

T.C.  
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
CERRAHİ (VET.) ANABİLİM DALI

**DENEYSEL OLARAK OSTEOMYELIT OLUŞTURULAN  
RATLARDA MEDİKAL OZONUN KORUYUCU VE TEDAVİ EDİCİ  
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ  
Mehmet TABUR

**Danışman**  
Doç. Dr. Ramazan GÖNENCİ

**HATAY – 2014**

T.C.  
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
CERRAHİ (VET.) ANABİLİM DALI

**DENEYSEL OLARAK OSTEOMYELIT OLUŞTURULAN  
RATLARDA MEDİKAL OZONUN KORUYUCU VE TEDAVİ EDİCİ  
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ  
Mehmet TABUR

**Danışman**  
Doç. Dr. Ramazan GÖNENCİ

Bu tez, Mustafa Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 1204 Y  
0138 nolu proje olarak desteklenmiştir.

**HATAY - 2014**

T.C.  
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
CERRAHİ (VET.) ANABİLİM DALI

**DENEYSEL OLARAK OSTEOMYELIT OLUŞTURULAN  
RATLARDA MEDİKAL OZONUN KORUYUCU VE TEDAVİ EDİCİ  
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Yüksek Lisans Tezi  
Mehmet TABUR

Bu tez aşağıda isimleri yazılı tez jürisi tarafından 05 /09 / 2014 günü sözlü olarak yapılan tez savunma sınavında oybirliği ile kabul edilmiştir.

**Tez Jürisi :** Jüri başkanı : Doç. Dr. Ramazan GÖNENCİ  
Üye : Prof. Dr. M. Enes ALTUĞ  
Üye : Doç. Dr. Yaşar ERGÜN

Bu tez, Enstitümüz Cerrahi (Vet.) Anabilim Dalında hazırlanmıştır.

... / ... / 2014

Doç. Dr. Yaşar ERGÜN  
Enstitü Müdürü

## ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Medikal ozon bağışıklık sistemini güçlendirdiğinden bireyi hastalıklara karşı güçlü kılar ve hücrelerin oksijenlenmesini artırdığından dolayı da yaşlanmayı geciktirir. Hatta hiçbir sağlık sorunu olmayan kişilere de ozon kürleri önerilmiştir. Bu yüzden ozon “yaşamın kişiye geri verilmesi” olarak görülmüştür. Yine insan vücudunda üretilen toksinlerin uzaklaştırılmasından dolayı, Alman bilim çevrelerinde, “kanın yıkanması” olarak kabul gören ozon tedavisi, gerçek anlamda detoks etkisi yaratmaktadır. Çeşitli nedenlerle vücuda girmiş bulunan kimyasal ve biyolojik atıkların uzaklaştırılması veya zararsız hale gelmesi ozon sağaltımı ile sağlanabilir. Dış kaynaklı toksinlerin yanında canlı vücudunda metabolizma artığı olarak oluşan endojen toksinlerin tıbbi ozon marifetiyle vücuttan arındırılması; bedenin korunmasını, sağlığın geri kazanılmasını ve hücrelerin genç kalmasını sağlar.

Medikal ozonun yukarıda belirtilen bazı pozitif özelliklerinin yanı sıra; uygulama yöntemlerinin oldukça basit olması, hastalarca iyi tolere edilmesi, hiçbir yan etkisinin olmaması ve canlı organizmasında hiçbir kalıntı bırakmaması bu çalışmanın planlanmasının başlıca gerekçelerini oluşturmuştur.

Bu çalışmanın planlanması ve yürütülmesinde değerli zamanlarını ayırarak, tez yönetiminde büyük katkı sağlayan kıymetli danışman hocam Sayın Doç. Dr. Ramazan GÖNENCİ'ye, araştırma boyunca gerekli kolaylığı sağlayan kıymetli hocalarım Prof. Dr. Muhammed Enes ALTUĞ ve Yrd. Doç. Dr. Cafer Tayer İŞLER'e, araştırmaya katkı vererek zamanlarını harcayan değerli hocalarım Doç. Dr. Şule Yurdağül ÖZSOY ve Yrd. Doç. Dr. Zafer CANTEKİN'e, MKÜ Veteriner Fakültesi Cerrahi Anabilim Dalı Araştırma Görevlisi arkadaşlarım Ziya YURTAL ile Mehmet Zeki Yılmaz DEVECİ'ye ve Mikrobiyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans yapan değerli arkadaşlarıma teşekkürü borç bilirim.

# İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	II
ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR	III
İÇİNDEKİLER	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ	V
ÇİZELGELER DİZİNİ	VI
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	VII
ÖZET	IX
ABSTRACT	X
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Ozon Nedir?	2
2.2. Ozonun Tarihçesi	4
2.3. Ozonun Etki Mekanizmaları	5
2.4. Medikal Ozonun Uygulama Metodları	15
2.5. Ozonterapi Endikasyonları	22
2.6. Ozonterapi Kontrendikasyonları	23
2.7. Cerrahi Hastalıklarda Ozonterapi	24
2.8. Ozon Jeneratörü	29
2.9. Osteomyelitis	30
3. GEREÇ ve YÖNTEM	32
3.1. Kullanılan Hayvanlar ve Gruplar	32
3.2. Enfeksiyonun Oluşturulması	32
3.3. Medikal Ozonun Uygulanması	33
3.4. Klinik Bulgular	33
3.5. Radyografik Bulgular	33
3.6. Mikrobiyolojik Analizler	34
3.7. Histopatoloji	36
3.8. İstatistik Analizleri	36
4. BULGULAR	37
4.1. Klinik Bulgular	37
4.2. Radyografik Bulgular	38
4.3. Mikrobiyolojik Bulgular	41
4.4. Histopatolojik Bulgular	41
5. TARTIŞMA	46
6. SONUÇ	53
7. KAYNAKLAR	54
ÖZGEÇMİŞ	57

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<b><u>Sayfa</u></b>
<b>Şekil 2.1.</b> Ozonun Oluşum Mekanizması (a) ve CFC molekülünün görünümü (b) .....	3
<b>Şekil 2.2.</b> Sıcaklığa göre atmosferi oluşturan tabakalar (a) ve ozon molekülünün görünümü (b) .....	3
<b>Şekil 3.1.</b> Deney Hayvanları Ünitesinde yer alan ve çalışmada kullanılan kafes ve ratların görünümü (a). Oksijen tüpünü ozon jeneratörüne bağlayan regülatör (b) .....	32
<b>Şekil 3.2.</b> Kemik medullasının açılması (a) ve intramedullar mikrop enjeksiyonunun görünümü (b) .....	32
<b>Şekil 3.3.</b> Çalışmada kullanılan medikal Ozon Jeneratörü ve Medikal Ozonun rektal olarak uygulanışı .....	33
<b>Şekil 3.4.</b> Swap örneği almak için kemiğin distal kısımdan makasla kesilmesi (a) ve kemik medullasından mikrobiyolojik inceleme için örneğin alınması (b) .....	34
<b>Şekil 4.1.</b> Osteomyelit oluşturulan ratlarda topallığın görünümü .....	38
<b>Şekil 4.2.</b> Kontrol (a), Tedavi (b) ve Koruyucu Grupta (c) osteomyelitin diafiz boyunca yaygınlığını gösteren radyogram örnekleri .....	40
<b>Şekil 4.3.</b> Kontrol (a), Tedavi (b) ve Koruyucu Grupta (c) osteomyelitin distal bölgedeki yaygınlığını gösteren radyogramlar ...	40
<b>Şekil 4.4.</b> Kontrol Grubu olgularından tipik birinin pozitif (a), simetrik (b) ve negatif (c) görünümü .....	40
<b>Şekil 4.5.</b> Deneysel amaçlı hayvanlara verilen bakteri süspansiyon sıvılarından yapılan PCR analizlerinden elde edilen <i>Staphylococcus aureus</i> spesifik PCR bantları (a), Hayvanlardan alınan swap örneklerinden yapılan <i>Staphylococcus aureus</i> spesifik PCR analiz sonuçları (b) .....	41
<b>Şekil 4.6.</b> Referans Grubunda histolojik olarak normal kemik dokusunun görünümü, H&EX200 .....	43
<b>Şekil 4.7.</b> Kontrol Grubuna ait kemiklerin histopatolojik incelemesinde geniş kanama ve nekroz alanlarının, çok sayıda nötrofil lökosit kümelenmesinin ve buna bağlı oluşan intramedüller apse oluşumunun görünümü (Sırasıyla H&EX300 ve H&EX200) ...	44
<b>Şekil 4.8.</b> Yine Kontrol Grubunda yangısal hücrelerden makrofajlar, az sayıda lenfositler ve yer yer bağ doku hücre üremelerinin görünümü (Sırasıyla H&EX60 ve H&EX200) .....	44
<b>Şekil 4.9.</b> Tedavi grubunun histopatolojik görünümleri .....	44
<b>Şekil 4.10.</b> Koruyucu grubun histopatolojik görünümleri .....	45

## ÇİZELGELER DİZİNİ

	<b><u>Sayfa</u></b>
<b>Çizelge 2.1.</b> Medikal ozonun plazmadaki biyolojik etkileri .....	13
<b>Çizelge 2.2.</b> Değişik hastalık gruplarında önerilen medikal ozon dozları .....	29
<b>Çizelge 3.1.</b> Primerlerin baz dizileri, bağlandıkları spesifik gen bölgeleri ve PCR ürünlerinin uzunlukları .....	35
<b>Çizelge 4.1.</b> Grupların ortalama canlı ağırlıklarının haftalık seyri .....	37
<b>Çizelge 4.2.</b> Osteomyelit etkenlerinin enjeksiyonundan 1 ve 2 hafta sonraki lokal klinik görünüm .....	38
<b>Çizelge 4.3.</b> Bütün olgularda radyogram bulgularının gruplara göre derecelendirilmesi .....	39
<b>Çizelge 4.4.</b> Bütün olguların gruplara ve histopatolojik bulgulara göre değerlendirilmesi .....	42
<b>Çizelge 4.5.</b> Gruplar arası yangının histopatolojik olarak derecelendirilmesi ve histopatolojik bulguların değerlendirilmesi ....	42
<b>Çizelge 4.6.</b> Radyografik ve histopatolojik bulguların nonparametrik istatistik analizleri .....	45

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

ACE	Anjiotensin Covering Enzim
ark.	Arkadaşları
ATP	Adenozin trifosfat
$\beta$	Beta
bp	Base pair
$^{\circ}\text{C}$	Santigrad derece
CAT	Katalaz
$\text{CCl}_4$	Karbon tetraklorür
CFC	Kloroflorakarbon
cm	Santimetre
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DPG	Difosfogliserat
Dr	Doktor
EOG	Electronic Ozone Generator
g	Gram
G	Gauge
GPx	Glutasyon peroksidaz
GR	Glutasyon redüktaz
GST	Glutasyon transferaz
GSH	Glutasyon
H	Hidrojen
$\text{Hb}_4\text{O}_8$	Hemoglobin
$\text{H}_2\text{O}_2$	Hidrojen peroksit
HClO	Hipoklorik asit
hf	Hafta
HO-1	Hemoksijenaz-1
4-HNE	4-hidroksi-2,3-trans nonenal
4-HHE	4 hidroksi 2E-heksenal
IL	İnterlokin
INF	İnterferon
IU	International unit
im	Intramuscular
km	Kilometre
l/dk	Litre / dakika
LOP	Lipid oksidasyon ürünleri
LPO	Lipid peroksidasyon
$\mu\text{l}$	Mikrolitre
$\mu\text{g}/\text{kg}$	Mikrogram / kilogram
$\mu\text{g}/\text{m}^3$	Mikrogram/metreküp
mcg/ml	Mikrogram / mililitre
$\mu\text{g}/\text{ml}$	Mikrogram / mililitre
mg/l	Miligram / litre
m	Metre
mM	Milimol
mmHg	Milimetre cıva
NaCl	Sodyum klorür



nm	Nanometre
NFkB	Nükleer faktör kB
NO	Nitrojen oksit
OH	Hidroksil
OHT	Otohemoterapi
O <sub>3</sub> -OHT	Ozonlanmış otohemoterapi
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
ppm	Milyonda bir kısım
PUFA	Doymamış yağ asitleri
RNT	Reaktif nitrojen türevleri
ROT	Reaktif oksijen türevleri
RNA	Ribonükleik Asit
sn	Saniye
SOD	Süperoksit dismutaz
TGF	Transforme edici büyüme faktörü
TNF	Tümör nekrozis faktör
UV	Ultraviyole
W	Watt

## ÖZET

### **Deneyisel Olarak Osteomyelit Oluşturulan Ratlarda Medikal Ozonun Koruyucu ve Tedavi Edici Etkilerinin Araştırılması**

Bu çalışma ile medikal ozonun ratlarda akut osteomyelit oluşumunu engelleyip engellemediğini araştırmak, ayrıca enfekte olmuş kemiğin sağaltımında ozonun etkinliğini gözlemlemek amaçlanmıştır. Bu amaçla; 24 adet, yaklaşık 5 aylık, 300 –500 g ağırlığında, erkek Wistar rat kullanılmıştır. Hayvanlar eşit olarak 3 gruba ayrılarak; Kontrol Grubu, Koruyucu Grup ve Tedavi Grubu oluşturulmuştur. Grupların hepsinin sağ femur kemiğine intramedullar olarak *Staphylococcus aureus* (300 000 adet) enjekte edilerek osteomyelitis olması sağlanmıştır. Bütün grupların klinik bulguları; çalışma öncesi ve sırasında haftalık olarak takip edilmiştir. Kontrol Grubuna başka herhangi bir uygulama yapılmazken; Koruyucu Gruba enfeksiyon etkeninin enjeksiyonundan bir hafta önce başlamak üzere günlük ve 15 uygulamayı içeren bir ozon kürü düşük konsantrasyonlu (low), 1/16 oranında, 40 µg/ml olarak, 500 µg/kg dozda ve rektal üfleme (insüflasyon) şeklinde ozon jeneratörü kullanılarak verilmiştir. Tedavi Grubuna ise bakteri enjeksiyonundan 4 gün sonra başlamak üzere Koruyucu Grupta belirtilen ozonterapi seansının aynısı uygulanmıştır. Bilimsel deneyin bitiminden iki gün sonra bütün olgular derin anesteziye alınarak sakrifiye edildi ve ilgili kemiklerin radyografik, mikrobiyolojik ve histopatolojik incelemeleri yapıldı.

Bütün gruplar arasında genel ve lokal klinik bulgular açısından, gözle görülür bir fark gözlenmedi. Kontrol Grubu ile diğer gruplar arasındaki radyografik farklar istatistiksel olarak önemli ( $P < 0.05$ ) ve Tedavi Grubu ile Koruyucu Grup arasındaki fark ise önemsiz bulundu. Klasik mikrobiyolojik kültür yönteminde herhangi bir üreme olmadı. Ancak PCR analizlerinde Tedavi Grubunda pozitiflik saptanmazken, Kontrol Grubunun biri hariç hepsinde ve Koruyucu Grubun tamamında pozitiflik saptandı. Ancak Kontrol Grubunun yarısında PCR bantları orta ve ileri şiddette iken, Koruyucu Grubun hepsinde bantlar çok zayıf idi. Histopatolojik olarak; Koruyucu Grupta hafif, Tedavi Grubunda orta ve Kontrol Grubunda ise şiddetli derecede yangı bulguları gözlemlendi. İstatistiksel olarak bütün gruplar birbirleriyle karşılaştırıldığında; Tedavi Grubunda Kontrol Grubuna göre, Koruyucu Grupta ise Tedavi Grubuna göre histopatolojik iyileşme düzeyi daha anlamlı idi ( $P < 0.05$ ).

Sonuç olarak; ratlarda deneyisel olarak oluşturulan osteomyelit olgularında medikal ozonun koruyucu ve tedavi edici etkilerinin bulunduğu kanısına varıldı.

**Anahtar Kelimeler:** Rat, Medikal Ozon, Osteomyelit

## ABSTRACT

### Investigation of Preventive and Curative Effects of Medical Ozone in Rats Exposed to Experimental Osteomyelitis

Investigation of preventive and therapeutic effects of medical ozone in rats with acute osteomyelitis was aimed in this study. For these purposes, 24 male Wistar rats aged approximately 5 months and weighed 300-500 g were used. All the animals were randomized into 3 equal groups named Control, Preventive and Treatment Groups. *Staphylococcus aureus* was injected intramedullary into right femur of each animal in 3 groups to form acute osteomyelitis. Clinical findings of all groups were noted weekly before and during the study. The Preventive Group was taken an ozone session by rectal insufflation daily at a concentration of 40 µg/ml, at low concentration 1/16 and at a dose of 500 µg/kg for 15 days with an ozone generator starting a week before microorganism injection, whereas nothing were applied to Control animals. The Treatment Group was administered the same ozone therapy sessions as the Preventive Group. But this application was started just after 4 days following the microorganism injection. At the end of the scientific experiment, two femurs of each animal in 3 groups were excised and examined radiographically, microbiologically and histopathologically following the deep anaesthesia and the sacrifice of all cases.

Noticeable differences were not observed between all groups for local and general clinical sings. It was found that radiographic differences between the Control Group and other two groups were significant ( $P < 0.05$ ), but those between the Preventive and the Treatment Groups were insignificant statistically. There was not any microbiological reproduction in conventional culture methods. So, all cases of the Preventive and the Treatment Groups were completely determined to be positive and negative respectively, and all cases except one of the Control Group were determined to be positive in PCR analysis. But, PCR bands of all Preventive cases were highly poor (thin bands) and severities of the bands in half of the Controls were moderate to severe (thick bands). Histopathologically; mild, moderate and severe inflammation findings in the Preventive, Treatment and Control Groups were observed respectively. When compared all groups to each other statistically; histopathological healing was significant in the Treatment Group compared to the Control Group, and it was significant in the Preventive Group compared to the Treatment Group ( $P < 0.05$ ).

Conclusively, it was thought that preventive and curative effects of medical ozone in rats exposed to experimental osteomyelitis had been found.

**Key Words:** Rat, Medical Ozone, Osteomyelitis

## 1. GİRİŞ

Oksijen insanoğlunun en temel gereksinimidir ve oksijen olmadan ancak beş dakika yaşayabilir. Birçok hastalık, ihtiyaç olan doku ve organlara yeniden yeterli oksijen sağlanmasıyla önlenebilir veya tamamen iyileştirilebilir. Günümüz dünyasında, sadece nefes almak artık canlı vücuduna yeterli oksijeni sağlayamıyor. Çünkü canlı vücudu sürekli olarak hava, su ve yiyeceklerdeki toksinler tarafından kirletiliyor. Şehirlerdeki oksijen miktarı % 21'in altında ve düşmeye de devam etmektedir. Sigara kullanımı, stres, hareketsiz yaşam, sağlıksız beslenme gibi durumlar da eklenince canlı vücudunda toksinlerin birikimi ve oksijen eksikliği artar. Bu da kronik yorgunluğa, erken yaşlanmaya, hastalıklara ve özellikle de kansere zemin hazırlar. Bu yüzden insanoğlu yeterli oksijenlenmeyi sağlamak için nefes almaktan daha fazla şey yapmak zorundadır.

Ozonterapi doku ve hücrelere ihtiyacı olan oksijeni en etkili şekilde sağlama ve toksinleri yok etme hususunda bilinen en güçlü tedavidir. Dr. Otto Warburg bütün hastalıkların oluşumu ve ilerlemesinde temel faktörün oksijen yetersizliği ve oluşan toksinler olduğunu belirterek, ozonu "süper potansiyele sahip oksijen" olarak ifade etmiştir.

Bilimsel, modern ve etkili bir yöntem olan medikal ozon tedavisi; Batıda 100 yılı aşkın süredir bilinmekte olup, Rusya'da 1990–2000 yılları arasında Rusya Ulusal Nükleer Merkezi fizikçilerince temel çalışmalar ve teknik icatlarla geliştirilmiştir.

Günümüzde, özellikle günümüz tıbbının etkili bir tedavi sunmadığı durumlarda, ozon tedavisi ona gerçek bir alternatif oluşturmaktadır. Medikal ozon güçlü antibakteriyel, antiviral, antifungal, immünomodülatör, detoksifikasyon ve güçlü oksijenizasyon etkisi ile hızlı ve etkili yara iyileştirici özellikleri sayesinde; cerrahi, iç hastalıkları, doğum ve jinekoloji, dermatoloji, diş hekimliği ve enfeksiyöz hastalıklar gibi alanlarda çok geniş bir kullanım imkânı bulmuştur. Basit uygulama yöntemleri, hastalarca iyi tolere edilmesi, hiçbir yan etkisinin olmaması ve düşük maliyeti ozon tedavisini uygun, pratik, güvenli ve etkili kılmaktadır. Ozonterapi tek başına veya diğer tedavi yöntemlerine ek olarak (tamamlayıcı) etkinliklerini artırmak amacıyla kullanılabilir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Ozon Nedir?

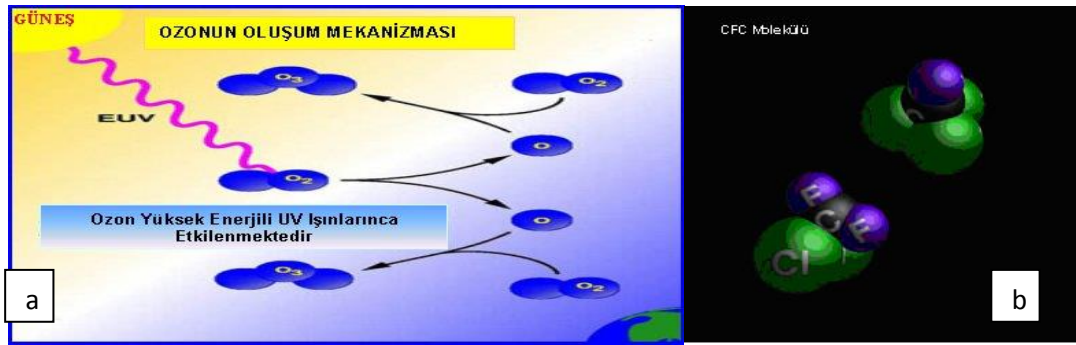
Ozon (O<sub>3</sub>); üç oksijen atomundan oluşan, iki ters yönlü etkiye sahip, dış yörüngesinde çiftleşmiş çok sayıda elektron içeren, kolayca reaksiyona giren, stabil olmayan, renksiz, atmosferde açık mavi renkli ve keskin kokulu bir gazdır. Atmosferi oluşturan azot, oksijen ve karbondioksit gibi temel gazlara göre oldukça düşük oranda bulunan ozon, hem iklimi etkilemekte hem de yer yüzeyindeki canlıların korunmasında önemli rol oynamaktadır. Oksijen atmosferde; oksijen atomu (O), oksijen molekülü (O<sub>2</sub>) ve ozon (O<sub>3</sub>) olarak üç değişik formda bulunur. Ayrıca ozon oksijenden az kararlı ve çok yüksek enerji taşır (*Bocci ve ark. 2011b, Gerard ve Sunnen 1996, Özler ve ark. 2009*).

İsmi Yunanca “koklamak” manasına gelen “ozein (Tanrının nefesi)” kelimesinden gelir. Alman kimyacı Christian Friedrich Schönbein (1799–1868) tarafından 1840 yılında keşfedildi. Zemin seviyelerine yakın yerlerde 10 milyon hava partikülü başına bir partikül O<sub>3</sub> (0.1 ppm = 200 µg/m<sup>3</sup>) konsantrasyonlarında duman şeklinde bulunur. Atmosferdeki ozonun % 90'ına yakını, stratosfer olarak bilinen (20–50 km yüksek) yukarı atmosferin çok soğuk bir tabakasında saçılmış halde bulunur ve yaklaşık 20 km kalınlığındaki bu tabakaya “ozon tabakası” adı verilir. Maksimum ozon yoğunluğu ise 10 ppm ile 19–23. km'ler civarındadır. Geri kalan %10'luk ozon miktarı ise yerden 10–15. km'ye kadar uzanan troposfer tabakası içinde bulunmaktadır. Atmosferin üst katmanlarında yüksek enerjiye sahip güneş ışınlarının alt katmanlarında ise yıldırım çakması sonucu oluşan elektrik arkının normal oksijen moleküllerine (O<sub>2</sub>) çarpmasıyla ortaya çıkan oksijen atomlarının (O) diğer oksijen molekülleriyle (O<sub>2</sub>) birleşmesi sonucunda ozon (O<sub>3</sub>) meydana gelir (O<sub>2</sub> + O + UV=> O<sub>3</sub>). Ozon tabakası özellikle 290-320 nm aralığındaki ultraviyole ışınları absorbe eder. Normal şartlarda havadaki konsantrasyonu 0.02 ppm dir. Yoğunluğun 100 ppm üzerine çıkması toksik dozdur (*Kutlubay ve ark.2010, <http://www.mgm.gov.tr/arastirma/ozon-ve-uv.aspx>*).

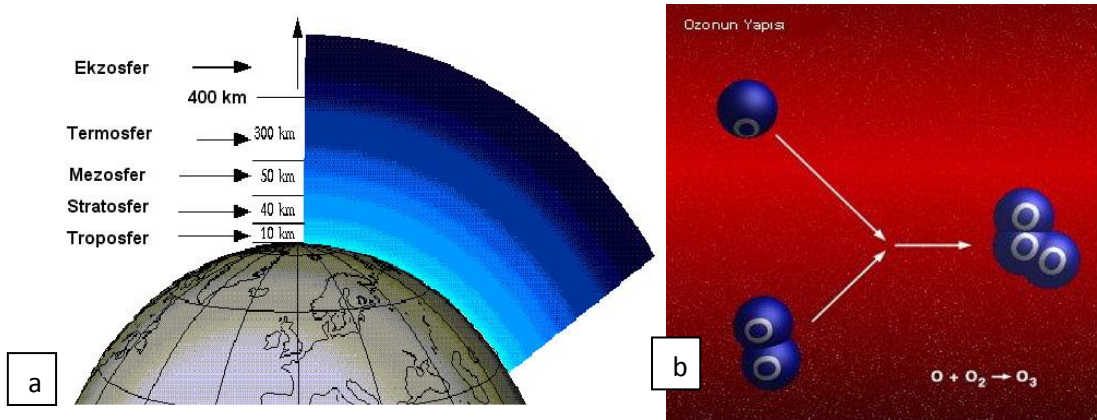
Ozon üretimi 240 nm'den daha kısa dalga boylu ultraviyole (UV) radyasyon tarafından sağlanır. Ozonun parçalanması ise 320 nm'den yüksek uzun dalga boylu ve 400 ile 700 nm aralığındaki kısa dalga boylu ultraviyole radyasyona maruz kaldığında meydana gelir. Ozon üretim ve parçalanma bölgesinin oluşturulmasında, daha uzun dalga boylu fotonlar atmosferin içine daha kolay işlemektedir. Bir ozon molekülü düşük enerjili

ultraviyole radyasyonu emse bile, parçalanarak oksijen molekülüne ve serbest oksijen atomuna dönüşebilmektedir (<http://www.mgm.gov.tr/arastirma/ozon-ve-uv.aspx>).

Ozonu yok eden kimyasal maddeler; hidrojen, azot, klor ve brom içeren bileşiklerdir. Bunların en bilinenleri ise kloroflora karbonlar (CFC), karbon tetra klorür (CCl<sub>4</sub>), metil kloroform, metan ve nitrojen oksit (NO). Atmosferin üst tabakalarında koruyucu etkiye sahipken, alt tabakalarda kirletici özelliğe sahip olur. Ozon endüstri atığı olarak karbondioksit (CO<sub>2</sub>) ve NO ile reaksiyona girmesi ile çok korozif özelliğe sahip hale gelir (Altman 1996, <http://www.mgm.gov.tr/arastirma/ozon-ve-uv.aspx>).



Şekil 2.1. Ozonun Oluşum Mekanizması (a) ve CFC molekülünün görünümü (b) (<http://www.mgm.gov.tr/arastirma/ozon-ve-uv.aspx>)



Şekil 2.2. Sıcaklığa göre atmosferi oluşturan tabakalar (a) ve ozon molekülünün görünümü (b) (<http://www.mgm.gov.tr/arastirma/ozon-ve-uv.aspx>)

Stratosferik ozon aynı zamanda "iyi ozon" olarak da adlandırılır. Bu tabaka, doğal bir filtre vazifesi görerek yeryüzündeki tüm yaşam türlerini güneşin zararlı UV ışınlarına karşı korur. Diğer %10'luk ozon; araç egzozları ve endüstriyel atıklar ile karışır ve oluşan uçucu organik karışımlar ve nitrojen oksit (NO) güneş ışınlarıyla reaksiyona girerek "duman" denilen tehlikeli bir "kentsel-endüstriyel pus" halini alırlar. Kısaca yeryüzündeki ozon, fotokimyasal dumanın anahtar bileşenidir. Bu kötü ozon insanlarda ve hayvanlarda ciddi göz, burun ve solunum problemlerine neden olabilir ve tarım ürünleriyle ormanlara zarar verebilir. Stratosferdeki O<sub>3</sub> ve O<sub>2</sub>, UV-B'nin çoğunu ve UV-C'nin tamamını yutarak dünya

yüzeyindeki yaşamı korur. Eğer aksi sözkonusu olsaydı tüm bu zararlı ışınlar dünya yüzeyine erişebileceklerdi. Reaksiyonlar esnasında ozon stratosferdeki doğal bir dengenin sonucu olarak hem üretilir hem de yok edilir (<http://www.mgm.gov.tr/arastirma/ozon-ve-uv.aspx> Bocci 2006a, Bocci 2006b,).

Ozon oksijenden 1.6 kat daha yoğun ve suda 10 kat daha çözünebilir bir moleküldür. Radikal olmamasına rağmen florine ve persülfattan sonra en güçlü üçüncü oksidan maddedir. Stabil olmadığı için depolanamaz ve yarılanma ömrü 20 °C’de 40 dakika olduğu için bir defada kullanılmalıdır. Ozon UV radyasyonun yanısıra yüksek voltajlı elektrik boşalması hareketiyle de oluşabilir. Büyük miktarlardaki ozon kuvvetli ve hoş olmayan kokusuyla gözleri ve akciğerleri rahatsız eder. Parçalanmış ozon atomları nedeniyle ozon tabakası içerisindeki ozonun yoğunluğu azalmakta ve güneş radyasyonunun zararlı etkilerinin yeryüzüne kadar ulaşmasına neden olmaktadır (Bocci 2006a).

Çok güçlü okside etme ve çok etkili dezenfektan özelliği sayesinde; ozon içme suyu sağlayan arıtma ve şişeleme tesislerinde, gıda endüstrisinde, soğuk hava depolarında, yüzme havuzlarında, pestisit mücadelesinde; sütçülük işletmelerinde, ilaç fabrikalarında, kimyasal madde üretim tesislerinde, ağartıcı olarak ve zararlı maddelerin parçalanmasında kullanılır. Ozon aynı zamanda pek çok gelişmiş ülkelerde hava kirliliğini gösteren bir kriterdir (Altman 1996, Kutlubay ve ark. 2010).

## 2.2. Ozonun Tarihçesi

Ozon, çok eskilerden beri bilinmektedir. Ozonlama ise, yaklaşık yüz yıldır bilinen bir teknoloji olmasına rağmen kıymeti daha yeni anlaşılmaktadır. Ozonun ya da oksijenli suyun yararları ilk kez İsviçre’de 1840 yılında Alman kimyacı Christian Fredrick Schönbein tarafından keşfedildi. Keşfinden sonraki ilk yıllarda dezenfeksiyon amacıyla kullanılmıştır. İlk olarak Los Angeles ozonu şehir suyu arıtmasında kullanırken, 1860 yılında Monaco şehrinin su arıtma tesisinde dezenfeksiyon amacıyla kullanılmaya başlanmıştır. Ozon kullanımı teknolojinin gelişmesiyle 1980’lerde daha da yayıldı ve kullanım alanları çoğaldı. Ozon artık havuzlarda, soğutma sistemlerinde, kaplıcalarda ve çeşitli endüstrilerde kullanıldı. Ozonla yapılan çeşitli çalışmalar ve deneyler sonucunda, ozonun güçlü bir oksitleyici olması sayesinde suda ve havada koku giderici, mikrop kırıcı, ortamı kirleten pek çok organik molekülün yok edicisi olarak kullanılabilmesi anlaşılmış ve kabul görmüştür. Nicola Tesla (1896) ilk ozon jeneratörünün patentini aldı ve ozon tıp alanında kullanılmaya başladı (Altman 1996, Özler ve ark. 2009, Travalgi ve ark. 2010).

Ozonun kabul edilen ilk tıbbi kullanımı (medikal ozon) Albert Wolff tarafından 1915 yılında deri hastalıklarının tedavisinde olmuştur. Aynı dönemde Birinci Dünya Savaşı sırasında Alman askerlerinin kangren ve benzeri ciddi yaralanmalarını tedavi eden Dr. Albert Wolff olmuştur. Dr. EA Fisch 1932'lerden sonra ozonlu suyu dezenfektan olarak kullanmaya başladı. Onun hastası Dr. Payr kolit ve fistül sağaltımında ozonu rektal olarak uyguladı. Bilimsel bir toplantıda ozonun tedavi edici bir ajan olarak gündeme alındığı ilk önemli organizasyon ise 1935 yılında Berlin'de toplanan 59. Alman Cerrahi Birliği Toplantısı (59<sup>th</sup> Meeting of the German Surgical Society) olup, burada Dr. Erwin Payr "Cerrahi'de Ozon Uygulamaları" başlığı altında kendi vakalarından oluşan derleme türünde bir sunum yapmıştır. Yine Payr 1945 yılında dolaşım bozukluklarında intravenöz ozon enjeksiyonunu gerçekleştirdi. Dr. W. Zable 1950'lerin sonuna doğru kanser hastalarında ozon kullanmaya başladı. Bu tarihten sonra 1980'li yıllara kadar, çeşitli hekim ve araştırmacılar ozon tedavisini münferit olarak uygulamışlardır. Bu yıllardan itibaren ise tıbbi amaçla ozon kullanımına yönelik gerek bilimsel çalışmalar, gerekse vaka serileri literatürlerde hızla artmaya başlamıştır (*Altman 1996, Özler ve ark. 2009*).

Dr. Otto Warburg 1926 yılında Berlin'de kanserin hücre düzeyinde oksijen azlığından meydana geldiğini bildirip, bu saptaması ile 1931 ve 1944 Nobel ödüllerini aldı. Bu alandaki ödülü arka arkaya 2 kez alan tek kişi olarak tarihe geçti. Türkiye'de ise; 1998'den bu yana Kızılay Altın-tepe Araştırma Hastanesi'nde ve 2000 yılında İstanbul'da Ozon Sağlık Hizmetlerinde ozon kullanılmaya başlanmıştır. Bu tarihten sonra ozon kullanımı Türkiye'de beşeri hekimlikte ve sonrasında veteriner alanında hızla yayılmaya başladı.

### **2.3. Ozonun Etki Mekanizmaları**

#### **2.3.1. Ozonun Oksijenizasyon Üzerine Etkisi**

Canlı vücudundaki 75-100 trilyona yakın hücre arasında saniyede üç milyara yakın biyokimyasal reaksiyon olur. Hücrelerin bu fonksiyonlarını sürdürebilmesi için enerjiye ve enerji için de bir yakıtı ihtiyaç vardır. İşte bu yakıt canlılar için oksijendir. Oksijenin olmadığı yerde hayat da olmaz. Bu nedenle normal sağlıklı hücreler "aerobik yaşam" denen bir metabolizmaya sahiptir ([http://www.ozceozon.com/neden\\_ozon.aspx](http://www.ozceozon.com/neden_ozon.aspx)).

Ex vivo ozonlanmış otohemoterapi (O<sub>3</sub>-OHT) uygulamasında oksijen-ozon karışımı suda ve plazmada çözünür. Ozon oksijene göre 1,6 kat daha yoğun ve suda çözünürlüğü 10 kat daha fazla olan bir moleküldür. Çözünmesi ısıya, basınca ve konsantrasyonuna bağlıdır. Doku ve hücreler üzerinde hiçbir hasar verici etki oluşturmaz. Biyolojik sıvılarda



ise ozon oksijenden farklı olarak hızlıca biyomoleküller ile reaksiyona girer. Kan dolaşımını hızlandırır. Oluşan oksijen pO<sub>2</sub>'yi 40 mmHg'den 400 mmHg'ya kadar çıkarır ve hemoglobin (Hb<sub>4</sub>O<sub>8</sub>) oksijene doyar. Major otohemoterapi (OHT) formunda ozon alan tüm hastaların arter kanındaki parsiyel O<sub>2</sub> basıncında istatistiksel olarak anlamlı artış, karbondioksit basıncında azalma ve oksihemoglobin düzeyinde artış gözlenmiştir (*Bocci ve ark. 2011a ve b, Özler ve ark. 2009, Saini 2011*).

Rektal üfleme öncesi kalın bağırsakların temizliği daha iyi yapıldığında, daha fazla gaz karışımı kana geçer. Tedavi durdurulduktan sonra oksihemoglobinin reduksiyon zamanındaki yükseklik çok yavaş (6 aya kadar) düşer. Bu yüzden, kanın artmış oksijen içeriği, ozon tedavisi bittikten sonra dahi terapötik fayda sağlayabilir (*Null 1996*).

Ozonidlerle birlikte, ozon ve doymamış yağ asitleri arasındaki etkileşimin sonucunda vücutta bol miktarda su bulunduğundan hidroperoksitler ortaya çıkan ürünlerdir. Ozonoliz sırasında üretilen hidrojen peroksitin ozonun tedavi edici etkinliklerinin en azından bir kısmından sorumlu ikincil habercisi gibi davrandığı kabul edilmektedir. İlk etkilerinden biri eritrositlerde hemoglobine afinitesi olan 2,3-difosfogliserat (2,3-DPG) düzeyini artırma yoluyla hemoglobin-oksijen ayrışma eğrisinin sağa kaymasına ve böylece oksijenin dokulara daha kolay bırakılmasına ( $HbO_2 + 2,3-DPG = Hb\ 2,3-DPG + O_2$ ) neden olmasıdır. Yani; kan desteği yetersiz olan dokulara, ilaç uygulamalarıyla elde edilemeyen, daha fazla oksijen bırakılmaktadır (*Bocci 1999, Bocci 2006a, Clavo ve ark. 2004b, Özler ve ark. 2009*).

### **2.3.2. Ozonun Oksidasyon Üzerine Etkisi**

#### **2.3.2.1. Oksidatif Denge ve Oksidatif Stres**

Serbest radikaller organizmalarda sürekli olarak oluşturulan ve antioksidan savunma sistemi tarafından düzenli olarak ortadan kaldırılan moleküllerdir. Bu mekanizmada serbest radikallerin oluşumu ile bunların antioksidan sistem tarafından ortadan kaldırılması arasında bir denge söz konusudur ki buna “oksidatif denge” adı verilir. Oksidatif denge sağlandığı sürece organizma serbest radikallerin olumsuz etkilerinden zarar görmez. Antioksidan savunma mekanizmasının yetersiz kalması veya serbest radikal oluşumunun artması nedeniyle oksidatif dengenin serbest radikaller yönüne kayması durumunda “oksidatif stres” adı verilen bir durum meydana gelir. Fazla miktarda serbest radikal oluşumu sonucu oluşan oksidatif stres ile hücrede DNA, proteinler, lipitler, karbonhidratlar ve enzimler zarar görebilir. Biyolojik sistemlerdeki süperoksit anyonu, hidroksil, peroksil

ve hidrojen peroksit gibi serbest radikaller oksidatif stresin en önemli nedenlerini oluştururlar (Kayış 2010).

Her şeyden önce oksidan bir maddeyle karışan kan ölçülebilir bir oksidatif strese neden olur. Yani oldukça reaktif kimyasal elçilerin oluşumu ile hemostazik değişimler oluşur. Oluşan oksidatif stres biyolojik yanıtı indükler ve adaptif fenomene yol açar. Bu üniversal yanıt bakteriler, bitkiler ve memelilerde oluşur. Küçük ve tekrar eden stresler oldukça faydalı adaptasyon yanıtını indükler ve kritikleşen savunma mekanizmasını tekrar canlandırır. Aynı zamanda başlangıçta hemostaz bozukluğunu takiben konpanzator biyolojik mekanizmanın uyarılması başlatılır (Bocci ve ark. 2011b).

Son zamanlarda oksidatif stresin hücre hasarındaki rolü ve hastalıkların altında yatan patolojik süreçlere etkileri konusuna odaklanılmıştır. Yakın zamanda yapılan çalışmalarda ise oksidatif stresin bilinenin tersi etkilerinin de olabileceği görülmüştür. Bu çalışmalarda oksidasyon/redüksiyon (redox) reaksiyonlarının başta hücre içi haberleşme olmak üzere biyolojik mekanizmalarda rol aldığı gösterilmiştir. Gerek reaktif moleküller gerekse bunların çeşitli biyolojik moleküllerle reaksiyona girmesi sonucu ortaya çıkan oksidasyon ürünleri düşük konsantrasyonlarda (fizyolojik düzeylerde) hücrede önemli roller üstlenmektedir (Bocci ve ark. 2011a, Clavo ve ark. 2004b, Özler ve ark. 2009).

### **2.3.2.2. Oksidan ve Antioksidan Sistem**

Biyolojik sistemlerde serbest radikaller en fazla elektron transferi sonucu oluşmaktadır. Reaktif oksijen türevleri (ROT), reaktif nitrojen türevleri (RNT) ve diğer reaktifler olmak üzere üç gruba ayrılır. Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller oksijenden oluşan radikallerdir. Serbest oksijen radikalleri dış yörüngelerinde çiftleşmemiş tek bir elektron bulunan kimyasal türevlerdir. Bunlar son derece değişken olup, kolayca inorganik ve organik kimyasallarla reaksiyona girerler. Hücre mitokondrilerinde olduğu zaman, özellikle nükleik asitler ve yanısıra çeşitli membran molekülleri ile etkileşerek onları parçalar. Serbest radikaller özellikle otokatalitik reaksiyonları başlatır ve hasar zincirini ilerleterek yayarlar. Bunlar, superoksit radikalleri ( $O_2^-$ ), hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ve  $OH^{\cdot}$ 'i kapsar.  $H_2O_2$  ve oksijen atomuna (singlet oksijen,  $O$ ) prooksidan da denir. Ayrıca bazı hücre içi ksantin oksidaz gibi oksidazlar aktivitelerinin sonucunda direkt olarak (mitokondri dışı) superoksit radikalleri oluşturur. Bakır ve demir gibi değişimli metallerde hücre içi bazı reaksiyonlar sırasında serbest elektron alıp vererek serbest radikal oluşumunu katalize eder. Çeşitli hücre tiplerinde normal olarak sentezlenen önemli bir kimyasal mediyator olan NO, serbest radikal olarak etki edebilir veya son derece reaktif

nitrit türevlerine dönüşebilir. UV ışını ve iyonize radyasyon suyu hidroksil (OH.) ve hidrojen (H) serbest radikallerine hidrolize edebilir. Radikal oluşumu hipoksi, normoksi ve hiperoksi durumlarının hepsinde de oluşur. Az miktarda serbest radikal oluşumu bazı durumlarda (bakterilerin nötrofiller tarafından oksijen radikalleri ile öldürülmesi gibi) organizmaya yararlı olabilir (*Bocci 2006a, Bocci ve ark. 2011a, Kayış 2010*).

Her aerobik canlı moleküler oksijenin kullanımından kaynaklanan reaktif oksijen ve nitrojen türevlerinin direkt etkileri ve bunların yaptığı ikincil metabolik değişimlerden etkilenir. Çok hücreli organizmalar oksidatif fosforilasyonla; metabolizma oksijen derişimini normal seviyede tutmaya çalışır, yaşam için gerekli enerjiyi temin eder ve son ürün olan 4 elektronu indirgeyerek organizmanın suyunu üretir. Oksijen molekülü elektron alarak en son suya indirgenir. Oksijene bir elektron eklenmesi sonucu süperoksit anyonu, iki elektron eklenmesi sonucu hidrojen peroksit, üç elektron eklenmesi sonucu hidroksil radikali ve en son dört elektron eklenmesi ile su oluşur (*Kayış 2010*).

Aerobik oksidatif solunumu engelleyen hipoksi; hücre zedelenmesi ve ölümünün son derece önemli ve yaygın nedenidir. Hipoksik durumda; hücre düzeyinde oksidatif fosforilasyondan anaerobik glikolize geçiş, hücre içine daha fazla glukoz alımı ve hipoksi alarmı veren trans kripsiyon faktörü sentezinin artışı gibi değişimler gözlenir. Aerobik solunumun son basamağında indirgenen elektronlar yine oksijen ile ortamdan uzaklaştırılırlar. İlgili dokuda yeterli oksijen yoksa elektronlar birikir ve serbest radikalleri oluştururlar. Yani hipokside mitokondriler radikal üretme merkezi haline gelirler. Sonuçta, enerji üretimindeki azalma ile anaerobik glikoliz artar. Glikojenden adenzin trifosfat (ATP) üretimi ile hızla glikojen depoları tükenmeye başlar. Artan glikoliz laktik asit ve inorganik fosfatların birikimine neden olur. Böylece hücre içi pH azalır. Hipoksi düzelmez ise, mitokondriyal fonksiyonun daha da kötüleşmesi ve membran permeabilitesinin artması daha fazla morfolojik bozulmaya neden olur. Hipoksi düzelirse tüm bozukluklar reverzibl hale gelir. Eğer düzelmez ise irreverzibl lezyonlar ortaya çıkar (*Bocci 1994, Çavuşoğlu ve ark. 2001*).

Aerobik canlılar serbest radikallerin toksik etkilerinden korunmak için antioksidan sistemler geliştirmişlerdir. Non enzimatik olanlar; ürik asit, askorbik asit, protein (özellikle albumin), protein olmayan tiyoller, vitamin E ve bilirubindir. Enzimatik olanlar ise süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) ile glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon transferaz (GST), glutatyon (GSH) ve glutatyon redüktazdan (GR) oluşan glutatyon sistemidir (*Bocci ve ark. 2011a, Calunga ve ark. 2005, Özler ve ark. 2009*).

### 2.3.2.3. Ozonun Serbest Radikaller Üzerine Etkisi

Özellikle MOH (majör otohemoterapi) uygulanan ozon/oksijen karışımındaki ozon; afinite sırasıyla çoklu doymamış yağ asitleriyle, antioksidanlarla ve sistein gibi sülfhidril (SH) grubu taşıyan tiyol bileşikleriyle reaksiyona girer. Ozonun miktarına bağlı olarak karbonhidratlar, proteinler, enzimler, DNA ve RNA bu reaksiyondan etkilenebilir. Tüm bu bileşikler ozon karşısında elektron donörü gibi davranarak oksitlenirler. Sonuçta süperoksit (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ve hipoklorik asit (HClO) gibi reaktif oksijen türevleri (ROT) oluşur. Bu reaksiyonlardan en önemlisi doymamış yağ asitlerinin oksidasyonudur ( $R-CH=CH-R'+O_3+H_2O \rightarrow R-CH=O+R'-CH=O+H_2O_2$ ). Bu reaksiyonda her hidrojen peroksit ile birlikte iki de lipit oksidasyon ürünü (lipid oxidation products; LOP) oluşmaktadır. Lipit oksidasyon ürünleri için iyi bilenen örnekleri; lipoperoksil radikalleri, hidroperoksitler, malondialdehit, izoprostan, alkenaller ve 4-hidroksi-2,3-trans nonenaldir (HNE). Görülüyor ki, ozonun biyolojik etkilerinin ortaya çıkması için serbest radikallerin varlığı önemlidir. Serbest radikaller, çeşitli patolojik süreçlerin gerek başlatıcısı, gerek ara basamaklarda işe karışabilen, gerekse sonucunda ortaya çıkabilen reaktif maddelerdir. Bunlar, organizmada aerobik solunum sırasında mitokondride ve fagositlerde solunum patlaması gibi çeşitli fizyolojik durumlarda da oluşabilmektedir (*Bocci ve ark. 2011a, Kim ve ark. 2009, Güzel ve ark. 2011, Özler ve ark. 2009, Stübinger ve ark. 2006*).

### 2.3.2.4. Ozonun Antioksidan Sistem Üzerine Etkisi

Ozon sağaltımı antioksidan sistemi uyarırken lipit peroksidasyon (LPO) yoğunluğunu azaltır. Ozon uygulamasıyla LPO potansiyelinde azalma ve antioksidan savunma sisteminde uyarılma oluşur. Ayrıca, elde edilen sonuçlara göre ozon tedavisi lipit peroksidasyonu ile antioksidan savunma sistemi arasında dinamik bir denge kurmaktadır. Antioksidan savunma sisteminin aktivasyonu ve lipit peroksidasyon değerlerinin normalizasyonu, lipoproteinlerin toksisitesini ortadan kaldırdığından, bunların arter duvarlarına penetrasyonunu azalttığından ve makrofajları aktive ettiğinden çok önemli görülmektedir. Kendiliğinden yok oluşun oranı birçok hücre tipinde bulunan Süperoksit Dismutazların etkisi ile anlamlı bir şekilde arttırılır. Glutatyon da serbest radikal yıkımını katalize ederek zedelenmeye karşı hücreleri korur (*Bocci 2006a, Calunga ve ark. 2005*).

Doğal olarak, organizmadaki antioksidan savunma sistemleri ozon oksidasyonuna karşı koyar. Plazmanın sahip olduğu geniş antioksidan kapasite ve eritrositlerdeki antioksidan enzimler nedeniyle, kan ozon toksisitesine karşı en dirençli dokudur. Major

OHT uygulamaları sırasında plazmada çözünen ozonun burada bulunan antioksidanlar (bilirubin, askorbik asit, SH grubu taşıyan glutatyon ve albumin) ile reaksiyona girerek bunların konsantrasyonunu azaltmaktadır. Öte yandan, ortaya çıkan ROT artışı ve antioksidanların azalması geçici bir durumdur. Çünkü uygulamadan 20 dakika sonra antioksidan düzeyleri eski haline döner. Tıbbi ozon plazma içinde hemen hidrofilik antioksidanlarla reaksiyona girerek 5 dk içinde; askorbik asitin % 78'ini okside ederek dehidroaskorbata, ürik asitin % 20'sini okside ederek allantoin ve alfa tokoferolün % 10'unu alfa tokoferil radikaline çevirir (*Bocci ve ark. 2011a ve b, Özler ve ark. 2009*).

### 2.3.3. Ozonun Metabolizma Üzerine Etkisi

Ozon kan plazmasında çözünerek, elektron transferini ve tüm metabolizmayı hızlandıran kimyasal elçilerin ortaya çıkmasına yol açar. Aynı zamanda ozon doymamış yağ asitleri (PUFA) ile reaksiyona girerek peroksidasyona neden olur. N-6 PUFA peroksidasyonu fizyolojik sınırlarda oluşumu canlı için esansiyel oluşunda konsensus olan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile 4-hidroksi-2E-nonenal (4-HNE) ve n-3 PUFA peroksidasyonu ise 4 hidroksi 2E-heksenal (4-HHE) oluşumuna yol açar (*Bocci ve ark. 2011b*).

Ozon, altın ve platin dışında tüm metalleri ve diğer elementlerin çoğunu okside edebilir. Ozon, yüksek oksidatif potansiyeline karşın çok selektif hareket eder. Bu selektivitenin nedeni ozon molekülünün polar yapısı, yani pozitif polarize olmuş oksijen atomudur. Bu da moleküle elektrofilik karakter kazandırır. Bu nedenle, yüksek yoğunlukta elektrona sahip moleküller en reaktif elementlerdir. Ozon doymamış hidrokarbonlar, aminler, sülfhidril grupları ve aromatik bileşikler ile tepkimeye girer. Doymamış yağ asitleri, SH- grubu içeren aromatik amino asitler ve peptidler ozona karşı hassastırlar. Ozonun organizmanın farklı patolojik süreçlerinde, lipid, karbohidrat ve proteinlerin karaciğerdeki ara metabolizmaları üzerinde düzenleyici etkileri vardır. Ozonoterapiden sonra; enerji metabolizması uyarılarak hepatositlerde nükleer aktivite artar, yeni glikojen oluşumu meydana gelir, hepatosit rejenerasyonu uyarılır ve peritonitte karaciğer üzerinde koruyucu etki görülür. Hepatositlerin onarıcı, glikolitik ve antioksidan fonksiyonunun hücre içi mekanizmalarının ozon ile aktivasyonu; karaciğer fonksiyonlarının ve antitoksik etkilerinin geliştirilmesi için temel teşkil eder. Kandaki toksik maddelerin direkt olarak oksidasyonu, organizmadan toksik ve alerjik maddelerin temizlenmesi sırasındaki hepatosit yükünü azaltır. Ozon tedavisi hepatositlerin yağlı enerji maddelerini karbohidratlara çeviren yapısal ve fonksiyonel mekanizmalarını tetiklediğinden yağlı karaciğer dejenerasyonu görülmez. Ozon, lipoik asidi oksitleyerek; plazma lipidlerinde

(kolesterol ve aterojenik lipoprotein fraksiyonları) ve karbohidratlarda azalma meydana getirir (*Bocci ve ark. 2011a, Gerard ve Sunnen 1996*).

Ozon, kandaki lipidlerle direk etkileşime girerek ve ayrıca vücuttaki antioksidan sistemi uyararak aktive eder. Ozon özellikle aterosklerotik damar hastalıklarında; arter ve ven duvarındaki fibrin birikimi ve plakları yıkımlar. Membran kolesterolündeki azalma ise; membran akışkanlığının, kan akışının ve membrana bağlı yapıların normalizasyonunu sağlar. Ozon, glukoz-6-fosfat dehidrogenaz aktivitesindeki artışa ve bu enzimin heksozmonofosfat şantındaki reaksiyonlardaki kullanımının artışına bağlı olarak kan glukoz düzeyinde azalmaya da sebep olur. Kan laktat ve pirüvat düzeylerinde de azalma olur ki, karbohidrat metabolizmasındaki bu okside olmamış ürünlerin 2,3-difosfogliserat oluşum sürecinde kullanımı ile açıklanabilir (*Bocci 2005, Bocci 2006a, Bocci ve ark. 2011a, Null 1996*).

#### **2.3.4. Ozonun Dezenfeksiyon ve Detoksifikasyon Etkisi**

Ozon bilinen her türlü virüs, bakteri, mantar, Rickettsia ve Chlamydia gibi çeşitli hastalık etkenlerinin dezenfeksiyonunu sağlar. Bu yolla antibiyotikler ile tedavi edilmesi çok güç olan veya tedavi edilemeyen hastalıkların tedavisi mümkün olmaktadır. Ozon, oksidasyon gücü çok yüksek olan bir gaz ve bilinen en kuvvetli doğal bir dezenfektandır. Yüksek oksidasyon kuvveti, ozonun bakterilerin tahribatında tam etkin bir rol oynamasına sebep olur. Bir gr ozon, 1 m<sup>3</sup> suda bulunan mikroorganizmaların tamamını ortalama 5 dakika içinde öldürür. Ozonun dezenfeksiyon etkisi; bakteri, virus, mantar, protozoon ile bunların spor ve kistlerine karşı kullanıldığı zaman klordan 1.5 kat daha etkilidir. Ayrıca ozon, havada bulunan oksijenin parçalanması yoluyla elde edildiği için kararsız yapısı nedeniyle dezenfeksiyon görevini tamamladıktan sonra daima hammaddesi olan oksijene dönüşür. Ozon gazının dezenfeksiyon sonrasında artık ve kalıntı bırakmaması, özellikle gıda sanayisinde kullanımını, diğer dezenfektanlara göre avantajlı kılmaktadır (*Güzel ve ark. 2011, Kim ve ark. 2009, Saini 2011, Stübinger ve ark. 2006*).

Çok hücreli organizma hücrelerinin antioksidan savunma sistemleri olduğundan, ozon dokular üzerinde hasar verici ve irrite edici bir etki oluşturmaz. Ozonun fosfolipidlerin ve lipoproteinlerin oksidasyonu nedeniyle bakteriyel hücrelerin membran bütünlüğünü bozar. Ozon mikrobik hücrenin içine nüfuz eder, sitoplazma maddeleri ile reaksiyona girer ve kapalı DNA plazmidlerini bakteriostatik etkinin azalmasına neden olan açık DNA'ya dönüştürür. Gram pozitif bakteriler, membran yapıları değişik olan gram negatif bakterilere göre ozona çok daha duyarlıdır. Terapötik dozlarda lokal, enteral ve

parenteral ozon uygulaması insan vücudunda hiçbir toksik etki oluşturmaz. Ozonun detoks etkisi insan vücudunda üretilen zararlı maddelerin uzaklaştırılması yoluyla, olası zararlardan korunması şeklinde gerçekleşir. Kanın yıkanması olarak da kabul gören ozonun detoksifikasyon etkisi hepatositlerdeki karaciğer filtrasyonu ve mikrozomal sistem atkivasyonu ile gerçekleşir (*Null 1996*).

Ozonun virusidal etkisi membran polipeptid zincirlerinin yıkımıyla ortaya çıkar. Bu da virüslerin hedef hücrelere bağlanmasını engeller ve RNA'nın bir zincirini ikiye bölerek üreme reaksiyonunun temelini yok etmiş olur. Kapsüllü virüsler, kapsüllü olmayanlara göre ozona daha duyarlıdır. HIV-1 ile enfekte lenfositlerin kültüründe ozonun anti-viral etkisinin keşfedilmesi önemli bir buluş olmuştur. Bu etki; virüs membranının kısmi yok edilmesi ve özelliklerini kaybetmesi, virüs proteinlerinin transkripsiyonu ve translasyonunu dolayısıyla da virüs üremesinin inhibe edilmesini sağlayan, reverse transkriptaz enziminin inaktivasyonu ve virüsün hedef hücrelere reseptörleri ile bağlanamaması ile açıklanabilir. Burada önemli rol, sağlam hücreleri virüs penetrasyonuna karşı koruyan, biyolojik aktif peptid olan interferon sentezinin aktivasyonuna aittir. Ayrıca, HIV ile ilişkili birçok enfeksiyonun da antibiyotiklere karşı dirençli olduğu kanıtlanmıştır (*Bocci 1994, Null 1996*).

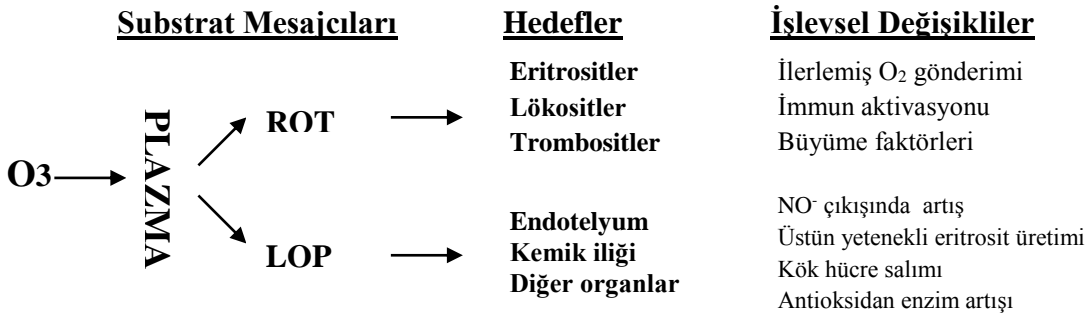
Medikal ozon ayrıca giardiozis ve kriptosporidiozis gibi parazitlere karşı da etkili bulunmuştur (*Bocci 2006a, Gerard ve Sunnen 1996*).

### **2.3.5. Ozonun Dolaşım Sistemi Üzerine Etkisi**

Intravenöz ozon kürü uygulanmasından sonra tüm vakalarda (özellikle heparin antikoagülan olarak kullanıldığında), başlangıçta platelet agregasyonunda artış daha sonra azalma tespit edilmiştir. Trombositler yara iyileşmesinde etkin olan büyüme faktörleri ve fagositozu uyaran lökositleri NFkB (nükleer faktör kB) aracılığıyla bölgeye davet eden interlökinler (IL-8) için zengin bir kaynaktır. Kan koagülasyon sisteminde medikal ozon kullanımı ile belirgin bir değişiklik gözlenmemiştir. Damar içi ozonlu serum fizyolojik infüzyonu, hasta kanında hiperfibrinolizise yol açmadan fibrinolitik aktiviteyi artırmaktadır. Hemostaz sisteminin fibrinolitik bağlantısının aktivasyonu, kısmi veya tam trombolizi uyararak trombüs gelişimini inhibe eder ve vasküler yataktan eliminasyonunu sağlar. Bu nedenle ozon, kan pıhtılaşmasının bir proçesi olan kompleks zincir reaksiyonlarının her safhasında, kan koagülasyonunda orta derecede bir azalmaya eğilim yaratır. Bu şekilde özellikle kan akımının azaldığı bölgelerde intravasküler trombozisi önlemiş olur. Ozonlu serum fizyolojik infüzyonu, kan viskozitesini ve koagülasyonunu

azaltarak kan ve lenf damarlarındaki mikrodolaşımı ve bu damarlardaki kan hücrelerinin özelliklerini (deformasyon, agregasyon, adezyon), kan koagülasyon özelliklerini, transkapiller metabolizma özelliklerini ve mikrodamarların ultrastrüktürel özelliklerini iyileştirir. Bir yandan damarların genişlemesini diğer yandan kan hücrelerinin yapımını hızlandırmak yoluyla yeterli miktarda kanın gitmesi sağlanır. Bu yolla çeşitli damar hastalıklarının tedavisine yardımcı olmaktadır. Birçok araştırmada ozon tedavisinin etkilerinden birinin de periferel kan akımının ve mikrosirkülasyonun artırılmasıdır. Ozon, mekanizması tam kesin olmayan biçimde vazodilatasyon etkisi gösterir. Ozonlu oto-kan veya ozonlanmış serum fizyolojik uygulanması serebral dokuda cGMP seviyesinde artışa ve düz kas protein fosforilasyonunu uyarabilen ve düz kas relaksasyonunu sağlayan cGMP-bağımlı protein kinaz aktivasyonunu sağlar. Bu da serebral vazodilatasyon ile sonuçlanır (*Clavo ve ark. 2004b, Clavo ve ark. 2004c, Valacchi ve Bocci 1999*).

**Çizelge 2.1.** Medikal ozonun plazmadaki biyolojik etkileri (*Bocci 2005*).



### 2.3.6. Ozonun Bağışıklık Sistemi Üzerine Etkisi

Tıbbi ozonun immün yanıtı uyarıcı kapasitesi de vardır. Ozon küçük dozlarda immünostimülasyon ve yüksek dozlarda immünosüpresyon etki yapar. Ozon tedavisi; peroksit formasyonu yoluyla fagositoz aktivasyonunda ve özellikle hidrojen peroksit seviyesinin azaldığı kronik enfeksiyöz hastalıklarda önemlidir. Ozon tedavisi sayesinde fagositozun bozulmuş tüm evreleri düzelir. Fagositoz aktivasyonunun bir muhtemel şekli de fagosit stimüle edici faktörün sentezindeki artıştır. Ozonlu serum fizyolojinin bir sarkomun çevresine subkutanöz enjeksiyonundan sonraki ilk safhada, fagositlerin oksijen metabolizmasını aktive eder ve immün hücrelerin fagositik aktivitesini belirgin olarak artırır. Öncelikle peroksitlerin formasyonu ile uyarılan oksijen patlama evresinin aktivasyonu ile adezyon zamanında azalma şeklindedir. Aktif oksijen formları enfeksiyöz ajanları öldürür ve bu ajanlar daha sonra fagositlerce yok edilir. Bununla birlikte, ozonun fagositleri nasıl stimüle ettiği açık değildir ve bu alandaki gerçek buluş ozonun,



sitokinlerin hafif stimülatörü gibi davranarak periferal insan dolaşımındaki mononükleer hücreleri etkilemesinin keşfedilmesidir. Daha sonra çok sayıda sitokinin (IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ ) ozon tedavisi ile arttığı gösterilmiştir (*Bocci 1994, Null 1996, Ohtsuka ve ark. 2006, Saini 2011*).

Sitokinlerin biyolojik etki spektrumu çok geniş ve sentezlerinin aktif oksijen formları ile stimülasyonu şüphe götürmez olduğundan, ozon tedavisi ile metabolik modülasyonun çok yönlü etkilerini açıklamak kolaydır. Örneğin, en önemli sitokinlerden olan interlökinler (IL) organizmanın savunma gücü üzerinde çok sayıda uyarıcı etkisi vardır. Isı artışı olur ve karaciğerde C-reaktif protein sentezi 100 kat artar. İnflamatuar sürecin bir belirteci olarak bilinen bu protein bakteri hücreleriyle birleşerek fagositoz reaksiyonlarının artırılmasındaki kompleman proteinlerin aktivitesini artırır. Dolaşıma salınan interlökinler hücrel ve hümoral hemostazı düzenler. T-helper hücreleriyle reaksiyona girerek IL-2 oluşumunu uyarır. IL-2 immünglobulin sentezi yapan ve plazma hücrelerine dönüşen B lenfositlerin fonksiyonunu regüle eder. Ayrıca aktif oksijen ve peroksitlerin oluşumunu artırır ve ozonun uyardığı peroksitlerle birlikte transkripsiyonun nükleer faktörü olan NF- $\kappa$ B'yi aktive eder. Kanın ozonla karşılaşmasının, sitoplazmadaki H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> seviyesinde ani bir artış oluşturmaya izin veren NF- $\kappa$ B transkripsiyon faktörü, sitokin sentezinde bir aktivatör olabilir (*Bocci, 1994, Bocci ve ark. 2011a, Valacchi ve Bocci 1999*).

Sonuçta, ozonun etkisi ile periferik kandaki mononükleer hücrelerin aktivasyonu gerçekleşir, spesifik ve non-spesifik immün cevap yoğunlaşır. Canlı vücudundaki immünolojik mekanizmalar oksijen bağımlıdır: Enfeksiyon ve tümör ajanlarına cevap olarak serbest oksijen radikalleri oluşturan makrofaj ve granüositlerin uyarılması gerçekleşir. Kemotaksis ve fagositoz oksidatif metabolizmanın yoğunlaşmasına yol açar. Bu da mononükleer kan hücrelerinde termorezistan proteinlerin biyosentezinde artışa yol açar. Bu proteinler tümör nekroz faktörünün (TNF) olumsuz etkilerini artırır ve bilinmeyen antijenlerin üretimi ve prezentasyonunda, protein yapıların koruyucu etkisini artırarak ve immün sistemi uyatarak önemli bir rol oynar (*Bocci 1994, Bocci 2005, Null 1996*).

Biyolojik aktif maddelerin üretiminin aktivasyonu ile kişi kendini çok iyi, zinde ve sağlıklı hisseder. Diğer yandan her gün insanoğlunun yaşlanan hücrelerinin sağlığa kavuşması yanında, yeni ve genç hücrelere kavuşması sağlanır. Yapısı bozulmuş dokuların yenilenmesi ozon sayesinde mümkün olmaktadır. Sağladığı tüm yararların yanında bedensel ve ruhsal anlamda sorunları azaltarak veya yok ederek yaşam kalitesini yükseltir. Uyku kalitesinin artmasından, zihinsel ve fiziksel performansın artışına kadar, hayatın her

anını ve yönünü olumlu yönde etkileyen ozon sağaltımı, yaşam sevincini geri kazandırmaktadır (*Null 1996*).

Böylelikle, ozonun biyolojik etkileri ozonun güçlü oksidatif potansiyeline bağlı olan serbest radikallerin biyoregulator rolü ile açıklanabilir. Aktif oksijen formları NF- $\kappa$ B'nin aktivasyonunda haberci olarak görev görür. Kanın ozonlanmasını takiben sitoplazmada H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin ani ve kısa süreli artışı transkripsiyon faktörün aktivasyonuna neden olabilir. Çekirdeğe translokasyondan sonra NF- $\kappa$ B; sitokinlerin, akut faz proteinlerinin, eritropoetinlerin ve adeziv hücre moleküllerinin sentezini artıran bazı genlerin ekspresyonunu sağlar. Bu, peroksit üretiminin immünolojik (NF- $\kappa$ B'nin aktivasyonu yoluyla) ve biyokimyasal (heksozmonofosfat şant) mekanizmaların aktivasyonu için önemli bir faktör olduğu anlamına gelir (*Bocci 1994, Bocci 1999, Travalgi ve ark. 2010*).

### **2.3.7. Ozonun Yangı Giderici ve Analjezik Etkisi**

Ağrıya yol açan nedeni ortadan kaldırmanın yanında ağrının hissedilmesine neden olan kimyasal bileşenlerin uzaklaştırılması yoluyla ağrı hissini kısa sürede yok olmasını sağlar. Ana semptomun ağrı olduğu migren, romatizma ve spinal osteokondrozis gibi birçok hastalıkta ozonun analjezik etkisi görülmüştür. Ozonun antiinflamatuvar etkisi hücre reaksiyonlarını regüle eden prostaglandinleri modüle edici etkisinden kaynaklanır. Ayrıca yangı sitokinlerine karşı anti stokin ve büyüme faktörlerini artırır. Doku oksijenizasyonundaki artışa bağlı olarak, ağrı reseptörlerinin aktivasyonunu uyaran ürünlerin metabolizmasını ve atımını artırır. Oksijen salınımının bir sonucu olarak, modifiye hücre membranındaki katyon-anyon dengesi tekrar sağlanır ve ozon elektrofizyolojik olarak gerçek bir ağrı antagonist görevi görür. Ağrıdaki azalma katabolik kartilaj enzimlerin inhibisyonundan da kaynaklanabilir. Intravenöz ozon infüzyonundan sonra HLA-DR moleküllerinin yüksek düzeydeki ekspresyonunda azalma ve CD3, CD4+, CD8+ ve CD45 parametrelerinin normale döndüğü ve ozon kullanımının inflamatuvar süreçler için alternatif bir tedavi olabileceği gösterilmiştir (*Bocci 1994, Null 1996, Han ve ark. 2007, Souza ve ark. 2010*).

## **2.4. Medikal Ozonun Uygulama Metodları**

### **2.4.1. Major Otohemoterapi (Major OHT, O<sub>3</sub>-OHT)**

Ozon ile majör veya masif otohemoterapi, hastanın belli bir miktarda kanının vücut dışında (ekstrakorporal) ozon ile zenginleştirildiği ve tekrar hastanın dolaşımına verildiği

bir yöntemdir. Farklı uygulama teknikleri bulunmaktadır: Hastanın veninden disposable kap içine, peristaltik silindir pompa ile 100–250 ml kan alınır. Burada kan ozon/oksijen gaz karışımı ile zenginleştirilir ve rezidüel gaz karışımı destrüktöre gönderilir. Elde edilen kan hastanın başka bir veninden damla seti ile geri infüze edilir. Kabın içine 10 ml izotonik NaCl solüsyonu içinde çözülmüş 750 IU heparin önceden eklenir (*Bocci 2006a, Bocci 2006b, Gerard ve Sunnen 1996, Hernandez 2007, Lu ve ark. 2010, Nogales ve ark. 2008*).

Major otohemoterapi (OHT), en düşük riskli ozon uygulama biçimidir. Hasta vücudunun dışındaki bir ortamda “ozon+kan” karışımının tekrar vücuda geri verilmesi yani reinfüzyonudur. İlke olarak, steril, tek kullanımlık ve ozona dayanıklı tedavi materyalleri kullanılmalıdır. Ozon oksijen karışımını “Mikroperl Yöntemi” ile yapmak daha avantajlı, yan etkisi daha az ve etkinliği daha fazladır. Major OHT yöntemiyle dakikada 60–90 damla reinfüzyon yapılır. Sığırlarda yangısal olgularda 10 µg/ml konsantrasyonda ve 20 µg/kg dozda Major OHT uygulanmıştır (*Güzel ve ark. 2011, Ohtsuka ve ark. 2006*).

Major OHT esnasında uygulanan ozon - oksijen karışımındaki ozon plazmada hızla çözünür. Ozonun bir kısmı plazmada bulunan antioksidanlar ile reaksiyona girerek bunların miktarlarını azaltır. Bu anlık olaylar sırasında çeşitli reaktif oksijen türevleri (ROT) oluşur. Bu radikallerin yarı ömrü çok kısa olduğu için, daha kan hastaya geri verilemeden, yani ototransfüzyondan önce bunlar ortadan kalkarak yerlerini lipit oksidasyon ürünlerine (LOP) bırakırlar. Bu ürünler, büyük oranda kandaki hâkim hücre olan eritrositlerin membranlarının oksidasyonu ile ortaya çıkar. Eritrosit membranındaki doymamış yağ asitleri oksidasyona çok duyarlıdır. Bu reaksiyonlar sırasında ortaya çıkan hidrojen peroksit, molekül yapısı itibarıyla radikal olmayan oksitleyici bir moleküldür (*Bocci ve ark. 2011a, Özler ve ark. 2009*).

Ozon tedavisinin klasik damar içi uygulaması ilk olarak 1974 yılında Wolff tarafından tarif edilmiştir. Bu yöntemde; kan ozona dayanıklı bir şişede 5–10 dakika oksijen/ozon karışımıyla temas ettikten sonra tekrar aynı kişiye geri verilir. Bu reaksiyonlar sırasında ortaya çıkan hidrojen peroksit, ozonun tedavi edici etkinliklerinin en azından bir kısmından sorumlu ikincil habercisi gibi davranır. İlk etkilerinden biri eritrositlerde 2,3-difosfogliserat düzeyini artırmak ve böylece oksijenin dokulara daha kolay bırakılmasına neden olmaktır. Plazmada konsantrasyonu artan hidrojen peroksit kolayca hücrelerin içine diffuze olarak; lökosit ve endotel hücrelerde çeşitli interferon (IFN), interlökin (IL) ve transforme edici büyüme faktörü (TGF) yapımını da artıran uyarıları tetikler. Lipit oksidasyon ürünlerinin yarı ömürleri ise saatlere varabilmekte, dolayısıyla ömrü çok kısa olan reaktif oksijen türevlerinin ilk etkileri sonrasında ozonun

gecikmiş etkilerinden sorumlu tutulmaktadır. Uzun yarı ömürlerinden dolayı bu ürünler ototransfüzyon ile vücuda verilmiş olur ve dolaşım yoluyla dokulara ulaşarak buralarda çeşitli biyolojik etkiler gösterirler. Major otohemoterapi yapılmadan önce kanın antikoagülan verilerek hazırlanması gerekir. Çünkü ozon doza bağlı olarak trombosit fonksiyonlarının artışına neden olmaktadır. Trombosit fonksiyonlarındaki artışın bazı yararlı sonuçları da olmaktadır. Aktive olmuş trombositler içlerinde bulunan büyüme faktörlerini salarak iskemi ve ülserli hastalarda iyileşmeye olumlu katkı sağlar. Ozon uygulaması ile hemoksijenaz-1 (HO-1) enziminin de uyarıldığı bildirilmiştir. Son yıllarda HO-1 ile yapılmış birçok çalışmada bu enzimin; antioksidan, antiapoptotik ve antiinflamatuvar etkilerinin olduğu gösterilmiştir (*Bocci 1994, Bocci ve ark. 2011a, Özler ve ark. 2009, Valacchi ve Bocci 1999*).

#### **2.4.2. Minör Otohemoterapi (Minör OHT)**

Ozonun diğer bir uygulama şekli olan minör otohemoterapide ise hastadan alınan 5 ml kan ile aynı miktarda 80-100 µl/ml konsantrasyonundaki oksijen/ozon karışımı bir dakika inkübe edilir. Bu süre zarfında ozonun, yine aynı şekilde kanda önce çözünüp sonra da biyolojik moleküller ile reaksiyona girmesi beklenir. Sonrasında bu kan, kas içine yavaşça enjekte edilir. Uygulama sonrasında enjekte edilen kanın doku derinliklerine ilerlerken pıhtılaşmasına rağmen hastalarda hafif şişme ve ağrı görülebilir. Bu uygulamanın immünmodülatuar bir etkisinin olduğu iddia edilmektedir. Enjeksiyon yerinde hafifçe steril inflamasyon meydana gelmektedir. Bölgeye nötrofil ve monositler gelerek denatüre proteinleri ve parçalanmış eritrositleri fagosite etmektedir. Eğer kan içinde HCV, BV ve HIV gibi virüsler var ise ozon tarafından inaktive edilip parçalanmış bu virüs atıkları bölgeye gelen immün hücreler tarafından ortadan kaldırılır. Bu işlem bir çeşit aşı etkisi yaratır ve immün sistemi antijenlere karşı uyarır (*Altman 1996, Bocci 1994, Bocci 2006a, Özler ve ark. 2009*).

Hastaya verilen ozon miktarı dereceli olarak artırılabilir veya tedavi kürü süresince sabit tutulabilir. Minör OHT'ye 5 ml kan ile başlanır ve 10 ml'ye kadar çıkartılır (Hatta kronik hastalığı olanlarda 20 ml). İşlem iki günde bir tekrarlanır ve daha sonra haftada 1-2 uygulamaya geçilir. Bir tedavi kürü 6-12 uygulama içerebilir ve her tedavi kürü 2-3 ayda bir endikasyona göre tekrarlanabilir. Kronik hastalığı olanlar genelde trombozise yatkın olduğundan, hastadan alınan kan heparinlenmelidir. Bu metot özellikle alerjik durumlarda, kronik yangılarda, onkoloji ve gerontolojide kullanılmaktadır. Geleneksel tedavi ile karşılaştırıldığında, yan etkilerinin olmayışı ve yüksek klinik etkiye sahip olması

avantajıdır. Ozon kas içi ve sinir çevresine 10-80 µg/ml olarak enjekte edilebilir (*Altman 1996, Bocci 2006a, Bocci 2006b, Lin ve ark. 2011*).

### **2.4.3. Lokal Ozon Uygulaması**

Hasarlı deri, yaralar, trofik ülserler, oral mukoza membran ve dış genital organlara ozon-oksijen gaz karışımı ve ozonlanmış sıvılar (su, kristaloid solüsyonlar, antiseptikler, nebati yağlar) uygulanır. Çalışma odasına ozon sızıntısını engellemek için tedavi kapalı sistemlerle yapılmalıdır (*Altman 1996, Gerard ve Sunnen 1996*).

#### **2.4.3.1. Ozonlu Su Banyosu (Balneoterapi)**

Su ve sıcak maden suyu, yaygın cilt ve doku süreçlerinin iyileşmesine yardım eder. Kan ile lenfatik akımlar sadece ozon ve oksijen değil aynı zamanda mineralleri de alırlar. Ozon-mineral banyoları özellikle periferik kan akımı bozuklukları, egzema, ülser ve hiperenfekte yaraların tedavisinde kullanım alanı bulur. Önce hasarlı deri bölgesi serum fizyolojik veya distile su ile nemlendirilmiş bir gazlı bez ile örtülür. Çünkü ozon kuru deri üzerindeki bakterilere etkili değildir. Ekstremitelerdeki lezyonlarda “mini banyo” adı verilen plastik torbalar kullanılır. Torba 30°C’de 5–8 litre distile veya maden suyu ile doldurulur. Hasta ekstremitte bu torba içine yerleştirilir ve özel bir bandaj ile kapatılır. Su 10 mg/l konsantrasyonda ve 1 l/dk akımı hızında ozonlanarak torbanın tabanına yerleştirilmiş bir sonda ile verilir. Bir ucu destrüktöre bağlanmış sondanın diğer ucu torba içine yerleştirilerek rezidüel ozonun alınması sağlanır. Tedavi 20–30 dk sürer. Bu metot ozonun tıptaki ilk kullanım şeklidir. O zamanda kullanılan malzemeler bu metodun yaygın olarak kullanımını kısıtlamıştır. Günümüzde, ozon gaz yıkamasını tıpta geniş alanda kullanmaya izin veren ozona dirençli malzemeler bulunmaktadır. Ozonlu su ayrıca 0.8-1 mg/l dozda (in vitro) bazı antibiyotiklerle kıyaslandığında daha az endotoksin oluşumuna neden olmaktadır (*Altman 1996, Gerard ve Sunnen 1996, Shinozuka ve ark, 2007*).

#### **2.4.3.2. Intraartiküler Ozon Enjeksiyonu**

Intraartiküler ve periartiküler ozon/oksijen gaz karışımı enjeksiyonlarının, değişik formdaki eklem hasarlarının tedavisinde olumlu sonuçları vardır. Eklem içine veya çevresine enjekte edilecek medikal ozonun dozu ve hacmi eklem büyüklüğüne ve patolojinin klinik görünümüne bağlıdır. Eklem büyüklüğüne göre 5-60 ml ozon - oksijen gaz karışımı uygulanır. Eklem içi 40 µg/ml ozon uygulaması (haftalık ve 3 hafta süreyle) ratlarda sinovitis geriletmiştir. Enjeksiyondan sonra bu bölge gazlı bez ile tamponlanmalı

ve flaster ile sabitlenmelidir. Enjeksiyondan sonra eklem ağrısız bölgelerine pasif masaj uygulanır. Ozon tedavisi tedavi etkinliğini belirgin olarak artıran medikal ve fizik tedavi metotları ile kombine edildiğinde tüm artropatilerde başarıyla kullanılabilir. (*Null 1996, Yu ve ark. 2011*).

#### **2.4.3.3. Ozonlu Zeytinyağı**

Uygulanması ve elde edilmesi kolay olduğu için ozon tedavisinin en çok uygulanan yöntemlerinden biridir. Ozonlu zeytinyağının antiseptik ve rejeneratif özellikleri vardır. Biyolojik maddeler üzerine çok daha uzun süreli etki eden ozonidler, ozonlu solüsyonlardan çok daha fazla aktiftir. Doymamış yağ asidi ozonidinin oksijene olan afinitesinden dolayı, mikroorganizmaların bir reseptörüne bağlanır ve onu bloke eder. Ozonlu yağ 10-100 kez dilüsyondan sonra dahi mikroplara karşı sterilize edici etkisini korur. Ozonlu zeytinyağı dokulara penetre olarak aktif oksijen bırakır. Böylelikle bu bölgedeki kan akımını artırır, metabolik süreçleri aktive eder, bölgedeki granülasyon ve epitelizasyonu hızlandırır. Ozonun bakterisidal ve fungisidal etkisi belli bir latent dönemden sonra başlar. Bu özellikte yağ elde etmek için O<sub>3</sub> yoğunluğu mukozalar için 2 mg/l ve deri için 10 mg/l olarak ayarlanır ve 50 ml yağ için 60 dk boyunca ozonlama işlemi sürdürülür (*Geweely 2006, Travalgi ve ark. 2010*).

Nörodermatit, trofik ülser, yara yüzeyleyleri, yanıklar, böcek ısırılmaları ve kozmetik amaçla ozonlanmış yağ kullanılır. Uygulama yöntemleri arasında, vajinaya tampon, rektuma mikrolavman ve oral uygulamalar bulunmaktadır. Oral zeytinyağı alımı özefageal patolojilerde endikedir. Ozonlanmış yağ kapsül şeklinde mide veya duodenum ülserlerinde, gastritte ve giardia tedavisinde oral olarak da verilebilir. Üretimi için farmakolojik zeytinyağı kullanılır. Koyu renkli bir şişe içinde serin yerde muhafaza edildiğinde, ozonlu zeytinyağı terapötik özelliklerini 6 ay boyunca korur (*Altman 1996, Güven ve ark. 2008*).

#### **2.4.4. Rektal ve Vajinal Ozon İnsüflasyonu**

Ozon uygulama yöntemlerinden biri de ilk defa Dr. Aubourg tarafından savunulan O<sub>2</sub>-O<sub>3</sub> gaz karışımının rektum içerisine jeneratör ve özel hortumu aracılığıyla üflenmesidir (insüflasyon). Bu metot genelde bağırsakların kronik kolit ve fistülleri gibi yangısal hastalıklarında endikedir. Verilen ozonun önemli kısmı fekal içerik tarafından nötralize edilir. Kalan kısım mukozayı örten glikokaliks ve mukoproteinlerden oluşan katman içerisinde çözünür ve bu bileşiklerle reaksiyona girerek LOP' nin oluşumuna neden olur.

Bu peroksitler oksijen ile birlikte mukozadan birkaç saniye sonra emilerek kana karışır. Portal ven aracılığıyla karaciğere ulaşır. O<sub>3</sub> gazının rektal yolla uygulanması (rektal insüflasyon) hastada kesinlikle hiçbir rahatsızlık hissettirmez. Bu amaçla 5-35 µg/ml konsantrasyonda ve 200-300 ml hacimdeki gaz karışımı kolorektal olarak uygulanır. Ancak Küba gibi ülkelerde 50 µg/ml konsantrasyonda ve uzun süreli (20 seans) olarak kullanılmaktadır. Bu şekil uygulamanın mutajenik olabileceği unutulmamalıdır. Her şeye rağmen rektal insüflasyon yolu son zamanlarda bütün hastalıklarda kullanılmaya başlamıştır. Daha az invaziv olmasından dolayı genel sağlık ve yeniden canlanma için de kullanılmaktadır (*Altman 1996, Bocci 2005, Bocci ve ark. 2011a*).

Rektal ozon insüflasyonu, bir yandan patojenik mikroorganizmalarca bozulmuş barsak flora dengesini restore etmek için lokal antiinflamatuvar ve dezenfeksiyon metodu olarak kullanılırken diğer yandan intravenöz enjeksiyonun mümkün olmadığı durumlarda majör otohemoterapi ve parenteral infüzyona alternatif olarak kullanılabilir. Ozon - oksijen gaz karışımının rektumdan hızlı rezorpsiyonu kandaki oksijen seviyesini artırır ve buna bağlı olarak da sistemik metabolik bir etki oluşturur. Bağışıklık sisteminden sorumlu olan lenfositlerin %70'i barsaklarda bulunur. Bu yüzden rektum yoluyla uygulanan ozon immün sistemin regülasyonu için de kullanılabilir. Laboratuvar bulguları, major ya da minör otohemoterapiye uygun olmayan hastalarda ozonun, rektal üfleme yoluyla uygulanması yeğlenir. Bu işlemin uygulama süresi 10–20 sn olmalıdır. Çünkü fazla ozon insüflasyonu, ozon - oksijen gaz karışımının intestinal gazlarla karıştığı ve bu şekilde barsak mukozasındaki etkinliği azaldığı için daha az etkilidir. Hızlı rektal üfleme ampullada basınç artışına neden olur ve bu da ozon/oksijen gaz karışımının mukoza için daha geniş bir alan ve hızlı difüzyon sağlar. Bu basınç artışı sigmoidde peristaltik hareketlere neden olur. Bu da verilen gazın daha ileri hareketini zorlaştırır (*Bocci 2006a, Bocci 2006b*).

Düşük ozon konsantrasyonu hiperemiyi ve rejenerasyon sağlarken, yüksek konsantrasyonlar kanamayı durdurucu ve baskterisidal etki gösterir. İnsüflasyon Janet şırıngası veya PVC boru ile rektal katetere bağlanmış özel plastik torbalar vasıtasıyla lavman sonrası yapılır. Her gün veya günde iki kez uygulanan işlemlerde verilen ozon - oksijen gaz karışımının hacmi artırılır. Yüksek hacimlerde gaz karışımı verilecekse, el yardımı ile karına masaj yapılması önerilir ve böylece gaz kalın barsaklarda eşit olarak dağılır. İlk rektal insüflasyondan sonra karında şişlik hissi, intestinal ağrı, bulantı, genel bir sıkıntı hali görülebilir ve bu durum kısa sürede kaybolur. Rektal insüflasyon formundaki ozonterapi herhangi bir yan etki oluşturmaz (*Altman 1996, Bocci 2006a, Bocci 2007a*).

Vulvovajinit ve vajinal enfeksiyonlarda ozonlanmış serum fizyolojik disposable bir vajinal kateter yardımıyla patolojik içeriğin yıkanması için vajinal insuflasyon şeklinde kullanılır. Böylece terapötik ajanın kıvrımlı bir yapıya sahip vajina epitelinin hemen tamamına temas etmesi sağlanır. Serumun ozonlanması için kullanılan gaz karışımındaki ozon konsantrasyonu 3–5 mcg/ml arasında değişir. Tedavi her gün, 6–8 gün süreyle ve 200–400 ml hacminde uygulanır. Vajinal insuflasyon için ozon - oksijen gaz karışımı 1500–2500 mcg/l ozon konsantrasyonda vajinal spekulum üzerine bağlanmış intravajinal uç içinden 0.5-1 l/dk hızında 5-10 dakika verilebilir. Ozonlanmış distile su da sprey halinde vajina içine verilebilir (*Altman 1996, Bocci 2005*).

#### **2.4.5. Oral Ozon Uygulaması**

Bu amaçla ozon; gaz, ozonlu distile su ve bitkisel yağ şeklinde ağız yoluyla uygulanabilir. Gaz karışımı bir prob vasıtasıyla mide içine basınçla uygulanabilir. Ozonlu su ağızdan ya da rektal yıkama şeklinde de alınabilir. Ozonlama için distile veya iki kere distile edilmiş su kullanılması önerilir. Kötü kalitedeki su ozonun bozulmasını hızlandırır. Asit ortamda ozon - oksijen gaz karışımı daha stabilken, alkali ortamda ozon parçalanması çok daha hızlı gerçekleşir. Ozonlu distile suyun oda ısısında yaklaşık yarılanma ömrü 30 dk olduğundan, ozonlu suyun elde edilmesinden hemen sonra kullanılması önerilir. Daha düşük sıcaklıkta çözülmüş ozon su içinde daha uzun süre korunur. Yeni hazırlanmış ozonlu distile su buzdolabında yaklaşık 1 saat saklanabilir. Uygulama için; 2500–10000 mcg/l ozon, 20 dk ozonlama süresi ve 1 l/dk ozon - oksijen gaz karışımının akım hızı gerekir. Daha uzun süre ozonlama su içindeki çözülmüş ozonun miktarını artırmaz. Ozonlu suyun gastrit, özefajit, peptik ülser ve kronik kolesistitte oral alımı endikedir. Ozonlu su; stomatit, paradontosis, diş çekimi sonrası, enfekte yaralarının tedavisi ve cerrahi işlemlerden önce oral kavitenin genel dezenfeksiyonunda endikedir (*Altman 1996, Stübinger ve ark. 2006*).

#### **2.4.6. Subkutan Ozon Enjeksiyonu (Ozon Kabarcıkları)**

Bu metot dermatoloji (piyoderma, dermatit, psöriazis), cerrahi (trofik ülser, deri lezyonları, pürülan yara yüzeyleri, dekübit, fronkül, yanıklar), nöroloji (periferik sinir sistemi hastalıkları) ve diğer tıbbi alanlarda yaygın bir biçimde kullanılmaktadır. Subkutanöz ozon enjeksiyonu; lokal etkilerinin yanı sıra tüm organizmanın dinamiğinde artış, metabolik süreçlerde iyileşme ve kendini iyi hissetme gibi olumlu sonuçlar ortaya çıkarır. Bu akım hızı hastada ağrı hissine neden olmaz ve ozon ile doymamış yağ asitleri



arasındaki etkileşime bağlı olarak subkutanöz hücre dokusunda lipolizi hızlandırır. Subkutanöz ozon enjeksiyonu 1000–5000 mcg/L ozon konsantrasyonunda ve her patolojik bölge için 5–50 ml uygulanır. Bir enjeksiyonda 1–2 ml gaz karışımı uygulanır. Enjeksiyonlar hipodermik iğne ile hasarlı bölgenin etrafına ve hiperemi sınırından 0.5-1 cm uzaklığa yapılır. Her gün veya iki günde bir yapılan ozon enjeksiyonu sonucunda bölgede ozon kabarcıkları oluşur. Tedavi süresi hastalığın klinik görünümüne göre değişir. İşlem ağrılıdır ancak ağrı ve yanma hissi çok çabuk yok olarak yerini uzun süreli sıcaklık hissi alır. Subkutanöz ozon tedavisinin başka bir uygulama şekli de, ozon akupunktur tedavisidir. Ozon tedavisi ile akupunkturun kombinasyonu, sadece enerji sirkülasyonunda yeni bir impuls oluşumu değil aynı zamanda hücrelerin ozon tedavi ile oksijen kullanımını sağlayarak bu impulsun devamı elde edilmiş olur. Meridyen hatları boyunca subkutanöz ozon enjeksiyonu ile ozon kolaylıkla yayılabilir ve seçilen noktaya her durumda ulaşır. Bir seansta 8–10 noktaya enjeksiyon yapılır. Tedavi 10–12 günlük seansı içerir. Akupunktur ve ozon tedavisinin kombinasyonu bazı kronik hastalıklarda kullanılabilir. Bu tedavinin düzenli ve uzun süreli kullanımıyla hastalar sağlıklı bir yaşam kalitesine ulaşırlar (*Bocci 1994, Li ve ark. 2007*).

#### **2.4.7. Damar İçi Ozon Enjeksiyonları**

Bu metotlar arteriyel ve venöz kan dolaşım bozukluklarında, ozon/oksijen gaz karışımının vasküler akım içine direk olarak verilir. Bu yöntemlerin uygulanması muhtemel komplikasyonlara neden olabileceğinden büyük beceri gerektirir. Bu nedenle intraarteriyel ve intravenöz ozon - oksijen gaz enjeksiyonu pek uygulanmamaktadır. Bu metot ancak arteriyel dolaşım bozukluklarında kullanılabilir (*Altman 1996*).

#### **2.5. Ozonoterapi Endikasyonları**

Ozon tedavisi, antikoagülanlar hariç diğer tüm ilaçlar ve fizik terapiler ile kombine olarak kullanılabilir. Ozon etkisini artırdığı için analjezik, sedatif, antibakteriyel ve hipotansif ilaç dozlarının azaltılmasına izin verir. Dahası, ozon tedavisinin diğer terapötik metotlarla kombine edilerek oluşturulan kompleks tedavinin etkisi kullanılan tedavi ile elde edilen etkilerin aritmetik toplamından daha fazladır. Medikal ozon cerrahide (Enfekte yara, yanık ve ülserler, osteomyelit, pürülan peritonit, akut tromboflebit, diabetik ayak lezyonları, kalın barsak cerrahisi öncesi hastaların preoperatif hazırlığında ve postoperatif uygulamalarında, pürülan artrit, deforman artrozis ve onkolojide), iç hastalıklarında (İskemik kalp hastalığı, dolaşım bozukluğu ensefalopatisi, alt ekstremitelerin aterosklerotik

arteriyal dolaşım bozuklukları, diabetes mellitus, kronik bronşit, bronşial astım, kronik pyelonefrit, kronik gastrit, gastrik ve duodenal ülseröz hastalık, kronik nonülseröz kolit ve kronik hepatit), ürolojide (Akut ve kronik böbrek yetmezliği, sistopyelonefrit, ürogenital tüberküloz, cinsel yolla bulaşan hastalıklar ve kronik prostatit), jinekolojide (Spontan abortus, gestozis, gebelik anemisi, fetus enfeksiyonu, erken toksikoz, fetoplasental yetmezlik, genital organların inflamatuvar hastalıklarında, bakteriyel vajinozis ve vulvar distrofi), nörolojide (İşemik atak rehabilitasyonu, kronik serebrovasküler yetmezlik, migren, sistemik skleroz, kompresif iskemik nöropatiler ve spinal osteokondrozis), dermatolojide (Alt ekstremitelerin trofik ülserleri, cilt anjitiinin ülseröz formları, piyoderma ve akne, herpes, egzema, atopik dermatit, diğer kaşıntılı dermatit, fronkülozis, skleroderma, liken planus, büllöz dermatit, psöryazis ve kollajenozis) ve kozmetolojide (Akne isilik, sellülit, lokal lipodistrofi, alopesi ve seboreik dermatit) geniş kullanım alanı bulmuştur (*Bocci 2006a, Bocci 2006b, Bocci 2009, Calunga ve ark. 2005, Lu ve ark. 2010, Özler ve ark. 2009*).

## **2.6. Ozonterapi Kontrendikasyonları**

Ozon tedavisinin yan etkisi yok denecek kadar azdır. Bildirilen yan etkiler uygulama hatalarına bağlı lokal komplikasyonlardır. Genel olarak ozon tedavisinde görülen yan etkilerin; allerjik reaksiyonlar, emboliler ve infeksiyonlar olduğu bildirilmektedir. Bunlar genellikle sistemik uygulamalarda görülmüştür. Topikal uygulamada sözü edilecek tek negatif etki yaralarda meydana gelen hafif düzeyde irritasyonlardır. Ancak bazen ozonterapi uygulanması sakıncalı olabilir. Bu durumlar; glukoz 6 fosfat dehidrogenaz enzim eksikliği (favizm), özellikle erken dönem olmak üzere hamilelik, anjiotensin çevirici enzim (ACE) inhibitörü tedavisi görenler, hipertiroidizm, kanama bozukluğu, kronik pankreatit, yeni geçirilmiş kalp krizi, kontrol altına alınamayan kardiyovasküler hastalıklar ve ozona reaksiyon gösteren astım hastaları olarak sıralanabilir. Komplikasyonların tüm uygulamalara oranı 1 milyonda 7 (% 0,0007) vakadır. Ozon tedavisinin yan etkileri genellikle ozon-oksijen karışımının intravenöz verilmesinden kaynaklanır ki bu yöntem artık günümüzde pek kullanılmamaktadır. Muhtemel yan etkilerin nedenleri genellikle yanlış uygulama tekniği ve ozon dozunun hatalı seçimidir. Akciğer ve gözler ozonun toksik etkisine en hassas organlardır. Gözdeki irritasyonu ve akciğere etkileri konsantrasyon, sıcaklık, nem ve maruz kalınan süreye bağlı olarak değişir. Düşük konsantrasyonda ozon inhalasyonu boğazda irritasyon ve öksürüğe yol açarken, yüksek konsantrasyonları akciğer ödemeine neden olabilir. Ozon solunduğunda toksik bir gazdır.

Göze ve akciğerlere temas etmemelidir. Çünkü bunların nötralizasyon kapasitesi ve antioksidanları minimal düzeyde olduğu için ozona karşı çok duyarlıdırlar (*Altman 1996, Bocci 2006a, Kutlubay ve ark 2010, Özler ve ark. 2009*).

## **2.7. Cerrahi Hastalıklarda Ozonterapi**

### **2.7.1. Kulak ve Göz Hastalıklarında Ozonterapi**

Medikal ozon, kulakta antibakteriyel, antihipoksik ve hücrel-humoral immünite regülatörü olarak kullanılabilir. Orta kulak iltihabının tedavisi için irrigasyon şeklinde (5-7 uygulama) 600 mcg/l konsantrasyonda gaz ya da solüsyon halinde ozonoterapinin kullanılması önerilir. Ozonlanmış serum fizyolojinin lokal kullanımı kulak akıntısının durmasına ve timpanik mukozadaki yangının giderilmesine yardım eder. Bu uygulamanın yangıya işaret eden “myeloperoksidaz” enzim seviyesini istatistiksel olarak önemli derecede düşürdüğü bildirilmiştir (*Shakov ve Edeleva 1999*). Ayrıca kronik purulent otitis media olgularında *Pogosov ve ark. (2001)* ultrasonoterapiye paralel olarak 10 mg/l konsantrasyonda ozonlanmış serum fizyolojinin lokal kullanımını önermektedir.

Ozon; keratokonjiktivitis, kornea ülserleri, glakom, retinal dejenerasyonlar ve retinitis pigmentosa gibi birçok göz hastalığının sağaltımında kullanılır. Yapılan bir çalışmada; keratokonjiktivitis ya da kornea ülseri bulunan toplam 59 kedi değerlendirilmiş, sağaltım amacıyla ozon ve susam yağı karışımı lokal olarak uygulanmış ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Yine endoftalmitis bulunan olgularda ozonla doyurulmuş serum fizyolojinin intravitreal uygulamasıyla başarılı sonuçlar elde edilmiştir Ozonterapi 800-1000 mcg/l konsantrasyonda ozonlanmış serum fizyolojinin (günaşırı 5-6 uygulama) intravenöz infüzyonu şeklinde gerçekleştirilir. Gerçekleştirilen oksidatif terapinin sonuçları görme keskinliğinde artma olarak ortaya çıkar. Tedavinin herhangi bir yan etkisi gözlenmemiştir (*Bocci 2006b, Güzel ve ark. 2011, Null 1996, Vigna ve Menéndez-Cepero 2007*).

### **2.7.2. Diş Hekimliğinde Ozonterapi**

Ozonterapi, ilaç dozunun azaltılmasına hatta bazı durumlarda tamamen kesilmesine olanak sağlayan ve diş hekimliğinde kullanılan geleneksel tedavi metotları için iyi bir tamamlayıcı metottur. Lokal tedavide primer olarak ozonlu su geniş kullanım alanı bulur. Diş çürüğü, macun ve gargaraların kullanımı sayesinde gerilemekte ya da yavaşlamaktadır. Ozon % 99.9 başarı ile steril edilen diş yüzeyine ağız sıvılarında sürekli bulunan minerallerin (en önemlisi kalsiyum tuzları) çürükten boşalan bölgeyi doldurmasını sağlar.

Ozonterapi yalnızca çürük tedavisi ve dişlerin korunmasında değil, aynı zamanda dişeti hastalıklarında, aftöz ülserasyonların tedavisinde ve dişleri beyazlatmak için de kullanılabilir. Diş dolgusu yapılacaksa, dolgu konulmadan önce ozon uygulanması, işlem sonrası ağrıyı ve hassasiyeti engeller. Kanal tedavisi esnasında ozon uygulayarak bakterilerin yok edilmesi, çoğu kez birkaç seans sürebilecek bir işlemi tek seansa indirecektir. Dental cerrahi sonrası ağrıyı azaltmak için yine ozon uygulanabilir (*Saini 2011, Stübinger ve ark. 2006*).

Paradontozis veya alevlenmiş apikal süreçlerden dolayı dental ekstraksiyonlar ve protezde, seçilecek yöntem dezenfektan ve stimulan etkisinden dolayı ozonlu sudur. Cerrahiden önce dezenfeksiyon amacıyla oral kavitenin ve apsenin ozonlu su ile yıkanması önerilir. Bu prosedür sonraki 2–3 gün boyunca, yara kavitesi tam olarak iyileşene kadar tekrarlanır. Diş kavitesinin hazırlanması sırasında ve konservatif diş hekimliğinde ozonlu su dezenfeksiyon için kullanılır. Oral hijyenin artırılması ve optimizasyonu için 2 mg/l konsatrasyonda ozonlanmış serum fizyolojik diş temizlik evresinde yıkama formunda kullanılır. Bu iki metodun kombinasyonu oral kavitenin mikroflorası üzerinde yüksek bir etki ortaya koyar (*Lukinykh ve Kosiuga Siu 1998, Saini 2011, Stübinger ve ark. 2006*).

### **2.7.3. Peritonitte Ozonterapi**

Ozonterapinin peritonitin değişik formlarının tedavisinde özellikle intraperitoneal yolla kullanımı ozonun ikili patogenetik etki mekanizmasına dayalıdır. Birincisi, bakteri, virüs ve mantarlara karşı, membranlarının fosfolipid ve lipoproteinlerin oksidasyonuna, polipeptid ve protein zincirlerin kırılmasına bağlı olarak bozulması sonucu ortaya çıkan dezenfektan etkidir. İkincisi, plazma ve hücre membranlarında bulunan protein-lipid kompleksleriyle ilgili olarak, hücresel seviyede pO<sub>2</sub>'nin artmasına ve hipoksinin ortadan kalkmasına, biyolojik aktif maddelerin transformasyon ve sentezine, tokseminin ortadan kaldırılmasına, immünkompetan hücrelerin aktivasyonuna, reolojik ve kanın oksijen taşıma fonksiyonunun iyileşmesine lipid peroksidasyon süreçlerinin yoğunluğunun azalmasına ve organizmanın antioksidan savunma sisteminin aktivasyonuna yol açan sistemik metabolik etkidir. Bu durum peritonitlerin sağaltımında büyük bir önem arz eder (*Güzel ve ark. 2011, Shinozuka ve ark. 2008*).

*Souza ve ark. (2010)* yaptıkları çalışmada, ratlarda fekal kontaminasyon ile peritonitis oluşturarak periton içi ozon sağaltımı yapmışlardır. Ozonun, bakterileri inaktif hale getirerek ve sitokin salınımını azaltarak enfeksiyona karşı yangısal cevabı sınırlandırdığını göstermişlerdir. Yine *Bette ve ark. (2006)* tarafından yapılan diğer bir çalışmada, ratlara

fekal kontaminasyondan önce ozon profilaksisi yapılmış, ardından tazobactam/piperacillin ile kombine edilmiştir. Bu yöntemin, ozonun ön uygulama ile bağışıklık sistemini aktive etmesiyle ratların hayatta kalma oranını artırdığı görülmüştür.

Ozonoterapinin uygun kullanımı peritonite bağlı endotoksikozu, komplikasyonları ve ölüm oranını azaltmakta ve iyileşmeyi hızlandırmaktadır. Ozon tedavi şeması, peritonitin formuna, yayılımına ve evresine göre düzenlenir. Ameliyat sırasında, peritonit kaynağı elimine edildikten sonra, karın içi serum fizyolojik ile yıkanır. Gaz karışımı 20 ml/kg dozda, % 5'lik ozon ve 102 µg/ml konsantrasyonda periton içi olarak (günde 1-2 kez ve 5 gün süreyle) uygulanabilir. Parenteral, enteral ve majör otohemoterapi peritoneal lavaj ile kombine edilebilir (*Bette ve ark. 2006, Souza ve ark. 2010*).

#### **2.7.4. Yara ve Yanıklarda Ozonoterapi**

Ozon yara üzerindeki etkisini; bakteri enfeksiyonunu azaltmak, yarayı onarmak ya da yara bölgesindeki oksijen miktarını artırmak suretiyle yaptığı bildirilmektedir. Ozona maruz bırakılan kronik ya da akut yara bölgesinde, yara iyileşmesinde son derece önemli olan büyüme faktörlerinin (TGF) aktivitesinde artış olduğu belirtilmektedir. Buna bağlı olarak da, anjiyogenezis, fibroblast aktivitesi ve kollojen sentezinin arttığı gösterilmiştir (*Bocci 2006a, Bocci 2007b, Kim ve ark. 2009, Travalgi ve ark. 2010, Valacchi ve Bocci 1999*).

Medikal ozon lavaj için serum fizyolojik, distile su ve antiseptiklerle karıştırılabilir. Yara ve kavite temizliğinde, periton lavajında, dializde ve bandaj uygulamalarında antiseptik solüsyonlar da ozonlanır (2–4 mg/l). Gaz formundaki ozon ve ozon içeren kristaloid solüsyonlar bakteriyel floranın (stafilokoklar, proteus, kolibasiller, klebsiella, mantarlar, anaerobik flora) çoğalmasını baskılayabilecek durumdadır. Ozon ile mikropların antibiyotiklere duyarlılığı artarak dozları ve kullanım süreleri azalır. Yaralarda hızlı bakteriyel dekontaminasyon olur, yara yüzeyi nekrotik dokulardan temizlenir, granülasyon, fibrozis ve kenar epitelizasyonu başlatır. Ozonoterapi ile 3-4. günlerde ağrı sendromu ortadan kalkar (*Güven ve ark. 2008, Tylicki ve ark. 2004*).

Ozonun tek başına deri hücresi içine penetre olabilme özelliği bulunmaz. Ancak susam yağı ya da zeytinyağı gibi çoklu doymamış yağ asitleriyle oksidatif reaksiyona girerek deriye penetre olabilir. Deri üzerinde oluşturulan yaralara uygulanması halinde, yara iyileşmesini hızlandırdığı bildirilmektedir. Buradan yola çıkılarak, kronik yara iyileşmesinde özellikle de atrofik ve işemik ülserler ile diyabete bağlı yaraların sağaltımında kullanılmaktadır (*Bocci 2006a, Kim ve ark. 2009, Travalgi ve ark. 2010*).

Kronik yaralarda; uzun süre saf ozonun kullanılması yara iyileşmesini geciktirirken, oksijen/ozon karışımı ya da ozonlanmış yağların uygulanması, bölgedeki bakteri sayısını azaltır, oksijenizasyonu sağlar ve yara iyileşmesini hızlandırır. Yara iyileşmesinde kullanılan ozonun dozu da oldukça önemlidir. Çok düşük ve çok yüksek dozlarda yara iyileşmesini geciktirirken, orta düzeylerdeki ozon konsantrasyonlarından çok daha olumlu sonuçlar elde edilebilmektedir (*Güzel ve ark. 2011, Travalgi ve ark. 2010*).

Oksidatif stres; yanık şokunun ilk günlerinden itibaren oksidatif süreçlerin ani artışı ve antioksidan savunma sisteminin yetmezliğine bağlı olarak gelişir. Terapötik dozlarda ozon kullanılması lipid peroksidasyon ve antioksidan enzimler arasındaki dinamik dengenin restorasyonunu kolaylaştırır. Endotoksemi seviyesinde belirgin bir azalma olur ve sonuçta immünolojik durum düzelir ve fagositoz aktivitesi artar. Ozon respiratuar, kardiyovasküler ve sekretuar sistemlerin optimizasyonunu sağlar. Yanık hastalarındaki poliorganik yetmezlik sendromunu artıran tüm patolojik süreçlerin düzeltilmesinde aktif rol oynar. Tüm bunlar ozonoterapinin bir endojen detoks olarak düşünülmesine izin verir. Bu amaçla; termik travmaların kompleks tedavisinde, ozonlanmış serum fizyolojik her gün infüzyon yapılır, lokal tedavisi (plastik torbalama) gerçekleştirilir veya hastanın kendi kanı ile majör otohemoterapiye baş vurulur. İşlem kontaminasyon durumunda 10 mg/l ozon konsantrasyonunda 30 dk uygulama ile başlanır ve yara temizliği sağlandıktan sonra epitelizasyon için konsantrasyon 1–2 mg/l'ye süre de 10 dk'ya kadar düşürülür. Yanık yüzeylerinin epitelizasyon evresinde ozonlu zeytinyağı uygulamak daha uygundur (*Bocci 2005, Clavo ve ark. 2004b*).

### **2.7.5. Onkolojide Ozonoterapi**

Genel olarak kanser hücreleri oksijensiz ortamda oluşur ve çoğalır. Ozon yoluyla yüksek oksijene kavuşan dokulardaki kanserojen hücreler üreme yeteneğini yitirirler. Tümörler, normal dokulara oranla daha hipoksik olan bölgelerde gelişme imkânı bulurlar. Tümör hipoksisi, angiogenezin artmasına ve daha agresif tümör davranışına neden olur. Uzun süreli işemiler, normal dokuların ölümüne yol açarken, tümörlerin gelişmesini sağlar. Aynı zamanda tümöral hipoksi, radyoterapi ve kemoterapi gibi sağaltım girişimlerini de olumsuz şekilde etkiler. Oldukça fazla yan etkisi olan radyoterapi ve kemoterapinin yan etkilerini azaltmak için, özellikle oksijenin radyosensitizer ve kemosensitizer etkisinden faydalanmak için ozon uygulaması tümörlü hastalarda faydalı olabilir (*Bocci ve ark. 2005, Bocci 2007b, Clavo ve ark. 2004a, Clavo ve ark. 2004b, Gerard ve Sunnen 1996*).

Uzun süreli uygulanan ozon sağaltımı, dokulardaki oksijen miktarını artırarak tümörlü dokunun hipoksik durumunu düzeltir. Böylelikle daha az agresif bir tümör davranışı oluşturur. Dokulardaki oksijen düzeyini artırmak için, birçok farklı yöntem kullanılmasına karşın, bunlardan hiçbirinin dokularda kalıcı bir normoksi oluşturamadığı görülmüştür. Bu yöntemlerin 15-30 dakikadan fazla uygulanmasının, vazokonstriksiyona yol açarak dokulara olan kan akımını azalttığı da belirtilmiştir (*Bocci ve ark. 2005, Bocci 2007b, Clavo ve ark. 2004a, Clavo ve ark. 2004b, Gerard ve Sunnen 1996*).

*Kuz'michev ve Kuz'micheva (2004)* çalışmasında, tiroid nodüllü genç hastaları değerlendirmiş; bir gruba ilaç ve major otohemoterapi, diğer gruba ise sadece ilaç sağaltımı uygulamıştır. Çalışma sonunda, ozon uygulanan bireylerde tiroid dokusundaki kan akımının iyileştiği ve lezyonların küçüldüğü izlenmiştir (*Güzel ve ark. 2011*).

Tavşanlarda yapılan bir araştırmada; kulaklarında sokuamoz hücre karsinoması oluşturulmuş deneklerden bir gruba sadece O<sub>2</sub>, diğerine O<sub>3</sub>/O<sub>2</sub> karışımı intraperitoneal üfleme yöntemiyle verilmiştir. O<sub>2</sub> verilen deneklerin % 23,1'nin, ozon grubunun %50'sinin ve kontrol grubunda ise % 7,1'inin yaşadığı saptanmıştır (*Güzel ve ark. 2011*).

### **2.7.6. Ortopedide Ozonterapi**

Osteomyelit, eklem ve bazı omurga hastalıklarında ozonterapi yaygın olarak kullanılmaya başlamıştır. Osteomiyelitislerin sağaltımı, ortopedistler için son derece güçtür. Bu duruma enfeksiyona yol açan bakterilerin gerek antibiyotiklere karşı olan direnci gerekse antibiyotiklerin enfeksiyon bölgesine yeterince penetre olamamaları yol açar. Bu tür olgularda ozonun hem lokal hem de major otohemoterapi ile uygulanması, hızlı bir dezenfeksiyon ile birlikte hızlı bir iyileşme sağlar. Disk fitıklarında ozon, disk içerisine ya da paravertebral bölgeye uygulanabilir (32 µg/µl dozda ve yaklaşık 1.5-2 l µl). Bölgeye uygulanan ozonun oluşturduğu oksidatif etki ile nükleus pulposus'da denatürasyon ve atrofi meydana gelir. Bu durum, hem omurilik üzerindeki baskının azalmasına hem de kan ve lenf dolaşımının rahatlamasına olanak sağlar. Aynı zamanda bölgede oluşan aseptik yangının gerilemesine ve hastanın ağrısının azalmasına da yardımcı olarak hem antiinflamatuvar hem de analjezik etki gösterir (*Bocci 1999, Bocci 2007b, Han ve ark. 2007, Lu ve ark. 2010, Muto ve ark. 2008*).

Akut interdigital flegmonlu 60 inekte yapılan karşılaştırmalı bir çalışmada (*Scrollavezza ve ark. 2002*); medikal ozonun ceftiofur ve oksitetrasiklinlerden daha iyi sonuç verdiği ve ozonterapinin antibiyotiklere alternatif olabileceği sonucuna varılmıştır.

Akut ve kronik maksiller sinüzitte, maksillofasiyal cerrahide, açık mandibular kırıkların tedavisinde ve spinal osteokondrozis olgularında oral ve sinüs içi yıkama için ozonlanmış serum fizyolojik ya da distile su kullanılır. Kendine has özellikleri sayesinde, ozonterapi deforme artroz, artrit, eklem romatizması ve epikondilit gibi akut ve kronik artropatilerin tedavisinde antiinflamatuvar ve analjezik amaçla kullanılmaktadır. Hasarlı dokulardaki mikrosirkülasyonu restore eder, dekonjesyonu sağlar, effüzyonu azaltır, kırıkta rejeneratif etki oluşturur ve eklemden pasif ve aktif hareket artar. Ozon enjeksiyonları haftada 2–3 kez ve ortalama 8–10 uygulama şeklinde yapılır. Ozonterapi kürü 3–5 aylık ağrısız dönemden sonra tekrar edilmelidir. Oksidatif terapi steroidlerle kombine edildiğinde artropatilerde tedavinin etkinliği artar ve bu terapi organizmanın yapısal hemostazını korur (Null 1996, Stübinger ve ark. 2006, Yu ve ark. 2011).

**Çizelge 2.2.** Değişik hastalık gruplarında önerilen medikal ozon dozları (Bocci 2005)

<b>ÖNERİLEN O<sub>3</sub> KONSANTRASYONLARI</b>		
	<b>Başlangıç (mcg/ml)</b>	<b>İleri (mcg/ml)</b>
<b>Enfeksiyöz hastalıklar</b>	<b>20-25</b>	<b>70</b>
<b>Vasküler hastalıklar</b>	<b>20</b>	<b>40</b>
<b>Dejeneratif hastalıklar</b>	<b>20</b>	<b>30-40</b>
<b>Solunum hastalıkları</b>	<b>10</b>	<b>30-40</b>
<b>Otoimmün hastalıklar</b>	<b>50</b>	<b>80</b>
<b>Metastatik Tümörler</b>	<b>25</b>	<b>70-90</b>

## **2.8. Ozon Jeneratörü**

Medikal uygulamalarda ozon O<sub>2</sub> - O<sub>3</sub> karışımı halinde kullanılır. Bu karışımda O<sub>2</sub> oranı en az % 95 ve O<sub>3</sub> oranı ise en fazla % 5 olmalıdır (internal kullanım için % 0.05 ozon ve % 99.95 oksijen, harici kullanımlar için % 5 ozon ve % 95 oksijen karışımı). Bu amaçla kullanılan ozon jeneratörleri paslanmaz çelik, nötral cam ve teflon gibi ozona dirençli materyalden imal edilmelidir. Gerçek zamanlı olarak fotometrik olarak kalibre edilebilmelidir. Ozon jeneratöründen 1 g ozon elde etmek için 20–25 W elektrik enerjisine ihtiyaç vardır. Medikal ozon, saf medikal oksijenin, ozon oluşturmak üzere (tıbbi ozon jeneratörü kullanarak) elektriksel olarak aktive edilmesiyle elde edilir. Ozonun, 10-80 µg/ml doz aralığındaki kullanımı herhangi bir yan etki oluşturmadığı, ayrıca aynı oranların gerek eritrosit gerekse lökosit fonksiyonları üzerinde de olumsuz etkisinin bulunmadığı bildirilmektedir (Altman 1996, Bocci 2006a, Bocci 2006b, Bocci 2007a, Li ve ark. 2007, Tylicki ve ark. 2004).



## **2.9. Osteomyelitis**

### **2.9.1. Tanım**

Osteomyelitis kemik medullasının ve ilişkili dokuların pyojen mikroorganizmalar tarafından sekonder olarak oluşturulan akut ve kronik yangısıdır. Klinik görünümünün ve patofizyolojisinin değişikliğinden dolayı, osteomyeliti klinik olarak değerlendirmek oldukça zordur (*Patel ve ark. 2009*).

### **2.9.2. Neden**

Osteomyelit bakteriyel ve mikotik olmak üzere iki gruba ayrılır. Rota (kemik operasyonları, açık kırık, ısırık, ateşli silah ve yabancı cisime bağlı yumuşak doku yaralanmaları, periodondit, rinit ve otit gibi fokal enfeksiyonlar), monomikrobiyal (Stafilokoklar), polimikrobiyal (gram pozitif ve negatifler karışımı) ve anaerobik enfeksiyonlar bakteriyel osteomyelite neden olur. Koksidiyoz, blastomikoz, histoplazmoz, kriptokokkoz ve aspergilloz başlıca mikotik osteomyelit nedenleridir (*Arıcan 2012, Deprem ve Yeşildere 2006*).

### **2.9.3. Klinik Bulgular**

Akut fazda; iştahsızlık, hareketsizlik, kilo kaybı ve ateş gibi genel semptomlara rastlanır. Hastalıklı periost ve çevresindeki kaslar şiş, ağrılı ve sıcaktır. Kronik olgularda fibrozis, kas atrofisi, lenfadenopati ve kontraktür şekillenir (*Deprem ve Yeşildere 2006*).

### **2.9.4. Tanı**

Anamnez, fiziksel muayene, mikrobiyoloji ve radyoloji ile tanıya gidilir. Özellikle radyografik bulgular ve bakteriyel kültür tanıyı kesinleştirir (*Deprem ve Yeşildere 2006*).

### **2.9.5. Radyografik Bulgular**

Akut osteomyelit olgularında; erken dönemde kemik anormalliği görülmez. Sadece yumuşak dokuda şişme vardır. Daha sonra (1-2 hafta) periostal üreme reaksiyonları gözlenir. Bu dönemde diafiz shaftı uzamaya ve eklemi de içine almaya meyillidir. Yeni kemik ve korteks arasında radyolüsent hat görülebilir. Korteks ve medullada erime (lizis) ve kemik apsesi dikkati çeker (*Arıcan 2012*).

Kronik osteomyelit durumunda; kemik duvarında lizis, sekester ve periostal üreme gözlemlenir (*Arıcan 2012*). Kemik emilimi medullada erimeye, kırık kemik uçlarının

yuvarlanmasına ve korteksin incelmesine neden olur. Periostal yeni kemik oluşumları çevreye yerleşmiş, sivri ve aşırı büyümüş halde gözlenirler (*Deprem ve Yeşildere 2006*).

### 2.9.6. Sağaltım

Kemiğin kapillar membranını direkt geçebilen ve interstisyel sıvıların içine sızarak genişçe yayılabilen ilaçlar; betalaktamlar (sefalosporinler ve penisilinler), aminoglikozitler ve kinolonlardır. Akut osteomyelitler genelde 4-6 haftalık antibakteriyel tedavi ile iyileştirilebilirler. Kronik osteomyelitler ise debridman ve sekesterlerin uzaklaştırılmasıyla ancak iyileşebilir. Antibiyotik emdirilmiş petler kronik olgularda faydalıdır. Bazen drenaj, kırığın stabilizasyonu, kemik greftlerinin kullanılması ve önceden uygulanan implantın uzaklaştırılması gerekebilir (*Deprem ve Yeşildere 2006*).

Metisiline duyarlı *Staphylococcus aureus*'un tedavisinde quinolon sınıfı antibakteriyel ajanlar kullanılır. Üçüncü kuşak quinolon olan levofloksasinin gr pozitif, gr negatif ve anaerobik bakterilere karşı istisnai bir geniş spektrum aktivitesi vardır (*Shirliff ve ark. 2001*). Yapılan bir çalışmada (*Greenberg ve ark, 2000*), levofloxacin, lomefloxacin ve ciprofloxacin gibi fluoroquinolonların kronik osteomyelitis olgularında oral olarak verilmesinin uzun süre kullanımı ve debridmanla birlikte uygulanması ile etkin ve güvenli bir sağaltım seçeneği sunduğu sonucuna varılmıştır (özellikle levofloxacin en ideali). Ayrıca kronik osteomyelit sağaltımında ofloxacin'in % 91 oranında başarı sağladığı da rapor edilmiştir (*Shirliff ve ark. 2001*). Yine akut osteomyelit olgularında vankomisin etkin bulunmazken, üçüncü kuşak bir sefalosporin olan ceftaroline ve linezolid daha etkin olarak görülmüştür. Ayrıca ceftaroline eklem ve ortopedik enfeksiyonlarda da oldukça aktiftir (*Jacqueline ve ark. 2010*). Kronik osteomyelitin sağaltımında antibiyotik ve debridmana ek olarak lokal ozon veya hiperbarik oksijen uygulaması da oldukça faydalı bulunmuştur (*Steinhart ve ark. 1999*). Mader (1987) Aril fluoroquinolon olan geniş spektrumlu olan A56619'u osteomyelit sağaltımında kullanmış ve *Staphylococcus aureus* eradikasyonunu yüksek düzeyde bulmuştur.

Sunulan bu çalışma ile; ratlarda medikal ve cerrahi girişim ile bile sağaltımı oldukça güç olan osteomyelit olgularında, medikal ozonun koruyucu ve tedavi edici etkilerinin olup olmadığının araştırılması amaçlanmıştır.

### 3. GEREÇ ve YÖNTEM

#### 3.1. Kullanılan Hayvanlar ve Gruplar

Bu çalışma için, 5 aylık ve 300-500 g canlı ağırlığında 24 adet erkek Wistar rat kullanıldı. Hayvanlar (24 adet) eşit olarak ve rastgele Kontrol Grubu (Vaka no: 09-16), Koruyucu Grup (Vaka no: 17-24) ve Tedavi Grubu (Vaka no: 01-08) olmak üzere 3 gruba ayrıldı. Bireysel olarak ayrı kafeslere yerleştirilen hayvanlara yeterli miktarda su ve standard rat yemi verildi. Çalışma boyunca hepsine sağlık yönünden klinik gözlem yapıldı.



Şekil 3.1. Deney Hayvanları Ünitesinde yer alan ve çalışmada kullanılan kafes ve ratların görünümü (a). Oksijen tüpünü ozon jeneratörüne bağlayan regülatör (b).

#### 3.2. Enfeksiyonun Oluşturulması



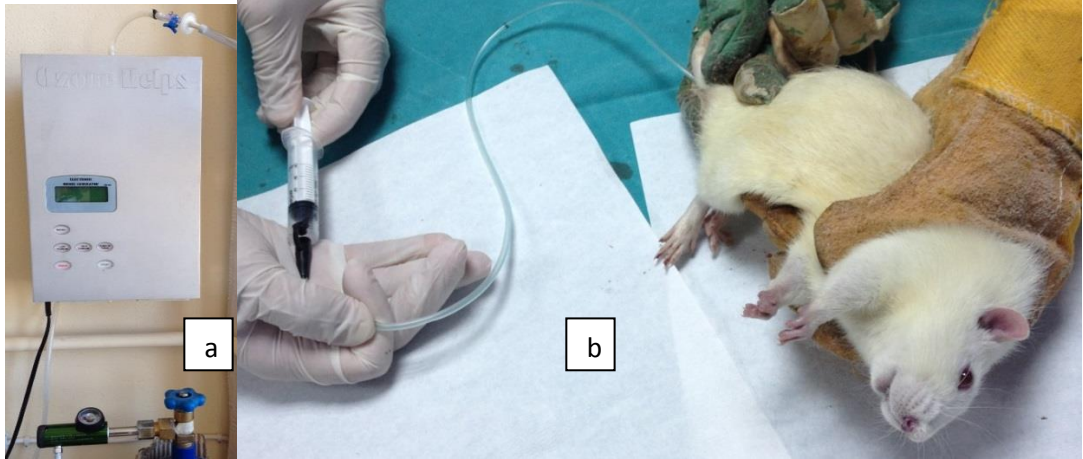
Şekil 3.2. Kemik medullasının 22G iğne ile femurun lateral kondilusundan açılması (a) ve insülin iğnesiyle uygulanan intramedullar mikrop enjeksiyonunun görünümü (b).

Ratlara önce 5 mg/kg xylazine (Alfazine<sup>®</sup>, Alfasan) ve 50 mg/kg ketalar (Alfamine<sup>®</sup>, Alfasan) kas içi olarak uygulanarak genel anesteziye alındı. Daha sonra ilgili bacak üstte olacak şekilde yanüstü yatırıldı. Önceden tıraş edilen distal femur lateral kısmının antisepsisi sağlandıktan sonra, 1 cm'lik deri ensizyonu yapıldı ve 22 G siyah uçlu enjektör iğnesi ile femurun lateral kondilusundan femur shaftına paralel yönlendirilerek medullaya ulaşıldı. Bu enjektör iğnesi çıkartılıp insülin iğnesi ile medulla içine 300 000 adet *Staphylococcus aureus* içeren 10 IU (0.1 ml) bakteriyel suspansiyon enjekte edildi. İğnenin geri çekilmesinden hemen sonra delik ucuna yaklaşık 30 saniye basınç uygulandı. Daha

sonra deri birkaç dikişle kapatıldı ve bölge pansuman altında korundu. Osteomyelit oluşumu için 4 gün beklendi.

### 3.3. Medikal Ozonun Uygulanması

Kontrol Grubuna ozon kürü uygulanmazken; Koruyucu Gruba enfeksiyon etkeninin enjeksiyonundan bir hafta önce başlamak üzere günlük ve 15 uygulamayı içeren bir ozon kürü 40 µg/ml 1/16'lık düşük konsantrasyonda, 500 µg/kg dozda ve rektal üfleme (insüflasyon) şeklinde ozon jeneratörü (Ozone Helps marka ve EOG 100 model Jenerator) kullanılarak verildi. Bakteriyel enjeksiyonu takiben ozon kürüne bitinceye kadar devam edildi. Tedavi Grubunda ise bakteri enjeksiyonundan 4 gün sonra; günlük ve 15 uygulamayı içeren bir ozon kürü 40 µg/ml 1/16'lık düşük konsantrasyonda, 500 µg/kg dozda ve rektal üfleme (insüflasyon) şeklinde ozon jeneratörü kullanılarak verildi. Medikal ozon; jeneratörden 10 cm'lik plastik pistonlu tek kullanımlık enjektörle alındı ve hemen ozona dirençli 10 Ch genişliğinde bir besleme sondası aracılığıyla yavaşça (20 sn) kolon içerisine verildi. Verilen gazın geri çıkmaması için de yardımcı personel tarafından enjeksiyon esnasında ve sonrasında anüse yaklaşık 1 dakika kadar basınç uygulandı.



Şekil 3.3. Çalışmada kullanılan medikal Ozon Jeneratörü (a) ve Medikal Ozonun rektal olarak uygulanışı (b).

### 3.4. Klinik Bulgular

Klinik görünümü, yem ve su tüketimi, canlı ağırlığı gibi genel bulgular ile lokal ısı artışı, şişkinlik, apse oluşumu, fistülleşme, topallık ve duyarlılık gibi lokal bilgiler belirlenerek artış ya da azalış durumları haftalık olarak not edilerek kayıt altına alındı.

### 3.5. Radyografik Bulgular

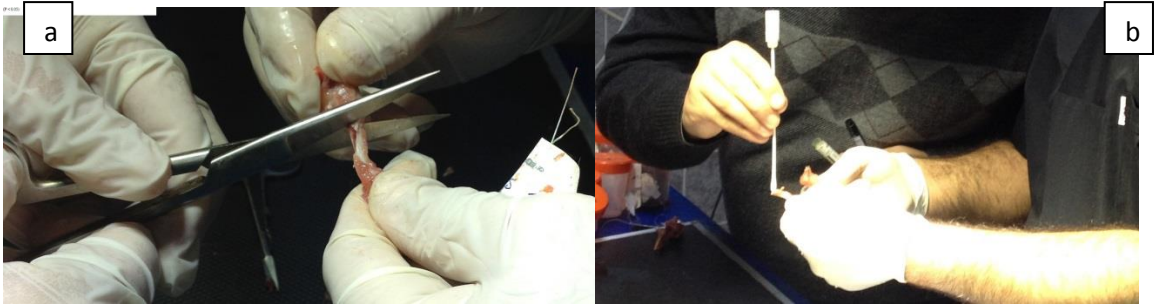
Hayvanların bütün femurları eksize edildikten sonra radyogramları (Bilgisayarlı radyografi) alındı. Enfekte edilen kemiklerdeki opasite artışı, kemik yıkımlanması, korteks

bütünlüğü, kemikteki kalınlaşma ve lezyonun yaygınlığı takip edildi. Diğer sağlam femurun radyogramı ile de simetrik kıyaslama yapılarak farklılıklar kaydedildi. Bütün olguların radyogramlarında; fokal opasite ve radyolusent alanlar, sağ femur kortekslerinin yapısı, kemikteki osteomyelitin yaygınlığı, patellanın etkileşimi ve genel kemik bütünlüğü osteomyelitin ana kıstasları olarak göz önünde tutuldu. Böylece tüm gruplar ve vakalar ayrı ayrı değerlendirilerek lezyonun şiddetine göre derecelendirildi. Radyogramlar *Shirtliff ve ark. (2001)* tarafından bildirilen kriterler modifiye edilerek değerlendirildi.

İlk önce sağ ve sol femurlar radyogram üzerinde birlikte değerlendirilerek; anatomik şekil, kemik kısımları arasındaki ahenk ve uyum birbiriyle kıyaslandı. Şekil, ahenk ve uyum bütünlüğü birbirine yakın ise “+”, tüm kemikte kalınlaşma varsa “++” ve yapısal değişim varsa “+++” şeklinde değerlendirildi. Kortekslerdeki incelleme “+”, görülemez hale gelmesi “++” ve geniş yıkılmış olması “+++” olarak değerlendirildi. Fokal opasite ve radyolusent odaklar kemiğin tüm diafiz bölgesinin üçte birine kadar ise “+”, üçte ikisine kadar ise “++” ve üçte ikinin üzerinde ise “+++” olarak kabul edildi. Osteomyelit kemiğin distal üçtebiri ile sınırlı ise “+”, kemiğin üçteikisine yayılmışsa “++” ve tüm diafizi kaplamışsa “+++” olarak düşünüldü. Patelladaki yıkılma da aynı şekilde üçe ayrılarak değerlendirildi. Bütün değerlendirmeler “+” hafif, “++” orta şiddet ve “+++” şiddetli olarak ifade edildi. Eğer hiçbir lezyon yoksa negatif bulgu manasına gelen “---“ işareti kullanıldı.

### 3.6. Mikrobiyolojik Analizler

Radyografik incelemeden hemen sonra, bütün kemikler suprakondiler olarak kırıldı. İntramedullar swap örnekleri alınarak kültür ve PCR incelemeleri yapıldı.



Şekil 3.4. Swap örneği almak için kemiğin distal kısımdan makasla kesilmesi (a) ve kemik medullasından mikrobiyolojik inceleme için örneğin alınması (b).

#### 3.6.1. Kültür Süspansiyonunun Hazırlanması

Bu amaçla *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 suşu Nutrient Agarda üretildi ve taze kültürden öze ile alınarak tüp içerisindeki steril PBS de çözündürülerek süspansiyon edildi.

Hazırlanan süspansiyon Den-1 (MacFarland Densitometer, Biosan) cihazında ölçülerek Mac-Farland 0,5'e ayarlandı. Hazırlanan süspansiyondan alınarak her bir deneme hayvanının sağ femur kemiğine intramedullar olarak 100 µl olacak şekilde enjekte edildi. Ayrıca hazırlanan bu süspansiyondan alınan örnekler PCR işlemine tabi tutularak etken teyit edildi.

Otopsi sonrası da kemikler steril şartlarda kırılarak kemik ilikleri açığa çıkartıldıktan sonra steril swaplar ile örnekleme yapıldı. Alınan swap örnekleri vakit geçirilmeden mikrobiyoloji laboratuvarına ulaştırılarak Kanlı Agara ekimleri yapıldı ve 37 °C de 72 saat süreyle inkübasyona bırakıldı.

### 3.6.2. Nükleik Asit İzolasyonu

Steril swap örnekleri Kanlı Agara ekim yapıldıktan sonra steril tüpler içindeki 1 ml steril PBS içerisinde 30 dakika bekletilerek, swap içeriğinin steril PBS içerisinde çözünmesi sağlandı. Daha sonra bu süspansiyonlardan moleküler analizlerde kalıp DNA olarak kullanılacak DNA'nın elde edilmesi amacıyla fenol/kloroform/izoamil alkol yöntemi kullanılarak Nükleik Asit izolasyonu yapıldı (*Sambrook ve Russell, 2002*).

### 3.6.3. PCR Karışımının Hazırlanması

Bu çalışmada, *Staphylococcus aureus* primer seti kullanıldı. Kullanılan primerlerin baz dizileri, bağlandıkları spesifik gen bölgeleri ve PCR ürünlerinin uzunlukları Çizelge 3.1'de gösterilmiştir. PCR karışımı (her bir örnek için); 10xPCR tamponundan 2,5 µl, MgCl<sub>2</sub>'den 3 mM, dNTP'den (10 mM) 200 µM, Primer I'den 25 pmol, Primer II'den 25 pmol ve Taq DNA Polimeraz'dan 1,5 IU olacak şekilde oluşturuldu. Bu karışıma 20 µl'lik hacme ulaşınca kadar distile su eklendi. Bu ana karışım her tüpe 20'şer µl olarak dağıtıldı ve herbirine 5 µl örnek DNA'sı eklenerek toplam reaksiyon hacmi 25 µl'ye tamamlandı. Tüm PCR karışımları aynı oranda hazırlandı. Bu karışıma göre hazırlanan örnekler çoğaltma için önceden programlanmış thermal cycler cihazına yerleştirildi.

**Çizelge 3. 1.** Primerlerin baz dizileri, bağlandıkları spesifik gen bölgeleri ve PCR ürünlerinin uzunlukları (*Riffon 2001*)

Etken Adı	Primer	Primer Dizisi	Uzunluk
<i>Staphylococcus aureus</i>	Sau 327	5'-GGA CGA CAT TAG ACG AAT CA-3'	1318 bp
	Sau 1645	5'-CGG GCA CCT ATT TTC TAT CT-3'	

### 3.6.4. DNA Amplifikasyonu

Amplifikasyon işlemi araştırılan etkenlerin belirlenmesinde kullanılan primerlerin seçildiği kaynak literatürlerde (*Riffon 2001*) önerilen yöntemle göre ayrı ayrı yapıldı. 94 °C’de 3 dakika ön denatürasyon, 94 °C’de 45 saniye denatürasyon, 64 °C’de 60 saniye primer bağlanması, 72 °C’de 120 saniye yeni DNA zincirinin sentezlenmesi olmak üzere toplam 30 döngü yapıldı. En son aşamada 72 °C’de 7 dakika bekletilerek reaksiyon tamamlandı. Oluşan amplifikasyon ürünleri agaroz jel elektroforezi ile UV ışık altında görüntülendi (*Sambrook ve Russell 2002*).

### 3.7. Histopatoloji

Medikal ozon uygulamasının bitiminden iki gün sonra bütün olgular derin anesteziye alınarak (10 mg/kg xylazine (Alfazine<sup>®</sup>, Alfasan) ve 100 mg/kg ketalar (Alfamine<sup>®</sup>, Alfasan), kas içi) sakrifiye edildi ve ilgili kemiklerin histopatolojik incelemeleri yapıldı.

Alınan tüm kemik örnekleri; ilk olarak %10’luk nötral formalin solüsyonunda 4 C° sıcaklıkta bir gece bekletildikten sonra PBS solüsyonuna atıldı. Daha sonra dekalsifikasyon işlemi için %10’luk formik asit solüsyonunda oda sıcaklığında bir hafta boyunca bekletildi. Dehidrasyonu takiben artan dereceli alkollerde tespit edilerek parafine gömüldü. Parafin bloklardan 5 µm kalınlığında kesitler alınarak hematoksilin-eozin (H&E) ile boyandı. Hazırlanan preparatlardan ışık mikroskop altında (Olympus CX31) incelemeler yapıldı. Lezyonların mikrofotografı alındı (Olympus DP12).

Histopatolojik değerlendirilmede; akut yangı göstergesi olarak nötrofil lökosit artışı, kanama ve nekroz; iyileşme kriteri olarak da bağdoku üremesinin yoğunluğu derecelendirildi. Osteomyelitte oluşan yangı ve yangı kriterlerinin yoğunluklarına göre derecelendirilmesi; yok (---), hafif (+), orta dereceli (++) ve şiddetli (+++) şeklinde gösterildi. Herhangi bir işlem yapılmayan sol femurlar ise Referans Grubu olarak kullanıldı.

### 3.8. İstatistiksel Analizler

Radyografik ve histopatolojik bulgulardan elde edilen nonparametrik analizlerin istatistikleri yapıldı. Önce gruplar içi her denek için median (ortanca) oluşturuldu. Daha sonra üçlü gruplar arası karşılaştırmalar için “Kruskal Wallis Testi” ve ikili gruplar arası karşılaştırmalar için “Mann Whitney U Testi” kullanılarak gruplararası ortancalar (P) elde edildi. Çalışmada P < 0.05 düzeyi istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Klinik Bulgular

#### 4.1.1. Genel Klinik Bulgular

Bütün olgularda inspeksiyondaki genel görünüm oldukça aktifti. Günlük yem ve su tüketimi gibi genel bulgular çalışma boyunca tüm gruplarda normal gözlemlendi. Vaka no 03 ve 04'de (Tedavi) çalışmanın ikinci haftasında ishal gözlemlendi. Ayrıca 24 nolu olguda (Koruyucu) yine ikinci haftada ozon uygulamasını takiben kısa süreli şok görüldü. Çalışma boyunca ölüm vakasına hiçbir grupta rastlanmadı. Kontrol Grubundakilerin canlı ağırlıkları ikinci haftanın sonuna kadar dramatik bir şekilde düştü. Koruyucu Grupta operasyona kadar canlı ağırlık ortalamasının azaldığı ve operasyondan sonra bir hafta içinde yarı yarıya toparlandığı gözlemlendi. Tedavi Grubunda ise yine ilk hafta içerisinde ağırlık ortalaması düşerken takip eden haftada toparlanmaya başlamıştır (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. Grupların ortalama canlı ağırlıklarının haftalık seyri.

Hafta	Kontrol Grubu (No: 9-16)	Koruyucu Grup (No: 17-24)	Tedavi Grubu (No: 1-8)
0.	414.38 g	393.13 g	376.25 g
1.	389.50 g	353.50 g	341.75 g
2.	366.50 g	374.25 g	357.75 g

#### 4.1.2. Lokal Klinik Bulgular

##### 4.1.2.1. Kontrol Grubu

Lokal ısı artışı, duyarlılık, topallık, şişkinlik, apse oluşumu ve fistülleşme gibi lokal bilgiler değerlendirildiğinde ilk hafta; olguların iki tanesinde orta, 5 tanesinde hafif derecede ve 1 tanesinde de şiddetli topallık gözlemlendi. Orta dereceli topallık gözlenen vakalarda hayvanlar ilgili ayağını yere basarken parmaklarını kapalı tutuyordu. Bölgede şişlik ve ısı artışı yok denecek kadar azdı. İkinci hafta; topallık dereceleri pek değişmezken lokal ısı artışı ve şişlikte belirgin bir artışın varlığı saptandı (Çizelge 4.2).

##### 4.1.2.2. Koruyucu Grup

Osteomyelit etkenlerinin enjeksiyonundan bir hafta sonraki incelemede; 2 vakada hafif, 5 vakada orta ve 1 vakada da şiddetli topallık görüldü. Lokal ısı artışı ve şişlik ise



belli belirsizdi. Daha sonraki haftada; topallıkların azaldığı, şişliğin hafif arttığı ancak lokal ısının pek değişmediği saptandı. Bu grupta da apse oluşumu ve fistülleşme gibi bir durum gözlenmedi (Çizelge 4.2).

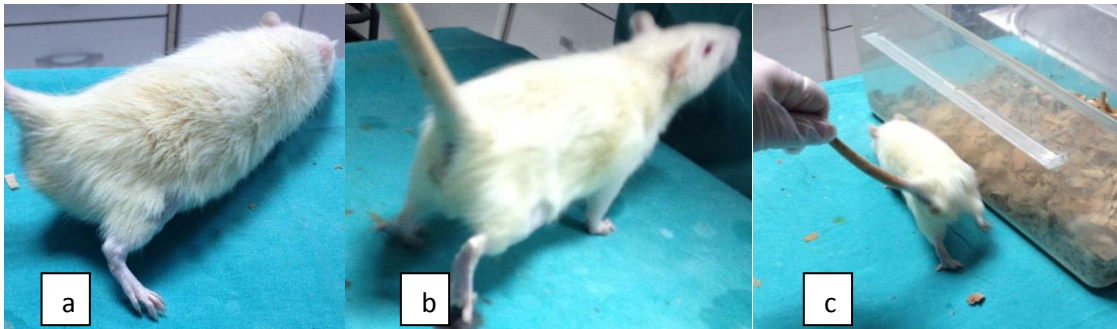
#### 4.1.2.3. Tedavi Grubu

Osteomyelit etkenlerinin enjeksiyonundan bir hafta sonraki incelemede; iki vakada hafif olmak üzere diğerlerinde orta derece topallık görüldü. Lokal ısı artışı ve şişlik ise belli belirsizdi. Daha sonraki haftada; topallığın hafif azaldığı, şişliğin hafif arttığı ancak lokal ısının pek değişmediği saptandı. Tedavi Grubunda da apse ve fistül gözlenmedi (Çizelge 4.2).

**Çizelge 4.2.** Osteomyelit etkenlerinin enjeksiyonundan 1 ve 2 hafta sonraki lokal klinik görünüm. Lezyonların derecelendirilmesi: “+” hafif, “++” orta, “+++” şiddetli

	Kontrol Grubu (No: 09-16)			Tedavi Grubu (No: 01-08)			Koruyucu Grup (No:17-24)		
	Topallık	Isı	Şişlik	Topallık	Isı	Şişlik	Topallık	Isı	Şişlik
1 hafta sonra	+	+	+	++	+	+	++	+	+
2 hafta sonra	+	++	++	+	+	++	+	+	++

Swap örnekleri almak için eksize edilen kemikler steril cerrahi makasla suprakondiler olarak kesilirken; Tedavi Grubuna ait femurun makasa karşı ciddi bir direnç gösterdiği, Koruyucu Grubun aynı şekilde belirgin bir direnç gösterdiği, ancak Kontrol Grubunun ise çok az direnç gösterdiği tespit edildi.



**Şekil 4.1.** Osteomyelit oluşturulan ratlarda topallığın görünümü. Koruyucu Grupta yere tam basamayan bir olgu (a), Tedavi Grubunda parmaklarının ucuyla yere basan bir olgu (b) ve Kontrol Grubunda ayağını yere basmak istemeyen bir olgunun (c) görünümü.

## 4.2. Radyografik Bulgular

### 4.2.1. Kontrol Grubu

En şiddetli osteomyelit bulguları bu grupta tespit edildi. Ayrıca sağlam kemikle kıyaslandığında kemik shaftının total olarak büyüdüğü ve dikdörtgen hale geldiği görüldü (Şekil 4.4a). Sol femurla kıyaslandığında lezyonlu kemikteki bütünlük değişimi ve osteomyelit oluşumunun kemikteki yaygınlığı açısından sağ femurların bozukluğu orta

şiddette idi. Patelladaki yıkımlanma oranı hafif derece olarak gözlemlendi (Şekil 4.3C). Diğer radyogram bulguları ise şiddetli olarak tespit edildi. Her radyografik parametre için “+” değeri rakamsal olarak “1” kabul edildiğinde, bu grubun skoru 95 olarak bulundu (Çizelge 4.3).

#### 4.2.2. Tedavi Grubu

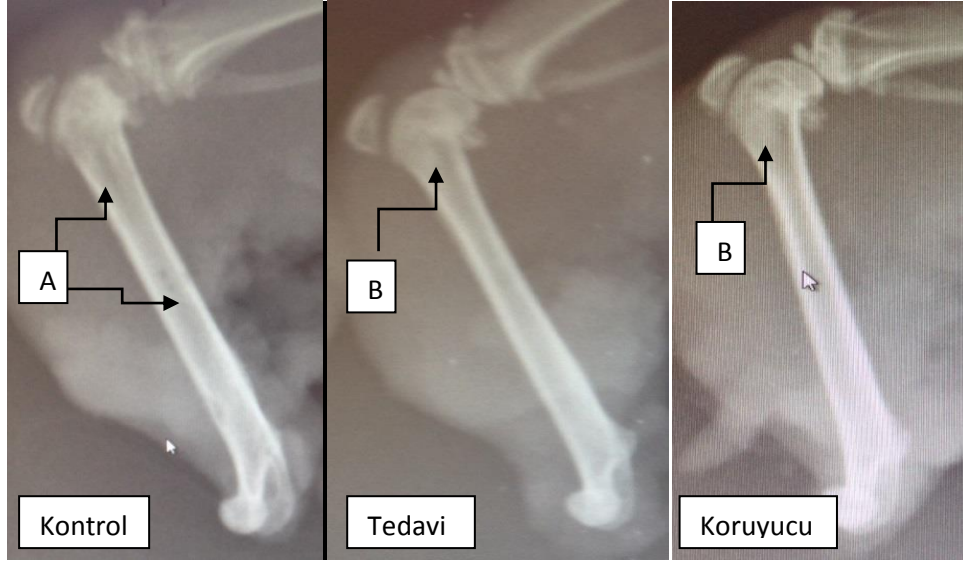
Bu grupta şiddetli radyogram bulgularına rastlanmazken, lezyonlar hafif-orta derece idi. Patelladaki yıkımlanma oranı negatife yakın; sol femurla kıyaslandığında lezyonlu kemikteki bütünlük değişimi, osteomyelit oluşumunun kemikteki yaygınlığı ve fokal radyolüsent alanlar hafif; diğer radyogram bulguları ise orta şiddette bulundu. Grubun skoru ise 51 olarak sayıldı. Kontrol Grubu ile kıyaslandığında % 46.3 oranında az olduğu hesaplandı (Çizelge 4.3).

#### 4.2.3. Koruyucu Grup

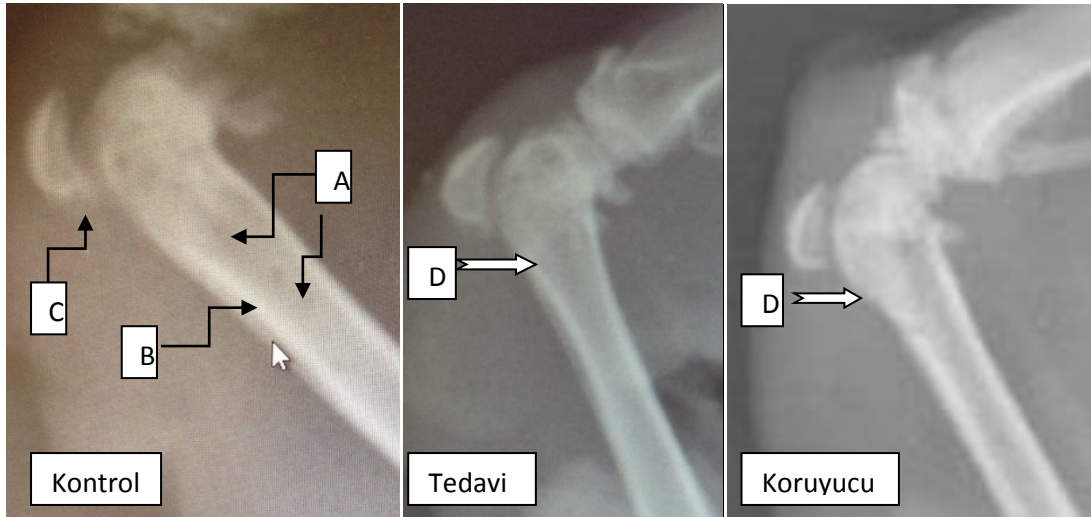
Bu grupta da şiddetli radyogram bulgusuna rastlanmazken, patelladaki yıkımlanma oranı negatife yakın bulundu. Sol femurla kıyaslandığında lezyonlu kemikteki bütünlük değişimi, osteomyelit oluşumunun kemikteki yaygınlığı hafif şiddette bulundu. Diğer radyogram bulgularının şiddeti ise orta dereceli idi. Bu grubun skoru 45 ve azalma oranı ise Kontrol Grubu ile kıyaslandığında % 52.6 idi (Çizelge 4.3).

**Çizelge 4.3.** Bütün olgularda radyogram bulgularının gruplara göre derecelendirilmesi.  
Bulguların Derecelendirilmesi: Yok (---), minimum (+), orta (++), şiddetli (+++)

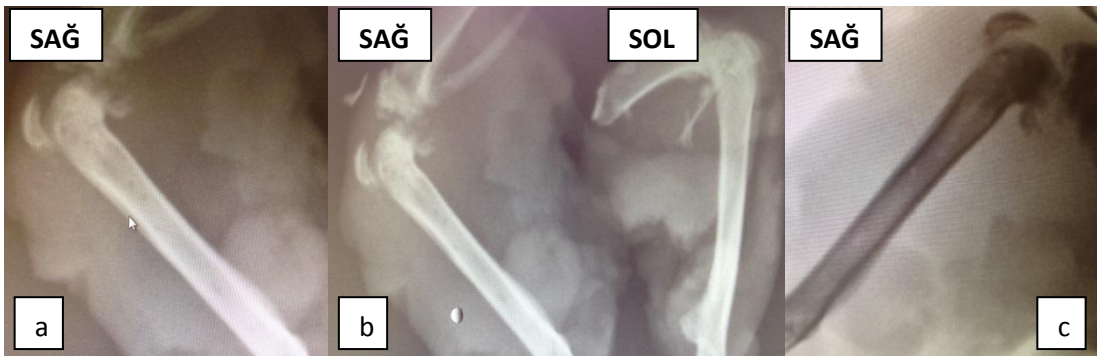
KONTROL GRUBU								
RADYOGRAM BULGULARI	09	10	11	12	13	14	15	16
Kemik bütünlüğünde değişim (Sol femurla kıyas)	+	++	+	++	+++	++	++	++
Fokal radyolüsent alanlar	++	+++	++	+++	+++	++	+++	+++
Fokal opasitenin yaygınlığı	+	++	+	+++	+++	++	+++	++
Osteomyelit oluşumunun kemikteki yaygınlığı	+	+	+	++	+++	+	+++	++
Kemik korteks yıkımlanması	++	+++	+	+++	++	+++	+++	+++
Patelladaki yıkımlanma oranı	+	+	+	+	+	++	---	+
TEDAVİ GRUBU								
RADYOGRAM BULGULARI	01	02	03	04	05	06	07	08
Kemik bütünlüğünde değişim (Sol femurla kıyas)	+	+	+	+	---	---	---	++
Fokal radyolüsent alanlar	+	+	+	+	+	+	+	+
Fokal opasitenin yaygınlığı	++	++	++	+	+	+	+	++
Osteomyelit oluşumunun kemikteki yaygınlığı	+	+	+	+	+	+	+	+
Kemik korteks yıkımlanması	+	++	++	++	++	++	+	+
Patelladaki yıkımlanma oranı	+	+	---	+	---	---	---	+
KORUYUCU GRUBU								
RADYOGRAM BULGULARI	17	18	19	20	21	22	23	24
Kemik bütünlüğünde değişim (Sol femurla kıyas)	---	+	+	---	+	---	---	---
Fokal radyolüsent alanlar	++	++	+	++	++	++	+	+
Fokal opasitenin yaygınlığı	+	++	++	+	+	+	+	+
Osteomyelit oluşumunun kemikteki yaygınlığı	+	+	+	+	+	+	+	+
Kemik korteks yıkımlanması	+	+	++	+	+	+	+	+
Patelladaki yıkımlanma oranı	---	---	+	---	+	---	---	---



**Şekil 4.2.** Kontrol, Tedavi ve Koruyucu Grupta osteomyelitin diafiz boyunca yaygınlığını gösteren radyogram örnekleri. Kontrol Grubunda lezyon bütün diafizi kaplamışken (A), diğer gruplarda lezyonlar distal üçtebir bölgede sınırlı kalmıştır (B). Ayrıca Kontrol kemikte kalınlaşma mevcuttur.



**Şekil 4.3.** Kontrol, Tedavi ve Koruyucu Grupta osteomyelitin distal bölgedeki yaygınlığını gösteren radyogramlar. Kontrol Grubunda radyolüsent alanların yaygınlığı (A), kemikteki kalınlaşma (B) ve patelladaki hafif yıkımlanma (C) dikkati çekerken, diğer gruplarda lezyonlar daha hafif ve kemik bütünlüğü normale yakın görülmektedir. Ayrıca Koruyucu Gruptaki kemikte korteks bütünlük arz etmektedir.

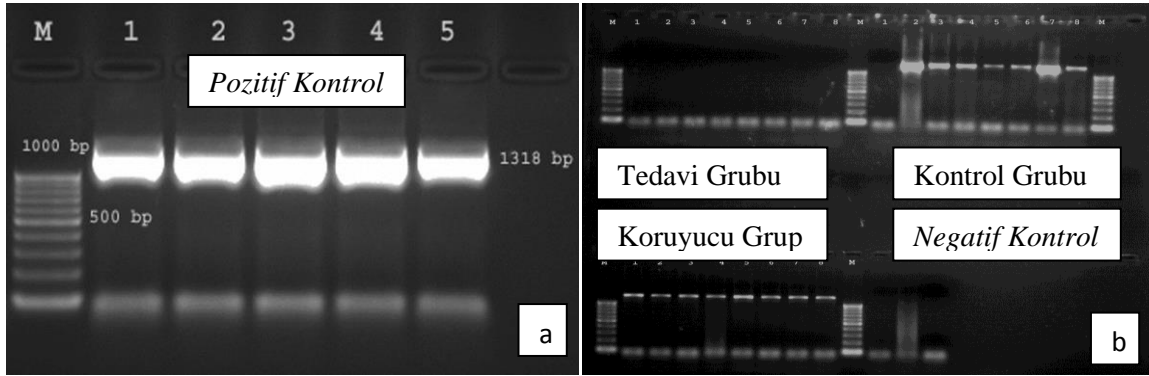


**Şekil 4.4.** Kontrol Grubu olgularından tipik birinin pozitif (a), simetrik (b) ve negatif (c) görünümü. Sol kemikle kıyaslandığında kemiğin kalınlaştığı ve deforme olduğu gözlenmektedir.

Radyografik bulguların istatistiksel değerlendirilmesinde; Kontrol Grubunun radyogram bulguları diğer gruplarla kıyaslandığında her ikisinde de istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $P < 0.05$ ). Ancak ozon verilen gruplar birbiriyle karşılaştırıldığında ise istatistiksel olarak anlamsız bir durum ortaya çıktı (Çizelge 4.6).

### 4.3. Mikrobiyolojik Bulgular

İlk 24 saatte üreme olmaması nedeniyle inkübasyon süresi 48 ve 72 saate kadar uzatıldı. Ancak 72 saatlik sürenin sonunda da yapılan ekimler neticesinde herhangi bir bakteriyel üreme olmadı. Yapılan PCR çalışmaları sonucunda, hayvanlara verilen etken süspansiyonundan yapılan analizlerde süspansiyon ile verilen *Staphylococcus aureus* suşları teyit edildi (Şekil 4.5a). Yapılan klasik kültür yöntemiyle hayvanlardan alınan swap örneklerinin hiç birinden üreme olmadı. Tüm swap örneklerinden yapılan PCR analizlerinde ise; Tedavi Grubunda bulunan örneklerin hiçbirinde spesifik bantlara rastlanamazken, Kontrol Grubunda bir vaka örneği hariç diğerlerinin hepsinde ve Koruyucu Grupta ise olguların tümünde *Staphylococcus aureus* spesifik bantları belirlendi. Yani Tedavi Grubunda pozitiflik saptanamazken, Kontrol Grubunda yedi olguda ve Koruyucu Grupta ise sekiz olguda pozitiflik saptandı. Ancak Koruyucu Grupta tespit edilen tüm bantlar oldukça zayıf (ince iken; Tedavi Grubunun örneklerinden 3'ü zayıf (% 37.5), 2'si orta derece (% 25) ve 2'si de (% 25) şiddetli (kalın bant) idi (Şekil 4.5b).



**Şekil 4.5.** Deneysel amaçlı hayvanlara verilen bakteri süspansiyon sıvılarından yapılan PCR analizlerinden elde edilen *Staphylococcus aureus* spesifik PCR bantları (1318 base pair, bp) (a). Hayvanlardan alınan swap örneklerinden yapılan *Staphylococcus aureus* spesifik PCR analiz sonuçları (b).

### 4.4. Histopatolojik Bulgular

#### 4.4.1. Referans grubu

Referans grubundaki (sol femurlar) kemik dokusu ışık mikroskopunda normal olarak izlendi ve mikrofotografaları histolojik olarak görüntülendi (Şekil 4.6). Herhangi bir yangı ve enfeksiyon gibi patolojik bulguya rastlanmadı (Çizelge 4.4).

#### 4.4.2. Kontrol Grubu

Medikal ozon tedavisi uygulanmayan Kontrol Grubundaki kemiklerin histopatolojik incelemesinde; nötrofil lökosit artışı, nekroz, kanama ve bağdoku üremesi grubun bütün bireylerinde değişik oranlarda gözlemlendi. Kanama ve nekrozun bütün bireylerde görüldüğü tek grup bu idi (Çizelge 4.4). Grup ortalamaları dikkate alındığında; şiddetli derecede kanama ve nekroz alanlarının gözlemlendiği söylenebilir. Ayrıca çok sayıda nötrofil lökosit kümelenmesinden oluşan intramedüller apse oluşumları dikkati çekti (Şekil 4.7). Yangısal hücrelerden makrofajlara, az sayıda lenfositlere ve yer yer bağ doku hücre üremelerine rastlandı (Şekil 4.8). Koruyucu ve Tedavi Grupları ile kıyaslandığında; derece olarak yangı bulguları Kontrol Grubunda en şiddetli olarak gözlemlendi (Çizelge 4.5).

**Çizelge 4.4.** Bütün olguların gruplara ve histopatolojik bulgulara göre değerlendirilmesi. Bulguların Derecelendirilmesi: *Yok (---), minimum (+), orta (++)*, *şiddetli (+++)*

KONTROL GRUBU								
HİSTOPATOLOJİK BULGULAR	09	10	11	12	13	14	15	16
Nötrofil Lökosit Artışı	++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++
Bağdoku Üremesi	+	+	+	+	+	+	+	+
Nekroz	+++	++	+++	+++	++	+++	+++	+++
Kanama	+++	+++	++	+++	++	+++	+++	+++
TEDAVİ GRUBU								
HİSTOPATOLOJİK BULGULAR	01	02	03	04	05	06	07	08
Nötrofil Lökosit Artışı	++	++	++	++	++	+	++	++
Bağdoku Üremesi	++	++	++	+	++	++	++	++
Nekroz	---	---	---	---	---	---	---	---
Kanama	+	+	+	+	+	+	+	+
KORUYUCU GRUP								
HİSTOPATOLOJİK BULGULAR	17	18	19	20	21	22	23	24
Nötrofil Lökosit Artışı	+	+	+	+	+	+	+	+
Bağdoku Üremesi	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Nekroz	---	---	---	---	---	---	---	---
Kanama	---	---	---	---	---	---	---	---

**Çizelge 4.5.** Gruplar arası yangının histopatolojik olarak derecelendirilmesi ve histopatolojik bulguların değerlendirilmesi. Bulguların Derecelendirilmesi: *Yok (---), minimum (+), orta (++)*, *şiddetli (+++)*

Yangının Ortalama Derecelendirilmesi				
	Yok	Hafif	Orta	Şiddetli
Referans Grubu (Sol femurlar)	0	-	-	-
Kontrol Grubu (No: 9-16)	-	-	-	+++
Koruyucu Grubu (No: 17-24)	-	+	-	-
Tedavi Grubu (No: 1-8)	-	-	++	-
Histopatolojik Bulguların Değerlendirilmesi				
Gruplar	Nötrofil Lökosit Artışı	Bağdoku Üremesi	Nekroz	Kanama
Referans Grubu (sol femurlar)	---	---	---	---
Kontrol Grubu (No: 9-16)	+++	+	+++	+++
Tedavi Grubu (No: 1-8)	++	++	---	+
Koruyucu Grup (No: 17-24)	+	+++	---	---

#### 4.4.3. Tedavi Grubu

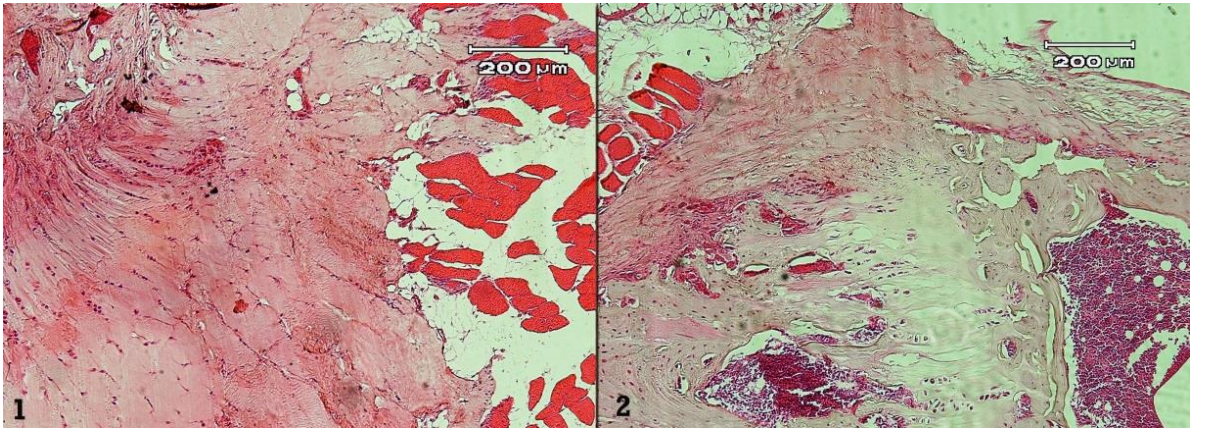
Yangının derecesi açısından histopatolojik olarak değerlendirildiğinde, Tedavi Grubunda orta derecede yangı ve enfeksiyon bulguları ortalamasına rastlandı. Yine osteomyelit oluşturulduktan sonra medikal ozon uygulanan Tedavi Grubunda, nötrofil lökosit yoğunluğunun azaldığı (orta derece) dikkati çekti. Hemen hemen hiç nekrotik kemik dokusuna rastlanmadı. Yine orta derecede bağ doku üremesi gözlemlenirken (Çizelge 4.5), yer yer (hafif derece) kanama odaklarına rastlandı (Şekil 4.9). Grup bireysel olarak değerlendirildiğinde diğer lezyonlar değişik oranlarda görülürken, hiçbir bireyde nekroz bulgusuna rastlanmadı (Çizelge 4.4)

#### 4.4.4. Koruyucu Grup

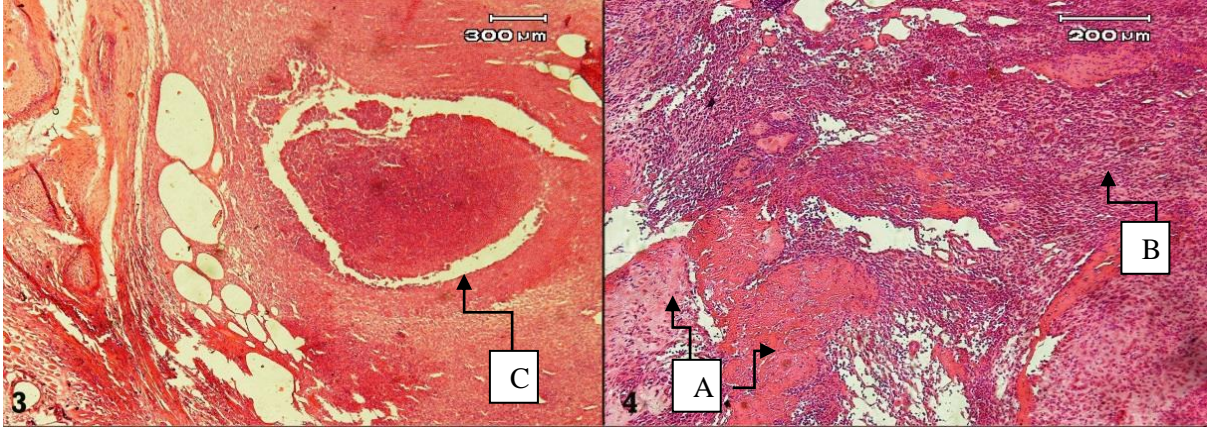
Koruyucu Grupta ortalama olarak hafif derecede yangı bulguları gözlemlendi. Önceden ozon verilen Koruyucu Grubun histopatolojik incelemesinde; nötrofil lökositlerin yoğunluğunda belirgin azalma (hafif derece) gözlenirken, aksine şiddetli bağdoku üremesi (Şekil 4.10) görüldü (Çizelge 4.5). Diğer patolojik bulgular grubun bütün olgularında gözlenirken, kanama ve nekroz alanlarına hiçbir bireyde rastlanmadı (Çizelge 4.4).

Histopatolojik bulgular istatistiksel olarak değerlendirildiğinde ise; ozon kullanılmayan grubun bulguları ozon kullanılan her iki gruptan da istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $P < 0.05$ ). Yine Koruyucu ve Tedavi Grupları birbiriyle kıyaslandığında da iki grup arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı ( $P < 0.05$ ) idi (Çizelge 4.6).

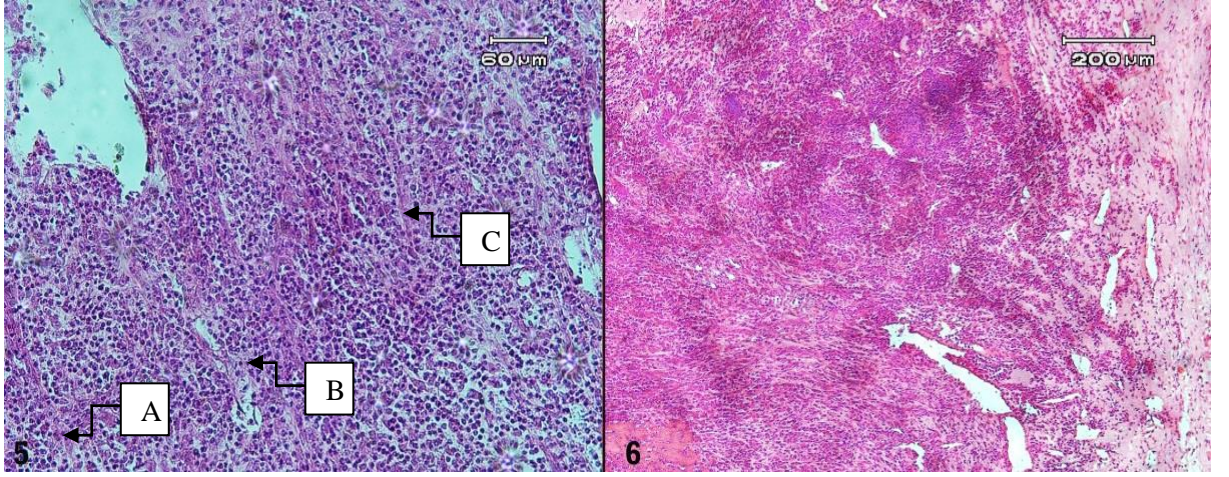
Ozon verilen gruplardaki (Tedavi ve Koruyucu) istatistiksel bulguların; histopatolojik olarak yangı kriterlerine yansıdığı, radyografik bulgulara ise yansımadığı tespit edildi.



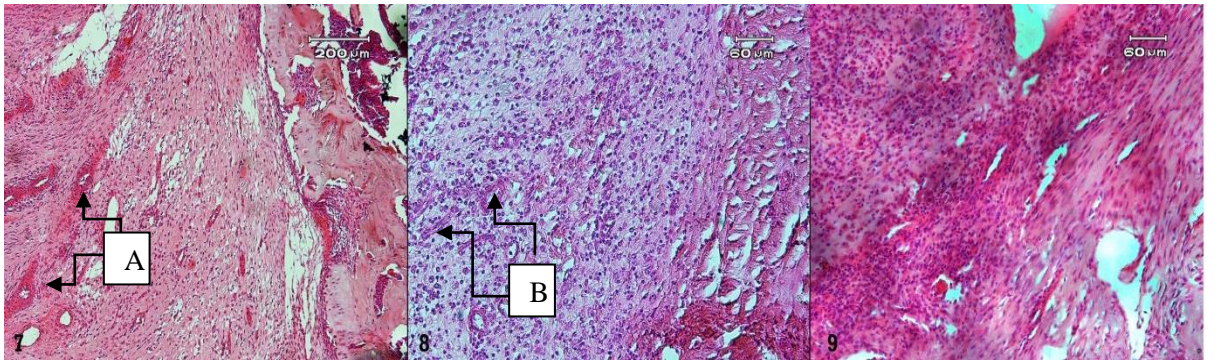
Şekil 4.6. Referans Grubunda histolojik olarak normal kemik dokusunun görünümü (H&EX200).



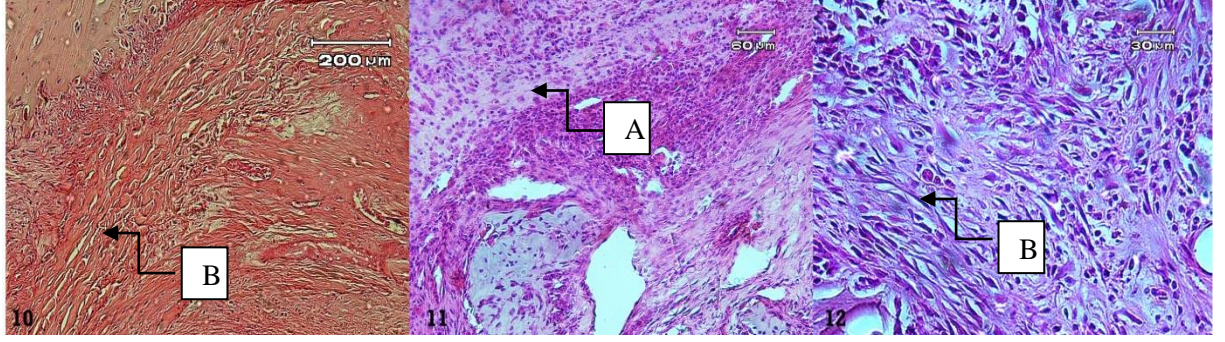
**Şekil 4.7.** Kontrol Grubuna ait kemiklerin histopatolojik incelemesinde geniş kırmızı renkli kanama ve açık pembe renkli nekroz alanlarının (A), çok sayıda mor renkli nötrofil lökosit kümelenmesinin (B) ve buna bağlı oluşan intramedüller apse (C) oluşumunun görünümü (Sırasıyla H&EX300 ve H&EX200).



**Şekil 4.8.** Yine Kontrol Grubunda yangısal hücrelerden pembe stoplazmalı makrofajlar (A), az sayıda düzgün çekirdekli lenfositler (B) ve yer yer genç olgunlaşmamış iplikli bağ doku (fibroblast) hücre üremelerinin (C) görünümü (Sırasıyla H&EX60 ve H&EX200).



**Şekil 4.9.** Tedavi Grubunun histopatolojik görünümleri. Kanama azalarak hiperemik damarlar ortaya çıkmış (A). Yangısal hücre (nötrofil lökosit) yoğunluğu Kontrol Grubuna göre azalmış ve bağ dokusu hücreleri artmıştır (B). Ancak Tedavi Grubunda nekrotik kemik dokusu gözlenmedi (Sırasıyla H&EX200, H&EX60 ve H&EX60).



**Şekil 4.10.** Koruyucu Grubun histopatolojik görünümleri. Nötrofil lökositlerin yoğunluğunda çok belirgin azalma gözlenirken (A), fibroblastik üremelerde şiddetli artış dikkati çekmektedir. Öyleki olgunlaşmış bağ doku hücreleri (fibrositler) mekik şeklinde görülmektedir (B). Bu grupta kanama ve nekroz alanlarına rastlanmadı (Sırasıyla H&EX200, H&EX60 ve H&EX30).

**Çizelge 4.6.** Radyografik ve histopatolojik bulguların nonparametrik istatistik analizleri. Üçlü grup arası karşılaştırmalar \*Kruskal Wallis Testi ve ikili grup karşılaştırmaları ise \*\*Mann Whitney U Testi ile yapıldı.

Gruplar	Olgu	Radyografik Bulgular		Histopatolojik Bulgular		
		Median	P	Median	P	
Kontrol Grubu	09	+	1**	0.001*	0.002**	0.000*
	10	++				
	11	+				
	12	+++				
	13	+++				
	14	++				
	15	+++				
	16	++				
Tedavi Grubu	01	+	1**	0.001*	0.002**	0.000*
	02	+				
	03	+				
	04	+				
	05	+				
	06	+				
	07	+				
	08	+				
Koruyucu Grup	17	+	1**	0.001*	0.002**	0.000*
	18	+				
	19	+				
	20	+				
	21	+				
	22	+				
	23	+				
	24	+				



## 5. TARTIŞMA

Osteomyelitli hastalardan en yaygın olarak izole edilen patojenler; methicillin, cephalothin, lincomycin, kanamycin, chloramphenicol ve vancomycine duyarlı ancak penicillin, tetracycline, erythromycin ve streptomycine dirençli olan *Staphylococcus aureus*' dur (Norden 1970, Shirliff ve ark. 2001). Ortopedi alanında *Staphylococcus aureus* etkeninin neden olduğu kemik enfeksiyonu önemli bir problemdir. Antibiyotiklere karşı direncinin sürekli artması, hem yeni antibiyotiklere yönelmeyi hem de uygun modellerde yeni deneysel çalışmaların yapılmasını zorunlu kılmaktadır (Oğuz ve ark. 2011). Stafilokok türlerinin genellikle % 40-50 oranında monomikrobiyal kemik enfeksiyonuna (Arıcan 2012) yol açması da düşünüldüğünde, bu durum etkenin tercih nedenini belirlemiş ve medikal ozonun alternatif bir sağıltım seçeneğı olarak kullanılmasını anlaşılır kılmıştır.

Osteomyelitisin tedavisi oldukça zor olup, kompleks ve multidisipliner bir yaklaşım gerektirir. Cerrahi debridman ve antibiyotik uygulaması başlıca tedavi seçenekleri olmasına rağmen, sağıltım uzun zaman alır ve yan etkilerinin oluşması mümkündür. Yine yangı bölgesinin kanla beslenememesi, hipoksi ve doku iskemisi tedavideki başarısızlığın en önemli nedenleridir. Son zamanlarda debridmanı takiben antibiyotik salınımı yapan polimetilmetakrilat petlerinin bölgeye yerleştirilmesi ve inhalasyon şeklinde hiperbarik oksijen (HBO) uygulamasıyla da iyi sonuçlar alınmış olsa da, osteomyelit tamamen çözülebilmiş değildir (Oğuz ve ark. 2011). Bu yüzden sunulan araştırmada alternatif ve ek bir sağıltım olabileceğı düşünülen medikal ozon kullanıldı. Kaldı ki, Oğuz ve ark. (2011) yaptıkları çalışmada medikal ozonun osteomyelit sağıltımında HBO uygulamasından daha etkili olduğunu ancak ikisinin birlikte kullanılması adjuvant tedavi açısından sinerjik etki oluşturduğunu belirtmiştir.

Antibiyotiklerin keşfinden sonra akut osteomyelitten kaynaklanan mortalite oranı azalmıştır. Buna rağmen kemoterapi her derde deva olarak görülmemektedir. Bazen antibiyotik sağıltımına rağmen %15-30'lara varan kronik osteomyelit şekillenebilmektedir. Enfeksiyonla sonuçlanan kemik travma ve operasyonları da kronik osteomyelite neden olabilir (Norden 1970). Akut faz osteomyelitinin günümüz standart tedavi metodu parenteral antibiyotiktir. Bu problemler yalnız oral antibiyotik uygulamasıyla hafifletilebilir. Debridman ve 4-6 hafta süren parenteral antibiyotik iyileşmenin köşe taşlarını oluşturur (Shirliff ve ark. 2001, Steinhart ve ark. 1999). Ancak bunun sekonder enfeksiyon, hasta

uyumsuzluğu ve yüksek fiyatlı olması gibi negatif etkileri vardır. Ayrıca organizmanın antibiyotiklere karşı sürekli artan direnç kazanması alternatifler üzerinde çalışmayı gerektirmektedir. Zaten bu çalışmayla da standart tedaviye tamamlayıcı ve alternatif olarak medikal ozonun koruyucu ve tedavi edici etkilerinin olup olmadığı araştırılmıştır.

Keşfinden sonraki ilk yıllarda dezenfeksiyon amacıyla kullanılırken, yıllar içerisinde yapılan çalışmalar ozonun medikal kullanımını gündeme getirmiştir. Ozon tedavisi belirli bir miktarda ozon - oksijen karışımının vücut boşluklarına ya da dolaşım sistemine uygulanması olarak özetlenebilir. Ozon - oksijen gaz karışımı intravenöz, subkutan ve intramuskuler kullanım dışında; intraartiküler (Yu ve ark. 2011), intraperitoneal (Souza ve ark. 2010), rektal (Calunga ve ark. 2005), intradiskal (Han ve ark. 2007) ve topikal de (Travalgi ve ark. 2010) uygulanabilir. Ozon uygulaması esnasında oksidatif stres ve lipid oksidasyonu sonucu oluşan hidrojen peroksit ikincil haberci gibi davranarak ozon tedavisinin biyolojik etkilerine aracılık eder. Tekrarlayan ozon uygulamaları sonucunda antioksidan sistem uyarılarak oksidatif strese karşı direnç gelişir. Ayrıca hücre membranında bulunan yağ asitlerinin oksidasyonuna bağlı olarak çeşitli sitokin düzeyleri de artar. Ozon tedavisi özellikle inflamatuvar sürecin yoğun olarak yaşandığı ve immün sistemin ön planda yer aldığı fizyopatolojik durumlarda yardımcı tedavi yöntemi olarak kullanılmaktadır (Altman 1996, Bocci 1994, Bocci ve ark. 2011a, Gerard ve Sunnen 1996, Özler ve ark. 2009). Medikal ozonun *Staphylococcus aureus* etkenine karşı etkin olması, canlıda savunma sistemini harekete geçirmesi ve oksijenizasyon etkisi birlikte düşünüldüğünde; bu faktörlerin birlikte sinerjik etki yaptığı, yangılı dokulara iyi penetre olduğu ve enfeksiyonu azalttığı düşünülebilir.

Günümüzde, medikal ozon güçlü antibakteriyel (Shinozuka ve ark. 2008), antiviral (Roy ve ark. 1981), antifungal (Geweely 2006), immünomodülatör, detoksifikasyon ve güçlü oksijenizasyon etkisi ile hızlı ve etkili yara iyileştirici özellikleri sayesinde; cerrahi (Calunga ve ark. 2005), iç hastalıkları (Tylicki ve ark. 2004), doğum ve jinekoloji (Ogata 2000), dermatoloji (Kim ve ark. 2009), diş hekimliği (Saini 2011), onkoloji (Clavo ve ark. 2004a) ve enfeksiyöz hastalıklar (Souza ve ark. 2010) gibi alanlarda çok geniş bir kullanım imkânı bulmuştur (Güven ve ark. 2008). Bu amaçla dünyada ve ülkemizde tonlarca antibakteriyel, antifungal, antiparaziter, antiviral, antienflamatuvar ve diğer destek tedavi ilaçlarının kullanıldığı göz önünde bulundurulursa; ozonterapi gibi zararsız ve ucuz bir tedavinin ülke ekonomisine katkı sağlayacağı yadsınmaz. Zira ozonun tek başına ya da tamamlayıcı ajan olarak kullanılması; adı geçen ilaçların dozunun ve miktarının azalmasına katkıda bulunacak ve yan etkilerini de minimuma düşürecektir.

Medikal ozon deneysel olarak kullanılan laboratuvar hayvanlarının dışında; köpeklerde (*Han ve ark. 2007*), sığırlarda (*Ogata ve Nagahata 2000*) ve atlarda (*Alvarenga ve ark. 2009*) da çalışılmış ve pozitif sonuçlar alınmıştır. Yapılan literatür taramada; özellikle 2000’li yılların başında ve ondan sonraki yıllarda deney hayvanlarındaki çalışmalar çığ gibi büyümüş ve beşeri hekimlikte de klinik uygulamalar bir hayli artmıştır. Ancak çiftlik ve pet hayvanlarında yeterince klinik uygulama yapılmamıştır. Bu çalışma da göstermiştir ki, yapılan bilimsel çalışmalar artırılmalı, tıbbi ozon bu hayvanlarda da daha fazla uygulanmalı ve veteriner pratiğinde yaygınlaştırılmalıdır.

Basit uygulama yöntemleri, hastalarca iyi tolere edilmesi, hiçbir yan etkisinin olmaması ve düşük maliyeti ozon tedavisini uygun, pratik, güvenli ve etkili kılmaktadır. Ozonterapi tek başına veya diğer tedavi yöntemlerine ek olarak (tamamlayıcı) etkinliklerini artırmak amacıyla kullanılabilir. Ozon uygulamaları sonucunda oluşması beklenen ROT ve LOP’in terapötik etki gösterebilmesi için belli bir konsantrasyonda olması gerekir. Yapılan çalışmalarda ozonun terapötik konsantrasyonu 10–80 µg/ml olarak belirlenmiştir. Bu ozon konsantrasyonu Rice-Evans’ın tarif ettiği (*Özler ve ark. 2009*) total antioksidan kapasiteyi % 25’den fazla düşürmediği gibi, azalan antioksidanlar 20 dakika sonra eski haline gelmektedir. Ayrıca, aynı oranların gerek eritrosit gerekse lökosit fonksiyonları üzerinde de olumsuz etkisinin bulunmadığı bildirilmektedir (*Bocci 1994, Bocci ve ark. 2011a, Özler ve ark. 2009*).

Ozonun; peritonitisler, purulent ve iyileşmeyen yaralar, dekübitisler, termik travmalar, yıkımlayıcı akciğer ve pleura hastalıkları, artropatiler, arterioskleroz, diyabetes mellitus komplikasyonları, pankreatitler, tümöral oluşumlar, göz hastalıkları, diş hekimliği, ortopedik hastalıklar, deri hastalıkları ve lumbal disk hernilerinin sağaltımı gibi birçok kullanım alanı vardır (*Bocci 1999, Güven ve ark. 2008, Han ve ark. 2007, Souza ve ark. 2010, Travalgi ve ark. 2010, Vigna ve Menéndez-Cepero 2007*). Belirtilen temel etkileri sayesinde ozonun; enfeksiyöz, dejeneratif, immun depresan, vasküler ve ortopedik bozukluklarla sonuçlanan pek çok hastalığın sağaltımında uygulama alanı bulduğu söylenebilir.

Klinik görünümünün ve patofizyolojisinin değişikliğinden dolayı, osteomyeliti klinik olarak değerlendirmek oldukça zordur. *Patel ve ark (2009)* yaptığı çalışmada ideal bir osteomyelit modelinin olmadığını bildirmiştir. Bu yüzden de in vivo deneysel çalışmalarda değişik hayvan ve çalışma modelleri oluşturulmuştur (*Patel ve ark. 2009*). *Norden (1970)* yaptığı çalışmada osteomyelit oluşturma amaçlı enjeksiyondan bir hafta sonra bacakların diz bölgesinde hafifçe şişmeye başladığını ve 2-3 hafta sonra da distal metafizde

genişlemenin olduğunu belirtmiştir. Yapılan çalışmada da elde edilen lokal klinik bulgular bu çalışmayla uygunluk göstermiştir. Kontrol, Tedavi ve Koruyucu Gruplar klinik olarak birlikte değerlendirildiğinde; Tedavi ve Koruyucu Grubun Kontrol Grubuna göre kısmen iyi olduğu gözlemlendi ancak belirgin bir fark saptanamadı (Çizelge 4.2). Klinik olarak gruplar arasında gözle görülür bir farkın gözlenmediğini söylemek daha doğru bir ifade olabilir.

Radyografik değerlendirmede; Kontrol Grubu ile diğer gruplar arasında farklılıklar gözlemlendi. Radyogram bulguları Kontrol Grubunda genelde orta - şiddetli bulunurken, Tedavi ve Koruyucu Grubunda hafif - orta şiddette tespit edildi. Medikal ozon verilen gruplar birbiriyle kıyaslandığında radyografik olarak pek fark gözlenmedi (Çizelge 4.3). Yapılan istatistiksel analiz de göstermiştir ki; Kontrol Grubu ile diğer gruplar arasındaki fark önemli ( $P < 0.05$ ) ve Tedavi Grubu ile Koruyucu Grup arasındaki fark ise önemsizdi (Çizelge 4.6). Kemik distal shaftında fokal opasiteler ve radyolüsent alanlar, kemik korteksinde bozulma, kemik shaftında kalınlaşma ve deformasyon, kısmi patellar hasarlar ve osteomyelitin değişik oranlarda yayılması gibi başlıca radyografik bulgular grupların hepsinde gözlemlendi (Şekil 4.2, 4.3, 4.4). *Shirliff ve ark. (2001)* belirgin röntgen bulgularının enfeksiyonu takiben en az 2 hafta sonra görüldüğünü ve ayrıca bir ay arayla iki kez röntgen çekmelerine rağmen belirgin bir fark gözlemleyemediklerini bildirmişlerdir. Sunulan çalışma mikrop enjeksiyonunu takiben iki hafta içinde sonlandırılmasına rağmen, dijital röntgenin kullanılması ve görüntülerin büyütülerek yakından inceleme olanağından dolayı gruplar arası radyografik farkların tespiti mümkün olabilmektedir.

Swap örnekleri almak için suprakondiler femur bölgesi kesilirken; hem Tedavi hem de Koruyucu Gruba ait kemiklerin makasa karşı ciddi bir direnç göstermesi ve Kontrol Grubunun ise çok az direnç göstermesi araştırmacılar tarafından ilgi çekici bulundu. Burada Kontrol Grubundaki kemiklerde histopatolojik olarak geniş yangı, nekroz ve apse odaklarının (Şekil 4.7) saptanması; kemiğin radyografik olarak kalınlaşmasına, deforme olmasına (Şekil 4.4) ve kemik korteksinin direncinin azalmasına bağlanabilir. Çünkü ozon uygulanan gruplarda patolojik bulguların azalması (Şekil 4.9 ve 4.10) yangıya karşı pozitif etkilerinden dolayı kemiklerin direnç kazanmasına yol açmıştır.

Klasik mikrobiyolojik ekimlerin hiçbirisinde üreme olmadığı için, Gruplar arasında hiçbir farklılık ortaya konamadı. Bu yüzden PCR uygulamasına gereksinim duyuldu (Şekil 4.5). Gruplar arasındaki farklılığı mikrobiyolojik olarak ancak PCR ortaya koyabildi. Fakat bakteri plaklarının (bantlar) Tedavi Grubunun tüm bireylerinde negatif çıkarken, diğer gruplarda bir denek hariç hepsinde pozitif çıkması; radyografik ve histopatolojik bulgular ile uyumluluk sağlamadı. Bu durum ortamda yıkılanmış dokuların çokluğu ve

örnekleme yapılan bölge ile ilişkili olabilir. Hem belirtilen bu neden hem de PCR'ın kantite açısından bakteri yoğunluğunu değerlendirememesi; sunulan çalışmaya ayrıcalık ve farkındalık katmamıştır. Ancak Kontrol Grubunun % 50'sinde defektif bakteri hücrelerine ait bantların orta ve ileri derecede şiddetli olması (kalın bant), bu Grupta ölü mikroorgaizmaların hala yoğun olduğunu ve henüz elimine edilemediğini açıkça göstermiştir (Şekil 4.5b). Yine Tedavi Grubunda defektli hücreler tamamen elimine edilirken, Koruyucu Grupta az da kalsa bütün bireylerinden tamamen elimine edilememesi araştırmacılar tarafından ilginç bulunmuştur. Bu durum tıbbi ozonun Koruyucu Grupta immunmodulator ve Tedavi Grubunda ise immunaktivator olarak davranmış olabileceğini düşündürmüştür.

Gruplar arasındaki esas belirleyici ve ayırıcı farklılıklar histopatolojik incelemeler sonucunda ortaya çıkmıştır. Zira bütün gruplar birbirleriyle karşılaştırıldığında farklar istatistiksel olarak önemli bulundu ( $P < 0.05$ ). Ancak medikal ozon verilen gruplar açısından bakıldığında; histopatolojik bulgular radyogram bulguları ile tam uyum göstermezken mikrobiyolojik bulgular ile biraz uyumsuzluk gösterdi.

Keşfinden sonraki ilk yıllarda en önemli antiseptiklerden biri olan ozonun bu etkisi güçlü okside edici özelliğinden kaynaklanmaktadır. Etkisini virüsler ve bakteriler dâhil tüm mikroorganizmalar üzerine gösterir ve bunlara ait toksinleri okside eder (*Bocci ve ark. 2004, Saini 2011*). Medikal ozonun intraartiküler enjeksiyonu; başta diz ve omuz eklemi olmak üzere akut ve kronik ağrılı tüm eklem rahatsızlıklarında tedavi yöntemi olarak kullanılmıştır (*Viebahn-Haensler 2005*). Ayrıca antibiyotiklere karşı gelişen direnç ve antibiyotiklerin enfeksiyon bölgesine yeterince penetre olamaması gibi sebepler göz önünde bulundurulduğunda, sağaltımı oldukça güç bir hastalık olarak görülen osteomyelitin tedavisinde de medikal ozon uygulamaları ile başarılı sonuçlar alınmıştır (*Bocci 2006a, Bocci 2006b, Lu ve ark. 2010*).

Bu deneysel çalışmada, *Staphylococcus aureus* bakterisinin femura intramedullar yolla verilmesi ile ratlarda osteomyelitis oluşturuldu ve tedavisinde medikal ozonun etkinliği araştırıldı. Herhangi bir tedavi görmeyen osteomyelitisli grupta (Kontrol Grubu) yoğun nötrofil lökosit toplanmalarından (Şekil 4.8) oluşan intramedüller apse oluşumu ile kemikte geniş kanama ve nekroz alanları (Şekil 4.7) gözlemlendi. Diğer çalışma gruplarında ise osteomyelitisin tedavisi için farklı zamanlarda medikal ozon ratlara verildi. Her iki grupta da medikal ozonun osteomyelitiste oluşan yangısal reaksiyonu azalttığı gözlemlendi (Çizelge 4.4 ve 4.5). Tedavi ve Koruyucu Grup birbiriyle kıyaslandığında ise yangı ve

enfeksiyon azalması Tedavi Grubunda (Şekil 4.9) diğerine göre (Şekil 4.10) daha düşük idi.

Ancak bir hafta öncesinden medikal ozon verilmeye başlanan ve sonrasında deneysel osteomyelit oluşturulan grupta (Koruyucu Grup); deneysel mikrop enjeksiyonundan 4 gün sonra medikal ozon tedavisi yapılan gruba (Tedavi Grubu) kıyasla iyileşme sürecinin daha hızlı şekillendiği, ortamda yangısal hücrelerin yerine proliferen olan fibroblastik üremelerin daha yoğun gözlenmesi ile gösterildi. Koruyucu Grupta, nötrofil lökositler yerini büyük oranda bağ dokusu hücrelerinden oluşan üremelere bırakmıştır. Tedavi Grubunda da nötrofil lökosit yoğunluğunda Kontrol Grubuna kıyasla azalma dikkat çekiciydi (Çizelge 4.4 ve Resim 4.7, 4.8, 4.9, 4.10).

Bağ dokusu hücrelerindeki bu artış ile bakteriye karşı gelişen yangısal reaksiyonun gerilediğini ve onun yerine reperasyon faaliyetinin başladığını düşündürdü. Böylece bakteriyel enfeksiyona karşı birincil yanıt olarak gelişen başta nötrofil lökositler olmak üzere diğer yangısal hücrelerin yoğunluğundaki azalma; medikal ozonun daha önceki çalışmalarda da bildirildiği gibi (*Martínez-Sánchez ve ark. 2005, Muto ve ark. 2008, Gülmen ve ark. 2013, Tasdemir ve ark. 2013*) enfeksiyöz hastalıklara karşı tedavi edici ve koruyucu etkisinin olduğu kanıtlanmış oldu (Resim 4.10).

Özellikle medikal ozon kullanılan gruplar incelendiğinde; Tedavi Grubunda yangısal hücrelerin azaldığı, kanamanın minimuma düştüğü ve nekrozun bütün bireylerde ortadan kalktığı dikkati çekti. Koruyucu Grup değerlendirildiğinde ise yangısal hücrelerin daha da azaldığı, kanama ve nekrozun ise tamamen ortadan kalktığı gözlemlendi. Kemik dokusunda izlenen nekrotik ve hemorajik değişikliklerin medikal ozon tedavisi ile minimum düzeye inmesi ve hatta tamamen ortadan kalkması medikal ozonun membran permeabilitesi ve hücresel hasardan sorumlu olan reaktif oksijen radikallerinin (*Elvis and Ekta 2011, Viebahn-Haensler 2005*) oluşumunu azalttığı yani oksidatif ve histopatolojik hasarı önlediği kanısına varıldı. Ayrıca medikal ozonun güçlü antibakteriyel (*Shinozuka ve ark. 2008*), immunmodülatör (*Ohtsuka ve ark. 2006*), antiinflamatuar (*Tylicki ve ark. 2004*), oksidasyon (*Calunga ve ark. 2005*) ve oksijenizasyon (*Clavo ve ark. 2004a*) etkileri de göz önünde bulundurulduğunda; sonuç oldukça çarpıcı görüldü. Hatta nekrozun yanısıra kanamanın da bütün bireylerde ortadan kalkması ozonun koruyucu etkisini daha da öne çıkarmıştır (Çizelge 4.4).

Yapılan çalışmada, sağ femur medullarından alınan swap örneklerinin klasik kültür yöntemi kullanılarak yapılan mikrobiyolojik incelemeleri sonucunda, hemen hemen hiçbir örnekte izolasyon olmadı ve dolayısıyla da gruplar arasında hiçbir fark görülmedi.

Klasik kültür yöntemi kullanarak ilik örneklerinden yapılan ekimler sonucu üremenin olmaması; yangı kimyasalları ya da yangı hücreleri tarafından fagosite edilmiş olan etkenlerin üreyemediğini ve bu yolla bakteriyolojik üremenin baskılandığını düşündürdü. Benzeri bir durum özellikle *Staphylococcus aureus* kökenli mastitislerde daha önce bildirilmiştir. Bu örneklerde PCR kullanımı ya da farklı kültür öncesi bazı işlemlerden geçirilerek kültürlerin yapılması önerilmiştir (*Phuertes ve ark. 2001, Godden ve ark. 2002*). Ancak PCR analizlerinde; Tedavi Grubunda hiç pozitiflik saptanamazken, Kontrol Grubunda yedi olguda ve Koruyucu Grupta ise sekiz olguda pozitiflik saptandı (Şekil 4.5b). PCR analizlerinde medikal ozon uygulanan gruplarda pozitiflik dikkate alındığında; Tedavi Grubunda hemen hemen bütün mikroorganizmaların bölgeden elimine edildiği ve Koruyucu Gruptaki etkenlerin büyük oranda elimine edildiği ancak düşük yoğunlukta da olsa hala var olduğu düşünülebilir. Medikal ozon verilmeyen Kontrol Grubunda ise bakteriyel üremenin engellenmesine rağmen enfeksiyonun ve etkenlerin tam olarak elimine edilemediği ve hatta bazı vakalarda büyük oranda (% 50) mikropların yoğun olduğu söylenebilir.

Medikal ozon; sunulan bu çalışmada atravmatik, biyolojik temelli, ucuz, güvenli ve kolay uygulanabilir bir bilimsel tedavi desteği sunmuştur. Yalnız başına kullanılmasına rağmen hem koruyucu hem de sağaltıcı etkisi görülen ozon; eğer diğer sağaltım seçenekleri ile de birleştirilirse mükemmel bir tamamlayıcı ajan olabileceği, kullanılan diğer ajanların dozlarını düşüreceği, yan etkilerini azaltacağı ve daha ekonomik bir sağaltım seçeneği sunabileceği kanısını araştırmacılar uyandırdı. Ancak medikal ozonun yaygınlaştırılması yanısıra; enfeksiyöz, dejeneratif, immün depresan, vasküler, ortopedik ve diğer bozukluklardaki etki mekanizması yeni bilimsel çalışmalarla iyice aydınlığa kavuşturulmalı ve klinik sonuçları aydınlatılmalıdır. En önemlisi de klinik olgulara uyarlanarak medikal ozon kullanım metodları veteriner pratiğine ivedi olarak aktarılmalıdır.

## 6. SONUÇ

Makroskopik olarak, swap almak üzere kemiklere uygulanan travmada sübjektif olarak medikal ozonun enfekte kemiğe belirgin derecede direnç kazandırdığı gözlemlendi.

Yangının derecesi açısından histopatolojik olarak değerlendirildiğinde; Referans Grubunda yangı hiç görülmezken, Koruyucu Grupta hafif, Tedavi Grubunda orta ve Kontrol Grubunda ise şiddetli yangı ve enfeksiyon bulgularının gözlemlendiği söylenebilir. Yani histopatolojik bakıda, medikal ozon uygulamasının ilgili kemikteki yangı ve enfeksiyon şiddetini her iki uygulama şeklinde de azalttığı saptandı.

Yangı belirtilerinin radyografik açıdan değerlendirmesinde ozon verilen iki grup arasında istatistiksel olarak bir fark bulunmazken, histopatolojik açıdan anlamlı olarak belirlendi. Ancak Kontrol ile diğer gruplar arasındaki radyografik ve histopatolojik bulgular istatistiksel olarak oldukça önemli bulundu ( $P < 0.05$ ).

PCR bulguları, Kontrol Grubundaki bantların şiddetini ortaya koysa da; bu çalışma sonuçları açısından çok değerli ve ayrıcalıklı bir metod olarak görülmedi.

Tedavi Grubunun bütün deneklerinde nekroz görülmezken, Koruyucu Grubun bireylerinde nekrozun yanısıra kanamanın da hiç görülmemesi ilginç bulundu.

Sonuç olarak; ratlarda deneysel olarak oluşturulan osteomyelitte medikal ozonun koruyucu ve tedavi edici etkilerinin bulunduğu kanısına varıldı. Bu iki etki birbiriyle kıyaslandığında, medikal ozonun koruyucu etkisinin tedavi edici etkisinden daha üstün olduğu bu bilimsel çalışmayla ortaya kondu.



## 7. KAYNAKLAR

1. **Altman N.** Ozone: Life-Threatening Pollutant or Powerful Healing Agent? p. 3–12. In: Bio-oxidative Therapies: Oxygen, Ozone and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, , Ed. Evers MHT, **1996**, FAST, Netherlands.
2. **Alvarenga HM, Souza MV, Hincapie JJ, Ribeiro JJI, Vargas VMI.** Behavior of Hematological Variables in Horses Treated with Ozone Therapy. *REDVET*, **2009**, 10 (7): 1-13.
3. **Arıcan M.** *Veteriner Genel Radyoloji ve Kedi, Köpek İçin Tanısal Radyografi Atlası*. Cilt II. Bahçıvanlar Basım ve Sanayi AŞ, Konya, **2012**, s.293-294.
4. **Bette M, Nusing RM, Mutters R, Zamora ZB, Menendez S, Schulz S.** Efficiency of Tazobactam/Piperacillin in Lethal Peritonitis is Enhanced after Preconditioning of Rats with O<sub>3</sub>/O<sub>2</sub>-Pneumoperitoneum. *Shock*, **2006**, 25 (1): 23-29.
5. **Bocci V.** A Reasonable Approach for the Treatment of HIV Infection in the Early Phase with Ozonotherapy (Autohaemotherapy). How 'Inflammatory' Cytokines may have A Therapeutic Role. *Mediators Inflamm*, **1994**, 3 (5): 315-321.
6. **Bocci V.** Biological and Clinical Effects of Ozone. Has Ozone Therapy a Future in Medicine? *British Journal of Biomedical Science*, **1999**, 56: 270–279.
7. **Bocci V.** Ozone as Janus: This Controversial Gas Can be Either Toxic or Medically Useful. *Mediators Inflamm*, **2004**, 13 (1): 3-11.
8. **Bocci V.** *Ozone: A New Medical Drug*, **2005**, Springer, Dordrecht, Netherlands.
9. **Bocci VA.** Scientific and Medical Aspects of Ozone Therapy. State of the Art. *Archives of Medical Research*. **2006a**, 37: 425-435.
10. **Bocci V.** Is it True That Ozone is Always Toxic? The End of a Dogma. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **2006b**, 216 (3): 493-504.
11. **Bocci V, Zanardi I, Travagli V.** Oxygen/Ozone as a Medical Gas Mixture. A Critical Evaluation of the Various Methods Clarifies Positive and Negative Aspects. *Med Gas Res*. **2011a**; 1 (6): 1-9. Doi:10.1186/2045-9912-1-6
12. **Bocci VA, Zanardi I, Travagli V.** Ozone Acting on Human Blood Yields a Hormetic Dose-Response Relationship. *J Transl Med*, **2011b**, 9: 66. DOI: 10.1186/1479-5876-9-66
13. **Calunga JL, Zamora ZB, Borrego A, Rio SD, Barber E ve ark.** Ozone Therapy on Rats Submitted to Subtotal Nephrectomy: Role of Antioxidant System. *Mediators of Inflammation* **2005**. 4, 221–227.
14. **Clavo B, Perez JL, Lopez L, Suarez G, Lloret M ve ark.** Ozone Therapy for Tumor Oxygenation: A Pilot Study. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, **2004a**, 1 (1): 93–98.
15. **Clavo B, Ruiz A, Lloret M, Lopez L, Suarez G ve ark.** Adjuvant Ozonotherapy in Advanced Head and Neck Tumors: A Comparative Study. *Evid Based Complement Alternat Med*, **2004b**, 1 (3): 321–325.
16. **Clavo B, Catalá L, Perez JL, Rodriguez V, Robaina F.** Ozone Therapy on Cerebral Blood Flow: A Preliminary Report. *Evid Based Complement Alternat Med*, **2004c**, 1 (3): 315–319.
17. **Çavuşoğlu H, Yeğen BÇ, Alican İ.** Tıbbi Fizyoloji, Türkçe Çeviri, Türkçe 1. Baskı, *Yüce Yayınları A.Ş. ve Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Şti.*, **2001**, Tavashi Matbaacılık, İstanbul, s. 772-780.
18. **Deprem O, Yeşildere T.** Kas İskelet Bozuklukları: Kemikler ve Eklemeler. In: *Kedi ve Köpeklerin Klinik Hekimliği* (Çeviri, Schaer M.), Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Şti, **2006**, İstanbul, s.561.
19. **Elvis AM, Ekta JS.** Ozone Therapy: A Clinical Review. *J Nat Sci Biol Med*, **2011**, 2: 66.
20. **Gerard V, Sunnen MD.** *Ozone in Medicine: Overview and Future Directions*, p. 163-174. In: Bio-oxidative Therapies: Oxygen, Ozone and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Ed. Evers MHT, **1996**, FAST, Netherlands.
21. **Geweely NSI.** Antifungal Activity of Ozonized Olive Oil (Oleozone). *Int. J. Agri. Biol.* **2006**, 8 (5): 670-675.
22. **Godden SM, Jocelyn JT, Leslie KE, Smart NL, Kelton DF.** Effect of Sampling Time and Sample Handling on the Detection of *Staphylococcus aureus* in Milk Form Quarters with Subclinical Mastitis. *Can Vet J*, **2002**, 43: 38–42.
23. **Greenberg RN, Newman MT, Shariaty S, Pectol RW.** Ciprofloxacin, Lomefloxacin, or Levofloxacin as Treatment for Chronic Osteomyelitis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **2000**, 44: 164–166.
24. **Gülmen Ş, Kurtoğlu T, Meteöğlu I, Kaya S, Okutan H.** Ozone Therapy as an Adjunct to Vancomycin Enhances Bacterial Elimination in Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* Mediastinitis. *Journal of Surgical Research*, **2013**, 185: 64-69.
25. **Güven A, Gundoğdu G, Sadir S, Topal T, Erdoğan E ve ark.** The Efficacy of Ozone Therapy in Experimental Caustic Esophageal Burn. *J Pediatr Surg*, **2008**, 43 (9): 1679–1684.
26. **Güzel Ö, Yıldar E, Erdikmen DO.** Medikal Ozon ve Veteriner Cerrahide Kullanımı. *İstanbul Üniv. Vet. Fak. Derg*, **2011**, 37: (2), 177-184.

27. Han HJ, Kim JY, Jang HY, Lee B, Yoon JH ve ark. Fluoroscopic-guided Intradiscal Oxygen-Ozone Injection Therapy for Thoracolumbar Intervertebral Disc Herniations in Dog. *In Vivo*, **2007**, 21 (4): 609–613.
28. İnternet erişim: <http://www.mgm.gov.tr/arastirma/ozon-ve-uv.aspx>
29. İnternet erişim: [http://www.ozceozone.com/neden\\_ozon.aspx](http://www.ozceozone.com/neden_ozon.aspx)
30. Jacqueline C, Amador G, Caillon J, Mabecque VL, Batard E ve ark. Efficacy of the New Cephalosporin Ceftaroline in the Treatment of Experimental Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Acute Osteomyelitis. *Antimicrob Chemother*, **2010**, 65: 1749–1752.
31. Kayış T. Diazinon'un Subletal Konsantrasyonlarının *Pimpla turionellae* L.'nin Eşey Oranı ve Bazı Biyokimyasal Parametreleri Üzerine Etkileri. *Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Doktora Tezi, **2010**, Adana.
32. Kim HS, Noh SU, Han YW, Kim KM, Kang H, Kim HO, Park YM. Therapeutic Effects of Topical Application of Ozone on Acute Cutaneous Wound Healing. *Journal of Korean Medical Science*, **2009**, 24: 368–374.
33. Kutlubay Z, Engin B, Serdaroğlu S, Tüzün Y. Dermatolojide Ozon Tedavisi. *Dermatoz*, **2010**, 1 (4) : 209-216.
34. Li LJ, Yang YG, Zhang ZL, Nie SF, Li Z ve ark. Protective Effects of Medical Ozone Combined with Traditional Chinese Medicine Against Chemically-Induced Hepatic Injury in Dogs. *World Journal Gastroenterology*, **2007**, 13 (45): 5989-5994.
35. Lin Q, Chen H, Lu C, Wang B, Zhang Y ve ark. Effects of Ozone on Sciatic Nerve in Rat. *Interv Neuroradiol*, **2011**, 17 (3): 281-285.
36. Lu W, Li YH, He XF, *et al.* Treatment of Large Lumbar Disc Herniation with Percutaneous Ozone Injection via the Posterior-Lateral Route and Inner Margin of the Facet Joint. *World J Radiol*, **2010**, 2 (3): 109–112.
37. Lukinykh LM, Kosiuga Slu. Changes in the Quantitative Composition of the Microbial Flora of Dental Deposits during the Intensification of Oral Hygiene. *Stomatologiia (Mosk)*, 1998, 77 (6): 7-8.
38. Mader JT, Morrison LT, Adams KR. Comparative Evaluation of A-56619, A-56620, and Nafcillin in the treatment of Experimental *Staphylococcus aureus* Osteomyelitis. *Antimicrob. Agents Chemother*, **1987**, 31 (2): 259-263.
39. Martínez-Sánchez G, Al-Dalain SM, Menéndez S, Re L, Giuliani A ve ark. Therapeutic Efficacy of Ozone in Patients with Diabetic Foot. *Eur J Pharmacol*, **2005**, 523 (1-3): 151-161.
40. Muto M, Ambrosanio G, Guarnieri G, Capobianco E, Piccolo G ve ark. Low Back Pain and Sciatica: Treatment with Intradiscal- Intraforaminal O2-O3 Injection. Our Experience. *Radiol Med*, 2008; 113: 695-706.
41. Norden CW. Experimental Osteomyelitis. I. A Description of the Model. *The Journal of Infectious Diseases*, **1970**, 122 (5): 410-418.
42. Ogata A, Nagahata H. Intramammary Application of Ozone Therapy to Acute Clinical Mastitis in Dairy Cows. *Journal of Veterinary Medical Science*, **2000**, 62 (7): 681–686.
43. Oğuz E, Ekinci Ş, Eroğlu M, Bilgiç S, Koca K ve ark. Evaluation and Comparison of the Effects of Hyperbaric Oxygen and Ozonized Oxygen as Adjuvant Treatments in an Experimental Osteomyelitis Model. *Journal of Surgical Research*, **2011**, 171 (1): 61–68. DOI: 10.1016/j.jss.2011.06.029
44. Ohtsuka H, Ogata A, Terasaki N, Koiwa M, Kawamura S. Changes in Leukocyte Population after Ozonated Autohemoadministration in Cows with Inflammatory Diseases. *Journal of Veterinary Medical Science*, **2006**, 68 (2): 175–178.
45. Özler M, Öter Ş, Korkmaz A. Ozon Gazının Tıbbi Amaçlı Kullanılması: Derleme. *TAF Prev Med Bull* **2009**, 8 (1): 59–64.
46. Patel M, Rojavin Y, Jamali AA, Wasielewski SJ, Salgado CJ. Animal Models for the Study of Osteomyelitis. *Semin Plast Surg*, **2009**, 23 (2): 148–154.
47. Phuektes P, Mansell PD, Browning GF. Multiplex Polymerase Chain Reaction Assay for Simultaneous Detection of *Staphylococcus aureus* and Streptococcal Causes of Bovine Mastitis. *J Dairy Sci*, **2001**, 84: 1140-1148.
48. Pogosov VS, Miroshnihenko NA, Tafintsev AN. Medical Ozone in Combination with Low-Frequency Ultrasound Therapy in the Treatment of Patients with Chronic Purulent Otitis Media. *Vestn Otorinolaringol*, **2001**, 5:24-25.
49. Riffon RS. Development of a Rapid and Sensitive Test for Identification of Major Pathogens in Bovine Mastitis by PCR. *J Clin Microbiol*, **2001**, 39 (7): 2584–2589.
50. Roy D, Wong PKY, Engelbrecht RS, Chian ESK. Mechanism of Enteroviral Inactivation by Ozone. *Applied and Environmental Microbiology*, **1981**, 41 (3): 718-723.
51. Saini R. Ozone Therapy in Dentistry: A Strategic Review. *J Nat Sci Biol Med*, **2011**, 2 (2): 151–153.

52. Sambrook J, Russell W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed, Cold Spring Harbor Press, 2002, New York, USA
53. Scrollavezza P, Ansaloni F, Polidori P, Ablondi M, Pogliacani B. Ozonized Autohemotherapy: A New Method to Treat Dairy Cow Acute Interdigital Phlegmon. Comparison with Ceftiofur and Oxytetracycline. *Ital J Anim Sci*, 2002, 1, 211-216.
54. Shinozuka Y, Uematsu K, Takagi M, Taura Y. Comparison of the Amounts of Endotoxin Released from Escherichia coli after Exposure to Antibiotics and Ozone: An in vitro Evaluation. *Journal of Veterinary Medical Science*, 2008, 70 (4): 419-422.
55. Shirtliff ME, Calhoun JH, Mader JT. Comparative Evaluation of Oral Levofloxacin and Parenteral Nafcillin in the Treatment of Experimental Methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* Osteomyelitis in Rabbits. *J. Antimicrob. Chemother*, 2001, 48 (2): 253-258.
56. Shakhov VY, Edeleva AN. Medical Ozone: Reasons of Application in Chronic Purulent Mesotympanitis. *Vestnik Otorinolaringologii*, 1999, 2: 48-49.
57. Souza YM, Fontes B, Martins JO, Sannomiya P, Brito GS ve ark. Evaluation of the Effects of Ozone Therapy in the Treatment of Intra-abdominal Infection in Rats. *Clinics*, 2010, 65 (2): 195-202.
58. Steinhart H, Schulz S, Mutters R. Evaluation of Ozonated Oxygen in an Experimental Animal Model of Osteomyelitis as a Further Treatment Option for Skull-base Osteomyelitis. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 1999, 256 (3): 153-157.
59. Stübinger S, Sader R, Filippi A. The Use of Ozone in Dentistry and Maxillofacial Surgery: A Review. *Quintessence Int*, 2006, 37 (5): 353-359.
60. Taşdemir C, Taşdemir S, Vardi N, Ates B, Onal Y ve ark. Evaluation of the Effects of Ozone Therapy on Escherichia coli-Induced Cytitis in Rat. *Ir J Med Sci*, 2013, 182: 557-563.
61. Travalgi V, Zanardi I, Valacchi G, Bocci V. Ozone and Ozonated Oils in Skin Diseases: A review, *Mediators of Inflammation* 2010, Doi:10.1155/2010/610418.
62. Tylicki L, Biedunkiewicz B, Rachon D. No Effects of Ozonated Autohemotherapy on Inflammation Response in Hemodialyzed Patients. *Mediators of Inflammation*, 2004, 13: 377.
63. Valacchi G, Bocci V. Studies on the Biological Effects of Ozone: 10. Release of Factors from Ozonated Human Platelets. *Mediators Inflamm*, 1999, 8 (4-5): 205-209.
64. Verhein KC, Jacoby DB, Fryer AD. IL-1 Receptors Mediate Persistent, but not Acute, Airway Hyperreactivity to Ozone in Guinea Pigs. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2008, 39 (6): 730-738.
65. Viebahn-Haensler R. Uygulama Biçimleri ve Kullanım Alanları. Tedavi Uygulamaları. In: *Ozonun Tıpta Kullanımı*, 1. Baskı, Ed: Balkan B, Medikal Ozon Oksijen Derneği, İstanbul, 2005, s.53-65.
66. Viebahn-Haensler R. Tedavi Amaçlı Kullanımlar. In: *Ozonun Tıpta Kullanımı*, 1. Baskı, Ed: Balkan B, Medikal Ozon Oksijen Derneği, İstanbul, 2005, s.42-48.
67. Vigna I, Menéndez-Cepero S. Ozone Therapy Application in Different Ophthalmologic Diseases: Study of 59 Cases. *Revista Electronica de Clinica Veterinaria*, 2007, 2 (11): 1-9.
68. Yu B, Chen HQ, Lu CH, Lin QR, Wang BW, Qin CH. Effect of Intra-articular Ozone Injection on Serum and Synovial TNF- $\alpha$ , TNFR I, and TNFR II Contents in Rats with Rheumatoid Arthritis. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Bao*, 2011, 31 (6): 1055-1058.

## ÖZGEÇMİŞ

10 Ekim 1972 tarihinde Osmaniye'nin Kadirli ilçesinde doğdu. İlkokulu Küçükçınar Köyü İlköğretim Okulu'nda, ortaokulu Kadirli Merkez Ortaokulunda, liseyi Adana Erkek Lisesi'nde okudu. 1990 yılında kazanmış olduğu İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesinden 1996 yılında mezun oldu. 1997–1998 yıllarında Gıda Kontrol Subayı olarak Adaklı/Bingöl'de askerliğini yaptı. Askerliğini bitirdikten sonra Pfizer İlaç firmasında Uzman Tıbbi Satış Mümessili olarak 10 yıl çalıştı. Bu esnada İstanbul Bilgi Üniversitesi'nde “Management Business Administration” Yüksek Lisansını tamamladı. Bilgi Üniversitesi'nde Tezini “Kurumsal Yönetim ve Güncel Yönetim Teknikleri” konusunda hazırladı. Daha sonra sırasıyla; Özel Hatay Hastanesi'nde Hastane Müdürü olarak 2 yıl, Yalçın Yem AŞ'de Pazarlama Müdürü olarak 7 ay ve Mustafa Kemal Üniversitesi Rektörlük Basın-Yayın ve Halkla İlişkiler Biriminde Koordinatör olarak 6,5 ay görev yaptı. Katıldığı eğitim ve seminerler; Satış Teknikleri, Stres Yönetimi, Gruplara Satış Yapma, Microsoft Office, İleri Prezantasyon Becerileri, Profesyonel Satış Becerileri, Literatür Analizi ve Sunum Becerileri, İyi Bir İzlenim Bırakmak, Pusula Satış Analiz Sistemi, Teams Eğitimi, İş Planlama Teknikleri, Zamanın 9 Prensibi, Müşteri Odaklılık, Veri Analizi ve Hedefleme, Satışta Güncel Yaklaşımlar, Şapka Çıkartacak Hizmet Eğitimi, Akılcı Çalışma Eğitimi, Satış Yetkinliği, Sosyal Stil Satış Stratejileri, Londra Cavendish College' de İngilizce kursu, Kalite Sistem Tetkikçisi Eğitimi, Sağlık İşletmeleri Yöneticiliği, Hızlı Okuma Kursu, Yöneticilik ve Liderlik Eğitimi'dir. Aralık 2012 tarihinden itibaren de Özel Veteriner Kliniği işletmektedir.