

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

STREPTOZOTOSİN İLE DİYABET OLUŞTURULAN FARELERDE
ÇEKAL PERFORASYON SONUCU GELİŞEN SEPSİS TEDAVİSİNDE
OZON'UN KALP VE AKCİĞER DOKUSU ÜZERİNE
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

UZMANLIK TEZİ
DR. BİLGİN HASRET ŞİMŞEK

TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. NURTEN İNAN

ANKARA
EYLÜL 2024

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

STREPTOZOTOSİN İLE DİYABET OLUŞTURULAN FARELERDE
ÇEKAL PERFORASYON SONUCU GELİŞEN SEPSİS TEDAVİSİNDE
OZON'UN KALP VE AKCİĞER DOKUSU ÜZERİNE
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

UZMANLIK TEZİ
DR. BİLGİN HASRET ŞİMŞEK

TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. NURTEN İNAN

ANKARA
EYLÜL 2024

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER.....	I
KISALTMALAR.....	III
TABLOLAR DİZİNİ.....	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VII
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Havan Deneylerinde Farelerin Kullanımı	4
2.2. Farelerde Diyabet	7
2.2.1. Streptozosin	8
2.2.2. Etki mekanizması	9
2.2.3. Uygulama şekli.....	10
2.3. Farelerde Sepsis.....	12
2.4. Ozon.....	14
2.4.1. Ozonun Tarihçesi	14
2.4.2. Ozonun Yapısal Özellikleri	15
2.4.3. Medikal Ozonun Üretilme Yöntemi	16
2.4.4. Ozonun Uygulanma Yöntemleri	17
2.4.5. Ozonun etki mekanizması.....	21
2.4.6. Ozon tedavisinin kullanıldığı hastalıklar.....	25
2.4.7. Ozon tedavisinin kontrendikasyonları	27
2.5. Diyabetes Mellitus	28
2.5.1. Diyabetin Epidemiyolojisi.....	30
2.5.2. Diyabetin Patofizyolojisi.....	30
2.5.3. Diyabetin Akciğer Üzerine Etkisi.....	33
2.5.4. Diyabetin Kalp Üzerine Etkisi	34
2.6. Sepsis.....	37
2.6.1. Sepsisin Patofizyolojisi	40
2.6.2. Sepsisin Kalbe Etkisi	42
2.6.3. Sepsisin Akciğere Etkisi.....	43
2.6.4. Diyabetiklerde Sepsis.....	45
2.7. Oksidatif stres.....	46
2.7.1. Diyabette oksidatif stres.....	47

2.7.2.	<i>Sepsiste oksidatif stres</i>	50
2.7.3.	<i>Kalpte oksidatif stres</i>	52
2.7.4.	<i>Akciğerde oksidatif stres</i>	54
2.8.	Antioksidan Savunma Sistemleri	55
2.8.1.	<i>Süperoksit Dismutaz (SOD)</i>	57
2.8.2.	<i>Katalaz (CAT)</i>	58
2.9.	Malondialdehit (MDA)	59
3.	GEREÇ VE YÖNTEM	61
3.1.	Denek Seçimi	61
3.2.	Kullanılan İlaç	61
3.3.	Kullanılan Yöntem	62
3.3.1.	<i>Diyabetin Oluşturulması</i>	62
3.3.2.	<i>Sepsisin Oluşturulması</i>	63
3.4.	Deney Grupları	63
3.5.	Dokuların Saklanması	67
3.6.	Histopatolojik İnceleme	67
3.6.1.	<i>Akciğer Dokusunun Histopatolojik İncelemesi</i>	67
3.6.2.	<i>Kalp Dokusunun Histopatolojik İncelemesi</i>	68
3.7.	Biyokimyasal İnceleme	68
3.8.	İstatiksel Değerlendirme	68
4.	BULGULAR	69
5.	TARTIŞMA	83
6.	SONUÇ	98
7.	ÖZET	99
8.	SUMMARY	101
9.	KAYNAKLAR	103

KISALTMALAR

- AA:** Araşidonik asit
- ACE:** Anjiotensin dönüştürücü enzim
- AGE:** İleri glikasyon son ürünleri
- AHT:** Major ozon otohomeoterapi
- ALI:** Akut akciğer hasarı
- Ang II:** Anjiyotensin II
- ARDS:** Akut solunum sıkıntısı sendromu
- ARE:** Antioksidan yanıt elementleri
- BOEX:** Oksijen-ozona yarı-toplam vücut maruziyeti
- CAT:** Katalaz
- cGMP:** Siklik guanizin monofosfat
- COX-2:** Siklooksijenaz-2'nin
- Cu-Zn-SOD:** Bakır ve çinko içeren süperoksid dismutaz
- ÇLP:** Çekal bağlama ve delme
- DKM:** Diyabetik kardiyomiyopati
- DM:** Diyabetes mellitus
- 2,3-DPG:** 2,3 Difosfogliserat
- EAD:** Erken afterdepolarizasyon
- EBOO:** Oksijen-ozona karşı vücut dışı kan dolaşımı
- ECM:** Hücre dışı matriks
- EC-SOD:** Ekstrasellüler süperoksit dismutaz
- FFA:** Serbest yağ asitleri
- GLUT-2:** Glukoz transporter-2
- GLUT-4:** Glukoz transporter-4
- GSH-Px:** Glutasyon peroksidaz
- GST:** Glutasyon-S transferaz
- G6PD:** Glikoz-6-fosfat-dehidrogenaz
- HCIO:** Hipokloröz asit
- HO-1:** Hemoksijenaz-1

HSP-70: Isı şok proteini
H₂O₂: Hidrojen peroksit
4-HHE: 4-Hidroksiheksenal
4-HNE: 4-Hidroksinonenal
IDF: Uluslararası Diyabet Federasyonu
iNOS: İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
KVH: Kardiyovasküler hastalık
KY: Kalp yetmezliği
LOP: Lipid ozonlama ürünleri
LPP: Lipit peroksidasyon süreçleri
LPS: lipopolisakkarit
MAO: Monoamin oksidaz
MAP: Ortalama arter basıncını
MDA: Malondialdehit
MMP: Matriks metalloproteinazlar
Mn-SOD: Mitokondrial süperoksit dismutaz
MODS: Çoklu organ yetmezliği sendromu
MRSA: Metisiline dirençli Staphylococcus aureus
NAD: Nikotinamid adenin dinükleotid
NADPH: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NF-κβ: Nüklear faktör kappa-β
NO: Nitrik oksit
NO₂: Nitrik dioksit
NO⁻: Nitroksil anyonu
NOX: NADPH oksidaz
Nrf2: nuclear factor erythroid 2-related factor 2
O₃: Ozon
O₂-O₃: Oksijen- ozon
O₂⁻: Süperoksit anyonu

OH⁻: Hidroksil anyonu
ONOO⁻: peroksinitrit anyonu
PAD: Periferik arter hastalığı
PAF: Trombosit aktive edici faktör
PAI-1: Plazminojen aktivator inhibitörü-1
PDGF: Trombosit kaynaklı büyüme faktörünü
PUFA: Çoklu doymamış yağ asitleri
RAAS: Renin anjiyotensin aldosteron sistemi
RI: Rektal insüflasyonu
RNS: Reaktif nitrojen türleri
ROS: Reaktif oksijen türleri
SDBH: Son dönem böbrek hastalığı
SIRS: Sistemik inflamatuvar yanıt sendromu
SOD: Süperoksit dismutaz
SOFA: Sequential Organ Failure Assessment
STZ: Streptozosin
SV: Atım hacmini
TBARS: Tiyobarbitürik asit reaktif maddeleri
TGF- β : Dönüştürücü büyüme faktörü- β
UV: Ultraviole
VEGF: Vasküler endotelyal büyüme faktörünü
XO: Ksantin oksidaz

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1: Farelerin bazı yaşamsal parametreleri (8)	6
Tablo 2: Farelerde DM oluşturulması için kullanılan STZ'nin dozları(8).....	11
Tablo 3: Sık kullanılan sepsis modellerinde klinik uygulama ve standardizasyon(8).....	12
Tablo 4: Ozon uygulama yolları(23)	17
Tablo 5: Ozonun insanlardaki toksik etkileri(23).....	28
Tablo 6: Diyabetin sınıflandırılması(34).....	29
Tablo 7: Sequential Organ Failure Assessment (SOFA)(44).....	39
Tablo 8: Deney grupları.....	62
Tablo 9: Akciğer dokusu histopatolojik bulguları [Ort ± SH].....	71
Tablo 10: Kalp dokusu histopatolojik bulguları [Ort ± SH]	76
Tablo 11: Akciğer dokusu oksidan durum parametreleri [Ort ± SS]	80
Tablo 12: Kalp dokusu oksidan durum parametreleri [Ort ± SH]	81

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: Swis albino faresi(9)	5
Şekil 2: Bir ozon jeneratörünün şematik görünümü(23).....	17
Şekil 3:AHT bileşenlerinin şematik çizimi (23).....	19
Şekil 4: EBOO modeli	20
Şekil 5: Ozonun eritrosit metabolizması üzerindeki etkisi(26)	23
Şekil 6: Diyabetik kardiyomiyopati patogenezinde oksidatif stres(42)	36
Şekil 7: Oksidatif stresin kalp ritmine etkisi(74).....	54
Şekil 8:PUFA peroksidasyon şeması(28)	60
Şekil 9: Çekal ligasyon ve Çekal delme.....	63
Şekil 10: Grup K; Akciğer dokusu (H&E X40)	72
Şekil 11: Grup D; Akciğer dokusu (H&E X40).....	72
Şekil 12: Grup DO; Akciğer dokusu (H&E X40).....	73
Şekil 13: Grup DÇLP; Akciğer dokusu (H&E X40)	73
Şekil 14: Grup DÇLPO; Akciğer dokusu (H&E X40).....	74
Şekil 15: Grup DOÇLP; Akciğer dokusu (H&E X40).....	74
Şekil 16: Grup K; Kalp dokusu (H&E X40)	77
Şekil 17: Grup D; Kalp dokusu (H&E X40)	77
Şekil 18: Grup DO; Kalp dokusu (H&E X40)	78
Şekil 19: Grup DÇLP; Kalp dokusu (H&E X40)	78
Şekil 20: Grup DÇLPO; Kalp dokusu (H&E X40)	79
Şekil 21: Grup DOÇLP; Kalp dokusu (H&E X40)	79

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Diyabetes mellitus (DM)'nin dünya çapındaki prevalansı son yirmi yılda önemli ölçüde artarak 1985'te tahmini 30 milyon vakadan 2019'da 463 milyona ulaşmıştır ve 2040 yılına kadar 642 milyon bireyin diyabet hastası olacağı öngörülmektedir. DM önemli bir mortalite sebebidir. Son yıllarda diyabet, Amerika Birleşik Devletleri'nde önde gelen yedinci ölüm nedeni olarak listelenmiştir, ancak çeşitli çalışmalar diyabetle ilişkili ölümlerin muhtemelen eksik bildirildiğini göstermektedir(1).

DM'li bireylerde enfeksiyon sıklığı ve şiddeti daha fazladır. Bunun nedenleri arasında, hiperglisemi ile ilişkili hücre aracılı bağışıklık ve fagosit fonksiyonunda tam olarak tanımlanmamış anormalliklerin yanı sıra azalmış vaskülarizasyon da yer almaktadır. Hiperglisemi, çeşitli organizmaların (Candida ve diğer mantar türleri) kolonizasyonuna ve büyümesine yardımcı olur. Birçok yaygın enfeksiyon diyabetik popülasyonda daha sık ve şiddetli görülürken, bazı nadir enfeksiyonlar neredeyse sadece diyabetik popülasyonda görülür(1). Diyabette, 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(2).

Sepsis, enfeksiyona karşı düzensiz konak yanıtının neden olduğu, yaşamı tehdit eden bir organ işlev bozukluğudur. Yaygın klinik özellikler arasında organ işlev bozukluğu ile enfeksiyon belirtileri ve zihin bulanıklığı; takipne,

hipotansiyon, hepatik, renal veya hematolojik işlev bozukluğu yer alır. Son 20 yılda yapılan araştırmalar, birçok hastanın enfeksiyona yanıt olarak akut organ disfonksiyonu geliştirdiğini, ancak ölçülebilir bir inflamatuvar aşırılık olmadığını (yani, sistemik inflamatuvar yanıt sendromu [SIRS] olmadan) ortaya koymuştur. Aslında, diğer yolaklarda önemli değişikliklerle birlikte hem pro- hem de anti-inflamatuvar yanıtlar mevcuttur(1).

Tedavide güncel klinik yaklaşım erken tanı ve kaynağı belirleme ile başlamakta ve erken antibiyotik tedavisi temel taşı oluşturmaktadır. Antibiyotiklerin yanında kortikosteroidler de önemli yer tutmaktadır. Ancak steroidlerin de mortaliteyi ancak %10 azaltabildiği gösterilmiştir. Antibiyotik tedavisi ciddi enfeksiyonlar için çok önemlidir, ancak küresel antibiyotik direnci artmaktadır ve şu anda Dünya Sağlık Örgütü tarafından insanlığın karşı karşıya olduğu ilk on küresel halk sağlığı riskinden biri olarak sınıflandırılmaktadır. Yeni antibakteriyel ajanların geliştirilmesi yetersizdir ve alternatif bakterisit tedavileri arzu edilmektedir(3).

Sepsiste en sık etkilenen organ sistemlerinden ikisi solunum ve kardiyovasküler sistemlerdir. Solunum yetmezliği klasik olarak, şüpheli enfeksiyondan sonraki 7 gün içinde ortaya çıkan hipoksemi ve kardiyak kökenli olmayan bilateral infiltratlar olarak tanımlanan akut solunum sıkıntısı sendromu (ARDS) olarak kendini gösterir. ARDS, Berlin kriterlerine göre hafif (PaO_2/FIO_2 , 201-300 mmHg), orta (101-200 mmHg) veya şiddetli (≤ 100 mmHg) olarak sınıflandırılabilir(1).

Kardiyovasküler tehlike tipik olarak hipotansiyon şeklinde ortaya çıkar. Bunun nedeni açık hipovolemi, yaygın kapiller sızıntı nedeniyle kan akışının ve intravasküler hacmin yanlış dağılımı, azalmış sistemik vasküler direnç veya deprese miyokardiyal fonksiyon olabilir. Yeterli hacim genişlemesinden sonra hipotansiyon sıklıkla devam eder ve vazopressör kullanımını gerektirir. Erken şokta, volüm durumu azaldığında, sistemik vasküler direnç düşük kalp debisi ile oldukça yüksek olabilir; ancak volüm replasmanından sonra bu tablo hızla düşük sistemik vasküler direnç ve yüksek kalp debisine dönüşebilir(1).

Ozon (O_3), döngüsel bir yapıya sahip üç oksijen atomu içeren bir gazdır. Antioksidan stresi indükler ve oksidatif strese karşı direnci artırır ve inflamasyonda antioksidan ajan olarak kullanılmıştır. Oksijen-ozon tedavisinin biyo-oksidatif bir prosedür olduğu bilinmektedir ve düşük doz ozon uygulaması prostaglandin sentezini, bradikinin ve alkojenik maddelerin salınımını ve makrofajlardan ve polimorfonükleer lökositlerden proteinaz salgılanmasını inhibe etmektedir(4). Ozon tedavisi, antioksidan etkiler, immünomodülatör kapasite ve lokal mikro sirkülasyonun modülasyonu gibi karmaşık mekanizmalar yoluyla etki eden, gelişmekte olan bir tedavi stratejisidir(5).

Aslında, oksijen-ozon (O_2 - O_3) tedavisinin etkinliği kısmen O_3 'ün biyolojik bileşenlerle etkileşimi sonucu ortaya çıkan ılımlı oksidatif strese bağlı olabilir. O_2 - O_3 tedavisi, kronik inflamatuvar süreçler ve immün aşırı aktivasyon ile karakterize edilen çeşitli patolojik durumlarda yardımcı bir terapötik seçenek olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır(6).

Diyabette hiperglisemi ile ilişkili hücre aracılı bağışıklık, fagosit fonksiyonunda bozukluk ve hiperglisemiye bağlı oksidatif stresin artmış olması hastaların mortalitesini önemli ölçüde arttırmaktadır. Sepsise bağlı organ yetmezliklerinde mortaliteyi en çok etkileyen iki organ kalp ve akciğerdir. Bu sebeple bu iki organ sistemi üzerindeki inflamatuvar ve oksidatif etkileri azaltmayı amaçladık. Ozonun antiinflamatuvar, antioksidan ve antibakteriyel etkileri bilinmektedir. Kontrollü ozon uygulamasının oksidatif bir ön koşullanmayı veya oksidatif strese adaptasyonu ve direnci artırır. Bu sebeple ozon tedavisi ile sepsisin kalp ve akciğer üzerindeki inflamatuvar etkileri azaltıcı etkileri olup olmadığını araştırmayı amaçladık. Bu çalışmada diyabetik farelerde çekal perforasyon sonrası gelişen sepsis durumunda, intraperitoneal (ip) olarak uygulanan ozon' un kalp ve akciğer dokusunu koruyup korumadığının gösterilmesi ve az sayıdaki literatür çalışmalarına katkı sağlamayı hedefledik.

2. GENEL BİLGİLER

2.1.Havan Deneylerinde Farelerin Kullanımı

Hayvan modeli çalışmaları, insanlardaki klinik deneylerden önce in vivo ortamı simüle ettikleri için her türlü bilimsel çalışmanın kritik bir yönüdür. Bu nedenle, genetik ve biyolojik sistem açısından insana en yakın hayvan modelinin seçilmesi tavsiye edilir. Kemirgenler arasında biyoloji uygulamaları için tercih edilenler farelerdir. Fareler daha yüksek üreme oranına sahiptir ve ayrıca

laboratuvarda kullanımı ve bakımı kolaydır, bu da deneysel hata olasılığını en aza indirir. Fareler ayrıca insanlarla en büyük benzerliğe sahip hayvanlardan biridir, bu da onları insanda olan herhangi bir bozukluğu ve hastalığını modellemek için seçilebilir kılar(7).

Kanser, immünoloji, toksikoloji, metabolizma, gelişme biyolojisi, diyabet, obezite, yaşlanma araştırmalarının yanı sıra hipertansiyon, Hodgkin hastalığı, hemolitik anemi, hidrosefali, adrenal yetmezlik, muskuler distrofi ve koroner aterosklerozis gibi sayısız hastalık modellerinde fareler kullanılmaktadır. Bugün, laboratuvar fareleri modern genetik araştırmalar için de önde gelen model olarak kabul edilmektedir(8).

Genel olarak, tüm Swiss albino fareleri kökenlerinin bulunduğu ülke olan İsviçre'nin adını almıştır. Hepsi 20. yüzyılın başında Lozan'daki Centre Anticancereus Romand'da yetiştirilen hayvanlardan türemiştir. Dışarıda yetiştirilen farelerin çoğu tam olarak bu ortak kökene sahiptir(9).



Şekil 1: Swis albino faresi(9)

Kısa beyaz kürkleri ve kırmızı gözleri, orta derecede büyük kulakları ve az tüylü kuyrukları vardır (Şekil 1). Yetişkin vücut uzunluğu 7,5-10 cm ve kuyruk uzunluğu yaklaşık 5-10 cm'dir. Bir kafeste birden fazla erkek olmadığı sürece sakin bir mizaca sahiptirler. Tüm yaygın davranış kategorilerinin normal özelliklerini gösterirler: a) bakım davranışı (tımar etme, yeme, içme, yuva yapma); b) araştırma/keşif davranışı (tırmanma, kazma, çiğneme, koklama); ve c) sosyal/cinsel davranış (bir araya toplanma, birbirini tımar etme, koku/bölgesel işaretleme, saldırganlık, savunma, cinsel davranış ve sosyal etkileşimler)(9)

Tablo 1: Farelerin bazı yaşamsal parametreleri (8)

Parametreler	Normal Değerler	Ünite
Yetişkin ağırlığı		
Erkek	20-40	gr
Dişi	18-35	gr
Yaşam ömrü	1-3(en fazla 4)	yıl
Günlük su tüketimi	6,7	mL
Günlük yem tüketimi	5,0	gr
Puberte		
Erkek	28-49	gün
Dişi	28-49	gün
Gebelik	19-21	gün
Yavru sayısı	4-12	adet
Doğum ağırlığı	1,0-1,5	gr
Laktasyon süresi	21	gün
Kalp atımı	310-840	atım/dk
Kan basıncı		
Sistolik	133-160	mmHg
Diastolik	102-110	mmHg
Kan volümü		
Plazma	3,15	mL/100 gr
Tam kan	5,85	mL/100 gr
Solunum sayısı	163	Dk'da
Tidal volüm	0,18 (0,09-0,38)	mL

2.2.Farelerde Diyabet

Deney hayvanlarında diyabet oluşturmak için birden çok yöntem kullanılmaktadır. Bunlar:

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 hayvan modellerinde diyabet oluşturulmasında en çok kimyasal ajanlar tercih edilmektedir. Laboratuvar hayvanlarında yaygın olarak alloksan kullanılmaktayken son zamanlarda sıklıkla streptozosin (STZ) maddesi kullanılmaktadır(8).

Diyabet ve komplikasyonlarının incelenmesi için yıllar boyunca ağırlıklı olarak kemirgenlerde olmak üzere çeşitli diyabet hayvan modelleri tanımlanmıştır. Kapsamlı bir şekilde gözden geçirildiği üzere, bunların her biri hastalık patolojisinin farklı yönlerini taklit eder ve model seçimi, çalışma hedefleriyle ilgili klinik yönleri yansıtmalıdır. Farelerde STZ ile indüklenen diyabetin ardından

miyokardda reaktif oksijen türleri (ROS), inflamasyon, fibrozis ve apoptozis seviyelerinde artış rutin olarak görülmektedir. STZ ile indüklenen T1DM fare modeli birçok prelinik bilim insanı için tercih edilen bir model olmaya devam etmektedir(10).

2.2.1. Streptozosin

Streptozotosin (STZ, 2-deoxy-2-(3-(methyl-3nitrosoureido)-D-glucopyranose) Streptomyces achromogenes tarafından sentezlenir ve hem insüline bağımlı hem de insüline bağımlı olmayan diabetes mellitusu indüklemek için kullanılır(11; 12).

STZ antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu gibi kemoterapötik alkilleyici ajan olarak da kullanılabilir. 1963' te Rakieten ve arkadaşları STZ'nin diabetojenik etkilerinin de olduğunu göstermiştir(13). Bu etki Junod ve arkadaşları tarafından, 1969 da diabetojenik etkilerin pankreatik adacık β -hücrelerinin seçici yıkımından kaynaklandığını gösteren daha önceki çalışmalara(14) dayanarak karakterize edilmiştir(15). Bu etkinin bir sonucu olarak hayvanlarda insülin eksikliği, hiperglisemi, polidipsi ve poliüri görülür ki bunların hepsi insan tip 1 DM karakteristik özellikleridir. Fare, rat ve maymun dahil olmak üzere birçok hayvan türü STZ'nin pankreatik β -hücre sitotoksik etkilerine karşı hassastır, tavşan ise daha az hassastır. Günümüzde STZ en sık olarak rat ve farelerde diyabet oluşturmak için kullanılmaktadır(12).

STZ'ye karşı hayvan cinsiyeti duyarlılığı laboratuvar hayvanlarında diyabet gelişimi üzerinde güçlü bir etkisi vardır. Dişiler düşük doz STZ'nin etkilerine direnç

gösterirken, erkeklerin pankreatik adacık β -hücreleri STZ kaynaklı sitotoksositeye dişilerden daha yatkın olduğundan, erkek hayvanlar çalışma için daha popülerdir(16). Erkek farelerin çeşitli türlerde STZ'ye karşı daha hassas olduğu Gurley ve arkadaşları tarafından doğrulanmıştır(17). Bu cinsiyet farkının kesin nedeni tanımlanmamış olsa da östrojenlerin erkek ratların STZ kaynaklı diyabete duyarlılığını azalttığı bilinmektedir(18).

2.2.2. Etki mekanizması

STZ glikoza benzer yapısı nedeniyle pankreatik beta hücrelerine glukoz transporter-2 (GLUT2) aracılığı girip seçici olarak birikir ve insülin sekresyonunu inhibe ederek insüline bağımlı DM oluşumuna neden olur(8; 11). GLUT2 ekspresyonunun azalmasının STZ'nin diyabetojenik etkisini önlediği bulunmuştur(19). 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 neden olur. Bu süreç içerisinde DNA onarımı için aktifleşen mekanizmalar sonucunda nikotinamid adenin dinükleotid (NAD) ve ATP depoları azalır. Dolayısıyla hücresel enerji depolarının tükenmesi beta hücrelerinde nekroza yol açar(8).

Alternatif bir hipotez STZ'nin hücre içi nitrik oksit (NO) donörü olarak davranma potansiyeli ile ilişkili olabileceğini öne sürmektedir. STZ, guanilil siklaz aktivitesini ve siklik guanizin monofosfat (cGMP) oluşumunu arttırarak pankreatik beta hücre hasarına neden olmaktadır(8).

Hipoksantin metabolizması sırasında hidrojen peroksit dismutasyonundan kaynaklanan süperoksit ve hidroksil radikalleri gibi reaktif oksijen türevleri (ROS)'ların oluşumu STZ'nin diğer etkilerine eşlik edebilir ve beta hücre yıkım sürecini hızlandırabilir. Hücresel stres ile aktive olan, hücre ölüm mekanizmalarında ve doğal yolla oluşan tip 1 ve 2 DM patogeneğinde rol oynayan N-Terminal kinazın STZ'nin sebep olduğu beta hücrelerinin ölümünde de önemli bir faktör olduğu düşünülmektedir(8).

2.2.3. Uygulama şekli

STZ ışığa hassas olduğu için -20 C de ve ışıktan korunarak saklanmalıdır. pH 4-4,5'de stabildir. Çözeltisi kullanılmadan hemen önce pH 4,5 olan 0,1 Molar sitrat tamponu içinde taze olarak hazırlanmalı ve ışıktan korunmalıdır(8; 12). STZ asidik pH'da bile çözeltide kararsız olduğundan, enjeksiyondan hemen öncesine kadar sitrat tamponuna karıştırılmamalıdır. STZ çözeltisi taze olarak hazırlanmalı ve çözüldükten sonra 5 dakika içinde enjekte edilmelidir çünkü sitrat tamponunda 15 ila 20 dakika içinde ayrışır(12).

Farelerde STZ ile indüklenmiş diyabet modelleri oluşturmak için iki farklı yöntem seçilebilir. Bunlardan biri, tekrarlanan düşük dozlarda STZ kullanmaktır. Hayvanlara 5 gün boyunca birden fazla düşük dozda STZ verilir. Bu şekilde, ilacın toksik etkilerine maruz kalma azaltılır ve hipergliseminin başlaması geciktirilir. Bir diğeri ise 48 saat içinde tek bir yüksek doz STZ kullanımıdır ve 48 saat içinde tam β -hücre nekrozu ile hızlı bir diyabet modeli sağlar(2). Birden fazla, düşük doz STZ, tek bir yüksek doz STZ'den daha az toksik etkiyle ilişkili olsa da, birçok araştırmacı

diyabetik hayvanlar üretmek için hala tek bir yüksek doz STZ yaklaşımını tercih etmektedir(12). Farelerde DM için kullanım şekli ve dozları tablo 2’de özetlenmiştir.

Tablo 2: Farelerde DM oluşturulması için kullanılan STZ’nin dozları(8)

DM Tipi	Uygulama Şekli	Dozu
Tip 1 DM	i.p.	60-150 mg/kg tek doz
Tip 2 DM	65 mg/kg i.p. + 150 mg/kg i.p. NAD	
Tip 2 DM	40 mg/kg i.p. + 5 hafta süreli yüksek yağlı diyet	
Tip 2 DM	90-100 mg/kg i.p. + 3 hafta süreli yüksek yağlı diyet	

Kimyasal ajanlarla oluşturulan diyabet modellerinde kan glikozunun yanıtları(8):

STZ uygulamasından sonra kan glikoz yanıtlarında trifazik olarak adlandırılan değişiklikler gözlenmektedir.

1.FAZ: İlk geçici hipoglisemik faz; alloxan uygulamasından sonraki ilk 30 dakikada meydana gelen hipoglisemi dönemidir. Glikokinaz inhibisyonu sonucu ATP elde edilememesine bağlı olarak gerçekleştiği düşünülmektedir. STZ glikokinaz enzimini inhibe etmediği için STZ enjeksiyonu sonrasında bu faz yoktur.

2.FAZ: Kimyasal ajanların uygulanmasından 1 saat sonra kan glikoz seviyesinde artış ve insülin seviyesinde düşüş gerçekleşir. 2-4 saat süren bu hiperglisemik faz insülin sekresyonunun inhibisyonundan kaynaklanır.

3.FAZ: Hipoglisemi ile seyreden bu faz kimyasal ajanların uygulanmasından 4-8 saat sonra ortaya çıkar. Çok şiddetli seyreterek ölümlere sebep olabilir. Beta hücrelerin ölümü sonrasında içeriğindeki insülin dolaşıma geçmesi nedeniyle olduğu düşünülmektedir.

4.FAZ: Diyabetik hipergliseminin kalıcı hale geçtiği fazdır. Beta hücre bütünlüğünün kaybolduğu 12-48 saatin sonunda görülür.

2.3.Farelerde Sepsis

Hayvan modellerinde indüklenmiş modellere en iyi örnek sepsis modelleridir. Bu modelde amaç oluşturulan hastalığı hedef organizmada görülenlere benzer kılmaktır. İnsanlarda kan dolaşımı enfeksiyonları ile ilişkili sepsis tablosunu hayvanlarda deneysel oluşturmak mümkündür(8).

Tablo 3:*Sık kullanılan sepsis modellerinde klinik uygulama ve standardizasyon(8)*

Model	Klinik uyarılama	Standardizasyon
Çekal ligasyon ve delinmesi (ÇLP)	Çok iyi	Çok zor
Fekal inokulum	İyi	Zor
Havuzlanmış fekal inokulum	İyi	Çok zor
Kültür üretimi bakteri peritonit	Orta	Kolay
Bakteri ile fibrin pıhtısı	İyi	Kolay
Bakterinin infüzyon modeli	Kötü	Kolay
Lipopolisakkarit	Kötü	Kolay

ÇLP yöntemi, in vivo sepsis modellemesi için yaygın olarak kullanılan bir prosedürdür. Çekum bakterilerle dolu olduğundan, delinmesi polimikrobiyal peritonit, bakterilerin kana karışması (bakteriyemi), septik şok, çoklu organ disfonksiyonu ve nihayetinde ölümle sonuçlanır. Fekal materyal çekuma redükte edildikten sonra ilioçekal valfin altından bağlanır. 20 G iğne ile iki delik açılır ve fekal materyalin dışarıya çıkması sağlanır. Ayrıca bilinen bir mikroorganizma ya da fekal materyalin intraperitoneal inokülasyonu ile de sepsis modeli oluşturabilir. Çekum ligasyonu ve delinmesi standardizasyonu çok zor olmasına rağmen en sık kullanılan yöntemdir(8; 20-22). Çünkü kısmen nekroz, doku hasarı ve

polimikrobiyal bir enfeksiyonun başlatılması yoluyla insan sepsisinin birçok faktörünü ve karmaşıklığını kopyalar(22).

ÇLP modelinin güçlü yönlerinden biri, prosedürde ölçülebilir küçük değişiklikler yaparak sepsisin şiddetinin ayarlanabilmesidir. Sepsis şiddetini ayarlamak için yaygın olarak modüle edilen parametreler arasında bağlanan çekum miktarı, peritona sokulan çekum içeriği miktarı (deliklerin sayısına/büyüklüğüne)(20-22).

ÇLP modelinde sepsis indüksiyonunu takiben, kandaki proinflamatuvar sitokin seviyeleri (IL-1 β , IL-6, IFN γ ve TNF dahil) önemli ölçüde artar ve indüksiyon sonrası ~6 saatte zirveye ulaşır. Proinflamatuvar sitokinlerin yükselişinin hemen ardından antiinflamatuvar sitokinlerin (örn. IL-10 ve IL-4) seviyeleri artar. Benzer şekilde, insan septik hastalarında TNF, IL-6, IL-1 β , IL-10 serum seviyelerinde artış yaygın olarak gözlenmektedir(22).

Bakteriyemi, farelerde ÇLP ile indüklenen sepsisten 6 saat kadar sonra ortaya çıkmaktadır. ÇLP modeli kemirgenlerde kullanıldığında, hipotermi, taşikardi, takipne ve bozulmuş motor aktivite gibi tipik sepsis veya septik şok semptomları ile hastalık paternleri gösterirler. Bu semptomlar yaklaşık olarak 12 saat sonra ortaya çıkar. ÇLP uygulanan fareler peritonit indüksiyonundan yaklaşık 18 saat sonra ölmeye başlar. Sepsis ne kadar şiddetli olursa ölüm oranı da o kadar artar(20-22).

2.4.Ozon

2.4.1. Ozonun Tarihçesi

Christian Friedrich Schonbein (1799-1868) 1840 yılında, oksijen varlığında voltaik bir yığınla çalışırken, bir tür "süper aktif oksijen" olabilecek "elektrikli ve keskin kokulu" bir gazın ortaya çıktığını fark ettiğinde ozonu keşfetti(6; 23-25). Voltaik bir ark tarafından elektrik deşarjı oluşturulduğunda ozonun oksijenden türediği kavramı, oksijen varlığında bir miktar ozon üretebilen yüksek gerilime ayarlanmış iki elektrot plakasından oluşan süper-indüksiyon tüpünü icat eden kimyager Werner von Siemens tarafından pratik olarak uygulanmıştır(23).

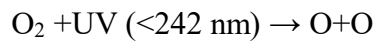
İlk tıbbi uygulama, 1. Dünya Savaşı sırasında Alman askerlerindeki gazlı, travma sonrası gangreni tedavi etmek için ozon kullanımı gibi görünmektedir. Birinci dünya savaşı sırasında (1914-18) O₃'ün antibakteriyel özelliklerine aşina olan ve ellerinde çok az tıbbi kaynak bulunan doktorlar O₃'ü enfekte yaralara topikal olarak uygulamış ve O₃'ün sadece enfeksiyonu iyileştirmekle kalmayıp aynı zamanda hemodinamik ve antienflamatuar özelliklere de sahip olduğunu keşfetmişlerdir(26). 1896'da dahi Nikola Tesla ABD'deki ilk O₃ jeneratörünün patentini almıştır(6; 26). Ancak ileriye doğru büyük bir adım, fizikçi Joachim Hansler (1908-1981) tarafından tıbbi kullanım için güvenilir bir ozonlayıcının icat edilmesi olmuştur(24).

2.4.2. Ozonun Yapısal Özellikleri

Ozon (O₃) Yunanca koku yaymak anlamına gelir. Doğada stratosferde bulunur, ancak diatomik oksijenin (O₂) yüksek voltajlı elektrik deşarjına maruz bırakılmasıyla yapay olarak da üretilebilir ve gaz halinde renksiz görünür, karakteristik bir kokusu vardır(3; 6). Ozon, tek başına veya NO₂ ile elektrik deşarjı ve/veya ultraviole (UV) radyasyonu ile üretilen doğal, oldukça reaktif, gaz halinde bir moleküldür. Doğal ancak kararsız bir moleküldür. Molekül üç oksijen atomundan (O₃) oluşur ve molekül ağırlığı, oksijen diatomik molekülüne (32.00) kıyasla 48.00'dir. Ozon ve oksijenin 100 ml sudaki (0°C'de) çözünürlüğünün sırasıyla 49,0 ml ve 4,89 (ml) (on kat daha düşük) olduğu bilinmektedir. Sonuç olarak, ozonun sudaki yüksek çözünürlüğü, biyolojik sıvılarda bulunan herhangi bir çözünür bileşik ve biyomolekül ile anında reaksiyona girmesini sağlar(23; 24).

Oksidan maddeler arasında O₃, flor ve persülfattan sonra en güçlü üçüncü maddedir ve bu durum yüksek reaktivitesini açıklamaktadır. Aktive olmuş lökositlerin bile in vivo ozon ürettiği görülmektedir. Konsantrasyonuna ve konumuna bağlı olarak koruyucu veya saldırgan olabilir(4; 23; 24).

Ozon, Siemens tüpünün elektrotları arasında kurulan çok yüksek voltaj gradyanlarının izin verdiği endotermik bir süreç yoluyla saf oksijenden oluşturulur(3):



Bu reaksiyon tersinir olduğu için pratikte ozonun kendiliğinden ayrıştığı bu sebeple depolanması zor olduğu bilinmektedir. Ozon, oksijenin basınçla doğrusal çözünürlüğü açısından klasik Henry yasasını takip etmez, çünkü kandaki bakteriler, iyonlar ve biyomoleküllerle hemen reaksiyona girer(3; 23).

Ozon konsantrasyonlarının ABD veya Avrupa'da sırasıyla ppmv veya mcg/ml olarak rapor edilmektedir. Dönüşüm aşağıdaki gibidir:

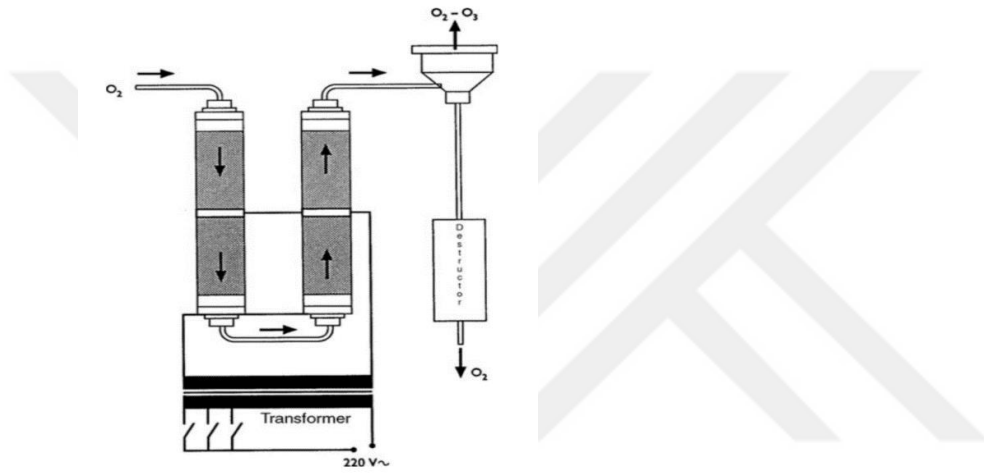
$$1 \text{ ppmv} = 1.0 \text{ mcg/ml veya } 1.0 \text{ mg/l veya } 1.0 \text{ g/m}^3$$

Ozon bir gaz olarak 20°C'de 40 dakikalık bir yarı ömürle kendiliğinden ayrışır. Bu, ozonun sıcaklığa bağlı yarı ömre sahip yarı kararlı bir gaz olduğu, ancak -111.91°C'nin altındaki bir sıcaklıkta 1.571 g/mL özgül ağırlıkla sıvı halde depolanabileceği anlamına gelir. Endüstriyel ozon havadan üretilir ancak tıbbi ozon yalnızca tıbbi oksijen kullanılarak geçici olarak üretilmelidir çünkü aksi takdirde eş zamanlı nitrik dioksit (NO₂) üretimi çok toksik olacaktır(24; 26).

2.4.3. Medikal Ozonun Üretilme Yöntemi

Tıbbi ozon jeneratörü, 5.000 ila 13.000 V arasındaki voltaj farklarını ayarlayabilen bir elektronik programa seri olarak bağlanmış 2-4 yüksek voltaj tüpünden oluşur. Korona deşarj ozonatörü olarak tanımlanan sistemde ozon, oksijenin yüksek voltaj ve toprak elektrotları arasındaki bir boşluktan geçerek korona olarak adlandırılan bir enerji alanı oluşturmasıyla oluşur. Elektrik deşarjından gelen enerji, oksijen moleküllerinin oksijen atomlarına parçalanmasını sağlar ve bu da fazla oksijen molekülü varlığında üç atomlu ozon molekülünü oluşturur. Ozonun sentezlenmesine elektrik deşarjı tarafından salınan enerji izin

verirken, ozonun ayrışmasına enerji salınımı eşlik eder. Jeneratör saf tıbbi oksijenle beslenir tıbbi amaçlar için hava kullanılamaz. Çünkü %78 azot içerdiğinden nihai gaz karışımı oksijen ve ozonun yanı sıra değişken miktarda yüksek derecede toksik NO₂ içerecektir. Ayrıca, tıbbi gaz karışımı konsantrasyonu %95'ten az O₂ ve %5'ten fazla O₃ içermemelidir (6; 23; 24).



Şekil 2: Bir ozon jeneratörünün şematik görünümü(23)

2.4.4. Ozonun Uygulanma Yöntemleri

Tablo 4: Ozon uygulama yolları(23)

Parenteral	Topikal
Intravenöz (IV) Intra-arterial (IA) ^b Intramusküler (IM) Subcutaneous (SC) Intraperitoneal (IPE) Intraplevral (IPL) Intra-artiküler (IAT) (A) Periartiküler (B) Myofasiyal Intradiskal (ID) Intraforaminal (IF) Intralezyonel (IL) ^c	Nasal ^a Tubal ^a Auricular Oral ^a Vaginal Uretral ve mesane içi Rektal Dermal Dental

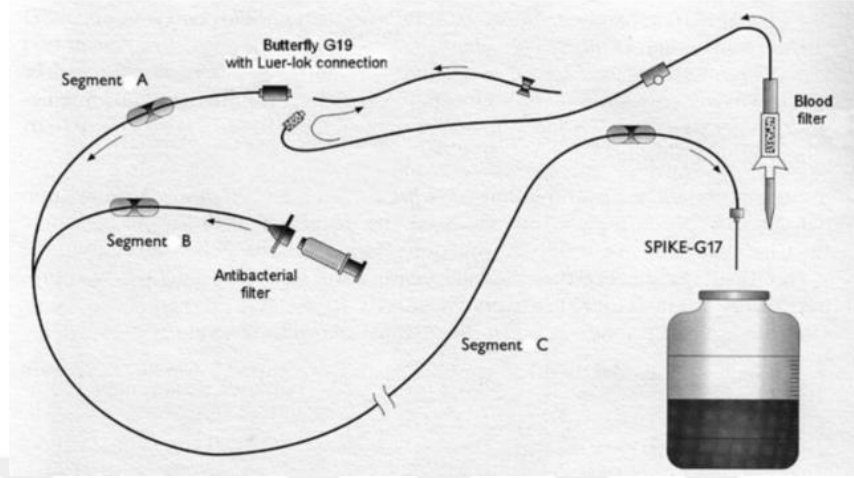
^a30-60 sn apne sırasında yapılmalıdır. ^bEkstremitelerde iskemisi için artık kullanılmamaktadır. Hepatik metastaz hepatic arter yoluyla embolize edilebilir. ^cIntratümöral veya abse içi fistül yoluyla.

Ozonun İnsanda Uygulanan Terapötik Modaliteleri(23)

1. Major ozon otohomeoterapi (AHT)
2. Minör ozon otohomeoterapi
3. İzotonik salin veya glukoz solüsyonunda çözünmüş hidrojen peroksit ile biyooksidatif tedavi
4. Oksijen-ozonun rektal insüflasyonu (RI)
5. Oksijen-ozona yarı-toplam vücut maruziyeti (BOEX)
6. Oksijen-ozona karşı vücut dışı kan dolaşımı (EBOO)

1. Major ozon otohomeoterapi (AHT)

Bu terim, bir miktar kanın (50-225 ml) bir kol veninden alındığı, nazıkçe karıştırılarak en az 5 dakika boyunca oksijen-ozona maruz bırakıldığı ve donöre yeniden IV infüzyonu yapıldığı klasik ve eşsiz prosedürü ifade eder(5; 23). Kanın vücut dışına alındığında pıhtı oluşmaması için sodyum sitrat %3,8 çözeltisi (10 ml sitrat artı 90 ml kan) veya heparin (ml kan başına 15-20 IU) kullanılır(23). O₃ terapisi, çeşitli terapötik aralığa (mL kan başına 20-80 µg/mL gaz) sahip bir oksijen O₂-O₃ karışımını birleştirir. O₃ terapisi uygulaması, tedavi hedeflerine ve tedavinin yerine göre değişir(25; 27).



Şekil 3:AHT bileşenlerinin şematik çizimi (23)

2. *Minör ozon otohomeoterapi*

Minör ozon otohomeoterapi ilk olarak hastadan 5-10 ml lik kan alınıp sonrasında bu kanı tedavinin kapsamına ve hastalığa bağlı olarak eşit hacimde 40 ila 100 mcg/ml filtrelenmiş oksijen-ozon ile karıştırılıp oluşan bu karışımın intramüsküler (IM) veya subkutan (SC) olarak hastaya uygulanmasıdır(23).

3. *İzotonik salin veya glukoz solüsyonunda çözünmüş hidrojen peroksit ile biyooksidatif tedavi*

İlk olarak izotonik salin kullanarak denenmiş. Kolda ven hattı boyunca ağrı olunca ozon-izotonik salin çözeltisinin flebite neden olduğunu düşünülmüş. Daha sonra hidrojen peroksit (H_2O_2) kullanarak uygulanmış. Çözeltiyi hazırlamak için, 0,5 ml steril %15 H_2O_2 çözeltisini 250 ml %5 steril glukoz çözeltisi veya diyabetik bir hasta durumunda steril serum fizyolojik ile seyreltip sonrasında çözelti ozon ile karıştırılıp uygulanmış(23).

4. *Oksijen-ozonun rektal insüflasyonu (RI)*

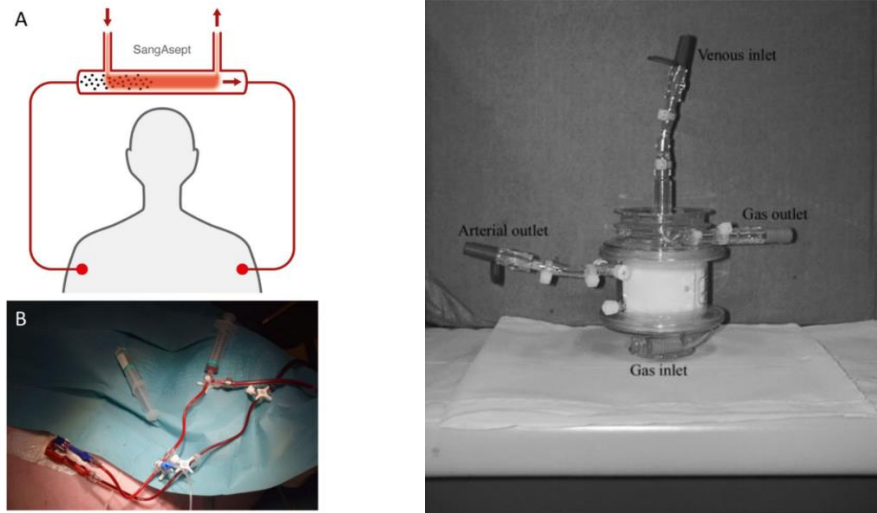
O_2 - O_3 'ün rektal insüflasyonu bir diğer yaygın uygulama bölgesidir(25).

5. *Oksijen-ozona yarı-toplam vücut maruziyeti (BOEX)*

Rektal insüflasyonu reddeden ve majör AHT için venöz erişimi zayıf olan hastalar için vücudu (pulmoner toksisiteden kaçınmak için baş ve boyun hariç) ozona dayanıklı bir kabin içinde uygulanmaktadır. Kabinden geçen gaz akışı (yaklaşık %97 O₂ ve %3 O₃ karışımı) 1 L/dk'dır. Tedavi sırasında nihai ozon konsantrasyonu, patolojiye ve hastanın durumuna bağlı olarak hem kontrollü hem de değiştirilebilir sıcaklıkta (37-40°C) ve bağıl Nemde ($\leq$ %100) verilen 1 µg/mL'nin altındadır(23; 27).

6. *Oksijen-ozona karşı vücut dışı kan dolaşımı (EBOO)*

EBOO, hastadan bir çift lümenli bir katater ile kan alınıp ve O₃'e dirençli bir gaz eşanjöründen geçirildikten sonra peristaltik bir pompa kullanarak kanın dolaşıma geri verilmesidir. Kan/O₃ miktarlarının değişebildiği ancak her zaman kesin olarak belirlendiği bir saat içinde yaklaşık 5 litre kan O₂-O₃'lanabilir(27).



Şekil 4: EBOO modeli

2.4.5. Ozonun etki mekanizması

O₃ doğadaki en güçlü oksitleyici moleküllerden biri olarak kabul edilir. Bocci ve arkadaşları tarafından farklı çalışmalarda bildirildiği üzere, O₃ insan sıvılarında ve dokularında su ve çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA) ile hızla reaksiyona girerek sırasıyla H₂O₂ ve esas olarak 4-hidroksinonenal (4-HNE) ve 4-hidroksiheksenal(4-HHE) gibi oluşan bir lipid ozonlama ürünleri (LOP) karışımı oluşturur. O₃ maruziyetinden sonra oluşan LOP'ler arasında lipoperoksit radikalleri, hidroperoksitler, malonldialdehit, izoprostanlar, ozonid ve alkenallerde bulunur(6; 25). H₂O₂ temel ROS olarak kabul edilir ve ozon habercisi olarak görev yapar. Bununla birlikte, süperoksit iyonu (O₂⁻) ve hidroksil radikali (OH⁻) gibi ozon reaksiyonlarının ürünleri olarak başka ROS'lar da tanımlanmıştır. Yüksek reaktiviteleri göz önüne alındığında, ROS önemli hücre bileşenlerine zarar verebilir ve son derece kısa ömürleri (birkaç saniye) göz önüne alındığında üretimleri hassas bir şekilde kalibre edilmelidir(6).

H₂O₂'nin bir kısmı, katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) gibi serbest çözünür antioksidanlar tarafından azaltılır. H₂O₂ birleştikçe, büyük kısmı eritrositler tarafından temizlense de tüm kan hücrelerine serbestçe yayılır. Plazma ile kan hücrelerinin sitoplazması arasında dinamik ancak geçici bir H₂O₂ gradyanı oluşması, bu oksidantı çok erken bir efektör haline getirir. H₂O₂ konsantrasyonunun küçük olmasına rağmen toksisite olmaksızın birçok önemli biyokimyasal reaksiyonu tetiklemek için yeterli olmasıdır. Çünkü hücre içi ortam, tehlikeli bir artışa izin vermeyen zengin glutatyon (GSH), tiyoredoksin, CAT ve GSH-Px içerir(28). O₃ GSH-Px, CAT ve süperoksit dismutaz (SOD) gibi antioksidan

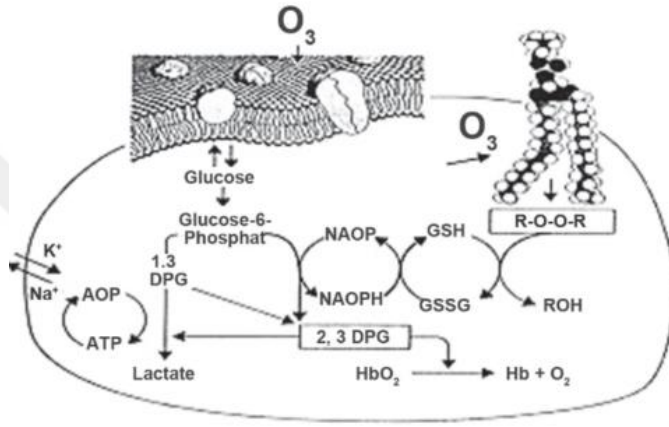
enzimlerin aktivitesini artırır. İnsan dokularında, ROS'un neden olduğu ılımlı oksidatif stres, GSH-Px, CAT ve SOD gibi endojen radikal temizleyiciler tarafından etkisiz hale getirilir(26; 29).

Kontrollü ozon uygulamasının oksidatif bir ön koşullanmayı veya oksidatif strese adaptasyonu ve direnci artırır. Ozon önkoşullamasının serbest radikallerin hücrel hasarına karşı koruduğu gösterilmiştir(4).

Çeşitli çalışmalarda O₂-O₃ tedavisinin kas-iskelet ağrısıyla ilgili farklı patolojik durumlardaki etkileri değerlendirilmiştir. Ağrının enflamasyon süreciyle ilgili yaygın bir semptom olduğu ve O₂-O₃ tedavisinin sadece enflamasyonun yönetiminde değil aynı zamanda nosiseptif algı ve modülasyonda da önemli bir rol oynayabileceği yaygın olarak kabul edilmektedir. Bu nedenle, O₂-O₃ uygulamasından sonra serotonin ve endojen opioidlerde bir artış gösterilmiştir ve bu antioksidan moleküller antinosiseptif yolları uyararak ağrının giderilmesine neden olabilir(6).

Hipoksi ve vaskülarizasyon bozukluğu, kas erimesi ve kas-iskelet sistemi rahatsızlıklarında yaygın bir patolojik özelliktir. Ozon tedavisi eritrosit hücrelerinde glikoliz hızında artışa neden olur. Ozon, piruvatın oksidatif karboksilasyonunu artırarak Krebs döngüsünü aktive eder ve ATP üretimini uyarır. Ayrıca NADH'de önemli bir azalmaya neden olur ve sitokrom C'nin oksitlenmesine yardımcı olur(26). Eritrositlerde fosfofruktokinazın aktivasyonu, ATP ve 2,3 difosfoglisarat (2,3-DPG)'nin kanıtlanmış bir artışıyla glikolizi hızlandırır. İşlevsel olarak, Bohr etkisi nedeniyle oksihemoglobin sigmoid eğrisi sağa kayar, yani küçük bir pH

azalması (yaklaşık 7,25) ve 2,3-DPG'de hafif bir artış olur. Sağa kayma, oksijenin hemoglobine kimyasal bağlanması zayıfladığından ve iskemik dokulardan oksijen ekstraksiyonunu kolaylaştırdığından doku oksijenasyonunu iyileştirmek için avantajlıdır(27; 28).



Şekil 5: Ozonun eritrosit metabolizması üzerindeki etkisi(26)

Ozonun İmmünoregülatör fonksiyonları

Küçük ve tekrarlanan oksidatif streslerin, antioksidan yanıt elementlerinin (ARE) transkripsiyonunda yer alan nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2)'ye aracılık eden transkripsiyonel faktörün aktivasyonunu indükleyebileceği gösterilmiştir(6). Nrf2'nin inflamasyonun hücre içi sinyal yollarında da önemli bir rol oynadığı görülmektedir. Bu bağlamda Li ve arkadaşları, Nrf2-antioksidan sinyalizasyonunun aktivasyonunun, birkaç in vivo çalışmada vurgulandığı gibi, inflamatuvar yanıt ve kas atrofisinin önemli bir düzenleyicisi olan nükleer faktör kappa-B (NF-κB)'yi zayıflatabileceğini göstermiştir(30).

H₂O₂, transkripsiyon faktörü NF-κB'nin bir alt birimi olan IκB'yi fosforile edecek tirozin kinazların aktivitesini artırarak NF-κB'nin etkisine aracılık eder.

Terapötik O₃ dozları NF-κB yolunu baskılar. Buna karşılık, yüksek O₃ dozları NF-κB yolunu aktive ederek enflamasyonu teşvik eder. Düşük dozlarda O₃'ün prostaglandin sentezini inhibe ettiği, bradikinin salgılattığı, makrofaj ve lökosit salgılarını artırdığı gösterilmiştir. Ayrıca interferon, tümör nekroz faktörü ve interlökin (IL)-2'de artışlar görülür. IL-2'deki artışların immün yanıt mekanizmalarını başlattığı bilinmektedir (25; 28).

O₃ lökosit sayısını artırır ve granülositlerin fagositik yeteneğini geliştirir. Makrofajlar ozon tedavisini takiben daha yüksek mitokondriyal ROS seviyeleri sergiler. O₃ monosit oluşumunu teşvik eder ve T hücrelerini aktive eder. Eş zamanlı olarak, antikora bağlı hücre sitotoksitesini tetiklemek için interferon ve interlökinler (IL) gibi sitokinlerin salınımını uyarır. (5; 28).

Ozonun Antibakteriyel Etkisi

Ozon tedavisi, fosfolipidlerin ve lipoproteinlerin oksidasyonu yoluyla bakteriyel hücre zarfının bütünlüğünü bozar(5; 31). Mantarlarda, O₃ belirli aşamalarda hücre büyümesini engeller. Virüslerde, O₃ viral kapside zarar verir ve peroksidasyon ile virüs-hücre temasını bozarak üreme döngüsünü bozar. Hücreleri virüslerin istilasına açık hale getiren zayıf enzim kaplamaları, onları oksidasyona ve vücuttan atılmaya duyarlı hale getirir ve daha sonra sağlıklı hücrelerle yer değiştirir(26).

Ozon geniş spektrumlu, etkili ve güvenli bir bakteriostatik etkiye sahiptir. Raporlar, ozonun metisiline dirençli Staphylococcus aureus (MRSA), Streptococcus, P. aeruginosa, Escherichia coli ve mikobakteriler de dahil olmak

üzere *S. aureus*'u etkili bir şekilde öldürebildiğini doğrulamıştır(5). Özellikle hayvan modelleri, vankomisine ek olarak O₃ tedavisinin hayvanın metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* mediastinitini ortadan kaldırma kapasitesini artırdığını göstermiştir(25). Ozon patojenlerle reaksiyona giren fagositler miyeloperoksidaz tarafından katalize edilen anyon süperoksit (O₂⁻), H₂O₂ ve hipokloröz asit (HClO) üretir(3; 24).

2.4.6. Ozon tedavisinin kullanıldığı hastalıklar

İnflamasyonda antioksidan ajan olarak kullanılmıştır. Yaşa bağlı makula dejenerasyonu, iskemik ve enfeksiyöz hastalıklar ve yara iyileşme bozuklukları ozon tedavisinin faydasını kanıtladığı hastalıklar arasındadır(4).

Ateroskleroz, diyabet veya Buerger hastalığı (tromboanjitis obliterans) nedeniyle uzuv arterlerinde meydana gelen hafif bir tıkanıklık bile ayağa giden kan akışının giderek azalmasına neden olur. Bu patoloji O₃-AHT ile tedavi edilmek için en uygun olanıdır. Pentoksifilin ve prostanoidlere (ortodoks tedavinin altın standardı) kıyasla, O₃-AHT'nin iskemik vasküler hastalıkta daha etkili ve yan etkisiz olduğu kanıtlanmıştır(27). Küçük bir çalışmada, 28 hasta kendi ozonlanmış kanlarını ya da IV prostasiklin infüzyonunu almak üzere randomize edilmiştir. Tüm hastalar statinler, antihipertansif ve antiplatelet agregasyon ilaçları ile konvansiyonel tedaviye devam etmiştir. Ozon tedavisinin ağrının azaltılması ve yaşam kalitesinin iyileştirilmesi açısından prostasiklinden daha etkili olduğu kanıtlanmıştır, ancak büyük olasılıkla kısa tedavi süresi (7 haftada 14 tedavi)

nedeniyle her iki grupta da alt ekstremitelerin vaskülarizasyonunda önemli bir fark görülmemiştir(24).

Ozon en iyi topikal dezenfektan olarak kabul edilir çünkü bakteriler, virüsler, mantarlar ve protozoalar suda serbest kaldıklarında kolayca okside olurlar. Ozon tedavisi metabolizmayı iyileştirerek ve hafif bir sitokin indükleyicisi olarak çalışarak, bulaşıcı hastalıklar üzerinde faydalı bir etkiye neden olmaktadır(24).

Bel ağrısında ozon uygulamasının çok etkili olduğu kanıtlanmıştır. Doğrudan (intradiskal) veya paravertebral kaslara intramüsküler uygulama yoluyla dolaylı olarak uygulanabilir. Spor yaralanmalarına (232 denek) ve enflamatuar bozukluklara (770 denek) bağlı ağrı ile ilişkili bozukluklar üzerinde yapılan bir başka çalışmada da gösterildiği üzere, ozonun anti-nosiseptif sistemin aktivasyonu gibi çok sayıda etki gösterdiği ve lipid peroksidasyon ürünlerine bağlı olarak anti-inflamatuar etkiye sahip olduğu ve bunun sonucunda siklooksijenaz-2'nin (COX-2) inhibe edildiği görülmektedir(24). Sconza ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen yeni bir sistematik inceleme, diz osteoartritinden etkilenen hastalarda O₂-O₃ intra-artiküler uygulamasından sonra diz ağrısının etkili bir şekilde azaltılabileceğini bildirmiştir(32). Ayrıca, Ulusoy ve arkadaşları geleneksel tedaviye yanıt vermeyen lateral kronik epikondilitten etkilenen hastalarda O₂-O₃ enjeksiyon tedavisinden sonra olumlu sonuçlar bildirmiştir(33).

Ozonun diş hekimliğinde enfeksiyonları ortadan kaldırmak ve primer kök çürük lezyonlarını engellemek için çok yararlı olduğu kanıtlanmıştır (24)

Günümüzde OAHT, diyabetik ayak, bazı tümörler, herpes zoster ve lupus eritematozus gibi bazı otoimmün ilişkili hastalıklar için tamamlayıcı bir tedavi olarak kabul edilmektedir(5).

Ayrıca, sistemik ozon tedavisi, kemoradyoterapi direncini hafifletme kapasitesinin yanı sıra analjezik, antiaging ve antitümör ajan olarak büyük bir potansiyel göstermiştir. (5).

2.4.7. Ozon tedavisinin kontrendikasyonları

O₂-O₃ tedavisinin kontrendikasyonları temel olarak bu karışımın antioksidan özellikleriyle ilgilidir. Aşağıdaki durumlar kullanımını engeller veya sınırlar(6):

(a) Önemli ölçüde glukoz 6-fosfat dehidrogenaz (G-6PD) eksikliği olan hastalar. Favizm, bu enzimden yoksun bazı kişilerde görülen hemolitik bir hastalıktır. Bu enzim, aşırı oksidasyonu ve yoğun hemolizi ortadan kaldırabilen çok önemli indirgeyici eşdeğerler sağlar.

(b) Hamilelik, özellikle de erken evre, mutajenik riski dışlamak için, her ne kadar olası olmasa da.

(c) Anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE) inhibitörleri ile tedavi edilen hastalar.

(d) Hipertiroidizm, trombositopeni ve ciddi kardiyo-vasküler instabilite gibi anormal durumlar.

(e) Ozona karşı alerji olduğu iddia edilmiştir,

Çeşitli faydalarına rağmen, O₃ toksisitesi ve klinik faydası konsantrasyona ve uygun bölgeye uygulanmasına bağlıdır. O₃ tedavisinin en önemli kontrendikasyonlarından biri akciğer inhalasyonudur. O₃ tedavisi, akciğerin kompliyansını veya elastik özelliklerini değiştirmeden hava yolu direncini önemli ölçüde artırır. Ayrıca, O₃'ün göz ve akciğerlerle doğrudan teması, bu spesifik bölgelerdeki düşük antioksidan kapasiteleri nedeniyle kontrendikedir(25).

Tablo 5: Ozonun insanlardaki toksik etkileri(23)

O ₃ 'un havadaki konsantrasyonu (ppmv)	Toksik etkiler
0.1	Göz yaşarması ve üst solunum yollarında tahriş
1.0–2.0	Rinit, öksürük, baş ağrısı, bazen bulantı, öğürme ve yatkın kişilerde astım gelişebilir
2.0–5.0 (10–20 dk)	Giderek artan dispne, bronşiyal spazm, retrosternal ağrı
5.0 (60 dk)	Akut pulmoner ödem ve bazen solunum felci
10.0	4 saat içinde ölüm
50.0	Dakikalar içinde ölüm

2.5.Diyabetes Mellitus

DM, insülin eksikliği ve bazı durumlarda bozulmuş insülin etkisinin bir sonucu olarak ortaya çıkan yüksek kan glukozu ile karakterize kronik bir hastalıktır(2; 34). Heterojen olmasına rağmen diyabet iki geniş kategoriye ayrılabilir. Tip 1 diyabet, pankreas beta hücrelerinin otoimmün yıkımından kaynaklanır ve total (veya totale yakın) insülin eksikliği ile sonuçlanır. Tip 2 diyabet obezite ile güçlü bir şekilde ilişkilidir ve göreceli insülin eksikliği ve insülin duyarlılığında değişken kusurlar ile karakterizedir. Tüm diyabet türlerinden

kaynaklanan kronik hiperglisemi, mikrovasküler komplikasyonların (retinopati, nefropati, nöropati) yanı sıra aterosklerotik kardiyovasküler hastalık riskinde artışa neden olmaktadır. Tıbbi beslenme tedavisi, egzersiz, kilo yönetimi ve ilaçları içeren hiperglisemi ve ilgili risk faktörlerinin agresif kontrolü, komplikasyon riskini önemli ölçüde azaltmaktadır(34).

Hareketsiz yaşam tarzı ve obezitenin getirdiği çağımızın metabolik hastalığı haline gelmiştir. Kronik yüksek kan şekeri homeostazı bozar, oksidan stresin artmasına neden olarak bağışıklık tepkisini tetikler, mikro damar ve sinir hasarını artırır, doku ve organ hasarına neden olur(2). Diyabetin sınıflandırılması tablo 6 da gösterilmiştir.

Tablo 6: Diyabetin sınıflandırılması(34)

	TİP 1 DM	TİP 2 DM
Başlangıç yaşı	Çocukluk veya erken yetişkinlik dönemi, ancak her yaşta ortaya çıkabilir	Orta yaş ve üzeri, ancak obez çocuklarda ve ergenlerde de görülebilir
Aile öyküsü/genetik faktörler	Genetik risk tanımlanmıştır, ancak vakaların çoğu sporadiktir	Güçlü genetik bileşen, çoğu durumda poligenik
Çevresel tetikleyiciler	Büyük ölçüde bilinmiyor	Obezite, sedanter yaşam tarzı
İnsülin tedavisi için gereklilik	Evrensel	Değişken
Diyabetli kişiler arasında sıklık	%5-10	≈%90
İlişkili bozukluklar	Otoimmünite, özellikle tiroid ve diğer endokrin bozukluklar	Hipertansiyon, dislipidemi, metabolik sendrom, polikistik over sendromu

2.5.1. Diyabetin Epidemiyolojisi

DM'nin dünya çapındaki prevalansı son yirmi yılda önemli ölçüde artmıştır. Uluslararası Diyabet Federasyonu (IDF)'ye göre 1985'te tahmini 30 milyon vakadan 2021'de 537 milyona (20-79 yaş) ulaşmıştır. 2030 yılına kadar 643 milyon ve 2045 yılına kadar 783 milyon bireyin diyabet hastası olacağı öngörülmektedir. DM önemli bir mortalite sebebidir. IDF verilerine göre 2021 yılında DM'ye bağlı yaklaşık olarak 6,7 milyon ölümden sorumlu olduğunu ve 20-79 yaş arası yetişkinlerde küresel tüm nedenlere bağlı ölümlerin %11,3'ünü oluşturduğunu göstermektedir. Hem tip 1 hem de tip 2 DM prevalansı dünya çapında artıyor olsa da muhtemelen beslenme değişiklikleri ve artan obezite, ülkelerin daha sanayileşmiş hale gelmesiyle azalan aktivite seviyeleri ve nüfusun yaşlanması nedeniyle tip 2 DM prevalansı çok daha hızlı artmaktadır. (1; 34-36).

2.5.2. Diyabetin Patofizyolojisi

Tip 1 DM genetik, çevresel ve immünolojik faktörlerin etkileşiminin bir sonucudur ve sonuçta pankreatik beta hücrelerinin immün aracılı yıkımına ve insülin eksikliğine yol açar. Tip 1 DM her yaşta gelişebilir. Tip 1 DM'li bireylerin hepsinde olmasa da çoğunda, kanda beta hücre antijenlerine karşı otoantikorların varlığıyla tespit edilen adacığa yönelik otoimmünite kanıtı vardır. Duyarlı bireylerde otoimmün sürecin enfeksiyöz veya çevresel bir uyaran tarafından tetiklendiği düşünülmektedir. Hastaların çoğunda, beta hücre antijenlerine karşı otoantikorlar bu tetikleyici olaydan sonra ortaya çıkar ve bunu insülin salgılanmasında ilerleyici kayıp izler. Beta hücre fonksiyonundaki azalma oranı

bireyler arasında büyük farklılıklar gösterir; bazı hastalar hızla klinik diyabete ilerlerken, bazıları daha yavaş ve birkaç yıllık bir süre içinde diyabete dönüşür(1; 34).

Tip 2 DM'ye bir dizi patofizyolojik mekanizma katkıda bulunur ve bunların göreceli önemi bireyden bireye değişir. Tip 2 DM, bozulmuş insülin sekresyonu, insülin direnci, aşırı hepatik glukoz üretimi, anormal yağ metabolizması ve sistemik düşük dereceli inflamasyon ile karakterizedir. Obezite, özellikle visseral veya santral, tip 2 DM'de çok yaygındır (hastaların ≥ 80 'i obezdir). Hastalığın erken evrelerinde, insülin direncine rağmen glukoz toleransı normale yakın seyreder, çünkü pankreas beta hücreleri insülin çıkışını artırarak bunu telafi eder. İnsülin direnci ve telafi edici hiperinsülinemi ilerledikçe, bazı bireylerde pankreas adacıkları hiperinsülinemik durumu sürdüremez ve yemek sonrası glukozda yükselme olarak tanımlanan IGT olarak ortaya çıkar. İnsülin salgılanmasında azalma ve/veya glukagon salgılanmasında artış, hepatik glukoz üretiminde artışa neden olarak açlık hiperglisemisine yol açar. Nihayetinde, bu mekanizmaların bir kombinasyonu olarak tip 2 diyabetin ortaya çıkmasına yol açan açık beta hücre yetmezliği ortaya çıkar(1; 34).

Dolaşım anormallikleri yaygın olarak görülür, mikro ve makrovasküler hastalık şeklinde ortaya çıkarlar. Yıllar boyunca farklı yoğunlukta ve lokalizasyonda aşağıdaki komplikasyonlar gelişebilir: Diyabetik retinopati, 20-75 yaş arası hastaların yaklaşık %85'inde körlüğün önde gelen nedenidir. Diyabetik nefropati hastaların %20-40'ında görülür ve GFR <15 ml/dk olduğunda, son dönem böbrek hastalığı (SDBH) sakatlık ve erken ölümün önde gelen nedenidir. Diyabetik

ayak hastalığı normalde periferik vasküler hastalık (PAD), değişmiş biyomekanik, muhtemelen polinöropati ve enfekte ayak ülserleri gibi çeşitli faktörlerden kaynaklanır. Nöromusküler disfonksiyon ve kas erimesi ile hem somatik hem de otonom sinir sistemini içeren nöropati, morbiditenin bir diğer önemli nedenidir. Hızlanmış ateroskleroz sıklıkla miyokard enfarktüsü, inme ve nekrotik ülserlerle komplike olan ekstremit vasküler oklüzyonu ile kendini gösterir. Görünüşe göre etkisiz leptin aktivitesi ve/veya yağ asitleri dismetabolizmasına bağlı olan lipodistrofi, metabolik sendromun bir başka yönünü temsil etmektedir(37).

İleri glikasyon son ürünleri (AGE) oluşumunda artış: Hücre içi hiperglisemi, hücre içi ve dışı AGE'lerin oluşumunda başlatıcı olaydır. Enzimatik olmayan glikozilasyon (Maillard reaksiyonu), hemoglobinin beta zincirindeki bir alfaaminogrup, glikoz gibi indirgeyici bir şekerle reaksiyona girdiğinde meydana gelir(37).

Artan poliol yolu akısı: Aldoz redüktazın aktivasyonu glukozun sorbitole dönüşümünün artmasına ve GSH rejenerasyonu için faydalı olan NADPH'nin azalmasına yol açar. Ayrıca, nitrik oksit (NO) sentezinin azalması trombosit agregasyonunun ve vazokonstriksiyonun artmasına neden olur(37).

Protein kinaz C izoformlarının aktivasyonu: Hücre içi hiperglisemi, diyabetiklerin vasküler hücrelerinde diaçilgliserol miktarını artırır(37).

Artmış hekzozamin yolu akısı: Hücre içi glukoz fazlalığı hekzozamin yoluna yönlendirilerek TGF-B1 ve plazminojen aktivatör inhibitörü-1(PAI-1) üretiminin artmasına neden olur(37).

Baynes'in diyabetik hastalardaki değişikliğin artan oksidatif strese bağlı olabileceğini öne sürmüştür(38). Endotel bölgesinde artan ksantin oksidaz seviyesi, nitrik oksit (NO) ile hızla reaksiyona girerek vasküler gevşemeyi azaltan, trombosit agregasyonunu artıran ve peroksinitrit anyonunun (ONOO⁻) oluşumuna izin veren süperoksit anyonu (O₂⁻)'nin lokal salınımını artırır. Bu bileşik oldukça toksiktir ve doğru hücre sinyalizasyonu için çok önemli olan birkaç enzimi inaktive eder. ROS ve antioksidanlar arasındaki dengesizlik, özellikle de düşük GSH/GSSG oranı, genellikle diyabette hipertansiyondan önce gelir. Bir başka kısır döngü de eritrosit membranına bağlanan AGE'lerin lipoperoksit üretimini ve endotele yapışmayı uyarmasıyla başlayabilir. Bu süreç de monositlerin transendotelial göçünü destekleyerek oksidatif stresin şiddetlenmesine yol açar(37).

2.5.3. Diyabetin Akciğer Üzerine Etkisi

Akciğerin de diyabetin hedef organlarından biri olduğunu gösteren kanıtlar giderek artmaktadır. Van den Borst ve arkadaşları tarafından bildirildiği üzere diyabet, FEV1/FVC oranının korunmasıyla birlikte 1 s'deki zorlu ekspiratuar hacim (FEV1%) ve zorlu vital kapasite (FVC%) öngörülen değerinde önemli ölçüde azalma ile ilişkilidir(39).

Diyabet süresinin solunum fonksiyonunu etkilemediğini ve diyabetin solunum fonksiyonu üzerindeki zararlı etkisine hiperglisemi, insülin direnci, düşük dereceli kronik inflamasyon (CRP) ve obezitenin aracılık ettiği öne sürölmektedir. FEV1 ve FVC değerlerinin normoglisemiden diyabete doğru bu sürekli düşüşünü pekiştirmekte ve hipergliseminin solunum fonksiyonları üzerindeki zararlı etkisinin

diyabet tanı eşiğinden önce başladığını ortaya koymaktadır. Plazma glukozu ile solunum fonksiyonunun iki ana parametresi (FEV1 ve FVC) arasındaki L şeklindeki ilişki, prediyabet tanısı konduğunda normal glukozu olan kişilerde ve daha iyi metabolik kontrol sağlayan diyabetli hastalarda negatif bir ilişki olduğunu göstermektedir(40). 4459 katılımcının yer aldığı geniş bir kesitsel çalışma, T2DM'nin solunum fonksiyonu üzerindeki zararlı etkisinin prediyabet aşamasında başladığını ve metabolik kontrolle ilişkili olduğunu göstermiştir(41).

İnsülin direnci ve pulmoner disfonksiyonu birbirine bağlayan savunulan mekanizmalardan ikisi, mitokondriyal zindelikteki azalmaya bağlı olarak iskelet kası gücünün bozulması ve tip II alveolar epitel hücrelerinde bulunan insülin reseptörlerinin yüzey aktif madde üretimini uyarmadaki güçsüzlüğüdür(40).

2.5.4. Diyabetin Kalp Üzerine Etkisi

Aterosklerotik kardiyovasküler hastalık (KVH), diyabetli hastalar için başlıca morbidite ve mortalite nedenidir. Diyabette KVH'nin klinik ve patolojik özellikleri genellikle diyabetik olmayan bireylerde ortaya çıkanlardan ayırt edilemez, ancak daha erken yaşta ortaya çıkar, daha agresiftir ve diyabetli hastalarda iki ila dört kat daha yüksek ölüm oranlarıyla ilişkilidir (34).

Diyabette aterosklerotik KVH patogenezi karmaşık ve çok faktörlüdür ve çeşitli mekanizmalar kilit rol oynamaktadır. Hiperglisemi, insülin direnci, dislipidemi ve dolaşımdaki serbest yağ asitlerinde artış gibi metabolik faktörler aterosklerotik plak oluşumuna katkıda bulunur. Lipoproteinlerin oksidasyonu ve glikoksidasyonundaki artışlar aterojenitelerini artırır ve köpük hücre oluşumunu

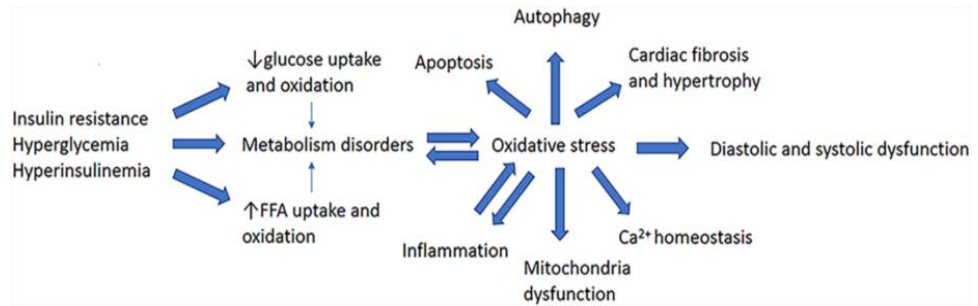
güçlendirir. Ateroskleroz gelişiminde erken bir olay olan endotel disfonksiyonu, hiperglisemi, insülin direnci, hipertansiyon ve dislipidemi dahil olmak üzere çeşitli metabolik sendrom bileşenleriyle ilişkili olarak tanımlanmıştır. Hızlanmış plak oluşumuna katkıda bulunan sistemik enflamasyon, yağ dokusu tarafından artan sitokin üretiminin bir sonucu olarak diyabet ve obezitede artmaktadır. Son olarak diyabet, trombosit reaktivitesinin artması ve dolaşımdaki fibrinojen ve plazminojen aktivatör inhibitörü-1 seviyelerinin artması da dahil olmak üzere pıhtılaşma faktörlerindeki değişiklikler nedeniyle protrombotik bir durumla karakterizedir(34).

Diyabetik kardiyomiyopati (DKM), doğrudan koroner arter hastalığı veya hipertansiyona bağlı olmayan fibrozis, kardiyak yeniden şekillenme ve giderek ilerleyen kalp yetmezliği (KY) ile karakterize olan kalp yapısı ve işlevindeki değişiklikler olarak tanımlanır. Diyabet, aterosklerotik kalp hastalığı olmasa bile kalp yetmezliği gelişimi için bilinen bir risk faktörüdür. Örneğin, Framingham Kalp Çalışması'nda, kalp yetmezliği sıklığı yaş uyumlu kontrollere kıyasla diyabetik erkeklerde iki kat, diyabetik kadınlarda beş kat artmış ve hipertansiyon, obezite, dislipidemi ve koroner arter hastalığı için düzeltme yapılmasına rağmen devam etmiştir(10; 34; 35).

DKM'nin en tipik patojenik özellikleri glikoz ve lipid metabolik bozuklukları, proteinlerin glikasyonu, oksidatif stres, inflamasyon, kardiyak yeniden şekillenme ve kardiyak disfonksiyondur. Diyabetik ortamlarda, çeşitli antioksidan enzimler inaktive olur veya aktivitelerinde azalma görülür ve ROS

üretimi ile bunların oksidatif savunma sistemleri tarafından ortadan kaldırılması arasındaki dengesizlik oksidatif stres olarak adlandırılır(35).

Normal koşullar altında, kardiyomiyositler enerji için esas olarak yağ asitlerine bağlıdır ve yalnızca %40'ı glikozdan elde edilir. İnsülin sinyalizasyonundaki bozukluklar, insülinle uyarılan glikoz alımının başlıca aracısı olan glukoz transporter 4'ün (GLUT4) translokasyonunda azalmaya neden olur. Bu kusurlar daha fazla FFA (serbest yağ asitleri) alımına, oksidasyonuna ve daha düşük glikoz alımına katkıda bulunur. Yüksek FFA oksidasyon seviyelerine rağmen, fazla FFA alımı tam olarak oksitlenmez. FFA alımı ve oksidasyonu arasındaki dengesizlik nedeniyle seramid gibi kardiyotoksik lipid ara ürünleri birikerek lipotoksiste, ROS ve reaktif nitrojen türevleri (RNS) birikimine neden olur(35).



Şekil 6: Diyabetik kardiyomiyopati patogenezinde oksidatif stres(42)

Hipertrofi ve miyokardiyal fibrozis, DKM'de patojenik yeniden şekillenmenin en yaygın şekilleridir. Bu nedenle, ECM proteinlerinin ve özellikle kolajenlerin birikimi diyabetik kalbi sıklıkla karakterize eder. AGE'ler ECM proteinlerini çapraz bağlar ve bu da fibrozis ile miyokardiyal gevşemeyi bozar. AGE konsantrasyonundaki artış, anjiyotensin II (Ang II) ve TGF- β gibi profibrotik sinyallerin upregülasyonuna neden olur ve bunun sonucunda MMP'ler ve TIMP'ler

arasındaki dengesizlik de kardiyak fibrozisi destekler. Diyabetik kalpte oksidatif stres ayrıca hücre içi Ca^{2+} konsantrasyonunda artışa ve sarkoplazmik Ca^{2+} alımında azalmaya neden olur ki bunlar miyosit hipertrofisinden sorumludur ve ayrıca miyokardiyal fibrozu teşvik eder. Hiperglisemi, hiperinsülinemi ve dislipidemi gibi metabolik bozukluklar oksidatif stres, enflamasyon, AGE birikimi, mitokondri hasarı, dengesiz kalsiyum regülasyonu ve kardiyomiyosit apoptozisi ile sonuçlanır. Bunlar kardiyak fibrozisi teşvik eder ve nihayetinde diyastolik veya sistolik disfonksiyon gelişimiyle sonuçlanır(35).

2.6.Sepsis

"Sepsis" kelimesi eski Yunancada çürümüş et ve kokuşma anlamına gelen bir kelimeden türetilmiştir. Sepsis, Üçüncü Uluslararası Konsensüs tanımına göre bir enfeksiyona karşı düzensiz konakçı yanıtına ikincil olarak ortaya çıkan, yaşamı tehdit eden bir organ fonksiyon bozukluğudur"(43). Sepsis sendromu, bakteriyemi, sepsisemi, şiddetli sepsis ve septik şok dahil olmak üzere sepsise çok çeşitli tanımlar uygulanmıştır. Sepsis, tüm dünyada yoğun bakım ünitelerine (YBÜ) kabulün en yaygın nedenleri arasındadır(44). Önemli bir küresel sağlık yükünü temsil eder ve dünya çapında morbidite ve mortalitenin önde gelen nedenlerinden biridir. Sepsis, yılda tahmini 11 milyon ölümden sorumludur ve küresel olarak yaklaşık her beş ölümden birini oluşturmaktadır(45). Septik atak geçiren hastaların akut olayı takip eden 5 yıla kadar ölüm riski artmaktadır ve ayrıca yaşam kaliteleri daha kötü olmaktadır. Anksiyete, depresyon, travma sonrası stres bozukluğu, bilişsel bozukluk ve yeniden hastaneye yatış oranları daha yüksektir(44).

SIRS terimi, ortak sistemik yanıtı tanımlamak için ortaya atılmıştır. Dört SIRS kriteri tanımlanmıştır: taşikardi (kalp hızı dakikada >90 atım); takipne (solunum hızı dakikada >20 nefes veya kısmi CO_2 basıncı $[\text{PaCO}_2] <32$ mm Hg); ateş veya hipotermi (sıcaklık >38 °C veya <36 °C); ve lökositoz, lökopeni veya bandemi (beyaz kan hücresi $[\text{WBC}] \mu\text{L}$ başına >12.000 , μL başına <4000 veya bandemi $\geq 10\%$). Bu kriterlerden iki veya daha fazlasını karşılayan hastalar SIRS tanımını karşılamıştır. SIRS şüpheli veya doğrulanmış bir enfeksiyöz sürecin sonucu olduğunda, hastalar "sepsis" olarak tanımlanmıştır. Şiddetli sepsis, organ fonksiyon bozukluğu olan sepsis olarak tanımlanmıştır. Septik şok da "yeterli sıvı resüsitasyonuna rağmen devam eden sepsis kaynaklı hipotansiyon" ile ağır sepsisin bir alt kümesi olarak nitelendirilmiştir. Ancak, sepsisi tanımlamak için SIRS kriterlerinin kullanılmasının hem duyarlılık hem de özgüllükten yoksun olması nedeniyle sorunlu olduğu ortaya çıkmıştır. Bu tanımları "iyileştirmek" amacıyla, 2016 yılında Üçüncü Uluslararası Konsensüs Görev Gücü (Sepsis-3) tarafından sepsis ve septik şok için güncellenmiş tanımlar yayınlanmıştır(43). 2016 yılında sepsis, Sequential Organ Failure Assessment (SOFA) skoru ile ölçülen, enfeksiyona karşı düzensiz bir sistemik konak yanıtının neden olduğu yaşamı tehdit eden organ fonksiyon bozukluğu ile karakterize bir sendrom olarak tanımlanmıştır. YBÜ'deki hastalar için organ disfonksiyonu ayrıca SOFA skorunda 2 veya daha fazla puanlık bir artış olarak tanımlanmıştır. SOFA skorunun daha sonra bu hasta popülasyonunda mortalite açısından iyi bir geçerliliğe ve tahmin yeteneğine sahip olduğu gösterilmiştir. "Ağır sepsis" terimi gereksiz olduğu gerekçesiyle terk edilmiş ve septik şok klinik olarak ortalama arter basıncını (MAP) 65 mm Hg veya üzerinde

tutmak için vazopressör desteği gerektiren hipotansiyon ve hipovolemi kanıtı olmaksızın 2 mmol/L'den yüksek serum laktat seviyesi olarak tanımlanmıştır(44).

İlk enfeksiyondan kurtulanlar bağışıklıkta uzun vadeli bozulmalardan ve yaygın ikincil enfeksiyonlara karşı artan duyarlılıktan muzdariptir. Aslında, sepsise bağlı ölümlerin ~%70'i, immünoşüpresyonun bir sonucu olarak hasta ilk septik olaydan kurtulduktan sonra meydana gelir. Septik bir olay sırasında, hastalar apoptotik lenfosit ölümünün bir sonucu olarak bağışıklık hücrelerinin sayısında keskin bir azalma yaşarlar. Lenfopeni, yeni veya ikincil enfeksiyonlara verilen yanıtların azalmasına ve latent virüslerin yeniden aktive olmasına katkıda bulunur. Sepsisin neden olduğu bu lenfopeni geçicidir ve septik bir olaydan sonra gelişen immünoparaliz, mutlak lenfosit sayılarının iyileşme noktasının ötesine uzanır(22).

Tablo 7: Sequential Organ Failure Assessment (SOFA)(44)

SOFA SKORU	PUANLAR				
SİSTEM	0	1	2	3	4
SOLUNUM PaO ₂ /FiO ₂ , mmHg (kpa)	>400 (53.3)	<400 (53.3)	<300 (40)	<200 (26.7) Solunum desteği ile	<100 (13.3) Solunum desteği ile
KOAGÜLASYON Platelets, × 10 ³ /μL	>150	<150	<100	<50	<20
KARACİĞER Bilirubin, mg/dL (μmol/L)	<1.2 (20)	1.2- 1.9 (20- 32)	2.0-5.9 (33-101)	6.0-11.9 (102-204)	>12.0 (204)
KARDİYOVASKÜLER	MAP ≥ 70 mm Hg	MAP < 70 mm Hg	Dopamine < 5 or dobutamine (any dose)	Dopamine 5.1-15 or epinephrine < 0.1 or NE < 0.1	Dopamine > 15 or epi- nephrine > 0.1 or NE > 0.1
SANTRAL SİNİR SİSTEMİ Glasgow Koma Skoru	15	13-14	10-12	6-9	<6
BÖBREK Kreatinin mg/dL(μmol/L)	<1.2 (110)	1.2- 1.9 (110-170)	2.0-3.4 (171-299)	3.5-4.9 (300-440)	>5.0 (440)
İdrar çıkışı mL/gün				<500	<200

2.6.1. Sepsisin Patofizyolojisi

Önceleri sepsiste gözlenen organ fonksiyon bozukluğunun, sitokin fırtınası olarak adlandırılan proinflamatuar aracılarn kontrolsüz üretiminin bir sonucu olduğuna inanılıyordu. Ancak, sepsisli hastalarda hem proinflamatuar hem de karşıt bir anti inflammatuar yanıtın eş zamanlı olarak ortaya çıktığına dair kanıtlar bulunmaktadır(22; 44).

Yaşlı hastalar arasında, özellikle de önemli komorbiditeleri olanlarda, anti-inflamatuar yanıt baskın olabilir. Tersine, majör travma sonrası proinflamatuar ve anti-inflamatuar aracılarn dengesi ya başlangıç seviyesine dönebilir ya da bu hastaları organ yetmezliği, enfeksiyon ve sepsise yatkın hale getiren kalıcı inflamasyon, immünosupresyon ve katabolizma durumuna ilerleyebilir(44). İstilacı patojenden gelen lipopolisakkarit endotel hasarına ve endotel glikokaliksinin kaybına ve hasarlı endotel hücrelerinden nitrik oksit salınımına neden olarak sepsiste gözlenen patolojik vasküler geçirgenliğe, vazodilatasyona ve hipoperfüzyona katkıda bulunur(44; 46).

MODS

Çoklu organ yetmezliği sendromu (MODS), "bir veya daha fazla organın müdahale olmaksızın faaliyetlerini kendiliğinden destekleyememesi" olarak tanımlanabilir. MODS en yaygın olarak enfeksiyonun sepsis ve septik şoka ilerlemesinin bir sonucu olarak ortaya çıkar. Klinik olarak enfeksiyonu tetikleyen unsurların, konağın bu enfeksiyona verdiği doğal yanıtın ve yaşamı sürdürmesini sağlayan tıbbi tedavinin sonuçlarının bir kombinasyonu olarak görülür. Sürekli

diyaliz ve gelişmiş ventilatör bakımı dahil olmak üzere iflas eden organların desteklenmesindeki ilerlemeler potansiyel olarak sağ kalımı artırmış olsa da MODS, yoğun bakım ünitesinde yaygın bir ölüm nedeni olmaya devam etmektedir(44).

Septik hastalarda MODS görülme olasılığı septik olmayan hastalara göre daha yüksektir ve sepsis mevcut olduğunda MODS'de mortalite daha yüksektir (%31'e karşı %21). YBÜ hastalarının %72'si en az bir organ yetmezliği vardır ve organ yetmezliği olan YBÜ hastaları arasında ölüm oranı %15 civarındadır(44).

SIRS sıklıkla MODS'un öncülü olarak görülür ve MODS ile işlev bozukluğunun sürekliliği üzerinde yer alır. SIRS yanıtının bileşenleri bir ameliyatı, ateşli bir hastalığı veya yaralanmayı takiben neredeyse tüm hastalarda görülür. SIRS sıklıkla MODS'a ilerlemeden düzelir. MODS, devam eden, düzensiz veya tedaviye dirençli SIRS yanıtının ilerleyici organ sistemi dengesizliği ile bir sonucu olarak görülebilir(44).

MODS'un başlangıcında ve yayılmasında ortak bir tema, düzensiz bir bağışıklık yanıtının varlığıdır. Devam eden doku hipoperfüzyonu muhtemelen akut inflamatuvar yanıtın aktivasyonuna, oksidatif dengesizliğe, hücresel proteinlerin yapısal olarak yeniden düzenlenmesine, bağışıklık sisteminin düzensizliğine, apoptotik yolların aktivasyonuna, hücre ölümüne ve organ disfonksiyonuna yol açar. İnflamasyon, doku hasarı ve enfeksiyondan iyileşme sırasında normal bir süreç olmasına rağmen, organ yetmezliği kalıcı proinflamatuvar bağışıklık sistemi aktivasyonundan kaynaklanabilir. Bu süreç mikrosirkülasyonda değişikliklere yol

açarak endotel hücre disfonksiyonu, endotel hücre glikokaliksinin kaybı, bozulmuş eritrosit deformabilitesi, artmış lökosit, trombosit adezyonu ve mikrovasküler trombus oluşumu ile sonuçlanarak hücrel hipoksi ve organ disfonksiyonuna neden olur(44).

2.6.2. Sepsisin Kalbe Etkisi

Şiddetli sepsis ile ilişkili kardiyovasküler değişiklikler arasında vazoplejik şok, miyokardiyal disfonksiyon, değişmiş mikrovasküler akış ve yaygın endotel hasarı yer almaktadır. Sepsis, trombositlerin ve lökositlerin yapışması ve aktivasyonu ile endotelial adezyon moleküllerinin artmış ekspresyonu ve aktivasyonu ve pıhtılaşma kaskadının aktivasyonu ile karakterizedir. Bu durum yaygın endotel hasarının yanı sıra endotelial glikokaliksin dökülmesiyle sonuçlanır ve bu da orantısız vazodilatasyonu, artmış vasküler geçirgenliği ve mikrovasküler trombozu daha da güçlendirir(44).

Vazodilatör şok veya vazopleji, vasküler düz kasın kasılmamasından kaynaklanır, arteriyel ve venöz dilatasyonla sonuçlanır. Vazoplejinin, NO üretiminin artmasıyla indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) ekspresyonunun artması, kas hücresi membranının hiperpolarizasyonu ile sonuçlanan K-ATPaz kanallarının aktivasyonu, natriüretik peptitlerin (NO ile sinerjik olarak hareket eden) üretiminin artması ve göreceli vazopressin eksikliğinden kaynaklandığına inanılmaktadır. Venodilatasyon venöz kapasitansı artırır, bu da venöz dönüşü azaltır ve vasküler sızıntının neden olduğu intravasküler hacim açığını artırır(44).

Sepsiste kardiyak fonksiyonu değerlendiren ilk çalışmalar sistolik fonksiyona odaklanmıştır. Bununla birlikte, diyastolik disfonksiyonun sistolik fonksiyondan daha belirleyici olduğu giderek daha fazla kabul görmektedir. Hafif derecede azalmış sistolik fonksiyon karşısında artmış ventriküler dolum başlangıçta atım hacmini (SV) korurken, bozulmuş ventriküler dolum ile diyastolik disfonksiyona ilerleme yeterli kompensasyonu engeller ve kalp debisi düşer. Bu hastalar, kardiyak dolum basınçlarını artıran ve SV'de minimum da olsa artışla pulmoner konjesyona yol açan sıvı yüklemesine kötü yanıt verir(44).

2.6.3. Sepsisin Akciğere Etkisi

Sepsisin en sık görülen komplikasyonlarından biri akut akciğer hasarıdır (ALI). Sepsis hastalarının yaklaşık %40'ında ALI/ARDS gelişir(47; 48). ALI/ARDS olan hastalarda mortalite son on yılda azalmış olsa da %30-60 gibi yüksek bir oranda seyretmeye devam etmektedir(49; 50). ALI, kısa vadede ölümün ve uzun vadede yaşam kalitesinin düşmesinin önemli bir nedenidir.

Akut akciğer hasarı (ALI) ve daha ağır formu olan akut solunum sıkıntısı sendromu (ARDS), akciğeri doğrudan veya dolaylı olarak etkileyen çeşitli patolojik süreçlerden kaynaklanabilir. Bakteriyel enfeksiyona yanıt olarak, akciğerlerdeki nötrofil aktivasyonu ALI'ye yol açar ve polimorfonükleer nötrofillerin (PMN) infiltrasyonu sepsis kaynaklı pulmoner disfonksiyon ve hasar için birincil mekanizmayı temsil eder(51). Vasküler geçirgenlikteki artışın neden olduğu proteinden zengin akciğer ödemi, ALI/ARDS'nin evriminin erken dönemindeki başlıca patolojik bulgudur. Alveolar taşma, alveolar kollaps (interstisyel ödemin neden olduğu), kompliyanın ve

fonksiyonel rezidüel kapasitenin azalmasına yol açar(47; 50; 52). ARDS, inflammatuar mekanizmalar nedeniyle normalde hava ile dolu olan alveollerde su ve hücrel materyal birikimi ile karakterizedir. Bununla birlikte, ARDS'nin fibro-proliferatif fazı sırasında ortaya çıkan fibrozisin havalanma kaybına yol açarak akciğerlerin radyolojik yoğunluğunun artmasına neden olduğu görülmüştür (52).

ALI, çok sayıda enflammatuar sitokin hücre içi ve hücre dışı matrikse salınarak akciğer dokusu hasarına, alveolar membran hasarına ve alveolar-kılcal difüzyon disfonksiyonuna yol açarak kalıcı hipoksemiye neden olur(50; 53). Sepsisin bir sonucu olarak kabul edilen akut solunum sıkıntısı sendromu (ARDS), tümör nekroz faktörü α (TNF- α) veya interlökin 1 β (IL-1 β) gibi proinflammatuar sitokinlerin aşırı salınımı da dahil olmak üzere birçok farklı olayın neden olduğu alveolar bariyer hasarı ile karakterizedir(54). İnflammatuar süreçte, doku yıkımı potansiyeli ile koruyucu immün savunma ve doku onarımı mekanizmaları arasında hassas bir denge mevcuttur. Erişkin solunum sıkıntısı sendromu (ARDS), inflammatuar dengenin doku hasarına doğru kaydığı bir hastalık durumu olarak karakterize edilmiştir. Aşırı inflammatuar reaksiyonlar ve özellikle nötrofil aktivasyonu ARDS patogenezinde rol oynamaktadır (55).

Diyabetiklerde ALI insidansı çok daha düşüktür ve solunum yetmezliği daha az görülür. Dolayısıyla, diyabet ALI'de koruyucu bir rol oynuyor gibi görünse de, bu korumanın mekanizmaları hala bilinmemektedir. Filgueiras ve arkadaşlarının sepsisli diyabetik ratlarda yaptığı bir çalışmada inflamasyonun azalmasının alveolar makrofajlarda NF-kB aktivasyonunun bozulmasıyla ilişkili olduğu bulmuşlardır(48).

2.6.4. Diyabetiklerde Sepsis

Diyabetes mellituslu hastalarda enfeksiyon ve sepsis gelişme riski artmıştır ve tüm sepsis hastalarının %20,1 - 22,7'sini oluşturmaktadır. Bu ilişki ilk olarak bin yıl önce, diyabetin sıklıkla tüberküloz ile komplike olduğunu kaydeden İbn-i Sina (980-1027) tarafından gözlemlenmiştir. Enfeksiyon, diyabet hastalarında morbidite ve mortalitenin önemli bir nedeni olmaya devam etmektedir ve muhtemelen konakçı yanıtında, özellikle nötrofil kemotaksisi, adezyon ve hücre içi öldürmede görülen anormalliklerden kaynaklanmaktadır. Humoral defektler mevcuttur (hem antikor yanıtlarında hem de kompleman opsonizasyonunda) ve fagositozda bir defekt olduğuna dair daha önceki raporlar mevcuttur(56). Enflamasyon ve doğuştan gelen bağışıklıktaki bu değişiklikler, diyabet hastalarının enfeksiyona karşı artan duyarlılığına katkıda bulunur(48). Diyabetli sepsis hastalarında, düzensiz bağışıklık mekanizmaları konakçı yanıtını büyük ölçüde artırmaktadır. Yetersiz glisemik yönetimin önemli sayıda ciddi enfeksiyona katkıda bulunduğu ortaya konulmuştur. Sepsis ayrıca bağışıklık sisteminin ömrünü kısaltarak üretme ve çalışma kabiliyetini azaltarak zarar verir. Zaman içinde bu bozulma bağışıklık sisteminin hassas dengesini bozar(57). Yaklaşık 85.000'i diyabetik (çoğunlukla T2DM) olmak üzere 150.000'den fazla hasta üzerinde yapılan büyük boyutlu retrospektif kohort çalışması, zayıf glisemik kontrol ile yüksek ciddi enfeksiyon riski (sadece sepsis değil) arasında güçlü bir ilişki olduğunu doğrulamıştır(58). Sepsisli 1.104 hastanın değerlendirildiği başka bir çalışmada 241 (%21,8) hastada DM öyküsü olduğu tespit edilmiştir(59).

Diyabetik hastalar sepsis sonrası komplikasyonları ve artan mortaliteyi yaşıyan en büyük popölasyonu oluşturmaktadır. Hem kronik hem de stres kaynaklı hiperglisemi ve T2DM ile ilişkili obezite ve dislipideminin neden olduğu inflamasyon ve insülin direnci dahil olmak üzere çeşitli metabolik anormallikler, enfeksiyonlara karşı konak tepkisini daha da kötüleştirmektedir. Özellikle, diyabetik hastalar glisemik kontrolden bağımsız olarak diyabetik olmayanlara kıyasla enfeksiyonlar için daha yüksek hastaneye yatış riski göstermiştir. Diyabetik hastalarda, kötü metabolik kontrol hastaneye yatış riskinin üç kat artmasıyla ilişkilendirilmiştir. Hem sepsis hem de kronik hiperglisemide, reaktif oksijen türleri ve inflamatuvar aracılarn oluşumu nedeniyle glikokaliks hasarı mikrosirkülasyonu etkiler ve organ hasarına yol açar. Diyabet ve şiddetli sepsisin bir arada bulunması ayrıca eritrosit deformabilitesini tehlikeye atar, mikrosirkülasyonu kötüleştirir ve organ disfonksiyonunun ilerlemesini hızlandırır(60).

2.7.Oksidatif stres

Oksidatif stres çeşitli hastalıkların önemli bir bileşeni olarak kabul edilmektedir. Bu çeşitli hastalıklarda oksidatif stres serbest radikaller ve radikal olmayan bileşiklerle oluşur. Serbest radikaller fizyolojik ya da patolojik reaksiyonlar sırasında oluşabilen eşlenmemiş elektronu bulunan atom ve moleküllerdir(61). En çok bilinen oksidatif bileşikler reaktif oksijen türleri (ROS) ve reaktif nitrojen türleri (RNS)'dir. ROS'lar süperoksit anyonu (O_2^-), hidroksil anyonu (OH^-) gibi oksijen merkezli radikaller veya hidrojen peroksit (H_2O_2), hipoklorik asit (HOCl) ve singlet oksijen gibi radikal olmayan oksijen türevlerinden

oluşur. Reaktif nitrojen türleri ise nitrik oksit (NO) ve azot dioksit (NO₂) gibi serbest radikaller veya peroksinitrit (ONOO⁻) ve nitroksil anyonu (NO⁻) gibi radikal olmayan türevlerden oluşur(62). İskemide arteriyel kan akışının engellenmesi doku hipoksisine, mitokondriyal elektron taşıma zinciri işlev bozukluğuna ve hücre içi antioksidan mekanizmaları aşan reaktif oksijen türlerinde (ROS) artışa neden olur. Artan ROS'un neden olduğu oksidatif stres, endotel disfonksiyonu, DNA hasarı ve artmış inflamatuvar yanıt ile sonuçlanır(2).

Mitokondriyal işlev bozukluğu aşırı ROS üretimine neden olarak oksidatif protein ve lipid hasarının artmasına, ATP üretiminin azalmasına ve DNA hasarının birikmesine yol açabilir(5). ROS çok aktif ve kararsızdır, oksidatif stres seviyesinin yanı sıra SOD, GSH-Px enzim aktivitesi ve malondialdehit (MDA) ekspresyonu yoluyla hasarın derecesini dolaylı olarak yansıtır(63).

2.7.1. Diyabette oksidatif stres

Oksidatif stresin insülin direnci ve diyabet gelişimi ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Giderek artan sayıda kanıt, DM hastalarının vasküler dokularında hiperglisemiye yanıt olarak oksidatif stresin arttığını göstermektedir. Hiperglisemi ile indüklenen ROS seviyesindeki artışın, diyabetik ratların sol ventrikülünde kasılma fonksiyonunda bozulmaya ve miyokardiyal fibrozise yol açtığı çeşitli raporlarda gösterilmiştir(30). Oksidatif stresin insülin sinyalizasyonunu ve iskelet kasındaki hücreye glukoz alımında sorumlu olan GLUT-4 taşıyıcısının translokasyonunun bozulduğu gösterilmiştir(64).

ROS eksikliği olan farelerin iskelet kası hücre dizilerinin kullanıldığı yeni bir çalışmada, ROS'un histon modifikasyonunu değiştirerek glukoz taşıyıcı transkripsiyonunu azalttığı bulunmuştur(65). Yüksek ROS seviyesinin insülin sinyalini bozduğu, pankreas hücrelerinin bunu bir dereceye kadar telafi edip yeterince yüksek insülin salgılayabildiği ve kan glukoz seviyesinin düşük tutulabildiği varsayılmaktadır. ROS sadece insülin direncine neden olmakla kalmaz, aynı zamanda insülin salgılanmasını da azaltır. Dolayısıyla, ROS'un bu mekanizmaları diyabet için tetikleyicidir ve buna karşılık, yüksek glikoz durumu yüksek oksidatif stresi indükler. Yüksek oksidatif stresin organ hasarının yanı sıra kan şekeri kontrolünü de kötüleştirdiği düşünülmektedir(66).

Oksidatif stresle sonuçlanan ROS'lar, süperoksit anyonu (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikalının (OH^-) aşırı üretimi, diyabette kalp, böbrek ve iskelet kası gibi hedef organ hasarının yaygın bir nedeni olarak kabul edilmektedir. Giderek artan sayıda kanıt, diyabetik kalpte ROS üretiminin arttığını göstermektedir. Özellikle, ROS diyabetik kalbin mitokondrisi içinde üretilir. ROS aracılı kardiyak hasara karşı ilk savunma hattı SOD, CAT ve GSH-Px dahil olmak üzere çeşitli antioksidan enzimlerden oluşur. Oksidatif stresin diyabette miyokardiyal yeniden şekillenmeye katkıda bulunduğu birkaç faktör olabilir. İlk olarak, oksidatif stres kardiyak miyosit hipertrofisi ve apoptozunda rol oynar. SOD'nin kısmi inhibisyonunun neden olduğu ROS'deki hafif bir artış, izole kardiyak miyositlerde hipertrofi ve apoptoz ile sonuçlanır ve her ikisinin de diyabetik miyokardiyal hasara katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Spesifik olarak, diyabetik kalpte apoptoz insidansı artar, bu da miyosit kaybına, kalıntı

miyositlerin telafi edici hipertrofisine ve interstisyel fibroza neden olabilir. İkinci olarak, oksidatif stres MMP'lerin aktivasyonunu indükler. MMP'lerin kardiyak fibroblastlarda ROS tarafından aktive edildiği gösterilmiştir. Bu bulgulara dayanarak, artmış ROS MMP aktivasyonuna ve dolayısıyla diyabette interstisyel fibrozis gelişimine katkıda bulunur. Üçüncü olarak, diyabetle ilişkili son organ komplikasyonlarında büyüme faktörlerinin olası rolü giderek daha fazla kabul görmektedir. TGF- β ve bağ dokusu büyüme faktörü kardiyak fibroblast ve miyositlerden kolajen ve fibronektin üretimini indükler ve her iki faktörün artmış ekspresyonu diyabette kardiyak yeniden şekillenmenin gelişimine ve ilerlemesine katkıda bulunur(67; 68).

Diyabette endotel, NO'nun işlevsel faaliyetlerine karşı koyan ve damar vazokonstriksiyonunun yanı sıra trombosit aktivasyonuna neden olan ve bu nedenle mikrovasküler hasardan en azından kısmen sorumlu olan daha fazla süperoksit (O_2^-) anyonu üretir. Aşırı O_2^- üretimi ve bunun sonucunda NO ve O_2^- arasındaki fizyolojik dengenin sağlanamaması sadece hipergliseminin dismetabolik sonuçlarından değil aynı zamanda endotel hücrelerine bağlı ksantin oksidaz miktarının artmasından da kaynaklanmaktadır(37).

Lizin ve arginin kalıntıları ile karbonhidratlar arasındaki reaksiyonlar (glikoksidasyon adı verilen bir reaksiyon) AGE'ler ile sonuçlanır. Bu süreç normal metabolizma sırasında da meydana gelir, ancak hiperglisemik, hiperlipidemik ve oksidatif stres koşulları altında daha da belirgindir(61).

2.7.2. Sepsiste oksidatif stres

Sepsis ve özellikle septik şok, yüksek oksidatif potansiyel hasarla ilişkili olarak düzenlenmemiş bir modda büyük miktarlarda serbest radikal üretimini indükler. Sepsis ve septik şokta oksidatif stresin varlığını gösteren çeşitli serbest radikal kaynakları tespit edilmiştir. ROS'ların erken üretimi deneysel çalışmalarda gösterilmiştir. Lipid peroksidasyonu gibi unsurlar belgelenmiş ve organların çoklu disfonksiyon gelişimiyle ilişkilendirilmiştir(69).

Septik modelde hayvanların %40-50'sinin septik sürecin başlamasından 18-24 saat sonra çoklu organ yetmezliği nedeniyle öldüğü dikkate alındığında, yetmezliğe yol açan olaylar dizisinin bu organlardaki oksidatif stres tarafından başlatıldığı düşünülmektedir. Sepsiste aşırı ROS üretiminin ortaya çıktığı ve yüksek lipid peroksidasyonu, azalmış C vitamini ve antioksidan enzimlerle ifade edilen kronik oksidatif stres ürettiği iyi bilinmektedir(69).

ROS ve RNS, IL-6, interferon- γ , lökotrienler, tromboksan, trombosit aktive edici faktör (PAF) gibi diğer sitokinler ve aracılar da sepsis sendromu ve septik şok gelişimine katılmaktadır. Bu olaylar dizisi nötrofillerin aktivasyonuna ve peritonitli hastalarda lipid peroksidasyonunda artışa yol açar. ROS normal hücre içi süreçlerle üretilir, ancak inflamatuvar uyaranlara yanıt olarak ve ayrıca inflamatuvar hücreler tarafından abartılı bir şekilde üretilir. Bu yüksek reaktif eşleşmemiş elektronlar, süperoksit radikalleri üretmek için moleküler oksijenin indirgenmesine neden olur. SOD süperoksidin H_2O_2 dönüşümünü katalize ederken, GSH-Px H_2O_2 'in suya

dönüşümünü katalize eder. Septik şokta, serbest radikallerin aşırı üretimi nedeniyle bu enzimlerin seviyeleri ve aktiviteleri azalır(70).

Bu aşırı sitokinler veya kemokinler makrofajları ve nötrofilleri enfekte bölgeye çeker ve daha sonra sitotoksik ROS salgılar, sonuç olarak immün yanıtı daha şiddetli hale getirir. Enfeksiyöz faktörlerin varlığı, fagositozun engellenmesi veya antibiyotiklere karşı kazanılmış direnç, enfeksiyona karşı konak yanıtını yetersiz hale getirebilir. TNF- α ve IL-1 β gibi sitokinler immün yanıtın erken fazını düzenler. Oksidatif stres, enflamasyona ve dolayısıyla doku yıkımına katkıda bulunarak sepsis vakalarının seyrini olumsuz yönde etkilemektedir. Normal koşullar altında oksidanlar ve antioksidanlar denge halindedir, ancak hücrelerdeki oksidan konsantrasyonu arttığında bu durum değişir ve çeşitli organların işleyişini bozar. Hayvan modelleri üzerinde yapılan son çalışmalarda, oksidatif stres belirteçlerinin sepsisle ilişkili olarak değiştiği gösterilmiştir. Azalmış SOD ve GSH enzim aktiviteleri ve artmış MDA seviyeleri sepsis belirteçleri olarak kullanılmaktadır. Sepsis, hastaların bağışıklık tepkilerini aktive eden bakteri veya diğer faktörlerin varlığının bir sonucudur ve akciğer hasarı da dahil olmak üzere organ hasarına neden olur. Kontrolsüz inflamatuvar yanıtlar, artan ROS aktivitesi ve yükselen sitokin seviyeleri yoğun bakım ünitelerindeki hastaların hayatını tehdit etmektedir. Kumarin gibi antioksidan moleküller, artan oksidatif stresi önlemeye ve sepsis vakalarında görülen sitokin fırtınalarını sınırlamaya yardımcı olabilir(54).

2.7.3. Kalpte oksidatif stres

ROS aerobik metabolizmanın normal bir yan ürünüdür. ROS, iskemi-reperfüzyon hasarı, miyokardiyal stunning, apoptoz, inflamasyon ve arterioskleroz gibi kardiyovasküler sistemin birçok bozukluğunda kritik bir rol oynamaktadır(71; 72). Kalpte ROS için potansiyel kaynaklar mitokondri, ksantin oksidaz (XO), sitokrom P450 bazlı enzimler(71) ve NADPH oksidaz (NOX)'ı içerir. ROS, iyon kanalları, sarkoplazmik retikulum kalsiyum salım kanalları ve miyofilament proteinleri gibi miyokardiyal uyarım-kasılma bağlantısında yer alan temel proteinler ve miyosit büyümesine bağlı sinyal yolları dahil olmak üzere çeşitli hücre içi proteinlerin ve sinyal yollarının aktivitesini modüle edebilir. "Oksidatif stres", ROS üretimi antioksidan savunma sistemlerinin tamponlama kapasitesini aştığında ortaya çıkar ve hücre içinde aşırı ROS'a yol açar(72). Belirli koşullar altında ROS birikimi, mitokondri tarafından apoptotik hücre ölümüne yol açabilecek bir ROS üretim patlamasını ("ROS kaynaklı ROS salınımı") tetikleyebilir. SOD, CAT ve GSH-Px oksidatif hasara karşı hücresel savunmanın ana enzimatik bileşenleridir(71).

Fizyolojik koşullar altında mitokondri, kardiyomiyositlerde oksidatif fosforilasyon yoluyla bol miktarda ATP üretir. Asetil-CoA üretmek için piruvat ve FFA'ları verimli bir şekilde metabolize ederler ve solunum zincirindeki elektron indirgeme işlemi az miktarda oksijeni ROS'a indirger. Bu süreç NADPH oksidaz (NOX), ksantin oksidaz (XO) ve monoamin oksidaz (MAO) gibi enzimleri gerektirir(10; 35; 73).

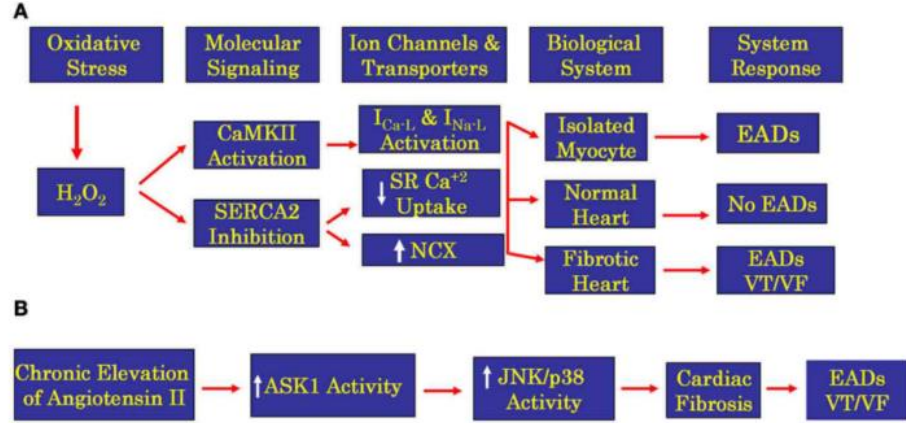
Kardiyomiyositlerde fazla ROS üretimi, mitokondriyal DNA hasarı, lipid peroksidasyonu ve proteinlerin post-translasyonel modifikasyonunun yanı sıra inflamasyon, kardiyak hipertrofi ve fibrozis ile sonuçlanan ve nihayetinde hücre ölümüne ve kardiyak disfonksiyona yol açan bir kısır döngüdür. ROS'un DKM gelişiminde rol oynayan çeşitli sinyal yollarını etkilediği gösterilmiştir(35).

Süperoksit anyonları (O_2^-) ile tüm hücrel makromoleküllerin (nükleik asitler, proteinler ve lipitler gibi) işlevine ve yapısına zarar verebilen 1) değişmiş bir Ca^{+2} regülasyonu ve elektriksel yeniden şekillenme ile ilişkili yolların aktive edilmesi, 2) kardiyomiyosit hipertrofinin uyarılması, 3) apoptozun indüklenmesi, 4) fibrozisin teşvik edilmesi ve 5) inflamatuvar yanıtın aktivasyonu veya engellenmesine neden olur. Tüm bu değişiklikler kalp yetmezliğinin gelişiminde kilit unsurlar olarak kabul edilmektedir(68; 73).

Oksidatif stresin en yaygın kullanılan göstergeleri izoprostanlar, malondialdehit, S-glutatyonilasyon, oksitlenmiş fosfolipidler, nitrotirozin, miyeloperoksidaz (MPO), oksitlenmiş düşük yoğunluklu lipoprotein, gama glutamil transferaz ve oksitlenmiş nükleik asitlerdir(73).

Hayvan ve klinik çalışmaları, kalp hastalıklarında yaygın bir patofizyolojik faktör olan oksidatif stresin, L-tipi kalsiyum akımını, geç Na ve Na-Ca değiştiricisini artırarak repolarizasyon rezervini azalttığını ve yapısal olarak yeniden modellenmiş kalplerde ventriküler taşikardi ve ventriküler fibrilasyonu (VT/VF) başlatabilen erken afterdepolarizasyonları (EAD)'ler teşvik ettiğini göstermiştir. Artan ventriküler fibrozis, oksidatif strese bağlı EAD'lerin tetiklenmiş aktivite ve VT/VF olarak ortaya çıkmasına izin vermede önemli bir kolaylaştırıcı

rol oynamaktadır, çünkü fibrotik olmayan normal kalpler benzer veya daha yüksek oksidatif stres seviyelerine maruz kaldıklarında aritmilere karşı dirençlidir(74).



Şekil 7: Oksidatif stresin kalp ritmine etkisi(74)

2.7.4. Akciğerde oksidatif stres

Hipoksik bir ortama hızlı bir şekilde maruz kaldıktan sonra, hipoksik ortama uyum sağlamak ve hatta akciğer dokusuna zarar vermek için oksidatif stres yanıtı olarak bir dizi reaksiyon meydana gelir. Ana belirtiler arasında her iki akciğerde yaygın şişme ve hiperemi, alveolar boşluğa proteinden zengin sıvının önemli ölçüde sızması, alveolar boşluğun kalınlaşması, makrofajların aktivitesinin artması ve inflamatuvar hücrelerin infiltrasyonu yer almaktadır(63).

ROS üretimi ve antioksidanların ortadan kaldırılması istikrarlı bir dinamik denge oluşturur. Organizma hipoksik strese maruz kaldığında, oksijensiz radikaller hücrelerde birikerek lipidlere, proteinlere ve DNA'ya zarar verir ve böylece akciğer dokusunda hasara neden olur. Pu ve arkadaşları hipoksik stres uzadıkça SOD ve GSH-Px aktivitelerinin azaldığını ve MDA ekspresyonunun arttığını; yani hipoksik

stres altındaki akciğer dokusunda oksidatif hasar oluştuğunu göstermiştir. Oksidatif hasar makrofajları doğrudan uyarabilir(63).

Çok sayıda çalışma ROS ve pulmoner hipertansiyon arasındaki ilişkiyi ortaya koymuştur. Kemirgen modelinde, hipoksik durum pulmoner hipertansiyon için bir modeldir ve hipoksi akciğerde Adrenomedullin transkripsiyonunu indükler. Adrenomedullin eksikliği olan fareler de üç hafta boyunca %10 O₂ koşullarında barındırıldıklarında pulmoner hipertansiyon geliştirmişlerdir. Pulmoner arter yeniden şekillenmesi, vahşi tip farelere kıyasla Adrenomedullin eksikliği olan farelerde belirgindi ve Adrenomedullin eksikliği olan farelerde ROS üretimi de artmıştı. Kemirgenlerdeki etkiye dayanarak, adrenomedullinin pulmoner hipertansiyonlarda kullanımını araştırmak için çalışmalar yapılmış ve Adrenomedullinin yararlı hemodinamik etkilere sahip olduğu bulunmuştur. Liu ve arkadaşları, murin NOX2 geninin bozulmasının kronik hipoksiye bağlı PAH ve vasküler yeniden şekillenmeyi tamamen ortadan kaldırdığını göstermiştir(75).

2.8.Antioksidan Savunma Sistemleri

Oksidatif stres, ROS ve RNS aşırı üretimini ifade eder, hücre içi antioksidan savunma sistemini alt eder ve iki sistem arasında bir dengesizlikle sonuçlanır. Endojen antioksidanlar enzimatik veya non-enzimatik olabilirler. A, C, E vitaminleri, glutatyon, keratonoidler, alfa lipoik asit, koenzim Q10, mineraller, kofaktörler, non-enzimatik antioksidanlardır. Enzimatik antioksidanlar ise SOD, CAT, GSH-Px, glutatyon-S transferaz (GST), glikoz-6-fosfat-dehidrogenaz (G6PD)dir(62; 76; 77).

Süperoksit anyonu SOD ve CAT tarafından hidrojen peroksit ve suya katalize edilir; her ikisi de antioksidatif savunma sisteminin anahtar enzimleri olarak kabul edilir. GSH-Px reaktif oksijen ara ürünlerinin biyomembranların fosfolipitleri, nükleik asitler ve proteinler gibi kritik hücrel bileşenlerle etkileşime girmesini önler(78). H_2O_2 'nin kendisi eşleşmemiş bir elektrona sahip değildir ve serbest bir radikal değildir, ancak kimyasal olarak oldukça reaktif olan hidroksil radikalleri ($HO^\cdot$) üretmek için Fenton reaksiyonu yoluyla Fe^{+3} ile reaksiyona girer. H_2O_2 , CAT veya GSH-Px tarafından H_2O ve O_2 'ye indirgenir(66). Egzersiz eğitiminin plazma ve trombositlerdeki antioksidan enzimler SOD ve katalazın aktivitesinde önemli bir artışa neden olduğu, bunun da hem lipid hem de protein oksidatif hasarında ve sistemik enflamasyonda azalmaya yol açtığı bildirilmiştir(73).

Organ hasarına karşı koruma sağlamak için ROS seviyelerini azaltmanın yolları olarak çeşitli hedefler vardır. Bunlar arasında ROS üretiminin önlenmesi, ROS'ların mümkün olduğunca çabuk temizlenmesi, hasarlı organın değiştirilmesi ve uygun zamanlama ve uygun lokalizasyon ile koruyucu fonksiyonun indüklenmesi yer alır. Bununla birlikte, lökositler tarafından üretilen ROS enfeksiyona karşı önemli bir koruyucu rol oynar ve bu nedenle ROS inhibe edici sinyallerin uygun zamanda ve uygun organda indüklenmesi gerekir(66).

2.8.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)

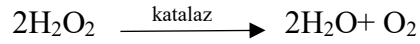
Tek bir elektronun O_2 'ye aktarılması, potansiyel olarak zarar verici süperoksit anyon radikali (O_2^-) oluşturur ve bu da serbest radikal zincir reaksiyonlarına yol açarak yıkıcı etkilerini artırır(79). Süperoksit, çeşitli kaynaklardan üretilen birincil ROS olduğundan, SOD tarafından parçalanması her hücre için birincil öneme sahiptir(80).

SOD, süperoksit (O_2^-) radikallerinin moleküler oksijen (O_2) veya hidrojen peroksite (H_2O_2) dönüşümünü katalize ederek OH^- radikallerinin oluşumunu engelleyen bir enzimdir(2; 79).

SOD'nin 3 formu bakır ve çinko içeren süperoksid dismutaz (CuZnSOD), mitokondrial süperoksit dismutaz (Mn-SOD) ve ekstrasellüler süperoksit dismutaz (EC-SOD), insan akciğerinde yaygın olarak ifade edilir. Mn-SOD mitokondri matriksinde lokalizedir. EC-SOD öncelikle ekstrasellüler matrikste, özellikle yüksek miktarda tip I kolajen lifleri içeren alanlarda ve pulmoner ve sistemik damarların çevresinde lokalizedir(81). Genel olarak, Cu-Zn-SOD ve Mn-SOD'un süperoksit radikallerinin toplu temizleyicileri olarak hareket ettiği düşünülmektedir. Hücre dışı matris bileşenlerine spesifik bağlanmasıyla akciğerdeki nispeten yüksek EC-SOD seviyesi, akciğer matris korumasının temel bir bileşenini temsil eder(66; 80).

2.8.2. Katalaz (CAT)

Katalaz, her biri aktif bölgede bir hem grubu içeren 4 özdeş monomerden oluşan bir tetramer olarak bulunur. SOD'ların veya ksantin oksidaz gibi oksidazların etkisiyle üretilen H₂O₂, katalaz ve GSH-Px tarafından suya indirgenir(79; 80).



Bu reaksiyon, substrat elektron vericisi olarak bir H₂O₂ molekülü ve bir oksidan veya elektron alıcısı olarak başka bir H₂O₂ molekülü kullanır. Bilinen en hızlı enzim reaksiyonlarından biridir ve saniyede milyonlarca potansiyel olarak zarar verici H₂O₂ molekülünü yok eder. Katalaz kan, kemik iliği, mukoza zarları, böbrek ve karaciğerde bulunur. Peroksizomlar, karaciğer de dahil olmak üzere birçok dokuda bulunan membrana bağlı organellerdir, oksidazlar ve katalaz bakımından zengindirler. Böylece H₂O₂ üreten ve parçalayan enzimler aynı hücre altı kompartman içinde bulunur. Bununla birlikte, mitokondriyal ve mikrozomal elektron taşıma sistemleri ile ksantin oksidaz ek H₂O₂ kaynakları olarak düşünülmelidir(79).

Bu antioksidanların ortak özelliği, indirgeyici eşdeğer olarak NADPH'ye ihtiyaç duymalarıdır. NADPH katalazı aktif formda tutar ve GSH-Px'ler için bir yardımcı substrat olan GSSG'yi GSH'ye dönüştüren tioredoksin (TRX) ve GSH redüktaz tarafından bir kofaktör olarak kullanılır. Glukoz-6-fosfat dehidrojenaz, NADPH üreterek sitozolik GSH tamponlama kapasitesinin (GSH/ GSSG) kritik bir belirleyicisidir ve bu nedenle temel, düzenleyici bir antioksidan enzim olarak kabul edilir(80).

2.9.Malondialdehit (MDA)

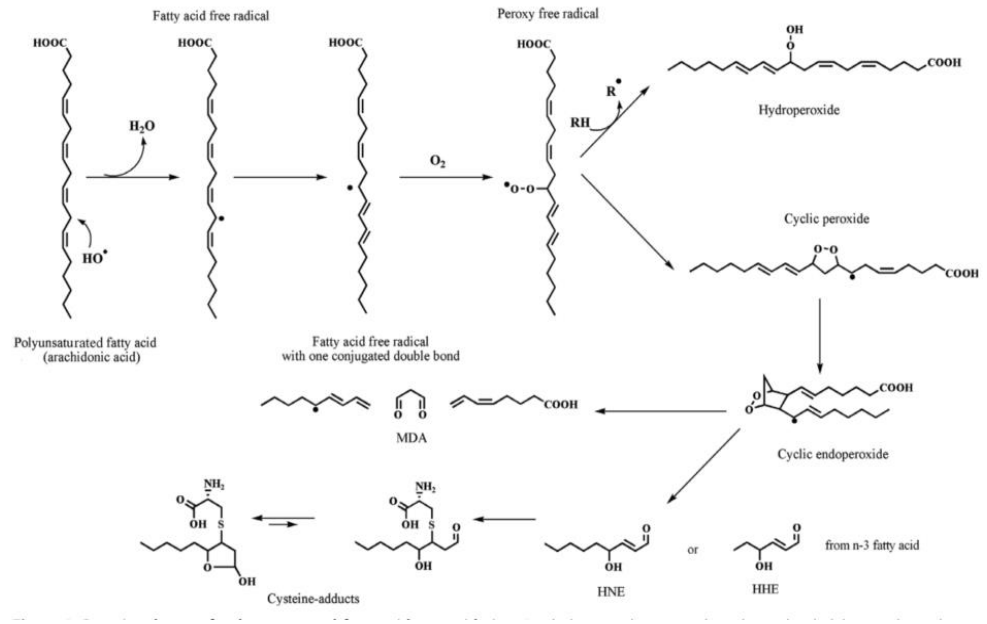
Lipit peroksidasyon süreçleri (LPP) ve lipitlerin bileşimi arasındaki karşılıklı bağımlılık hem fizikokimyasal bir düzenleme sistemi hem de bakteri hücre zarlarının lipitlerinin bileşiminin normal yenilenme biçimlerinden biri olarak düşünülebilir. Bununla birlikte, lipidlerin uzun süreli enzimatik olmayan serbest radikal oksidasyonu, membranların fizikokimyasal yapısında keskin bir bozulmaya yol açar. Bu, özellikle geçirgenlik, lipid-protein komplekslerinin stabilitesi ve lipide ve membrana bağlı enzimlerin inaktivasyonu ile ilgilidir. Oksidatif stresin değerlendirilmesi için en popüler belirteçlerden biri hem enzimatik hem de enzimatik olmayan LPP için endojen genotoksik ürün olan malondialdehittir (MDA)(82).

PUFA'lar, özellikle linoleik ve araşidonik asit (AA), lipid peroksidasyonunun önemli hedefleridir. Lipid oksidasyonuna uğrayan PUFA'ların türüne bağlı olarak, bunlar trans-4-hidroksi-2-nonenal (4-HNE), malondialdehit (MDA) ve diğerlerini içerir. Lipidlerden türetilen aldehitler çok reaktiftir ve bu nedenle genellikle ileri lipoksidasyon son ürünleri olarak adlandırılan Michael eklentilerini oluşturmak için proteinlerle kolayca reaksiyona girer. AA'nın radikal aracılı oksidasyonu, esterleşmiş olup olmadığından bağımsız olarak gerçekleşir (fosfolipidler, triaçilgliseroller veya kolesteriller gibi)(61).

Hem MDA hem de 4-HNE'nin tespiti için farklı yöntemler mevcuttur. Spiteller'in çeşitli kronik hastalıklarda lipid peroksidasyonunun rolünü gözden geçirmesinden bu yana, lipid oksidasyon son ürünleri oksidatif stres belirteçleri

olarak ortaya çıkmış olup, 4-HNE ve MDA en çok araştırılanlar arasındadır. Yaygın kullanımlarına rağmen hem MDA hem de 4-HNE'yi tespit eden tüm yöntemlerin tuzakları vardır. Tiyobarbitürik asit reaktif maddeleri (TBARS) testinde, ölçülen MDA'nın %98'ine kadarı prosedür sırasındaki yüksek sıcaklık koşulları tarafından oluşturulabilir. Genel olarak, doğrudan MDA ve 4-HNE ölçümü duyarsızdır çünkü bu reaktif ürünlerin büyük çoğunluğu proteinlere ve diğer biyomoleküllere bağlanır ve testten önce salınmadığı sürece tespit edilemez(61).

Plazma-oksitlenmiş düşük yoğunluklu lipoproteinler, malondialdehit ve MPO (lökosit aktivasyonunun bir indeksi), idrar biyopirinleri (bilirubinin oksidatif metabolitleri), plazma ve idrar izoprostan seviyeleri gibi oksidatif stres belirteçlerinin, KY'nin patogenezi veya KY için risk altındaki kişilerin belirlenmesi, gelecekteki risk tabakalandırması, KY'nin teşhisi veya biyobelirteç olarak tedavisinin izlenmesi ile ilgili önemli bilgiler sağlaması beklenmektedir(68).



Şekil 8:PUFA peroksidasyon şeması(28)

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulundan 01.05.2024 tarih ve G.Ü.ET-24.039 kod numaralı etik kurul onayı alındıktan sonra gerçekleştirildi.

3.1. Denek Seçimi

Gazi Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi (GÜDAM) Laboratuvarında gerçekleştirilen bu çalışmada, ağırlıkları 25-30 gr arasında değişen 46 adet erişkin erkek Swiss Albino cinsi fare kullanıldı. Fareler 20-21 °C ısıda, 12 saat gece 12 saat gündüz periyotları sağlanan özel çelik kafeslerde saklandı. Beslenme ve su ihtiyaçları serbest beslenme şeklinde sağlandı.

3.2.Kullanılan İlaç

Çalışmada 1 gramlık toz halinde streptozosin içeren flakon kullanılmadan hemen önce pH 4,5 olan 0,1 Molar sitrat tamponu içinde taze olarak hazırlandı. Kullanılan ozonun dozu: 20 mcg/ml

3.3.Kullanılan Yöntem

Çalışmada ağırlıkları 25-30 gr arasında değişen 46 adet, erkek Swis albino fare kullanıldı. Fareler rastgele 6 gruba ayrıldı (Sham, Diabet, Diabet+Ozon, Diabet+Çekal Perforasyon, Diabet+Çekal Perforasyon + Ozon 1, Diabet+Çekal Perforasyon + Ozon 2).

Tablo 8: Deney grupları

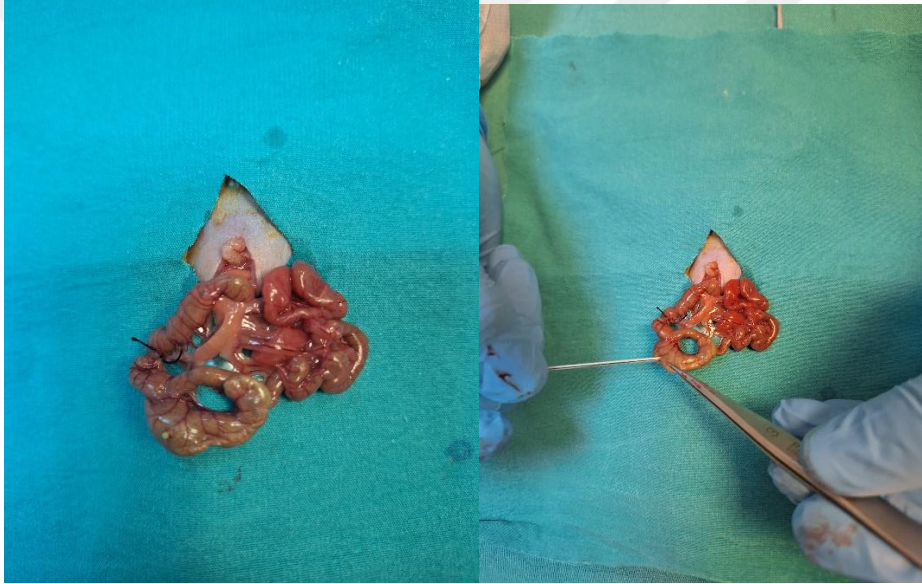
Grup 1	Sham(kontrol) (K)	n=6
Grup 2	Diabet (D)	n=8
Grup 3	Diabet+Ozon (DO) (Grup 4 ile eş zamanlı)	n=8
Grup 4	Diabet+Çekal Perforasyon (DÇLP)	n=8
Grup 5	Diabet+Çekal Perforasyon +Ozon 1(DÇLPO) (Perforasyondan sonra)	n=8
Grup 6	Diabet+Çekal Perforasyon +Ozon 2 (DOÇLP) (Perforasyondan önce)	n=8

3.3.1. Diyabetin Oluşturulması

Araştırma amacı ile 46 adet erişkin erkek Swiss cinsi albino fare kullanıldı. 40 tanesine DM oluşturmak için tek seferde intraperitoneal olarak 125 mg/kg streptozotosin enjekte edildi. Enjeksiyondan 72 saat sonra kuyruk venlerinden kan şekeri bakılıp, kan şekerleri 250 mg/dl ve üzerinde saptanırsa fareler diyabetik olarak kabul edildi. Streptozotosin enjeksiyonundan sonra, 4 hafta boyunca, diyabetin organlar üzerine kronik etkileri gözlenmesi için farelerin bakımları sağlandı. Bu süre zarfında farelerin kilo kaybını önlemek ve ketoasidoz gelişimini engellemek için insülin tedavisi (1-3 Ü/gün) uygulandı.

3.3.2. Sepsisin Oluşturulması

Çalışmada farelerde sepsis laparotomi sonrası çekum izole edilerek, çıkan kolon sıvazlanıp, çekum gaita ile doldurulduktan sonra ileoçekal valvin altından 3/0 ipek ile bağlanıp, çekum önyüzü 18 numara intraket iğnesi ile iki defa delinerek oluşturuldu.



Şekil 9: Çekal ligasyon ve Çekal delme

3.4. Deney Grupları

Kontrol (Sham) Grubu (Grup 1): Bu gruptaki farelere intramusküler enjeksiyonla, 50 mg/kg dozda ketamine hydrochloride ve 5 mg/kg'dan xylazine hydrochloride verilip anestezi sağlandı. İşlem, bir ısıtma lambası altında, fareler supin pozisyonda iken gerçekleştirildi. Ciltleri aseptik olarak hazırlanan farelere orta hat laparotomi yapıldı. Barsakların ıslak gazlı bez yardımıyla uzaklaştırılması

ardından, sham grubu farelerde çekum manipüle edildi, ancak delme ve bağlama işlemi yapılmadı. Peritoneal boşluktan ısı ve sıvı kaybını en az miktara indirmek için, peritoneal boşluğa serum fizyolojik uygulandı. Batın iki tabaka halinde 3/0 ipekle primer suturele kapatıldı. 24. saatte intraperitoneal uygulanan ketamin ve xylazine anestezisi altında intrakardiyak alınan kan ile kurban edilmek için kalp, akciğer doku örnekleri histopatolojik ve biyokimyasal değerlendirmeler yapılmak üzere alındı.

Diyabet-Sham grubu (Grup 2, n=8): Diyabet oluşturulan gruptaki farelere intramusküler enjeksiyonla, 50 mg/kg dozda ketamine hydrochloride ve 5 mg/kg'dan xylazine hydrochloride verilerek anestezi sağlandı. İşlem, bir ısıtma lambası altında, fareler supin pozisyonda iken gerçekleştirildi. Ciltleri aseptik olarak hazırlanan farelere orta hat laparotomi yapıldı. Barsakların ıslak gazlı bez yardımıyla uzaklaştırılması ardından, sham grubu farelerde çekum manipüle edildi, ancak bağlama ve delme işlemi yapılmadı. Peritoneal boşluktan ısı ve sıvı kaybını en az miktara indirmek için, peritoneal boşluğa serum fizyolojik uygulandı. Batın iki tabaka halinde 3/0 ipekle primer suturele kapatıldı. 24. saatte intraperitoneal uygulanan ketamin ve xylazine anestezisi altında intrakardiyak alınan kan ile kurban edilmek için kalp, akciğer doku örnekleri histopatolojik ve biyokimyasal değerlendirmeler yapılmak üzere alındı.

Diabet+Ozon Grubu (Grup 3, n=8): Diyabet oluşturulan gruptaki farelere İP 1 mL ozon (20 µ/mL) verildi. İntramusküler enjeksiyonla, 50 mg/kg dozda ketamine hydrochloride ve 5 mg/kg'dan xylazine hydrochloride verilerek anestezi

sağlandı. İşlem, bir ısıtma lambası altında, fareler supin pozisyonunda iken gerçekleştirildi. Ciltleri aseptik olarak hazırlanan farelere orta hat laparotomi yapıldı. Barsakların ıslak gazlı bez yardımıyla uzaklaştırılması ardından, bu gruptaki farelerde çekum manipüle edildi, ancak bağlama ve delme işlemi yapılmadı. Peritoneal boşluktan ısı ve sıvı kaybını en az miktara indirmek için, peritoneal boşluğa serum fizyolojik uygulandı. Batın iki tabaka halinde 3/0 ipekle primer sütürle kapatıldı. 24. saatte intraperitoneal uygulanan ketamin ve xylazine anestezisi altında intrakardiyak alınan kan ile sakrifiye edilerek kalp, akciğer doku örnekleri histopatolojik ve biyokimyasal değerlendirmeler yapılmak üzere alındı.

Diabet+Çekal Perforasyon Grubu (Grup 4, n=8): Diyabet oluşturulan gruptaki farelere İP 1 mL serum fizyolojik verildi. İntramusküler enjeksiyonla, 50 mg/kg dozda ketamine hydrochloride ve 5 mg/kg'dan xylazine hydrochloride verilerek anestezi sağlandı. İşlem, bir ısıtma lambası altında, fareler supin pozisyonunda iken gerçekleştirildi. Ciltleri aseptik olarak hazırlanan fareler orta hat laparotomi yapıldı. Laparotomi sonrası çekum izole edilerek, çıkan kolon sıvazlanarak, çekum gaita ile doldurulduktan sonra ileoçekal valvin altından 3/0 ipek ile bağlanıp, çekum önyüzü 20 G intraket iğnesi ile iki defa delindi. Batın iki tabaka halinde 3/0 ipekle primer sütürle kapatıldı. 24. saatte intraperitoneal uygulanan ketamin ve xylazine anestezisi altında intrakardiyak alınan kan ile sakrifiye edilerek kalp, akciğer doku örnekleri histopatolojik ve biyokimyasal değerlendirmeler yapılmak üzere alındı.

Diabet+Çekal Perforasyon – Ozon 1 Grubu (Grup 5, n=8): Diyabet oluşturulan gruptaki farelere intramusküler enjeksiyonla, 50 mg/kg dozda ketamine

hydrochloride ve 5 mg/kg'dan xylazine hydrochloride verilerek anestezi sağlandı. İşlem, bir ısıtma lambası altında, fareler supin pozisyonda iken gerçekleştirildi. Ciltleri aseptik olarak hazırlanan fareler orta hat laparotomi yapıldı. Laparotomi sonrası çekum izole edilerek, çıkan kolon sıvazlanarak, çekum gaita ile doldurulduktan sonra ileoçekal valvin altından 3/0 ipek ile bağlanıp, çekum önyüzü 20 G intraket iğnesi ile iki defa delindi. Batın iki tabaka halinde 3/0 ipekle primer sütünle kapatıldı. Bu gruptaki farelere operasyondan 1 saat sonra İP 1 mL ozon (20 µ/mL) verildi. 24. saatte intraperitoneal uygulanan ketamin ve xylazine anestezisi altında intrakardiyak alınan kan ile sakrifiye edilerek kalp, akciğer doku örnekleri histopatolojik ve biyokimyasal değerlendirmeler yapılmak üzere alındı.

Diabet+Çekal Perforasyon – Ozon 2 Grubu (Grup 6, n=8): Diyabet oluşturulan gruptaki farelere işlemden bir saat önce İP 1 mL ozon (20 µ/mL) verildi. Daha sonra intramusküler enjeksiyonla, 50 mg/kg dozda ketamine hydrochloride ve 5 mg/kg'dan xylazine hydrochloride verilerek anestezi sağlandı. İşlem, bir ısıtma lambası altında, fareler supin pozisyonda iken gerçekleştirildi. Ciltleri aseptik olarak hazırlanan fareler orta hat laparotomi yapıldı. Laparotomi sonrası çekum izole edilerek, çıkan kolon sıvazlanarak, çekum gaita ile doldurulduktan sonra ileoçekal valvin altından 3/0 ipek ile bağlanıp, çekum önyüzü 20 G intraket iğnesi ile iki defa delindi. Batın iki tabaka halinde 3/0 ipekle primer sütünle kapatıldı. 24. saatte intraperitoneal uygulanan ketamin ve xylazine anestezisi altında intrakardiyak alınan kan ile sakrifiye edilerek kalp, akciğer doku örnekleri histopatolojik ve biyokimyasal değerlendirmeler yapılmak üzere alındı.

3.5.Dokuların Saklanması

Sakrifikasyon sonrasında kalp ve akciğer dokuları bütünlük bozulmayacak ve travmatize edilmeyecek şekilde alındı. Doku örnekleri; histopatolojik değerlendirme yapılmaya kadar %10'luk formaldehid solüsyonu içinde saklandı. Biyokimyasal değerlendirme yapmak için ise -70 derecede saklandı.

3.6.Histopatolojik İnceleme

Deney sonunda toplanan kalp ve akciğer doku örneklerinin %10'luk nötral formalin içerisinde fiksasyonunun ardından rutin doku takibi sonucu parafin blokları elde edilip parafin doku bloklarından alınan 5 µm kalınlığındaki akciğer ve kalp doku kesitlerinin Hematoksilen&Eozin (H&E) ile boyanarak hazırlanan örnekleri Leica DM 4000B (Germany) bilgisayar destekli ışık mikroskopunda incelenecek ve elde edilen görüntüler, Leica LAS V4.9 programında değerlendirildi. Işık mikroskopik gözlem sonucunda akciğer ve kalp dokularındaki histopatolojik değişiklikler skorlanarak semikantitatif olarak değerlendirildi.

3.6.1. Akciğer Dokusunun Histopatolojik İncelemesi

Akciğer dokusunda histopatolojik değişiklik olarak; interstisyel ödem, interstisyel hemoraji, alveolar konjesyon, nötrofil infiltrasyonu/agregasyonu, alveolar duvar kalınlaşması ve toplam hasar skoru değerlendirildi.

3.6.2. Kalp Dokusunun Histopatolojik İncelemesi

Kalp dokusunda, inflamasyon-nötrofil infiltrasyonu, miyokardiyal dizorganizasyonu, interstisyel fibrozis, interstisyel ödem, miyokardiyal hücrelerde şişme ve miyokardiyal nekroz değerlendirildi.

3.7.Biyokimyasal İnceleme

Biyokimyasal inceleme Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya AD'' da değerlendirildi. Akciğer ve kalp dokularındaki oksidatif stres ve lipid peroksidasyonunu değerlendirmek için MDA ve serbest radikal metabolizmasında etkin olan enzimlerden CAT, SOD aktiviteleri değerlendirildi.

3.8.İstatiksel Değerlendirme

Çalışma verileri SPSS (Statistic Program for Social and Science) istatistik programı kullanılarak analiz edildi. İstatistiksel değerlendirme SPSS 20.0 bilgisayar programında aşağıda sıralanan testler kullanılarak gerçekleştirildi ve $p<0.05$ anlamlı kabul edildi. İstatistiksel analiz: veriler [ortalama $\pm$ standart sapma, ortanca, (%25-%75) olarak] değerlendirildi. Ölçülebilen parametrelere Kolmogorov-Smirnov testi uygulanarak dağılımın normal ya da anormal olup olmadığı belirlendi. Normal dağılım gösteren veriler ortalama $\pm$ standart sapma, diğerleri ise ortanca, (%25- %75) olarak belirtildi. 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

İnterstisyel ödem gruplar arasında anlamlı olarak farklı bulundu ($p=0.026$). DÇLP grubunda K, D ve DO gruplarına göre interstisyel ödem daha fazla görüldü ($p=0.001$, $p=0.026$, $p=0.007$, sırasıyla). İnterstisyel ödem DÇLPO ve DOÇLP gruplarında DÇLP grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu ($p=0.026$, $p=0.007$, sırasıyla), (Tablo-9, Şekil 10-15).

İnterstisyel hemoraji gruplar arasında anlamlı olarak farklı bulundu ($p=0.007$). DÇLP grubunda K, D ve DO gruplarına göre interstisyel hemoraji daha fazla görüldü ($p<0.001$, $p=0.042$, $p=0.003$, sırasıyla). Ayrıca D ve DÇLPO gruplarında K grubuna göre interstisyel hemoraji daha fazla görüldü ($p=0.042$, tümü). İnterstisyel hemoraji DÇLPO ve DOÇLP gruplarında DÇLP grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu ($p=0.042$, $p=0.012$, sırasıyla), (Tablo-9, Şekil 10-15).

Alveolar konjesyon gruplar arasında anlamlı olarak farklı bulundu ($p=0.020$). DÇLP grubunda K ve DO gruplarına göre alveolar konjesyon daha fazla görüldü ($p=0.001$, $p=0.007$, sırasıyla). Alveolar konjesyon DOÇLP grubunda DÇLP grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu ($p=0.007$), (Tablo-9, Şekil 10-15).

Nötrofil infiltrasyonu/agregasyonu gruplar arasında anlamlı olarak farklı bulundu ($p=0.004$). DÇLP grubunda K ve DO gruplarına göre nötrofil infiltrasyonu/agregasyonu daha fazla görüldü ($p<0.001$, $p=0.010$, sırasıyla). Ayrıca D ve DÇLPO gruplarında K grubuna göre nötrofil infiltrasyonu/agregasyonu daha fazla görüldü ($p=0.002$, $p=0.010$, sırasıyla). Nötrofil infiltrasyonu/agregasyonu

DOÇLP grubunda DÇLP grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu ($p=0.049$), (Tablo-9, Şekil 10-15).

Alveol duvar kalınlığı gruplar arasında anlamlı olarak farklı bulundu ($p<0.001$). DÇLP grubunda K ve DO gruplarına göre alveol duvar kalınlığı daha fazla görüldü ($p<0.001$, tümü). Ayrıca, D grubunda K grubuna göre alveol duvar kalınlığı daha fazla görüldü ($p=0.021$). Alveol duvar kalınlığı DO grubunda D grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu ($p=0.021$). Benzer şekilde, alveol duvar kalınlığı DÇLPO ve DOÇLP gruplarında DÇLP grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu ($p=0.006$, $p=0.002$, sırasıyla), (Tablo-9, Şekil 10-15).

Toplam hasar skoru gruplar arasında anlamlı olarak farklı bulundu ($p<0.001$). DÇLP grubunda K, D ve DO gruplarına göre toplam hasar skoru daha fazla görüldü ($p<0.001$, $p=0.006$, $p<0.001$, sırasıyla). Ayrıca, D ve DÇLPO gruplarında K grubuna göre toplam hasar skoru daha fazla görüldü ($p<0.001$, $p=0.004$, sırasıyla). Toplam hasar skoru DÇLPO ve DOÇLP gruplarında DÇLP grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu ($p=0.001$, $p<0.001$, sırasıyla), (Tablo-9, Şekil 10-15).

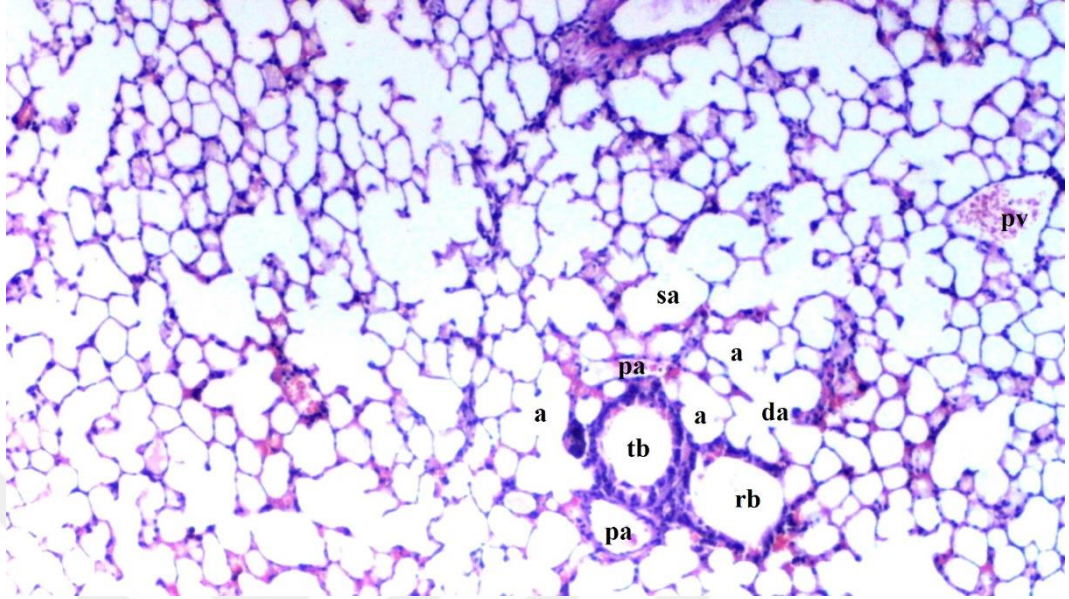
Tablo 9: Akciğer dokusu histopatolojik bulguları [Ort ± SH]

	Grup K (n=6)	Grup D (n=8)	Grup DO (n=8)	Grup DÇLP (n=8)	Grup DÇLPO (n=8)	Grup DOÇLP (n=8)	P**
İnterstisyel ödem	0.50±0.22	0.83±0.17	0.67±0.21	1.50±0.22*,&,+	0.83±0.17?	0.67±0.21?	0.026
İnterstisyel hemoraji	0.17±0.17	0.83±0.17*	0.50±0.22	1.50±0.22*,&,+	0.83±0.17*,?	0.67±0.33?	0.007
Alveolar konjesyon	0.33±0.21	0.83±0.17	0.50±0.22	1.33±0.21*,+	0.83±0.17	0.50±0.22?	0.020
Nötrofil infiltrasyonu/ agregasyonu	0.17±0.17	1.00±0.00*	0.50±0.22	1.17±0.17*,+	0.83±0.17*	0.67±0.21?	0.004
Alveol duvar kalınlığı	0.33±0.21	1.17±0.17*	0.33±0.21&	1.83±0.40*,+	0.83±0.17?	0.67±0.21?	<0.001
Toplam hasar skor	1.33±0.80	4.67±0.56*	2.83±0.79	7.33±0.61*,&,+	4.17±0.40*,?	3.17±0.54?	<0.001

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

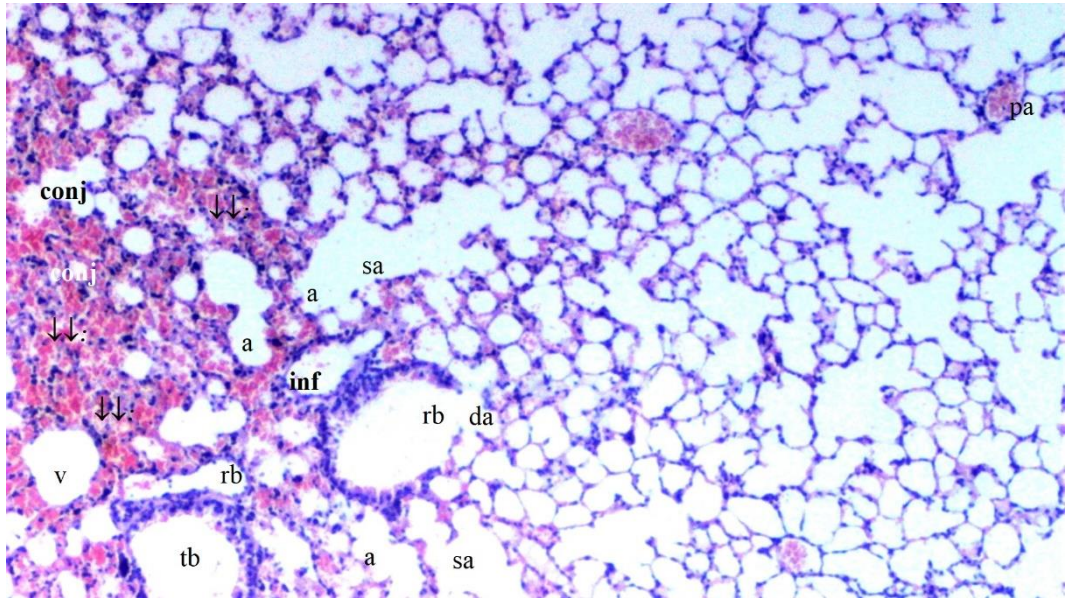
* $p < 0.05$: Grup K ile karşılaştırıldığında; & $p < 0.05$: Grup D ile karşılaştırıldığında;

+ $p < 0.05$: Grup DO ile karşılaştırıldığında; ? $p < 0.05$: Grup DÇLP ile karşılaştırıldığında



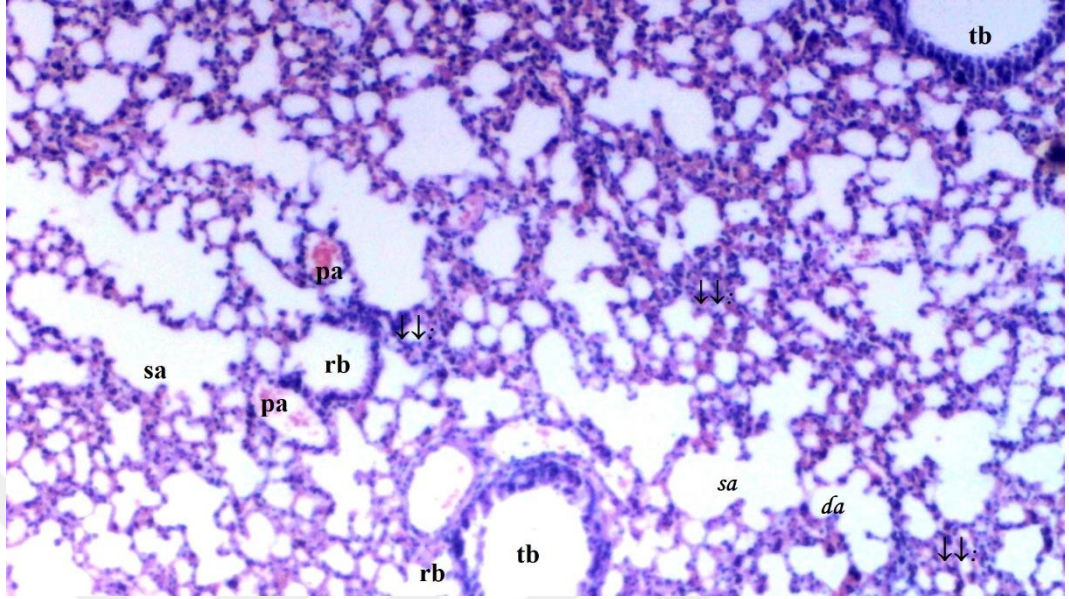
Şekil 10: Grup K; Akciğer dokusu (H&E X40)

(a: alveoller, tb: terminal bronşiol, rb: respiratuar bronşiol sa: saccus alveolaris da: ductus alveolaris, pa: pulmoner arter dalları, pv: pulmoner ven dalları)



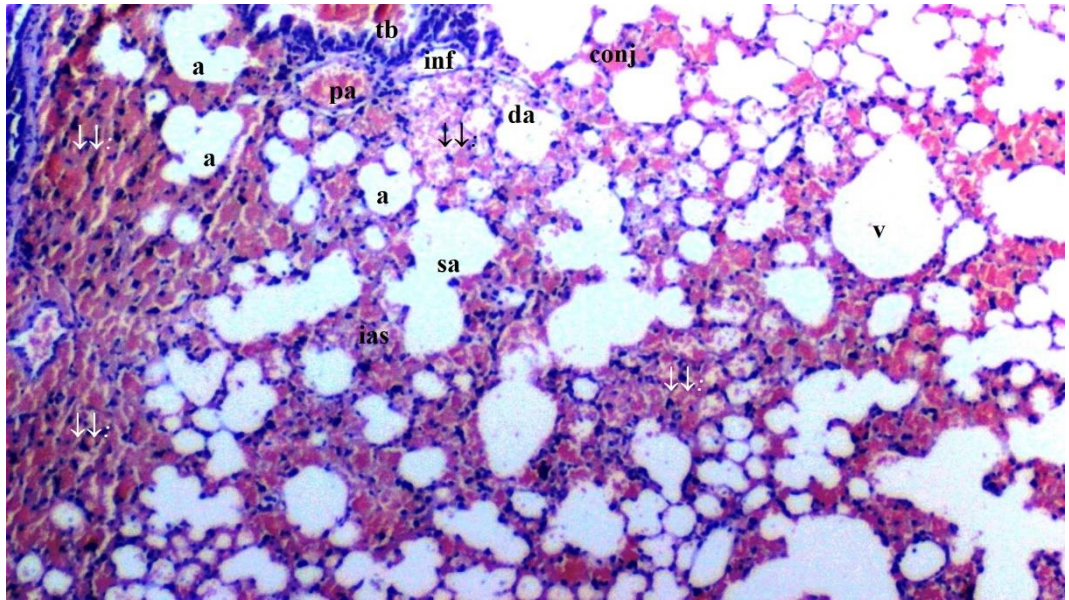
Şekil 11: Grup D; Akciğer dokusu (H&E X40)

(a: alveoller, tb: terminal bronşiol, rb: respiratuar bronşiol sa: saccus alveolaris da: ductus alveolaris, pa: pulmoner arter dalları, v: amfizematöz alveolar vakuol, inf: inflamasyon, conj: kapiller konjesyon, çift ok: septum kalınlaşması)



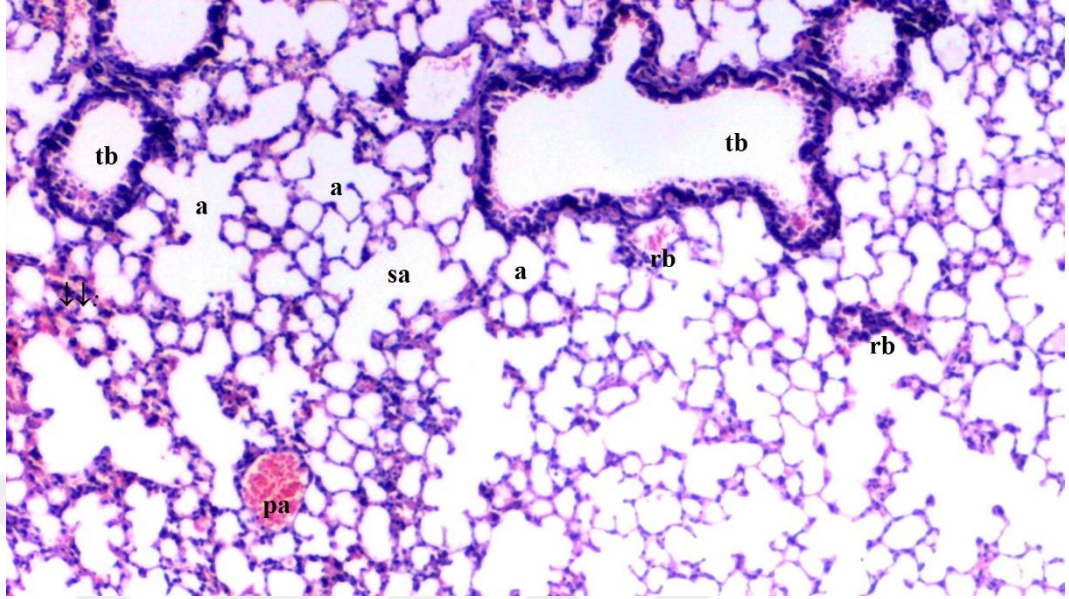
Şekil 12: Grup DO; Akciğer dokusu (H&E X40)

(tb: terminal bronşiol, rb: respiratuar bronşiol sa: saccus alveolaris da: ductus alveolaris, pa: pulmoner arter dalları, çift ok: septum kalınlaşması)



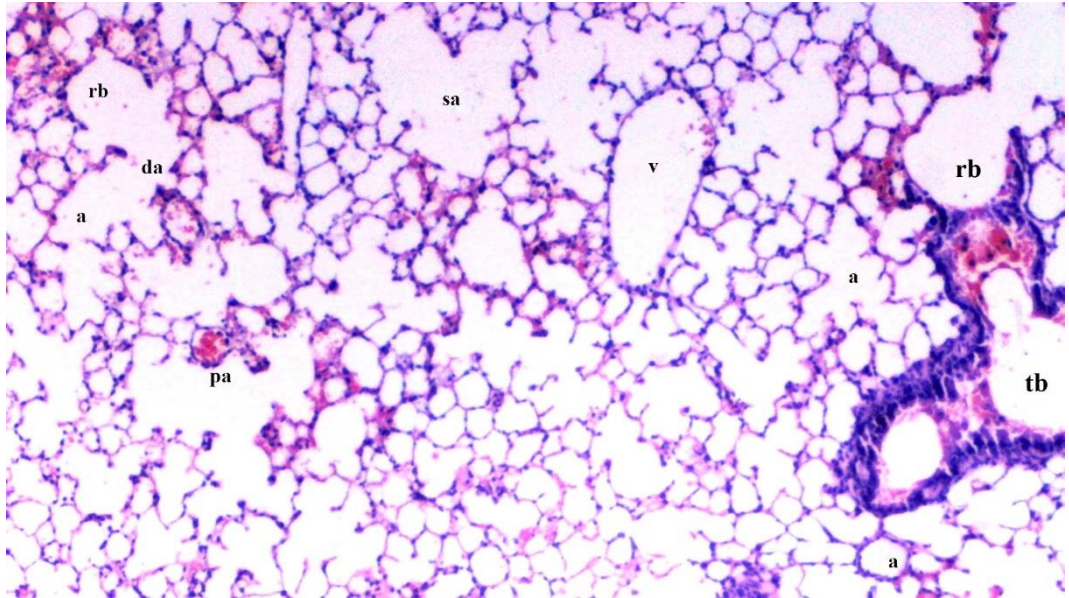
Şekil 13: Grup DÇLP; Akciğer dokusu (H&E X40)

(a: alveoller, tb: terminal bronşiol, sa: saccus alveolaris da: ductus alveolaris, pa: pulmoner arter dalları, v: amfizematöz alveolar vakuol, inf: inflamasyon, conj: kapiller konjesyon, ias: inter alveolar septum, çift ok: septum kalınlaşması)



Şekil 14: Grup DÇLPO; Akciğer dokusu (H&E X40)

(a: alveoller, tb: terminal bronşiol, rb: respiratuar bronşiol sa: saccus alveolaris pa: pulmoner arter dalları, çift ok: septum kalınlaşması)



Şekil 15: Grup DOÇLP; Akciğer dokusu (H&E X40)

(a: alveoller, tb: terminal bronşiol, rb: respiratuar bronşiol sa: saccus alveolaris da: ductus alveolaris, pa: pulmoner arter dalları, v: amfizematöz alveolar vakuol)

İnflamasyon-nötrofil infiltrasyonu gruplar arasında anlamlı olarak farklı bulundu ($p=0.036$). DÇLP grubunda K ve DO gruplarına göre inflamasyon-nötrofil infiltrasyonu daha fazla görüldü ($p=0.001$, $p=0.023$, sırasıyla). İnflamasyon-nötrofil infiltrasyonu DOÇLP grubunda DÇLP grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu ($p=0.023$), (Tablo-10, Şekil 16-21).

İnterstisyel ödem gruplar arasında anlamlı olarak farklı bulundu ($p=0.029$). DÇLP grubunda K, D ve DO gruplarına göre interstisyel ödem daha fazla görüldü ($p<0.001$, $p=0.045$, $p=0.014$, sırasıyla). Ayrıca, DÇLPO grubunda da K grubuna göre interstisyel ödem daha fazla görüldü ($p=0.045$). İnterstisyel ödem DOÇLP grubunda DÇLP grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu ($p=0.045$), (Tablo-10, Şekil 16-21).

Swelling in myokardiyal cells, şişme gruplar arasında anlamlı olarak farklı bulundu ($p=0.034$). DÇLP grubunda K ve DO gruplarına göre swelling in myokardiyal cells, şişme daha fazla görüldü ($p=0.004$, $p=0.013$, sırasıyla). Ayrıca, D grubunda da K grubuna göre swelling in myokardiyal cells, şişme daha fazla görüldü ($p=0.043$). Swelling in myokardiyal cells, şişme DÇLPO ve DOÇLP gruplarında DÇLP grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu ($p=0.043$, $p=0.013$, sırasıyla), (Tablo-10, Şekil 16-21).

Myokardiyal nekroz gruplar arasında anlamlı olarak farklı bulundu ($p=0.020$). DÇLP grubunda K ve DO gruplarına göre myokardiyal nekroz daha fazla görüldü ($p<0.001$, $p=0.020$, sırasıyla). Ayrıca, D grubunda da K grubuna göre myokardiyal nekroz daha fazla görüldü ($p=0.020$). Myokardiyal nekroz DÇLPO

ve DOÇLP gruplarında DÇLP grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu (p=0.020, tümü), (Tablo-10, Şekil 16-21).

Myokardial disorganizasyon ve interstisyel fibrozis gruplar arasında benzer bulundu (p=0.194, tümü), (Tablo-10, Şekil 16-21).

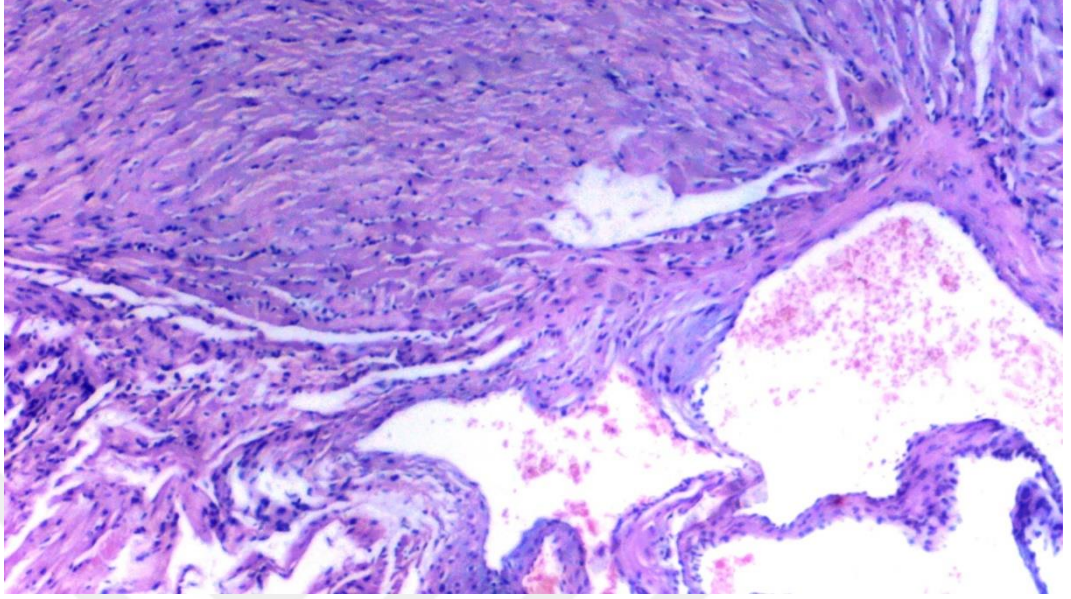
Tablo 10: Kalp dokusu histopatolojik bulguları [Ort ± SH]

	Grup K (n=6)	Grup D (n=8)	Grup DO (n=8)	Grup DÇLP (n=8)	Grup DÇLPO (n=8)	Grup DOÇLP (n=8)	P**
İnflamasyon-nötrofil infiltrasyonu	0.33±0.21	0.83±0.17	0.67±0.21	1.33±0.21*,+	0.83±0.17	0.67±0.21?	0.036
Myokardial disorganizasyon	0.33±0.21	0.83±0.17	0.67±0.21	1.17±0.17	0.83±0.31	0.67±0.21	0.194
İnterstisyel fibrozis	0.33±0.21	0.83±0.17	0.67±0.21	1.17±0.17	0.83±0.31	0.67±0.21	0.194
İnterstisyel ödem	0.17±0.17	0.67±0.21	0.50±0.22	1.33±0.33*,&,+	0.83±0.17*	0.67±0.21?	0.029
Miyokard hücrelerinde şişme	0.33±0.21	1.00±0.26*	0.50±0.22	1.33±0.21*,+	0.67±0.21?	0.50±0.22?	0.034
Myokardiyal nekroz	0.33±0.21	1.00±0.00*	0.67±0.21	1.33±0.21*,+	0.67±0.21?	0.67±0.21?	0.020

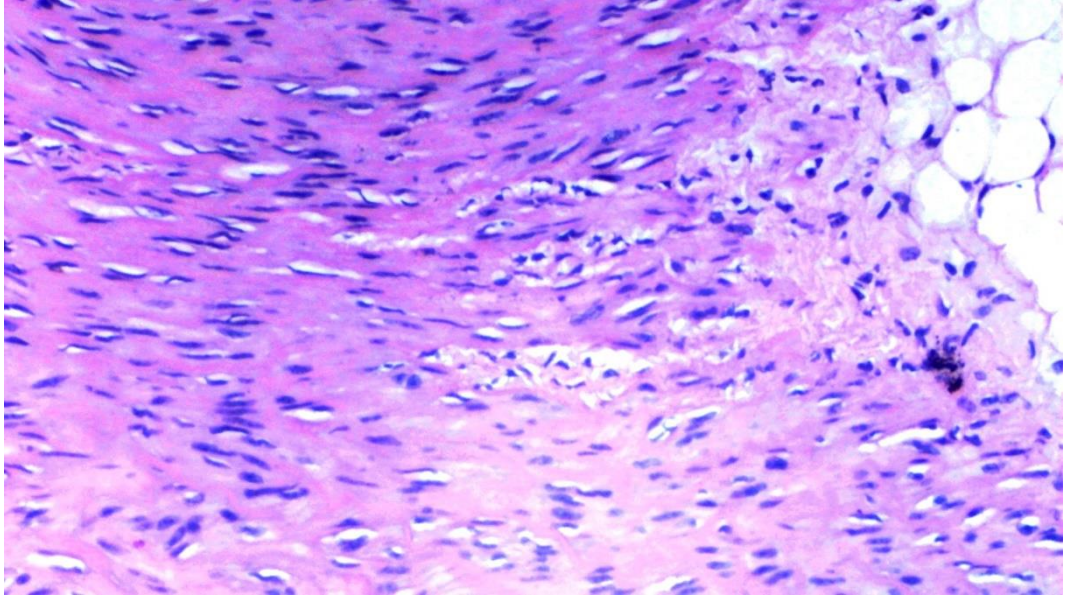
p**: Kruskal Wallis testi ile anlamlılık düzeyi p< 0.05

*p<0.05: Grup K ile karşılaştırıldığında; &p<0.05: Grup D ile karşılaştırıldığında;

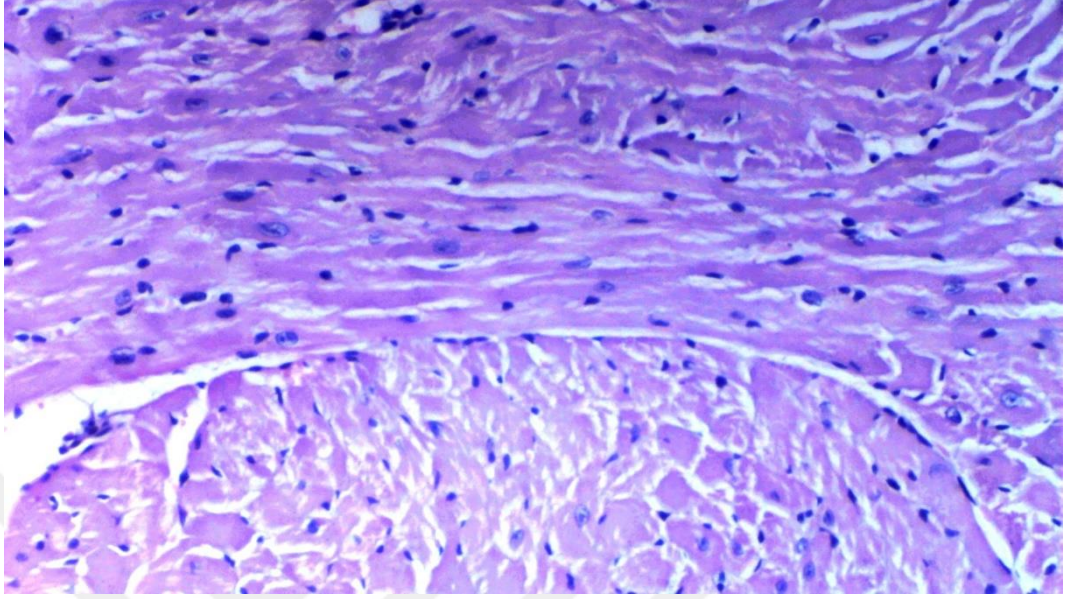
+p<0.05: Grup DO ile karşılaştırıldığında; ?p<0.05: Grup DÇLP ile karşılaştırıldığında



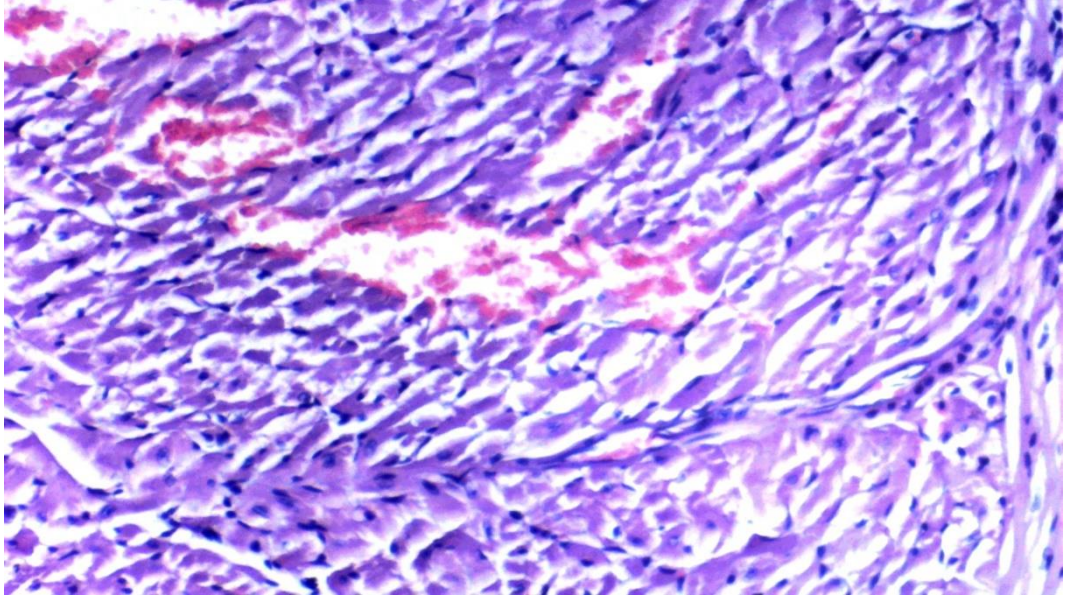
Şekil 16: Grup K; Kalp dokusu (H&E X40)



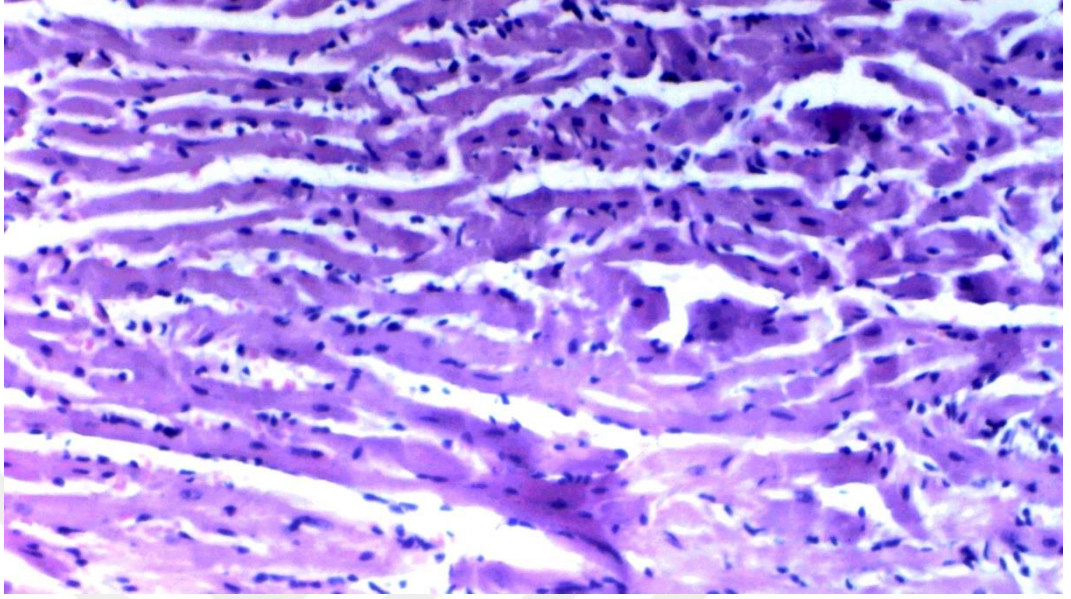
Şekil 17: Grup D; Kalp dokusu (H&E X40)



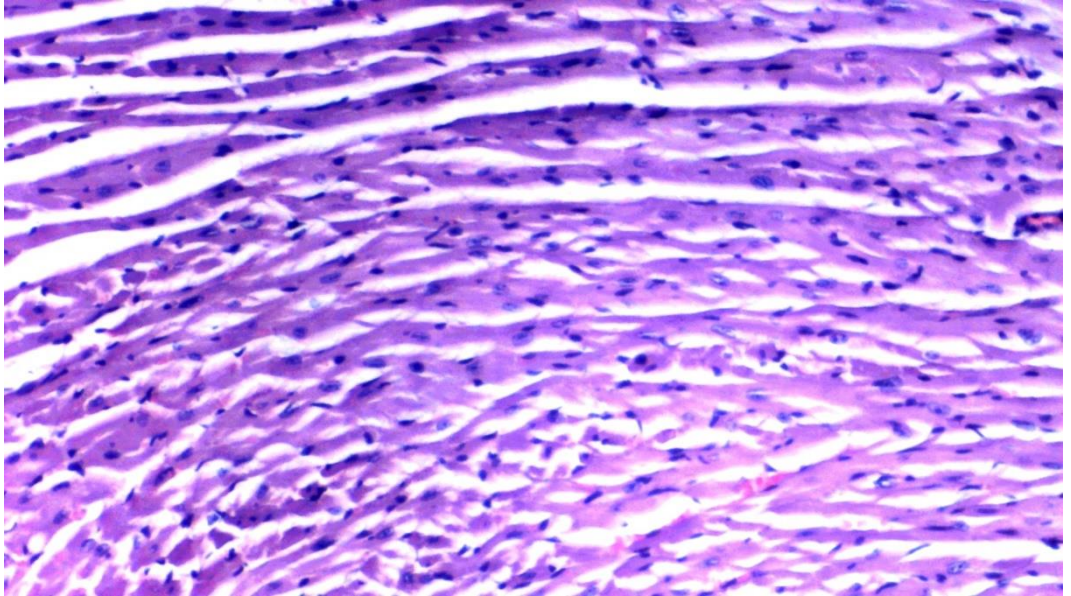
Şekil 18: Grup DO; Kalp dokusu (H&E X40)



Şekil 19: Grup DÇLP; Kalp dokusu (H&E X40)



Şekil 20: Grup DÇLPO; Kalp dokusu (H&E X40)



Şekil 21: Grup DOÇLP; Kalp dokusu (H&E X40)

Tablo 11: Akciğer dokusu oksidan durum parametreleri [Ort ± SS]

	Grup K (n=6)	Grup D (n=8)	Grup DO (n=8)	Grup DÇLP (n=8)	Grup DÇLPO (n=8)	Grup DOÇLP (n=8)	P**
MDA (nmol/g.pro)	15.19±2.78	19.29±4.78	16.92±4.90	24.74±3.38*,&,+	20.40±4.97*,?	17.82±3.51 ?	0.002
CAT (IU/mg.pro)	52.85±3.12	51.21±9.49	54.13±5.21	38.96±5.98*,&,+	46.82±6.67 +,?	47.28±8.03 ?	0.001

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

* $p < 0.05$: Grup K ile karşılaştırıldığında; & $p < 0.05$: Grup D ile karşılaştırıldığında;
+ $p < 0.05$: Grup DO ile karşılaştırıldığında; ? $p < 0.05$: Grup DÇLP ile karşılaştırıldığında

Gruplar (akciğer dokusu) MDA düzeyi açısından kendi aralarında kıyaslandığında, gruplar arasında anlamlı fark vardı ($p=0.002$). DÇLP grubunda K, D ve DO gruplarına göre MDA düzeyi anlamlı yüksek bulundu ($p < 0.001$, $p=0.013$, $p < 0.001$, sırasıyla). Ayrıca, DÇLPO grubunda da K grubuna göre MDA düzeyi anlamlı yüksek bulundu ($p=0.027$). MDA düzeyi DO grubunda D grubuna göre anlamlı düşük bulundu ($p=0.029$). Benzer şekilde, MDA düzeyi DÇLPO ve DOÇLP gruplarında DÇLP grubuna göre anlamlı düşük bulundu ($p=0.024$, $p=0.009$, sırasıyla), (Tablo-11).

Gruplar (akciğer dokusu) CAT enzim aktivitesi açısından kendi aralarında kıyaslandığında, gruplar arasında anlamlı fark vardı ($p<0.001$). DÇLP grubunda K, D ve DO gruplarına göre CAT enzim aktivitesi anlamlı düşük bulundu ($p<0.001$, tümü). Ayrıca, DÇLPO grubunda da DO grubuna göre CAT enzim aktivitesi anlamlı düşük bulundu ($p=0.039$). CAT enzim aktivitesi DÇLPO ve DOÇLP gruplarında DÇLP grubuna göre anlamlı yüksek bulundu ($p=0.027$, $p=0.020$, sırasıyla), (Tablo-11).

Tablo 12: Kalp dokusu oksidan durum parametreleri [Ort $\pm$ SH]

	Grup K (n=6)	Grup D (n=8)	Grup DO (n=8)	Grup DÇLP (n=8)	Grup DÇLPO (n=8)	Grup DOÇLP (n=8)	P**
MDA (nmol/g.pro)	62.78 $\pm$ 6.85	87.70 $\pm$ 13.13*	74.31 $\pm$ 6.50&	106.00 $\pm$ 17.47*,&,+	92.09 $\pm$ 12.91*,+?	89.66 $\pm$ 8.93*,+?	<0.001
CAT (IU/mg.pro)	37.53 $\pm$ 2.54	22.51 $\pm$ 3.72*	27.74 $\pm$ 6.41*,&	14.95 $\pm$ 2.48*,&,+	20.97 $\pm$ 4.38*,+?	21.34 $\pm$ 3.33*,+?	<0.001

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

* $p<0.05$: Grup K ile karşılaştırıldığında; & $p<0.05$: Grup D ile karşılaştırıldığında; + $p<0.05$: Grup DO ile karşılaştırıldığında; ? $p<0.05$: Grup DÇLP ile karşılaştırıldığında

Gruplar (kalp dokusu) MDA düzeyi açısından kendi aralarında kıyaslandığında, gruplar arasında anlamlı fark vardı ($p<0.001$). DÇLP grubunda K, D ve DO gruplarına göre MDA düzeyi anlamlı yüksek bulundu ($p<0.001$, tümü). Ayrıca, D, DÇLPO ve DOÇLP gruplarında da K grubuna göre MDA düzeyi anlamlı

yüksek bulundu ($p<0.001$, tümü). MDA düzeyi DÇLP ve DOÇLP gruplarında DÇLP grubuna göre anlamlı düşük bulundu ($p=0.046$, $p=0.002$, sırasıyla), (Tablo-12).

Gruplar (kalp dokusu) CAT enzim aktivitesi açısından kendi aralarında kıyaslandığında, gruplar arasında anlamlı fark vardı ($p<0.001$). DÇLP grubunda K, D ve DO gruplarına göre CAT enzim aktivitesi anlamlı düşük bulundu ($p<0.001$, tümü). Ayrıca, D, DO, DÇLP ve DOÇLP gruplarında da K grubuna göre CAT enzim aktivitesi anlamlı düşük bulundu ($p<0.001$, tümü). CAT enzim aktivitesi DÇLP grubunda DO ve DÇLP gruplarına göre anlamlı yüksek bulundu ($p=0.002$, $p=0.005$, sırasıyla). Benzer şekilde CAT enzim aktivitesi DOÇLP grubunda DO ve DÇLP gruplarına göre anlamlı yüksek bulundu ($p=0.003$, tümü), (Tablo-12).

5. TARTIŞMA

Enfeksiyon, diyabet hastalarında morbidite ve mortalitenin önemli bir nedeni olmaya devam etmektedir ve muhtemelen konakçı yanıtında, özellikle nötrofil kemotaksisi ve adezyonda görülen anormalliklerden kaynaklanmaktadır (56). Literatüre baktığımızda sepsis tedavisinde ozonun kullanılması ile ilgili çalışmalar olmasına rağmen diyabetiklerde gelişen sepsis tedavisinde ozonun kullanılması ile ilgili yeterli çalışma olmadığını görmekteyiz. Bu çalışmada diyabetik hastalarda gelişen sepsise karşı ozon tedavisinin etkinliğini araştırdık. Sepsisin en çok etkilediği iki organ olan kalp ve akciğeri bu çalışmada değerlendirdik.

Bu çalışmada elde ettiğimiz verilerde histopatolojik bulgularda diyabetin hem kalp hem de akciğer dokusunda inflamasyon oluşturduğunu görmekteyiz. Ayrıca biyokimyasal verilerde de oksidan durum parametrelerinin diyabet oluşturulan gruplarda oksidatif stres lehine değiştiğini görmekteyiz. Sepsis oluşturduğumuz gruplarda inflamasyon ve oksidan durum parametrelerinin daha fazla arttığını görmekteyiz. Diyabetik farelere ozon uygulanan grupta ise tek doz ozonun diyabetin kalp ve akciğer dokusunda oluşturduğu inflamasyonu azaltmada yeterli olmadığı sonucuna vardık. Diyabet kronik bir süreçte olduğu için tekrarlayan dozda ozon uygulanırsa daha etkili olacağını düşünmekteyiz. Sepsis olan gruplara ozon uyguladığımızda ise sepsisin kalp ve akciğer dokusu üzerindeki inflamasyon ve oksidan durum parametrelerini azalttığını göstermiş olduk. Ancak sepsis oluşturmada önce ozon uygulamasının inflamasyonu azaltmada daha etkin

olduğunu tespit ettik. Bu da bize ozonun ön koşullanma şeklinde uygulanmasının tedavide daha etkin olduğunu göstermektedir.

Park ve arkadaşlarının farelerde yaptığı bir çalışmada STZ ile T1D indüksiyonunun pulmoner fibrozis gelişimi ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir(83). Bizim çalışmamızda akciğer dokusunun histolojik değerlendirmesinde kontrol grubuna göre diyabet grubunda nötrofil infiltrasyonu/agregasyonu, alveolar duvar kalınlığı ve toplam hasar skoru daha fazla görüldü. Bu akciğerin de diyabetin hedef organlarından birisi olduğu düşüncesini desteklemektedir.

Sudy ve arkadaşlarının ratlar üzerinde yaptığı bir çalışmada gaz değişim parametreleri tip 1 ve tip 2 DM modellerinde tehlikede kalmış, hatta tip 1 DM modelinde daha da kötüleşerek alveolo-kapiller disfonksiyona işaret etmiştir(84). Bizim çalışmamızda diyabet grubunda kontrol grubuna kıyasla daha fazla görülen alveolar duvar kalınlığı ozon tedavisi yapılan DO grubunda diyabet grubuna kıyasla daha düşük görüldü. Bu da diyabete bağlı akciğerde oluşan alveolar duvar kalınlığı ozon tedavisi ile geri döndürülebileceğini düşündürmektedir.

ALI, çok sayıda enflamatuvar sitokin hücre içi ve hücre dışı matrikse salınarak akciğer dokusu hasarına, alveolar membran hasarına ve alveolar-kılcal difüzyon disfonksiyonuna yol açarak kalıcı hipoksemiye neden olur(50; 53). Karabulut ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada sepsis modelinde (CLP grubu), interalveolar septal kalınlaşmada artış, bronş epitelinde deskuamasyon ve venöz hiperemi gözlemlenmiştir(54). Neumann ve arkadaşlarının farelerde yaptığı colon ascendens stent peritonit (CASP) modelinde tetiklenen abdominal sepsisin,

önceden aktive edilmiş granülositlerin akciğere yoğun bir şekilde toplanmasına neden olduğunu göstermişler. Granülosit birikimi, akciğer vasküler geçirgenliğinde derin bir artış ve akciğerde farklı bir kemokin ve adezyon molekülü panelinin upregülasyonu ile ilişkili olduğunu bulmuşlar. ARDS hastalarının akciğer örneklerinin ve bronşıyoalveolar lavaj sıvısının analizi, nötrofil aktivasyonunu, yoğun inflamatuvar infiltratları göstermişlerdir. Oksidanlar ve proteazlar gibi toksik nötrofil ürünlerinin yüksek konsantrasyonlarını, artmış kemotaktik aktiviteyi ve IL-8 dahil olmak üzere yüksek kemokin konsantrasyonlarını doğrudan göstermişler(55). Bizim çalışmamızda ise DÇLP grubunda diyabet grubuna kıyasla interstisyel ödem, interstisyel hemoraji ve toplam hasar skoru daha fazla görüldü. Bu da sepsisin diyabetik farelerde de akut akciğer hasarına neden olabileceğini göstermiştir.

Filgueiras ve arkadaşlarının diyabetin akut akciğer hasarına karşı koruyucu mekanizmasını araştırmak için ratlarda çalışma yapmışlar. Diyabetik ratlar diyabetik olmayanlara göre sepsise daha duyarlıydı. Diyabetik olmayan ratlarda akciğerde ödem, lökosit infiltrasyonu ve COX2 ekspresyonunda artış görülmüştür. Diyabetik ratlarda bu inflamatuvar olaylar önemli ölçüde daha az yoğundu. Diyabetik ratların sepsise daha duyarlı olmalarına rağmen neden daha hafif ALI geliştirdiklerini anlamak için, sepsisli hayvanların AM'lerinde NFkB aktivasyonunu incelemişler. Sepsis, diyabetik olmayan ratlarda akciğere indüklenebilir prostaglandin sentaz COX2'nin ekspresyonunu indüklemiş ancak diyabetik ratlarda indüklememiştir. Bu bize diyabetik ratların gen ekspresyonuna yol açan sinyal kaskadında bir sorun olduğu ihtimalini düşündürmüştür. Sepsisli

diyabetiklerde inflamasyonun azalmasının alveolar makrofajlarda NF-kB aktivasyonunun bozulmasıyla ilişkili olduğu bulgusu, sepsisli diyabetiklerde gözlenen akciğer korumasının moleküler temelini açıklamaya yardımcı olan yeni bir mekanizmayı ortaya koymuşlar(48). Diyabet olmayan sepsis grubumuz olmadığı için diyabetin akut akciğer hasarına karşı koruyucu etkisini değerlendiremedik.

Yan ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada septik ratlarda pantoprazolun sepsise bağlı akut akciğer hasarı ve akut böbrek hasarını iyileştirebileceğini göstermişler(85). Fisher ve arkadaşlarının farelerde yaptığı bir çalışmada parenteral C vitamini infüzyonu, fareleri sepsisin zararlı sonuçlarından, proinflamatuvar yanıtın zayıflatılması, epitelyal bariyer fonksiyonunun güçlendirilmesi, alveolar sıvı klirensinin artırılması ve sepsisle ilişkili pıhtılaşma anormalliklerinin önlenmesi dahil olmak üzere birçok mekanizma ile koruduğunu göstermişlerdir(51). Souza ve arkadaşlarının ratlar üzerinde yaptığı bir çalışmada intraperitoneal ozon tedavisinin, sağkalım oranlarında bir iyileşme olmamasına rağmen, ratlarda intraabdominal enfeksiyondan kaynaklanan inflamatuvar yanıtı ve akut akciğer hasarını hafifletmede olası bir faydası olduğunu göstermişler(86).

Biz de çalışmamızda diyabetik farelerde sepsisin neden olduğu akut akciğer hasarını ozon tedavisi ile önleyebilmeyi araştırdık. Çalışmamızda sepsis olan iki gruba ozon verdik. DÇLP grubuna ÇLP yapıldıktan 1 saat sonra 20 mcg ozon verdik. DOÇLP grubuna ise ÇLP yapılmadan 1 saat önce 20 mcg ozon verdik. Akciğer histopatolojisinde DÇLP grubunda interstisyel ödem, interstisyel hemoraji, alveolar duvar kalınlığı ve toplam hasar skorunda DÇLP grubuna kıyasla

daha düşük bulundu. DOÇLP grubunda ise, interstisyel ödem, interstisyel hemoraji, alveolar konjesyon, nötrofil infiltrasyonu/agregasyonu, alveolar duvar kalınlığı ve toplam hasar skorunda DÇLP grubuna kıyasla daha düşük bulundu. Buradan ozon tedavisinin diyabetik farelerde sepsise bağlı akut akciğer hasarını azaltabileceği sonucuna varmaktayız. Ozonun ÇLP den önce uygulandığı DOÇLP grubunda DÇLP grubuna kıyasla alveolar konjesyon, nötrofil infiltrasyonu/agregasyonu düşük görülmesi ama ozonun ÇLP den sonra uygulanan DÇLPO grubunda ise düşük bulunmaması ozonun preempitif uygulanınca akut akciğer hasarını azaltmada daha etkili olduğu düşündürmektedir.

İskander ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada öleceği tahmin edilen farelerde sistemik enflamasyonun arttığına dair kanıtlar sunarken, hayatta kalan ve kalmayan septik farelerin hiçbirinde akciğer hasarı belirtisi ve dolayısıyla akciğer hasarı ile hayatta kalma arasında bir korelasyon olmadığını göstermektedir. Bu çalışmada kullanılan akciğer hasarı parametreleri, bakteriyel pnömoni modelinde gösterildiği gibiydi. Bu çalışmada, murin ÇLP sepsis modelinde akciğer hasarı gelişip gelişmediği değerlendirilmiştir. Öleceği tahmin edilen farelerin akciğer hasarı belirtisi göstermediğini tespit etmişler. Genel olarak veriler, akciğer hasarının murin ÇLP sepsis modelinde akut mortaliteye neden olmadığını güçlü bir şekilde göstermişlerdir(47). Bette ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada peritona tek başına O₃/O₂ gaz karışımı enjekte edilmesi, tedavi edilmeyen septik ratlarda %0 olan sağkalım oranına kıyasla ratların sağkalımını %33'e kadar artırmıştır. O₃/O₂ ile ön koşullandırma ve sepsisin başlangıcında piperasilin-tazobaktam kullanımı kombinasyonu, polimikrobiyal sepsis rat modelinde sağkalım oranını %93'e kadar

artırmıştır(87). Bizim çalışmamızda tüm fareler ÇLP den 24 saat sonra sakrifiye edilip farelerin sepsise bağlı ölmeleri için yeterli süre beklenmediği için mortaliteyi değerlendiremedik.

Kalp, şiddetli sepsis/septik şok nedeniyle yapısal olarak hasar gören önemli bir hedef organdır. Deneysel çalışmalara dayanarak, şiddetli sepsis/septik şokta azalmış miyokardiyal kontraktile ile ilişkili kardiyak patolojik değişiklikler, kardiyomiyositlerin hücre içi hücre iskeleti ile hücre dışı matris arasındaki mekanik bağlantıdaki bozukluğa, kardiyomiyositlerin mekanik, elektriksel/kimyasal olarak ayrılmasına, sarkolemmal geçirgenliğin artmasına ve kardiyomiyositlerin kontraktıl aparatındaki yapısal değişikliklere bağlanabilir(88).

Li ve arkadaşlarının ratlarda yaptığı bir çalışmada DM grubundaki miyokardiyal hücrelerin düzensiz olduğunu, morfolojik yapısının belirsiz olduğunu ve çok sayıda enflamatuar hücre infiltrasyonu olduğunu göstermiştir(89). Yapılan başka bir çalışmada tüm diyabetik fareler biyokimyasal ve histopatolojik değişiklikler açısından önemli miyokardiyal fibrozis göstermiştir. Buna ek olarak, diyabetik farelerin miyokard seviyesinde yapısal ve işlevsel değişikliklere sahip olduğunu da tespit etmişler. Bu çalışmada, 8 haftalık empagliflozin tedavisi kardiyak sistolik fonksiyonu başarılı bir şekilde korumuştur(30). Bizim çalışmamızda diyabet grubunda kontrol grubuna kıyasla miyokardiyal hücrelerde şişme ve miyokardiyal nekroz anlamlı düzeyde fazla görüldü. Ama myokardial disorganizasyon ve interstisyel fibrozis de gruplar arasında anlamlı bir fark görülmedi. Biz farelerde diyabet oluşturduktan sonra diyabetin etkilerinin

görülmesi için 1 ay bekledik. Bu 1 aylık süre myokardial disorganizasyon ve interstisyel fibrozis gelişmesi için yeterli bir süre olmadığını göstermektedir.

Karabulut ve arkadaşlarının ratlar üzerinde yaptığı bir çalışmada diyabette NOS, özellikle iNOS ve nNOS ekspresyonlarında değişiklik olduğunu ve bu enzimler miyokardiyal hasarın patofizyolojisinde rol oynayabileceğini göstermişlerdir. Bu sebeple pentoksifilinin, özellikle nNOS ve iNOS ekspresyonunu etkileyerek bu hasarda terapötik etkiye sahip olabileceği sonucuna varmışlar(90). Oh ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada dexmedetomidinin DM ratlarında kardiyak disfonksiyonu ve bozulmuş otofajiyi azalttığını göstermişlerdir(91). Literatürde diyabetin kalp üzerine etkilerini tedavi etmek için ozon tedavisinin kullanılmasını araştıran yeterli çalışma bulunmamaktadır. Bizim çalışmamızda ise diyabet grubu ile DO grubu arasında histolojik olarak anlamlı bir farklılık görülmemiştir.

Önceden diyabeti olan sepsis hastaları, diyabeti olmayan sepsis hastalarına kıyasla uzun vadede daha yüksek majör kardiyovasküler olay tehlikesi yaşamaktadır. Sepsis geçirmemiş hastalarla karşılaştırıldığında, sepsis sonrası kardiyovasküler olayların mutlak risk artışı diyabetli hastalarda daha yüksektir(92). Cai ve arkadaşlarının STZ indüklenen diyabetik farelerde lipopolisakkarit (LPS) ile sepsis oluşturmuşlar. Kalbin histopatolojik incelemesinde düzensiz düzenleme, kardiyositlerin dejenerasyonu ve miyokardiyal liflerin yırtılması gibi miyokardiyal hasarı sergilemiştir. Ayrıca elektron mikroskopik incelemesinde kardiyositlerin mitokondrileri, kısmi miyofiberlerin çözülmesine eşlik eden vakuolizasyon ve düzensiz şişme göstermiştir(93). Bizim çalışmamızda ise kalp dokusunda DÇLP

grubunda diyabet grubuna kıyasla daha fazla interstisyel ödem görüldü. DÇLP grubunu kontrol grubu ile kıyaslırsak DÇLP grubunda inflamasyon-nötrofil infiltrasyonu, myokardiyal hücrelerde şişme, interstisyel ödem ve myokardiyal nekroz daha fazla görüldü. Diyabetiklerde gelişen sepsisin akut fazında da kardiyak hasar olduğu ve bu hasar tedavi edilmeyince kalpte kontraksiyon bozukluğu olabileceğini düşündürmektedir.

Diyabetik hastalarda sepsisin sık görüldüğü bilinmektedir ve bu hastaların kardiyak etkilenmesi hastaların morbidite, mortalite ve yoğun bakım da kalış süresini arttırmaktadır. Bu sebeple diyabetik hastalarda sepsise bağlı kardiyak etkilenmeyi azaltmak için birçok çalışma yapılmıştır. Cai ve arkadaşlarının diyabetik fareler üzerinde yaptığı bir çalışmada glibenklamidin STZ farelerinde LPS ile indüklenen miyokardiyal hasarı hafiflettiğini, serum IL-1 β ve TNF- α 'yı azalttığını göstermişlerdir. Ayrıca glibenklamid kültürlenmiş primer peritoneal makrofajlarda LPS + yüksek glukoz stimülasyonu ile Nalp3 ve Kaspaz-1 ekspresyonunu inhibe etmiştir. Bunlar glibenklamidin diyabette inflamasyon altında miyokardiyal hasara karşı koruma sağlayabileceğini düşündürmüştür(93).

Ozonun anti-inflamatuar etkisi olduğu bilinmektedir. Bu sebeple biz de çalışmamızda STZ ile diyabet oluşturulan farelerde ÇLP ile sepsis oluşturduk. Sepsis sonucu kardiyak dokuda oluşan inflamatuvar etkileri ozon tedavisi ile önleyebilir miyiz diye bu çalışmayı yaptık. Çalışmamızdaki DÇLPO grubunda DÇLP grubuna kıyasla myokardiyal hücrelerde şişme ve myokardiyal nekroz istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulundu. Ayrıca DOÇLP grubunda DÇLP grubuna kıyasla inflamasyon-nötrofil infiltrasyonu, interstisyel ödem, myokardiyal

hücrelerde şişme ve myokardiyal nekroz anlamlı düzeyde düşük bulundu. Buradan çıkarılacak sonuç ozon tedavisinin kalpteki inflamasyonu azaltabileceği düşündürmektedir. DÇLPO grubundan farklı olarak DOÇLP grubunda inflamasyon-nötrofil infiltrasyonu ve interstisyel ödemin düşük bulunması ozonun preempitif uygulanmasının kardiyak inflamasyonda daha etkili olduğunu göstermektedir.

Oksidatif stres çeşitli hastalıkların önemli bir bileşeni olarak kabul edilmektedir. Bu çeşitli hastalıklarda oksidatif stres serbest radikaller ve radikal olmayan bileşiklerle oluşur(61). Diyabetik hastalarda ROS üretim kapasitesinin artmasına ek olarak, endojen antioksidan mekanizmalar da sıklıkla bozulur(10). Sepsis ve özellikle septik şok, yüksek oksidatif potansiyel hasarla ilişkili olarak düzenlenmemiş bir modda büyük miktarlarda serbest radikal üretimini indükler. Sepsis ve septik şokta oksidatif stresin varlığını gösteren çeşitli serbest radikal kaynakları tespit edilmiştir. ROS'ların erken üretimi deneysel çalışmalarda gösterilmiş, lipid peroksidasyonu gibi unsurlar belgelenmiş ve organların çoklu disfonksiyon gelişimiyle ilişkilendirilmiştir(69).

Giderek artan sayıda kanıt, DM hastalarının vasküler dokularında hiperglisemiye yanıt olarak oksidatif stresin arttığını göstermektedir. Hiperglisemi ile indüklenen ROS seviyesindeki artışın, diyabetik ratların sol ventrikülünde kasılma fonksiyonunda bozulmaya ve miyokardiyal fibrozise yol açtığı çeşitli raporlarda gösterilmiştir(30). Özellikle, ROS diyabetik kalbin mitokondrisi içinde üretilir. ROS aracılı kardiyak hasara karşı ilk savunma hattı süperoksit dismutaz (SOD), katalaz ve glutatyon peroksidaz (GSHPx) dahil olmak üzere çeşitli

antioksidan enzimlerden oluşur(67). Bizim çalışmamızdaki kontrol ve diyabet grubunu karşılaştırdığımızda kalp dokusunda MDA seviyesinin yüksek olması ve CAT enzim aktivitesinin düşük olması bize diyabete bağlı oksidatif stresin kalp üzerindeki etkilerinin daha belirgin olduğunu göstermektedir.

Diyabetin hayvan modellerinde süperoksit dismutaz (SOD) mimetikleri veya koenzim Q10 gibi uygun antioksidanlarla yapılan müdahale, diyabetik kardiyomiyopatiye ilerlemeyi sınırlamak için önleyici bir tedbir olarak erken dönemde veya hastalık sürecinin ilerleyen dönemlerinde oksidatif stresin diyabetik kalp hastalığına nedensel katkıda bulunma rolü ortaya konulmuştur (10). Smith ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada malondialdehit seviyeleri, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında O₃+Q10 grubundaki konsantrasyonlarda önemli ölçüde azalmıştır. Birlikte ele alındığında, bu çalışma O₃ tedavisinin Q10 ile kombinasyonunun oksidasyonun neden olduğu hasarla mücadelede ve bu hasarın önlenmesindeki faydalı etkilerine dair kanıtlar sunmaktadır. Çok sayıda çalışma, O₃ tedavisinin ılımlı oksidatif stres indüksiyonu yoluyla Nrf2 yolağının aktivasyonunu artırdığına dair kanıtlar sağlamıştır(25). Bizim çalışmamızda kontrol grubu ile ozon uygulanan DO grubunu karşılaştırdığımızda kalpte sadece CAT enzim aktivitesinin düşük bulundu. MDA düzeyi ise kontrol grubu ile benzer bulundu. Diyabet ve DO grubunu karşılaştırdığımızda ise DO grubunda sadece akciğer dokusunda MDA düzeyi istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulundu. Bu da bize ozon tedavisinin diyabete bağlı oluşan oksidatif stres belirteçlerinden MDA üzerinde daha etkin olduğunu göstermektedir.

Martinez-Sanchez ve arkadaşlarının diyabetik ayak hastalarında yaptığı bir çalışmada ozon tedavisi aldıktan sonra glisemik kontrolde iyileşme, oksidatif strese azalma, SOD'da artış, herhangi bir yan etki olmaksızın lezyonlarda belirgin bir iyileşme ve kontrol grubuna göre daha az amputasyon göstermiştir. O₃ AHT'nin kan dolaşımını ve iskemik dokulara oksijen iletimini iyileştirdiği, antioksidan sistemi yukarı yönlü düzenleyerek kronik oksidatif stresi düzelttiği, yan etki olmaksızın zindelik ve öfori halini tetiklediği ve insülin salgılanmasını veya etkinliğini artırabileceği artık kanıtlanmıştır(94). Li ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada DM grubunda malondialdehit (MDA) içeriği artarken süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesinin önemli ölçüde azaldığını, simvastatin uygulamasından sonra, SOD aktivitesinin arttığını ve MDA içeriğinin önemli ölçüde azaldığını göstermişlerdir(89). Bu çalışmalardaki sonuçlar bizim sonuçlarımızı destekler niteliktedir.

Diyabet ve DÇLP grubunu karşılaştırdığımızda hem akciğer hem kalp dokusunda MDA düzeyi yüksek CAT enzim aktivitesi ise düşük bulundu. Bu bulgulara bize sepsise bağlı hem kalp hem de akciğer dokusunda oksidatif stres oluşturduğunu göstermektedir. DO ile DÇLPO grubunu karşılaştırdığımızda ise iki grup arasında hem akciğer hem kalp dokusunda CAT enzim aktivitesi DÇLPO grubunda daha düşük bulundu ama MDA düzeyleri arasında anlamlı bir fark görülmedi. DO ile DOÇLP gruplarını karşılaştırdığımızda ise sadece kalp dokusunda CAT enzim aktivitesi DOÇLP grubunda yüksek bulundu. Buradaki verilerden de çıkarılacak sonuç sepsise bağlı oluşan oksidatif stres tedavisinde ozonun CAT enzim aktivitesi üzerinde daha etkin olduğudur.

Liu ve arkadaşlarının fareler üzerinde yaptığı bir çalışmada CLP prosedürü serum antioksidan SOD seviyesinde önemli bir düşüşe ve MDA seviyelerinde artışa yol açarak CLP sırasında akciğer hasarına katkıda bulunmuştur. Dexmedetomidin tedavisi SOD salınımını önemli ölçüde artırmış ve MDA salınımını azaltmıştır. Ayrıca Dexmedetomidinin SOD seviyelerini artırırken enflamatuvar faktörlerin ve MDA'nın salınımını azaltarak ALI'yi hafiflettiğini, aynı zamanda Dex'in Beclin1 proteininin ekspresyonunu artırarak ve mTOR proteininin ekspresyonunu azaltarak ortaya çıkan otofajiyi artırabileceğini ortaya koymuşlardır(53). Jacobs ve arkadaşlarının ratlar üzerinde yaptığı bir çalışmada, septik ratlarda serum süperoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) seviyelerindeki artışın sağkalımda artışla iyi korelasyon gösterdiğini ortaya koymuştur(95).

DÇLP grubu ile DÇLPO grubunu karşılaştırdığımızda hem kalp hem akciğer dokusunda DÇLPO grubunda MDA düzeyi düşük, CAT enzim aktivitesi ise yüksek bulundu. DÇLP grubu ile DOÇLP grubunu karşılaştırdığımızda hem kalp hem akciğer dokusunda DOÇLP grubunda MDA düzeyi düşük, CAT enzim aktivitesi ise yüksek bulundu. Bu da bize hem kalp hem de akciğer dokusunda diyabet ve sepsisin neden olduğu oksidatif stresin ozon tedavisi ile azaltabildiğimizi göstermektedir. Hem ozonun sepsisten önce uygulandığı hem de ozonun sepsisten sonra uyguladığı iki grupta da oksidatif stresin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldığını görmekteyiz.

Literatüre baktığımızda Guanche ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada 30-50 µg/ml konsantrasyonlardaki ozon oksidatif ön koşullandırma tedavisinin karaciğer ve akciğeri oksidatif strese karşı koruduğunu ve pro-oksidan/antioksidan

aktivitelerin dengesini koruyarak ve ROS'un etkisini tersine çevirerek deneysel septik şokun neden olduğu doku hasarını eşit derecede azalttığını göstermişler(69). Madej ve arkadaşları E. coli endotoksini ile sıçanlarda indüklenen endotoksik şokun iyi bilinen deneysel modelini kullanarak ozon oksidatif ön koşullandırmanın SOD ve CAT aktiviteleri ve bunların ROS seviyelerinin kontrolündeki rolleri açısından koruyucu etkilerini de göstermiştir(77).

Kontrol ve DÇLP grubunu karşılaştırdığımızda DÇLP grubunda hem kalp hem akciğer dokusunda MDA düzeyinin yüksek CAT enzim aktivitesinin düşük olduğunu görmekteyiz. Bu iki grupta bir grup sağlıklı fareler diğer grupta ise hem diyabet hem de sepsis olduğu için oksidatif stresin yüksek olması beklenen bir sonuçtur. DO ile DÇLP gruplarını karşılaştırdığımızda ise DÇLP grubunda ise hem akciğer hem kalp dokusunda MDA düzeyinin yüksek, CAT enzim aktivitesinin düşük olduğunu görmekteyiz. Bu da beklenen bir sonuç çünkü bir gruba oksidatif stresi azaltıcı bir ajan olan ozon diğer gruba ise oksidatif stresi arttırıcı etkisi olan sepsis oluşturulmuş.

Yamanel ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada sepsis grubunun akciğer dokusu MDA seviyeleri diğer tüm gruplara kıyasla anlamlı derecede yüksek bulunmuş. Hiperbarik oksijen ve ozon tedavisinin MDA değerleri sham hayvanlarına kıyasla anlamlı farklılık göstermemiş. Antioksidan enzim değerleri, SOD ve GSH-Px, sepsis hayvanlarında azalmış olarak bulunmuş. Sepsis grubuyla karşılaştırıldığında, ozon tedavisi grubunda hem SOD hem de GSH-Px aktivitesi için anlamlı derecede yüksek seviyeler bulunurken, Hiperbarik oksijen tedavisi grubunda sadece SOD aktivitesi artmış. Sepsis grubunun akciğer dokusundaki

miyeloperoksidaz aktivitesinin sham grubuna kıyasla anlamlı derecede artmış olduğu görülmüş ve bu da akciğer dokusuna nötrofil infiltrasyonu olduğunu göstermiştir. Hem ozon tedavisinin hem de hiperbarik oksijen uygulaması MPO aktivitesini azaltmış; ancak değerler yine de sham grubununkinden önemli ölçüde yüksek bulunmuş. Bu çalışmanın sonuçlarına göre ozon tedavisinin, oksidatif/antioksidan durumun modülasyonu yoluyla etkileri bakımından sepsisin kontrolünde antibiyoterapiye yardımcı olarak hiperbarik oksijen tedavisine alternatif bir terapötik yaklaşım olarak kullanılabileceğini ortaya koymaktadır(96).

Kontrol grubu ile DÇLPO grubunu karşılaştırdığımızda DÇLPO grubunda hem akciğer hem kalp dokusunda MDA düzeyinin yüksek, CAT enzim aktivitesi ise sadece kalp dokusunda düşük bulundu. Akciğer dokusunda CAT enzim aktivitesi kontrol grubu ile benzer bulundu. Kontrol grubu ile DOÇLP grubunu karşılaştırdığımızda ise DOÇLP grubunda sadece kalp dokusunda MDA düzeyi yüksek CAT enzim aktivitesi düşük bulundu. Akciğer dokusunda ise iki grupta her iki parametre benzer bulundu. Burada DÇLPO ile DOÇLP grupları arasında sadece akciğer dokusunda CAT enzim aktivitesi farklı bulundu. Buradan çıkarılacak sonuç ozonun önce uygulanması akciğerde CAT enzim aktivitesi üzerinde daha etkin olduğunu göstermektedir.

Karabulut ve arkadaşlarının ratlar üzerinde yaptığı bir çalışmada ÇLP yöntemi ile sepsis oluşturulmuş sonrasında antioksidan tedavi olarak suberosin verilmiş. MDA düzeyleri ile GSH ve SOD enzim aktiviteleri CLP grubunda olumsuz etkilenirken, suberosin tedavisi verilen gruplarda bu oksidatif stres parametrelerinin iyileştiği gösterilmiş(54). Madej ve arkadaşlarının septik ratlar

üzerinde yaptığı bir çalışmada *Escherichia coli* lipopolisakkaritinin intravenöz uygulaması ratlarda serbest radikal reaksiyonlarını uyardığını, SOD ve katalaz aktivitelerinde belirgin bir artış sağladığını göstermişler. Oksijen/ozon karışımının intraperitoneal infüzyonu, serbest radikal reaksiyonlarını ve enzimatik reaksiyonları kontrol seviyelerine geri döndürdüğünü ve bunun da klinik bir öneme sahip olabileceğini ortaya koymuşlardır(77).

Literatürde diyabetiklerde gelişen sepsis tedavisinde ozonun kullanılması ile ilgili yeterli çalışma olmaması ve diyabetik hastalarda önemli bir oranda sepsis görülmesi bu çalışmanın literatüre önemli bir katkı sağlayacağını düşündürmektedir. Diyabetin inflamasyon ve oksidatif stres üzerinde önemli etkileri olduğu bilinmektedir. Literatürdeki çalışmalarda sepsis tedavisinde ozonun kullanılması ile elde edilen sonuçların diyabetik farelerde gelişen sepsiste ozonun kullanılmasıyla elde edilen sonuçlarla benzer olduğunu ortaya koymuş olduk.

6. SONUÇ

İnsanların yaşam ve beslenme tarzlarının değişmesi sonucunda diyabetin dünyadaki yaygınlığı artmaktadır. Diyabetin sistemik bir hastalık olduğu ve tüm organ sistemlerini etkilediği kanıtlanmıştır. Diyabetik hastalar sepsis nedeniyle yoğun bakım ünitelerine yatış sıklığı, yatış süresi, morbidite ve mortalite oranları önemli derecede artmaktadır. Giderek artan antibiyotik direnci sebebiyle sepsis tedavisinde antibiyotiklere adjuvan tedavi arayışları devam etmektedir. Çalışmamızda diyabetik farelerde gelişen sepsise karşı ozon tedavisinin akciğer ve kalp dokusu üzerine etkilerini araştırılmıştır.

Çalışmamızda fareler STZ ile diyabet oluşturulduktan sonra diyabet organlar üzerine etkisi görülmesi için bir ay bekledik. Bu bir ayın sonunda farelerde sepsis oluşturmak için ÇLP yöntemini kullanıp ozon tedavisini uyguladıktan 24 saat sonra kalp ve akciğer dokuları alınıp histopatolojik ve biyokimyasal incelemeler yaptık.

Dokuların histopatolojik ve biyokimyasal incelemesinde kalp ve akciğer dokusunda hem diyabetin hem de sepsisin organlar üzerindeki etkilerini ozon tedavisiyle azaltabildiğimizi gördük. Ozon tedavisinin sepsisten önce uygulanmasının sepsisten sonra uygulanmasına göre daha etkili olduğu sonucuna vardık.

Sonuç olarak diyabetik hastaların sepsis tedavisinde sistemik ozon tedavisinin antibiyotik tedavisine adjuvan tedavi olarak uygulanabileceğini düşünmekteyiz. Ozon tedavisinin sepsisin akciğer ve kalp üzerindeki destrüktif etkilerini azaltarak hastaların morbidite ve mortalite oranlarını azaltacağı konusunda umut vadetmektedir. Ozon tedavisinin sepsisin neden olduğu hasarın düzeltilmesinde optimum düzeyde faydalanılabilmesi için mekanizma, dozaj ve zamanlama açısından ileri çalışmaların yapılması gerektiğini düşünmekteyiz.

7. ÖZET

Amaç: Bu çalışmada diyabetiklerde gelişen sepsis tedavisinde adjuvan tedavi olarak ozon tedavisinin kullanılmasının sepsisin en çok etkilediği iki organ olan kalp ve akciğer dokusu üzerine etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Bu çalışmada 46 adet Swiss albino faresi kullanıldı. Bu farelerin 40 tanesine İP 125 mg/kg dozunda STZ enjekte edilerek diyabet oluşturuldu. Fareler diyabet oluşturulduktan sonra diyabetin organlar üzerine etkisinin görülebilmesi için 1 ay beklenildi. 1 ayın sonunda diyabet oluşturulmayan 6 fare kontrol (K) (n=6) ve diyabet oluşturulan 40 fare ise rastgele 5 gruba ayrılarak diyabet (D) (n=8), diyabet+ozon (DO) (n=8), diyabet+çekal perforasyon (DÇLP) (n=8), diyabet+çekal perforasyon+ozon 1 (DÇLPO) (n=8), diyabet+çekal perforasyon+ozon 2 (DOÇLP) (n=8), grupları oluşturuldu. DO grubuna İP 1 ml (20mcg/ml) ozon enjekte edildi. Eş zamanlı olarak DÇLP grubuna ise ÇLP prosedürü uygulandı. DÇLPO grubuna ise ÇLP prosedürü yapıldıktan 1 saat sonra İP 1 ml (20 mcg/ml) ozon enjekte edildi. DOÇLP grubuna ise ÇLP prosedürü yapılmadan 1 saat önce İP 1 ml (20 mcg/ml) ozon enjekte edilip sonra ÇLP prosedürü uygulandı. Tüm gruplar 24 saat sonra derin anestezi altında intrakardiyak kan alınarak kurban edilip kalp ve akciğer dokuları alındı. Doku örnekleri; histopatolojik değerlendirme yapılmaya kadar %10'luk formaldehid solüsyonu içinde saklandı. Biyokimyasal değerlendirme yapmak için ise -70 derecede saklandı.

Bulgular: Akciğer histopatolojik incelemesinde interstisyel ödem, interstisyel hemoraji, alveolar konjesyon, nötrofil infiltrasyonu/agregasyonu, alveol duvar kalınlığı ve Toplam hasar skoru gruplar arasında anlamlı olarak farklı bulundu. Kalp histopatolojik incelemesinde inflamasyon-nötrofil infiltrasyonu, interstisyel ödem, miyokardiyal hücrelerde şişme, miyokardiyal nekroz gruplar arasında anlamlı olarak farklı bulundu. Miyokardiyal disorganizasyon ve interstisyel fibrozis gruplar arasında benzer bulundu. Kalp ve akciğer dokusunda diyabet ve sepsise bağlı inflamasyonun arttığı görüldü. Ozon uygulanan gruplarda ise bu inflamasyonun azaldığı görüldü. Biyokimyasal parametrelerde ise kalp ve akciğer dokusunda MDA ve CAT seviyeleri gruplar arasında anlamlı düzeyde farklı bulundu. Sepsis ve diyabet oluşturulan gruplarda hem kalp hem akciğer dokusunda MDA seviyelerinin arttığı görüldü. Ozon uygulanan gruplarda ise MDA seviyesinin azaldığı görüldü. Sepsis ve diyabet oluşturulan gruplarda CAT seviyesinin azaldığı, ozon uygulanan gruplarda ise CAT seviyesinin arttığı görüldü.

Sonuç: Diyabet ve sepsisin akciğer ve kalp üzerindeki yıkıcı etkilerinin ozon tedavisi önlenileceğini göstermiş olduk. Ayrıca ozonun sepsisten önce uygulanmasının hem kalp hem de akciğer dokusunda ozonun sepsisten sonra uygulanmasından daha etkili olduğunu saptadık.

Anahtar kelimeler: Diyabetes mellitus, Sepsis, Ozon, Akciğer, Kalp

8. SUMMARY

Objective: The aim of this study was to investigate the effects of ozone therapy as adjuvant therapy in the treatment of sepsis in diabetics on heart and lung tissue, the two organs most affected by sepsis.

Materials and Methods: In this study, 46 Swiss albino mice were used. Diabetes was induced in 40 of these mice by injecting STZ at a dose of IP 125 mg/kg. After diabetes was induced, the mice were waited for 1 month to observe the effects of diabetes on the organs. At the end of 1 month, 6 mice without diabetes were divided into control (K) (n=6) and 40 mice with diabetes were randomly divided into 5 groups and diabetes (D) (n=8), diabetes+ozone (DO) (n=8), diabetes+cecal perforation (DCLP) (n=8), diabetes+cecal perforation+ozone 1 (DCLPO) (n=8), diabetes+cecal perforation+ozone 2 (DCLCLP) (n=8) groups were formed. IP 1 ml (20mcg/ml) ozone was injected into the DO group. Simultaneously, the CLP procedure was performed in the DCLP group. In the DCLPO group, IP 1 ml (20 mcg/ml) ozone was injected 1 hour after the CLP procedure. In the DOÇLP group, IP 1 ml (20 mcg/ml) ozone was injected 1 hour before the ÇLP procedure and then ÇLP procedure was performed. All groups were sacrificed 24 hours later under deep anesthesia by intracardiac blood sampling and heart and lung tissues were removed. Tissue samples were stored in 10% formaldehyde solution until histopathological evaluation. For biochemical evaluation, they were stored at -70°C.

Results: In lung histopathologic examination, interstitial edema, interstitial hemorrhage, alveolar congestion, neutrophil infiltration/aggregation, alveolar wall

thickness and total damage score were significantly different between the groups. In histopathologic examination of the heart, inflammation-neutrophil infiltration, interstitial edema, swelling of myocardial cells, and myocardial necrosis were significantly different between the groups. Myocardial disorganization and interstitial fibrosis were similar between the groups. Diabetes and sepsis-induced inflammation increased in heart and lung tissue. This inflammation was decreased in ozone treated groups. In biochemical parameters, MDA and CAT levels in heart and lung tissue were significantly different between the groups. In sepsis and diabetes induced groups, MDA levels increased in both heart and lung tissue. In the ozone-treated groups, MDA levels decreased. CAT levels decreased in sepsis and diabetes induced groups, while CAT levels increased in ozone treated groups.

Conclusion: We have shown that the destructive effects of diabetes and sepsis on the lung and heart can be prevented by ozone therapy. We also found that ozone administration before sepsis is more effective than ozone administration after sepsis in both heart and lung tissue.

Key words: Diabetes mellitus, Sepsis, Ozone, Lung, Heart

9. KAYNAKLAR

1. Loscalzo J, Fauci AS, Kasper DL, Hauser S, Longo D, Jameson JL. 2022. *Harrison's Principles of Internal Medicine, Twenty-First Edition (Vol.1 & Vol.2)*. McGraw Hill LLC
2. Sengel N, Kucuk A, Ozdemir C, Sezen SC, Kip G, et al. 2023. 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* 18:7543-57
3. Skorup P, Fransson A, Gustavsson J, Sjöholm J, Rundgren H, et al. 2022. Evaluation of an extracorporeal ozone-based bactericide system for the treatment of Escherichia coli sepsis. *Intensive Care Med Exp* 10:14
4. Orakdogan M, Uslu S, Emon ST, Somay H, Meric ZC, Hakan T. 2016. The Effect of Ozone Therapy on Experimental Vasospasm in the Rat Femoral Artery. *Turk Neurosurg* 26:860-5
5. Liu L, Zeng L, Gao L, Zeng J, Lu J. 2023. Ozone therapy for skin diseases: Cellular and molecular mechanisms. *Int Wound J* 20:2376-85
6. de Sire A, Agostini F, Lippi L, Mangone M, Marchese S, et al. 2021. Oxygen-Ozone Therapy in the Rehabilitation Field: State of the Art on Mechanisms of Action, Safety and Effectiveness in Patients with Musculoskeletal Disorders. *Biomolecules* 11
7. Janmeda P, Chaudhary P, Paliwal S. 2022. Swiss Albino Mice A Model of Research. *Science Reporter*:31
8. Arslan M, Anadol E, Özer A. 2023. *Bilimsel Araştırmalarda Laboratuvar Hayvanları & Deneysel Modeller*. Akademisyen Kitabevi
9. Irena Zl, R. Rajna, M. Katarina, M. Iva, A. Jasminka, K. Vladimir, P. 2016. Characterization of intor:Swiss albino mice adopted in the institute of virology, vaccines and sera – torlak, belgrade in the early twentieth century. *Acta Veterinaria-Beograd* 66:279-93
10. Ritchie RH, Abel ED. 2020. Basic Mechanisms of Diabetic Heart Disease. *Circ Res* 126:1501-25
11. Szkudelski T. 2001. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res* 50:537-46
12. Furman BL. 2021. Streptozotocin-Induced Diabetic Models in Mice and Rats. *Curr Protoc* 1:e78
13. Rakieten N, Rakieten ML, Nadkarni MV. 1963. Studies on the diabetogenic action of streptozotocin (NSC-37917). *Cancer Chemother Rep* 29:91-8
14. Junod A, Lambert AE, Orci L, Pictet R, Gonet AE, Renold AE. 1967. Studies of the diabetogenic action of streptozotocin. *Proc Soc Exp Biol Med* 126:201-5
15. Junod A, Lambert AE, Stauffacher W, Renold AE. 1969. Diabetogenic action of streptozotocin: relationship of dose to metabolic response. *J Clin Invest* 48:2129-39
16. Kolb H. 1987. Mouse models of insulin dependent diabetes: low-dose streptozocin-induced diabetes and nonobese diabetic (NOD) mice. *Diabetes Metab Rev* 3:751-78

17. Gurley SB, Clare SE, Snow KP, Hu A, Meyer TW, Coffman TM. 2006. Impact of genetic background on nephropathy in diabetic mice. *Am J Physiol Renal Physiol* 290:F214-22
18. Paik SG, Michelis MA, Kim YT, Shin S. 1982. Induction of insulin-dependent diabetes by streptozotocin. Inhibition by estrogens and potentiation by androgens. *Diabetes* 31:724-9
19. Schnedl WJ, Ferber S, Johnson JH, Newgard CB. 1994. STZ transport and cytotoxicity. Specific enhancement in GLUT2-expressing cells. *Diabetes* 43:1326-33
20. Rittirsch D, Huber-Lang MS, Flierl MA, Ward PA. 2009. Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture. *Nat Protoc* 4:31-6
21. Siempos, II, Lam HC, Ding Y, Choi ME, Choi AM, Ryter SW. 2014. Cecal ligation and puncture-induced sepsis as a model to study autophagy in mice. *J Vis Exp*:e51066
22. Sjaastad FV, Jensen IJ, Berton RR, Badovinac VP, Griffith TS. 2020. Inducing Experimental Polymicrobial Sepsis by Cecal Ligation and Puncture. *Curr Protoc Immunol* 131:e110
23. Bocci V. 2010. *OZONE: A new medical drug*. Springer Netherlands
24. Bocci V, Borrelli E, Travagli V, Zanardi I. 2009. The ozone paradox: ozone is a strong oxidant as well as a medical drug. *Med Res Rev* 29:646-82
25. Smith NL, Wilson AL, Gandhi J, Vatsia S, Khan SA. 2017. Ozone therapy: an overview of pharmacodynamics, current research, and clinical utility. *Med Gas Res* 7:212-9
26. Elvis AM, Ekta JS. 2011. Ozone therapy: A clinical review. *J Nat Sci Biol Med* 2:66-70
27. Bocci V, Zanardi I, Travagli V. 2011. Oxygen/ozone as a medical gas mixture. A critical evaluation of the various methods clarifies positive and negative aspects. *Med Gas Res* 1:6
28. Bocci VA, Zanardi I, Travagli V. 2011. Ozone acting on human blood yields a hormetic dose-response relationship. *J Transl Med* 9:66
29. Azuma K, Mori T, Kawamoto K, Kuroda K, Tsuka T, et al. 2014. Anti-inflammatory effects of ozonated water in an experimental mouse model. *Biomed Rep* 2:671-4
30. Li C, Zhang J, Xue M, Li X, Han F, et al. 2019. SGLT2 inhibition with empagliflozin attenuates myocardial oxidative stress and fibrosis in diabetic mice heart. *Cardiovasc Diabetol* 18:15
31. Almaz ME, Sonmez IS. 2015. Ozone therapy in the management and prevention of caries. *J Formos Med Assoc* 114:3-11
32. Sconza C, Respizzi S, Virelli L, Vandenbulcke F, Iacono F, et al. 2020. Oxygen-Ozone Therapy for the Treatment of Knee Osteoarthritis: A Systematic Review of Randomized Controlled Trials. *Arthroscopy* 36:277-86
33. Ulusoy GR, Bilge A, Ozturk O. 2019. Comparison of corticosteroid injection and ozone injection for relief of pain in chronic lateral epicondylitis. *Acta Orthop Belg* 85:317-24
34. Goldman L, Schafer AI. 2019. *Goldman-Cecil Medicine E-Book*. Elsevier Health Sciences

35. Peng ML, Fu Y, Wu CW, Zhang Y, Ren H, Zhou SS. 2022. Signaling Pathways Related to Oxidative Stress in Diabetic Cardiomyopathy. *Front Endocrinol (Lausanne)* 13:907757
36. Rahman MO, Ahmed S, Mazumder T, Salam MA, Baral PK, et al. 2022. A comparative evaluation of cardiac and neurological safety status of two commonly used oral hypoglycaemic agents in T2-DM Swiss albino mice model. *Metabol Open* 14:100191
37. Bocci V, Zanardi I, Huijberts MS, Travagli V. 2011. Diabetes and chronic oxidative stress. A perspective based on the possible usefulness of ozone therapy. *Diabetes Metab Syndr* 5:45-9
38. Baynes JW. 1991. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes* 40:405-12
39. van den Borst B, Gosker HR, Zeegers MP, Schols AM. 2010. Pulmonary function in diabetes: a metaanalysis. *Chest* 138:393-406
40. Zhang RH, Zhou JB, Cai YH, Shu LP, Simo R, Lecube A. 2020. Non-linear association between diabetes mellitus and pulmonary function: a population-based study. *Respir Res* 21:292
41. Sanchez E, Gutierrez-Carrasquilla L, Barbe F, Betriu A, Lopez-Cano C, et al. 2019. Lung function measurements in the prediabetes stage: data from the ILERVAS Project. *Acta Diabetol* 56:1005-12
42. !!! INVALID CITATION !!! (35).
43. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, et al. 2016. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* 315:801-10
44. Lilly CM, Irwin RS, Boyle WA, Kelly WF. 2023. *Irwin and Rippe's Intensive Care Medicine*. Wolters Kluwer Health
45. Angriman F, Saoraya J, Lawler PR, Shah BR, Martin CM, et al. 2024. Preexisting Diabetes Mellitus and All-Cause Mortality in Adult Patients With Sepsis: A Population-Based Cohort Study. *Crit Care Explor* 6:e1085
46. Nakagawa NK, Jukemura J, Aikawa P, Nogueira RA, Poli-de-Figueiredo LF, Sannomiya P. 2007. In vivo observation of mesenteric leukocyte-endothelial interactions after cecal ligation/puncture and surgical sepsis source control. *Clinics (Sao Paulo)* 62:321-6
47. Iskander KN, Craciun FL, Stepien DM, Duffy ER, Kim J, et al. 2013. Cecal ligation and puncture-induced murine sepsis does not cause lung injury. *Crit Care Med* 41:159-70
48. Filgueiras LR, Jr., Martins JO, Serezani CH, Capelozzi VL, Montes MB, Jancar S. 2012. Sepsis-induced acute lung injury (ALI) is milder in diabetic rats and correlates with impaired NFkB activation. *PLoS One* 7:e44987
49. Huang W, McCaig LA, Veldhuizen RA, Yao LJ, Lewis JF. 2005. Mechanisms responsible for surfactant changes in sepsis-induced lung injury. *Eur Respir J* 26:1074-9
50. Jin LY, Li CF, Zhu GF, Wu CT, Wang J, Yan SF. 2014. Effect of siRNA against NF-kappaB on sepsis-induced acute lung injury in a mouse model. *Mol Med Rep* 10:631-7

51. Fisher BJ, Kraskauskas D, Martin EJ, Farkas D, Wegelin JA, et al. 2012. Mechanisms of attenuation of abdominal sepsis induced acute lung injury by ascorbic acid. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 303:L20-32
52. Sorgun O, Cakir A, Bora ES, Erdogan MA, Uyanikgil Y, Erbas O. 2023. Anti-inflammatory and antioxidant properties of betaine protect against sepsis-induced acute lung injury: CT and histological evidence. *Braz J Med Biol Res* 56:e12906
53. Liu Z, Xu J, Zhao Y, Wan Y, Guo R, et al. 2024. Dexmedetomidine protects against sepsis-induced lung injury through autophagy and Smad2/3 signaling pathway. *Iran J Basic Med Sci* 27:453-60
54. Karabulut Uzuncakmak S, Halici Z, Karakaya S, Kutlu Z, Saglam YS, et al. 2023. Suberosin Alleviates Sepsis-Induced Lung Injury in A Rat Model of Cecal Ligation and Puncture. *J Invest Surg* 36:1-9
55. Neumann B, Zantl N, Veihelmann A, Emmanuilidis K, Pfeffer K, et al. 1999. Mechanisms of acute inflammatory lung injury induced by abdominal sepsis. *Int Immunol* 11:217-27
56. Koh GC, Peacock SJ, van der Poll T, Wiersinga WJ. 2012. The impact of diabetes on the pathogenesis of sepsis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 31:379-88
57. Bodke H, Wagh V, Kakar G. 2023. Diabetes Mellitus and Prevalence of Other Comorbid Conditions: A Systematic Review. *Cureus* 15:e49374
58. Critchley JA, Carey IM, Harris T, DeWilde S, Hosking FJ, Cook DG. 2018. Glycemic Control and Risk of Infections Among People With Type 1 or Type 2 Diabetes in a Large Primary Care Cohort Study. *Diabetes Care* 41:2127-35
59. van Vught LA, Scicluna BP, Hoogendijk AJ, Wiewel MA, Klein Klouwenberg PM, et al. 2016. Association of diabetes and diabetes treatment with the host response in critically ill sepsis patients. *Crit Care* 20:252
60. Costantini E, Carlin M, Porta M, Brizzi MF. 2021. Type 2 diabetes mellitus and sepsis: state of the art, certainties and missing evidence. *Acta Diabetol* 58:1139-51
61. Frijhoff J, Winyard PG, Zarkovic N, Davies SS, Stocker R, et al. 2015. Clinical Relevance of Biomarkers of Oxidative Stress. *Antioxid Redox Signal* 23:1144-70
62. Halliwell B. 2006. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol* 141:312-22
63. Pu X, Li F, Lin X, Wang R, Chen Z. 2022. Oxidative stress and expression of inflammatory factors in lung tissue of acute mountain sickness rats. *Mol Med Rep* 25
64. Ohta Y, Kinugawa S, Matsushima S, Ono T, Sobirin MA, et al. 2011. Oxidative stress impairs insulin signal in skeletal muscle and causes insulin resistance in postinfarct heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 300:H1637-44
65. Shimosawa T, Ogiwara T, Matsui H, Asano T, Ando K, Fujita T. 2003. Deficiency of adrenomedullin induces insulin resistance by increasing oxidative stress. *Hypertension* 41:1080-5
66. Ogura S, Shimosawa T. 2014. Oxidative stress and organ damages. *Curr Hypertens Rep* 16:452
67. Tsutsui H, Kinugawa S, Matsushima S, Yokota T. 2011. Oxidative stress in cardiac and skeletal muscle dysfunction associated with diabetes mellitus. *J Clin Biochem Nutr* 48:68-71

68. Tsutsui H, Kinugawa S, Matsushima S. 2011. Oxidative stress and heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 301:H2181-90
69. Guanche D, Hernandez F, Zamora Z, Alonso Y. 2010. Effect of ozone pre-conditioning on redox activity in a rat model of septic shock. *Toxicol Mech Methods* 20:466-71
70. Rodriguez ZZ, Guanche D, Alvarez RG, Rosales FH, Alonso Y, Schulz S. 2009. Preconditioning with ozone/oxygen mixture induces reversion of some indicators of oxidative stress and prevents organic damage in rats with fecal peritonitis. *Inflamm Res* 58:371-5
71. Zima AV, Blatter LA. 2006. Redox regulation of cardiac calcium channels and transporters. *Cardiovasc Res* 71:310-21
72. Zipes DP, Libby P, Bonow RO, Mann DL, Tomaselli GF. 2018. *Braunwald's Heart Disease E-Book: A Textbook of Cardiovascular Medicine*. Elsevier Health Sciences
73. Aimo A, Castiglione V, Borrelli C, Saccaro LF, Franzini M, et al. 2020. Oxidative stress and inflammation in the evolution of heart failure: From pathophysiology to therapeutic strategies. *Eur J Prev Cardiol* 27:494-510
74. Karagueuzian HS, Nguyen TP, Qu Z, Weiss JN. 2013. Oxidative stress, fibrosis, and early afterdepolarization-mediated cardiac arrhythmias. *Front Physiol* 4:19
75. Liu JQ, Zelko IN, Erbynn EM, Sham JS, Folz RJ. 2006. Hypoxic pulmonary hypertension: role of superoxide and NADPH oxidase (gp91phox). *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 290:L2-10
76. Feng R, He W, Ochi H. 2001. A new murine oxidative stress model associated with senescence. *Mech Ageing Dev* 122:547-59
77. Madej P, Plewka A, Madej JA, Nowak M, Plewka D, et al. 2007. Ozonotherapy in an induced septic shock. I. Effect of ozonotherapy on rat organs in evaluation of free radical reactions and selected enzymatic systems. *Inflammation* 30:52-8
78. Rodriguez ZZ, Guanche D, Alvarez RG, Martinez Y, Alonso Y, Schulz S. 2011. Effects of ozone oxidative preconditioning on different hepatic biomarkers of oxidative stress in endotoxic shock in mice. *Toxicol Mech Methods* 21:236-40
79. Rodwell VW, McGuinness O, Botham KM, Kennelly PJ, Weil PA. 2022. *IE Harper's Illustrated Biochemistry* 32/e. McGraw-Hill Education
80. Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. 2012. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J* 5:9-19
81. Jonsson LM, Edlund T, Marklund SL, Sandstrom T. 2002. Increased ozone-induced airway neutrophilic inflammation in extracellular-superoxide dismutase null mice. *Respir Med* 96:209-14
82. Tsaturyan V, Poghosyan A, Toczylowski M, Pepoyan A. 2022. Evaluation of Malondialdehyde Levels, Oxidative Stress and Host-Bacteria Interactions: Escherichia coli and Salmonella Derby. *Cells* 11
83. Park SS, Mai M, Ploszaj M, Cai H, McGarvey L, et al. 2023. Type 1 diabetes contributes to combined pulmonary fibrosis and emphysema in male alpha 1 antitrypsin deficient mice. *PLoS One* 18:e0291948
84. Sudy R, Schranc A, Fodor GH, Tolnai J, Babik B, Petak F. 2020. Lung volume dependence of respiratory function in rodent models of diabetes mellitus. *Respir Res* 21:82

85. Yan XX, Zheng AD, Zhang ZE, Pan GC, Zhou W. 2019. Protective effect of pantoprazole against sepsis-induced acute lung and kidney injury in rats. *Am J Transl Res* 11:5197-211
86. Souza YM, Fontes B, Martins JO, Sannomiya P, Brito GS, et al. 2010. Evaluation of the effects of ozone therapy in the treatment of intra-abdominal infection in rats. *Clinics (Sao Paulo)* 65:195-202
87. Bette M, Nusing RM, Mutters R, Zamora ZB, Menendez S, Schulz S. 2006. Efficiency of tazobactam/piperacillin in lethal peritonitis is enhanced after preconditioning of rats with O3/O2-pneumoperitoneum. *Shock* 25:23-9
88. Celes MR, Prado CM, Rossi MA. 2013. Sepsis: going to the heart of the matter. *Pathobiology* 80:70-86
89. Li FL, Wan X, Wang X, Liu X, Wu YL, et al. 2018. [Simvastatin prevented myocardium of diabetes rats from apoptosis through inhibition of oxidative stress]. *Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi* 34:422-6 69
90. Karabulut D, Ulusoy HB, Kaymak E, Sonmez MF. 2016. Therapeutic effects of pentoxifylline on diabetic heart tissue via NOS. *Anatol J Cardiol* 16:310-5
91. Oh JE, Jun JH, Hwang HJ, Shin EJ, Oh YJ, Choi YS. 2019. Dexmedetomidine restores autophagy and cardiac dysfunction in rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus. *Acta Diabetol* 56:105-14
92. Angriman F, Lawler PR, Shah BR, Martin CM, Scales DC, the Sepsis Canada N. 2023. Prevalent diabetes and long-term cardiovascular outcomes in adult sepsis survivors: a population-based cohort study. *Crit Care* 27:302
93. Cai J, Lu S, Yao Z, Deng YP, Zhang LD, et al. 2014. Glibenclamide attenuates myocardial injury by lipopolysaccharides in streptozotocin-induced diabetic mice. *Cardiovasc Diabetol* 13:106
94. Martinez-Sanchez G, Al-Dalain SM, Menendez S, Re L, Giuliani A, et al. 2005. Therapeutic efficacy of ozone in patients with diabetic foot. *Eur J Pharmacol* 523:151-61
95. Jacobs S, Sobki S, Morais C, Tariq M. 2000. Effect of pentaglobin and piperacillin on survival in a rat model of faecal peritonitis: importance of intervention timings. *Acta Anaesthesiol Scand* 44:88-95
96. Yamanel L, Kaldirim U, Oztas Y, Coskun O, Poyrazoglu Y, et al. 2011. Ozone therapy and hyperbaric oxygen treatment in lung injury in septic rats. *Int J Med Sci* 8:48-55