1. **Streszczenie**

Ozon wykazuje właściwości silnie utleniające, działa toksycznie na organizmy żywe, powoduje uszkodzenie błon komórkowych. Ozonoterapia poprawia mikrokrążenie krwi w niedotlenianych tkankach, podnosi też poziom komórkowych antyoksydantów, stymuluje układ odpornościowy oraz korzystną rolę w reakcjach zapalnych. Mikrocząstki (MP*)* to sferyczne fragmenty błon komórkowych o średnicy od 0,1 do 1,0 μm uwalniane z komórek eukariotycznych do przestrzeni zewnątrzkomórkowej. Formowanie MP odbywa się w trakcie dojrzewania, aktywacji oraz apoptozy komórki. Nie posiadają one jądra komórkowego oraz nie syntetyzują własnych białek, mogą jednak zawierać aktywne biologicznie molekuły, np. enzymy, białka błonowe, materiał genetyczny, białka adhezyjne, czynniki krzepnięcia oraz lipidy błonowe. Uczestniczą w regulacji i koordynacji wielu procesów zachodzących w organizmie, np.: procesów zapalnych, neoangiogenezy, krzepnięcia i fibrynolizy. Mikrocząstki przekazują sygnały między komórkami, stanowią łącznik między procesem krzepnięcia a lokalnym stanem zapalnym. Odgrywają także istotną rolę w progresji nowotworów.

Ozonoterapia wykazała pozytywny wpływ na proces gojenia ran w przebiegu cukrzycy, oraz chorób tętnic obwodowych,wzrost perfuzji nerek, leczenie postaci suchej AMD, poprawę funkcji motorycznych kończyn górnych po przebytym udarze mózgu, korzystne zmiany w metabolizmie tłuszczów i stymulację układu antyoksydacyjnego po przebytym zawale serca, złagodzenie objawów astmy oskrzelowej. Badania na temat skutków działania ozonu na krew są niejednoznaczne. Brak jest doniesień dotyczących wpływu ozonu na powstawanie mikrocząstek.

Celem badań była ocena wpływu ozonowania krwi pełnej na:

* + 1. uwalnianie mikrocząstek pochodzenia erytrocytarnego (EMP), leukocytarnego (LMP), śródbłonkowego (ŚMP) oraz z płytek krwi (PMP),
    2. wybrane parametry układu hemostazy.

Materiałem do badań była krew żylna pobrana od 20 zdrowych mężczyźni w wieku 25-35 lat, nie biorący żadnych leków. Krew w ilości 80 ml pobierana była do pojemnika z roztworem cytrynianu sodu, fosforanu i dekstrozy. Po pobraniu krew rozdzielana była na 3 części: pierwszą część poddawano działaniu powietrza atmosferycznego (grupa P), drugą działaniu ozonu w dawce 30 µg/ml (grupa O1), trzecią działaniu ozonu w dawce 60 µg/ml (grupa O2). Grupę kontrolną stanowiła krew nie poddana procedurze napowietrzania ani ozonowania (grupa K). Mieszanina ozonu z tlenem była wytwarzana z tlenu medycznego w urządzeniu ATO-3 MINI ozone generator (CryoFlex, Poland), bezpośrednio przed ozonowaniem krwi. Stężenie ozonu w mieszaninie gazów wynosiło 30 µg/ml. Krew była mieszana z pojedynczą dawką 10 lub 20 ml mieszaniny ozonu z tlenem lub 20 ml powietrza. Z każdego pojemnika pobierano przed podaniem gazu i bezpośrednio po ozonowaniu/napowietrzaniu pobierane były próbki krwi do badań metodą cytometrii przepływowej i badań układu hemostazy. Próbki do badań hemostazy odwirowywano z przyspieszeniem 2000 × g przez 10 min w celu uzyskania osocza. W celu oznaczenia ilości MP, próbki krwi odwirowano przez 15 minut z przyspieszeniem 1500 x g, w celu oddzielenia większych elementów morfotycznych. Supernatant odwirowywano 2 minuty z przyspieszeniem 13000 x g. Następnie w supernatancie określano liczbę i rodzaj mikrocząstek. Pochodzenie mikrocząstek ustalano na podstawie ekspresji antygenów powierzchniowych charakterystycznych dla komórek, z których powstały: mikrocząstki pochodzenia erytrocytarnego - CD235+, MP pochodzące z płytek krwi - CD 42+, MP z leukocytów - CD45+, MP pochodzące z komórek śródbłonka naczyniowego – CD144+. Próbki analizowano z użyciem cytometru przepływowego Facscalibur (Becton Dickinson, USA). Pomiar czasu APTT wykonywano przy użyciu odczynnika Hemostat APTT-EL Pomiar czasu PT wykonywano z zastosowaniem odczynnika Hemostat Tromboplastin SI. Pomiar stężenia fibrynogenu oznaczano przy użyciu zestawu Hemostat Fibrinogen opartego na metodzie Claussa. Stężenie D-dimerów określano przy użyciu testu ilościowego w systemie VIDAS do immunoenzymatycznego oznaczania produktów degradacji fibryny z wykorzystaniem techniki enzymoimmunofluorescencyjnej (BioMerieux). Opracowanie danych przeprowadzono za pomocą pakietu statystycznego STATISTICA 6.0.

W grupach poddanych ozonowaniu zaobserwowano statystycznie istotny wzrost stężenia D-dimerów w porównaniu do grupy kontrolnej oraz grupy P. Wydłużenie APTT w obu grupach poddanych działaniu ozonu w porównaniu z grupą K oraz grupą P było statystycznie istotne, aczkolwiek niewielkie, nie wykraczające poza zakres normy. Wydłużenie PT osiągnęło istotność statystyczną tylko w grupie poddanej działaniu ozonu w dawce 60 µg/ml w porównaniu z grupą K, grupą napowietrzoną oraz grupą ozonowaną dawką 30 µg/ml. Odnotowano znaczący statystyczne spadek stężenia fibrynogenu w grupie poddanej działaniu ozonu w grupie O1 oraz grupie O2 w porównaniu z grupą K oraz grupą P. Spadek stężenia fibrynogenu w grupie O2 w porównaniu z grupą O1 również był istotny statystycznie. W obu ozonowanych grupach w porównaniu z grupą K oraz grupą P wykazano znamienny statystyczne wzrost ilości PMP oraz EMP. Wzrost ilości PMP i EMP w grupie O2 w porównaniu z grupą O1 również był istotny statystycznie. W obu grupach poddanych działaniu ozonu oraz w grupie napowietrzanej odnotowano istotny statystyczne wzrost ilości ŚMP oraz LMP w porównaniu z grupą K. Ponadto wzrost ilości ŚMP w grupie O2 w porównaniu z grupą P również był istotny statystycznie podobnie jak wzrost ilości LMP w grupach O1 i O2 w porównaniu z grupą P. Różnica w ilości LMP pomiędzy grupą O1 a grupą O2 też była istotne statystycznie.

Wykonane badania własne dostarczyły dowodów, że ozonowanie krwi powoduje wprost proporcjonalne do dawki ozonu uwalnianie mikrocząstek z krwinek czerwonych, leukocytów, płytek krwi, a nawet z komórek śródbłonka. Ponadto ozonowanie krwi powoduje wydłużenie czasów APTT oraz PT, oraz spadek stężenia fibrynogenu i wzrost stężenia d-dimerów.

Obserwacje i wnioski:

* + 1. Ozonowanie krwi hamuje krzepnięcie krwi i aktywuje fibrynolizę.
    2. Ozonowanie krwi powoduje wzrost ilości generowanych mikrocząstek z komórek krwi i śródbłonka.
  1. Wzrost ilości mikrocząstek generowanych z komórek krwi i śródbłonka jest wprost proporcjonalny od dawki ozonu.
  2. Ilości generowanych pod wpływem ozonu mikrocząstek z poszczególnych rodzajów komórek krwi i komórek śródbłonka korelują ze sobą.
  3. Ze względu na wpływ ozonowania krwi na uwalnianie mikrocząstek i układ hemostazy, wydaje się, że w przypadku stosowania przetoczeń ozonowanej krwi należy brać pod uwagę stan układu hemostazy u pacjenta, a w szczególności oceniać ryzyko zakrzepowo-zatorowe.