

**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
PROJE KESİN RAPORU**

Diyabetik Sıçanlarda Sistemik Ve Lokal Ozon Uygulamasının Yara İyileşmesi Üzerine Etkisinin
İncelenmesi

Prof. Dr. Çiğdem ÖZER

Prof. Dr. Candan Özoğul

Prof. Dr. Celaletdin Avni Babacan

Öğr. Üyesi Dr. Hakan Dayanır

Öğr. Üyesi Dr. Dilek Kuzay

Öğr. Gör. Dr. Duygu Dayanır

Proje Kodu: 01/2017-27

Başlama-Bitiş Tarihi: 06.10.2017-24.09.2020

Rapor Tarihi:24.09.2020

Tıp Fakültesi / Temel Tıp/Fizyoloji Anabilim Dalı

Ankara-“2020”



T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KESİN RAPOR FORMU

İÇİNDEKİLER

Sayfa

Özet	3
Projenin Amacı ve Kapsamı	4
Projenin Materyal-Yöntemi	5
Projenin Bulguları	8
Projenin Sonucu ve Öneriler	12
Geleceğe İlişkin Öngörülen Katkılar	12
Kaynaklar	12
Ekler	14



T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KESİN RAPOR FORMU

(Proje kesin raporu ekler hariç 15 sayfayı geçmemelidir. Projeler A4 formatında, Times New Roman karakterinde, 12 punto büyüklüğünde ve tek satır aralıkla yazılmalıdır. Proje raporu aşağıdaki başlıklar dikkate alınarak hazırlanmalıdır)

Özet (Proje başlığı, özeti ve anahtar kelimeler Türkçe ve İngilizce yazılmalıdır. (Proje özeti 250 kelimeyi geçmemelidir.)

Proje Adı: Diyabetik Sıçanlarda Sistemik Ve Lokal Ozon Uygulamasının Yara İyileşmesi Üzerine Etkisinin İncelenmesi

Proje Özeti: Kronik diyabette iyileşemeyen yaralara rastlanmaktadır. Ozon antioksidan sistemi uyarıcı, antimikrobiyal, antiinflamatuvar, özellikleriyle yara iyileşmesini uyarıcı etkilere sahiptir.

Çalışmamızda; Sistemik ve lokal ozon tedavisinin Diyabetik sıçanlarda kesi yarası iyileşme sürecine ve yara dokusu oksidan-antioksidan düzeylerine etkilerini incelemeyi amaçladık. Etik Kurul onayından sonra, GÜDAM'dan temin edilen erkek Wistar-Albino sıçanlar Diyabet yapılan, yapılmayan olarak önce ikiye, sonrasında; ozon uygulanmayan(K), lokal(L), sistemik(S) ve lokal+sistemik(S+L) olarak 4 gruba ayrıldı. Bu gruplarda kendi içinde tedavi sürelerine göre 3 gün, 5 gün olarak 2 alt gruba ayrıldı. Diyabet, 65mg/kg Streptozotosinin tekdoz, i.p enjeksiyonuyla yapıldı. Uygulamadan 48 saat sonra AKŞ'leri 250mg/dl üzeri olanlar diyabet (DM+) grubuna alındı. Sırt derisinde 5 cm uzunluğunda kesi yapıp, dikişle kapatıldı. Ozon, Sistemik tedavide: ip. 1.1 mg/kg/gün dozda, Lokal Tedavide: 1 mcg/gün dozda yara bölgesine subcutan enjeksiyonla verildi. K+L tedavi aynı gün içinde önce S sonra L uygulama şeklinde yapıldı. Denekler son uygulamadan 2 gün sonra feda edilerek yara dokusunda genel histomorfolojik inceleme yanında, mikroskopik olarak MMP-2, MMP-9, VEGF, TIMP-1, TIMP-2 düzeyleri, oksidan antioksidan düzeyleri açısından da dokuda MDA, GSH, NOx ve SOD düzeylerine bakıldı. Bulgular Kruskal Wallis ve Mann-Whitney U testleri ile karşılaştırıldı p<0,05 değerleri anlamlı kabul edildi.

Ozon uygulaması yapılan tüm gruplarda epitel rejenerasyonu ve immün tutulum verilerinde olumlu anlamlı değişiklik tespit edildi. DM(+) gruplar içerisinde L gruplarda S gruplara kıyasla daha ileri epitelizasyon görüldü.

Diyabetle birlikte oksidan stres artarken antioksidan düzeyleri azaldı ancak ozon tedavisinin bu durum üzerinde anlamlı iyileştirici bir etkisi görülmedi. Ancak ozon verilmeyen 5 günlük diyabetli grupta anlamlı yükselen NOx değerleri kombine tedaviyle düştü (p<0,05).

Anahtar Kelimeler: Diyabetes Mellitus, Medikal ozon tedavisi, Kesi yarası, Yara iyileşmesi

Title: Examining The Effect Of Systemic And Local Ozone For Wound Healing And The Other Tissues In Diabetic Rats

Abstract: Non-healing wounds can be seen in chronic diabetes. Ozone has stimulating

effects on wound healing by antioxidant, antimicrobial, anti-inflammatory properties. In our study; we aimed to investigate the effects of systemic and local ozone therapy on wound healing process and scar tissue oxidant-antioxidant levels in diabetic rats. After the approval of the Ethics Committee, male Wistar-Albino rats obtained from GUDAM were diagnosed with and without Diabetes first in two, then in four as; control(K), local(L), systemic(S) and local+systemic(S+L) groups. Groups were divided into 2 subgroups as 3 days and 5 days according to the duration of treatment. Diabetes was induced by a single dose i.p injection of 65mg/kg Streptozotocin. Those who had FBG above 250mg/dl 48 hours after the application were included in the diabetes (DM+) group. 5cm long incision was made on the back skin and sutured. Ozone was applied, in systemic treatment: ip., 1.1 mg/kg/day, in local Treatment: 1 mcg/day and was given to the wound area by subcutan injection. C+L treatment was applied on the same day as S then L application. Subjects were sacrificed 2 days after the last application. In addition to the general histomorphological examination of the wound tissue, MMP-2, MMP-9, VEGF, TIMP-1, TIMP-2 levels were measured microscopically, and MDA, GSH, NOx and SOD levels in the tissue in terms of oxidant antioxidant levels. The findings were compared with Kruskal Wallis and Mann-Whitney U tests. p value of <0.05 was considered significant.

A positive significant change was detected in the epithelial regeneration and immune uptake data in all groups treated with ozone. In DM (+) groups, more advanced epithelization was observed in L groups compared to S groups.

Oxidant stress levels were increased in DM(+) groups while antioxidant levels were decreased, but ozone therapy had no significant curative effect on this condition. However, NOx values, which were increased significantly in the 5-day DM(+) C group, were decreased with combined therapy (p <0.05).

Keywords: Diabetes Mellitus, Medical ozone treatment, Incisional wound, Wound healing

1- Projenin Amacı ve Kapsamı

Diyabetes mellitus (DM) insülin yapımında ve salınımında veya dokularda insüline yanıtta bozulma ile karakterize dünya çapında yaygın bir sendromdur. İnsüline dokulardaki yanıtınlığa göre; insüline bağımlı (IBDM-Tip I) ve insüline bağımsız (NIBDM-Tip II) olarak sınıflandırılmaktadır. DM; poliüri, polidipsi, polifaji ve buna rağmen kilo kaybı, hiperglisemi, glikozüri, ketoz, asidoz ve koma ile karakterizedir. Diyabetin akut komplikasyonları arasında diyabetik ketoasidoz, hiperosmolar koma, hipoglisemi, laktik asidoz sayılabilir. Kronik komplikasyonları ise genel olarak makro ve mikrovasküler düzeydedir. Makrovasküler komplikasyonlar arasında hipertansiyon, kardiyovasküler ve serebrovasküler hastalıklar ile periferik arter hastalığı yer alırken, nöropati, retinopati ve nefropati mikrovasküler komplikasyonları oluşturur. Diyabette protein glikasyonu ve glukoz otooksidasyonu sonucu serbest radikaller oluşumu artar. Diyabetin kronik komplikasyonlarının etyopatogenezinde artmış oksidan stresin önemli rol oynadığı düşünülmektedir. Deney hayvanlarında selektif pankreas hasarı ile diyabet oluşturmak üzere en sık kullanılan iki ajan alloksan ve streptozotosin (STZ)' dir. Yara iyileşmesi, uzun süre, canlılık işlevinin doğal bir parçası gibi kabul edilmiştir. Diyabet bağ dokusu metabolizmasını olumsuz yönde etkilediğinden yara iyileşmesinde etkili olan yapıları bozmaktadır. Bu olumsuzluğu yaratan nedenler yeterince açık değildir ancak yüksek kan glukozu; hücre proliferasyonunu azaltmakta ve protein glikolizasyonuna neden olarak kollojen sentezini etkilemektedir. Yüksek kan glukozu durumunda kollojen liflerinin çapraz köprülerinde görülen azalma sonucunda kollojenaz ile yıkıma yatkınlık oluşmaktadır.

Diyabetik yarada kollojen sentezinin mediyatörleri olan büyüme faktörleri de, muhtemelen gecikmiş ve azalmış inflamatuvar cevaba sekonder olarak azalmıştır. Bununla birlikte diyabetik yaralarda, enfeksiyöz komplikasyonların artışına neden olabilen fagositoz kabiliyet kaybı ve granülasyon dokusu oluşumunu azaltabilen apoptoz artışı gözlenmektedir.

Ozon (O_3); üç oksijen atomundan oluşan bir kimyasal bileşiktir. O_3 oda sıcaklığında renksiz, keskin kokulu bir gazdır. Oksijen atomu (O_2), antioksidan sistemi uyarıcı, antimikrobiyal, antiinflamatuvar, toksin ve ağır metal inhibe edici ve laktik asiti giderici özelliği ile metabolizmayı hızlandırıcı ve yaraların iyileşmesini uyarıcı etkilere sahiptir. Ozon bu tıbbi etkilerinin çoğunu kan oksijen düzeylerini yükselterek ve bağışıklık sistemini güçlendirerek gerçekleştirir. Çoğu diyabet, hipertansiyon ve koroner arter hastası; bozulmuş periferik kan akımından dolayı iyileşemeyen yaralara sahiptir. İskemik hastalıklar başta olmak üzere birçok hastalıkta lipid peroksidasyonunda ve oksidan strese artış görülmüştür. Ozon terapisinde vücuda aktif oksijen türleri verildiğinden, ozonun lipid peroksidasyon (LPO) süreçlerine etkisini araştırmak çok önemlidir. Yapılan çok sayıda araştırma ozonun terapötik dozlarının antioksidan sistemleri stimüle ettiğini ve LPO şiddetini düşürdüğünü göstermektedir. Aynı zamanda, antioksidan savunma sistemi ozon tarafından uyarılarak aktive olur.

Ozon terapisi kan glukozunda azalma meydana getirir. Bu azalma, glukoz-6-fosfat-dehidrogenaz aktivitesinde artışa ve bu enzimin heksozaminofosfat yolunda yer alan reaksiyonlarda kullanımının artışına bağlıdır. Ozonun detoksifiye edici etkileri hepatositlerdeki mikrozomal sistemin (ökaryotik hücrede, endoplazmik retikulum üzerinde bulunan ve enzim üreten yapılar) aktive olması ve karaciğerin filtrasyon işlevinin artması üzerinden gerçekleşir.

Bir farmasötik madde olarak medikal ozon, gaz halinde olduğundan ayrıcalıklıdır ve özel uygulama şekilleri gerektirmektedir. Medikal ozon/oksijen karışımları göz önüne alındığında, oksijen yalnızca ozon hazırlamak için bir gaz olarak değil, aynı zamanda pratikte uygulanan 1.0 ile 100 $\mu\text{g/ml}$ ozon konsantrasyon aralığına karşılık olarak 0.05 ila maksimum 5.0 % hacim aralığındaki ozona bir solvent olarak kullanılmaktadır. Tek kullanımlık bir enjektörde (tamamen silikonlanmış ve ozona dirençli) yarılanma ömrü 55 dakikadır. Teknik olarak, kullanılan “medikal ozon”, aslında en saf ozon ve medikal oksijen (0.05-5% (Hacim) ozon = 1-100 $\mu\text{g/ml}$ ozon + 99.95-95% oksijen) karışımıdır. Doğada ortaya çıkan ve antropojenik, saf olmayan ozonun aksine, medikal ozonun miktarı tam olarak belirtilir (10-40 μg ozon / ml kanda).

Ozon tedavisi antioksidan sistemi uyarıcı, antimikrobiyal, antiinflamatuvar, toksin ve ağır metal inhibe edici ve laktik asiti giderici özelliği ile metabolizmayı hızlandırıcı ve yaraların iyileşmesini uyarıcı etkilere sahiptir.

Literatürdeki bu bilgiler ışığında çalışmamızın amacı; Sistemik ve lokal ozon tedavisinin Diyabetik sıçanlarda kesi yarası iyileşme sürecine ve yara dokusu üzerine olan etkilerini oksidan ve antioksidan mekanizmalar ile ilişkilendirerek açıklamaktır.

2- Projenin Materyal-Yöntemi

Çalışmada Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezi'nden (GÜDAM) temin edilen ağırlıkları 250 ± 20 gr arasında değişen 96 adet erişkin, erkek Wistar Albino sıçan kullanıldı. Sıçanlarda yapılacak deneyler GÜDAM laboratuvarında gerçekleştirildi.

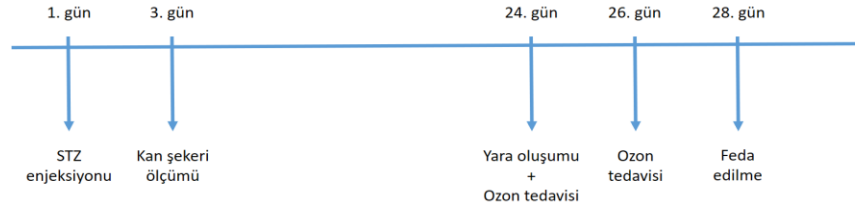
Sıçanların her biri ayrı kafeslerde 12 saat aydınlık-karanlık siklusunda, $24 \pm 2^\circ\text{C}$ 'lik ortamda, standart sıçan yemi ve musluk suyu ile serbest olarak beslendi.

Deneye başlamadan önce bütün hayvanlar 8 saatlik açlığı takiben tartıldı ve kuyruk veninden kan alınarak açlık kan şekeri (AKŞ) ölçüldü.

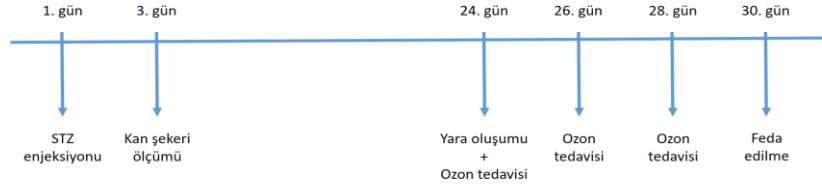
Deney Protokolü: Çalışmadaki denekler Diyabet yapılan (STZ yapılan) ve Diyabet yapılmayan (STZ nin çözücüsü sitrat tamponu yapılan) olarak 2 ana gruba ayrıldı. Daha sonra bu iki ana grup kendi içinde ozonun uygulama şekline göre kontrol, lokal, sistemik ve lokal+sistemik uygulama olarak 4 gruba ayrıldı.

Ayrıca yara iyileşmesinde iyileşme süreçleri de göz önüne alınarak 4 grubun her biri de kendi içinde tedavi sürelerine göre 2 alt gruba ayrıldı (1. ve 3. gün (2 kere uygulama) tedavi yapılanlar ve 1., 3., 5. gün tedavi yapılanlar (3 kere uygulama)). Tüm denekler son uygulamadan 2 gün sonra feda edildi.

3 günlük ozon tedavisi



5 günlük ozon tedavisi



Kontrol –DM(-)				Diyabet -DM(+)			
Tedavi yapılmayan	Lokal uygulama	Sistemik uygulama (ip)	Lokal + sistemik	Tedavi yapılmayan	Lokal uygulama	Sistemik uygulama (ip)	Lokal + sistemik
3 gün	3 gün 2 tedavi	3 gün 2 tedavi	3 gün 2 tedavi	3 gün	3 gün 2 tedavi	3 gün 2 tedavi	3 gün 2 tedavi
5 gün	5 gün 3 tedavi	5 gün 3 tedavi	5 gün 3 tedavi	5 gün	5 gün 3 tedavi	5 gün 3 tedavi	5 gün 3 tedavi

NOT:

Projede 162 adet sıçan ile çalışılacağı ve yara iyileşme süresi olarak 1,3 ve 5. günler şeklinde 3 alt grup oluşturulması planlanmıştı. Yani kesi yarası yapıldıktan sonra aynı gün ozon verilir (1 tedavi, 2 gün sonra feda edilecekler, kesiyi takiben aynı gün ve 3. gün ozon tedavisi yapılır (2 tedavi) 5. gün feda edilecekler ve kesiyi takiben 1.3. ve 5. gün (3 tedavi) ozon tedavisi yapılır 7. gün feda edilecekler olarak. Ancak, çalışmaya başladığımızda hayvanları diyabet yapmakta sıkıntılar yaşandı. Hayvan kayıpları beklenenden fazla idi. Bu durumda önce 5 günlük yara iyileşme süreci olan , yani en uzun tedavi süreci olan grup ile çalışmaya başladık. Daha sonra da 3 günlük iyileşme süreci olan grubu (2 defa ozon tedavisi alacak olan grup) çalışmaya dahil ettik. Bu grupları tamamladıktan sonra doku çalışmalarını yaptık ve sonuçlarımız, 1 kerelik ozon tedavisi yapmanın sonuçlar üzerinde fazla bir

değişiklik yapmayacağını gösterdi. Bu arada yaşanan hayvan kayıplarının fazla olması elimizde diyabet oluşturmak için kullandığımız STZ nin de çok azalmasına neden oldu. En önemlisi, gerek diyabet oluşumunda hayvan kayıplarının beklenenden fazla yaşanması ve gerekse yapılan 2 grubun verilerinin değerlendirilmesi ile ortaya çıkan tablo sonucu gereksiz hayvan kullanımından kaçınmak için yara oluşumunu takiben 1 kerelik ozon tedavisi alacak olan grup çalışmada yapılmadı.

Deneysel diyabet oluşturma:

Hayvanlara 0.1 Molar (pH: 4.5) soğuk sitrat tamponun 1 ml'sinde çözünen, 65mg/kg Streptozotosin (STZ) tek doz, i.p olarak enjekte edildi. STZ uygulamasından 48 saat sonra 8 saat önceden aç bırakılan hayvanların AKŞ'leri tespit edildi ve ve AKŞ'leri 250mg/dl üzeri olanlar diyabet kabul edilerek diyabet grubuna alındı. Diyabet oluşumundan sonra, diyabetin stabilizasyonu için uygun bir süre (yaklaşık 3 hafta) beklendi. Bu arada AKŞ bakılarak kontrol yapıldı.

Kesi yarası oluşturma:

Diyabetin stabilizasyonundan sonra sıçanlarda ketamine + ksilazin (45 mg/kg + 5 mg/kg) anestezisi altında sırt derisinde çift taraflı 5 cm uzunluğunda tıraşlı deriye kesi yapıp birer cm arayla atılan dört dikişle kapatıldı.

Yara oluşumunu takiben

Sistemik Ozon Tedavisi: Günde bir kere intraperitoneal (ip.) 1.1 mg/kg dozda uygulandı.

Lokal Ozon Tedavisi : 1 mcg/gün dozda yara bölgesine subkutan enjeksiyonla verildi.

Kombine Ozon tedavisi (sistemik +lokal): Belirtilen her iki uygulama birlikte (aynı gün içinde önce sistemik sonra lokal uygulama şeklinde) uygulandı.

Çalışmanın bitiminde yara dokusunda değerlendirilen parametreler:

1.Yaranın mikroskopik incelenmesi (Histoloji):

Sakrifiye edilen deneklerde oluşturulan yara bölgesini tam olarak içeren örnekler nötral formaldehit ile fikse edildikten sonra rutin takip işlemlerinden geçirilerek histokimyasal ve immünohistokimyasal olarak değerlendirildi. Elde edilen kesitlerin bir bölümü Hematoksilen Eozin ve Masson Trikrom boyası ile boyanarak yara iyileşme paterni incelendi. Diğer kesitler ise VEGF, MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2 gibi yara iyileşmesinde önemli rolleri olduğu bilinen antikorların ekspresyonları açısından incelendi. İmmün tutulumlar her antikorun hücre ve dokudaki lokalizasyonlarına göre incelendi.

2.Dokuda TBARS Tayini: Kit protokolü takip edildi.

3.Dokuda Glutasyon Tayini: Kit protokolü takip edildi

4.Dokuda NOx tayini: Total NO miktarları vanadium klorür ile Griess yöntemi aracılığıyla çalışıldı. Dokular 5 katı fosfat tamponu (pH=7) ile homojenize edilip, 2000 g de 5 dk. santrifüjlendi. Süpernatana NaOH ilavesinden sonra oda sıcaklığında 5 dk. bekletilip, %5 lik ZnSO4 eklenip, 3000 g de 20 dk. santrifüje edilip Elisa okuyucuda okundu.

5.Dokuda Zn, Cu-SOD Tayini: Spektrofotometrik yöntemle hazır Kit ile, uygun yöntemi takiben çalışıldı. Doku örnekleri gram doku başına 5-10 ml pH 7.2 olan ve 1 mM EDTA,

210 mM mannitol ve 70 mM sukroz içeren soğuk HEPES buffer ile homojenize edilip, 4°C, 1500 x g de 5 dk, santrifüje edildi (Üst faz alındı. Çalışılncaya kadar -80 °C de saklandı.).

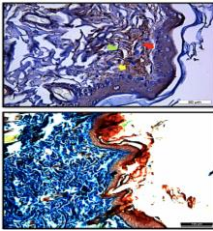
İstatistiksel Analiz

İstatistiksel karşılaştırmalar SPSS-15 programı kullanılarak yapıldı. Değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verildi. Tüm gruplar arasındaki fark non-parametrik Kruskal Wallis testi ile değerlendirildi. İkili gruplar arasındaki fark Mann Whitney U testi ile incelendi ($p < 0,05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi).

3- Projenin Bulguları

Histolojik Bulgular

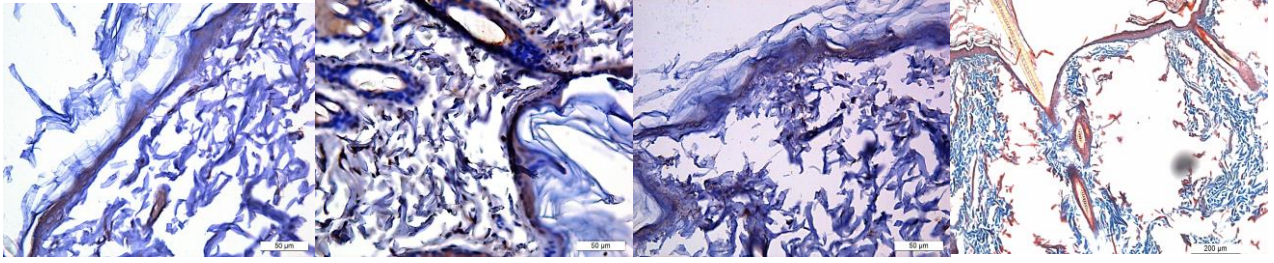
Dokulardan alınan kesitler Masson Trikrom yöntemi ile boyanarak epitelizasyon bulguları değerlendirildi, kit protokolünü takiben MMP-2, MMP-9, VEGF, TIMP-1, TIMP-2 immün tutulumları belirlendi. Epitelizasyonun en ileri olduğu grup DM(-) 5 günlük kombine uygulama (lokal +sistemik ozon uygulaması) yapılan grup olduğu tespit edildi (Resim -1). Bu grupta imünohistokimyasal yöntem ile araştırılan belirteçlere ait (MMP2-9, TIMP1-2, VEGF) immüntutulum diğer tüm gruplara göre daha zayıftı . Elde edilen bu veri ozon uygulamasının kombine uygulanması halinde epitel rejenerasyonunda en olumlu sonucu sağladığını düşündürdü. DM(-)ve DM(+) gruplar içinde lokal uygulama yapılan deneklerde, aynı grupta sistemik uygulama yapılan deneklere kıyasla hem epitel rejenerasyonunda hem de MMP2-9, TIMP1-2, VEGF tutulumlarında daha olumlu sonuçlar tespit edilmesi yara iyileşmesi ve bölgesel inflamasyonun dengelenmesinde lokal uygulamanın bölgesel etki ile sistemik uygulamaya kıyasla daha olumlu sonuçlar elde edileceği izlenimini oluşturdu. Tüm gruplar karşılaştırıldığında epitelizasyonun en zayıf izlendiği gruptan en güçlü izlendiği gruba göre sırasıyla:+3K, +3S, +5K, +3L, +5S, +3 L+S, -3K, +5L, -5K, +5 L+S, -3S, -5S, -3L, -5L, -3 L+S, -5 L+S(+ Diyabet olan, - Diyabet olmayan, 3: 3 gün, 5:5 gün)K:Kontrol, L:Lokal uygulama, S:Sistemik uygulama, L+S: Lokal+Sistemik uygulama)



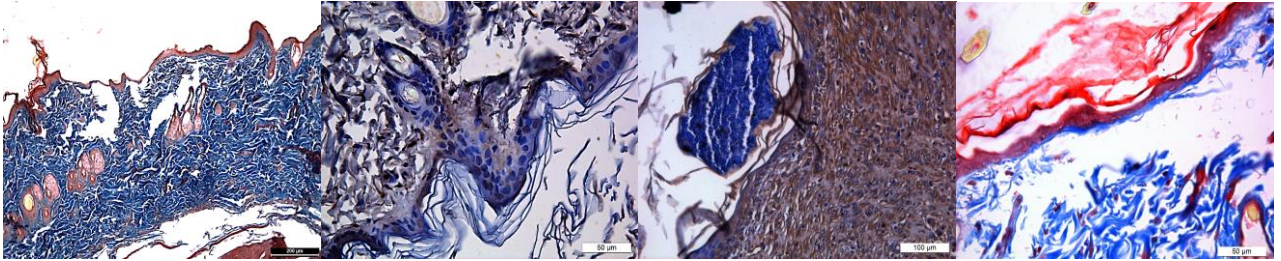
Resim -1)(Üst resim) (MMP-2 immüntutulum), (alt resim) (masson trikrom) Epitel rejenerasyonu tüm gruplaragöre daha ileri seviyede izlendi (kırmızı ok). Bağ dokusunda gözlenen boşluklar ekstraselüler sıvı artışı lehine yorumlandı ve minimal izlendi (yeşil ok). MMP2-9, TIMP1-2, VEGF tutulumu tüm gruplardan daha anlamlı sayıdatespit edildi (sarı ok).

DM(-) gruplar:

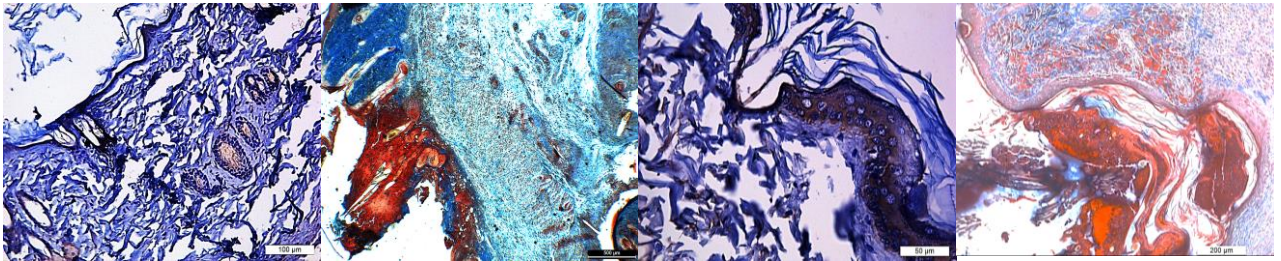
DM (-) 3 (MMP-9, TIMP-2) - 5günlük (TIMP-1, Masson's Trichrome) kontrol (K) grubu



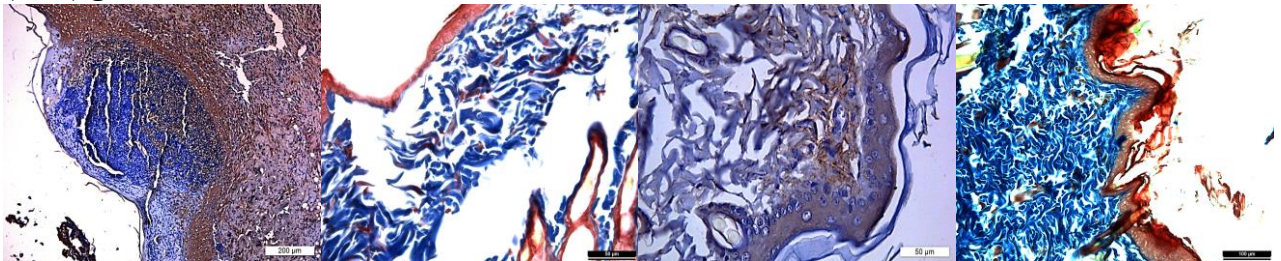
DM (-) 3(TIMP-2, Masson's Trichrome) -5 günlük(MMP-2, Masson's Trichrome) kontrol (L) grubu



DM (-) 3 (MMP-9 Masson's Trichrome) -5 günlük (MMP-9 Masson's Trichrome) sistemik (S) grubu

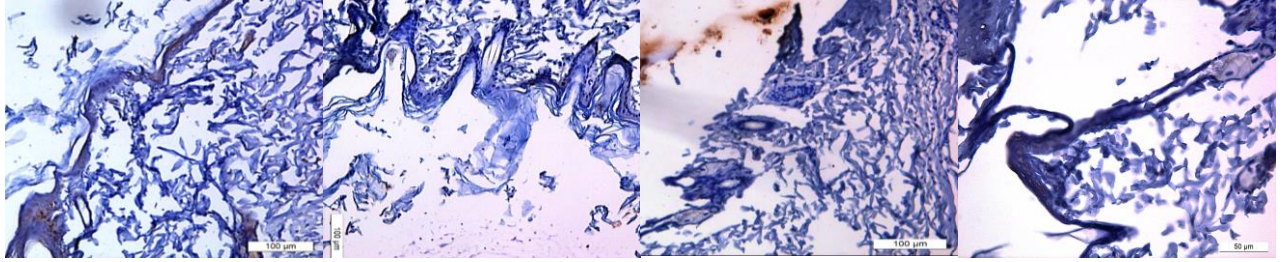


DM (-) 3 (TIMP-2 Masson's Trichrome) – 5 (MMP-2 Masson's Trichrome) günlük kombine (L+S) grubu

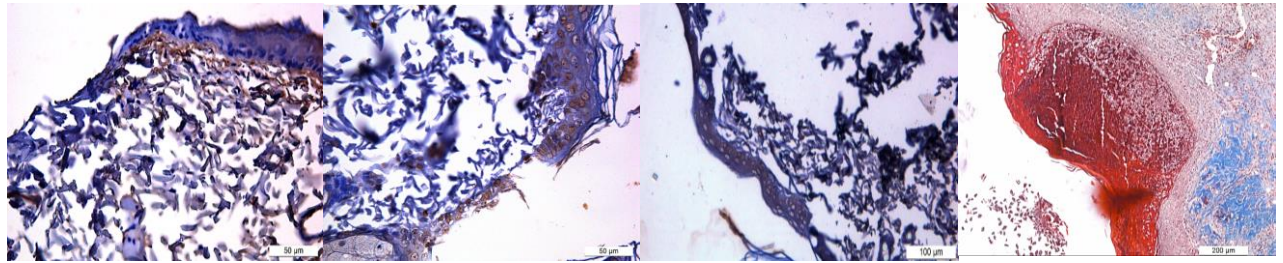


DM(+) gruplar

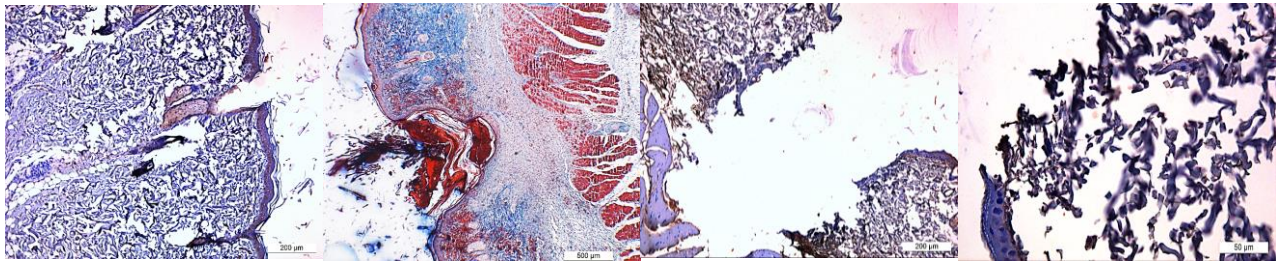
DM (+) 3 (MMP-2, TIMP-1) - 5günlük (TIMP-1, TIMP-2) kontrol (K) grubu



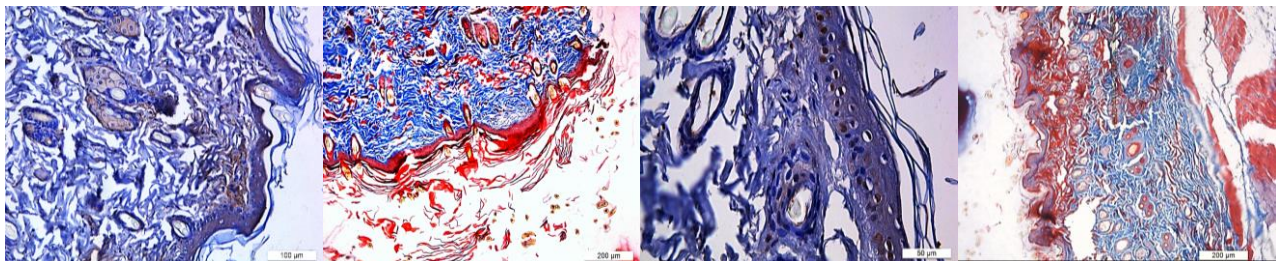
DM (+) 3(MMP-2, VEGF) -5 günlük(MMP-9, Masson's Trichrome) kontrol (L) grubu



DM (+) 3 (MMP-2, Masson's Trichrome) -5 günlük (MMP-9, MMP-2) sistemik (S) grubu



DM (-) 3 (MMP-9, Masson's Trichrome) – 5 (MMP-2 Masson's Trichrome) günlük kombine (L+S) grubu



Biyokimyasal Bulgular

GRUPLAR		MDA (nmol/ml)	GSH (mg/L)	SOD (ng/ml)	NOx (μmol/L)
Kontrol (3 günlük tedavi)	Kontrol	4,15 ± 0,90 ^a	98,05 ± 5,97 ^c	6,04 ± 0,65	13,93 ± 3,78
	Lokal	4,30 ± 1,10	88,25 ± 14,32	5,08 ± 0,65	11,23 ± 3,96
	Sistemik	4,88 ± 1,04	90,27 ± 19,65	6,20 ± 1,05	10,41 ± 3,22
	Lokal+Sistemik	5,19 ± 0,64	84,47 ± 18,59	5,63 ± 1,40	8,16 ± 2,47
Diyabet (3 günlük tedavi)	Kontrol	5,45 ± 0,99 ^a	89,10 ± 5,93 ^c	6,33 ± 0,83	16,71 ± 6,90
	Lokal	5,98 ± 1,40	97,51 ± 10,72	5,82 ± 0,88	10,94 ± 3,92
	Sistemik	5,08 ± 1,56	90,28 ± 12,38	6,49 ± 0,97	11,94 ± 3,96
	Lokal+Sistemik	4,98 ± 1,03	99,27 ± 14,23	6,05 ± 0,42	12,67 ± 3,32
Kontrol (5 günlük tedavi)	Kontrol	3,74 ± 1,01 ^b	105,34 ± 5,07	5,92 ± 1,47	11,13 ± 2,20 ^d
	Lokal	4,10 ± 1,41	100,42 ± 13,74	6,33 ± 0,66	10,56 ± 4,04
	Sistemik	4,39 ± 1,30	90,73 ± 14,76	5,43 ± 1,26	8,49 ± 2,54
	Lokal+Sistemik	4,43 ± 0,84	87,80 ± 11,69	5,92 ± 0,87	7,77 ± 2,49
Diyabet (5 günlük tedavi)	Kontrol	5,33 ± 0,90 ^b	97,28 ± 26,49	6,88 ± 1,59	16,34 ± 3,70 ^{d,e}
	Lokal	4,48 ± 0,74	94,70 ± 20,02	6,26 ± 1,12	13,33 ± 3,70
	Sistemik	4,66 ± 1,40	89,03 ± 18,07	6,04 ± 1,37	14,00 ± 4,61
	Lokal+Sistemik	4,36 ± 1,33	92,44 ± 19,59	6,33 ± 0,62	9,00 ± 1,11 ^e
Değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir (n=6). Kruskal Wallis ve Mann-Whitney U testleri uygulanmıştır. a,b,c,d,e: Aynı harfler istatistiksel olarak anlamlı grupları göstermektedir (p<0,05).					

MDA: Ozon tedavisi almayan 3 ve 5 günlük Diyabetik grupla kontrolleri karşılaştırıldığında yara dokusundaki MDA değerleri anlamlı şekilde yüksek bulundu (p<0,05). Diyabetiklerde yapılan ozon tedavisinin özellikle 5 günlük grupta doku MDA düzeylerini, tedavi yapılmayan Diyabetik kontrol grubuna göre bir miktar düşürmekle birlikte gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamadı.

GSH: Ozon tedavisi almayan 3 günlük diyabetli grupta, kontrolle karşılaştırıldığında yara dokusundaki GSH değerleri anlamlı şekilde düşük bulundu (p<0,05). Diğer gruplar incelendiğinde özellikle 3 günlük tedavi grubunda ozon uygulamasının özellikle diyabete bağlı olarak düşen GSH düzeyinde bir miktar artış yapmakla birlikte anlamlı bir fark bulunamadı.

SOD: Yara dokusundaki SOD değerlerinde gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamadı.

NOx: Ozon tedavisi almayan 5 günlük diyabetli grupta kontrolle karşılaştırıldığında yara dokusundaki NOx değerleri anlamlı şekilde yüksek bulundu (p=0,044). Lokal + sistemik yolla verilen ozon tedavisi diyabette yükselen NOx değerlerini anlamlı şekilde düşürdü (p=0,004).

4- Projenin Sonucu ve Öneriler

Tüm bu veriler ışığında ozon uygulamasının diyabetik ratlarda yara iyileşmesinde olumlu histomorfolojik etkiler oluşturduğu düşünüldü. Yara iyileşmesi ve MMP2-9, TIMP1-2, VEGF tutulumlarında en olumlu etkinin kombine uygulamalarda görülmesi kombine yaklaşımın klinikte ilk seçenek olarak tercih edilmesinin önerilebileceğini akla getirdi. Yine lokal uygulamanın da sistemik uygulamaya kıyasla daha olumlu sonuçlar sağlaması, lokal uygulamanın bölgesel etki ile daha hızlı sonuçlar vermiş olabileceğini düşündürdü.

Biyokimyasal değerlendirmelerde ise (MDA; NOx) yine kombine uygulamanın bir miktar daha etkili olduğu görülmüştür.

Elde edilen veriler ozon uygulamasının diyabetik yara iyileşmesi üzerine olası olumlu etkileri yönünden farklı pencereler açmış bulunmaktadır. Bununla birlikte tüm bu verilerin klinik uygulama öncesi moleküler basamakları da kapsayan ileri deneyler ile desteklenmesi gerekmektedir. Ancak çalışmamızın sonuçları göstermiştir ki 2 veya 3 defa yapılacak bir ozon tedavisi tam anlamıyla yara iyileşmesinde etkili değildir. Lokal ya da sistemik verilen medikal ozon tedavisinin yara iyileşmesindeki rolünün bundan sonra yapılacak çalışmalarda tedavi süreleri uzatılarak, farklı deney modelleriyle ortaya konulması önerilebilir.

5- Geleceğe İlişkin Öngörülen Katkıları

Elde edilen veriler ozon uygulamasının, diyabetik yara iyileşmesi üzerine olası olumlu etkileri yönünden farklı pencereler açmış bulunmaktadır. Yapılacak ileriki çalışmalarla lokal ya da sistemik verilen medikal ozon tedavisinin farklı deney modelleri ve belki daha uzun süreli uygulamalarıyla yara iyileşmesindeki rolünün ortaya konulması önem arz etmektedir.

6- Kaynaklar

- 1) Ganongun Tıbbi Fizyolojisi / Pankreasın Endokrin İşlevler ve Karbonhidrat metabolizmasının Düzenlenmesi Yirmiüçüncü baskı 2011 syf.322
- 2) Szkudeiski T: The mechanism of Alloksan and Streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res* 50:537-46, 2001
- 3) Delaney C, Dunge A, Di Matteo M, Cunningham JM, Green MH, Green IC: Comparison of glucose-stimulated insulin secretion in rat islets of langerhans by streptozotocin and methyl and ethyl nitrosoureas and methanesulphonates. Lack of correlation with nitric-oxide release or O6- alkylating ability. *Biochem Pharmacol* 50: 2015-20, 1995
- 4) Kohl, C., Ravel, D., Girard, J., Pegorier, J.P.: Effects of Benfluorex on Fatty Acid and Glucose Metabolism in Isolated Rat Hepatocytes, *Diabetes*, 51: 2363- 68 (2002)
- 5) Nukatsuka M, Yoshimura Y, Nishida M, Kawadw J. Importance of the concentration of ATP in rat pancreatic beta cells in the mechanism of streptozotocine- induced cytotoxicity. *J Endocrinol* 1990; 127(1): 161-5
- 6) Orhan Y. Diabetes mellitus. Sencer E (Editör). *Endokrinoloji, metabolizma ve beslenme*

hastalıkları. 1. baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi; 2001:246-51.

7) Hehenberger K, Heilborn JD, Brismar K, Hansson A: Inhibited proliferation of fibroblasts derived from chronic diabetic wounds and normal dermal fibroblasts treated with high glucose is associated with increased formation of I-lactate. Wound Repair Regen 6: 135-41, 1998

8) Black CT, Hennessey PJ, Ford EG, Andrassy RJ: Protein glycosylation and collagen metabolism in normal and diabetic rats. J Surg Res 47: 200-202, 1989

9) Lien YH, Stern R, Fu JC, Siegel RC: Inhibition of collagen fibril formation in vitro and subsequent cross-linking by glucose. Science 225:1489-91, 1984

10) Bitar MS, Labbad ZN: Transforming growth factor-beta and insulin-like growth factor-I in relation to diabetes-induced impairment of wound healing. J Surg Res 61: 113- 19, 1996

11) Cantürk NZ, Vural B, Esen N, Cantürk Z, Oktay G, Kırkali G, Solakoğlu S: Effects of macrophage colony-stimulating factor on incisional wound healing in an experimental diabetic rat model. Endocr Res 25: 105-16, 1999

12) Darby I, Bisucci T, Hewitson TD, MacLellan DG: Apoptosis is increased in a model of diabetes-impaired wound healing in genetically diabetic mice. Int J Biochem Cell Biol 29: 191-200, 1997

13) <http://zehirlenme.blogspot.com/2009/11/yara-nedir-yara-iyilesmesi.html>

14) C:\Users\pc\Desktop\ozon sauna ozon ozon tedavi ozon terapi ozon tedavisi terapisi detox antiaging serbest radikal kanser toksin Sağlık tıp diabet medikal antioksidan kür güzellik wellness - Part 7.mht

15) C:\Users\pc\Desktop\OZON TERAPİ MERKEZİ İstanbul Ozon metabolik balans Zayıflama Tedavi AntiAging.htm

16) <http://www.medikalozon.com/ozon-terapi-iyilesmeyen-yaralari-iyilestiriyor.html> 17) Di Paolo N, Gaggiotti E, Galli F. Extracorporeal blood oxygenation and ozonation: clinical and biological implications of ozone therapy. Redox Rep. 2005; 10(3): 121-30.

18) Viebahn-Hänsler, "Ozon-Handbuch, Grundlagen - Prävention – Therapie", 6. Erg. 2002.

19) Babacan A. Ozon, Ozonterapi ve Klinik Kullanımı. Türkiye Klinikleri J Med Sci. 2008

7- Ekler

a. Proje Bütçesi (Harcamalar tablo halinde verilmelidir.)

Proje Süresi: 24 (Ay)				
Başlama Tarihi	Bitiş Tarihi	Ek Süre (Ay)	Ek Süre Dahil Bitiş Tarihi	Toplam Proje Süresi (Ay)
06.10.2017	06.10.2019	12	06.10.2020	36

Proje Bütçesi: 20.042 TL		
Harcanan	Kalan	Ek Bütçe
17.808.00 TL	2.234.00 TL	-

- b. Makine –Teçhizatın Konumu, Anabilimdalı/ Bölüm/ Fakülteye Devir Bilgisi ve devir yapıldığına dair taşınır işlem fişi- Form19)
Proje kapsamında alınan makine-techizat bulunmamaktadır
- c. Bilimsel ve teknik ayrıntılar
- d. Sunumlar (Kongre ana web sayfası, Düzenleme ve Bilim Kurulu üyeleri çıktısı, sunum tam metni, teşekkür yazısı)
- *NATURAL'2019 - '5th International Eurasian Congress on Natural Nutrition, Healthy Life & Sport, Ekim 2019 Ankara / TürkiyeBildirisi Başlığı: Examining The Effect of Systemic and Local Ozone For Wound Healing in Diabetic Rats – Histomorphologic preliminary study results (Katılım ve uluslararası sözlü bildiri sunumu (Kabul mektubu ektedir)*
- e. Yayınlar (Hakemli bilimsel dergiler, tam metni)
Bulunmamaktadır
- f. Tezler (Tez kapağı, imza ve teşekkür sayfası)
Tez bulunmamaktadır



**5th International Eurasian Congress on Natural Nutrition,
Healthy Life & Sport, 02-06 October, 2019 - Ankara, Turkey**

ACCEPTANCE LETTER

Dear Res. Asst. Ph.D. Duygu Dayanır

We are pleased to inform you that your paper titled "*Examining The Effect Of Systemic And Local Ozone For Wound Healing In Diabetic Rats*" (Paper ID: 273) submitted to '5th International Eurasian Congress on Natural Nutrition, Healthy Life and Sport (NATURAL'2019) has been evaluated utilizing three-persons referee process and upon their recommendation your paper has been accepted for **oral** Presentation.

Please note that scan your bank receipt and send it with your paper ID numbers by e-mail to 'natural@natural2019.com' when you complete your registration payment procedures. Thank you for your valuable contribution to NATURAL'2019. We hope to receive more of your research papers in our next conferences.

We look forward to welcoming you at Main Conference Halls of Gazi University, in Ankara, Turkey on October, 2019. Sincerely yours, 2019.08.22.


Prof. Dr. Ilkay Erdogan Orhan
Chair of NATURAL'2019


Prof. Dr. Erdal Zorba
Co-Chair of NATURAL'2019

Gazi University, Faculty of of Pharmacy & Faculty of Sport Sciences
Tel: +90 (312) 2023170, +90 (312) 2023501, Gsm: +90 (533) 6018472
www.natural2019.com, natural@natural2019.com