

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
ANESTEZİYOLOJİ VE REANİMASYON ANABİLİM DALI

STREPTOZOSİN İLE DİYABET OLUŞTURULAN
RATLARDA KARACİĞER İSKEMİ REPERFÜZYON
HASARINDA OZONUN KORUYUCU ETKİSİ

UZMANLIK TEZİ
DR. BİLGE DEMİRTAŞ

TEZ DANIŞMANI
DOÇ. DR. GÜLAY KİP

ANKARA
ARALIK 2024

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
ANESTEZİYOLOJİ VE REANİMASYON ANABİLİM DALI

STREPTOZOSİN İLE DİYABET OLUŞTURULAN
RATLARDA KARACİĞER İSKEMİ REPERFÜZYON
HASARINDA OZONUN KORUYUCU ETKİSİ

UZMANLIK TEZİ
DR. BİLGE DEMİRTAŞ

TEZ DANIŞMANI
DOÇ. DR. GÜLAY KİP

ANKARA
ARALIK 2024

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER.....	i
KISALTMALAR	iii
TABLolar DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
1. GİRİŞ ve AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Hayvan Deneylerinde Ratların Kullanımı	3
2.2.Ratlarda Diyabet Modelleri	5
2.2.1. Streptozotosin.....	6
2.2.2.Etki Mekanizması.....	6
2.2.3.Uygulama Şekli	7
2.2.4.Kimyasal Ajanlarla Oluşturulan Diyabet Modellerinde Kan Glikozunun Yanıtları[12]	8
2.3.Ratlarda İskemi Reperfüzyon Modeli	9
2.3.1.Karaciğer İskemi Reperfüzyon Modeli	10
2.4. İskemi Reperfüzyon Hasarı	12
2.4.1. Mekanizma	13
2.4.2. Karaciğer İ/R	16
2.5. Ozon	17
2.5.1. Tıbbi Alanda Kullanım.....	18
2.5.2.Uygulama Yolları	19
2.5.3. Kontrendikasyonlar [22].....	22
2.5.4. Etki Mekanizması.....	23

2.6. Diyabetes Mellitus.....	24
2.6.1. Risk Faktörleri	26
2.6.2. Patofizyoloji	26
2.6.3. DM ve Karaciğer	31
2.7. Oksidatif Stres	32
3. GEREÇ VE YÖNTEM	37
3.1. Denek Seçimi	37
3.2. Kullanılan Yöntem	37
3.2.1. Diyabet oluşturma	38
3.2.2. Karaciğer İ/R Oluşturma	38
3.3. Deney Grupları	41
3.4. Dokuların Saklanması	42
3.5. Histolojik İnceleme	42
3.6. Biyokimyasal İnceleme	43
3.7. İstatiksel Değerlendirme.....	43
4. BULGULAR	44
5. TARTIŞMA.....	53
6. SONUÇ	60
7. KAYNAKÇA	62
8. ÖZET.....	69
9. SUMMARY	71
10. EKLER	73
11. ÖZGEÇMİŞ.....	75

KISALTMALAR

AGE	: İleri glikasyon son ürünü
ALT	: Alanin aminotransferaz
AST	: Aspartat aminotransferaz
CAT	: Katalaz
CHX	: Sikloheksimid
CYP 450	: Sitokrom P 450
DAG	: Diaçil gliserol
DM	: Diyabetes mellitus
EBOO	: Ekstrakorporeal kan oksijenizasyonu ve ozanlanması
ETZ	: Elektron transport zinciri
ENOS	: Endotelyal nitrik oksit sentaz
FFA	: Serbest yağ asidi
GGT	: Gama glutamil transpeptidaz
GLUT 2	: Glukoz transporter-2
GM-CSF	: Granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktör
GPx	: Glutasyon peroksidaz
GSH	: Glutasyon
GST	: Glutasyon S transferaz
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
HCC	: Hepatosellüler karsinom

HOCl-	: Hipokloröz asit
HIF	: Hipoksi ile indüklenen faktör
IFN	: İnterferon
IL	: İnterlökin
i.m.	: İntramusküler
i.p.	: İnterperitoneal
İ/R	: İskemi/Reperfüzyon
i.v.	: İntravenöz
MDA	: Malondialdehit
MODY	: Gençlerin erişkin başlangıçlı diyabeti
MPT	: Mitokondriyal permeabilite geçişi
NAD	: Nikotinamid
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NAFLD	: Nonalkolik yağlı karaciğer hastalığı
NO	: Nitrik oksit
NOS	: Nitrik oksit sentaz
NFkB	: Nükleer faktör kappa-β
Nrf2	: Nükleer faktör eritroid 2-ilişkili faktör 2
O₃	: Ozon
O₂^{•-}	: Süperoksit anyonu
•OH	: Hidroksil radikali
OHT	: Otohemoterapi

PDGF	: Trombosit kaynaklı büyüme faktörü
PKC	: Protein kinaz C
PUFA	: Çoklu doymamış yağ asidi
ROS	: Reaktif oksijen türleri
SD	: Spraque Dawley
SH	: Standart hata
SOD	: Süperoksit dismutaz
SS	: Standart sapma
STZ	: Streptozosin
TGF β	: Dönüştürücü büyüme faktörü- β
TNFα	: Tümör nekroz faktör- α
VEGF	: Vasküler endotelial büyüme faktörü
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü

TABLULAR DİZİNİ

Tablo 1. Ratların bazı yaşamsal parametreleri	4
Tablo 2. Ratlar için STZ dozları	7
Tablo 3. Deney grupları.....	37
Tablo 4. Rat karaciğer dokusu histopatolojik bulguları [Ort ± SH]	45
Tablo 5: Karaciğer dokusu oksidan durum bulguları [Ort ± SS]	50
Tablo 6: Rat AST, ALT ve Glukoz bulguları [Ort ± SS]	52

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Wistar albino rat	5
Şekil 2. Diyabet oluşturan bir alloksan (tetrafazik; I–IV) veya STZ dozuna karşı fazik kan glikoz yanıtı (trifazik; streptozotosin durumunda ilk faz gelişmez; II–IV)	8
Şekil 3. İskemide metabolik yol	14
Şekil 4. Reperfüzyonda ROS üretimi	15
Şekil 5. Ozon üretimi	18
Şekil 6. Major ozon OHT 1:Ozon enjektörü(polipropilen) 2:Bakteri filtresi (0,2 µm) 3:Vakum şişesi 4:Transfüzyon seti(polietilen)	21
Şekil 7. a: Reaksiyonlar sonucu oluşan ozon peroksitin farmakolojik etkileri	23
Şekil 8. Poliöl yolu	28
Şekil 9. AGE mekanizması	30
Şekil 10. ROS ve antioksidanlar	32
Şekil 11. ROS oluşumu	33
Şekil 12. Antioksidan sistem	33
Şekil 13. Glutatyon ilişkili antioksidan sistemi (GPX: Glutatyon peroksidaz, GR: Glutatyon redüktaz, GST: Glutatyon S transferaz)	34
Şekil 14. Lipit peroksidasyonu ve MDA oluşumu	35
Şekil 15. Lipit peroksidasyonu ve MDA oluşumu	36
Şekil 16. Aseptik şartların sağlanması ve sadece orta hat laparotomi ile sağlıklı organların görünümü	39
Şekil 17. Porta hepatis ve mikrovasküler klemp yerleştirilmesi	39
Şekil 18. İskeminin ilerleyişi.....	40
Şekil 19. Batında görülen kitle nedeniyle çalışmaya dahil edilmeyen rat	41
Şekil 20. Grup K; VC: Vena sentralis, HL: Hepatik lobül; *: sinüzoid; (*): sinüzoid dilatasyonu; k: Kupffer hücresi; PA: Portal aralık; →:hepatositler; ↓↓: Parankimde MN hücre infiltrasyonu	46

- Şekil 21.** Grup K; VC: Vena sentralis, HL: Hepatik lobül; *: sinüzoid; (*): sinüzoid dilatasyonu; k: Kupffer hücresi; PA: Portal aralık; →:hepatositler..... 46
- Şekil 22.** Grup DK; VC: Vena sentralis, HL: Hepatik lobül; *: sinüzoid; (*): sinüzoid dilatasyonu; k: Kupffer hücresi; →: hepatositler; ↓↓: Parankimde MN hücre infiltrasyonu; inf: İnflamasyon; conj: Kapiller konjesyon; er: eritrosit..... 47
- Şekil 23.** Grup DK; VC: Vena sentralis, HL: Hepatik lobül; *: sinüzoid; (*): sinüzoid dilatasyonu; k: Kupffer hücresi; →:hepatositler; er: eritrosit..... 47
- Şekil 24.** Grup DİR; VC: Vena sentralis, HL: Hepatik lobül; *: sinüzoid; (*): sinüzoid dilatasyonu; k: Kupffer hücresi; →: hepatositler; ↓↓: Parankimde MN hücre infiltrasyonu; conj: Kapiller konjesyon; er: eritrosit 48
- Şekil 25.** Grup DİR; VC: Vena sentralis, HL: Hepatik lobül; *: sinüzoid; (*): sinüzoid dilatasyonu; k: Kupffer hücresi; →: hepatositler; ↓↓: Parankimde MN hücre infiltrasyonu; inf: İnflamasyon; conj: Kapiller konjesyon; er: eritrosit..... 48
- Şekil 26.** Grup DİR-O VC: Vena sentralis, HL: Hepatik lobül; *: sinüzoid; (*): sinüzoid dilatasyonu; k: Kupffer hücresi; →: hepatositler; ↓↓: Parankimde MN hücre infiltrasyonu; conj: Kapiller konjesyon; er: eritrosit 49
- Şekil 27.** Grup DİR-O ; VC: Vena sentralis, HL: Hepatik lobül; *: sinüzoid; (*): sinüzoid dilatasyonu; k: Kupffer hücresi; →: hepatositler; ↓↓: Parankimde MN hücre infiltrasyonu; dej: hepatosit ve vena sentralis dejenerasyonu; conj: Kapiller konjesyon; er: eritrosit..... 49

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Diabetes mellitus (DM), hiperglisemi ve glukoz intoleransı ile karakterize bir metabolik bozukluktur. Bozulmuş insülin salgılanması ve periferik duyarlılık ile birlikte sonunda β hücresi disfonksiyonu ile ilişkili olduğu bilinmektedir. DM, dünyadaki en eski hastalıklardan biridir. Uluslararası Diyabet Federasyonu'nun 2017 raporunda, 2017 yılında dünya çapında 451 milyon yetişkinin diyabet hastası olduğu ve 2045 yılına kadar 693 milyon kişinin DM'den muzdarip olmasının beklendiği öne sürülmüştür. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ayrıca, dünyadaki yetişkin nüfusun %19'undan fazlasının 2030 yılına kadar DM'tan muzdarip olacağını tahmin etmektedir. [1]

Diabetes mellitus'ta, morbidite ve mortaliteye neden olan uzun vadeli komplikasyonlar, mikrovasküler ve makrovasküler hastalıklarla karakterizedir. [2]

Vasküler endotel, hiperglisemi kaynaklı metabolik değişiklikler için savunmasız bir hedef gibi görünmektedir. Poliol yolunun aktivasyonu, proteinlerin enzimatik olmayan glikozilasyonu ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) artışı diyabet komplikasyonlarında önemli bir rol oynar. [2]

Hiperglisemiye bağlı olarak serbest oksijen radikal üretiminin ve lipid, protein ve nükleik asitlerin oksidasyon veya peroksidasyonunun arttığı, antioksidan savunma sisteminin yetersiz olduğu bilinmektedir. Serbest radikal üretiminin artması ise diyabet komplikasyonlarının başlamasına ve ilerlemesine katkıda bulunmaktadır. [3]

İskemi reperfüzyon (İ/R) hasarı bir dokuya kan akımının kısıtlanması ile başlayan ve kan akımının yeniden sağlanması ile meydana gelen hücresel hasar, organ yetmezliği ve ölüme kadar gidebilecek olaylar bütündür. [4] Hasarın nedeni, bir dizi reaksiyon sonrasında ortaya çıkan oksidatif stres ve inflamatuvar yanıttır.

On dokuzuncu yüzyılın ortalarında keşfedilen bir gaz olan ozon, mezomerik durumların varlığı nedeniyle dinamik olarak kararsız bir yapıda olan üç oksijen atomundan oluşan bir moleküldür. [5]

Ozon tedavisi, antioksidan etkiler, immünomodülatör kapasite ve lokal mikro dolaşımın modülasyonu dahil olmak üzere karmaşık mekanizmalar yoluyla etki eden gelişmekte olan bir tedavi stratejisidir. [6] Antioksidan stresi tetikler ve oksidatif strese karşı direnci destekler ve inflamasyonda antioksidan ajan olarak kullanılmıştır. [7] Ayrıca hipoksiye bağlı faktörlerin (HIF'ler) gen ekspresyonunu etkileyebilir ve hipoksik doku koşullarını iyileştirmek için vasküler endotelial büyüme faktörünü (VEGF) ve trombosit kaynaklı büyüme faktörünü (PDGF) aktive edebilir. [6]

Literatürde DM ve İ/R hasarının patofizyolojisi ve tedavi modaliteleri ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır. Çalışmamızda oksidatif stres ve inflamatuvar süreçler ile karakterize hastalıklarda yaygın şekilde kullanılmış olan ozonun karaciğer İ/R hasarındaki koruyucu etkisini diyabet oluşturulan ratlar üzerinden incelemek amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Hayvan DeneYlerinde Ratların Kullanımı

Laboratuvar hayvanları biyomedikal araştırmalarda ve klinik öncesi toksisite çalışmalarında her zaman önemli araştırma araçları olarak kullanılmıştır. Yeni ilaçların, aşıların, cerrahi malzemelerin, tanı kitlerinin geliştirilmesi, farklı maddelerin güvenlik ve toksisite testleri vb. ile ilgili deneyler yalnızca hayvan modelleri ile mümkündür. [8]

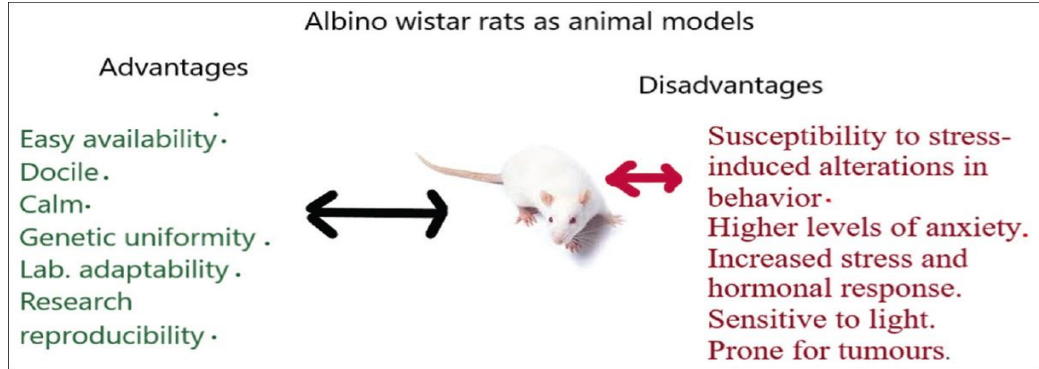
Fareler, ratlar, tavşanlar ve kobaylar biyomedikal araştırmalarda yaygın olarak kullanılan laboratuvar hayvanlarıdır, fareler ve ratlar tüm laboratuvar hayvanlarının yaklaşık %95'ini oluşturur. Ratlar arasında, Wistar ratları klinik öncesi toksikoloji araştırmalarında en yaygın kullanılan hayvandır. [8]

Wistar ratları, kısa üreme döngüsü ve yaşam süresi; anatomileri, biyolojileri ve fizyolojileri hakkında bilginin bulunması; yumuşak huylu, uysal ve küçük boyutlu olmaları nedeniyle Sprague Dawley (SD) ratlarına göre barınma ve bakımı kolaylaştırması gibi çeşitli nedenlerle yaygın olarak seçilen hayvan modelidir. Memelilerdir ve organ sistemleri şekil, yapı ve fizyoloji açısından insanlara çok benzer. [8] Wistar rat melez bir albino rattır. Bu cins, 1906 yılında Wistar Enstitüsü'nde biyolojik ve tıbbi araştırmalarda kullanılmak üzere üretildi ve bilim insanlarının çoğunlukla ev faresini kullandığı bir dönemde model organizma olarak geliştirilen ilk rat olarak biliniyor. [9]

Albino olup cilt, saç ve gözlerinde pigmentasyon eksikliği vardır. Gözlerinde melanin katmanları yoktur, bu yüzden aslında şeffaftırlar ve bu da görmelerine zorluk çıkarır. Dahası, ciltleri oldukça hassastır ve güneşe karşı alerji geliştirebilirler, bu da ultraviyole radyasyona karşı korunmayı gerektirir. Bu anatomik özellikler, Albino Wistar sıçanlarını deneylerde sıklıkla kullanılan diğer tüm onaylanmış türlerden ayırır.

Tablo 1. Ratların bazı yaşamsal parametreleri [10]

Parametreler	Değerler	Ünite
Yaşam süresi	2,5-3,5	yıl
Erkek vücut ağırlığı	450-520	gr
Dişi vücut ağırlığı	250-300	gr
Solunum sayısı	85	dak
Kalp atımı	300-500	atım/dak
Vücut ısısı(rektal)	35,9-37,5	°C
Vücut yüzey alanı	10,5	cm ²
Yem tüketimi	5-6	Gr/100 gr ca/gün
Su tüketimi	10-12	Gr/100 gr ca/gün
Total vücut sıvısı	167	ml
İntraselüler sıvı	92,8	ml
Ekstraselüler sıvı	74,2	ml
Plazma volümü	7,8	ml



Şekil 1. Wistar albino rat [9]

2.2. Ratlarda Diyabet Modelleri

1. Kimyasal ajanlar kullanılarak oluşturulan diyabet modelleri

Alloksan

Streptozosin

2. Spontan (genetik) tip 1 DM modelleri

3. Spontan (genetik) tip 2 DM modelleri

4. Gen hedefleme ve transgenik diyabet modelleri

5. Virüslerle oluşturulan modeller

6. Pankreotomi

Deneysel diyabet modeli oluşturulacağı zaman çalışılması planlanan DM tipine bağlı olarak hayvan modeli dikkatle seçilmelidir. İyi bir diyabet modeli; diyabetin tüm ana patogenezine sahip olmalı, antidiyabetik ilaçlara duyarlı olmalı ve hastalığın patogenezini incelemek için uygun olmalıdır. [10]

2.2.1. Streptozosin

Streptozosin (STZ) (2-deoksi-2-(3-metil-3-nitrozoüre)-1-D-glukopiranoz), toprak bakterisi *streptomyces achromogenes* tarafından üretilen , geniş spektrumlu antibakteriyel özellikler gösteren doğal olarak oluşan bir bileşiktir. Soluk sarı veya kirli beyaz kristal toz olarak görünen α - ve β -stereoizomerlerin bir karışımıdır. STZ'nin moleküler formülü $C_8H_{15}N_3O_7$ 'dir. Moleküler ağırlığı 265 g/mol'dür ve yapısı, bir ucunda metil grubu ve diğer ucunda glikoz molekülü bulunan nitrozoüre kısmından oluşur. Sitotoksik bir glikoz analogudur. Keşfedilmesinden sonra, metastaz yapan pankreas adacık hücresi tümörlerinin ve diğer malignitelerin tedavisinde kemoterapötik alkilleyici bir ajan olarak kullanılmıştır.

1963 yılında Rakieta ve meslektaşları STZ' nin diyabetojenik olduğunu bildirdiler. O keşif zamanından bugüne kadar STZ, deney hayvanlarında diyabetin indüklenmesinde kullanılan kimyasal ajanlardan biri olmuştur. [11]

2.2.2. Etki Mekanizması

STZ pankreatik beta hücrelerinde glukoz transporter-2 (GLUT2) aracılığı ile seçici olarak birikir ve insülin sekresyonunu inhibe ederek insüline bağımlı DM oluşumuna neden olur. STZ'nin diyabet oluşturmasının altında yatan temel mekanizma DNA'da hasara ve yıkıma neden olmasıdır. Hücre içine giren STZ, DNA alkilleyici etkisine bağlı olarak DNA'nın parçalanmasıyla sonuçlanan hasara ve sonucunda beta hücrelerinde nekroza yol açar. [10]

STZ'nin hücre ölümüne yol açan diyabetojenik etkisinin bir diğer olası mekanizması, pankreas hücrelerinde DNA alkilasyonuna ve hasarına yol açan nitrik oksit donörü olarak hareket etme yeteneğine atfedilmiştir. [11]

ROS'un STZ metabolizması sırasındaki önemli rollerinden biri, hipoksantinden ksantin oksidaz tarafından ATP parçalanmasının son ürünü olarak ürik asit üretimidir. Hipoksantin metabolizması sırasında H₂O₂ dismutasyonundan kaynaklanan süperoksit ve hidroksil radikalleri gibi reaktif oksijen türlerinin oluşumu beta hücresi yıkım sürecini hızlandırır. [11]

2.2.3. Uygulama Şekli

STZ, -20 °C de ışıktan korunarak saklanmalıdır. [10]

Deney hayvanlarına enjeksiyon ve en iyi sonuçları elde etmek için, aç karnına ve taze olarak hazırlanıp sitrat tamponunda (pH 4,4-4,5) eritilerek uygulanması en iyisidir. [11]

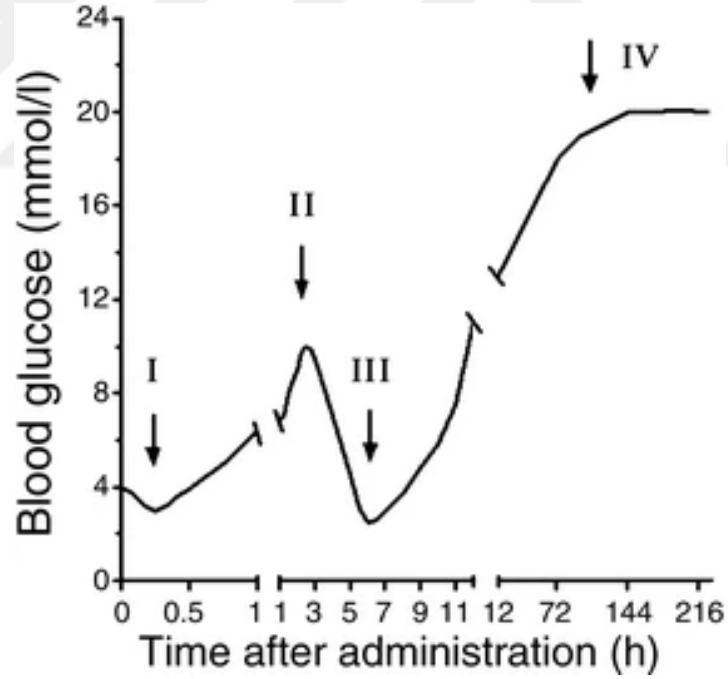
Tablo 2. Ratlar için STZ dozları [10]

DM tipi	Uygulama Şekli/Dozu
Tip 1 DM	İntraperitoneal (i.p.) 35-80 mg/kg tek doz
Tip 1 DM	İntramusküler (i.m.) 40 mg/kg tek doz
Tip 2 DM	65 mg/kg intravenöz (i.v.) + 110-230 mg/kg i.p. nikotinamid (NAD)
Tip 2 DM	35 mg/kg tek doz i.p + 2 hafta süreli yüksek yağlı diyet
Tip 2 DM	30 mg/kg iki doz i.p. + 4 hafta süreli yüksek yağlı diyet
Tip 2 DM	60 mg/kg i.v. + 2 hafta süreli yüksek yağlı diyet

NAD: Nikotinamid-STZ uygulanarak oluşturulan modelin amacı STZ'nin aşırı beta hücre harabiyetini azaltarak Tip 2 DM modeli oluşturmaktır.

2.2.4. Kimyasal Ajanlarla Oluşturulan Diyabet Modellerinde Kan Glikozunun Yanıtları [12]

Alloksan enjeksiyonundan birkaç dakika sonra 30 dakikaya kadar süren ilk geçici hipoglisemi fazı başlar. Altta yatan mekanizma, glukokinaz inhibisyonu yoluyla glikoz fosforilasyonunun blokajı nedeniyle geçici olarak azaltılmış bir tüketim ve artan ATP mevcudiyetidir. STZ glukokinazı inhibe etmediğinden, bu ilk geçici hipoglisemi fazı STZ enjeksiyonuna yanıt olarak gözlenmez. Bu faz sırasında morfolojik değişiklikler minimaldir.



Şekil 2. Diyabet oluşturan bir alloksan (tetrafazik; I–IV) veya STZ dozuna karşı fazik kan glikoz yanıtı (trifazik; streptozotosin durumunda ilk faz gelişmez; II–IV) [12]

İkinci faz, toksinlerin uygulanmasından 1 saat sonra kan glikoz konsantrasyonunda bir artış ve plazma insülininde bir azalma ile başlar. Genellikle 2-4 saat süren bu ilk hiperglisemi fazı, hipoinsülinemiye yol açan insülin salgılanmasının inhibisyonundan kaynaklanır.

Üçüncü faz, yine bir hipoglisemik fazdır ve tipik olarak toksinlerin enjeksiyonundan 4-8 saat sonra meydana gelir ve birkaç saat sürer. O kadar şiddetli olabilir ki konvülsiyonlara neden olabilir ve ölümcül olabilir. Bu şiddetli hipoglisemi, toksin kaynaklı salgı granülü ve hücre zarı yırtılması sonucu dolaşımın insülinle dolmasıyla oluşur.

Dördüncü faz kalıcı diyabetik hiperglisemik fazdır. Morfolojik olarak, tam degranülasyon ve beta hücre bütünlüğünün kaybı 12-48 saat içinde görülür. Beta olmayan hücreler sağlam kalır ve bu da toksik etkinin beta hücre seçici karakterini gösterir.

2.3. Ratlarda İskemi Reperfüzyon Modeli

İnsan çalışmalarının hızı yavaş olduğundan, insan dokularına araştırma amacıyla erişim ve girişimsel müdahaleler sınırlı olduğundan deneysel modeller bize geniş bir araştırma alanı sağlar. Bu nedenle İ/R hasarına karşı tedavi arayış yollarından biri de karmaşık biyolojik süreçlerin incelenebileceği bozulmamış canlı sistemlerin kullanılmasıdır. [4]

İ/R deneylerinde en çok ratlar ve fareler tercih edilir; [4]

-Etik açıdan uygun olması

- Anatomik, fizyolojik ve genetik olarak insanlara benzerliği
- Üreme döngüleri ve yaşam sürelerinin kısa olması
- Küçük olmaları sebebiyle deney manipölasyon kolaylığı
- Maliyetlerinin ucuz olması tercih edilme sebeplerindedir.

Ratlar farelere göre büyük boyutları nedeniyle İ/R deneylerinde özellikle cerrahi prosedürleri ve diğer test türlerini kolaylaştırdıkları için tercih edilir. Wistar albino ve Sprague Dawley ratları bilimsel araştırmalarda en çok tercih edilen cinslerdir. [4]

İ/R hasarının etkileyen faktörlerden biri de cinsiyet hormonlarıdır. Renal İ/R'de Muller ve arkadaşları, kastrasyon ve cinsel olgunlaşmamışlığın dişilerde oluşan İ/R hasarını etkilemediğini ancak erkeklerde oluşan hasarı azalttığını bildirmişlerdir. Bu da testosteronun bu cinsiyet farklılıklarında östrojenden daha büyük bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir. [13, 14]

2.3.1. Karaciğer İskemi Reperfüzyon Modeli

Karaciğer iskemisi ve reperfüzyonu; hemorajik şok, resüsitasyon, travma, karaciğer rezeksiyonları ve karaciğer nakli dahil olmak üzere birçok klinik senaryoda rol oynadığından son yıllarda yoğun bir şekilde araştırılan bir konu olmuştur. [15]

Karaciğer İ/R deneysel modellerinden elde edilen veriler ve İ/R mekanizmalarının tam olarak değerlendirilmesi klinik ortamda karaciğer cerrahisinde yeni koruyucu stretejilerin gelişmesini sağlayacaktır. [4]

Karaciğer İ/R hasarının induksiyonu, standartlaştırılmış deneysel koşullar altında gerçekleştirilmelidir. Yeterli alışma süresi, 12 saat aydınlık/12 saat karanlıkta uygun iklim koşullarında bakım, diyet, anestezi ve analjezik yöntemler standardize edilmelidir. [4]

2.3.1.1. Sıcak (Normotermik) İskemi Modelleri [4]

Portokaval Dekompresyonlu Global Hepatik İskemi

Pringle manevrası ilk olarak 1906 yılında Dr. James Hogarth Pringle tarafından tanımlanmış ve hepatoduodenal ligamenti klemleyerek hepatik girişi kontrol etmek için kullanılmıştır. Ana amaç majör hepatektomiler sırasında kanama miktarını azaltmaktır. Çalışmalar, ameliyat sırasında karaciğer ve büyük damarlardan kanamayı azaltmak ve postoperatif dönemde olumsuz sonuçları ve komplikasyonları önlemek için majör hepatik cerrahi sırasında 60 dakikaya kadar güvenli bir şekilde gerçekleştirilebileceğini göstermiştir. [16]

Bu yöntemle portal konjesyona bağlı intestinal sistemden endotoksinlerin dolaşıma salınması ile İ/R hasarı şiddetlenebilir. Portal konjesyonu önleme amacıyla kısmi karaciğer iskemisi ya da portokaval şant oluşturan global karaciğer iskemisi modelleri de kullanılabilir. [4]

Dalak Transpozisyonu ile Global Karaciğer İskemisi

Bu modelde sol hipokondriyal bir kesile dalağın deri altı keseye transpozisyonu sağlanır ve 2-3 hafta sonra portosistemik anastomozlar oluşur. İkinci adımda median laparotomi ile hepatoduodenal ligaman klemplenir. [4]

Kısmi Karaciğer İskemisi

Bu teknikte iskemi, sol ve median lobların hepatik arter, portal ven ve safra kanalının klemplenmesi ile oluşturulur ve %70 oranında kısmi iskemi elde edilir.

Karaciğer hasarı zamanla ilgilidir ve İ/R hasarının yüzdesine bağlıdır. Birçok zamanla ilgili deneysel model tanımlanmıştır ve 30, 45, 60, 90 dakikalık iskemi en sık kullanılan iskemi periyotlarıdır. [17]

2.3.1.2. Karaciğer Transplantasyon (Soğuk İskemi) Modeli

Bu model kliniğe uyumlu ve karaciğer nakli sorunlarını ortaya çıkarmak için avantajlı olmasına rağmen mikrocerrahi ve bunun için teknik deneyim gerektirdiğinden pratikte uygulanması zordur. [4]

2.4. İskemi Reperfüzyon Hasarı

İskemi, bir dokunun ihtiyacı olandan daha az kan ile beslenmesi durumudur. Reperfüzyon ise bu dokuya kan akımının yeniden sağlanmasıdır. [4]

İ/R hasarı terimi, yetersiz oksijen sunumu ile oluşan doku iskemisinden sonra kan akımının yeniden sağlanmasının, lokal hasarı ağırlaştırır ve uzak organ fonksiyonlarında bozulmaya neden olan karmaşık bir dizi inflamatuvar yanıt başlattığını gösteren deneysel ve klinik bulguları tanımlar. [18]

İ/R hasarının görüldüğü klinik durumlar şunlardır: [18]

-Trombolitik tedavi, anjiyoplasti, operatif revaskülarizasyon

-Stroke, miyokard enfarktüsü, ekstremitte iskemisi

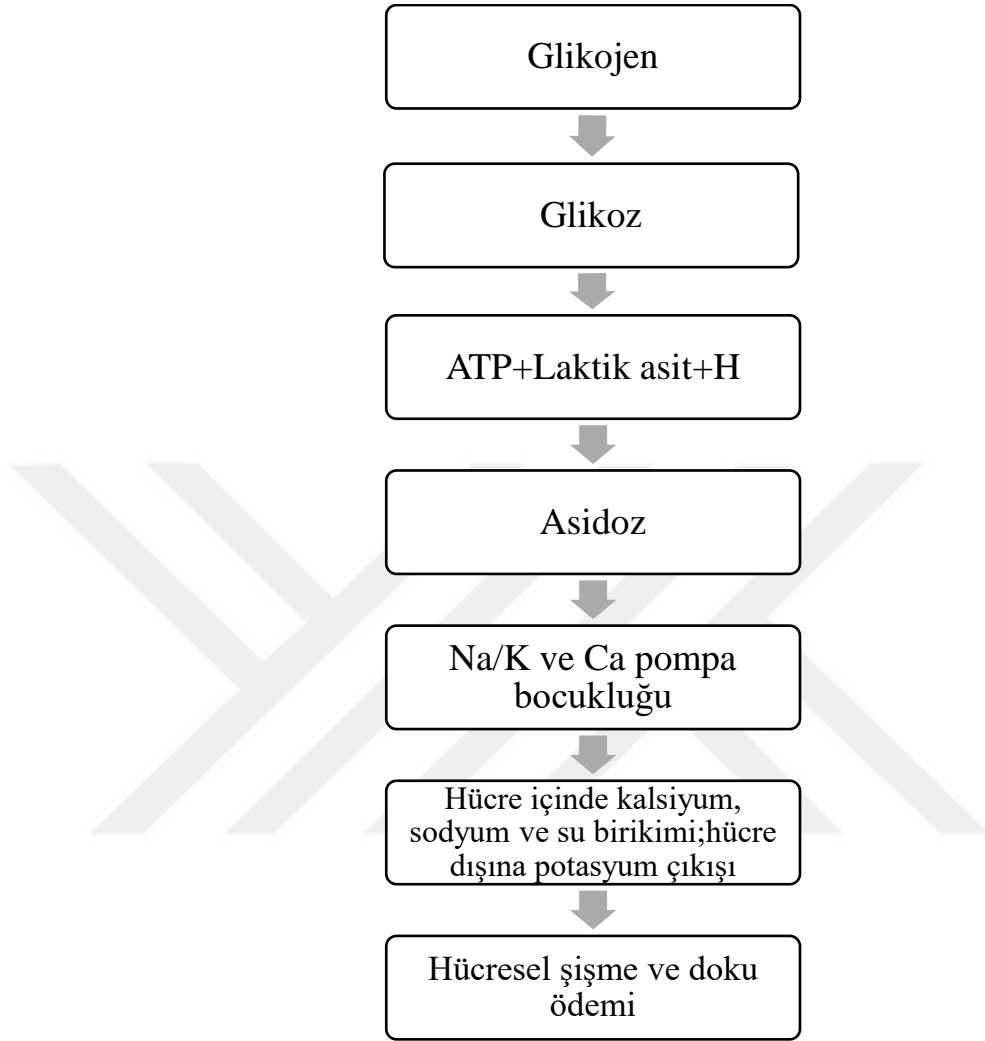
-Organ nakli, serbest doku transferi, kardiyopulmoner baypas, vasküler cerrahi

-Majör travma ve şok

2.4.1. Mekanizma

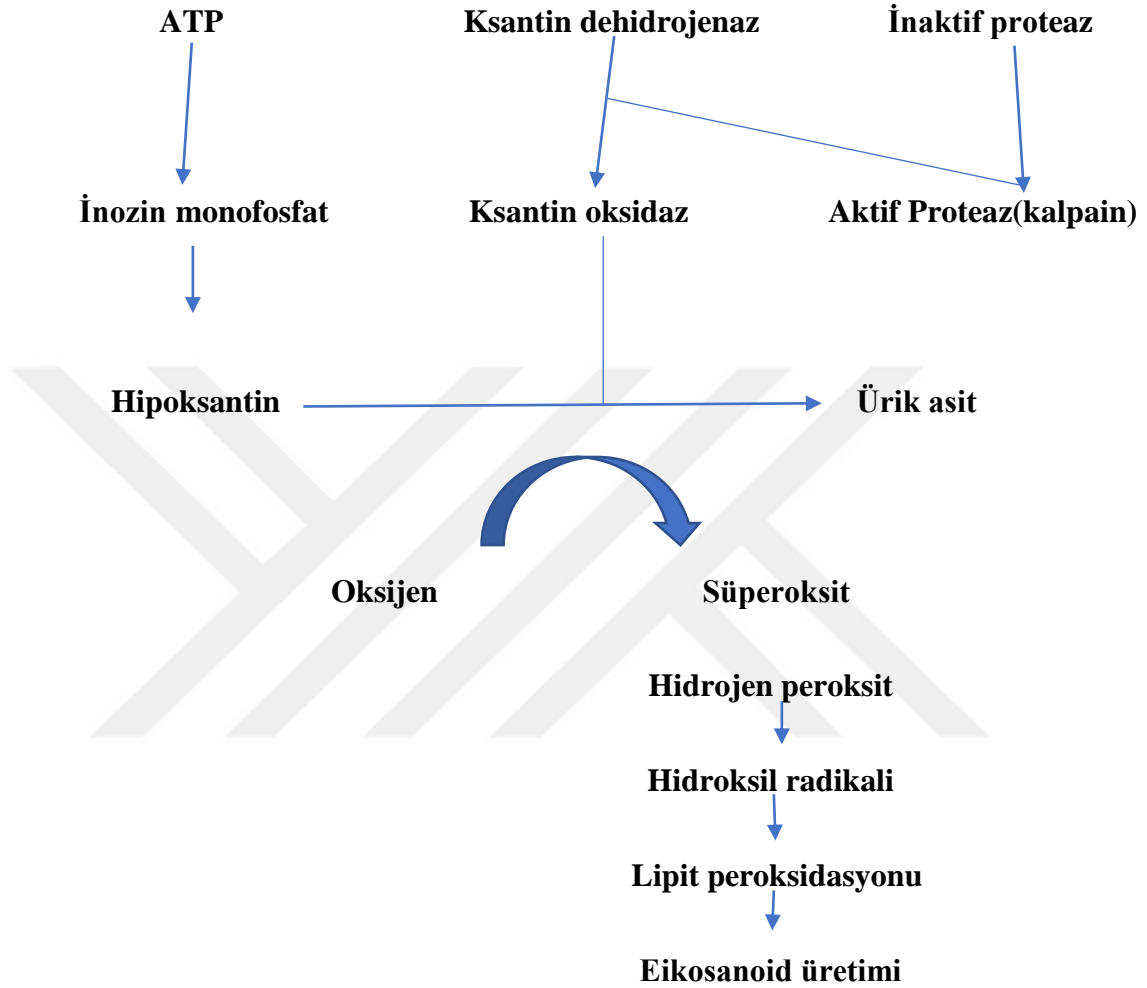
İskemik dokuya yeniden kan akışının sağlanması gereklidir fakat reperfüzyonun kendisi paradoksal olarak hücre hasarını ve ölümünü artırarak sadece iskemik dokuda değil uzak organlarda da hasara neden olarak çoklu organ yetmezliğine olabilir. [19]

Dokuda oksijen yetersizliğinde, hücreler anaerobik glikolize geçer. Anaerobik metabolizma sonucu daha az ATP üretiminin yanında hücrede laktik asit ve hidrojen iyonu birikir ve bu durum hücresel asidoza neden olur. Hücre asit baz dengesinin bozulması ve ATP üretiminin eksikliği, Na^+/K^+ ve Ca^{2+} gibi iyonik pompaların bozulmasına yol açar. Sonuçta, sitozolik sodyum içeriği artar, ozmotik dengeyi korumak için hücre içine su çeker. (Şekil 3) [19]



Şekil 3. İskemide metabolik yol [19]

Sitozoldeki kalsiyum iyonu artışı sitozolik proteazları aktive ederek ksantin dehidrojenazın ksantin oksidaza dönüşmesine neden olur. Anaerobik glikoliz sonucu oluşan ATP ise hipoksantine katabolize olur. İskeminin süresi ve şiddetine bağlı olarak hipoksantin dokuda birikir. Reperfüzyonla beraber dokuya sağlanan oksijen hipoksantin oksidasyonuna ve ürik asit oluşmasına neden olur. Moleküler oksijenin indirgenmesi ile ROS oluşur. (Şekil 4)[19]



Şekil 4. Reperfüzyonda ROS üretimi [19]

İlk oluşan süperoksit anyonu hidrojen iyonu ile tepkimeye girerek hidrojen peroksiti ve hidroksil radikalini oluşturur. Hücre membranlarının lipit yapılarının peroksit ile eikosanoidler dolaşıma geçer ve hücre permeabilitesi bozulur, hücre ölümü gerçekleşir. Süperoksit oluşturan yollar; mitokondriyal

elektron transport zinciri (ETZ), ksantin oksidaz, NADPH oksidaz, sitokrom P450 oksidaz ve nitrik oksit sentaz (NOS) enzimleridir. [4]

2.4.2. Karaciğer İ/R

Karaciğerde İ/R hasarı Toledo-Pereyra ve arkadaşları tarafından 1975 yılında deneysel karaciğer nakli çalışmaları sırasında önemli bir patolojik bozukluk olarak kabul edilmiştir. Nakledilen karaciğerin ilerleyici tromboz ve organ yetmezliğine yol açan greft nekrozu geliştirdiği gözlemlenmiştir. Reperfüzyon hasarı terimi ise karaciğer nakli literatüründe genel olarak 1980'lerin ortalarına kadar kullanılmamıştır. [20]

Karaciğer İ/R hasarı; hepatik cerrahi, karaciğer nakli, hipovolemik şok, toksik karaciğer hasarı, veno-oklüzif hastalık ve Budd-Chiari sendromu gibi klinik durumlarda görülen sıcak İ/R hasarı ve nakilden önce organ koruma sırasında meydana gelen soğuk İ/R hasarı olarak gruplandırılabilir. [20]

Sıcak İ/R' da başlangıç aşamasında (reperfüzyondan 2 saat sonra) oksidatif stres oluşturan ROS üretimi ve salınımı doğrudan hepatosellüler hasara yol açar. Erken fazda bir diğer mekanizma ise hepatositler ve miyositlerde anoksi, reperfüzyon ve oksidatif stresle ilişkili ölümcül hücre hasarında anahtar bir süreç olan mitokondriyal permeabilite geçişidir (MPT). [20]

Daha sonra CYP 450 oksidaz ve NADPH oksidaz aracılı süperoksit üretilir. Ek olarak, aktive edilmiş Kupffer hücrelerinin ve nötrofillerin ürünleri olarak prooksidan etki gösteren tümör nekroz faktörü (TNF), interlökin (IL)-1,

nitrik oksit (NO), HOCl- ve lökotrienler de oksidatif stresin oluşumunda rol oynar. [20]

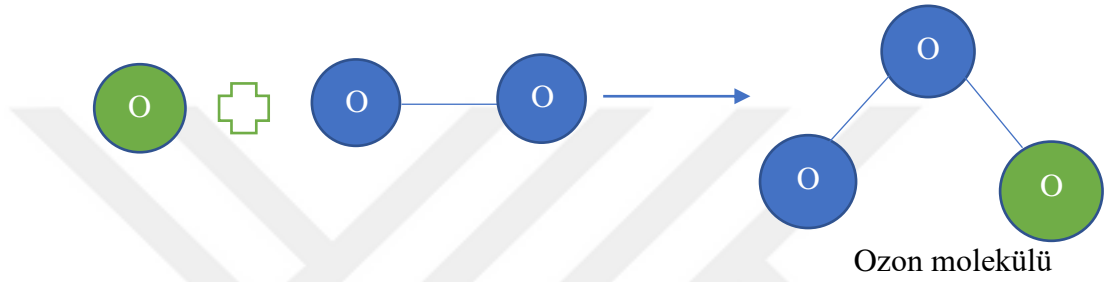
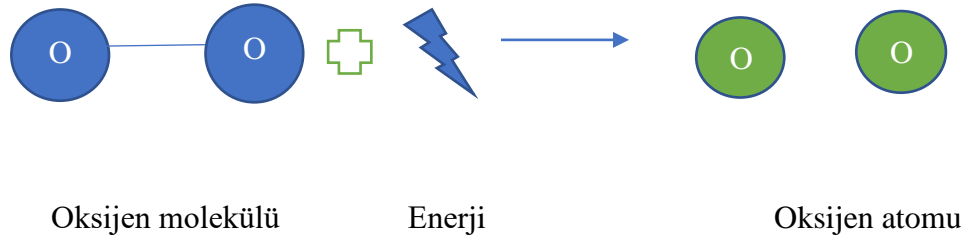
2.5. Ozon

Ozon (O₃), ilk kez 1839 yılında Christian Friedrich Schönbein tarafından izole edilen, üç adet oksijen atomundan oluşan, allotropik özelliklere sahip inorganik bir moleküldür. [21]

Schönbein, suya elektriksel deşarj uyguladığında tuhaf bir koku ortaya çıkıyordu ve buna Yunanca ozein (odor) kelimesinden türetilen ozon adını verdi. [22]

Dinamik olarak kararsız yapıda ve renksizdir. Keskin bir kokusu vardır. Sıvı ve katı halde patlayıcıdır. Yarı ömrü 20°C de 40 dk, 0°C'de 140 dk'dır. [5] Moleküler ağırlığı 48'dir. Suda çözünürlüğü oksijenden 10 kat daha fazladır. (49mL in 100mL, 0.02M, at 0°C) [23]

Ozon stratosferdeki en önemli gazlardan biridir ve dünyadaki canlı organizmaları 260-280 nm dalga boyundaki ultraviyole radyasyondan korur. Yeryüzünden 20-30 km yükseklikte bulunur. [24]



Şekil 5. Ozon üretimi [22]

Ozon doğada;

Gök gürültülü fırtınalardan sonra oluşan elektriksel deşarjların oksijen molekülünü oksijen atomlarına parçalaması ve daha sonra oksijen atomunun bir oksijen molekülü ile birleşmesi sonucu oluşur. (Şekil 5) [22]

Güneşten yayılan ultraviyole ışınların stratosferde bulunan oksijen üzerinde elektriksel deşarj sağlaması da bir başka ozon oluşum yoludur. [22]

2.5.1. Tıbbi Alanda Kullanım

1896'da Nikola Tesla'nın ozon jeneratörünün patentini almasıyla tıbbi alanda kullanılmaya başlanmıştır. [25]

1916'da 1. Dünya Savaşı sırasında, Londra'daki Queen Alexandra Askeri Hastanesi'nde yara iyileşmesinde antimikrobiyal özellikleri nedeniyle kullanılmış ve 100 yıldan fazladır tıbbi alanda kullanımı mevcuttur. [21]

Saf oksijen molekülünün tıbbi bir jeneratör tarafından 5-13 mV akımdan geçirilmesiyle en az %95 O₂ ve en fazla %5 O₃'ten oluşan bir karışım üretilmektedir. Oluşan ozon molekülünün yüksek kararsızlığı (20 °C'de 40 dakikalık yarı ömür) nedeniyle depolanamamaktadır. [21]

Endüstriyel ozon havadan üretilebilir fakat tıbbi ozon yalnızca tıbbi oksijen kullanılarak olarak üretilmelidir. Aksi durumda oluşan nitrik dioksit (NO₂) çok toksik olacaktır. [23]

2.5.2.Uygulama Yolları

Ozon Otohemoterapi

Major otohemoterapi (OHT) ve minör OHT olarak 2 uygulama yolu vardır. Major OHT'de 200-250 ml, minör OHT'de 5-10 ml kan kullanılır. Alınan kan, heparin veya sodyum sitrat içeren bir cam kaptan toplanır, 5-10 dakika boyunca 15-80 µg/mL konsantrasyonlarında oksijen/ozon karışımıyla temas ettirilir ve ardından hastaya geri verilir. Major OHT'de karışık kan i.v., minör OHT'de ise i.m. olarak verilir. Kullanım alanları şunlardır: [5]

-Periferik vaskülopatiler

-Kronik iskemik kardiyopati, akut serebral iskemi

-Herpes 1,2, herpes zoster, hepatitler

-Bakteriyel ve fungal enfeksiyonlar

-Dejeneratif göz hastalıkları

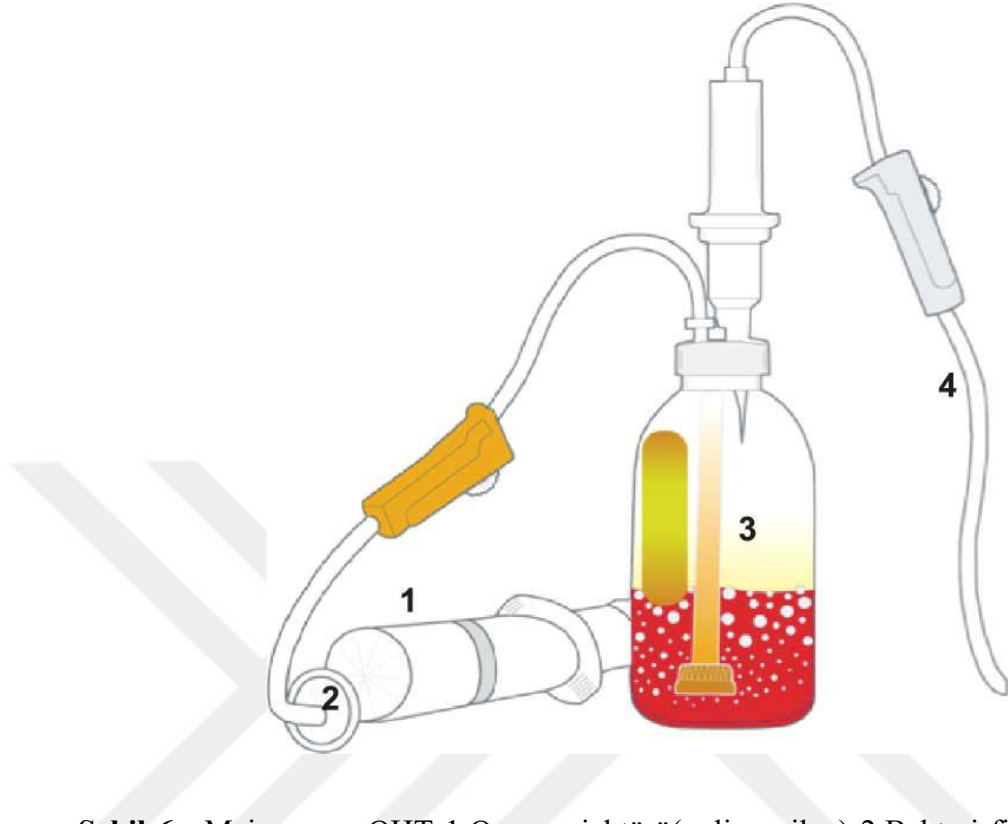
-Ortopedik patolojiler, osteoartrit

-Ağrı sendromları

-Diyabetik vaskülopati ve retinopatiler

-Otoimmün hastalıkları, akciğer hastalıkları, cilt hastalıkları, metastatik kanserler, sepsis ve çoklu organ yetmezliklerinde kullanımı da mevcuttur. [26]

OHT; IFN alfa, beta ve gama, TNF alfa, GM-CSF ve TGF beta üretimiyle ilişkilidir. Eritrositlerde süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesinde artış gözlemlenmiştir ve bu da antioksidan savunmalarda bir artış olduğunu göstermektedir. Bu değişiklikler ozon OHT'den saatler ve günler sonra gözlemlenebilir ve bu da lökositler ozon tarafından aktive edildiğinde, sitokin salınımının diğer bağışıklık hücrelerini tetikleyerek lenfoid ortamlara göç ettiklerini göstermektedir. [5]



Şekil 6. Major ozon OHT 1:Ozon enjektörü(polipropilen) 2:Bakteri filtresi (0,2 µm) 3:Vakum şişesi 4:Transfüzyon seti(polietilen) [27]

Düşük doz ozon tedavi modaliteleriyle yapılan çalışmalara göre ozon dozajı, 50-100 ml arasındaki kan miktarı kullanılarak, tedavi başına 500 µg ile maksimum 4000 µg ozon aralığını kapsar. Özellikle yaşlı veya dekompanse hastalarda hemodinamik açıdan risk oluşturabilecek yüksek volümde kan kullanılmamalıdır. Tam kanda 80 µg ve üzeri konsantrasyonlar hemoliz riskini artırması, 2,3-DPG ve antioksidanların azalması nedeniyle kullanılmamalıdır. [27, 28]

Majör OHT'de ml kan başına 10-40 µg ozon konsantrasyonlarının hücre metabolizmayı aktive ettiği, immünomodülatör etkisi ve hücre içi antioksidanlar üzerinde düzenleyici olduğu kanıtlanmıştır. [27]

Ekstrakorporeal kan oksijenizasyonu ve ozanlanması (EBOO)

EBOO, kanın ozonla temasına dayanır. Kan pompaları, heparinizasyon, kontrol sistemleri, hastaları bağlama ve ayırma yöntemleri hemodiyalizle benzerdir. Devrede kan pompası 75-80 ml/dk'lık sabit bir akım sağlar. Ozon, hastane dağıtım sisteminden elde edilen oksijenden bir jeneratör tarafından üretilir. Jeneratör, 0,2 bar basınçta 1-20 µg/mL oksijen konsantrasyonlarında ozon sağlayabilir. Pıhtılaşma, tedavinin başlangıcında 5000 IU heparin enjekte edilerek engellenir. [5]

Diğer yollar; [29]

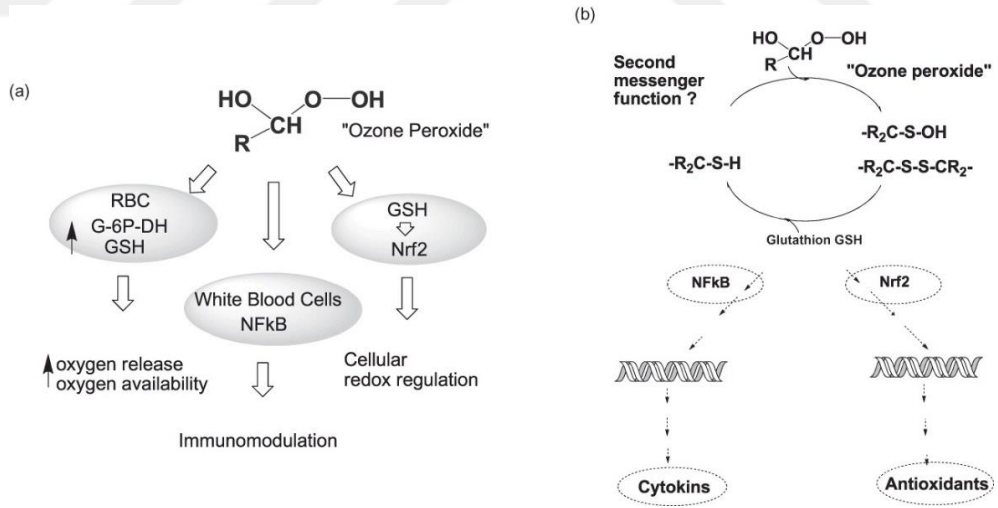
- Rektal insuflasyon,
- Yarı-toplam vücut maruziyeti,
- Ozonlanmış yağ ve su,
- İntraartiküler enjeksiyon,
- Akupunktur,
- Subkonjonktival enjeksiyon,
- Mesane insuflasyonu,
- Gingival enjeksiyon,
- Vertebral disk içi enjeksiyon,
- Aurikuler

2.5.3. Kontrendikasyonlar [22]

- Gebelik

- Glikoz-6-fosfat dehidrojenaz eksikliği
- Hipertiroidi
- Şiddetli anemi
- Şiddetli miyasteni
- Aktif hemoraji
- Alkol zehirlenmesi
- Yakın zamanda geçirilmiş myokard infarktüsü

2.5.4. Etki Mekanizması



Şekil 7. a: Reaksiyonlar sonucu oluşan ozon peroksitin farmakolojik etkileri [27]

1: RBC tarafından oksijen salınımı artar. 2: WBC aktivasyonu ve immunmodülasyon 3: Antioksidan mekanizmanın düzenlenmesi

b: Sinyal iletim yolağının düzenlenmesi; sitokin ve antioksidanların aktivasyonu

Major OHT ve rektal insuflasyon gibi sistemik olarak uygulanan ozon, doymamış yağ asitleri ile etkileşimi sonucu oluşan ozon peroksit üzerinden etki eder. Ozon peroksit, glutatyonun oksidasyonu yoluyla sinyal iletimini başlatır ve transkripsiyon faktörleri NFkB ve Nrf2 üzerinden immunmodülasyonu sağlar. RBC'ler üzerinden ise oksijen salınımını iyileştirir. (Şekil 7) [28]

NFkB transkripsiyon faktörü üzerinde IL 1, IL 6, TNF- α gibi sitokinlerin salınmasını; Nrf2 transkripsiyon faktörü üzerinden ise SOD, glutatyon (GSH) ve katalaz (CAT) gibi antioksidan sistemleri düzenler. Nitrik oksit (NO) ve malondialdehit (MDA) gibi oksidatif stres oluşturan maddelerin ise downregülasyonunu sağlar. [30]

2.6. Diyabetes Mellitus

Diyabetes mellitus insülinin relatif veya mutlak yokluğu ya da insülin cevapsızlığının neden olduğu hiperglisemi ve glukozüri ile seyreden bir hastalıktır. Açlık plazma glukozunun 126 mg/dl veya HgbA1c'nin %6.5'in üzerinde olması ile tanı konur.

Dünya çapında en yaygın ve hızlı büyüyen hastalıklardan biridir ve 2045 yılına kadar 693 milyon yetişkini etkilemesi beklenmektedir; bu, 2017'ye göre %50'den fazla artış demektir. Kardiyovasküler hastalıklar gibi makrovasküler ve nefropati, retinopati, nöropati gibi mikrovasküler komplikasyonlar diyabetin önemli morbidite ve mortalite nedenleridir. [31]

Uluslararası Diyabet Federasyonu verilerine göre 2019 yılında küresel diyabet yaygınlığının %9,3 (463 milyon kişi) olduğu, 2030 yılında %10,2'ye (578

milyon) ve 2045 yılında %10,9'a (700 milyon) yükseleceği tahmin edilmektedir. Yaygınlık kentsel alanlarda (%10,8) kırsal alanlardan (%7,2) ve yüksek gelirli ülkelerde (%10,4) düşük gelirli ülkelere (%4,0) daha yüksektir. [32]

Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre ise, diyabetin 2030 yılına kadar 7. birincil ölüm nedeni olacağı öngörülmektedir.[33]

DM' un 4 temel tipi vardır:[33]

Tip 1 DM, pankreas beta hücrelerinin otoimmün olarak yıkılması sonucu insülinin üretiminin bozulması ile karakterizedir. Çocukluk çağında görülür ve toplam DM hastalarının %5-10'unu oluşturur.

Tip 2 DM, insülinin yetersiz üretilmesi ya da insülinin hücrede kullanılmasını sağlayan insülin reseptörlerinin desensitizasyonu ile karakterizedir. DM hastalarının %90-95'ini oluşturur.

Gestasyonel DM, gebelik sırasında ortaya çıkar.

Monogenik diyabet, tek bir gendeki veya bir gen kümesindeki mutasyon nedeniyle oluşur ve otozomal dominant kalıtılır.

MODY (Gençlerin erişkin başlangıçlı diyabeti) tip diyabet bu gruba dahildir.

2.6.1. Risk Faktörleri

Dünyada gittikçe yaygınlaşan DM için birçok risk faktörü vardır:[33]

- Genetik
- Sigara
- Alkol
- Obezite; 2011 WHO verilerine göre hastaların yaklaşık %90'ında

aşırı vücut ağırlığıyla ilişkili olan tip 2 DM gelişir. Aşırı kilolu yetişkin bireylerde görülen obstrüktif uyku apnesi ve uyku bozukluğu, prediyabete ve tip 2 DM'a ilerleyen insülin direnci ve glikoz duyarlılığı için yaygın bir risk faktörüdür.

- Yüksek glisemik indekse sahip besinler
- Dislipidemi
- Hareketsiz yaşam tarzı
- Antipsikotikler, diüretikler, betablokörler, immüsupresanlar

grubundan bazı ilaçlar

- Koksakivirüs, sitomegalovirüs (CMV), MMR (kızamık, kızamıkçık, kabakulak) gibi bazı enfeksiyonlar Tip 1 DM'a neden olan otoantikor gelişimine katkıda bulunabilir.

2.6.2. Patofizyoloji

Tip 1 DM'ta insülin üreten pankreas β hücrelerinin yıkımı, T lenfositleri tarafından aktive edilen bir otoimmün reaksiyondan kaynaklanır. CD4+ yardımcı T hücreleri, makrofajları aktive ederek doku hasarına neden olur. CD8+ sitotoksik T hücreleri, β hücrelerini doğrudan yok eder ve ayrıca sitokinlerin salınmasını

sağlar, makrofajları aktive eder. Bu durum pankreasta hücrel nekroza ve lenfosit infiltrasyonuna neden olur. Pankreasta lokal olarak üretilen sitokinler (T hücreleri tarafından üretilen IFN- γ , makrofaj aracılı sitokinler TNF- α , IL-1) apoptoz yoluyla β hücrelerine zarar verebilir. [33]

Tip 2 DM, dünya çapında en yaygın metabolik bozukluklardan biridir ve gelişimi, pankreas β -hücreleri tarafından insülin salgılanmasında bozukluk ve insüline duyarlı dokuların insüline yanıt verememesi olarak iki ana faktörün birleşiminden kaynaklanır. [34]

Tip 2 DM hastaları çoğunlukla obez olma veya ağırlıklı olarak karın bölgesinde dağılmış yüksek vücut yağ yüzdesine sahip olma ile karakterizedir. Bu durumda artan serbest yağ asidi (FFA) salınımı ve adipokin düzensizliği gibi çeşitli inflamatuvar mekanizmalar insülin direncini destekler. [34]

Diyabetin tüm formları hiperglisemi, insülin etkisinin göreceli veya mutlak eksikliği, insülin direnci ve retina, renal glomerulus ve periferik sinirde diyabet spesifik patolojinin gelişimi ile karakterizedir. Diyabet ayrıca kalp, beyin ve alt ekstremitelerde arterlerini etkileyen hızlandırılmış aterosklerotik hastalıkla da ilişkilidir. [35]

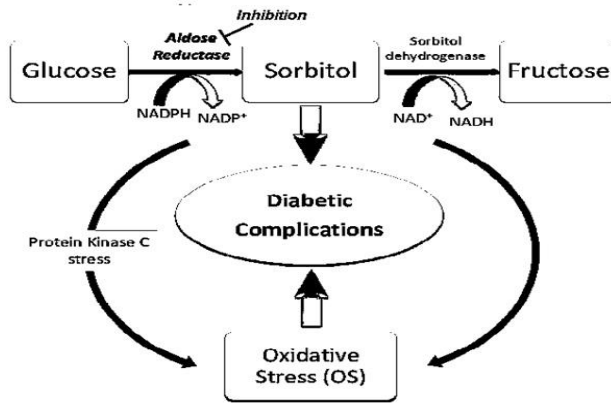
DM'un nefropati, retinopati, nöropati ve kardiyovasküler hastalıklar olmak üzere dört ana başlıkta incelenen önemli mortalite ve morbidite nedeni olan komplikasyonları mevcuttur. Bu komplikasyonların ortaya çıkmasında rol oynayan metabolik yollar şu şekildedir: [1, 35, 36]

Protein Kinaz C (PKC) Aktivasyonu

PKC ailesi, endotel hücre geçirgenliğinin modülasyonunda, hücre çoğalmasının aktivasyonunda ve vasküler büyümede önemli rol oynar. Özellikle PKC β izoformu, hiperglisemi ile birlikte dokularda biriken diaçilgliserol (DAG) ile aktive olur. Kalp, retina ve böbrek glomerülleri dahil olmak üzere çeşitli dokularda PKC aktivasyonu olur ve sonunda hem insanlarda hem de hayvan modellerinde diyabetik komplikasyonlar şiddetlenir.

PKC; eNOS, NAD(P)H oksidaz, fosfolipaz A2, endotelin-1 (ET-1), vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF), dönüştürücü büyüme faktörü- β (TGF- β) ve NF-KB'yi aktive ederek diyabetik komplikasyonlara zemin hazırlar. DAG ile aktive edilen PKC, anahtar proteinlerin gen ekspresyonunu etkiler ve kan akışının azalmasına, kılcal damar tıkanıklığına, inflamasyona, serbest radikal oluşumuna ve hücresel makromolekül hasarına yol açar. [36]

Poliol Yolunun Aktivasyonu



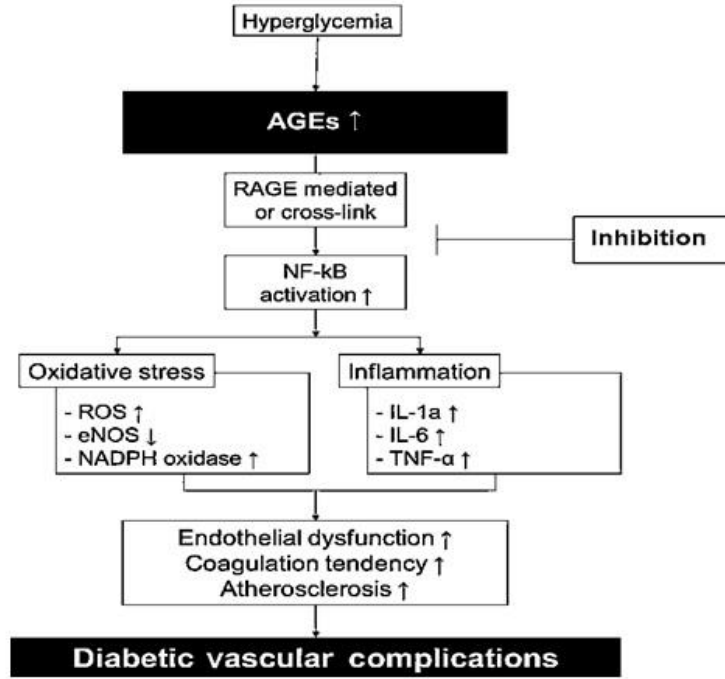
Şekil 8. Polioli yolu [1]

Poliol yolu iki temel enzimden oluşur: aldoz redüktaz ve sorbitol dehidrogenaz. (Şekil 8) Aldoza redüktaz sinir, retina, lens, glomerulus ve vasküler hücreler gibi dokularda bulunur ve poliol yolu, retinada ROS üretiminin ana kaynağıdır ve sorbitol birikiminin retinopati ile ilişkili olduğu gösterilmiştir.

Hipergliseminin poliol yolu üzerinden doku hasarına neden olduğunu açıklayan en temel mekanizma NADPH tüketimidir. NADPH, GSH oluşumunda yardımcı bir kofaktördür ve GSH da antioksidan sistemin önemli bir parçasıdır. Dolayısıyla NADPH tüketimi hücre içi oksidatif stresi şiddetlendirebilir. Diğer taraftan NADH artışı da ROS üretimi için bir substrat kaynağıdır.

İleri Glikasyon Son Ürünlerinin Oluşumu (AGE)

AGE'ler, hem glikozdan üretilen hem de arteriyel endotel hücrelerinde ve kalpte yağ asidi oksidasyonunun artması sonucu oluşan glikoz ve diğer glikozilleyici bileşiklerin proteinlerle nonenzimatik reaksiyonu sonucu oluşur. Diyabette, AGE'ler ekstraselüler matrikste artmış miktarlarda bulunur. [35]



Şekil 9. AGE mekanizması [1]

AGE'ler ve reseptörleri (RAGE) arasındaki etkileşim nükleer faktör κ B aktivasyonu ile sitokin ve büyüme faktörlerinin salınımını artırır, oksidatif stres oluşumuna neden olur ve inflamatuvar yanıtı açar. Bu etkileşim arterioskleroz ilerlemesini hızlandırabilir. (Şekil 9)

Artmış Hekzozamin Yolu Akısı

Hekzozamin yolunun, insülin direncinin ve diyabetik komplikasyonların ortaya çıkmasında etkili sitokinlerin salınımını artırarak etkili olduğu bildirilmiştir. [1]

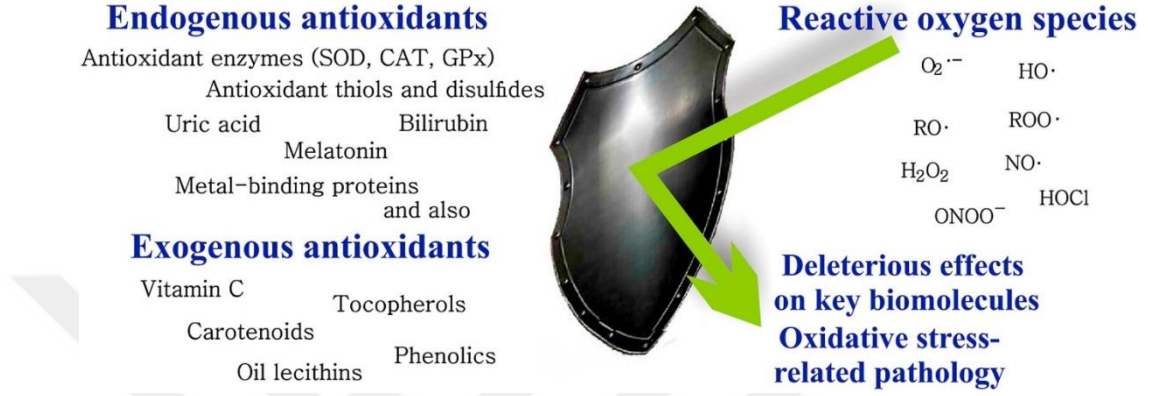
Oksidatif stres, diyabetin mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyonlarının gelişmesinde önemli rol oynar. Yukarıda bahsedilen yollar aracılığıyla artan ROS üretimi kusurlu anjiyogeneze, proinflamatuvar yolların aktivasyonuna ve hiperglisemi düzelse bile proinflamatuvar gen ekspresyonunun kalıcı hale gelmesine yol açan epigenetik değişikliklere neden olur (“hiperglisemik hafıza”). [35]

2.6.3. DM ve Karaciğer

Alkolik olmayan yağlı karaciğer hastalığı (NAFLD) ve diabetes mellitus, sıklıkla birlikte var olan ve sinerjik olarak hareket edebilen hastalıklardır. NAFLD, tip 2 DM hastalarının %70-80'ini ve yetişkin tip 1 DM hastalarının %30-40'ını etkiler. NAFLD ve DM'un birlikte bulunması diyabetin makrovasküler ve mikrovasküler komplikasyonlarında artışla ve ayrıca NAFLD'nin daha şiddetli formlarının (KC'de ileri fibroz ve siroz) ortaya çıkması ve sonuçta hepatosellüler karsinom (HCC) oluşumu ile ilişkilidir. [37]

Patogeneizde rol alan önemli mekanizmalardan biri, DM'ta insülin ilişkili lipit metabolizmasındaki bozukluktan kaynaklanan dolaşımdaki serbest yağ asidi düzeylerinin yükselmesi ve karaciğere taşınmasının artmasıdır. Sonuçta KC'de aşırı trigliserit sentezlenir ve insülin direncine bağlı yağ asidi oksidasyonu olması durumu daha da kötüleştirir. Glukoz seviyesinin yükselmesi de trigliserit sentezi için daha fazla substrat sağlar. [37]

2.7. Oksidatif Stres



Şekil 10. ROS ve antioksidanlar [38]

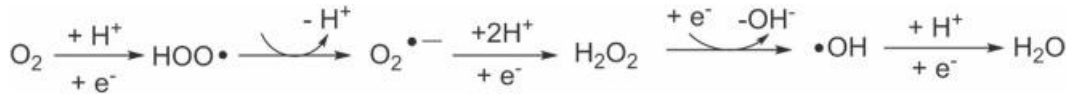
Oksidatif stres, prooksidan ve antioksidan türler arasındaki dengesizlik olarak tanımlanır. ROS, hücrel çoğalma, farklılaşma, göç, apoptoz ve nekrozda önemlidir. Fizyolojik düzeylerde ROS birçok önemli fizyolojik fonksiyonun, redoks homeostazının ve temel transkripsiyon faktörlerinin düzenlenmesi için gereklidir. NADPH oksidaz, ksantin oksidaz, mitokondri (CYP 450 enzim sistemi) gibi sistemler yoluyla ya da ekzojen olarak (radyasyon, kirlilik, yiyecekler, ilaçlar, sigara vb.) ROS aşırı artışıyla, antioksidan savunma yetersiz kaldığında veya tamponlama sistemleri hücrelerin redoks dengesini koruyamadığında oksidatif stres ortaya çıkar. [38, 39]

Süperoksit radikali, hidrojen peroksit, hidroksil radikalleri, peroksil radikalleri, nitrik oksit, peroksinitrit gibi eşleştirilmemiş bir elektrona sahip olan serbest radikaller kararsızdır ve oldukça reaktiftir. Bu nedenle lipitler, proteinler

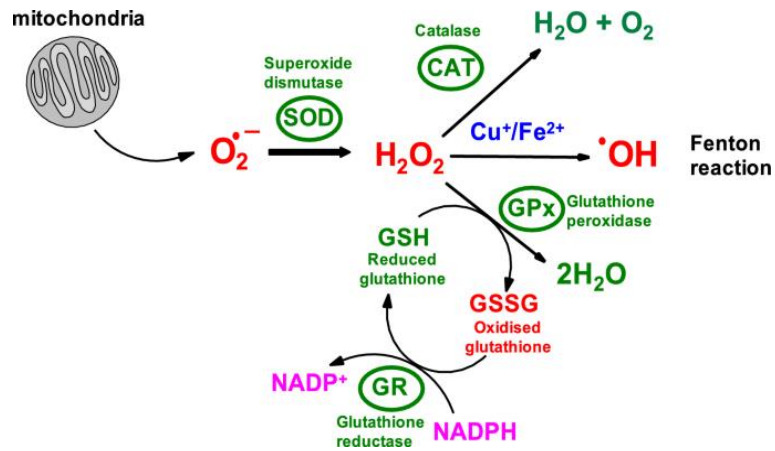
ve DNA gibi duyarlı bileşiklerle kolay ve hızlı bir şekilde reaksiyona girer ve oksidatif hasara neden olur. [39, 40]

Antioksidanların oksidatif stresin zararlı etkisini iyileştirmek için koordineli eylemi, antioksidan enzimler (SOD, CAT, GST, glutatyon peroksidaz-GPx), enzimatik olmayan glutatyon ve küçük molekül ağırlıklı antioksidanlar (C ve E vitaminleri, flavonoidler, karotenoidler, melatonin, ergotiyonin) tarafından sağlanır. [39] (Şekil 12,13)

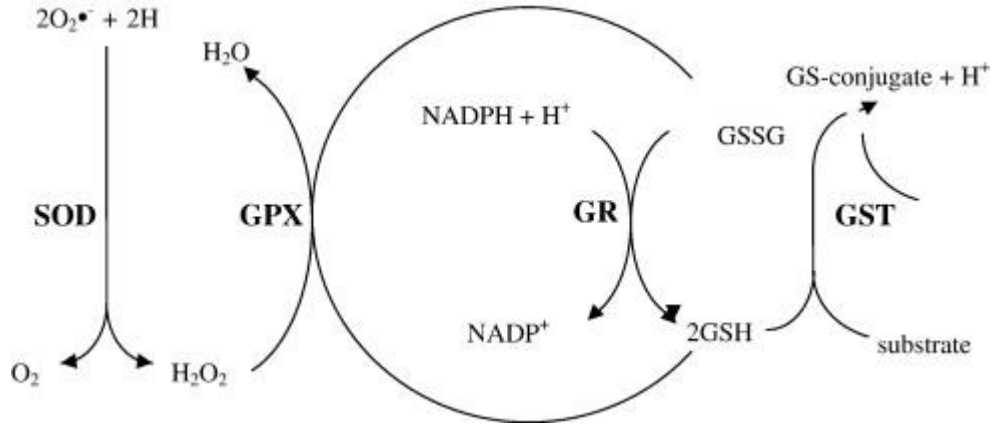
SOD'nin fonksiyonu, $O_2^{\bullet-}$ 'nin (süperoksit anyonu) dismutasyon reaksiyonunu katalize etmektir. CAT ve GPx ise H_2O_2 'yi H_2O ve O_2 'ye ayırıştırır. [41] (Şekil 12,13)



Şekil 11. ROS oluşumu [41]



Şekil 12. Antioksidan sistem [42]



Şekil 13. Glutasyon ilişkili antioksidan sistemi (GPX: Glutasyon peroksidaz, GR: Glutasyon redüktaz, GST: Glutasyon S transferaz) [43]

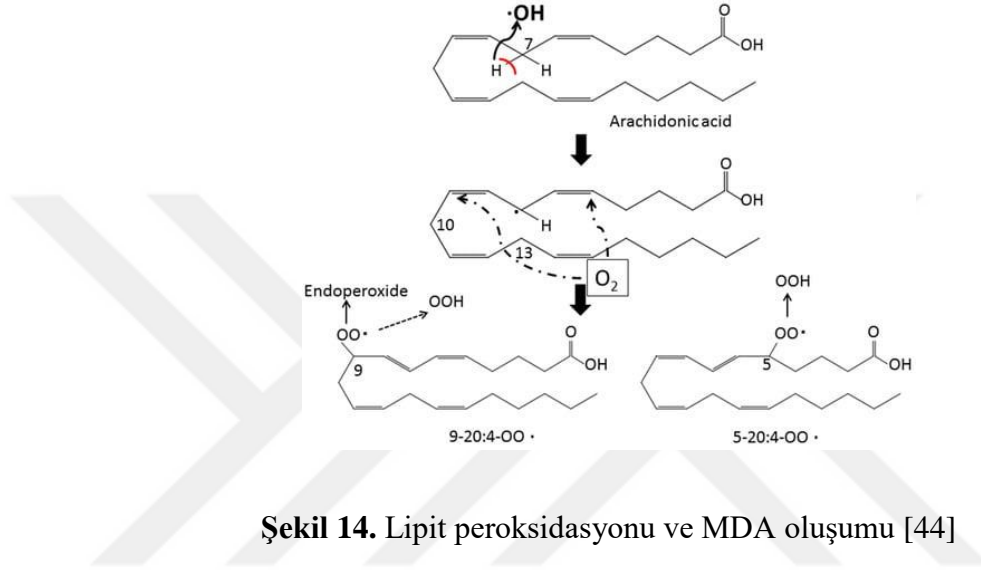
Oksidatif stres kanser, diyabet, nörodejenerasyon, kalp damar hastalıkları, romatoid artrit, böbrek hastalığı ve göz hastalıklarının gelişiminde önemli rol oynar. [38]

Reaktif türler son derece kısa ömürlü olduğundan, konsantrasyonlarını doğrudan ölçmek çok zor ve maliyetlidir. Bu nedenle proteinlerin, lipidlerin ve DNA'nın oksidatif hasarından oluşan ürünler oksidatif hasarın kapsamını ölçmek için kullanılır. Bunlardan biri lipid peroksidasyonunun ürünü olan MDA'dır. [41]

Lipit Peroksidasyonu

En reaktif ve tehlikeli radikal olan hidroksil radikali ($\bullet OH$), metal iyonlarının varlığında H_2O_2 'den oluşur ve lipid peroksidasyon reaksiyonlarında önemli bir rol oynar. Karbon-karbon çift bağları içeren lipidleri, özellikle çoklu doymamış yağ asitlerini (PUFA) okside eder. PUFA'larda, $-C=C-$ birimleri tek

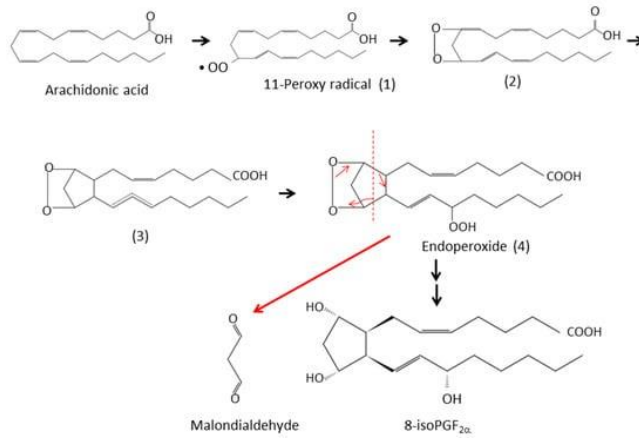
bağlı bir –C– atomuyla ayrılır. Bu –C– atomlarına bağlı hidrojen atomları hidroksil radikalinin saldırısına karşı hassastır. (Şekil 14) [44]



Şekil 14. Lipit peroksidasyonu ve MDA oluşumu [44]

En az üç çift bağ içeren PUFA'ların peroksidasyonu sonucu MDA oluşur. MDA; hücrel proteinler, DNA ve bu proteinlerin lizin kalıntıları ile reaksiyona girerek kovalent bağlar oluşturur. Oluşan bu aldehit-protein ürünlerinin ateroskleroz, diyabet, nörodejeneratif hastalıklar ve karaciğer hastalığı gibi durumlarda rol aldığı gösterilmiştir. (Şekil 15) [44]

MDA ve aldehit-protein ürünleri lipit peroksidasyonunun varlığının, hastalığın riski ve ilerlemesinin belirlenmesinde yararlı biyobelirteçlerdir. [44]



Şekil 15. Lipit peroksidasyonu ve MDA oluşumu [44]

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulundan 21.12.2023 tarih ve G.Ü.ET-23.114 kod numaralı etik kurul onayı alındıktan sonra gerçekleştirildi.

3.1. Denek Seçimi

Çalışmada ağırlıkları 200-225 gr arasında değişen 30 adet, erkek Wistar cinsi albino rat kullanıldı.

3.2. Kullanılan Yöntem

Ratlar sham grubunda 6, diğer gruplarda 8'er tane olmak üzere, rastgele 4 gruba ayrılacaktır. (Sham, Diyabet-Sham, Diyabet-İ/R, Diyabet-Ozon-İ/R)

Tablo 3. Deney grupları

Grup 1	Sham (kontrol) (K)	n=6
Grup 2	Diyabet- Kontrol (DK)	n=8
Grup 3	Diyabet- İskemi reperfüzyon (DİR)	n=8
Grup 4	Diyabet- Ozon-İskemi reperfüzyon (DİR-O)	n=8

3.2.1. Diyabet oluşturma

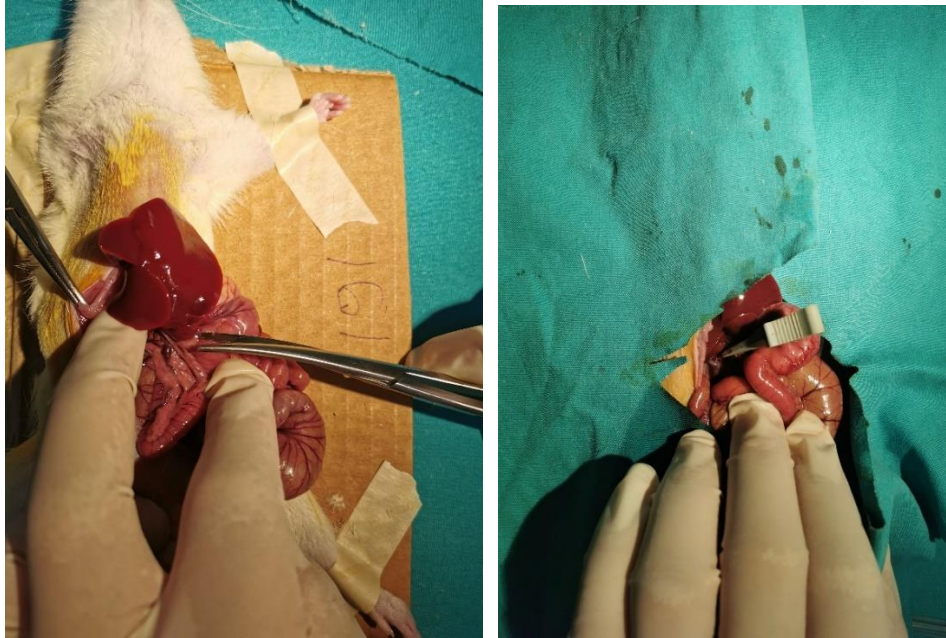
Diyabet oluşturmak için tek seferde i.p. olarak 55 mg/kg streptozotosin enjekte edildi. Enjeksiyondan 72 saat sonra kuyruk venlerinden kan şekeri bakıldı. Kan şekerleri 250 mg/dl ve üzerinde saptanan ratlar diyabetik olarak kabul edildi. STZ enjeksiyonundan sonra 4 hafta boyunca, diyabetin organlar üzerine kronik etkilerinin gözlenmesi için ratların bakımları sağlandı. Bu süre zarfında ratların kilo kaybını önlemek ve ketoasidoz gelişimini engellemek için insülin tedavisi (1-3 /gün) uygulandı.

3.2.2. Karaciğer İ/R Oluşturma

50 mg/kg ketamin hidroklorid ve 5 mg/kg ksilazin hidroklorid i.m. enjeksiyonla verildikten sonra ciltleri aseptik şartlara uygun hale getirilen ratlara orta hat abdominal laparotomi yapılıp porta hepatis mikrovasküler klemp konuldu. 60 dakika iskemi ve 60 dakika reperfüzyon uygulandı. Tüm işlemler bir ısıtma lambası altında, ratlar supin pozisyonda iken gerçekleştirildi. (şekil 16,17)



Şekil 16. Aseptik şartların sağlanması ve sadece orta hat laparotomi ile sağlıklı organların görünümü



Şekil 17. Porta hepatis ve mikrovasküler klemp yerleştirilmesi



Şekil 18. İskeminin ilerleyişi



Şekil 19. Batında görülen kitle nedeniyle çalışmaya dahil edilmeyen rat

3.3. Deney Grupları

Sham Grubu (Gr K, n=6): Bu gruptaki ratlarda hepatic iskemi yapılmaksızın sadece orta hat abdominal laparotomi yapıp kapatıldı. İşlemden iki saat sonra anestezi altında abdominal aorttan kan alınması yöntemi ile sakrifikasyon sonrasında ratların karaciğer dokusu çıkartıldı ve bu dokuda histopatolojik ve biyokimyasal değerlendirmeler yapıldı.

Diyabet-Sham grubu (Gr DK, n=8): Diyabet oluşturulan gruptaki ratlara hepatic iskemi yapılmaksızın sadece orta hat laparotomi yapıp kapatıldı, işlemden iki saat sonra anestezi altında abdominal aorttan kan alınması yöntemi ile sakrifikasyon sonrasında ratların karaciğer dokusu çıkartıldı ve bu dokuda histopatolojik ve biyokimyasal değerlendirmeler yapıldı.

Diyabet-İskemi-Reperfüzyon Grubu (Gr DİR, n=8): Diyabet oluşturulan ratlara 4 hafta sonra orta hat abdominal laparotomi yapıp porta hepatis

mikrovasküler klemp konuldu, 60 dakika iskemi ve 60 dakika reperfüzyon sonrası anestezi altında abdominal aorttan kan alınması yöntemi ile sakrifikasyon sonrasında ratların karaciğer dokusu çıkartıldı ve bu dokuda histopatolojik ve biyokimyasal değerlendirmeler yapıldı.

Diyabet-Ozon-İskemi-Reperfüzyon Grubu (Gr DİR-O n=8): Diyabet oluşturulan ratlara 4 hafta sonra, (intraperitoneal ozon-oksijen karışımı: 0.7 mcg/kg (50 mcg/ml), (Medozon kompakt, Herrmann Apparatebau GmbH, Almanya) verildi. Ozon uygulamasından bir saat sonra ratlara orta hat abdominal laparotomi yapıp porta hepatis mikrovasküler klemp konuldu, 60 dakika iskemi ve 60 dakika reperfüzyon sonrası anestezi altında abdominal aorttan kan alınması yöntemi ile sakrifikasyon sonrasında ratların karaciğer dokusu çıkartıldı ve bu dokuda histopatolojik ve biyokimyasal değerlendirmeler yapıldı.

3.4. Dokuların Saklanması

Sakrifikasyon sonrasında karaciğer dokusu bütünlük bozulmayacak ve travmatize edilmeyecek şekilde alındı.

Karaciğer doku örnekleri; histopatolojik değerlendirme yapıncaya kadar %10'luk formaldehid solüsyonu içinde saklandı. Biyokimyasal değerlendirme yapmak için ise -70 derecede saklandı.

3.5 . Histolojik İnceleme

Histolojik doku hasarı hemotoksilen-eozin boyama ile ışık mikroskopisinde değerlendirildi. Histopatolojik değişiklik olarak hepatosit

dejenerasyonu, sinüzoidal dilatasyon, piknotik çekirdek, nekroza giden hücre, parankimde mononükleer hücre infiltrasyonu değerlendirildi. Karaciğer hasarının şiddeti; 4 puanlı bir skala (0=hasar yok, 1= hafif hasar, 2= ileri hasar, 3=şiddetli hasar) ile değerlendirildi.

3.6. Biyokimyasal İnceleme

Kanda aspartat aminotransferaz (AST), alanin aminotransferaz (ALT) ve glukoz; karaciğer dokusunda malondialdehid (MDA) düzeyi, katalaz (CAT) enzim aktivitesi çalışıldı.

Biyokimyasal analizler Gazi Üniversitesi Yaşam Bilimleri Uygulama ve Araştırma Merkezi Biyokimya Laboratuvarında yapıldı. Katalaz aktivitesi Aebi yöntemiyle, MDA aktivitesi ise Van Ye TM ve arkadaşlarının yöntemiyle belirlendi. [58,59]

3.7. İstatiksel Değerlendirme

Çalışma verileri SPSS (Statistic Program for Social and Science) istatistik programı kullanılarak analiz edildi. İstatiksel değerlendirme SPSS 26.0 bilgisayar programında aşağıda sıralanan testler kullanılarak gerçekleştirildi ve $p<0.05$ anlamlı kabul edildi. İstatiksel analiz: veriler [ortalama \pm standart sapma (SS), veya standart hata (SH) olarak] değerlendirildi. Ölçülebilen parametrelere Kolmogorov-Smirnov testi uygulanarak dağılımın normal ya da anormal olup olmadığı belirlendi. Gruplar arasında fark olup olmadığını belirlemede bağımsız gruplarda Kruskal-Wallis testi ile değerlendirildi. Farklılık olması durumunda gruplar arası Mann-Whitney U testi ile karşılaştırılma yapıldı.

4. BULGULAR

Işık mikroskopisinde; hidropik dejenerasyon gruplar arasında anlamlı olarak farklı bulundu ($p=0.006$). DİR grubunda kontrol ve DK gruplarına göre hidropik dejenerasyon daha fazla görüldü ($p=0.001$, $p=0.004$, sırasıyla). Hidropik dejenerasyon DİR-O grubunda DİR grubuna anlamlı olarak düşük bulundu ($p=0.013$), (Tablo 4, Resim 20-27).

Sinüzoidal dilatasyon gruplar arasında anlamlı olarak farklı bulundu ($p=0.003$). DİR grubunda kontrol ve DK gruplarına göre sinüzoidal dilatasyon daha fazla görüldü ($p<0.0001$, $p=0.002$, sırasıyla). Sinüzoidal dilatasyon DİR-O grubunda DİR grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu ($p=0.009$), (Tablo 4, Resim 20-27).

Piknotik çekirdek gruplar arasında benzer bulundu bulundu ($p=0.117$), (Tablo 4, Resim 20-27).

Nekroza giden hücre gruplar arasında anlamlı olarak farklı bulundu ($p=0.019$). DİR grubunda kontrol ve DK gruplarına göre nekroza giden hücre daha fazla görüldü ($p=0.004$, $p=0.012$, sırasıyla). Nekroza giden hücre DİR-O grubunda DİR grubuna anlamlı olarak düşük bulundu ($p=0.040$), (Tablo 4, Resim 20-27).

Parankimde MN (mononükleer) hücre infiltrasyonu gruplar arasında anlamlı olarak farklı bulundu ($p=0.017$). DİR grubunda kontrol ve DK gruplarına

göre parankimde MN hücre infiltrasyonu daha fazla görüldü ($p=0.004$, $p=0.008$, sırasıyla). Parankimde MN hücre infiltrasyonu DİR-O grubunda DİR grubuna anlamlı olarak düşük bulundu ($p=0.040$), (Tablo 4, Şekil 20-27).

Tablo 4. Rat karaciğer dokusu histopatolojik bulguları [Ort \pm SH]

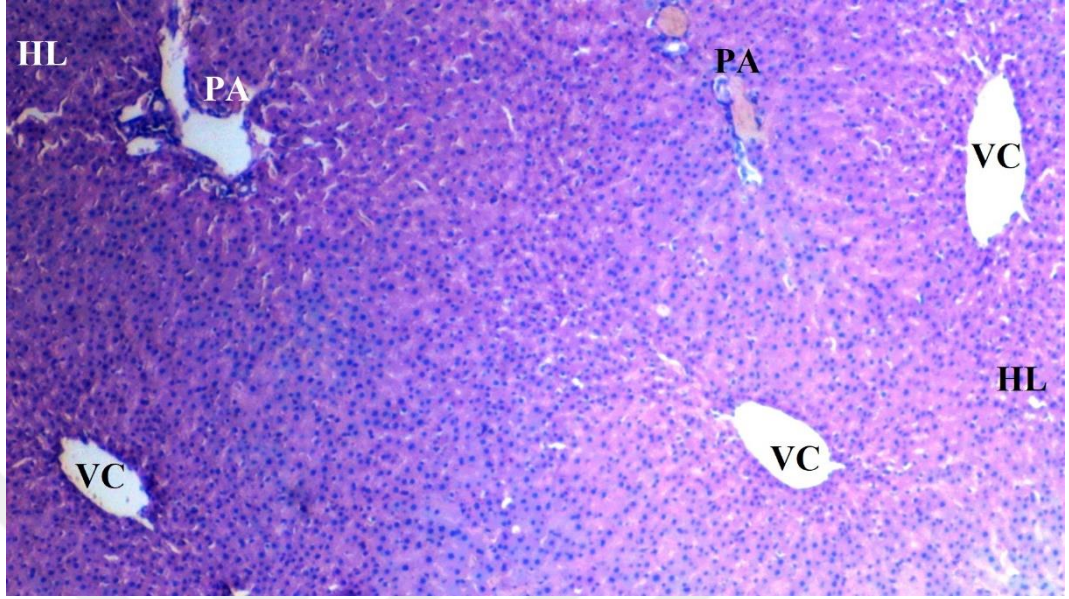
	Grup K (n=6)	Grup DK (n=8)	Grup DİR (n=8)	Grup DİR-O (n=8)	P**
Hepatosit dejenerasyonu	0.33 \pm 0.21	0.50 \pm 0.22	1.50 \pm 0.22*,+	0.67 \pm 0.21&	0.006
Sinüzoidal dilatasyon	0.50 \pm 0.22	0.67 \pm 0.31	1.67 \pm 0.21*,+	0.83 \pm 0.17&	0.002
Piknotik çekirdek	0.50 \pm 0.22	0.67 \pm 0.21	1.33 \pm 0.33	0.83 \pm 0.17	0.117
Nekroza giden hücre	0.33 \pm 0.21	0.50 \pm 0.22	1.33 \pm 0.21*,+	0.67 \pm 0.21&	0.019
Parankimde MN hücre infiltrasyonu	0.33 \pm 0.21	0.50 \pm 0.34	1.83 \pm 0.40*,+	0.83 \pm 0.31&	0.017

p^{**} : Kruskal Wallis testi ile anlamlılık düzeyi $p < 0.05$

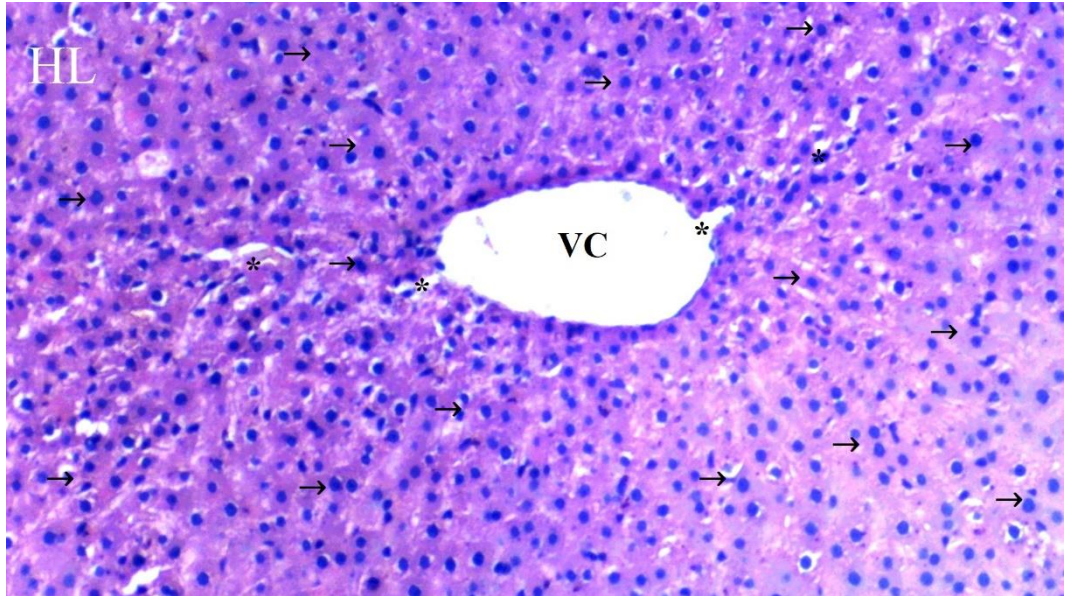
* $p < 0.05$: Grup K ile karşılaştırıldığında

+ $p < 0.05$: Grup DK ile karşılaştırıldığında

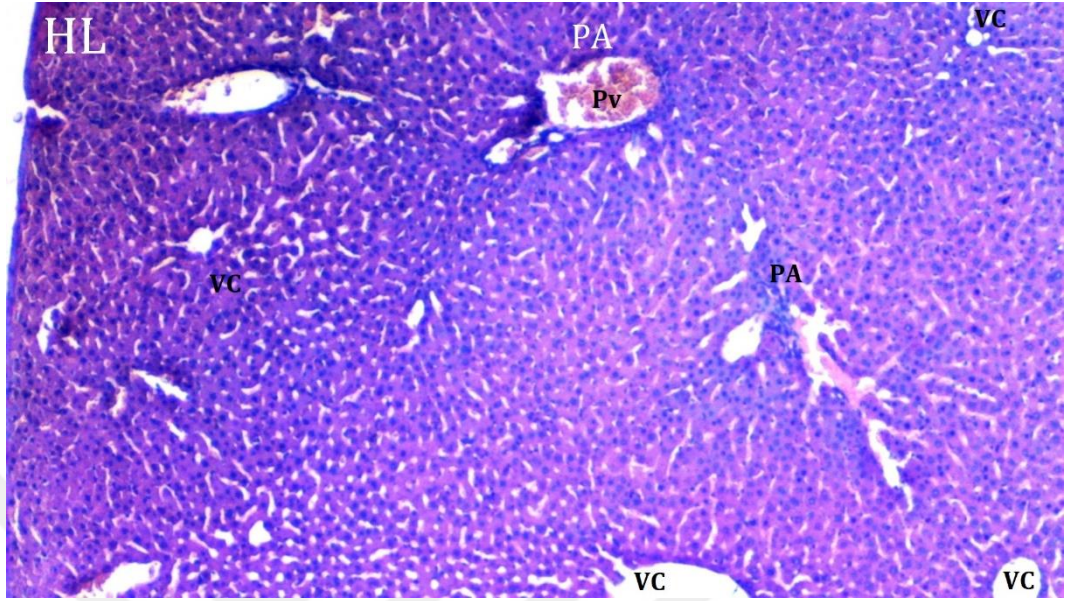
& $p < 0.05$: Grup DİR ile karşılaştırıldığında



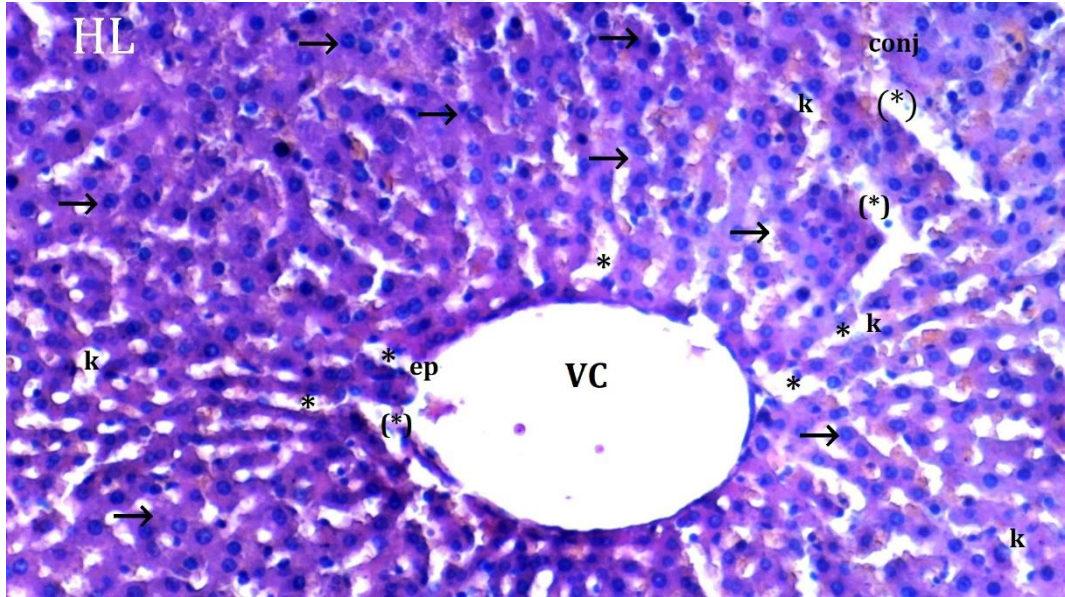
Şekil 20. Grup K; VC: Vena sentralis, HL: Hepatik lobül; *: sinüzoid; (*): sinüzoid dilatasyonu; k: Kupffer hücresi; PA: Portal aralık; →:hepatositler; ↓↓: Parankimde MN hücre infiltrasyonu



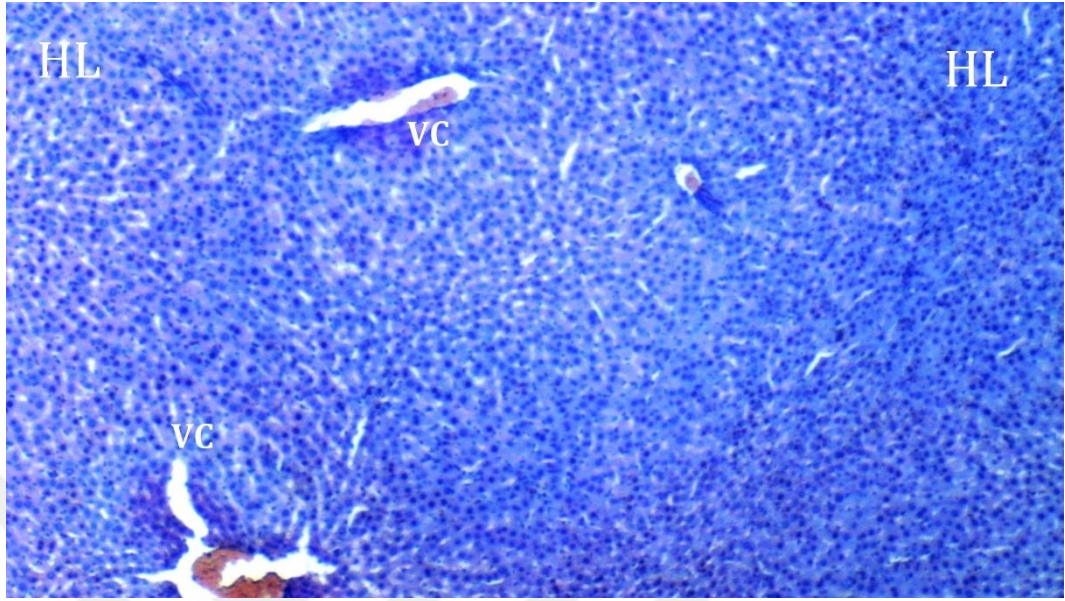
Şekil 21. Grup K; VC: Vena sentralis, HL: Hepatik lobül; *: sinüzoid; (*): sinüzoid dilatasyonu; k: Kupffer hücresi; PA: Portal aralık; →:hepatositler



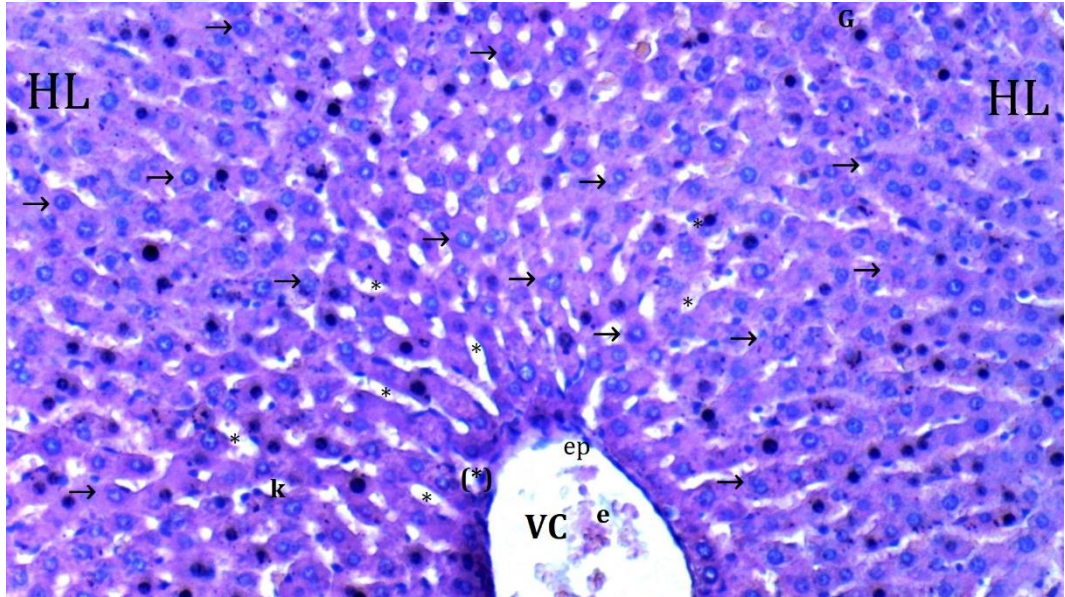
Şekil 24. Grup DİR; VC: Vena sentralis, HL: Hepatik lobül; *: sinüzoid; (*): sinüzoid dilatasyonu; k: Kupffer hücresi; →: hepatositler; ↓↓: Parankimde MN hücre infiltrasyonu; conj: Kapiller konjesyon; er: eritrosit



Şekil 25. Grup DİR; VC: Vena sentralis, HL: Hepatik lobül; *: sinüzoid; (*): sinüzoid dilatasyonu; k: Kupffer hücresi; →: hepatositler; ↓↓: Parankimde MN hücre infiltrasyonu; inf: İnflamasyon; conj: Kapiller konjesyon; er: eritrosit



Şekil 26. Grup DİR-O VC: Vena sentralis, HL: Hepatik lobül; *: sinüzoid; (*): sinüzoid dilatasyonu; k: Kupffer hücresi; →: hepatositler; ↓↓: Parankimde MN hücre infiltrasyonu; conj: Kapiller konjesyon; er: eritrosit



Şekil 27. Grup DİR-O ; VC: Vena sentralis, HL: Hepatik lobül; *: sinüzoid; (*): sinüzoid dilatasyonu; k: Kupffer hücresi; →: hepatositler; ↓↓: Parankimde MN hücre infiltrasyonu; dej: hepatosit ve vena sentralis dejenerasyonu; conj: Kapiller konjesyon; er: eritrosit

Gruplar karaciğer dokusu MDA düzeyi açısından kendi aralarında kıyaslandığında, gruplar arasında anlamlı fark vardı ($p<0.001$). DİR ve DİR-O gruplarında K grubuna göre MDA düzeyi anlamlı yüksek bulundu ($p<0.001$, her ikisi). Ayrıca, DİR grubunda DK grubuna göre de MDA düzeyi anlamlı yüksek bulundu ($p<0.001$). MDA düzeyi DİR-O grubunda DİR grubuna göre anlamlı düşük bulundu ($p<0.001$), (Tablo-5).

Gruplar karaciğer dokusu CAT enzim aktivitesi açısından kendi aralarında kıyaslandığında, gruplar arasında anlamlı fark vardı ($p<0.001$). DİR grubunda K ve DK gruplarına göre CAT enzim aktivitesi anlamlı düşük bulundu ($p<0.001$, $p=0.002$, sırasıyla). CAT enzim aktivitesi DİR-O grubunda DİR grubuna göre anlamlı yüksek bulundu ($p=0.029$), (Tablo-5).

Tablo 5: Karaciğer dokusu oksidan durum bulguları [Ort \pm SS]

	Grup K (n=6)	Grup DK (n=8)	Grup DİR (n=8)	Grup DİR-O (n=8)	P**
Katalaz (IU/mg protein)	52.27 \pm 6.55	44.48 \pm 5.16	31.42 \pm 7.99*,+	43.24 \pm 5.82&	<0.001
Malondialdehid (nmol/g protein)	77.52 \pm 10.67	91.38 \pm 8.12	124.26 \pm 11.84*,+	102.22 \pm 4.14*,&	<0.001

*p***: Kruskal Wallis testi ile anlamlılık düzeyi $p < 0.05$

**p < 0.05*: Grup K ile karşılaştırıldığında

+p < 0.05: Grup DK ile karşılaştırıldığında

&p < 0.05: Grup DİR ile karşılaştırıldığında

Gruplar ALT düzeyi açısından kendi aralarında kıyaslandığında, gruplar arasında anlamlı fark vardı ($p<0.001$). ALT düzeyi DİR grubunda K ve DK gruplarına anlamlı artmış olarak tespit edildi ($p<0.0001$, tümü). Benzer şekilde ALT düzeyi DİR-O grubunda da K ve DK gruplarına göre anlamlı artmış olarak tespit edildi ($p<0.001$, tümü). ALT düzeyi DİR-O grubunda DİR grubuna göre anlamlı olarak düşük tespit edildi ($p<0.001$), (Tablo-6).

Gruplar AST düzeyi açısından kendi aralarında kıyaslandığında, gruplar arasında anlamlı fark vardı ($p<0.001$). AST düzeyi DİR grubunda K ve D gruplarına göre olarak artmış olarak tespit edildi ($p<0.0001$, tümü). Benzer şekilde AST düzeyi DİR-O grubunda da K ve DK grupların göre anlamlı olarak artmış tespit edildi ($p=0.008$, $p=0.009$, sırasıyla). AST düzeyi DİR-O grubunda DİR grubuna göre anlamlı olarak düşük tespit edildi ($p=0.006$), (Tablo-6).

Gruplar glukoz düzeyi açısından kendi aralarında kıyaslandığında, gruplar arasında anlamlı fark vardı ($p<0.001$). Glukoz düzeyi DİR grubunda K ve DK gruplarına göre anlamlı artmış olarak tespit edildi ($p<0.0001$, $p=0.015$, sırasıyla). Benzer şekilde glukoz DİR-O grubunda da K ve D gruplarına göre anlamlı olarak artmış tespit edildi ($p=0.004$, $p=0.006$, sırasıyla). Glukoz düzeyi DİR-O grubunda DİR grubuna göre anlamlı olarak düşük tespit edildi ($p<0.001$), (Tablo-6).

Tablo 6: Rat AST, ALT ve Glukoz bulguları [Ort ± SS]

	Grup K (n=6)	Grup DK (n=8)	Grup DİR (n=8)	Grup DİR-O (n=8)	P**
AST(U/L)	119.80±11.28	144.40±27.04	3974.00±1660.78*,+	2052.80±973.44*,+,&	<0.001
ALT(U/L)	48.20±14.52	72.20±29.34	1867.33±448.80*,+	1045.80±384.32*,+,&	<0.001
GLUKOZ(mg/dL)	186.17±54.94	511.67±138.22	648.50±58.66*,+	353.33±80.31*,+,&	<0.001

*p**:* Kruskal Wallis testi ile anlamlılık düzeyi $p < 0.05$

**p < 0.05:* Grup K ile karşılaştırıldığında

+p < 0.05: Grup DK ile karşılaştırıldığında

&p < 0.05: Grup DİR ile karşılaştırıldığında

5. TARTIŞMA

İskemi, bir dokunun işlevini tam olarak yerine getirebilmesi için gerekli olan kanlanmanın sağlanamamasıdır. İskemi süresi arttıkça etkilenen dokuda yapısal bütünlük kaybı başlar ve hücre ölümü gerçekleşir. Bu hasarın olmaması için dokuya yeniden kan akışının sağlanması gerekir. Reperfüzyon olarak adlandırılan bu durum paradoksal olarak hasarın şiddetini artırabilir ve etkilenen doku haricinde uzak organlarda da hasara neden olabilir. Bu dokuya kan akışının bozulması ile başlayan ve beraberinde akımın yeniden sağlanması ile hasarın şiddetlendiği, hücre ölümüne kadar giden olaylar bütününe İ/R hasarı denir.

İ/R hasarı klinik olarak; stroke, myokard infarktüsü, ekstremiteler iskemisi gibi durumlardan sonra vücudun kendi fibrinolitik mekanizmalarıyla ya da trombolitik tedavi, anjiyoplasti, operatif revaskülarizasyon gibi tedaviler sonrasında kan akımının yeniden sağlandığı durumlarda; vasküler cerrahiler ve karaciğer cerrahileri sırasında vasküler klemp uygulanması ve sonrasında kaldırılması durumlarında; organ nakli, kardiyopulmoner baypas cerrahisi, majör travma ve şokta görülebilmektedir.

Diyabet, pankreasın insülin sekresyonunun yetersizliği veya yokluğu ya da dokuların insüline cevabının bozulmasıyla karakterize kronik metabolik bir hastalıktır. Dünya çapında prevalansı giderek artmıştır ve artmaya devam etmektedir. Diyabetin önemli mortalite ve morbiditeye neden olan nöropati, nefropati, retinopati, kardiyovasküler hastalıklar gibi komplikasyonları vardır.

Hem İ/R hasarı hem de diyabetin ve komplikasyonlarının patofizyolojisi ve tedavi yöntemleri ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmaların çoğunda ortak olan mekanizma oksidatif stres, proinflamatuvar mediatörler ve artmış sistemik inflamatuvar yanıttır. Biz de çalışmamızda diyabetik ratlarda karaciğer İ/R modeli üzerinde ozonun etkilerini araştırdık.

İ/R, karaciğer cerrahisi ve karaciğer nakil operasyonları ile ilişkili vasküler oklüzyona bağlı hasarın majör komponentidir. Aynı zamanda hipovolemik şok, kardiyak arrest gibi durumlarda da karaciğer İ/R hasarı mortalite ve morbiditede önemli rol oynar. Mitokondriyal enerji tükenmesi, aşırı ROS üretimi, kalsiyum aşırı yüklenmesi, lökosit agregasyonu, sitokin salınımı ve mikrosirkülasyon disfonksiyonu gibi bir dizi karmaşık süreç hasarın oluşmasında etkilidir. Oksidatif stres bu karmaşık patofizyolojik süreçte rol oynayan temel faktördür. Bu nedenle tedavi ile ilgili yapılan çalışmalar antioksidan mekanizmaları hedeflemektedir. Ozon da bu çalışmalarda kullanılan maddelerden biridir. Nitekim parsiyel hepatektomi uygulanan ratlarda Gültekin ve arkadaşlarının yaptığı bir karaciğer İ/R çalışmasında, parsiyel hepatektomi yapılan grupta hafif piknoz görülürken, parsiyel hepatektomi+İ/R uygulanan grupta şiddetli nötrofil infiltrasyonu ve nekroz görülmüştür. Ozonun ise bu hasarı belirgin şekilde azalttığı bu çalışmada gösterilmiştir. [45] Bizim çalışmamızda da DİR grubunda kontrol ve DK grubuna göre karaciğer hasarı artmıştır ve ozon uygulanan grupta bu hasarın azaldığı histopatolojik değerlendirme sonuçlarıyla görülmektedir. Çalışmamızın farklılığı ise karaciğer hasarı oluşturulan ratların diyabetik olmasıdır. Yine bu çalışmada karaciğer hasar belirteci olarak kabul edilen AST ve ALT düzeylerinin İ/R

grubunda artmış olduğu, ozon uygulanan grupta ise belirgin azaldığı gözlenmiştir. Çalışmamızda AST ve ALT düzeyleri biyokimyasal olarak değerlendirildiğinde DİR grubunda yükselen bu değerlerin ozon ile azaldığı gözlenmiştir. Dolayısıyla ozonun karaciğer hasarının derecesini azattığı gösterilmiştir. Ancak Gültekin ve arkadaşlarının çalışmasında olduğu gibi bizim çalışmamızda da her ne kadar ozonun karaciğer hasarı üzerinde önemli koruyucu etkisi gösterilmiş olsa da K ve DK grubuna göre AST ve ALT düzeyleri DİR-O grubunda daha fazla görülmüştür.

Tüfek ve arkadaşları, yaptıkları çalışmada karaciğer İ/R hasarı üzerinde deksmedetomidinin olumlu etkisini göstermişlerdir. Karaciğer dokusunu histopatolojik olarak değerlendirdiklerinde, İ/R grubundaki karaciğer dokusunda hasarın belirteci olarak belirgin hemoraji, sinüzoidal dilatasyon, hepatosit konjesyonu ve fokal nekroz alanları görmüşlerdir. [46] Bizim çalışmamızda da DİR grubunda K ve DK gruplarına göre karaciğer hasarı anlamlı derecede yüksek bulunmuştur.

Ozon uzun yıllar klinikte kullanılmıştır ve antioksidan mekanizmaları düzenleyerek oksidatif stres üzerine etkili olduğu bilinmektedir. Bu yollardan biri Nrf2 transkripsiyon faktörünü indüklemesiyle antioksidan kapasiteyi arttırmasıdır. Bu konuda yapılan çalışmalardan biri, Meng ve arkadaşlarının miyokard İ/R hasarı üzerinde ozonun etkisini araştırdıkları çalışmadır. Bu çalışmada İ/R uygulanan rat gruplarında kardiyomiyositlerde belirgin şekilde hasar görülmüştür ve ozon uygulanan gruplarda bu hasarın azaldığı gösterilmiştir. Çalışmalarında genetik analizlerle Nrf2 aktivitesinin ozon uygulanan grupta arttığı da

gösterilmiştir. [47] Bizim çalışmamızda immunohistokimyasal analiz bulunmadığı için mekanizmalar üzerine bir yorum yapılamamaktadır.

Ozonun karaciğer İ/R hasarındaki koruyucu etkisinde protein sentezinin rolünün araştırıldığı Küba'da yapılmış bir çalışmada, bizim çalışmamızla da uyumlu olarak İ/R grubunda hepatoselüler hasarın bulgusu olarak sinüzoidal hiperemik dilatasyon görülmüş ve ozon uygulanan grupta bu hasarın azaldığı gösterilmiştir. Bu çalışmada farklı olarak bir gruba sikloheksimid (CHX) uygulanarak protein sentezi baskılanmış ve ozon+CHX uygulanan grupta ozonun aktive ettiği enzimlerden biri olan SOD aktivitesinin azaldığı gösterilmiştir. [48]

Bir lipit peroksidasyon ürünü ve hepatik hasarın da belirteci olan MDA, çalışmamızda DİR grubunda K ve DK gruplarına göre anlamlı olarak yüksek, ozon uygulanan grupta ise düşük bulunmuştur. Ajamieh ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada da benzer şekilde İ/R grubunda MDA seviyeleri yüksek, ozon uygulanan grupta ise K grubu ile benzer bulunmuştur. Çalışmamızda farklı olarak ozonun İ/R hasarına bağlı MDA seviyelerindeki artışı önlemede faydalı olabileceği gösterilmiş olsa da kontrol grubu seviyelerine düşmemiştir. Bu farklılığın ortaya çıkmasında ozonun uygulama yöntemi, dozu ve uygulanan yol ile birlikte çalışmamızdaki ratların diyabetik olmasının önemli olabileceğini düşünmekteyiz. [48]

Wang ve arkadaşları akciğer İ/R hasarına karşı ozonun koruyucu etkisini göstermişlerdir. Çalışmada, akciğere İ/R uygulanan grupta belirgin ödem, kanama ve alveoler boşluk bütünlüğünün kaybı görülmüş ve ozon uygulanan grupta bu

bulguların azaldığı gösterilmiştir. Bu çalışmada da ozonun Nrf2 aktivitesini arttırarak etki gösterdiği immunohistokimyasal incelemeler ile gösterilmiştir. [49]

Peralta ve arkadaşlarının ratlarda hepatik İ/R hasarı üzerinde ozonun etkisini araştırdıkları çalışmada, bizim çalışmamızla uyumlu olarak, İ/R hasarı oluşturulan grupta karaciğerde geniş ve multipl nekroz alanları, parankimde nötrofil infiltrasyonları görülmüştür. Ozon tedavisi ile bu hasar alanlarının daha minimal ve başlangıç aşamasında olduğu gösterilmiştir. Biyokimyasal olarak karşılaştırıldığında ise çalışmamızla benzer şekilde İ/R ile artan AST ve ALT düzeyleri ozon ile belirgin şekilde düşmüştür. [50]

Öztosun ve arkadaşlarının renal İ/R hasarında ozonun etkisini araştırdığı çalışmada, ozon uygulanan rat grubunda renal hasarın azaldığı gösterilmiştir ve ozonun immunmodülatör ve antioksidan etkisi olduğu sonucuna varılmıştır. Çalışmada lipit peroksidasyonunu gösteren MDA düzeyi, çalışmamızla benzer olarak İ/R oluşturulan modelde yüksek, ozon tedavisi uygulanan grupta ise düşük bulunmuştur. [51] Renal İ/R hasarına ozonun etkisinin araştırıldığı bir diğer çalışma olan Chen ve arkadaşlarının çalışmasında da ozonun böbrekteki İ/R hasarını azalttığı gösterilmiştir.

Evelson ve arkadaşlarının yaptığı, diyabetik ratlarda oksidatif stresin ve karaciğer üzerine etkilerinin incelendiği bir çalışmada diyabetin uygulandığı gruplarda karaciğer mikroskopik olarak değerlendirildiğinde perisentral ven etrafında sinüzoidal dilatasyon görülmüştür. [52] Yine Porepa ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada diyabeti olan bireylerde karaciğer hastalığı gelişme riski yüksek

bulunmuştur ve ‘diyabetik hepatopati’ olarak değerlendirilmiştir. [53] Bizim çalışmamızda DK grubunda karaciğerde hasar belirteci olarak histopatolojik değişiklikler görülse de kontrol grubu ile benzer bulundu. Bu durum, diyabet oluşturduğumuz ratların 1 aylık bakım süresinin karaciğer hasarının belirginleşmesi için yetersiz olabileceğini ve/veya kan şekeri regülasyonu için zaman zaman insülin tedavisi uygulayarak hiperglisemi kontrol altında tutmanın belirgin hasarı önleyebileceğini düşündürmektedir. Yine Kanter ve arkadaşları tarafından diyabetin miyokard üzerinde oluşturduğu oksidatif hasarda egzersizin olumlu etkisinin araştırıldığı bir çalışmada diyabet oluşturulan ratlarda kontrol grubuna göre miyokarda dejeneratif değişiklikler görülmüştür. [54]

Diyabet ile oksidatif stres birbiriyle ilişkili durumlardır. Hiperglisemi; ROS artışına neden olur ve renal glomerulus, retina, periferik sinirler, kardiyovasküler sistem, beyin ve alt ekstremitte arteriyel sisteminde diyabet ilişkili patolojilerin oluşumuna neden olur. Ozonun endojen antioksidan sistem üzerine etki ederek diyabet ilişkili oksidatif hasarı ve komplikasyonlarını azaltabileceği ile ilgili çalışmalar yapılmıştır. Bunlardan biri Martinez ve arkadaşlarının yaptığı STZ ile diyabet oluşturulan ratlarda ozonun pankreas hasarına karşı koruyucu etkisini araştırdıkları çalışmadır. Ozon uygulanan grupta pankreas adacıklarındaki hasarın ve beta hücre kaybının tedavisiz diyabetik gruba göre daha az olduğu gösterilmiştir.[55] Bu konuda yapılmış bir diğer çalışmada Morsy ve arkadaşları diyabetik nefropatide ozonun oksidatif hasar belirteçlerini iyileştirdiğini göstermişlerdir. Çalışma süresini 6 hafta olarak belirlemişlerdir ve bu sürenin diyabetik komplikasyonların belirgin hale gelmesi için uygun olduğunu

göstermişlerdir.[56] Biz araştırmamızda, yapılan bu tür çalışmaları da baz alarak İ/R ve diyabetin oksidatif hasar oluşturma yönünden birbirini potansiyelize edeceğini öngörerek bu iki durumu birlikte değerlendirdik. Ozonun diyabetik olan ratlarda karaciğer İ/R hasarı üzerindeki etkisine odaklandık ve ozonun doğrudan diyabet üzerine etkisini görebilmek için gereken diyabet-ozon grubu çalışmamızda mevcut değildi.

Koroner arter hastalığı diyabetin majör komplikasyonlarındanır. Diyabetik miyokard İ/R modeli oluşturulan Gülcan ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, ozonun miyokard hasarı üzerinde iyileştirici etkisi olduğu ileri sürülmüştür. 4 haftalık bir çalışma süresi olan ve bu süre boyunca insülin tedavisi de alan ratların kullanıldığı çalışmada miyokard hasar belirteçlerinin ozon ile azaldığı gösterilmiştir. Bu bulgular ozonun karaciğer hasarını azalttığını gösterdiğimiz çalışmamızın bulguları ile uyumludur. [57]

Önal ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, ratlarda intestinal İ/R modeli oluşturmuşlardır ve bunun öncesinde profilaktik ozon tedavisi uygulamışlardır. Bu çalışmada ozonun intestinal mukoza üzerindeki hasarı azalttığını göstermişlerdir. Bu araştırmadaki biyokimyasal verileri çalışmamızla karşılaştırdığımızda benzer olarak CAT enzim düzeylerinin İ/R uygulanan grupta en yüksek, ozon uygulanan grupta ise en düşük olduğunu görmekteyiz. Farklı olarak Önal ve arkadaşlarının çalışmasında MDA düzeylerinde anlamlı bir farklılık görülmemiştir. [60]

6. SONUÇ

Karaciğer naklinde ve diğer karaciğer cerrahilerinde görülen komplikasyonlardan biri İ/R hasarıdır. Bu hasar hem hipoksiden hem de süperoksit, hidrojen peroksit ve hidroksi radikalleri gibi ROS üretimi, Kupffer hücreleri aktivasyonu ve sitokin salınımından kaynaklanan donör organına verilen hasar demektir ve hücresele nekroza yol açar. Bu durum daha sonra hastalarda bölgesel doku hasarının daha da şiddetlenmesine neden olacak metabolik asidoz, hiperkalemi gibi elektrolit bozuklukları, myoglobinemide gibi ciddi sorunlara yol açar. İ/R hasarı; bu hastalarda, hipoksi ve şok durumlarında ve deney hayvanı modellerinde bir dizi karmaşık mekanizma ile sistemik ve hemodinamik bozukluklara neden olur. Çalışmamızda diyabetik ratlarda karaciğer İ/R hasarında ozonun etkisini araştırdık.

Çalışmamızda STZ uygulayarak diyabet oluşturduktan sonra etkilerinin görülmesi için 1 ay ratların bakımları sağlandı. 1 ay sonunda ilgili gruba ozon tedavisi verildikten 1 saat sonra karaciğerde porta hepatise klemp konularak 60 dk iskemi 60 dk reperfüzyon süresi sonunda karaciğer dokusu çıkarılarak biyokimyasal ve histopatolojik incelemeler yapıldı.

İncelemeler sonucunda diyabetik ratların karaciğer dokusundaki hasar belirteçlerinin ozon tedavisi ile iyileşebileceği görüldü. Bu konuda yapılmış diğer çalışmalar gibi çalışmamızın literatüre katkıda bulunabileceğini düşünmekteyiz. Klinik olarak hastalarda, karaciğer ilişkili cerrahilerde ya da karaciğerde İ/R

hasarına neden olabilecek diğer patolojik olaylarda, diyabeti olan hastalarda karaciğer ilişkili patolojilerde ozonun profilakside ve tedavide etkin olarak kullanılabilmesi için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.



7. KAYNAKÇA

1. Ohiagu, F.O., P.C. Chikezie, and C.M. Chikezie, *Pathophysiology of diabetes mellitus complications: Metabolic events and control*. Biomedical Research and Therapy, 2021. **8**(3): p. 4243-4257.
2. Menendez-Cepero, S., et al., *Ozone Therapy in diabetes and its complications*. Journal of Ozone Therapy, 2018. **2**(2).
3. Şengel, N., et al., *The Effect of Sevoflurane and Fullerenol C 60 on the Liver and Kidney in Lower Extremity Ischemia-Reperfusion Injury in Mice with Streptozocin-Induced Diabetes*. Int J Nanomedicine, 2023. **18**: p. 7543-7557.
4. Küçük A, A.M., *Deneysel İskemi Reperfüzyon Modelleri*. 2021: Akademisyen Kitabevi.
5. Di Paolo, N., V. Bocci, and E. Gaggiotti, *Ozone therapy*. The International journal of artificial organs, 2004. **27**(3): p. 168-175.
6. Liu, L., et al., *Ozone therapy for skin diseases: Cellular and molecular mechanisms*. International wound journal, 2023. **20**(6): p. 2376-2385.
7. Orakdogan, M., et al., *The effect of ozone therapy on experimental vasospasm in the rat femoral artery*. Turk Neurosurg, 2016. **26**(6): p. 860-865.
8. Vigneshwar, R., et al., *Sex-specific reference intervals for Wistar albino rats: hematology and clinical biochemistry*. Indian Journal of Animal Health, 2021. **60**(1): p. 58-65.
9. Krubaa, P. and P.S. Yogitha, *Albino Wistar Rats: Advantages and Limitations in Biomedical Research*. SBV Journal of Basic, Clinical and Applied Health Science, 2024. **7**(2): p. 61-65.

10. Arslan M, A.E., Özer A, *Bilimsel Araştırmalarda Laboratuvar Hayvanları & Deneysel Modeller*. 2023: Akademisyen Kitabevi.
11. Eleazu, C.O., et al., *Review of the mechanism of cell death resulting from streptozotocin challenge in experimental animals, its practical use and potential risk to humans*. Journal of diabetes & metabolic disorders, 2013. **12**: p. 1-7.
12. Lenzen, S., *The mechanisms of alloxan-and streptozotocin-induced diabetes*. Diabetologia, 2008. **51**(2): p. 216-226.
13. Müller, V., et al., *Sexual dimorphism in renal ischemia-reperfusion injury in rats: possible role of endothelin*. Kidney international, 2002. **62**(4): p. 1364-1371.
14. Kher, A., et al., *Cellular and molecular mechanisms of sex differences in renal ischemia–reperfusion injury*. Cardiovascular research, 2005. **67**(4): p. 594-603.
15. Nastos, C., et al., *Global consequences of liver ischemia/reperfusion injury*. Oxidative medicine and cellular longevity, 2014. **2014**(1): p. 906965.
16. Dalda, Y., et al., *The Effect of Pringle Maneuver Applied during Living Donor Hepatectomy on the Ischemia-Reperfusion Injury Observed in the Donors and Recipients*. Medicina, 2024. **60**(4): p. 649.
17. Karatzas, T., et al., *Rodent models of hepatic ischemia–reperfusion injury: time and percentage-related pathophysiological mechanisms*. Journal of Surgical Research, 2014. **191**(2): p. 399-412.
18. Dorweiler, B., et al., *Ischemia-reperfusion injury: pathophysiology and clinical implications*. European Journal of Trauma and Emergency Surgery, 2007. **33**: p. 600-612.
19. Cowled P, F.R., *Pathophysiology of Reperfusion Injury*, in *Mechanisms of Vascular Disease: A Reference Book for Vascular Specialists [Internet]*, T.M. Fitridge R, Editor. 2011, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK534267/>: University of Adelaide Press.

20. Teoh, N.C. and G.C. Farrell, *Hepatic ischemia reperfusion injury: pathogenic mechanisms and basis for hepatoprotection*. Journal of gastroenterology and hepatology, 2003. **18**(8): p. 891-902.
21. de Sire, A., et al., *Oxygen–Ozone therapy in the rehabilitation field: state of the art on mechanisms of action, safety and effectiveness in patients with musculoskeletal disorders*. Biomolecules, 2021. **11**(3): p. 356.
22. Nogales, C.G., et al., *Ozone therapy in medicine and dentistry*. J Contemp Dent Pract, 2008. **9**(4): p. 75-84.
23. Bocci, V., et al., *The ozone paradox: ozone is a strong oxidant as well as a medical drug*. Medicinal research reviews, 2009. **29**(4): p. 646-682.
24. Maslennikov, O.V., C.N. Kontorshchikova, and I.A. GRIBKOVA, *Ozone therapy in Practice*. Health Manual, Ministry Health Service of The Russian Federation The State Medical Academy Of Nizhny Novgorod, Russia, 2008.
25. Elvis, A. and J. Ekta, *Ozone therapy: A clinical review*. Journal of natural science, biology, and medicine, 2011. **2**(1): p. 66.
26. Bocci, V. and V. Bocci, *The clinical application of ozonotherapy*. OZONE: A new medical drug, 2011: p. 97-232.
27. Viebahn-Hänsler, R., O.S. León Fernández, and Z. Fahmy, *Ozone in medicine: the low-dose ozone concept—guidelines and treatment strategies*. Ozone: science & engineering, 2012. **34**(6): p. 408-424.
28. Viebahn-Haensler, R. and O.S. León Fernández, *Ozone in medicine. The low-dose ozone concept and its basic biochemical mechanisms of action in chronic inflammatory diseases*. International Journal of Molecular Sciences, 2021. **22**(15): p. 7890.
29. Shoemaker, J.M., *Ozone therapy: History, physiology, indications, results*. Nottingham, PA, 2005. **114**.

30. Viebahn-Hänsler, R., O.S. León Fernández, and Z. Fahmy, *Ozone in medicine: clinical evaluation and evidence classification of the systemic ozone applications, major autohemotherapy and rectal insufflation, according to the requirements for evidence-based medicine*. *Ozone: Science & Engineering*, 2016. **38**(5): p. 322-345.
31. Cole, J.B. and J.C. Florez, *Genetics of diabetes mellitus and diabetes complications*. *Nature reviews nephrology*, 2020. **16**(7): p. 377-390.
32. Saeedi, P., et al., *Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas*. *Diabetes research and clinical practice*, 2019. **157**: p. 107843.
33. Alam, S., et al., *Diabetes Mellitus: insights from epidemiology, biochemistry, risk factors, diagnosis, complications and comprehensive management*. *Diabetology*, 2021. **2**(2): p. 36-50.
34. Galicia-Garcia, U., et al., *Pathophysiology of type 2 diabetes mellitus*. *International journal of molecular sciences*, 2020. **21**(17): p. 6275.
35. Giacco, F. and M. Brownlee, *Oxidative stress and diabetic complications*. *Circulation research*, 2010. **107**(9): p. 1058-1070.
36. Oguntibeju, O.O., *Type 2 diabetes mellitus, oxidative stress and inflammation: examining the links*. *International journal of physiology, pathophysiology and pharmacology*, 2019. **11**(3): p. 45.
37. Targher, G., A. Lonardo, and C.D. Byrne, *Nonalcoholic fatty liver disease and chronic vascular complications of diabetes mellitus*. *Nature reviews endocrinology*, 2018. **14**(2): p. 99-114.
38. Pisoschi, A.M., et al., *Oxidative stress mitigation by antioxidants-an overview on their chemistry and influences on health status*. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2021. **209**: p. 112891.

39. Jomova, K., et al., *Reactive oxygen species, toxicity, oxidative stress, and antioxidants: Chronic diseases and aging*. Archives of toxicology, 2023. **97**(10): p. 2499-2574.
40. Lichtenberg, D. and I. Pinchuk, *Oxidative stress, the term and the concept*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2015. **461**(3): p. 441-444.
41. Demirci-Cekic, S., et al., *Biomarkers of oxidative stress and antioxidant defense*. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 2022. **209**: p. 114477.
42. Jomova, K., et al., *Several lines of antioxidant defense against oxidative stress: antioxidant enzymes, nanomaterials with multiple enzyme-mimicking activities, and low-molecular-weight antioxidants*. Archives of Toxicology, 2024. **98**(5): p. 1323-1367.
43. Yan, F., et al., *A trifunctional enzyme with glutathione S-transferase, glutathione peroxidase and superoxide dismutase activity*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, 2008. **1780**(6): p. 869-872.
44. Ito, F., Y. Sono, and T. Ito, *Measurement and clinical significance of lipid peroxidation as a biomarker of oxidative stress: oxidative stress in diabetes, atherosclerosis, and chronic inflammation*. Antioxidants, 2019. **8**(3): p. 72.
45. Gultekin, F.A., et al., *Effects of ozone oxidative preconditioning on liver regeneration after partial hepatectomy in rats*. Journal of Investigative Surgery, 2013. **26**(5): p. 242-252.
46. Tüfek, A., et al., *The protective effects of dexmedetomidine on the liver and remote organs against hepatic ischemia reperfusion injury in rats*. International journal of surgery, 2013. **11**(1): p. 96-100.
47. Meng, W., et al., *Ozone protects rat heart against ischemia-reperfusion injury: A role for oxidative preconditioning in attenuating mitochondrial injury*. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2017. **88**: p. 1090-1097.

48. Ajamieh, H.H., et al., *Role of protein synthesis in the protection conferred by ozone-oxidative-preconditioning in hepatic ischaemia/reperfusion*. *Transplant international*, 2005. **18**(5): p. 604-612.
49. Wang, Z., et al., *Ozone protects the rat lung from ischemia-reperfusion injury by attenuating NLRP3-mediated inflammation, enhancing Nrf2 antioxidant activity and inhibiting apoptosis*. *European Journal of Pharmacology*, 2018. **835**: p. 82-93.
50. Peralta, C., et al., *Protective effect of ozone treatment on the injury associated with hepatic ischemia-reperfusion: Antioxidant-prooxidant balance*. *Free Radical Research*, 1999. **31**(3): p. 191-196.
51. Oztosun, M., et al., *The effects of medical ozone therapy on renal ischemia/reperfusion injury*. *Renal failure*, 2012. **34**(7): p. 921-925.
52. Evelson, P., et al., *Hepatic morphological changes and oxidative stress in chronic streptozotocin-diabetic rats*. *Annals of hepatology*, 2005. **4**(2): p. 115-120.
53. Porepa, L., et al., *Newly diagnosed diabetes mellitus as a risk factor for serious liver disease*. *Cmaj*, 2010. **182**(11): p. E526-E531.
54. Kanter, M., et al., *Effects of low intensity exercise against apoptosis and oxidative stress in Streptozotocin-induced diabetic rat heart*. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*, 2017. **125**(09): p. 583-591.
55. Martínez, G., et al., *Ozone treatment reduces blood oxidative stress and pancreas damage in a streptozotocin-induced diabetes model in rats*. *Acta Farmaceutica Bonaerense*, 2005. **24**(4): p. 491.
56. Morsy, M.D., W.N. Hassan, and S.I. Zalat, *Improvement of renal oxidative stress markers after ozone administration in diabetic nephropathy in rats*. *Diabetology & Metabolic Syndrome*, 2010. **2**(1): p. 29.

57. Gülcan, M.B., et al., *Ozone Administration Reduces Myocardial Ischemia Reperfusion Injury in Streptozotocin Induced Diabetes Mellitus Rat Model*. Drug Design, Development and Therapy, 2024. **18**(null): p. 4203-4213.
58. Aebi H. Catalase. In: H.U.Bergmeyer (Ed): *Methods of Enzymatic Analysis*, Academic Press , New York and London, 1974; pp.673-677.
59. Van Ye TM, Roza AM, Pieper GM, Henderson J Jr, Johnson JP, Adams MB. Inhibition of intestinal lipid peroxidation does not minimize morphological damage. *J Surg Res* 1993; 55:553-558.
60. Onal Ozkan, Yetisir Fahri, et al., *Prophylactic Ozone Administration Reduces Intestinal Mucosa Injury Induced by Intestinal Ischemia-Reperfusion in the Rat*. *Mediators of inflammation*, 2015. 1466-1861: p. **792016**

8. ÖZET

Amaç: Bu çalışmada, diyabetiklerde İ/R hasarının en çok etkilediği organlardan olan karaciğerde ozon tedavisinin etkilerini araştırmayı amaçladık.

Gereç ve Yöntem: Bu çalışmada 30 adet Wistar albino rat kullanıldı. Ratlar diyabet uygulanmayan kontrol grubu (K) (n=6) ve diyabet oluşturulan DK (n=8), DİR (n=8), DİR-O (n=8) olarak rastgele 4 gruba ayrıldı. Bu ratlardan 24 tanesine 55 mg/kg İP STZ verildi ve diyabet oluşturuldu. Diyabetin organlar üzerindeki etkisini görebilmek için 1 ay beklendi. 1 ay sonunda DİR ve DİR-O gruplarına karaciğerde İ/R hasarı oluşturuldu. DİR-O grubuna İ/R hasarı oluşturulmadan 1 saat önce intraperitoneal ozon-oksijen karışımı 0.7 mcg/kg (50 mcg/ml) verildi. Daha sonra tüm gruplar derin anestezi altında intraabdominal aortadan kan alınması yöntemi ile sakrifiye edilerek karaciğer dokuları çıkartıldı ve histopatolojik ve biyokimyasal incelemeye gönderildi. Doku örnekleri, histopatolojik değerlendirme yapılmaya kadar %10'luk formaldehid solüsyonu içinde saklandı. Biyokimyasal değerlendirme yapmak için ise -70 derecede saklandı.

Bulgular: Karaciğer histopatolojik incelemesinde; hidropik dejenerasyon, sinüzoidal dilatasyon, nekroza giden hücreler ve parankimde mononükleer hücre infiltrasyonu gruplar arasında anlamlı olarak farklı bulundu. DİR grubunda bu

bulgular D ve DK grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek, DİR-O grubunda ise daha düşük bulundu. Piknotik çekirdek gruplar arasında benzer bulundu.

Sonuç: Çalışmamızda diyabetin ve İ/R hasarının karaciğer üzerindeki yıkıcı etkilerinin ozon tedavisi ile önlenebileceğini gösterdik. Klinik olarak ozon tedavisinin etkin dozda ve yöntemle uygulanabilmesi için daha fazla çalışmaya ihtiyaç olduğunu düşünmekteyiz.



9. SUMMARY

Objective: In this study, we aimed to investigate the effects of ozone therapy on the liver, which is one of the organs most affected by I/R damage in diabetics.

Material and Method: In this study, 30 Wistar albino rats were used. Rats were randomly divided into 4 groups as the control group (C) (n=6) without diabetes and the DK (n=8), DIR (n=8), and DIR-O (n=8) groups with diabetes. 24 of these rats were given 55 mg/kg IP STZ and diabetes was induced. It was waited for 1 month to see the effects on the organs of diabetes. At the end of 1 month, ischemia reperfusion injury was induced in the liver in DIR and DIR-O groups. DIR-O group was given intraperitoneal ozone-oxygen mixture 0.7 mcg/kg (50 mcg/ml) 1 hour before the I/R injury was created. Then, all groups were sacrificed under deep anesthesia by taking blood from the intra-abdominal aorta, and liver tissues were removed and sent for histopathological and biochemical examination. Tissue samples were stored in 10% formaldehyde solution until histopathological evaluation. They were stored at -70 degrees for biochemical evaluation.

Results: In histopathological examination of the cells; hydropic degeneration, sinusoidal dilatation, necrosis and mononuclear cell infiltration in the parenchyma were found to be significantly different between the groups.

These findings were found to be significantly higher in the DIR group than in the D and DK groups and it was found to be lower in the DIR-O group.

Conclusion: Our study showed that the destructive effects of diabetes and I/R damage on the liver can be prevented with ozone therapy. We believe that further studies are needed to clinically apply ozone therapy in an effective dose and method.

Key words: Diabetes Mellitus, Ischemia Reperfusion, Ozone, Liver

10.EKLER

Evrak Tarih ve Sayısı: 21.12.2023-E.832501



T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı



Sayı : E-66332047-604.01.02-832501
Konu : Değerlendirme ve Onay

21.12.2023

Sayın Doç. Dr. Gülay KİP
Anesteziyoloji ve Reanimasyon Anabilim Dalı Başkanlığı - Öğretim Üyesi

Araştırmacı grubu Gülay KİP, Bilge DEMİRTAŞ, Aydın YAVUZ, Şaban Cem SEZEN, Ayşegül KÜÇÜK, Mustafa KAVUTÇU, Seda GÖKGÖZ ACAR VE Mustafa ARSLAN'dan oluşan, G.Ü.ET-23.114 kod numaralı ve "*Streptozotosin ile Diyabet Oluşturulan Ratlarda, Karaciğer İskemi Reperfüzyon Hasarında Ozonun Koruyucu Etkisi*" başlıklı araştırma öneriniz incelenmiş ve Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Yönergesindeki ilkelere uygun olduğu saptanarak onaylanmasına oybirliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi rica ederim.

It is unanimously approved that the research project numbered G.Ü.ET-23.114 and entitled "*Protective Effect of Ozone on Liver Ischemia-Reperfusion Injury in Streptozotocin-Induced Diabetic Rat*" is in compliance with Gazi University Animal Experiments Local Ethics Committee regulations.

With my best regards.

Hayvan Türü : Rat Wistar
Hayvan Sayısı : 38

Prof. Dr. Mustafa ARSLAN
Kurul Başkanı

Ek:1 Liste

Belge Doğrulama Kodu :BSDHHYDK2Z

Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

Belge Takip Adresi : <https://www.turkiye.gov.tr/gazi-universitesi-ebys>

Emniyet Mahallesi Bandırma Caddesi No :6/1 06560 Yenimahalle/ANKARA
Tel:0 (312) 202 20 57 - 0 (312) 2... Faks:0 (312) 202 38 76
e-Posta :hadyek@gazi.edu.tr İnternet Adresi :http://hadyek.gazi.edu.tr/
Kep Adresi: gaziuniversitesi@hs01.kep.tr

Bilgi için :Nursel Güner
Genel Evrak Sorumlusu
Telefon No:202 20 57



Bu belge,güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

Evrak Tarih ve Sayısı: 21.12.2023 E.832501

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU TOPLANTI KATILIM
LİSTESİ

TOPLANTI TARİHİ : 17/11/2023

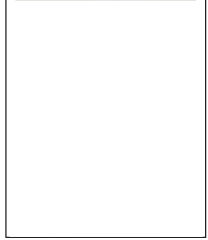
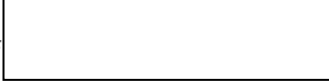
TOPLANTI SAYISI : 11

ADI-SOYADI
Prof.Dr.Mustafa ARSLAN (Başkan)
Prof.Dr.Mürşide Ayşe DEMİREL (Başkan Yrd.)
Prof.Dr.İlker ŞEN
Prof.Dr.Mustafa KAVUTÇU
Prof.Dr.Emin Ümit BAĞRIACIK
Prof.Dr.İpek SÜNTAR
Prof.Dr.Serkan YAVUZ
Prof.Dr.Şule COŞKUN CEVHER
Prof.Dr.Fatma Gökçe APAYDIN
Prof.Dr.Elvan ANADOL

Doç.Dr.Yeliz KILINÇ
Doç.Dr.Zeliha Aycan ÖZDEMİRKAN
Doç.Dr. Duygu AĞAGÜNDÜZ
Dr.Öğr.Üyesi Şevki Mustafa DEMİRÖZ
Dr.Öğr.Üyesi Sühan GÜRBÜZ
Dr.Öğr.Üyesi Zeynep YIĞMAN
Dr.Öğr.Üyesi Nur Banu BAL
Öğr.Gör.Dr.Burcu EKİM
Öğr.Gör.Dr. Beyza AYDOĞAN
Vet.Hek.Burcu AVCI
Osman İÇ

Bu belge,güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

11.ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı / Name, Surname : Bilge DEMİRTAŞ		
Doğum Yeri ve Tarihi / Place of Birth and Date : 		
Bitirdiği Lise ve Tarihi / Completed High School and Date : İçel Anadolu Lisesi / 2009-2013		
Bitirdiği Fakülte, Başlama ve Bitirme Tarihi / Graduated Faculty, Start and Graduation Date : Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi / 2013-2019		
Mesleki Deneyimi / Professional Experience	Nevşehir Devlet Hastanesi Acil Servis Pratisyen Hekim Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon Arş. Gör. Dr.	
Katılımcısı Olduğu Araştırmalar / Participated Researches	Yok	
Yayınlanmış Araştırmalar / Published Researches	Yok	
Katıldığı Ulusal Kongreler, Ödüller / Attended National Congresses, Awards	TARK	
Katıldığı Uluslararası Kongreler / Attended International Congresses	Yok	
Katıldığı Kurslar / Courses Attended a) Ulusal Kurslar / National Courses b) Uluslararası Kurslar / International Courses	TARD Asistan Okulu TARK Düşük Akım Anestezi Kursu Ocak 2020 Klinik Uygulamalarda USG Kursu Mart 2022 Klinik Ultrasonografi Kursu CEEA Modül Solunum ve Toraks Kursu 2022 Hayvan Deneyleri Kursu 2023 İleri Arter Kan Gazı Kursu 2023 Deneysel İskemi Reperfüzyon Modelleri Kursu 2024 TARK CRRT Kursu	
Tez Danışmanı / Thesis Advisor	Doç Dr. Gülay Kip	
Tez Konusu (Belirlenmiş ise) / Thesis Topic	Streptozotosin ile diyabet oluşturulan ratlarda karaciğer iskemisi reperfüzyon hasarında ozonun koruyucu etkisi	
Participating ERASMUS	Yok	