki ilişki incelendiğinde; troponin T ile enflamasyon şiddeti ve fibrozis düzeyi arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif ilişki saptandı (enflamasyon için p=0,002 r=0,476 ve fibrozis için p=0,028, r=0,347), (Şekil 19-20).

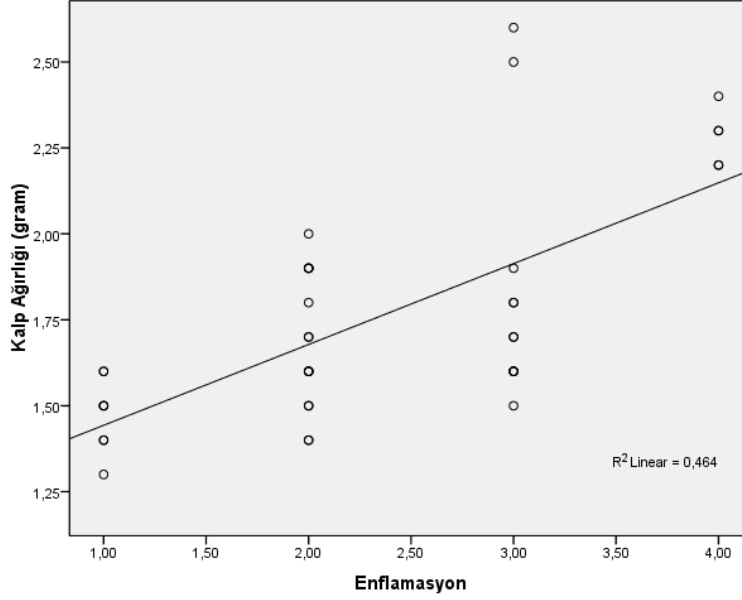


Şekil 19. Troponin T ile enflamasyon şiddeti ile arasındaki ilişki ($p=0,002$ $r=0,476$)

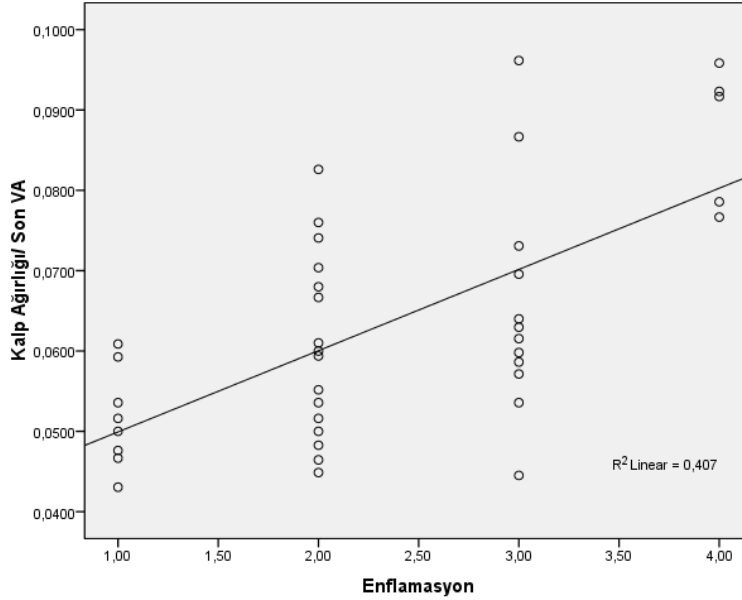


Şekil 20. Troponin T ile fibrozis düzeyi arasındaki ilişki ($p=0,028$ $r=0,347$)

Enflamasyon şiddetiyle farelerin kilo alımları (son vücut ağırlığı ile ilk vücut ağırlığı arasındaki fark) arasında istatistiksel olarak ilişki saptanmazken ($p>0,05$); kalp ağırlığı ve kalp ağırlığı/son vücut ağırlığı ile istatistiksel olarak anlamlı pozitif korelasyon saptandı ($p=0,000$, $r= 0,650$ ve $0,592$), (Şekil 21-22).

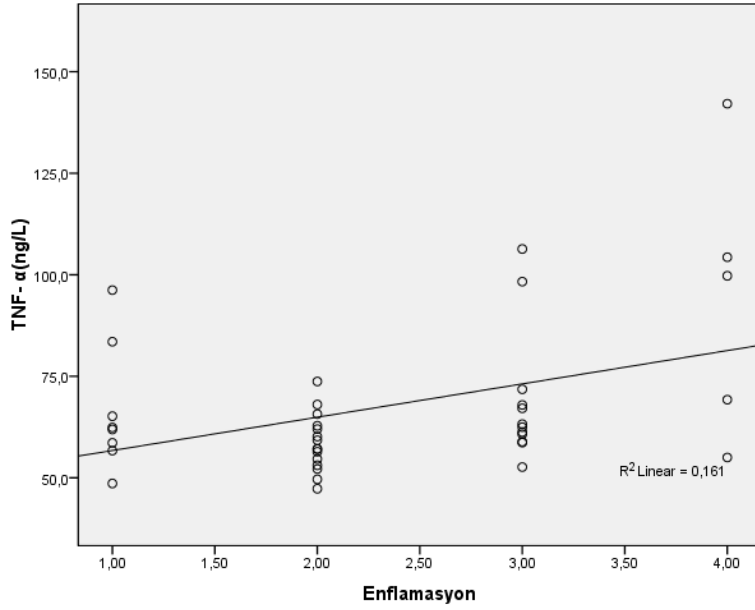


Şekil 21. Enflamasyon şiddeti ile kalp ağırlığı arasındaki ilişki ($p=0,000$ $r=0,650$)

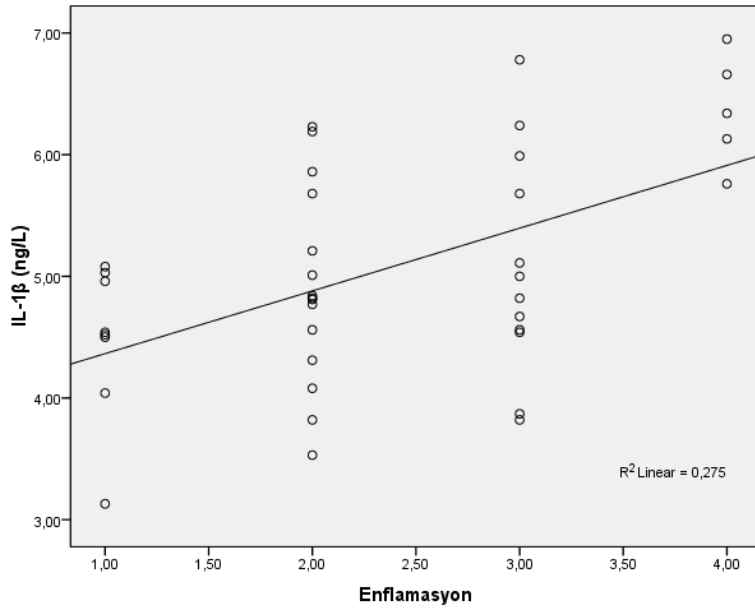


Şekil 22. Enflamasyon şiddeti ile kalp ağırlığı/son VA arasındaki ilişki ($p=0,000$ $r=0,592$)

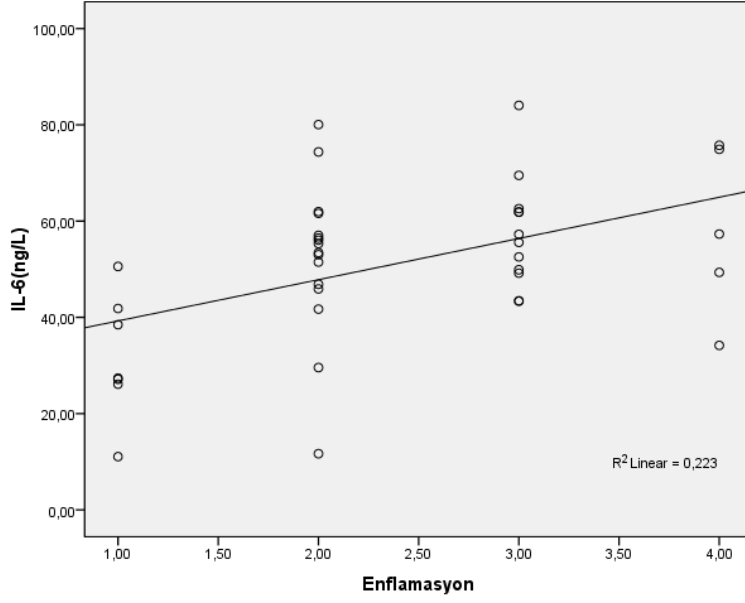
Enflamasyon şiddeti ile enflamatuvar sitokinler olan TNF- α , IL-1 β ve IL-6 arasındaki ilişki varlığı değerlendirildiğinde; enflamasyon şiddeti ile TNF- α , IL-1 β ve IL-6 arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif korelasyon saptandı (p ve r değerleri sırasıyla TNF- α için p=0,040 r=0,325; IL-1 β için p=0,002 r=0,466; IL-6 için p=0,002 r=0,470), (Şekil 23-24-25).



Şekil 23. Enflamasyon şiddeti ile TNF- α düzeyi arasındaki ilişki (p=0,040 r=0,325)

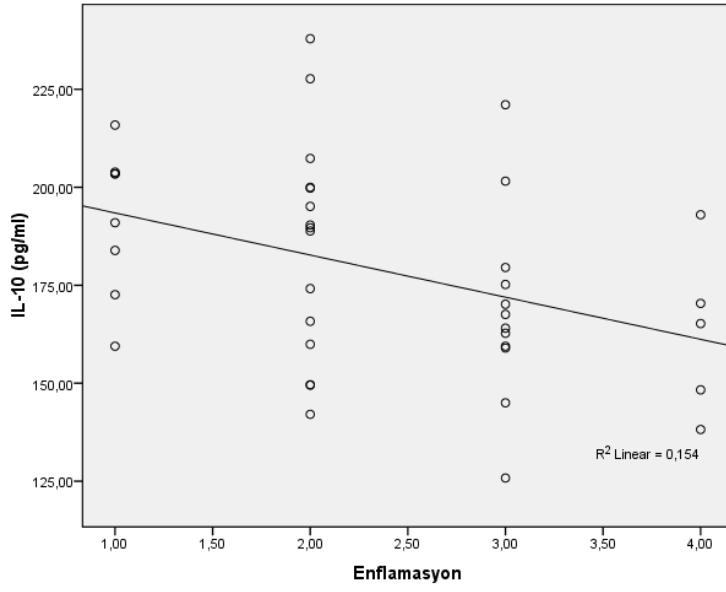


Şekil 24. Enflamasyon şiddetii ile IL-1 β düzeyi arasındaki ilişki (p=0,002 r=0,466)



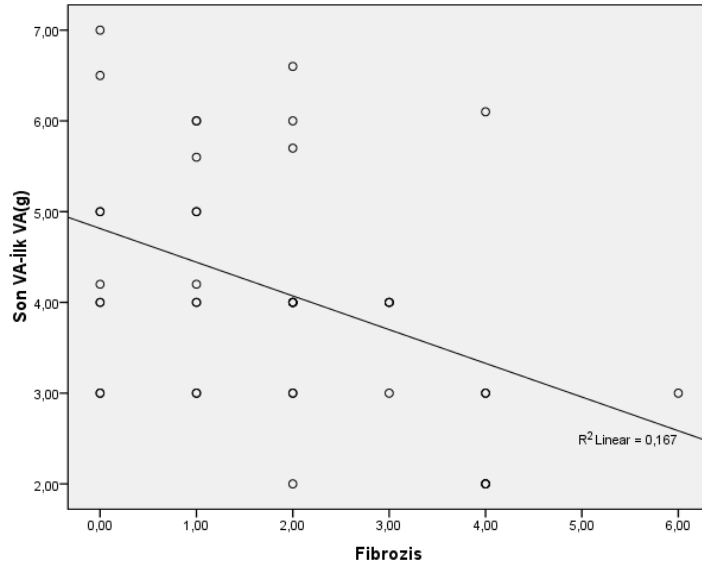
Şekil 25. Enflamasyon şiddeti ile IL-6 düzeyi arasındaki ilişki ($p=0,002$ $r=0,470$)

Enflamasyon şiddeti ile anti-enflamatuvar sitokinler olan IL-10 ve TGF- β 1 arasındaki ilişki varlığı değerlendirildiğinde; enflamasyon şiddeti ile IL-10 arasında istatistiksel olarak anlamlı negatif korelasyon saptanırken ($p=0,008$ $r= -0,414$), (Şekil 26); TGF- β 1 arasında istatistiksel olarak anlamlı korelasyon saptanmadı ($p>0,05$).

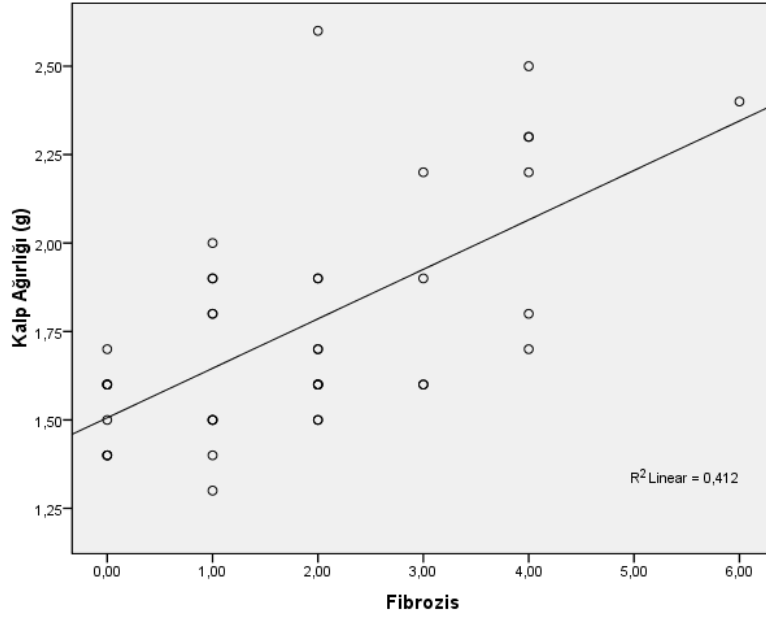


Şekil 26. Enflamasyon şiddeti i ile IL-10 düzeyi arasındaki ilişki ($p=0,008$ $r = - 0,414$)

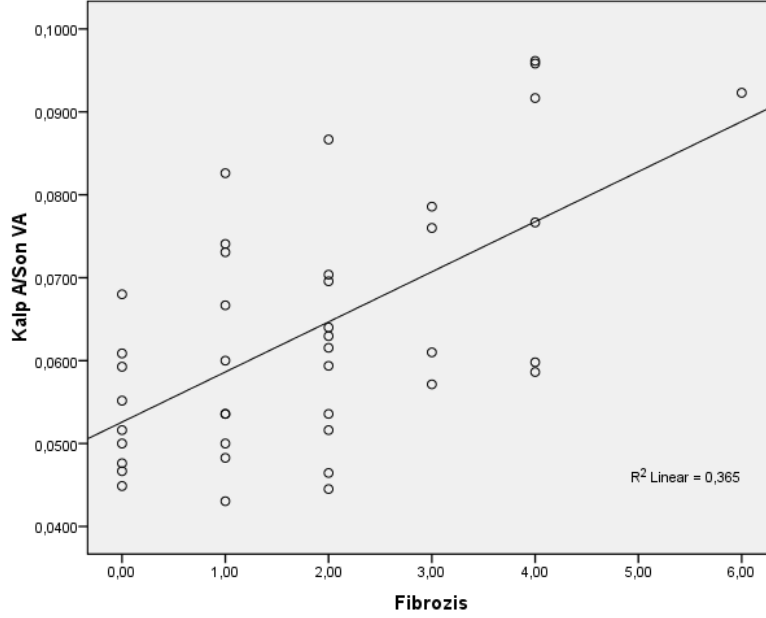
Fibrozis düzeyi ile farelerin kilo alım alımları (son vücut ağırlığı ile ilk vücut ağırlığı arasındaki fark) arasında istatistiksel olarak anlamlı negatif korelasyon saptanırken ($p= 0,006$ $r=- 0,419$), (Şekil 27); kalp ağırlığı ve kalp ağırlığı/son vücut ağırlığı oranı ile istatistiksel olarak pozitif korelasyon saptandı ($p=0,000$, $r= 0,590$ ve $0,524$), (Şekil 28-29).



Şekil 27. Fibrozis düzeyii ile son VA- ilk VA arasındaki ilişki ($p= 0,006$ $r=- 0,419$)

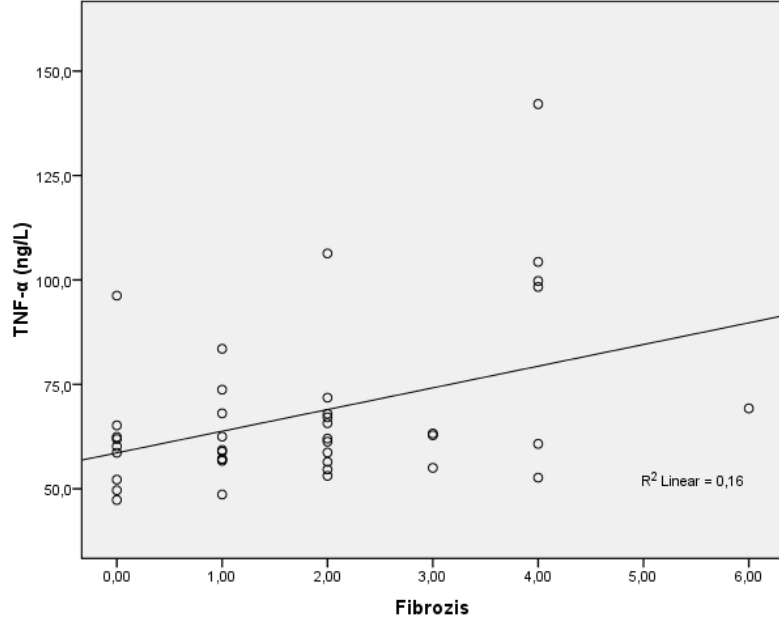


Şekil 28. Fibrozis düzeyi ile kalp ağırlığı arasındaki ilişki ($p=0,000$ $r=0,590$)

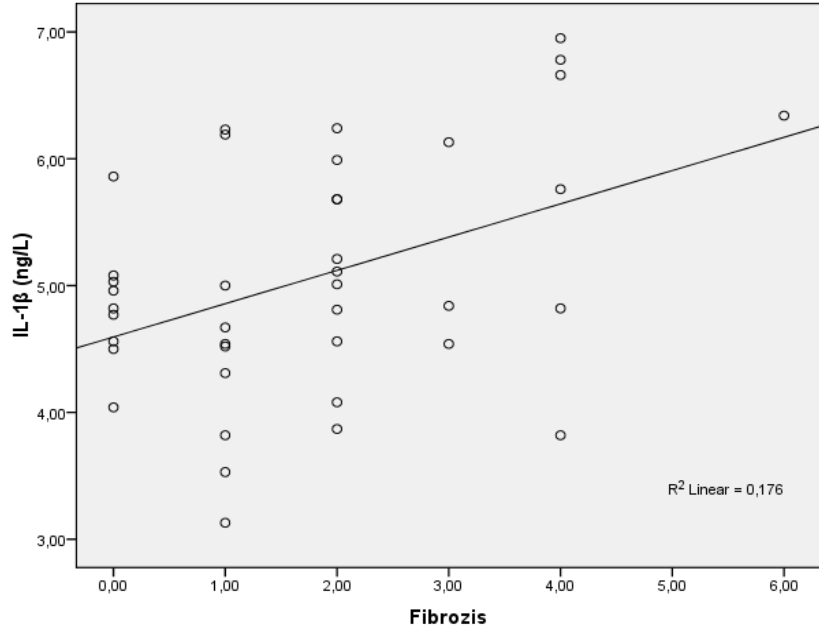


Şekil 29. Fibrozis düzeyi ile kalp ağırlığı/son VA arasındaki ilişki ($p=0,000$ $r=0,524$)

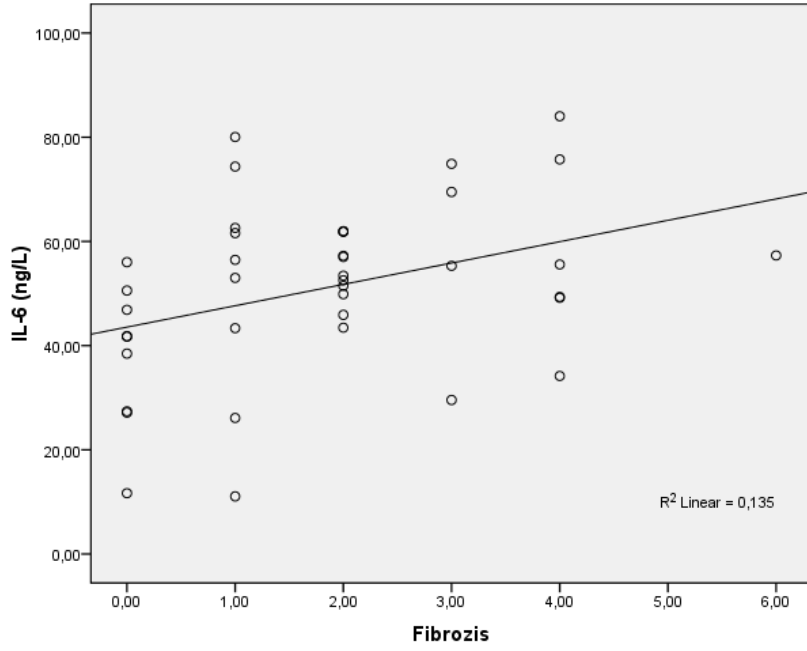
Fibrozis düzeyi ile enflamatuvar sitokinler olan TNF- α , IL-1 β ve IL-6 arasındaki ilişki değerlendirildiğinde; fibrozis düzeyi ile TNF- α , IL-1 β ve IL-6 arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif korelasyon saptandı (p ve r değerleri sırasıyla; TNF- α için p=0,030 r=0,343; IL-1 β için p=0,022 r=0,360; IL-6 için p=0,013 r=0,390), (Şekil 30-31-32).



Şekil 30. Fibrozis düzeyi ile TNF- α arasındaki ilişki (p=0,030 r=0,343)

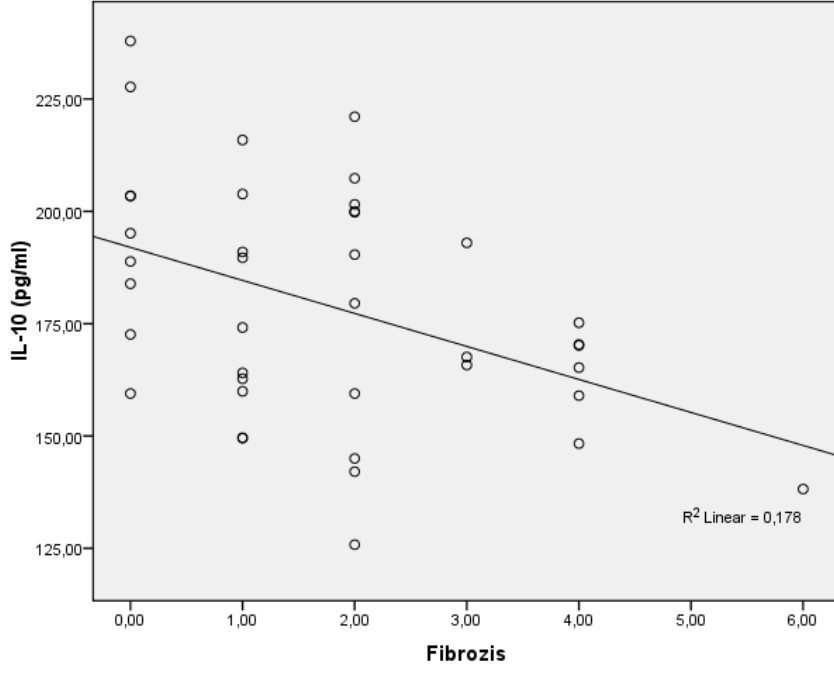


Şekil 31. Fibrozis düzeyi ile IL-1 β arasındaki ilişki (p=0,022 r=0,360)



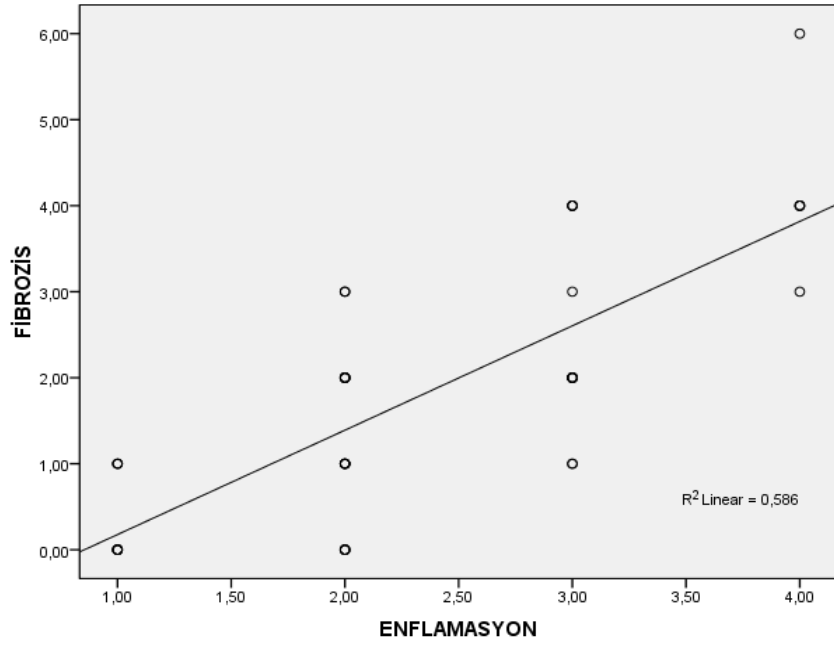
Şekil 32. Fibrozis düzeyi ile IL- 6 arasındaki ilişki (p= 0,013 r= 0,390)

Fibrozis düzeyi ile anti-enflamatuvar sitokinler olan IL-10 ve TGF- β 1 arasındaki ilişki değerlendirildiğinde; fibrozis düzeyi ile IL-10 arasında istatistiksel olarak anlamlı negatif korelasyon saptanırken ($p=0,017$ $r= -0,375$), (Şekil 33); TGF- β 1 düzeyleri ile arasında istatistiksel olarak farklılık saptanmadı ($p>0,05$).



Şekil 33. Fibrozis düzeyi ile IL-10 arasındaki ilişki ($p=0,017$ $r=- 0,375$)

Histolojik parametrelerin birbiriyle ilişkisi değerlendirildiğinde; enflamasyon şiddeti ile fibrozis d¼zeyi arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif korelasyon saptandı ($p=0,000$ $r=0,755$). Enflamasyon şiddeti ne kadar fazla ise, fibrozis gelişimi o kadar fazla olmuştur (şekil 34).



şekil 34. Enflamasyon şiddeti ile fibrozis d¼zeyi arasındaki ilişki ($p=0,000$ $r=0,755$)

5.TARTIŞMA

Miyokardit; miyozitlerin nekrozu ve dejenerasyonu ile seyreden, sağlıklı çocuklarda dilate kardiyomiyopati ve/veya kronik kalp yetersizliği ile sonuçlanabilen, hayati tehlike oluşturan bir hastalıktır (1). Üçüncü basamak hastanelere başvuran çocuk hastaların yaklaşık %0,05'i miyokardit tanısı almaktadır (3). Ülkemizde miyokardit insidansı tam olarak bilinmemektedir.

Miyokardit etiyolojisi oldukça geniş olup enfeksiyöz veya nonenfeksiyöz nedenlerden kaynaklanmaktadır. Klinik, hastanın yaşına bağlı olarak değişiklik göstermekle birlikte; kırgınlık, halsizlik, terleme, göğüs ağrısı, çarpıntı, egzersiz intoleransı, senkop, solunum sıkıntısı veya kardiyak kollapsa kadar geniş bir spektrumda karşımıza çıkabilmektedir (1,5). Miyokardit patogenezi hakkındaki bilgiler, deneysel hayvan çalışmalarından elde edilmiş olup; patogenezinde, enflamatuvar sitokinlerin ve otoimmünitenin rol oynadığı gösterilmiştir (4,5,11,125,126). Miyokardit tanısında kardiyak enzimler, elektrokardiyografi, telekardiyografi ve ekokardiyografi gibi invaziv olmayan testler kullanılsa da; kesin tanısı endomiyokardiyal biyopsidir. Tedavisi ve prognozu, altta yatan nedene göre değişir. Çoğu olguda altta yatan etiyoloji belirlenemez ve bu nedenle sadece destekleyici tedavi sağlanabilir (2). Günümüzde bazı merkezlerde, otoimmün ve viral miyokardit vakalarında destek tedavisine ek olarak IVIG tedavisinin faydaları bildirilmiş olsa da, halen miyokarditin özgün bir tedavisi yoktur (71).

Ozon; üç oksijen atomundan oluşan oda sıcaklığında renksiz, karakteristik kokusu olan ve kimyasal yapısı itibariyle radikal özelliği taşımamakla birlikte güçlü oksidan özelliği bulunan bir gazdır. Keşfedildiği günden beri tıp alanında başta dezenfektan olmak üzere; anti-mikrobiyal, anti-enflamatuvar, anti-oksidan ve immünmodülatör olarak kullanılmaktadır (7,8,90,91). Medikal ozon, ozon jenartörü ile oksijen molekülünün (O_2) çift bağını elektrik akımı verilmesiyle bozarak, diğer bir oksijen atomu ile birleşmesi sonucu oluşturulmaktadır. Elde edilen ozon, saf olarak verilmemeli ve belli oranda oksijenle karıştırılarak uygulanmalıdır. Bu karışımda oksijen %95'ten az, ozon %5'ten fazla olmamalıdır. Ozon, sistemik veya lokal olarak uygulanabilmektedir. Sistemik etki amacıyla majör veya minör otohemoterapi ve rektal insüflasyon olarak kullanılmaktadır. Rektal, intraartiküler, intraperitoneal veya topikal uygulamalar lokal etki istenilen durumlarda kullanılmaktadır. İntraperitoneal uygulamalar ise; genellikle deneysel hayvan çalışmalarında kullanılmaktadır.

Ozonun teröpatik dozu; uygulama şeklinden bağımsız olarak 5-60 µg/ml konsantrasyonlar arasındadır. Ozon tedavisinin yan etkisi yok denecek kadar az olup; genellikle uygulama hatalarına bağlı lokal komplikasyonlardan ve yüksek konsantrasyonda inhale edilmesinden ibarettir (90).

Ozonun anti-enflamatuvar, anti-mikrobiyal, anti-oksidan ve immünmodülatör etkileri bulunmaktadır. Bu etkileri nedeniyle literatürde, ozonla yapılmış çok sayıda klinik çalışma vardır (109-111,113,115,116). Diyabetik ayaklı hastalarda ozonun etkinliğini değerlendiren bir çalışmada (109); ozon tedavisinin antioksidan molekül düzeylerinde artışa bağlı olarak, antibiyotik tedavisine oranla yara iyileşmesini hızlandırdığı gösterilmiştir. Osteoartritli hastalarda intaartiküler ozon tedavisini gözden geçiren bir metaanalizde (111), intraartiküler ozon enjeksiyonu yapılan grubun, kontrol grubuna kıyasla ağrı skorunun daha düşük olduğu ve ozonun, hafif ve orta derecede osteoartriti olan hastalarda cerrahi tedavi öncesinde kullanılabiliceği bildirilmiştir. Tirelli U. ve arkadaşları (113), ozonu otohemoterapi ve rektal insüflasyon yöntemiyle fibromiyaljili hastalarda uygulamışlar ve diğer tedavilerden yeterli sonuç alamayan hastalarda tamamlayıcı ilaç olarak kullanılabiliceğini bildirmişlerdir. Başka bir çalışmada ise (110); lomber disk hernisi olan hastalara ozonun disk içine uygulaması sonrasında, hasta memnuniyeti ve medikal değerlendirmelerle tedavinin faydalı olduğunu bildirilmiştir. Ozonun dermatolojik hastalıklarda da etkili olduğu bildirilmiştir. İnfantil atopik dermatitli hastalarla yapılan bir çalışmada (115), topikal ozon uygulanmasının güvenli ve etkili olduğu bildirilmiştir. Huang ve arkadaşları (116), Herpes Zoster'li hastalarda topikal ozon tedavisinin, hiçbir yan etki olmadan ağrı şikayetlerini azaltarak klinik iyileşme sağladığını bildirmişlerdir.

Literatürde ozon ile ilgili çok sayıda deneysel hayvan çalışması da bulunmaktadır. Özellikle patogenizde iskemi/reperfüzyon hasarının, oksidatif stresin, enflamatuvar mekanizmaların ve immüntenin yer aldığı hastalıkların tedavisinde etkili olduğu bildirilmiştir (117,118,120,122-124,131). Ekici ve arkadaşları (117); ozonun, sıçanlarda testis torsiyonunu takiben iskemi/reperfüzyon hasarının önlenmesinde faydalı olduğunu bildirmişlerdir. Güven ve arkadaşları (118), yenidoğan sıçanlarda oluşturulan nekrotizan enterokolit modelinde ozonun; oksidatif stresi, intestinal hasarı ve TNF- α gibi enflamatuvar sitokinlerin düzeylerini azalttığını göstermişlerdir. Çeşitli kanser tedavi protokollerinde sıklıkla kullanılan, antrasiklin

grubu antibiyotik olan doksurobusinin; oksidatif stres sonucu neden olduğu kardiyak toksisitede, ozon tedavisinin oksidatif stresi baskılayarak kardiyoprotektif etkilerinin olduğu bildirilmiştir (122). Balb/c cinsi farelerde yapılan bir çalışmada (120), endotoksik şok sırasında ozon uygulamasının TNF- α salınımı azalttığı bildirilmiştir. Vaillant ve arkadaşları (131), romatoid artritli sıçanlarda 20 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyon intraartiküler ozon uygulamasının; TNF- α ve IL-1 β düzeyini azalttığını ve histolojik düzelme sağladığını bildirmişlerdir. Romatoid artritli sıçanlarda yapılan başka bir çalışmada ise (123), farklı konsantrasyonlarda (10-20-30-40-50 $\mu\text{g/ml}$) intraartiküler uygulanan ozonun enflamasyonu azalttığı ve en etkin konsantrasyonun 40 $\mu\text{g/ml}$ olduğu bildirilmiştir. Kaya ve arkadaşları (124), sıçanlarda oluşturdukları deneysel üveit modeline 60 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonunda intraperitoneal uygulanan ozon tedavisinin; inflaksimab tedavisi kadar etkin olduğunu ve TNF- α , IL-1 β ve IL-6 ve seviyesini azaltarak enflamasyonu baskıladığını ve histolojik olarak düzelmenin olduğunu bildirmişlerdir.

Literatürde deneysel hayvan modellerinde; romatoid artrit, üveit ve endotoksik şok gibi enflamatuvar hastalıklarda ozonun etkisini araştıran çalışmalar olmakla birlikte (120,123,124); patogenezinde enflamasyonun yer aldığı miyokardit üzerine etkisinin araştırıldığı herhangi bir çalışma bulunmamıştır. Çalışmamızda; miyokarditin patogenezinde enflamatuvar ve immün mekanizmaların rol oynaması ve ozonun da, anti-enflamatuvar ve immünmodülatör etkilere sahip olması nedeniyle miyokardit tedavisinde ozonun etkili olup olmayacağını araştırmayı amaçladık.

Çalışmamızda insan viral miyokardit patogenezinde oldukça benzeyen bir model olan deneysel otoimmün miyokardit modeli kullandık. Deneysel otoimmün miyokardit modeli; ilk olarak 1990 yılında, Kodama ve arkadaşları tarafından (125) oluşturulmuş olup; Lewis cinsi sıçanlarla yapılmıştır. Lewis cinsi sıçanlar ülkemize ithal edildiği için, Wistar Albino cinsi sıçanlar da miyokardit gelişimine dirençli olduğu için çalışmamızı, miyokardite duyarlı olan; ülkemizde de üretilen Balb/c cinsi fareler ile yaptık (132). Balb/c cinsi farelerde deneysel otoimmün miyokardit modeli; ilk olarak 1996 yılında Pummerer ve arkadaşları tarafından domuz kardiyak miyozini ve CFA karışımı kullanılarak oluşturulmuştur (126). Çalışmamız 6-8 haftalık, ağırlıkları 20-30 gram arasında değişen 49 erkek Balb/c cinsi fare ile yapıldı. Kontrol grubu dahil toplamda 7 grup oluşturuldu ve her gruba rastgele 7'şer fare koyuldu. Miyokardit oluşturulacak 6 gruptaki farelere deneyin 0. ve 7. günlerinde eşit miktardaki domuz kardiyak miyozin ve CFA karışımı subkutan uygulandı. Ozonun

etkinliğini araştırmak üzere 20, 30, 40, 50 ve 60 µg/ml konsantrasyondan ozon deneyin 8. gününden deneyin sonlandırıldığı 22. güne kadar hergün intraperitonel olarak uygulandı ve 22. günde fareler sakrifiye edildi.

Miyokardiyal hipertrofiye bağlı olarak kalp ağırlığının artması, miyokarditin patolojik bulgularından birisidir (5). Kalp ağırlığındaki bu artışın, vücut ağırlığındaki artıştan fazla olması durumunda ise; kalp ağırlığı/vücut ağırlığı oranında artışa neden olmaktadır. Kalp ağırlığı artışının azalması ve kalp ağırlığı/vücut ağırlığı oranında azalma, tedavinin etkinliğini göstermektedir. Pamukçu ve arkadaşları (73), DOM oluşturdukları sıçanlarda kalp ağırlığının arttığını gösterilmiştir. D vitamini öncülü olan kolekalsiferolün, otoimmün miyokarditli Balb/c fareler üzerindeki etkisini araştıran çalışmada ise; otoimmün miyokardit oluşturulan grupta kalp ağırlığının arttığı bildirilmiştir (81). Milenkovic ve arkadaşları (84), otoimmün miyokarditli sıçanlarda kalp ağırlığının arttığını saptamıştır. Hu F. ve arkadaşları yaptığı bir çalışmada (80); deneysel otoimmün miyokardit oluşturulan Balb/c farelerde kalp ağırlığı/son vücut ağırlığı oranında kalp ağırlığı lehine bozulma olduğunu bildirmişlerdir. DOM oluşturarak tedavinin etkinliğini gösteren çalışmalarda kalp ağırlığının ve kalp ağırlığı/vücut ağırlığı oranının tedaviyle azaldığı gösterilmiştir (73,80,81,85). Çalışmamızda; DOM grubundaki farelerin kalp ağırlığının kontrol grubuna göre arttığını saptadık. Önceki çalışmalarla uyumlu olarak; kalp ağırlığının ve kalp ağırlığı/vücut ağırlığı oranının ozon verilen tüm gruplarda, otoimmün miyokardit grubuna göre azaldığını gözlemledik. Sonuçlarımız, çalışmamızda uygulanan ozon konsantrasyonlarının miyokarditteki enflamatuvar süreçleri baskıladığını desteklemektedir.

Miyokardit, miyozitlerin enflamasyonu ve nekrozdur. Miyozitlerdeki bu hasar sonucunda, kardiyak hasar göstergesi olan troponin düzeylerinde artış meydana gelir. Miyokardit tedavisinde önemli bir gösterge troponin düzeylerinin azalarak normal sınırlara gerilemesidir. Çeşitli deneysel otoimmün miyokardit çalışmalarında, miyokardit gruplarında troponin düzeylerinin yükseldiği bildirilmiştir (50,73,74,78). Çalışmamızda da; önceki çalışmalarla uyumlu olarak, DOM grubunda, kontrol grubuna göre troponin T düzeylerini anlamlı olarak artmıştı. Pamukçu ve arkadaşları (74), obestatinin miyokardit üzerinde etkinliğini araştırdıkları çalışmalarında, obestatin tedavisi sonrası troponin I düzeyinin DOM grubuna göre azaldığını bildirmişlerdir. Lisinoprilin, deneysel otoimmün miyokardit üzerine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada lisinopril verilen miyokarditli sıçanların troponin T

düzeylerinin azaldığı gösterilmiştir (74). Başka bir çalışmada ise; DOM yapılan sıçanlarda, Protein Kinaz C inhibisyonu yapılarak troponin T düzeylerinin gerilediği bildirilmiştir (78). Bizim çalışmamızda da, literatürle uyumlu olarak; ozon verilen tüm gruplarda troponin T düzeyinin azaldığı ancak 50 ve 60 µg/ml konsantrasyonlardan ozon verilen gruplardaki azalmanın daha belirgin olduğu görüldü. Bu sonuç; 50 ve 60 µg/ml gibi yüksek konsantrasyonlarda verilen ozonun, miyokardit tedavisinde daha etkin olacağına işaret edebilir.

Miyokardit çoğunlukla, patojenik potansiyeli olan virüsün (Örn. *Coxsackievirüs*) vücuda girmesiyle başlar. Virüs duyarlı konakta; uygun dokularda çoğalarak, hematojen ve/veya lenfojen yolla miyokarda ulaşarak miyokard hasarına ve akut enflamasyona neden olur. Viral antijenlerin varlığı makrofajların aktivasyonuna neden olur ve makrofajların aktivasyonu sonucunda; enflamatuvar sitokinlerden TNF- α , IL-1 β ve IL-6 salınarak, viral eliminasyona başlar (39). Deneysel çalışmalarda otoimmün miyokardit modellerinde TNF- α , düzeylerinin arttığı gösterilmiştir. Pamukçu ve arkadaşları (73), DOM modelinde TNF- α düzeyinin yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Mito S. ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada (85), deneysel otoimmün miyokardit modelinde TNF- α düzeylerinin yükseldiği gösterilmiştir. Benitez R. ve arkadaşları (82), Balb/c farelerde oluşturdukları DOM modelinde, TNF- α düzeyinin yükseldiğini bildirmişlerdir. Çalışmamızda, literatürdeki çalışmalarla uyumlu olarak; TNF- α düzeyleri, otoimmün miyokardit grubunda yüksek bulundu. Miyokardit patogenezinde rol oynayan enflamatuvar mekanizmaların tedavi edilerek baskılandığını gösteren çalışmalarda ise, TNF- α düzeyleri, miyokardit gruplarına göre daha düşük olduğu gösterilmiştir (73,82,85). Zhong C. ve arkadaşları (78), Protein Kinaz C inhibisyonu yaparak DOM oluşturdukları Lewis cinsi sıçanlarda, TNF- α düzeylerinin azaldığını bildirmişlerdir. Lu ve arkadaşları tarafından (79), yarı esansiyel aminoasit olan taurinin, miyokarditli Balb/c farelerde TNF- α düzeylerini azaldığını gösterilmiştir. Bizim çalışmamızda da; TNF- α düzeylerinin, ozon verilen bütün gruplarda, DOM grubuna göre daha düşük olduğu görüldü. Bu sonuç; ozonun düşük, orta ve yüksek konsantrasyonlarda benzer anti-enflamatuvar etki sağlayarak miyokardiyal enflamasyonu azalttığını desteklemektedir.

Miyokardit seyrinde, bir diğer enflamatuvar olan IL-1 β 'nin düzeylerinde artış olduğu yapılan çalışmalardan bilinmektedir (78,85). Pamukçu ve arkadaşları bir çalışmada (73); DOM modelinde IL-1 β düzeyinin yüksek olduğunu göstermişlerdir.

Başka bir çalışmada ise; Balb/c farelerde oluşturulan DOM modelinde, IL-1 β düzeyinin yüksek olduğu bildirilmiştir (82). Çalışmamızda da önceki çalışmalarla benzer olarak; IL-1 β düzeyleri, deneysel otoimmün miyokardit grubunda, diğer gruplara göre daha yüksekti. Miyokarditin özellikle akut fazında makrofaj aktivasyonu sonucunda salınımı artan IL-1 β 'nin, uygun tedavi uygulamaları sonucunda düzeylerinin azalması tedavi etkinliği açısından anlamlıdır. Yapılan deneysel çalışmalarda, otoimmün miyokardit modellerinde IL-1 β düzeylerinin azalması uygulanan tedavinin etkin olduğunu göstermektedir (73,78,82,85). Çalışmamızda da IL-1 β düzeylerinin, ozon verilen bütün gruplarda, DOM grubuna göre azalmış bulundu. Bu sonuç; TNF- α sonuçlarında olduğu gibi, ozonun miyokardiyal hasarda düşük, orta ve yüksek konsantrasyonlarda benzer anti-enflamavuar etki sağladığını desteklemektedir.

Akut miyokardit fazında aktive olan diğer enflamatuvar sitokin olan IL-6'nın, yapılan deneysel otoimmün miyokardit çalışmalarında düzeylerinin arttığı gösterilmiştir. Pamukçu ve arkadaşları (73), obestatinin deneysel otoimmün miyokardit üzerinde etkinliğini araştırdığı çalışmada DOM grubunda IL-6 düzeyinde artış olduğunu, obestatin tedavisi sonrasında ise IL-6 düzeylerinin azaldığını bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda ise; IL-6 düzeyleri, DOM grubunda kontrol grubuna göre belirgin yüksekti. Bununla birlikte; 20 μ g/ml konsantrasyondan ozon verilen grup hariç, ozon verilen tüm gruplarda (farklılık istatistiksel olarak anlamlı olmasa da) DOM grubuna göre azalmış idi. En belirgin azalmanın ise; 60 μ g/ml konsantrasyondan ozon verilen grupta olduğu görüldü.

Miyokarditin özellikle subakut fazında miyozitlerin, virüslerin nükleik asit yapısını tanıması sonucu nükleer transkripsiyon faktörleri aktive olur ve enflamatuvar sitokin üretimi ve immün aktivasyon başlar. Doğal bağışıklığın bu şekilde tetiklenmesinden sonra; T hücrelerinin aktivasyonu, devamında B hücrelerinin uyarılması ve viral antijenlere karşı antikor üretimi ile sonuçlanan kazanılmış bağışıklık da uyarılmış olur. Subakut fazda, IL-10 gibi anti-enflamatuvar sitokinlerin enflamasyonu baskılamaya çalıştığı bilinmektedir (43). Bazen; anti-enflamatuvar mekanizmalar yeterli kalamaz ve bu süreç uzayarak kronik enflamasyona dönüşür, bu durumda ise; miyozitlerde nekroz, fibroz ve yeniden yapılanmaya meydana gelebilir (4,9,38,39). Pamukçu ve arkadaşları (73), deneysel otoimmün miyokardit seyrinde IL-10 düzeyinin azaldığı bildirilmiştir. WM. ve arkadaşları (77), atorvastatin; otoimmün miyokarditli sıçanlarda, IL-10 düzeyinin

azaldığını göstermişlerdir. Bizim çalışmamızda; literatürdeki önceki çalışmalarla uyumlu olarak; IL-10 düzeyi, DOM grubunda azalmıştı. Deneysel çalışmalarda; anti-enflamatuvar mekanizmaları güçlendiren tedavi uygulamalarında IL-10 düzeyinde artış olduğu dolayısıyla da enflamasyonun azaldığı görülmektedir. Nishio R. Ve arkadaşları (128), viral miyokarditli sıçanlara monoklonal IL-10 antikorunu verdiklerinde; histolojik olarak enflamasyonun, TNF- α ve IL-2 düzeylerinin azaldığını bildirmişlerdir. Atorvastatinin deneysel otoimmün miyokardite etkisini inceleyen bir çalışmada da, IL-10 düzeylerinin arttığı gösterilmiştir (77). Biz de çalışmamızda IL-10 düzeylerinin; 20 ve 30 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonlarda ozon verilen gruplarda değişmediğini, 40, 50 ve 60 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonlarda ozon verilen gruplarda ise, DOM grubuna göre arttığını ve en belirgin artışın 60 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonda ozon verilen grupta olduğunu gördük. Bu sonuçlar 60 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyondaki ozonun; otoimmün miyokarditte anti-enflamatuvar etkinliğin daha fazla olduğuna işaret edebilir.

Miyokarditin kronik fazında, enflamasyonun azalmasıyla birlikte; enflamasyon sırasında açığa çıkan TGF- β , enflamasyonu baskılayıp yeniden yapılanmayı tetikler ve bu durum ilerleyen süreçte, patolojik fibrozise neden olur. Deneysel çalışmalar kronik miyokarditin, viral patojenin vücuda girmesinden 21 gün sonra gelişmeye başladığını, özellikle de 28. günden sonra dilate kardiyomiyopati geliştiğini ve TGF'nin bu aşamada miyofibroblastlar tarafından eksprese edildiğini göstermiştir (4,9,11,38,39,133). Yakın zamanda yapılmış farklı bir çalışmada ise (134); kronik miyokarditli Balb/c farelerde TGF- β antikorunun dilate kardiyomiyopati oluşumunu engellediğini bildirilmiştir. Deneysel çalışmalarda otoimmün miyokarditin seyrinde TGF- β düzeylerinde azalma olduğu bildirilmiştir (73,135). Biz çalışmamızda TGF- $\beta 1$ düzeylerinin; istatistiksel olarak anlamlı olmasa da, DOM grubunda, kontrol grubuna göre daha düşük düzeyde olduğunu saptadık. Yapılan çalışmalarda, miyokarditte tedavinin etkinliği olarak TGF- β düzeylerinde artış olduğu gösterilmiştir. Pamukçu ve arkadaşları, obsestatinin anti-enflamatuvar etkisini araştırdıkları çalışmada (73); otoimmün miyokarditli Lewis sıçanlarda, TGF- $\beta 1$ düzeylerinin arttığını bildirilmişlerdir. Biz de çalışmamızda, TGF- $\beta 1$ düzeylerinin, ozon verilen gruplarda DOM grubuna göre anlamlı olmasa da ılımlı bir artış olduğunu saptadık. TGF- $\beta 1$ düzeyindeki farklılığın istatistiksel olarak anlamlı bulunmamasının iki nedene bağlı olabileceğini düşünmekteyiz: Birinci neden TGF- β 'nin çalışmamızda 22. günde yani kronik miyokardite geçiş döneminde çalışılmış olması; ikinci neden ise teknik olarak

son çalışılan test olması nedeniyle yeterli numune kalmaması sonucu bazı deneklerde çalışılmaması nedeniyle olabilir.

Miyokarditin patolojik bulgularından bir diğeri ise; makroskobik olarak kalp yüzeyindeki renk değişiklerdir ve genellikle miyokard dokusu gevşek ve soluk olarak görünür (5). Hayvan çalışmalarında da, kalp yüzeyindeki renk değişikleri gösterilmiştir (84,125,127). Pamukçu ve arkadaşları (73), deneysel otoimmün miyokardit oluşturulan sıçanların, kalp yüzeylerinde değişik evrelerde renk değişikliği olduğunu bildirmişlerdir. Yuan ve arkadaşları (51), karvedilolün anti-enflamatuvar etkisini gösterdikleri çalışmalarında otoimmün miyokarditli sıçanların kalp yüzeylerinde diskolorasyon olduğunu göstermişlerdir. Biz de çalışmamızda literatür ile uyumlu olarak; DOM oluşturulan farelerin kalplerinde, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı oranda artmış diskolorasyon saptadık. Bu da deneysel otoimmün miyokardit modelinin oluştuğunu göstermektedir. Deneysel otoimmün miyokardit ile yapılan hayvan çalışmalarında tedavi etkinliğinin değerlendirilmesinde kalp yüzeylerindeki renk değişikleri önemli bir gösterge olmuştur (51,73,76). Biz de çalışmamızda ozon verilen grupların diklorasyon evrelerinin DOM grubuna göre gerilediğini saptadık. Bu sonuçlar ozonun miyokarditte enflamasyonu baskılayarak anti-enflamatuvar etki sağladığını göstermektedir.

Miyokarditte patolojik süreçler hücresel düzeyde olduğundan kesin tanı endomiyokardiyal biyopsidir (5). Endomiyokardiyal biyopsi örnekleri, Dallas kriterlerine göre belirlenir ve miyozitlerin enflamasyon ve nekrozuna göre sınıflandırılır (12). Bu nedenle tedavinin etkinliğinin gösterilmesinde enflamasyon şiddetinde azalma önemli bir kriterdir. Yapılan deneysel çalışmalarda, histolojik olarak kalp dokusunda enflamasyon ve nekroz olduğu gösterilmiştir (73,125,126,132). Pamukçu ve arkadaşları (73), obestatinin anti-enflamatuvar etkisi sonucunda histolojik olarak miyokard dokusunda enflamasyonun azaldığını bildirmişlerdir. Benitez R. ve arkadaşları (82), Balb/c farelerde oluşturdukları DOM modelinde, VIP tedavisi sonrasında enflamasyonun azaldığını bildirmişlerdir. Karvedilolün anti-enflamatuvar etkinliğini gösteren deneysel bir çalışmada ise; histolojik olarak miyokard dokusundaki enflamasyonun regrese olduğu gösterilmiştir (51). Bir diğerk çalışmada (79) taurinin, miyokarditte enflamasyonu baskıladığı histolojik incelemeler sonucunda gösterilmiştir. Başka bir çalışmada ise (80); 1,25-OH₂ vitamin D₃'ün deneysel otoimmün miyokardit oluşturulan farelerde, enflamasyonun azalmasıyla beraber histolojik düzelmenin olduğu gösterilmiştir. Biz

de çalışmamızda; DOM oluşturulan grupta, kontrol grubuna göre belirgin artmış derecelerde enflamasyon saptadık. Ozon tedavisinden sonra enflamasyonun azaldığını ve özellikle 60 µg/ml konsantrasyondan verilen ozon grubuyla, DOM grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğunu gördük. Bu sonuçlar; 60 µg/ml gibi yüksek konsantrasyonlardan uygulanan ozon tedavisinin otoimmün miyokarditteki enflamasyonu daha güçlü bir şekilde baskılayacağını düşündürmektedir.

Miyokarditte, miyokard dokusunda hücre infiltrasyonu sonrasında aktive olan makrofajlardan salınan sitokinler; enflamasyon ve sonrasında fibrozis gelişimine yol açmaktadır (4,9). Miyokarditlerdeki bu süreç, çeşitli deneysel hayvan çalışmalarında gösterilmiştir (130,136). Biz de çalışmamızda DOM grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak artmış derecede fibrozis saptadık. Yapılan bir çalışmada (86), otoimmün miyokarditli Balb/c farelerde, berberinin anti-enflamatuvar etkisinin fibrozisi azalttığı gösterilmiştir. Biz de çalışmamızda, ozon tedavisi sonrasında enflamatuvar süreçlerin baskılanmasına bağlı olarak; ozon verilen tüm gruplarda fibrozisin azaldığını ve 60 µg/ml konsantrasyondan ozon verilen grupta, fibrozisteki azalanın DOM grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olduğunu saptadık. Bu sonuçlar; 60 µg/ml gibi yüksek konsantrasyonlarda uygulanan ozon tedavisinin otoimmün miyokarditte gelişebilecek fibrozisi daha güçlü bir şekilde engellediğini desteklemektedir.

Miyokarditli hastaların elektrokardiyografik değerlendirilmesinde spesifik olmamakla beraber; düşük voltajlı QRS kompleksleri, nonspesifik T dalga değişiklikleri ve sinüs taşikardisi görülebilir. Bazen de, akut miyokard enfarktüsünde görülen bir paterne benzeyen ST segmentinde azalma veya yükselme görülebilir (2,5). Pamukçu ve arkadaşları, otoimmün miyokarditli Lewis sıçanlarda obestatinin etkinliğini değerlendirdikleri çalışmalarında (73), deneklerin kalp hızı ve ST elevasyonu gibi elektrokardiyografik değişikliklerini değerlendirmişler. Kalp hızının miyokardit grubunda kontrol grubuna göre yüksek olduğunu ancak, istatistiksel olarak anlamlı sonuçların olmadığını bildirmişlerdir. Literatürde deneysel otoimmün miyokardit ile ilgili yapılan çalışmalarda sıçanlarda elektrokardiyografik değerlendirmenin yapıldığı görülürken, Balb/c farelerde elektrokardiyografik değerlendirmenin yapılabildiği bir çalışmaya rastlamadık. Miyokarditli hastalarda tanıda yapılacak en faydalı görüntüleme yöntemi ekokardiyografidir. Ekokardiyografi; miyokarditli hastalarda ventüküllerin yapısını, fonksiyon

bozukluklarını, duvar hareket anormalliklerini değerlendirmek için kolay ulaşılabilen araçtır. Literatürde deneysel otoimmün miyokarditli Balb/c farelerde, kardiyak fonksiyonu değerlendirmek için ekokardiyografi yapılabildiği görülmektedir (79,80). Biz çalışmamızda vücut ağırlıkları 19-30 gram arasında değişen farelere elektrokardiyografik ve ekokardiyografik değerlendirmeye teknik nedenlerden dolayı yer veremedik.

Ozonun anti-enflamatuvar, immünmodülatuvar ve antioksidan etkileri uygulanan doz ve konsantrasyona bağlı olarak değişmektedir. “*Uluslararası Ozon Tedavisi Okulları*”nın gerçekleştirdiği Madrid ozon deklorasyonunda kabul edildiği üzere terapötik ozon konsantrasyonları düşük, orta ve yüksek olarak üçe ayrılmaktadır (106). Buna göre; düşük ve orta dozlar anti-oksidan ve immunmodülatör, yüksek dozlar anti-enflamatuvar etki göstermektedir. Ozonun anti-enflamatuvar etkisi nedeniyle yapılan deneysel çalışmalarda ozon dozları, konsantrasyonları, uygulama yolları ve uygulama süreleri farklılık göstermektedir (119-121,123,124,131). Uysal ve arkadaşları (119), Sprague-Dawley cinsi sıçanlarda oluşturdukları nekrotizan pankreatit modelinde 0,7 mg/kg doz ve 60 µg/ml konsantrasyonda 3 gün intraperitoneal uyguladıkları ozon tedavisinin pankreas dokusu üzerinde olumlu etkileri olduğunu göstermişlerdir. Endotoksik şok oluşturulan Balb/c cinsi farelerde 0,2, 0,4 ve 1,2 mg/kg dozlarda intraperitoneal yolla ve 0,2 ve 0,4 mg/kg dozlarda rektal insüflasyon yolu ile 5 gün uygulanan ozon ile; TNF- α düzeylerinde azalma olduğu, en belirgin azalmanın 1,2 mg/kg dozda intraperitoneal olarak uygulanan grupta olduğu bildirilmiştir (120). Vaillant ve arkadaşları (131), romatoid artritli sıçanlarda 20 µg/ml konsantrasyon ve 80 µg/kg dozunda haftada 3 kez intraartiküler olarak uyguladıkları ozonun; TNF- α ve IL-1 β düzeyini azalttığını ve histolojik düzelme sağladığını bildirmişlerdir. Romatoid artritli sıçanlarda yapılan başka bir çalışmada ise (123), 10-20-30-40-50 µg/ml olmak üzere farklı konsantrasyonlarda haftada 1 kez, 3 hafta boyunca 1 ml intraartiküler uygulanan ozonun tüm gruplarda TNF- α , TNF-R1 ve TNF-R2 düzeylerini azalttığı ve en belirgin azalmanın 40 µg/ml konsantrasyonda uygulanan ozon grubunda olduğu bildirilmiştir. Otoimmün üveit modeli oluşturulan sıçanlarda yapılan bir çalışmada (124), üveit modelinin oluşturulmasının ardından gruplara 14-21. günlerde intraperitoneal uygulanan infliksimab tedavisi ile ozon tedavisinin (0,7 mg/kg dozda, 60 µg/ml konsantrasyonda) benzer etki göstererek TNF- α , IL-1 ve IL-6 düzeylerinde azalma ve histolojik olarak enflamasyon şiddetinde azalma sağladığı gösterilmiştir. Biz çalışmamızda, 1 mg/kg dozda, 20-30-40-50-60 µg/ml konsantrasyonlarda

çalışmanın 8-21. günler arası intraperitoneal olarak verilen ozonun tüm konsantrasyonlarda, otoimmün miyokarditte gelişen enflamasyona sekonder olarak artan TNF- α ve IL-1 β düzeylerinin baskılandığını saptadık. IL-6 düzeylerinde ise; 20 μ g/ml konsantrasyonda hariç, ozon uygulanan diğer gruplarda azalma olduğunu ve en belirgin azalmanın 60 μ g/ml konsantrasyonda ozon uygulanan grupta olduğunu gördük. Bununla birlikte; ozon verilen tüm gruplarda troponin T düzeyinin azaldığı ancak 50 ve 60 μ g/ml konsantrasyonlardan ozon verilen gruplardaki azalmanın daha belirgin olduğunu saptadık. Ek olarak anti-enflamatuvar bir sitokin olan IL-10 düzeylerinde de 60 μ g/ml konsantrasyonda ozon verilen grupta artış (20 μ g/ml konsantrasyonda etkisiz olmakla birlikte) saptadık. Histolojik açıdan ise; 60 μ g/ml konsantrasyonda ozon verilen grupta enflamasyon ve fibrozis şiddetinin daha fazla baskılandığı görüldü. Tüm bu sonuçlar; 20 μ g/ml gibi düşük dozlardan uygulanan ozonun aksine, 60 μ g/ml gibi yüksek konsantrasyonlarda verilen ozonun, miyokardit tedavisinde daha etkin olacağına işaret etmektedir.

Çalışmamızda, literatürdeki çalışmalardan farklı olarak, sonuçlarımız arasındaki ilişkiyi de değerlendirdik. Buna göre; troponin T düzeyleri ile klinik olarak farelerin kilo alımları arasında negatif, kalp ağırlığı ve kalp ağırlığı/son vücut ağırlığı arasında pozitif ilişki olduğunu saptadık. Troponin T düzeyleri ile enflamatuvar sitokin olan TNF- α , IL-1 ve IL-6 düzeylerinde ve histolojik gösterge olan enflamasyon şiddeti ve fibrozis düzeyi arasında anlamlı bir pozitif ilişki vardı. Bu durum troponin T düzeylerindeki artış ile enflamatuvar sitokin düzeyleri ve histolojik etkilenmedeki artışın paralel olduğunu göstermektedir. Bu sonuçlar; troponinin miyokarditin şiddetini belirlenmesinde (gerek klinik, gerek biyokimyasal ve gerekse patolojik olarak) oldukça güvenilir bir belirteç olduğunu düşündürmektedir.

Çalışmamızda deneysel otoimmün miyokardit oluşturulan gruptaki farelerin hastalık belirtisi olarak diğer gruplara göre günlük hareketlerinde azalma, tüylerinde dökülme, kilo alımlarında azalma, kalp ağırlığında artma, makroskopik olarak kalp yüzeyinde renk değişikliği olması, mikroskopik olarak enflamasyon ve fibrozis derecesinin yüksek olması, kardiyak hasar göstergesi olan troponin T düzeyinin daha yüksek olması ve enflamatuvar sitokin düzeylerinin (TNF- α , IL-1 β ve IL-6) yüksek, anti-enflamatuvar sitokin olan IL-10 düzeyinin düşük saptanması miyokardit geliştiğinin güçlü kanıtlarıdır. Bununla birlikte; ozon verilen gruplarda deneysel otoimmün miyokardit grubuna göre kalp ağırlığındaki artışın azaldığı, kilo alımlarının artırdığı, disklorasyonu evrelerinin azaldığı, mikroskopik olarak enflamasyon ve

fibrozisin baskılandığı, troponin T ve enflamatuvar sitokin (TNF- α , IL- 1β ve IL-6) düzeylerinin azaldığı ayrıca, anti-enflamatuvar sitokin olan IL-10'un düzeylerinin arttığı göz önünde bulundurulduğunda ozonun; anti-enflamatuvar ve immünmodölatör etkiyle, miyokarditte var olan enflamatuvar ve immün mekanizmaları yöneterek enflamasyonu baskıladığı saptandı. Ek olarak ozonun bu etkilerinin 60 $\mu\text{g/ml}$ gibi yüksek konsantrasyonlarda daha belirgin olduğu görüldü.

Çalışmamızın iki önemli kısıtlaması vardır: Bunlar; kardiyak fonksiyon ve miyokarditte tedaviye yanıtın değerlendirilmesinde kullanılan ekokardiyografik incelemenin farelerin çok küçük olması nedeniyle yapılamaması ve farelerdeki otoimmün miyokardit modelinin insandaki durumu yansıtmayabileceğidir.

Çalışmamızın sonuçları, ozonun anti-enflamatuvar ve immünmodölatör etkisinin miyokardit tedavisinde umut verici olabileceğini göstermektedir. Ancak bu konuda yapılacak geniş serileri içeren prospektif klinik çalışmalara ihtiyaç vardır.

6.SONUÇLAR

Bu çalışmada insandaki viral miyokardit patogenezin benzeyen; Balb/c cinsi farelerde oluşturulan deneysel otoimmün miyokardit modelinde, ozonun etkisini araştırmak amacıyla yapılmıştır.

1. İlk ve son vücut ağırlıkları açısından gruplar arasında istatistiksel olarak farklılık saptanmadı ($p>0,05$).

2.Tüm gruplardaki farelerin deney süresindeki 22 günlük izlemi boyunca kilo aldığı görüldü ($p=0,003$). Deneysel otoimmün miyokardit oluşturulan farelerde kilo alımının kontrol grubu ve ozon verilen gruplara göre daha azdı. Farklılık DOM grubu ile kontrol grubu, DOM grubu ile DOM+O20 grubu ve DOM grubu ile DOM+O60 grubu arasında istatistiksel olarak anlamlıydı ($p=0,003$).

3. Kalp ağırlığı ve kalp ağırlığı/son vücut ağırlığı oranı DOM grubunda, kontrol grubu ve ozon verilen diğer gruplara göre belirgin olarak fazlaydı ($p=0,000$).

4. Kardiyak hasar göstergesi olan troponin T düzeyleri açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptandı ($p=0,001$). Troponin T düzeyi DOM grubunda, tüm gruplara göre belirgin artmış olmakla birlikte; farklılık; DOM grubu ile kontrol grubu, DOM grubu ile DOM+O50 grubu ve DOM grubu ile DOM+O60 grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı idi ($p=0,001$).

5. TNF- α düzeyleri açısından gruplar arasında anlamlı farklılık saptandı ($p=0,0000$). TNF- α seviyesi DOM grubunda, tüm gruplara göre belirgin artmış olmakla birlikte; farklılık; DOM grubu ile kontrol grubu, DOM grubu ile DOM+O20 grubu, DOM grubu ile DOM+O30 grubu, DOM grubu ile DOM+O40, DOM grubu ile DOM+O50 grubu ve DOM grubu ile DOM+O60 grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı saptandı ($p=0,0000$),

6. IL-1 β düzeyleri açısından gruplar arasında anlamlı farklılık vardı ($p=0,000$). IL-1 β düzeyi DOM grubunda, tüm gruplara göre belirgin artmış olmakla birlikte; farklılık; DOM grubu ile kontrol grubu, DOM grubu ile DOM+O20 grubu, DOM grubu ile DOM+O30 grubu, DOM grubu ile DOM+O40, DOM grubu ile DOM+O50 grubu ve DOM grubu ile DOM+O60 grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı idi ($p=0,000$).

7. IL-6 düzeyleri açısından gruplar arasında belirgin farklılık bulundu ($p=0,004$). IL-6 düzeyi kontrol grubunda, tüm gruplara göre en düşük seviyede olmakla birlikte; farklılık; kontrol grubu ile DOM grubu ve kontrol grubu ile DOM+O20 grupları arasında istatistiksel olarak anlamlıydı ($p=0,004$).
8. IL-10 düzeyleri açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptandı ($p=0,005$). Farklılık; DOM grubu ile DOM+O60 grubu ve DOM+O20 ile DOM+O60 grubu arasında istatistiksel olarak anlamlıydı ($p=0,005$).
9. TGF- $\beta 1$ düzeyleri DOM grubunda, kontrol grubu ve ozon verilen gruplara göre düşük olmakla birlikte; gruplar arasında farklılık istatistiksel olarak anlamsızdı ($p>0,05$).
10. Diskolorasyon evreleri açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık vardı ($p=0,0001$). Farklılığın; DOM grubu ile kontrol grubu arasından kaynaklandığı görüldü.
11. Enflamasyon şiddeti incelendiğinde, gruplar arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0,0001$). Farklılığın; DOM grubu ile kontrol grubu ve DOM grubu ile DOM+O60 grubu arasından kaynaklandığı görüldü.
12. Fibrozis düzeyleri açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptandı ($p=0,0001$). Farklılık; DOM grubu ile kontrol grubu ve DOM grubu ile DOM+O60 grubu arasından kaynaklanmaktaydı.
13. Troponin T düzeyleri ile kilo alımı arasında anlamlı negatif korelasyon ($p=0,023$, $r=-0,358$), kalp ağırlığı ve kalp ağırlığı/son vücut ağırlığı oranı arasında ise pozitif korelasyon saptandı ($p=0,000$, $r= 0,625$ ve $0,703$).
14. Troponin T düzeyleri ile TNF- α , IL-1 β ve IL-6 düzeyleri arasında anlamlı pozitif korelasyon saptandı (p ve r değerleri sırasıyla TNF- α için $p=0,006$ $r=0,426$; IL-1 β için $p=0,000$ $r=0,584$; IL-6 için $p=0,048$ $r=0,318$).
15. Troponin T düzeyleri ile enflamasyon şiddeti ve fibrozis düzeyi arasında anlamlı pozitif ilişki saptandı (enflamasyon için $p=0,002$ $r=0,476$ ve fibrozis için $p=0,028$, $r=0,347$).
16. Enflamasyon şiddetiyle ile kalp ağırlığı ve kalp ağırlığı/son vücut ağırlığı oranı arasında anlamlı pozitif korelasyon saptandı ($p=0,000$, $r= 0,650$ ve $0,592$).

17. Enflamasyon şiddeti ile TNF- α , IL-1 β ve IL-6 arasında anlamlı pozitif korelasyon (p ve r değerleri sırasıyla TNF- α için p=0,040 r=0,325; IL-1 β için p=0,002 r=0,466; IL-6 için p=0,002 r=0,470); IL-10 düzeyleri arasında anlamlı negatif korelasyon saptandı (p=0,008 r= -0,414). Enflamasyon şiddeti ile TGF- β 1 düzeyleri arasında ise korelasyon saptanmadı (p>0,05).

18. Fibrozis düzeyi ile farelerin kilo alımları arasında anlamlı negatif korelasyon (p= 0,006 r=- 0,419); kalp ağırlığı ve kalp ağırlığı/son vücut ağırlığı oranı arasında pozitif korelasyon vardı (p=0,000, r= 0,590 ve 0,524).

19. Fibrozis düzeyi ile TNF- α , IL-1 β ve IL-6 düzeyleri arasında anlamlı pozitif korelasyon (p ve r değerleri sırasıyla; TNF- α için p=0,030 r=0,343; IL-1 β için p=0,022 r=0,360; IL-6 için p=0,013 r=0,390); IL-10 düzeyleri arasında ise anlamlı negatif korelasyon (p=0,017 r= -0,375) saptandı.

20. Histolojik parametrelerin birbiriyle ilişkisi değerlendirildiğinde; enflamasyon şiddeti ile fibrozis düzeyi arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif korelasyon olduğu görüldü (p=0,000 r=0,755).

KAYNAKLAR

1. Dancea AB. Myocarditis in infants and children: A review for the paediatrician. *Paediatrics & Child Health*. 2001;6(8):543-5.
2. Park MK. Cardiovascular Infections, Myocarditis. In: Park MK, eds. *Pediatric cardiology for Practitioners*. 6 th ed. St. Louis: Mosby, 2014:19,342-66.
3. Klugman D, Berger JT, Sable CA, He J, Khandelwal SG, Slonim AD. Pediatric patients hospitalized with myocarditis: a multi-institutional analysis. *Pediatric Cardiology*. 2010;31(2):222-8.
4. Leuschner F, Katus HA, Kaya Z. Autoimmune myocarditis: past, present and future. *Journal of Autoimmunity*. 2009;33(3-4):282-9.
5. Towbin JA. Myocarditis. In: Hugh D. Allen M, editor. *Moss and Adams' Heart Disease in Infants, Children, and Adolescents 7th ed* Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins; 2008:1207-1224.
6. Jensen LD, Marchant DJ. Emerging pharmacologic targets and treatments for myocarditis. *Pharmacology & Therapeutics*. 2016;161:40-51.
7. Bocci V. Ozone as Janus: this controversial gas can be either toxic or medically useful. *Mediators of Inflammation*. 2004;13(1):3-11.
8. Bocci VA. Scientific and medical aspects of ozone therapy. State of the art. *Archives of Medical Research*. 2006;37(4):425-35.
9. Dennert R, Crijns HJ, Heymans S. Acute viral myocarditis. *European Heart Journal*. 2008;29(17):2073-82.
10. Richardson P, McKenna W, Bristow M, Maisch B, Mautner B, O'Connell J, et al. Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of cardiomyopathies. *Circulation*. 1996;93(5):841-2.

11. Feldman AM, McNamara D. Myocarditis. *The New England Journal of Medicine*. 2000;343(19):1388-98.
12. Aretz HT. Myocarditis: the Dallas criteria. *Human Pathology*. 1987;18(6):619-24.
13. Carniel E, Sinagra G, Bussani R, Di Lenarda A, Pinamonti B, Lardieri G, et al. Fatal myocarditis: morphologic and clinical features. *Italian heart journal : official Journal of the Italian Federation of Cardiology*. 2004;5(9):702-6.
14. Tschope C, Bock CT, Kasner M, Noutsias M, Westermann D, Schwimmbeck PL, et al. High prevalence of cardiac parvovirus B19 infection in patients with isolated left ventricular diastolic dysfunction. *Circulation*. 2005;111(7):879-86.
15. Durani Y, Egan M, Baffa J, Selbst SM, Nager AL. Pediatric myocarditis: presenting clinical characteristics. *The American Journal of Emergency Medicine*. 2009;27(8):942-7.
16. Dominguez F, Kuhl U, Pieske B, Garcia-Pavia P, Tschope C. Update on Myocarditis and Inflammatory Cardiomyopathy: Reemergence of Endomyocardial Biopsy. *Revista Espanola de Cardiologia (English ed)*. 2016;69(2):178-87.
17. Fung G, Luo H, Qiu Y, Yang D, McManus B. Myocarditis. *Circulation Research*. 2016;118(3):496-514.
18. Lauer B, Niederau C, Kuhl U, Schannwell M, Pauschinger M, Strauer BE, et al. Cardiac troponin T in patients with clinically suspected myocarditis. *Journal of the American College of Cardiology*. 1997;30(5):1354-9.
19. Mlczoch E, Darbandi-Mesri F, Luckner D, Salzer-Muhar U. NT-pro BNP in acute childhood myocarditis. *The Journal of Pediatrics*. 2012;160(1):178-9.
20. Smith SC, Ladenson JH, Mason JW, Jaffe AS. Elevations of cardiac troponin I associated with myocarditis. Experimental and clinical correlates. *Circulation*. 1997;95(1):163-8.

21. Mair J, Morandell D, Genser N, Lechleitner P, Dienstl F, Puschendorf B. Equivalent early sensitivities of myoglobin, creatine kinase MB mass, creatine kinase isoform ratios, and cardiac troponins I and T for acute myocardial infarction. *Clinical Chemistry*. 1995;41(9):1266-72.
22. Braunwald E, Jones RH, Mark DB, Brown J, Brown L, Cheitlin MD, et al. Diagnosing and managing unstable angina. Agency for Health Care Policy and Research. *Circulation*. 1994;90(1):613-22.
23. Lee IM, Rexrode KM, Cook NR, Manson JE, Buring JE. Physical activity and coronary heart disease in women: is "no pain, no gain" passe? *Jama*. 2001;285(11):1447-54.
24. Swedberg K, Cleland J, Dargie H, Drexler H, Follath F, Komajda M, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic heart failure: executive summary (update 2005): The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Chronic Heart Failure of the European Society of Cardiology. *European Heart Journal*. 2005;26(11):1115-40.
25. Towbin JA, Lowe AM, Colan SD, Sleeper LA, Orav EJ, Clunie S, et al. Incidence, causes, and outcomes of dilated cardiomyopathy in children. *Jama*. 2006;296(15):1867-76.
26. Freedman SB, Haladyn JK, Floh A, Kirsh JA, Taylor G, Thull-Freedman J. Pediatric myocarditis: emergency department clinical findings and diagnostic evaluation. *Pediatrics*. 2007;120(6):1278-85.
27. Durani Y, Giordano K, Goudie BW. Myocarditis and pericarditis in children. *Pediatric clinics of North America*. 2010;57(6):1281-303.
28. Lurz P, Luecke C, Eitel I, Fahrenbach F, Frank C, Grothoff M, et al. Comprehensive Cardiac Magnetic Resonance Imaging in Patients With Suspected Myocarditis: The MyoRacer-Trial. *Journal of the American College of Cardiology*. 2016;67(15):1800-11.

29. Canter CE, Simpson KE. Diagnosis and treatment of myocarditis in children in the current era. *Circulation*. 2014;129(1):115-28.
30. Caforio AL, Pankuweit S, Arbustini E, Basso C, Gimeno-Blanes J, Felix SB, et al. Current state of knowledge on aetiology, diagnosis, management, and therapy of myocarditis: a position statement of the European Society of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases. *European Heart Journal*. 2013;34(33):2636-48, 48a-48d.
31. Wu LA, Lapeyre AC, 3rd, Cooper LT. Current role of endomyocardial biopsy in the management of dilated cardiomyopathy and myocarditis. *Mayo Clinic Proceedings*. 2001;76(10):1030-8.
32. Yilmaz A, Kindermann I, Kindermann M, Mahfoud F, Ukena C, Athanasiadis A, et al. Comparative evaluation of left and right ventricular endomyocardial biopsy: differences in complication rate and diagnostic performance. *Circulation*. 2010;122(9):900-9.
33. Mills KI, Vincent JA, Zuckerman WA, Hoffman TM, Canter CE, Marshall AC, et al. Is Endomyocardial Biopsy a Safe and Useful Procedure in Children with Suspected Cardiomyopathy? *Pediatric Cardiology*. 2016;37(7):1200-10.
34. Graham BH, Waymire KG, Cottrell B, Trounce IA, MacGregor GR, Wallace DC. A mouse model for mitochondrial myopathy and cardiomyopathy resulting from a deficiency in the heart/muscle isoform of the adenine nucleotide translocator. *Nature Genetics*. 1997;16(3):226-34.
35. Baba A, Yoshikawa T, Ogawa S. Autoantibodies produced against sarcolemmal Na-K-ATPase: possible upstream targets of arrhythmias and sudden death in patients with dilated cardiomyopathy. *Journal of the American College of Cardiology*. 2002;40(6):1153-9.

36. Matsumori A. Molecular and immune mechanisms in the pathogenesis of cardiomyopathy--role of viruses, cytokines, and nitric oxide. *Japanese Circulation Journal*. 1997;61(4):275-91.
37. Matsumori A, Yamada T, Suzuki H, Matoba Y, Sasayama S. Increased circulating cytokines in patients with myocarditis and cardiomyopathy. *British Heart Journal*. 1994;72(6):561-6.
38. Kawai C. From myocarditis to cardiomyopathy: mechanisms of inflammation and cell death: learning from the past for the future. *Circulation*. 1999;99(8):1091-100.
39. Sagar S, Liu PP, Cooper LT, Jr. Myocarditis. *Lancet (London, England)*. 2012;379(9817):738-47.
40. Liu PP, Opavsky MA. Viral myocarditis: receptors that bridge the cardiovascular with the immune system? *Circulation Research*. 2000;86(3):253-4.
41. Amoah BP, Yang H, Zhang P, Su Z, Xu H. Immunopathogenesis of Myocarditis: The Interplay Between Cardiac Fibroblast Cells, Dendritic Cells, Macrophages and CD4+ T Cells. *Scandinavian Journal of Immunology*. 2015;82(1):1-9.
42. Shioi T, Matsumori A, Nishio R, Ono K, Kakio T, Sasayama S. Protective role of interleukin-12 in viral myocarditis. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 1997;29(9):2327-34.
43. Okura Y, Yamamoto T, Goto S, Inomata T, Hirono S, Hanawa H, et al. Characterization of cytokine and iNOS mRNA expression in situ during the course of experimental autoimmune myocarditis in rats. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 1997;29(2):491-502.
44. Maron BJ, Ackerman MJ, Nishimura RA, Pyeritz RE, Towbin JA, Udelson JE. Task Force 4: HCM and other cardiomyopathies, mitral valve prolapse, myocarditis,

and Marfan syndrome. *Journal of the American College of Cardiology*. 2005;45(8):1340-5.

45. Packer M, Poole-Wilson PA, Armstrong PW, Cleland JG, Horowitz JD, Massie BM, et al. Comparative effects of low and high doses of the angiotensin-converting enzyme inhibitor, lisinopril, on morbidity and mortality in chronic heart failure. ATLAS Study Group. *Circulation*. 1999;100(23):2312-8.

46. Kantor PF, Lougheed J, Dancea A, McGillion M, Barbosa N, Chan C, et al. Presentation, diagnosis, and medical management of heart failure in children: Canadian Cardiovascular Society guidelines. *The Canadian Journal of Cardiology*. 2013;29(12):1535-52.

47. Kirk R, Dipchand AI, Rosenthal DN, Addonizio L, Burch M, Chrisant M, et al. The International Society for Heart and Lung Transplantation Guidelines for the management of pediatric heart failure: Executive summary. [Corrected]. *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation*. 2014;33(9):888-909.

48. Park MK. Congestive Heart Failure In: Park MK. *Pediatric cardiology for Practitioners*. 6 th ed. St. Louis: Mosby, 2014: 27, 451-64.

49. Abraham WT, Adams KF, Fonarow GC, Costanzo MR, Berkowitz RL, LeJemtel TH, et al. In-hospital mortality in patients with acute decompensated heart failure requiring intravenous vasoactive medications: an analysis from the Acute Decompensated Heart Failure National Registry (ADHERE). *Journal of the American College of Cardiology*. 2005;46(1):57-64.

50. Skrzypiec-Spring M, Haczkiwicz K, Sapa A, Piasecki T, Kwiatkowska J, Ceremuga I, et al. Carvedilol Inhibits Matrix Metalloproteinase-2 Activation in Experimental Autoimmune Myocarditis: Possibilities of Cardioprotective Application. *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics*. 2018;23(1):89-97.

51. Yuan Z, Shioji K, Nimata M, Kishimoto C. Cardioprotective effects of carvedilol on acute autoimmune myocarditis. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2004;259(1-2):223-7.
52. Schultz JC, Hilliard AA, Cooper LT, Jr., Rihal CS. Diagnosis and treatment of viral myocarditis. *Mayo Clinic Proceedings*. 2009;84(11):1001-9.
53. Xiao J, Shimada M, Liu W, Hu D, Matsumori A. Anti-inflammatory effects of eplerenone on viral myocarditis. *European Journal of Heart Failure*. 2009;11(4):349-53.
54. Jefferies JL, Denfield SW, Price JF, Dreyer WJ, McMahon CJ, Grenier MA, et al. A prospective evaluation of nesiritide in the treatment of pediatric heart failure. *Pediatric Cardiology*. 2006;27(4):402-7.
55. Reiss N, El-Banayosy A, Arusoglu L, Blanz U, Bairaktaris A, Koerfer R. Acute fulminant myocarditis in children and adolescents: the role of mechanical circulatory assist. *ASAIO journal (American Society for Artificial Internal Organs:1992)*. 2006;52(2):211-4.
56. Ghelani SJ, Spaeder MC, Pastor W, Spurney CF, Klugman D. Demographics, trends, and outcomes in pediatric acute myocarditis in the United States, 2006 to 2011. *Circulation Cardiovascular Quality and Outcomes*. 2012;5(5):622-7.
57. Rajagopal SK, Almond CS, Laussen PC, Rycus PT, Wypij D, Thiagarajan RR. Extracorporeal membrane oxygenation for the support of infants, children, and young adults with acute myocarditis: a review of the Extracorporeal Life Support Organization registry. *Critical Care Medicine*. 2010;38(2):382-7.
58. Singh RK, Humlicek T, Jeewa A, Fester K. Pediatric Cardiac Intensive Care Society 2014 Consensus Statement: Pharmacotherapies in Cardiac Critical Care Immune Therapy. *Pediatric critical care medicine : a journal of the Society of Critical*

Care Medicine and the World Federation of Pediatric Intensive and Critical Care Societies. 2016;17(3 Suppl 1):S69-76.

59. Magnani JW, Dec GW. Myocarditis: current trends in diagnosis and treatment. *Circulation*. 2006;113(6):876-90.

60. Kleinert S, Weintraub RG, Wilkinson JL, Chow CW. Myocarditis in children with dilated cardiomyopathy: incidence and outcome after dual therapy immunosuppression. *The Journal of Heart and Lung Transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation*. 1997;16(12):1248-54.

61. Schmaltz AA, Demel KP, Kallenberg R, Neudorf U, Kandolf R, Klingel K, et al. Immunosuppressive therapy of chronic myocarditis in children: three cases and the design of a randomized prospective trial of therapy. *Pediatric Cardiology*. 1998;19(3):235-9.

62. Bergmann KR, Kharbanda A, Haveman L. Myocarditis And Pericarditis In The Pediatric Patient: Validated Management Strategies. *Pediatric Emergency Medicine Practice*. 2015;12(7):1-22; quiz 3.

63. Aziz KU, Patel N, Sadullah T, Tasneem H, Thawerani H, Talpur S. Acute viral myocarditis: role of immunosuppression: a prospective randomised study. *Cardiology in the Young*. 2010;20(5):509-15.

64. Hia CP, Yip WC, Tai BC, Quek SC. Immunosuppressive therapy in acute myocarditis: an 18 year systematic review. *Archives of Disease in Childhood*. 2004;89(6):580-4.

65. Camargo PR, Okay TS, Yamamoto L, Del Negro GM, Lopes AA. Myocarditis in children and detection of viruses in myocardial tissue: implications for immunosuppressive therapy. *International Journal of Cardiology*. 2011;148(2):204-8.

66. Farinha IT, Miranda JO. Myocarditis in Paediatric Patients: Unveiling the Progression to Dilated Cardiomyopathy and Heart Failure. 2016;3(4).

67. Drucker NA, Colan SD, Lewis AB, Beiser AS, Wessel DL, Takahashi M, et al. Gamma-globulin treatment of acute myocarditis in the pediatric population. *Circulation*. 1994;89(1):252-7.
68. McNamara DM, Rosenblum WD, Janosko KM, Trost MK, Villaneuva FS, Demetris AJ, et al. Intravenous immune globulin in the therapy of myocarditis and acute cardiomyopathy. *Circulation*. 1997;95(11):2476-8.
69. Robinson JL, Hartling L, Crumley E, Vandermeer B, Klassen TP. A systematic review of intravenous gamma globulin for therapy of acute myocarditis. *BMC cardiovascular disorders*. 2005;5(1):12.
70. Haque A, Bhatti S, Siddiqui FJ. Intravenous immune globulin for severe acute myocarditis in children. *Indian Pediatrics*. 2009;46(9):810-1.
71. Robinson J, Hartling L, Vandermeer B, Klassen TP. Intravenous immunoglobulin for presumed viral myocarditis in children and adults. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2015(5):Cd004370.
72. Liu ZL, Liu ZJ, Liu JP, Kwong JS. Herbal medicines for viral myocarditis. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2012;11:Cd003711.
73. Pamukcu O, Baykan A, Bayram LC, Narin F, Cetin N, Narin N, et al. Anti-inflammatory role of obestatin in autoimmune myocarditis. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology*. 2016;43(1):47-55.
74. Atteya M, Mohamed RA, Ahmed AM, Abdel-Baky NA, Alfayez MA, Almalke HD, et al. Lisinopril has a cardio-protective effect on experimental acute autoimmune myocarditis in rats. *Histology and Histopathology*. 2017;32(4):405-12.
75. Yuan Z-Y, Kishimoto C, Shioji K, Nakamura H, Yodoi J, Sasayama S. Temocapril treatment ameliorates autoimmune myocarditis associated with enhanced cardiomyocyte thioredoxin expression. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2003;248:185-92.

76. Yuan Z, Nimata M, Okabe TA, Shioji K, Hasegawa K, Kita T, et al. Olmesartan, a novel AT1 antagonist, suppresses cytotoxic myocardial injury in autoimmune heart failure. *American journal of physiology Heart and Circulatory Physiology*. 2005;289(3):H1147-52.
77. Li WM, Liu W, Gao C, Zhou BG. Immunoregulatory effects of atorvastatin on experimental autoimmune myocarditis in Lewis rats. *Immunology and Cell Biology*. 2006;84(3):274-80.
78. Zhong C, Wu Y, Chang H, Liu C, Zhou L, Zou J, et al. Effect of PKC inhibitor on experimental autoimmune myocarditis in Lewis rats. *Oncotarget*. 2017;8(33):54187-98.
79. Lu YF, Zhang QY, Wang LH, Liu XY, Zhang SX. The protective effects of taurine on experimental autoimmune myocarditis. *European review for medical and pharmacological sciences*. 2017;21(8):1868-75.
80. Hu F, Yan L, Lu S, Ma W, Wang Y, Wei Y, et al. Effects of 1, 25-Dihydroxyvitamin D3 on Experimental Autoimmune Myocarditis in Mice. *Cellular physiology and biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*. 2016;38(6):2219-29.
81. Liu N, Su H, Zhang Y, Liu Z, Kong J. Cholecalciferol cholesterol emulsion attenuates experimental autoimmune myocarditis in mice via inhibition of the pyroptosis signaling pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2017;493(1):422-8.
82. Benitez R, Delgado-Maroto V. Vasoactive Intestinal Peptide Ameliorates Acute Myocarditis and Atherosclerosis by Regulating Inflammatory and Autoimmune Responses. 2018;200(11):3697-710.
83. Latva-Hirvela J, Kyto V, Saraste A, Vuorinen T, Levijoki J, Saukko P. Effects of levosimendan in experimental acute coxsackievirus myocarditis. *European Journal of Clinical Investigation*. 2009;39(10):876-82.

84. Milenkovic M, Vucicevic D, Milosavljevic P, Ranin NA, Vukanic ZS, Colic M. Suppression of experimental autoimmune myocarditis by sodium fusidate (fusidin). *Pharmacological Research*. 2005;52(6):491-6.
85. Mito S, Watanabe K, Harima M, Thandavarayan RA, Veeraveedu PT, Sukumaran V, et al. Curcumin ameliorates cardiac inflammation in rats with autoimmune myocarditis. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 2011;34(7):974-9.
86. Liu X, Zhang X, Ye L, Yuan H. Protective mechanisms of berberine against experimental autoimmune myocarditis in a rat model. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2016;79:222-30.
87. Bocci V, Aldinucci C, Borrelli E, Corradeschi F, Diadori A, Fanetti G, et al. Ozone In Medicine. *Ozone: Science & Engineering*. 2001;23(3):207-17.
88. Sun W, Pei L. Ozone preconditioning and exposure to ketamine attenuates hepatic inflammation in septic rats. *Archives of Medical Science : AMS*. 2012;8(5):918-23.
89. Andreula C. Ozone therapy. *Neuroradiology*. 2011;53 Suppl 1:S207-9.
90. Viebahn-Hänsler R, León Fernández OS, Fahmy Z. Ozone in Medicine: The Low-Dose Ozone Concept—Guidelines and Treatment Strategies. *Ozone: Science & Engineering*. 2012;34(6):408-24.
91. Bocci V, Di Paolo N. Oxygen-ozone therapy in medicine: an update. *Blood Purification*. 2009;28(4):373-6.
92. Elvis AM, Ekta JS. Ozone therapy: A clinical review. *Journal of Natural Science, Biology and Medicine*. 2011;2(1):66-70.
93. Sagai M, Bocci V. Mechanisms of Action Involved in Ozone Therapy: Is healing induced via a mild oxidative stress? *Medical Gas Research*. 2011;1:29.
94. Bocci VA, Zanardi I, Travagli V. Ozone acting on human blood yields a hormetic dose-response relationship. *Journal of Translational Medicine*. 2011;9:66.

95. Di Paolo N, Gaggiotti E, Galli F. Extracorporeal blood oxygenation and ozonation: clinical and biological implications of ozone therapy. *Redox report : communications in free radical research*. 2005;10(3):121-30.
96. Bocci V. Is it true that ozone is always toxic? The end of a dogma. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2006;216(3):493-504.
97. Valacchi G, Bocci V. Studies on the biological effects of ozone: 10. Release of factors from ozonated human platelets. *Mediators of Inflammation*. 1999;8(4-5):205-9.
98. Bach FH. Heme oxygenase-1: a therapeutic amplification funnel. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2005;19(10):1216-9.
99. Otterbein LE, Soares MP, Yamashita K, Bach FH. Heme oxygenase-1: unleashing the protective properties of heme. *Trends in Immunology*. 2003;24(8):449-55.
100. Bocci V. Autohaemotherapy after treatment of blood with ozone. A reappraisal. *The Journal of International Medical Research*. 1994;22(3):131-44.
101. Bocci V, Borrelli E, Travagli V, Zanardi I. The ozone paradox: ozone is a strong oxidant as well as a medical drug. *Medicinal Research Reviews*. 2009;29(4):646-82.
102. Di Paolo N, Bocci V, Gaggiotti E. Ozone therapy. *The International Journal of Artificial Organs*. 2004;27(3):168-75.
103. Bocci V. The case for oxygen-ozonotherapy. *British Journal of Biomedical Science*. 2007;64(1):44-9.
104. Fitzpatrick E, Holland OJ, Vanderlelie JJ. Ozone therapy for the treatment of chronic wounds: A systematic review. *International Wound Journal*. 2018;15(4):633-44.

105. Re L, Mawsouf MN, Menendez S, Leon OS, Sanchez GM, Hernandez F. Ozone therapy: clinical and basic evidence of its therapeutic potential. *Archives of Medical Research*. 2008;39(1):17-26.
106. Spain Ozone Therapy Society of Medical Professionals A. Madrid Declaration on Ozone Therapy 2010 [October 19, 2019]. Available from: <https://aepromo.org/en/madrid-declaration-on-ozone-therapy/>.
107. Smith NL, Wilson AL, Gandhi J, Vatsia S, Khan SA. Ozone therapy: an overview of pharmacodynamics, Current Research and Clinical Utility. 2017;7(3):212-9.
108. A SR, Reddy N, Dinapadu S, Reddy M, Pasari S. Role of ozone therapy in minimal intervention dentistry and endodontics - a review. *Journal of International Oral Health : JIOH*. 2013;5(3):102-8.
109. Martinez-Sanchez G, Al-Dalain SM, Menendez S, Re L, Giuliani A, Candelario-Jalil E, et al. Therapeutic efficacy of ozone in patients with diabetic foot. *European Journal of Pharmacology*. 2005;523(1-3):151-61.
110. Muto M, Ambrosanio G, Guarnieri G, Capobianco E, Piccolo G, Annunziata G, et al. Low back pain and sciatica: treatment with intradiscal-intraforaminal O₂-O₃ injection. Our experience. *La Radiologia Medica*. 2008;113(5):695-706.
111. Raeissadat SA, Tabibian E, Rayegani SM, Rahimi-Dehgolan S, Babaei-Ghazani A. An investigation into the efficacy of intra-articular ozone (O₂-O₃) injection in patients with knee osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Pain Research*. 2018;11:2537-50.
112. Menendez S, Del Cerro A, Alvarez T, Hernandez F. Application of ozone therapy in the vestibulocochlear syndrome. *Reviews on Recent Clinical Trials*. 2012;7(4):321-8.

113. Tirelli U, Cirrito C, Pavanello M, Piasentin C, Lleshi A, Taibi R. Ozone therapy in 65 patients with fibromyalgia: an effective therapy. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. 2019;23(4):1786-8.
114. Tan L, Huang J, Lu J, Lu J. Clinical efficacy of ozonated oil in the treatment of psoriasis vulgaris. *Journal of Central South University Medical Sciences*. 2018;43(2):173-8.
115. Qin G, Huang J, Pan Y, Xiang Y, Ou C, Huang J, et al. Topical ozone application: An innovative therapy for infantile atopic dermatitis. *Journal of Central South University Medical Sciences*. 2018;43(2):163-7.
116. Huang J, Huang J, Xiang Y, Gao L, Pan Y, Lu J. Topical ozone therapy: An innovative solution to patients with herpes zoster. *Journal of Central South University Medical Sciences*. 2018;43(2):168-72.
117. Ekici S, Dogan Ekici AI, Ozturk G, Benli Aksungar F, Sinanoglu O, Turan G, et al. Comparison of melatonin and ozone in the prevention of reperfusion injury following unilateral testicular torsion in rats. *Urology*. 2012;80(4):899-906.
118. Guven A, Gundogdu G, Vurucu S, Uysal B, Oztas E, Ozturk H, et al. Medical ozone therapy reduces oxidative stress and intestinal damage in an experimental model of necrotizing enterocolitis in neonatal rats. *Journal of Pediatric Surgery*. 2009;44(9):1730-5.
119. Uysal B, Yasar M, Ersoz N, Coskun O, Kilic A, Cayc T, et al. Efficacy of hyperbaric oxygen therapy and medical ozone therapy in experimental acute necrotizing pancreatitis. *Pancreas*. 2010;39(1):9-15.
120. Zamora ZB, Borrego A, Lopez OY, Delgado R, Gonzalez R, Menendez S, et al. Effects of ozone oxidative preconditioning on TNF-alpha release and antioxidant-prooxidant intracellular balance in mice during endotoxic shock. *Mediators of Inflammation*. 2005;2005(1):16-22.

121. Tezcan AH, Ozturk O, Ustebay S, Adali Y, Yagmurdu H. The beneficial effects of ozone therapy in acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. *Pharmacological Reports* : PR. 2018;70(2):340-5.
122. Delgado-Roche L, Hernandez-Matos Y, Medina EA, Morejon DA, Gonzalez MR, Martinez-Sanchez G. Ozone-Oxidative Preconditioning Prevents Doxorubicin-induced Cardiotoxicity in Sprague-Dawley Rats. *Sultan Qaboos University Medical Journal*. 2014;14(3):e342-8.
123. Chen H, Yu B, Lu C, Lin Q. The effect of intra-articular injection of different concentrations of ozone on the level of TNF-alpha, TNF-R1, and TNF-R2 in rats with rheumatoid arthritis. *Rheumatology International*. 2013;33(5):1223-7.
124. Kaya A, Sonmez M, Kar T, Haholu A, Yildirim Y, Muftuoglu T, et al. Efficiency of Ozone Therapy in a Rat Model of Experimental Uveitis. *Ocular Immunology and Inflammation*. 2017;25(5):695-700.
125. Kodama M, Matsumoto Y, Fujiwara M, Masani F, Izumi T, Shibata A. A novel experimental model of giant cell myocarditis induced in rats by immunization with cardiac myosin fraction. *Clinical Immunology and Immunopathology*. 1990;57(2):250-62.
126. Pummerer CL, Luze K, Grassl G, Bachmaier K, Offner F, Burrell SK, et al. Identification of cardiac myosin peptides capable of inducing autoimmune myocarditis in BALB/c mice. *The Journal of Clinical Investigation*. 1996;97(9):2057-62.
127. Odemis E, Turkay S, Koca C, Kiyici H, Karadag A, Bayrak R, et al. Effects of zileuton on the development of autoimmune myocarditis in an experimental rat model. *Current Therapeutic Research, Clinical and Experimental*. 2007;68(4):262-70.
128. Nishio R, Matsumori A, Shioi T, Ishida H, Sasayama S. Treatment of experimental viral myocarditis with interleukin-10. *Circulation*. 1999;100(10):1102-8.

129. Yuan J, Yu M, Li HH, Long Q, Liang W, Wen S, et al. Autophagy contributes to IL-17-induced plasma cell differentiation in experimental autoimmune myocarditis. *International Immunopharmacology*. 2014;18(1):98-105.
130. Weckbach LT, Grabmaier U, Uhl A, Gess S, Boehm F, Zehrer A, et al. Midkine drives cardiac inflammation by promoting neutrophil trafficking and NETosis in myocarditis. 2019;216(2):350-68.
131. Vaillant JD, Fraga A, Diaz MT, Mallok A, Viebahn-Hansler R, Fahmy Z, 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(1-3):318-24.
132. Myers JM, Fairweather D, Huber SA, Cunningham MW. Autoimmune myocarditis, valvulitis, and cardiomyopathy. *Current protocols in immunology*. 2013;Chapter 15:Unit 15.4.1-51.
133. Esfandiarei M, McManus BM. Molecular biology and pathogenesis of viral myocarditis. *Annual Review of Pathology*. 2008;3:127-55.
134. Blyszczuk P, Muller-Edenborn B, Valenta T, Osto E, Stellato M, Behnke S, et al. Transforming growth factor-beta-dependent Wnt secretion controls myofibroblast formation and myocardial fibrosis progression in experimental autoimmune myocarditis. *European Heart Journal*. 2017;38(18):1413-25.
135. Wang Y, Ma W, Lu S, Yan L, Hu F, Wang Z, et al. Androgen receptor regulates cardiac fibrosis in mice with experimental autoimmune myocarditis by increasing microRNA-125b expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2018;506(1):130-6.
136. Kania G, Blyszczuk P, Valaperti A, Dieterle T, Leimenstoll B, Dirnhofer S, et al. Prominin-1+/CD133+ bone marrow-derived heart-resident cells suppress experimental autoimmune myocarditis. *Cardiovascular Research*. 2008;80(2):236-45.

