



**T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ORTOPEDİ VE TRAVMATOLOJİ ANABİLİM DALI**

**DENEYSEL ENFEKTE DİZ PROTEZİ MODELİNDE
ENFEKSİYONUN EREDİKASYONU VE
EKLEM KIKIRDAĞI HASARI ÜZERİNDE
İNTRAARTİKÜLER UYGULANAN OZONUN(O₃) ETKİLERİ**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. ALPER KURTOĞLU

DENİZLİ - 2013



T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ORTOPEDİ VE TRAVMATOLOJİ ANABİLİM DALI

DENEYSEL ENFEKTE DİZ PROTEZİ MODELİNDE
ENFEKSİYONUN EREDİKASYONU VE
EKLEM KIKIRDAĞI HASARI ÜZERİNDE
İNTRAARTİKÜLER UYGULANAN OZONUN(O₃) ETKİLERİ

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. ALPER KURTOĞLU

Danışman:


Doç. Dr. MURAT OTO

DENİZLİ - 2013

Doç.Dr. Murat Oto danışmanlığında Dr. Alper Kurtoğlu tarafından yapılan “DENEYSSEL ENFEKTE DİZ PROTEZİ MODELİNDE ENFEKSİYONUN EREDİKASYONU VE EKLEM KIKIRDAĞI HASARI ÜZERİNDE İNTRAARTİKÜLER UYGULANAN OZONUN(O₃) ETKİLERİ” başlıklı tez çalışması 06/12/2013 tarihinde yapılan tez savunma sınavı sonrası yapılan değerlendirme sonucu jürimiz tarafından Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim/Bilim Dalı’nda TIPTA UZMANLIK TEZİ olarak kabul edilmiştir.

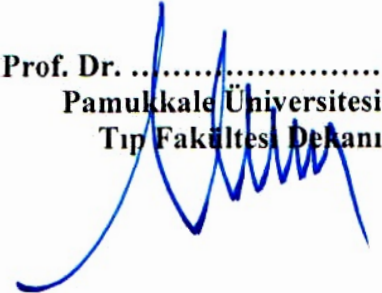

BAŞKAN
Prof. Dr. Ahmet Fahir Demirkan


ÜYE
Prof. Dr. Ahmet Esat Kiter


ÜYE
Doç. Dr. Murat Oto

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım. 13/02/2014

Prof. Dr.
Pamukkale Üniversitesi
Tıp Fakültesi Dekanı



TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca yetiŐmemde emek harcayan ve bu çalışmada yardımlarını ve zamanını esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Ahmet Fahir Demirkan'a , eğitimim boyunca üzerimde emekleri olan değerli hocalarım Prof. Dr. Ahmet Esat Kıter'e, Doç. Dr. Murat Oto'ya, Doç. Dr.Semih Akkaya'ya, Yrd. Doç. Dr. Alp Akman'a, tez çalıŐmasın da yardımlarından dolayı Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr.ağrı Ergin'e, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Yrd. Doç. Dr. Erdoğan Kocamaz'a, çalışma verilerinin değerlendirilmesinde katkılarından dolayı Halk Sağlığı Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Dr. Ali İhsan Bozkurt'a ve beraber çalıŐtığımız asistan arkadaşlarıma teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	I
İÇİNDEKİLER	II
KISALTMALAR	V
TABLO LİSTESİ	VII
ŞEKİL LİSTESİ	VIII
ÖZET	IX
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2.GENELBİLGİLER	3
2.1. DİZ PROTEZİ	3
2.1.1. Tanım ve tarihçe	3
2.1.2. Protez enfeksiyonu	6
2.1.2.1. Yüzeysel Enfeksiyonlar	10
2.1.2.2. Derin Enfeksiyonlar	11
2.1.3. Enfeksiyon Tanısı	13
2.1.3.1. Laboratuvar tanısı	14
2.1.3.2. Radyoloji	14
2.1.3.3. Histopatolojik çalışmalar	15

2.1.3.4. Mikrobiyolojik çalışmalar	15
2.1.3.5. Sintigrafi	16
2.1.4. Enfekte Diz Protezi Tedavisi	16
2.2.OZON TEDAVİSİ	17
2.2.1.Ozonun Tanımı	17
2.2.2.Tıbbi ozonun tanımı	18
2.2.4.Ozon tedavisinin tarihçesi	19
2.2.5.Ozonun etki mekanizması	19
2.2.5.1.Organik Ortamlarda Ozon Kimyası	19
2.2.5.2.KlinikUygulamalarda Ozonun Etki Mekanizması ..20	
2.2.5.3. Ozonun Hücre Seviyesindeki Etkileri	22
2.2.6.Ozonun vücuda verilış yolu	24
2.2.6.1.Majör otohemoterapi (MOH)	24
2.2.6.2.Minör otohemoterapi (MİH)	25
2.2.6.3.İntraartiküler uygulama	25
2.2.6.4. Peroksidik yağlar	25
2.2.7.Ozonterapinin klinik uygulamaları	26
2.2.7.1.Yara iyileşmesi ve kronik yaralar	26
2.2.7.2.Antibakteriyel etki	27
2.2.7.3. Mandibula avasküler nekroz	28
2.2.8.Yan etkiler ve kontrendikasyonlar	28
2.3.8.1 OzonTedavisininYapılmamasıGereken Durumlar..29	
2.3.8.2 Komplikasyonlar	30
2.2.9. Ozon toksikolojisi	30
2.2.9.1. Kısa dönem (akut) maruziyet	30
2.2.9.2. Uzun dönem (kronik) maruziyet	31
2.2.10.Hiperbarik oksijen tedavisi ile karşılaştırılması	31
3. GEREÇ VE YÖNTEM	33

3.1. Hayvanlar ve çalışma grupları	33
3.2. Enfeksiyon ajanının hazırlanması.....	33
3.3. Cerrahi müdahale ve bakteriyel inokülasyon	34
3.4. Bakteriyel inokülasyon	37
3.5. Cerrahi müdahale sonrası takip	38
3.6. Ozonun hazırlanması	39
3.7. Protez enfeksiyonu gelişiminin doğrulanması	40
3.8. Hayvanların sakrifiye edilmesi	42
3.9. Histopatolojik çalışma	43
3.10. İstatistiksel çalışma	46
4. BULGULAR	47
4.1. Klinik bulguların değerlendirilmesi	47
4.2. Histopatolojik inceleme sonuçları	48
4.3. İstatistiksel bulgular	53
5.TARTIŞMA	60
6. SONUÇLAR	79
7. ABSTRACT	81
8.KAYNAKLAR	83
TEZ ONAY SAYFASI	

KISALTMALAR (ABBREVIATIONS)

- A.mellifera L. : Apis mellifera Linnaeus
AB : Antibiyotik
Ark. : Arkadaşları
ATCC : American Type Culture Collection
BK : Beyaz küre
°C : Celcius
CRP : C- reaktif protein
cfu : colony forming unit
CO: Karbon monoksit
ÇTTS:Çalışmayı tamamlayan tavşan sayısı
ÇSÖTS:Çalışma sürecinde ölen tavşan sayısı
ÇDETTS:Çalışmaya dahil edilen toplam tavşan sayısı
D : Doz
DEKAM : Deneysel ve Klinik Arastırma Merkezi
DNA : Deoksiribonükleik asit
E. coli : Escherichia coli
G : Gauge
HCl : hidroklorür
H.influenzae : Haemophilus influenzae
HE : Hematoksilen-eozin
HIV : Human Immunodeficiency Virus
HBO : Hiperbarik oksijen
Hz : Hertz
IFN- γ : İnterferon-gama
IL : İnterlökin
IL-1 β : İnterlökin-1 beta
kg : kilogram

K : Kontrol
KCl : Potasyum Klorür
 μ : mikron
 μg : mikrogram
min. : minimum
maks. : maksimum
MİK : Minimum İnhibitör Konsantrasyon
MOH : Majör otohemoterapi
MİH : Minör otohemoterapi
mg : miligram
ml : mililitre
MRSA : Metisilin resistant staphylococcus aureus
N. gonorrhoea : Neisseria gonorrhoea
Nm : Nanometre
NO : Nitrik oksit
NSAİİ : Non-steroid antiinflamatuvar
O : Ozon
OAB : Ozon+Antibiyotik
PAÜ : Pamukkale üniversitesi
PMNL : Polimorfonükleer lökosit
RA : Romatoid artrit
RNA : Ribonükleik asit
S.aureus : Staphylococcus aureus
TDA : Total diz artroplastisi
TNF- α : Tümör Nekroz Faktörü- alfa
UHMWPE : Yüksek molekül ağırlıklı polietilen
x: Ortalama
 x^2 : Ki kare (chi-square)
UV : Ultraviyole

V : Volt

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Antibiyotik profilaksisinde kullanılan ilaçlar	9
Tablo 2. TDA da etken patojenler ve görülme sıklıkları	12
Tablo 3. Enfekte total diz artroplastilerinde tedavi yöntemleri	16
Tablo 4. Kıkırdak hasarlarında histolojik-histokimyasal skorlama	45
Tablo 5. Gruplardaki tavşanları histolojik-histokimyasal skor dağılımı	54
Tablo 6. Grupların ortalama histolojik-histokimyasal skorları ve toplam skorları	55
Tablo 7. Grupların ortalama histolojik-histokimyasal skorları ve standart sapma skorları..	55
Tablo 8. 1 doz ve 2 doz ozon alan grupların histolojik-histokimyasal skor dağılımı	57
Tablo 9. 1 doz ozon ve 2 doz ozon alan grupların skorları ve toplam skorları	58
Tablo 10. Grupların kültür pozitif sayılarını ve yüzdeleri	59
Tablo 11. Çalışmaya dahil edilen tavşanların dağılımını gösteren tablo.....	59

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Preop traş yapılmış tavşan sağ dizi	35
Şekil 2. Preop boyanmış ve steril örtülmüş yapılmış tavşan sağ dizi.....	35
Şekil 3. Tavşanların sağ dizlerine yerleştirilen vida ve pul örnekleri	36
Şekil 4. Vida ve polietilen yerleştirilmiş tavşan sağ dizi	36
Şekil 5. (Tavşan sağ dizi) Vida ve polietilen yerleştirildikten sonra suture edilmiş	37
Şekil 6. Bakteri süspansiyonunun diz eklemine verilışı	38
Şekil 7. Ozon jeneratörü (PZ-85, Cold Plazma Ozone Generator 110V-50 Hz, 110 V).....	40
Şekil 8. Kontrol grubundaki tavşanın bakteriyel inokülasyondan 1 hafta sonraki enfekte diz eklemi	41
Şekil 9. Kontrol grubundaki tavşanın sakrifikasyon öncesi enfekte diz eklemi	42
Şekil 10. Kontrol grubundaki diz eklemine açılması sonrası	43
Şekil 11. Çalışmada kullanılan ışık mikroskobu	44
Şekil 12. Normal eklem kırıkdağının ışık mikroskopik görünümü (HE, x10)	50
Şekil 13. K grubuna ait ışık mikroskopik görünüm (HE, x10)	50
Şekil 14. AB grubuna ait ışık mikroskopik görünüm (HE, x10)	51
Şekil 15. O grubuna ait ışık mikroskopik görünüm (HE, x10)	51
Şekil 16. OAB grubuna ait ışık mikroskopik görünüm (HE, x10)	52
Şekil 17. 2 doz ozon alan grubu ait ışık mikroskopik görünüm (HE, x10)	52
Şekil 18. 1 doz ozon alan grubu ait ışık mikroskopik görünüm (HE, x10)	53

DENEYSEL ENFEKTE DİZ PROTEZİ MODELİNDE ENFEKSİYONUN ERADİKASYONU VE EKLEM KIKIRDAĞI HASARI ÜZERİNDE İNTRAARTİKÜLER UYGULANAN OZONUN ETKİLERİ

ÖZET

Amaç: Bu çalışmanın amacı tavşanlarda deneysel enfekte diz protezi modeli oluşturup, meydana gelen enfeksiyonun eradikasyonu ve kıkırdak harabiyetinin önlenmesinde intra-artiküler(eklem içi) uygulanan ozonun etkilerini araştırmaktır.

Gereç ve Yöntem: Toplam 24 Yeni Zelanda tavşanının sağ femur lateral kondiline 1'er adet polietilen pul 1'er adet vida ile yerleştirildi. Aynı seansta intraartiküler Staphylococcus aureus inoküle edildi. Sırasıyla kontrol, antibiyotik, ozon ve ozon+antibiyotik olmak üzere dört grup oluşturuldu. İnokülasyondan sonraki 7. günde tüm tavşanlar klinik olarak değerlendirildi ve herbir tavşanda enfeksiyon bulgularının mevcut olduğu gözlemlendi. Tüm tavşanların diz eklemleri 1 cc sf ile irrigate edildi. Her gruptan 2 adet tavşan rastgele(random) seçilerek irrigasyon ve aspirasyon materyali kültür incelemesine alındı. Kontrol grubuna irrigasyon haricinde tedavi verilmedi. Antibiyotik grubuna 14 gün antibiyotik verildi. Ozon grubuna haftada 3 kez olmak üzere 2 hafta boyunca intraartiküler ozon verildi.Ozon+antibiyotik grubuna 14 gün boyunca hergün antibiyotik ve haftada 3 kez olmak üzere 2 hafta boyunca intrartiküler ozon verildi.Tüm hayvanlar 3. Haftanın sonunda tekrar değerlendirilip, sakrifiye edildi.Her gruptaki tavşanın sağ dizlerinden ve

kontrol grubundaki tavşanların ilave olarak sol dizlerinden kültür örnekleri alındı. Enfekte diz eklemi histolojik-histokimyasal skor açısından ve kültür sonuçları açısından değerlendirildi.

Bulgular: Kontrol grubu ile diğer gruplar arasında kültür örnekleri, histolojik-histokimyasal skor açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunurken, antibiyotik, ozon, ozon+antibiyotik grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. İstatistiksel olarak anlamlı fark saptanmasa da histolojik-histokimyasal toplam skor, ozon+antibiyotik grubunda en düşük bulunurken, kültür sonuçlarında en etkili sonuç antibiyotik grubunda bulunmuştur

Sonuç: Ozon tedavisinin sinovyal dokudaki inflamasyonu ve eklem kıkırdağındaki hasarı azaltması, antibakteriyel ve antiinflamatuvar etkilerine bağlanabilir. Diz protez enfeksiyonlarında enfeksiyonun eradikasyonu ve kıkırdak hasarını engellemede antibiyotikle beraber ozonun intraartiküler kullanımına gerek yoktur.

Anahtar kelimeler: Kıkırdak hasarı, ozon, protez enfeksiyonu

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Osteoartrit eklem kıkırdağı ile subkondral kemikte yapım ve yıkım olaylarındaki dengenin bozulması sonucu gelişen dinamik bir hastalıktır. En sık etkilenen eklem diz eklemidir ve “ gonartroz “ olarak isimlendirilir. Yaşla artan gonartroz diz ağrısına bağlı fiziksel yetmezliği beraberinde getirmekte, hastalığın ilerlemesiyle ağrı, tutukluk, hareket açıklığında azalma ve deformite meydana gelmektedir. Gonartroz ağrı ve fonksiyon kaybına neden olarak yaşam kalitesinde bozulmaya yol açar. Tedavisinde amaç ağrıyı azaltmak, eklem fonksiyonlarını ve deformiteleri düzeltmek ve yaşam kalitesini artırmaktır (1).Yaşam süresinin uzaması ve ileri yaştaki nüfusun artışına paralel olarak her geçen gün total diz protezi yapılan hasta sayısı artmaktadır. Hasta sayısının artmasıyla, ortaya çıkabilecek komplikasyonlar daha fazla kişiyi etkilemekte ve tedavinin başarısını azaltmaktadır. Cerrahi teknikteki ilerlemeler, diz protezi tasarımlarındaki gelişmeler, komplikasyonların daha iyi anlaşılması, profilaksi ve tedavi yöntemlerinin gelişmesiyle her geçen gün komplikasyon oranları azalmaktadır (2).TDA sonrası ilk 2 yıl içerisinde revizyona gitmesinin ana sebebi enfeksiyondur ve TDA sonrası enfeksiyon oranlarında son yıllarda artış görülmüştür. En sık karşılaşılan organizma metisiline dirençli Staphylococcus aureus'tur (MRSA) (3). Protez enfeksiyonları sonrasında uygulanan klasik yöntemler antibiyotik uygulaması, eklem yıkaması, antibiotikli spacer ve sonrasında revizyon artroplasti uygulanması şeklinde özetlenebilmektedir.

Aktif oksijen molekülü olan ozon gazı kullanılarak yapılan iyileştirici tedavilere "ozon terapi" denilmektedir. Oldukça eski bir tedavi şekli olmakla beraber her geçen gün farklı yararlı etkilerinin bulunması onu yeniden güncel hale getirmektedir. Ozonun antibakteriyel etkisi bu maddenin ilk kullanım alanıdır. Sharma ve Hudson tarafından yapılan bir çalışmada ortama verilen 25 ppm'lik bir ozon gazının 20 dakika içerisinde kuru yüzeyler ve gereçler dahil ortamdaki hastane kökenli pek çok bakteri için (bunların arasında *Acinetobacter baumani*, *Clostridium difficile* ve methicillin dirençli *Staphylococcus aureus* sayabiliriz) bakterisidal olduğu gösterilmiştir (4). Lokal tedavilerde 80 ve 100 µg/ml gibi yüksek konsantrasyonlarda ozon "yarayı temizlediği", diğer bir deyişle dezenfektan görevi gördüğü, 10-40 µg/mL civarında ise "yarayı iyileştirdiği" yada epitelizasyon ve granülasyonu arttırdığı rapor edilmiştir. Ozon güçlü doğal ve atık bırakmayan dezenfektan olduğu bilinmektedir. Bağışıklık sistemini güçlendirerek enfeksiyonlara karşı direnci artırdığı öne sürülmektedir. Bununla birlikte iyi bir dezanfektan olduğu bilinse de iskelet sistemi enfeksiyonları üzerine literatürde in vivo yeterli çalışma yoktur.

Bu çalışmada tavşanların dizlerinde protez enfeksiyon modeli oluşturarak ozon tedavisinin eklemdeki enfeksiyonun eradikasyonu ve eklem kıkırdağı harabiyetinin önlenmesi üzerine etkisi incelenmiştir.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. DİZ PROTEZİ

2.1.1. Tanım ve tarihçe

Dizde ilk artroplasti 1762 yılında Filkin tarafından uygulandı (5-6). Bu tüberküloz artritinde uygulanan bir rezeksiyon artroplastisiydi. Sonrasında Verneuil 1863 yılında eklem kapsülünü kullanarak ilk interpozisyon artroplastisini uyguladı (6-7). Bundan sonraki yıllarda interpozisyon artroplastisi osteoartritli ve romatoid artritli dizlerde 1940'lara kadar artrodez ve amputasyonun yanında tek alternatif olarak uyguladı. Bu tarihe kadar değişik dokuların interpozisyonu denendi. 1913'de Murphy yağ dokusu ve fasya lata, 1920'de Putti ve Campbell fasya lata, 1928'de Albee yağ dokusu ve fasya lata kullanılarak interpozisyon artroplastisi yapmışlardır (5,8).

Baer 1918 yılında ilk yabancı materyal interpozisyonunu gerçekleştirdi. Baer bu interpozisyonda kromize domuz mesanesi kullandı. Sonraki dönemde 1949'da Sampson selofan, 1950'de Kuhns ve Potter naylon, 1958'de Brown cilt interpozisyonunu uyguladılar (5,8).Tüm bu interpozisyon teknikleri osteoartritlik dizlerde ağrının azalmasını ve sınırlı bir hareket açıklığı sağladı fakat romatoid artritli dizlerde istenen sonuçlar alınamadı.

Smith–Peterson 1940'ta vitalyumu kalça protezinde başarılı bir şekilde kullanmasını takiben; Boyd ve Campbell, diz ekleminde femoral kondilleri örten metalik bir kalıptan oluşan hemiarthroplastiyi geliştirmiştir. Bu ilk protez denemesi başarısızlıkla sonuçlanmıştır. 1942 yılındaki Smith-

Peterson'un metalik bir femoral kalıp hemiartroplasti uygulaması da başarısız olmuştur (9).

Mac Intosh 1958'de ağırlı varus ve valgus deformitelerde, tutulan tarafta tibiaya uygulanarak deformiteyi düzelterek ağrıyı gideren bir akrilik hemiartroplasti tanımlamıştır. Ancak, ne Mac Intosh ne de Mc Keever tipi hemiartroplasti örneklerinde uzun süreli bir ağrısız eklem elde edilememiştir (5,8,9).

Hem femur hem de tibial yüzeylerin değiştirilmesi menteşeli protezlerin geliştirilmesiyle olmuştur. Judet 1947 yılında ilk menteşe tipi protez tasarımını oluşturmuştur.

Magnoni 1949'da, 1951'de Walldius, 1954'de Shires, 1957'de Mc Kee menteşeli protezi denemişlerdir (5). Diz hareketlerinin kompleks bölümleri nedeniyle bu basit menteşeli implantlarda başarı elde edilememiştir. Erken gevşeme ve yüksek enfeksiyon oranlarıyla karşılaşmıştır. Sonra rotasyon aksının daha posteriora getirildiği Guepar menteşeli protezi geliştirildi. Ancak bu protezde de gevşeme ve enfeksiyon sık meydana geldi. 1981'de geliştirilen sferosentrik protez kondiler yüzeyin değiştirildiği tasarıma ek olarak rotasyonel harekete de izin veriyordu. Modern protez tasarımları sayesinde menteşeli protezlerin kullanımı ekstremitte koruyucu cerrahi ve ileri derece instabil dizlerde uygulanmıştır (10,11). 1960'lı yıllarda kalça protezi tasarımında Charnley'in metal femoral ve polietilen asetabular komponent birlikteliğini polimetil metakrilatla tespit etmeye başlaması, yine Charnley'le birlikte çalışan Gunston'a aynı materyalleri dizde kullanma fikri verdi (5,11,12). Aynı zamanda dizin tek bir aks üzerinde değil sürekli değişen rotasyon

merkezleriyle kaydığını ve yuvarlandığını belirtmiştir. Buna “femoral rollback” denmektedir.

Gunston 1967 yılında modern diz protezlerinin ilk ışığı olarak kabul edilen polisentrik diz protezini tasarlamıştır (5,8,10,11). Freeman-Swanson 1970’li yılların başlarında, UCI (Universty of California at Irvine), Marmor, Geometrik (Conventry, Mayo klinik) gibi pek çok değişik protez tasarımını oluşturmasıyla diz protezi cerrahisinde modern dönem başlamış oldu (7,8,9).

Ülkemizde ilk total diz artroplastisi 1972 yılında Dr. Güngör Sami Çakırgil tarafından uygulanmıştır. Gunston’un polisentrik diz protezi uygulanmıştır. (13)

1970’li yıllarda total diz artroplastisinin gelişiminde modern dönem başlamıştır. Bunun ilk öncüsü Total Kondiler Protez olmuştur (Install-Hospital for Special Surgery). Bu protezin femoral komponenti kobalt-krom alaşımından oluşurken tibial ve patellar komponent ise tümüyle polietilenden oluşmaktaydı. Çapraz bağlar korunmamış ve komponentlerin tümü çimentolu olarak tespit edilmiştir (9). Fleksiyon ve ekstansiyon aralığının yeterince dengelenemediği durumlarda, femoral kayma ve yuvarlanma hareketi yapılamaması sonucunda femur metafizi, 95° fleksiyonda polietilen tibial eklem yüzeyine takılmaktaydı. Bu da fleksiyonun kısıtlıyordu. Bu sorunu gidermek amacıyla Insall ve Burnstein 1978’te geliştirdikleri protezde tibial komponentin merkezine yerleştirdiği mil mekanizması ile 70° fleksiyondan sonra kondillerin posteriora deplasmanını sağladı (10). Bu arka çapraz bağ yerine geçen (PCL

substituting) protezde femoral kayma ve yuvarlanma gerçekleşerek daha fazla fleksiyon dereceleri elde edilmekteydi.

Sonraki yıllarda protez tasarımları ve bu konudaki tartışmalar daha çok tespit, arka çapraz bağın korunup korunmaması, patellanın değiştirilip değiştirilmemesi üzerine olmuştur. Tespit ve aşınma sorunlarının aşılması amaçlı kobalt-krom, titanyum, seramik gibi alaşımlarla ultra yüksek molekül ağırlıklı polietilen komponentlerin birlikte kullanıldığı protez tasarımları oluşturulmuştur. (9)

2.1.2. Protez enfeksiyonu

Total diz protezi (TDP) sonrası enfeksiyon, mücadelesi en zor komplikasyondur. Enfeksiyon oranı % 1 ile % 23 arasında değişmektedir, özellikle menteşeli protezlerde enfeksiyon yüksek oranda görülmektedir (14). Başka bir yayında ise bu oran % 0,4 ile % 10,3 arasında verilmiştir (15,16). Menteşeli protezler için TDP sonrası enfeksiyon oranı % 4,8- % 22,5 arasındadır (17). Revizyon ameliyatlarından sonra bu oran daha da artarak % 4-32' ye kadar çıkar (18).

Tüm bu oranlardan da görüldüğü gibi total diz artroplastisi sonrasında enfeksiyon görülme sıklığı kalça artroplastisine nazaran daha yüksektir (15,19). Çünkü diz çevresindeki dokular yumuşak doku travmasına daha duyarlıdır ve diz protezinde turnike kullanımı geçicilerde olsa iskemik bir dönem oluşturur. Ayrıca diz protezi, diz gibi yüzeysel bir eklemden oransal olarak geniş bir alanın yabancı materyal ile kaplanmasına neden olur; bu da enfeksiyona zemin hazırlayıcı bir faktördür (15).

Protez enfeksiyonlarının histopatolojisine bakacak olursak enfeksiyon oluşmasında ve gelişmesinde önemli rol üstlenen biyofilm tabakası ile karşılaşırız. Polimeric matriksten oluşan bu biyofilmler içinde mikroorganizmalar organize olur, birbirleriyle ilişkileri sonucunda yapısal ve fonksiyonel heterojenite kazanırlar (20). Ayrıca biyofilm sayesinde mikroorganizmalar konak immün defansından ve antimikrobial ajanlardan da korunurlar. Böylece dirençli mikroorganizmalar haline gelirler. Bu direncin sebebi olarak biyofilm tabakası içinde mikroorganizmaların sabit üreme fazına girmesi gösterilir. Mikroorganizmaların sabit üreme fazına girme nedeni olarak ise; glukoz ve oksijen gibi metabolik substratların biyofilm tabakasından yetersiz geçişi suçlanmaktadır (21).

Burada görüldüğü gibi diz protezi enfeksiyonu diğer atroplastilere nazaran sık görülen ve mücadelesi zor bir komplikasyondur. Enfeksiyonun gelişmesini önlemek, geliştikten sonra mücadele etmekten daha kolay bir yöntemdir. Bu da hangi hastalarda enfeksiyon gelişme riskinin daha yüksek olacağı bilgisine sahip olunarak başarılabılır.

Diabet, obesite, albumin düzeyi $< 3,5$ gr/dl olması, Hb düzeyinin < 10 mg/dl olması, lenfosit < 1500 ml olması, sigara kullanımı, steroid kullanımı, immünsupresif tedavi, zayıf beslenme ve 2,5 saatten uzun operasyon süresi yara iyileşmesini olumsuz etkileyen, enfeksiyon riskini arttıran faktörlerdir (22).

Enfeksiyondan korunma yöntemlerini preoperatif, peroperatif ve postoperatif olarak gruplandırabiliriz. Preoperatif dönemde hastalar risk faktörleri yönünden araştırılmalı, bu faktörlerden herhangi birisi varsa artroplastiden önce tedavisi yoluna gidilmelidir. Örneğin ameliyat öncesi

tüm septik cilt lezyonları, üriner sistem enfeksiyonları, enfekte tırnak batmaları, diş, diş eti iltihapları ve çürükleri sorgulanmalı ve varsa tedavi edilmelidir (15,23). Ayrıca erkeklerde prostatizm şikayetleri varsa postoperatif üriner kateterizasyon gerektireceği ve üriner sistem enfeksiyonuna neden olabileceği için mümkünse bu yönde tedavisi yapılmalıdır (15). Hastalar hastanede ameliyat öncesi mümkün olduğunca az yatırılmalıdır. Böylelikle kendi floralarının hastanenin dirençli florası ile yer değiştirmesi engellenmiş olur. Hastanın cilt traşı ve temizliği ameliyathanede yapılmalıdır. Daha önce yapıldığında oluşan cilt sıyrık ve yaraları patojen bakterilerin üremesine neden olunur (16). Ameliyattan bir gün önce hastanın banyo yapması, cilt florasındaki bakteri sayısını azaltmaktadır (24).

Preoperatif enfeksiyondan korunma yöntemleri arasında antibiyotik profilaksisi, sağlıklı ve temiz ameliyathane koşulları, ultraviyole ışıkları, laminar akım düzeneği, doğru tasarlanmış ameliyathane, uygun cerrahi kıyafetler, cerrahın uygun yıkanması, hastanın uygun hazırlanması, hastanın uygun hazırlanması ve riskli hastalarda antibiyotikli sement kullanımı yer almaktadır. Ameliyathanedeki patojen mikrororganizmaların başlıca kaynağı havadaki bakterilerdir. Bunun da başlıca kaynağı ameliyathanedeki insanlardır. Ameliyathanede ne kadar insan varsa o kadar çok bakteri var demektir (25). Çünkü bir insan etrafına 1 dakikada 1000 ile 10000 adet canlı organizma yayar. Bu sayı hareket halindeyken 10 katına kadar çıkabilir (24) Bazı insanlar diğerlerine göre daha fazla sayıda organizma yayar ki bunlara yayıcı (shedder) denir. Erkeklerin % 13'ü, postmenopozal kadınların % 5'i, premenopozal kadınların ise % 1'i yayıcıdır. Diğer

tarafından insanların % 30'u cinsiyet ayrımı olmaksızın burunlarında *S. aureus* kolonizasyonuna sahiptir (26). Sonuç olarak ameliyathanede mümkün olduğunca az insan bulunmalı ve mümkün olduğunca az hareket sağlanmalıdır.

Ameliyathanede kullanılan ameliyat önlüğü, örtü malzemelerinin seçimi de önemlidir. Pamuk dokumalar iyi bir bariyer değildir. Önerilen kumaşlar daha dar gözenekleri olan polyester kumaşlardır (27)

Preoperatif antibiyotik profilaksisi için önerilen başlıca antibiyotikler tablo 1 'de verilmiştir. Bu antibiyotik uygulamasının turnike sıkılmadan 10-15 dk önce yapılması gerekmektedir (14).

Tablo 1: Antibiyotik profilaksisinde kullanılan ilaçlar (17)

Antibiyotik	Doz
Sefazolin	1 g iv ameliyattan önce, postop 1g iv 6 saatte bir / 24 saat
Sefuroksim	1,5 g iv ameliyattan hemen önce, postop 750 mg 8 saat ara ile / 24 saat
Vankomisin	1 g iv ameliyattan hemen önce, postop 0,5 g iv 12 saat ara ile / 24 saat

Postoperatif geç enfeksiyonlarda hematojen yolla bulaşma %40 oranında gözlenir (28). Hematojen bulaşmada; orofarengial, genitoüriner, gastrointestinal girişimler ve infekte cilt lezyonları sorumlu tutulmuştur (28,29). Bu gibi durumlarda antibiyotik profilaksisi uygulanması tartişma konusu olmakla birlikte, genel kanı uygulanması gerektiği yönündedir (17,30).

Total diz protezi enfeksiyonlarını yüzeyel ve derin olarak iki bölümde inceleyebiliriz.

2.1.2.1. Yüzeyel Enfeksiyonlar

Yara kenarından uzayan seröz ya da serohemanjinöz akıntı primer artroplastilerin % 0,5'inde, revizyon artroplastilerinin ise %10'unda görülebilmektedir (31). Diğer taraftan geriye dönüp bakıldığında derin enfeksiyon tespit edilen dizlerin % 17 ile % 50 sinde bu tür seröz akıntuların olduğu tespit edilmiştir (31). Bu nedenle Weiss ve ark. seröz akıntuların tedavisinde cerrahi debridman ve irrigasyon önermektedirler (31). Bu yaklaşım akla bazı sorular getirebilir. Acaba ortada tipik semptomatik bir enfeksiyon yokken hastaya ek bir cerrahi girişim gerekli midir, bu cerrahi girişimin geciktirilmesi derin enfeksiyon gelişmesi riskini artırır mı, seröz materyali boşaltmak için yapılan cerrahi girişim tek başına enfeksiyon nedeni olma ihtimali gibi sorular hakkında literatürde net bir yanıt yoktur.

Weiss ve arkadaşları yıkama işleminin herhangi bir morbiditeye neden olmadığını ve 4 yıllık izleme sonunda olgularının hiç birinde

enfeksiyon gelişmediği söylemektedirler (31). Insall ve ark. ise dize aspirasyon yapılmasını ve kültür negatif ise 1 hafta beklenmesini; bu süre içinde elastik bandaj, immobilizasyon ve buz uygulanmasını önermektedir (32). Kültür pozitif ise cerrahi girişim kaçınılmaz olacaktır.

2.1.2.2. Derin Enfeksiyonlar

Literatürde derin enfeksiyon oranı TDA sonrasında % 0,4 ile % 10,3 gibi geniş bir aralıkta bildirilmiştir, bu konuda en sağlıklı kaynaklar İsveç diz artroplastisi projesine aittir. Bu seride osteoartritli dizlerde yapılan diz protezi sonrası enfeksiyon oranı %1.7, romatoid artritli dizlerde yapılanlarda ise % 4,4 olarak bulunmuştur (15,33). TDA'da enfeksiyon kaynaklarına göre bakıldığında öncelikle cilt florası ardından da, fekal floranın geldiği görülür. Tablo 2 'de total diz artroplastisinde görülen etken patojenler ve görülme sıklıkları verilmiştir.

Tablo 2: TDA da etken patojenler ve görülme sıklıkları (15,17,24,33)

<u>Aerop bakteriler</u>	<u>%</u>
➤ <i>S. Aureus</i>	8-63
➤ Koagülaz negatif stafilokoklar	5-45
➤ Streptokoklar	4-22
✓ <i>S. pyogenes</i>	1-4
✓ <i>S. fecealis</i>	3-12
➤ Enterobacter	6-28
✓ <i>E. coli</i>	2-11
✓ <i>Proteus</i>	3-8
✓ <i>Klebsiella-Serratia</i>	3-9
<u>Anaeorop bakteriler</u>	<u>%</u>
➤ Gr (+) koklar	
✓ <i>Peptokok-Peptostreptokok</i>	1-14
✓ <i>Propionobakter-Difteroidler</i>	8-24
➤ Diğer anaeroplara	1-4
<u>Diğer bakteriler</u>	<u>1-7</u>
<u>Mantarlar</u>	<u>1</u>

Bu tabloya eklenmesi gereken bir grupta mix enfeksiyonlardır. Aoran A. ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada % 8 mix enfeksiyon görmüşlerdir. Bu mikroorganizmaların dağılımı E. coli + S. aureus + Klepsiella %2, S. aureus + Grup B streptokok % 4, S. epidermidis + streptokok % 2 şeklinde olmuştur (34). Benzer şekilde günümüzde metisilin dirençli S. aureus (MRSA) artan sıklıkta görülmektedir.

Hayakawa ve arkadaşlarının 19 enfekte diz protezi üzerinde yaptıkları bir çalışmada, 8 hastada MRSA üremesi görmüşler ve S. aureus (metisilin duyarlı) ile MRSA'yı en sık rastlanılan mikroorganizmalar olarak bulmuşlardır (35).

2.1.3. Enfeksiyonun Tanısı

TDP enfeksiyonları ilk 3 ay içinde ortaya çıkmışsa erken; 3 ay ile 24 ay arasında ortaya çıkmışsa gecikmiş; 24 aydan sonra ortaya çıkmışsa geç enfeksiyon olarak adlandırılır (36). Enfeksiyon erken dönemde ortaya çıkmışsa klinik olarak gürültülüdür. Ağrı, efüzyon, şişlik, kızarıklık, lokal ısı artışı görülür. Bazende akıntılı fistül ağzı tabloya eşlik edebilir. Bu durumlarda S. aureus veya Gr negatif basil gibi virulansı yüksek mikroorganizmalar düşünülmelidir. Geç dönemde ortaya çıkan enfeksiyonlardan ise genellikle koagülaz negatif stafilokoklar gibi virulansı düşük mikroorganizmalar sorumludur. Geç dönem enfeksiyonlarda öncelikli şikayet ağrıdır. Daha ileri dönemlerde implantta gevşeme bu tabloya eklenebilir. 6 ayı geçmesine rağmen bir dizde hala ağrı oluyorsa enfeksiyon lehine düşünülmelidir. Dolayısıyla geç dönemde enfeksiyonu

aseptik gevşemeden ayırmak zordur. Ayrıca tanıda laboratuvar tetkikleri, radyografi, aspirasyon, sintigrafi kullanılmalıdır (37).

Protez enfeksiyonlarında mikroorganizmanın inokulasyon yoluna baktığımızda; erken ve gecikmiş dönem enfeksiyonlarda, mikroorganizmanın protez implantasyonu sırasında alındığını, geç dönem enfeksiyonlarda ise mikroorganizmanın hemotojen yolla protez üzerine oturduğu görülür. Burada bakteriyeminin kaynağı sıklıkla cilt, solunum yolları, dental ve üriner sistem enfeksiyonlarıdır (37).

2.1.3.1. Laboratuvar İncelemeleri

Protez enfeksiyonunda sedimentasyon ve C Reaktif Protein (CRP) gibi akut faz reaktanları yükselebilir. Ancak bu reaktanlar romatoid artirit gibi eşlik eden çeşitli kronik hastalığı bulunan hastalarda da yüksek olabileceğinden spesifik değildir. Diğer bir risk ise erken ve gecikmiş olarak başlayan protez enfeksiyonlarında geçirilmiş operasyona bağlı olarak bu reaktanların yüksek olmalarıdır. Eritrosit sedimentasyon hızı ve CRP nonspesifik testler olmakla birlikte, ikisinin eşzamanlı yüksekliği enfeksiyon tanısına yardımcı olabilir. Enfeksiyonlarda, sedimentasyon ve CRP eşzamanlı yüksekliğinin duyarlılığı %99, özgünlüğü %89'dur. Protez eklem operasyonu sonrası CRP 21 gün içinde normale dönerken, sedimentasyonun normale dönmesi 90 günü alabilir (38).

2.1.3.2. Radyoloji

Radyolojinin değerli olması için implantasyondan itibaren 'değişikliklerin karşılaştırılabileceği' seri grafiler gereklidir. Yeni

subperiosteal kemik oluşumu, transkortikal sinus traktı görülmesi enfeksiyon için spesifiktir. Ayrıca implantın migrasyonu ve periprostetik osteoliz, enfeksiyon ile uyumlu olabilir (37).

2.1.3.3. Histopatolojik çalışmalar

Periprostetik dokudan yapılan kesitlerin mikroskop altında incelemelerinde, 400 büyütme her büyütme sahasında, 10'un üzerinde nötrofil görülmesi akut inflamasyon düşündürmelidir. Bu yöntemin duyarlılığı % 80, seçiciliği % 90' dır (37).

2.1.3.4. Mikrobiyolojik çalışmalar

Enfeksiyon tanısında aspirasyon sıvısının bakteriyolojik incelemesi altın standarttır. Bazı çalışmalar aspirasyon sıvısının kültür değerlendirmesinin % 100'e varan doğrulukta seçici ve duyarlı olduğunu bildirmektedir (39). Aspirasyon mayisinde $25000/ \text{mm}^3$ 'den fazla polimorf nüveli lökosit bulunması, protein değerinin yükselmesi ,(normalde kan değerinin 1/3 ü) glukoz değerinin düşmesi (normalde kan değeri ile aynı) enfeksiyon lehine bulgulardır (33,40).

Her ne kadar aspirasyon sıvısı kültür incelemesi altın standart olsada daha önceki antimikrobiyal tedavinin , sıvıda düşük sayıda organizma bulunması, uygunsuz kültür ortamı, özellikli mikroorganizmaların ,alınan kültürün mikrobiyoloji laboratuvarına geç ulaşmasının yanlış negatif sonuç vereceği unutulmamalıdır (37).

2.1.3.5. Sintigrafi

Teknesyum 99 kemik sintigrafisi, 3 fazlı yapıldığı zaman bile enfeksiyon tanısı için duyarlı olmakla birlikte seçici değildir. Diğer yandan Galyum 67 sintigrafisinin duyarlılığı % 83 , seçiciliği % 79 ; İndium 111 işaretli lökosit sintigrafisinin duyarlılığı % 83-100 , seçiciliği ise % 90 olarak bulunmuştur (41,42). Sonuç olarak sintigrafi, enfeksiyon tanısında kesin sonucu gösteren bir inceleme olmamakla birlikte, kararsız kalındığında, duyarlılığındaki üstünlüğü nedeniyle, eklem ponksiyonu gibi seçiciliği yüksek incelemelere karar verme ve ayırıcı tanı için kullanılabilir. Tüm bu anlatılanların ışığında yine de bazı vakalarda kararsız kalınabilmektedir.

2.1.4. Enfekte Diz Protezi Tedavisi

Enfekte total diz artroplastisinin tedavisinde sadece antibiyotik supresyonu gibi konservatif tedavilerden artrodez, amputasyon gibi radikal cerrahi girişimlere uzanan pek çok teknik tanımlanmıştır.

Tablo 3: Enfekte total diz artroplastilerinde tedavi yöntemleri

- Antibiyoterapi
- Debritleme + antibiyotik
- Rezeksiyon artroplastisi
- Artrodez
- Amputasyon
- Protezin değiştirilmesi
 - ✓ Tek aşamalı
 - ✓ İki aşamalı

Bu tedavi yöntemlerinden hangisinin seçileceği bir çok faktöre bağlıdır. Enfeksiyonun görülme zamanı , hastanın yaşı, genel sağlık durumu, immünolojik durumu, ayrıca enfekte eden mikroorganizmanın virülansı önemlidir (43).

2.2.OZON TEDAVİSİ

Ozon terapi günümüzde özel sağlık sektöründe geniş uygulama alanı bulmakta ancak uygulayan çevreler tarafından abartılı bir şekilde sunulmakta ve toplumda karşılanması imkansız beklentilere neden olmaktadır. Öte yandan ozon tedavisinin çeşitli hastalıklarda etkinliğini inceleyen ve sıklıkla doğrulayan yazılar da literatürde artan oranda belirmeye başlamıştır. Türkiye’de henüz konu ile ilgili resmi bir düzenleme yoktur.

2.2.1.Ozonun Tanımı

Ozon (O_3) embersel  oksijen atomundan oluşan, kararsız, depolanamayan, çok açık mavi renkli, keskin kokulu ve havadan daha ağır bir gazdır. Oksijenden 1,6 kat daha yoğun ve 10 kez daha fazla suda çözünür olan bu gazın yarılanma ömrü 20 C ’de 40 dakikadır (44). Adı Yunanca “koku yayan” anlamına gelen “ozein” kelimesinden türemiştir. Oksidan ajanlar arasında florin ve persulfattan sonra nc en kuvvetli oksidan olanıdır. Atmosferdeki ozonun %90’ına yakını, yer yüzeyinden yaklaşık 20–50 km yüksekte bulunan stratosfer tabakası içinde yer alır. Geri kalan %10’luk ozon miktarı ise 10–15 km’ler arasındaki troposfer tabakası

içinde bulunmaktadır (45). Ozonun stratosferdeki varlığı güneşten gelen ultraviyole B ve C ışınlarını engellediği için hayati iken, yaşadığımız hava katmanı olan troposferde bulunması solunum yolları için çok tehlikelidir ve hava kirliliği olarak kabul edilir (46). Ozon gazı canlılar için toksiktir. Antioksidan kapasiteleri çok düşük olduğundan akciğer ve gözler ozonun toksik etkisine en hassas organlardır. Zarar ozon gazının ortamdaki konsantrasyonu [ppm - part(s) per million], ortamdaki sıcaklık, nem (ozon nemli ortamda daha aktiftir) ve maruziyet süresine göre değişir (47). Direkt maruziyette ciddi sağlık sorunlarına yol açabilen ozon, atmosferdeki bir nevi radyasyon kalkanlığı yanında uzun süredir gıda ve sterilizasyon endüstrisinde ve veterinerlik alanlarında insanlığın hizmetindedir.

2.2.2. Tıbbi ozonun tanımı

Tıpta kullanılan ozon özel jeneratörlerde saf oksijenin yüksek voltaj farkından geçmesi sonucu elde edilir. Jeneratörden çıkan bu gazın sadece %3 ila %5'i ozondan oluşmaktadır, geriye kalan kısım ise oksijenden ibarettir (48). Ozonu tıpta kullanabilmemiz için ozon cihazlarının ozon üreten kısımlarının çelik (V4A kalitesinde), özel olarak anodlanmış alüminyum, seramik, cam ya da teflon (PTFE) gibi reaksiyona girmeyen maddelerden yapılması gerekirken, ozon vermek için kullanılan donanımların ise cam, polietilen, polipropilen veya teflon olması önerilmektedir (44,46). Ozon üretiminde normal hava kullanıldığı takdirde içindeki yüksek azot oranı nedeniyle toksik N_2O_2 (nitrojen dioksit) ortaya çıkar, bu nedenle önerilmez.

Ozon konsantrasyonu fotometre ile ölçülür. Bunun için mor ötesi dalga boyuna yakın 254 nm bandı kullanılır. Ozon terapisinde genellikle “gama” birimi kullanılır. Bu 1 mL ozon/oksijen karışımında 1 µg ozon demektir.

2.2.4. Ozon tedavisinin tarihçesi

Ozon gazını Alman kimyacı Christian Friedrich Schonbein 1839 yılında keşfetmiştir. Ozonun tıpta kullanımının Birinci Dünya savaşı sırasında A. Wolff (1915) tarafından başlatıldığı bilinmektedir. Payr 1935’te ilk kez sonuçlarını bilim dünyasına sunmuştur. Tıpta kullanılan ilk ozon jeneratörü Doktor Joachim Hansler tarafından 1958’de tasarlanmıştır. Klinikte rutin kullanıma da H. Wolff tarafından 1960’ların sonlarına doğru sokulmuştur. Ozon terapi Rokitansky (1977) ve Werkmeister’in (1981) kronik yaraların tedavisinde ozonu kullanmaya başlaması ile yeni bir ivme kazanmıştır (45,49).

2.2.5. Ozonun etki mekanizması

Ozonun etki mekanizmasını kimyasal ve klinik olmak üzere iki ayrı düzlemde incelemekte yarar vardır.

2.2.5.1. Organik ortamlarda ozon kimyası

Ozon gazı kuru ortamda etki göstermez. Su, plazma, lenf, serum, ya da idrarda eriyen ozon, reaksiyona girecek bir biyomolekül bulduğunda bu molekülü oksitlerken aynı zamanda ortama da oldukça reaktif oksijen verir. Bu olay basitçe aşağıdaki gibi özetlenebilir:



Ozon tercih sırasına göre ilk olarak çoklu doymamış yağ asitleri (polyunsaturated fatty acids -PUFA) ile reaksiyona girer, bunu askorbik asit, ürik asit gibi antioksidanlar, sistein gibi –SH grupları içeren tiyol bileşikleri, redükte glutatyon (GSH) ve albumin izler. Konsantrasyona bağlı olarak ozon karbonhidratlarla, enzimlerle, RNA ve DNA ile de reaksiyona girebilir. Tüm bu biyomoleküller elektron alıcısı olarak rol oynarlar (3). Ana reaksiyon şu şekilde formulize edilebilir:



Burada 1 nolu komponent PUFA, 2 ve 3 no'lu komponentler ise okside olmuş yağ asitleridirler (lipid oxidation product -LOP). Bu reaksiyondan ortaya çıkan hidrojen peroksit (H_2O_2) başlıca reaktive oksijen türevidir (reactive oxygen species -ROS) (50). Ozonun yağlarla olan reaksiyonunda her zaman karbon atomları arasındaki çift bağlar etkilenirken, proteinlerde çoklu aminoasit içeren işlevsel yan zincir bağları etkilenir (51,52). Oksijen radikali olarak kabul edemeyeceğimiz H_2O_2 aslında ikincil haberci olarak pekçok biyolojik ve tedavi edici etkilere aracı olur (53,54).

2.2.5.2. Klinik uygulamalarda ozonun etki mekanizması

Ozonun vücuda verilen “kontrollü” oksidatif stres olduğunu söyleyebiliriz (47). Ozonun etki mekanizması uygulama biçimine göre

değişiklik gösterir. Bugün en sık kullanılan ozon terapi yöntemi hastanın kendi kanının belirli konsantrasyonlarda ozona maruz bırakıldıktan sonra geri verilmesidir. Ozon gazı hemen plazmada erir ve kan hücrelerinin zarlarındaki doymamış yağ asitleri ile reaksiyona girip onları oksitlerken aynı zamanda da başta hidrojen peroksit olmak üzere pek çok ROS meydana gelir. ROS plazmada aşırı derecede hızlı oluşur ve ortamdaki antioksidan kapasite %5-25 kadar azalır (55). Ancak bu etki geçicidir ve 15-20 dakika içerisinde bir toparlanma olur (56). Bu arada bir miktar H_2O_2 hücre içine girmiş ve birçok metabolik reaksiyonu tetiklemeye başlamıştır. Hücre içine giren H_2O_2 hemen antioksidanlar tarafından nötralize edilir, öyle ki hücre içi peroksit konsantrasyonu plazma konsantrasyonunun %10'undan yüksek olamaz (57). Buraya kadar anlatılan reaksiyon sıklıkla kan vücuda geri verilmeden önce olup bitmiştir.

ROS çok stabil değildir ve vücuda verilmeden önce bozulmaya başlamıştır. LOP daha karardır, ancak o da kana verildiğinde hemen seyrelmeye maruz kalırlar, aynı zamanda da safra ve idrarla bir kısmı dışarıya atılır. Geri kalanlar ise GSH-transferaz (GSH-Tr) ve aldehid dehidrogenaz (ALDH) sistemleri ile metabolize edilir. Geriye kalan mikromolar konsantrasyondaki bu maddeler vücutta devam eden bir oksidatif stresin haberci molekülleri olarak vücuda yayılır (58). Bunun sonucunda vücuttaki süperoksit dismutaz (SOD), GSH-peroksidaz (GSH-Px), GSH-redüktaz (GSH-Rd) ve katalaz (CAT) gibi antioksidan enzimlerin üretimi artar. Ayrıca LOP oksidatif stres proteinlerini de indükler. Heme-oksijenaz I (HO-I) bunlardan birisidir (59). Bocci ozon tedavisini yukarıda

belirtilen fizyolojik ve biyokimyasal tepkimeler nedeniyle “tedavi edici şok” olarak isimlendirmektedir (46).

2.2.5.3. Ozonun hücre seviyesindeki etkileri

Daha önce de belirtildiği gibi ozonun bizzat kendisinin biyolojik bir etkisi söz konusu değildir. Ortaya çıkan ROS ve LOP ların pek çok etkisinden bahsedilse de çoğu spekülasyon niteliğindedir. Aşağıda literatürde nispeten güvenilir çalışmalar sonucunda elde edilen bilgiler ortopedinin alanları içinde özetlenmiştir.

Kemik iliği:

Ozon → kan → LOP → kemik iliği → matriks metalloproteinaz salınımında artma (özellikle MM9) → kök hücrelerinin kemik iliğinden ayrılması (60). Bu mekanizma henüz tam olarak kanıtlanmamıştır.

Alyuvar:

Ozon → kan → H₂O₂ → alyuvar → hücre içi glutatyon/glutatyon disülfid (GSH/GSSG) oranında azalma → redükte nikotinamid adenine dinükleotid fosfat/ nikotinamid adenine dinükleotid fosfat (NADPH/NADP) oranında azalma → Glukoz 6 fosfat dehidrogenaz (G-6PD) seviyesinde yükselme → pentaz fosfat pathway aktivitesinde artma → Glikolizde artma → ATP miktarında artma (60).

Ozon → kan → H₂O₂ → alyuvar → hücre içi pH'da düşme ve 2,3 difosfogliserid (2,3DPG) miktarında artma → oksijen ayrılma eğrisinin sağa kayması → dokulara oksijen verilmesinde artma (61).

Endotel hücreler:

Ozon → kan → LOP → endotel hücresi → nitrik oksit (NO) ve karbon monoksit (CO) salınımında artma ve plazma S-nitrosothiyollar ve S-nitrosohemoglobin seviyesinde artma → vazodilatasyon (63,64)

Platelet:

Ozon → kan → H₂O₂ → platelet → agregasyonda artma (64)

Bunun tam tersini iddia eden çalışmalar da var. Hemodializ hastalarına 50 gamadan haftada 3 kez majör otohemoterapi (MOH) uygulanan bir çalışmada platelet agregasyonunda kontrol gruba göre hiçbir fark bulunamamıştır (65). Bu çalışmada sitratlı antikoagülan kullanımını tavsiye ediliyor. Bilindiği gibi ortamda bulunan kalsiyum agregasyonu tetikleyebiliyor.

Ozon → kan → H₂O₂ → platelet → growth faktör üretiminde artma (64).

Bağışıklık hücreleri:

Ozon → kan → H₂O₂ → bağışıklık hücreleri → akut faz reaktanları, interlokinler, sitokinlerde artma. Ancak bu artış doz ile orantılı değildir, yaklaşık 40 µg/ml'den sonra belirgin bir artış görülmez (61,66,67).

2.2.6.Ozonun vücuda verilış yolu

Solunum yolu hariç tüm yollardan verilebilir (67). Bunlardan başlıcaları:

2.2.6.1.Majör otohemoterapi (MOH)

Hastadan 200-270 mL' ye kadar kan alınır ve uygun doz ozon gazı kanın bulunduğu kabın içine verilerek kanla 5-10 dakika kadar temas etmesine izin verilir, takiben 15 dakika içerisinde ozonlanmış kan damardan geri verilir. Bir merkez MOH da her mL kana 15µg ile 80 µg/L arasında ozon miktarı verilmesinin güvenli tedavi penceresi içerisinde olduğu kabul etmekteyken (68), bir başka merkez ise güvenlik sınırını her mL kan için 10-40 µg önerebilmektedir (44). Kana verilen ozon plazma tarafından tamponlanır, diğer bir deyişle olası zararlı etkileri azaltılır. Plazma olmadığı durumlarda, alyuvarlar SF içindeyken, ozonla temas hemoliz oranı %10' a kadar çıkarabilir (69). Oysa bu oran aynı konsantrasyon ozonda normal kanda %0,5'ten fazla değildir (61,70). Konsantrasyon 200 µg/mL ye çıkarıldığında ise hücrelerin %7'sinde hemoliz görülür (70). Ozonun antioksidan etki göstermeye başladığı eşik miktar 15-20 µg/mL olarak rapor edilmiştir (70). Bu miktarın altındaki konsantrasyonlarda kanda hazır bulunan antioksidan mekanizma ile etkisini göstermeden ROS 'lar nötralize olur (71). Ozon tedavisine yeni başlayanlar için en yararlı ilke düşük dozdan başlayıp çok yavaş bir şekilde dozu yükseltmektir. Somuta indirgenecek olursa 15 µg/mL den başlayıp yavaş yavaş 40 µg/mL ye kadar çıkmak olarak ifade edilebilir. Normalde haftada 2 kez ozon tedavisi

uygulanır, ancak her gün, hatta günde 3 kez yapıldığı ve bir sorun olmadığı da bildirilmiştir (46). Özellikle yaşlı ve durumu iyi olmayan hastalarda ozonlanacak hacim 300 mL üzerine çıkmamalıdır.

2.2.6.2.Minör otohemoterapi (MİH)

Yaklaşık 5 mL kan alınır, eşit hacimde ozonla karıştırılır, köpük de dahil olmak üzere hemen gluteal bölgeye intramüsküler olarak verilir. Kan enjeksiyon sahasında pıhtılaşır. Oluşan lokal inflamasyonla çevreye mediator salınımı gerçekleştiği söylense de (46) henüz bunlar birer hipotez seviyesinde kalmaktadır.

2.2.6.3.İntraartiküler uygulama

Ozon eklem sıvısında çözündüğünde biyokimyasallarla (antioksidanlar, proteinler) tepkimeye girerek reaksiyonlara neden olduğu, proinflamatuvar sitokinlerin olası inhibisyonu nedeniyle eklem içi inflamasyonu azalttığı, düşük dozlarda eklem kıkırdağı, fibroblast ve kondrositlerin proliferasyonunu indüklediğini Prof. Dr.V.Bocci tarafından ifade edilmektedir.Aynı zamanda bradikinin salınımını, inflamatuvar prostoglandin salınımını belki de ödemin absorpsiyonu, böylece ağrının yok olmasında etkin rol aynadığı belirtilirken diğer taraftan TGF- β 1 VE IL-10 gibi immüsupresif sitokinlerin salınımıyla inflamasyonun inhibe edildiği belirtilmektedir.

2.2.6.4. Peroksidik yağlar

İçinden ozon geçirilen bitkisel (zeytin) yağda peroksitler ve ozonoidler oluşur. Bu uygulamanın gerek yanıklarda gerekse diğer yaralarda iyileşmeyi %40 oranına kadar hızlandırdığı rapor edilmiştir (72).

2.2.7. Ozonoterapinin klinik uygulamaları

Ozon terapi pek çok alanda yaygın olarak kullanılmaktadır. Aşağıda ozonun ortopediyi ilgilendiren alanlarda kullanım alanlarının bir kısmı tartışılacaktır. Dikkati çeken nokta ozon tedavisinin 3. Dünya ülkelerinde ve eski Demirperde ülkelerinde daha radikal ve cesaretle kullanılıyorken, Avrupa'da çok daha temkinli bir yaklaşım olduğu, Amerika ve Kanada'da ise tamamen yasak olduğudur. Aşağıdaki bilgiler değerlendirilirken işaret edilen yayının yapıldığı merkezin de dikkate alınması tavsiye edilir. Diğer bir konu ise klinik çalışmalarının çoğunun yönteminin henüz bilimsel olarak tatmin edici olmaktan uzak olmasıdır.

2.2.7.1.Yara iyileşmesi ve kronik yaralar

MİH'nin tendon ve ligaman proliferatif rejenerasyonunu sağladığını ve klinik uygulamaların çok iyi sonuç verdiğini söyleyen yazılar mevcut (73,74), ancak bunların sonuçlarına güvenmek oldukça zor görünmektedir. Ateşli silah yaralanmasına maruz kalan ve deri gerfti konulan hastalarda ozon gazı uygulaması ile greft başarısının %40'tan %75'e çıktığı rapor edilmiştir (75). Bir başka çalışmada ise 200 kronik yaralı hastanın 187'sinin ozon tedavisi sonucunda belirgin iyileşme gösterdiği bildirilmiştir (74). Öte yandan hava kirliliği sonucu atmosferdeki yüksek orandaki ozonun yara iyileşmesini ters yönde etkilediği hayvan modelinde gösterilmiştir (76,77).

Sağlıklı bireyler üzerinde yapılan çalışmada ozonun TNF- α , IFN- γ ve IL-2 ve diğer interlökin seviyelerini belirgin bir şekilde yükselttiği

gösterilmiştir (78,79). Tüm bunlar olurken nötrofil fonksiyonlarının bozulmadığı saptanmıştır (80).

Ozon terapinin radyoterapi sonrası oluşan cilt reaksiyonlarında ağrıyı ve cilt reaksiyonlarını azaltmada etkili olduğunu savunan çalışma mevcut ancak hasta sayısı sınırlı ve kontrol grubu olmadığından güvenilirliği tartışmalı görünmektedir (81). Ozonun etkisi özellikle diyabetli hastalarda dikkat çekicidir. Diyabetin patogeneğinde artmış oksidatif stresin ve azalmış antioksidan kapasitenin varlığı kanıtlanmış durumdadır (82,83). Yara iyileşmesini desteklemesinin ötesinde, endotel seviyede NO/O₂ oranının tekrar dengelenmesini sağlayan ozon terapinin diyabetik ayak oluşumuna giden aşamaları en başından engellediği iddia edilmektedir (84). Benzer çalışmalar da ozonun diyabet nedeniyle vucutta oluşan oksidatif stresi engellediğini gösterilmiştir (85,86). Yapılan klinik çalışmalarda ise diyabetik ayaklarda belirgin bir iyileşme tanımlansa da çalışmanın dizaynı ve takip süresinin sadece 20 gün olması sonuçları inandırıcılıktan uzak kılmaktadır (87).

Ozon tedavisinin kronik bacak iskemisinde etkili olduğunu iddia eden çalışmalar mevcuttur (88-91). Bu etkinin dolaylı olarak iskemik yaraların iyileşmesine olumlu yönde katkıda bulunması beklenebilir. İskemik yaraların ozonlu su ile yıkanması ile yapılan lokal yara bakımının tatmin edici sonuçları rapor edilmiştir (44).

2.2.7.2. Antibakteriyel etki

Ozonun antibakteriyel etkisi bu maddenin ilk kullanım alanıdır. Sharma ve Hudson tarafından yapılan bir çalışmada ortama verilen 25 ppm

lik bir ozon gazının 20 dakika içerisinde kuru yüzeyler ve gereçler dahil ortamdaki hastane kökenli pek çok bakteri için, ki bunların arasında *Acinetobacter baumannii*, *Clostridium difficile*, ve methicillin-dirençli *Staphylococcus aureus*'u sayabiliriz, bakterisidal olduğu gösterilmiştir (92). Lokal tedavilerde 80 ve 100 µg/ml gibi yüksek konsantrasyonlarda ozon “yarayı temizlediği”, diğer bir deyişle dezenfektan görevi gördüğü, 10-40 µg/mL civarında ise “yarayı iyileştirdiği” ya da epitelizasyon ve granülasyonu artırdığı rapor edilmiştir (44).

2.2.7.3. Mandibula avasküler nekroz

Özellikle bu patolojide oldukça etkileyici sonuçlar bildirilmiştir (93,94), ancak uygulanan tedavi yöntemi daha çok diş hekimliği donanımını gerektirmektedir.

2.2.8. Yan etkiler ve kontraendikasyonlar

En sık rastlanılan yan etki hemolizdir, terapatik dozlarda dahi bu oran %0,4 ile 1,2 arasında tanımlanmıştır (95). Aynı yazıda bu miktarda bir hemolizin ortama HO-1 verdiğiinden ötürü yararlı ve istenilen bir şey olduğu savunulmaktadır. Tabii ki tüm bunların yanında ozonu “toksik”, ozon tedavisinin ise “zararlı” olduğunu iddia eden çalışmalar da yok değildir. Özellikle Cataldo ve Gentilini (96) ozonun hemoglobin ve kolesterol molekülleri üzerindeki yıkıcı etkilerini göstermişlerdir. Buna karşılık direkt insan kanı üzerinde yapılan başka bir çalışmada ise tam aksi sonuca varıldığı iddia edilmiştir (97). Aslında ozon terapiyi savunanlar da ozonun “toksik” bir ajan olduğunu yadsımıyorlar ve asıl etkisinin de bu

yolla olduğunu belirtiyorlar. Bu fikre karşı Cataldo “Mithridatism” kavramını gündeme getiriyor (98). Efsaneye göre Pontus Kralı 6. Mithraides’in kendisini zehirlenmelerden korumak için düzenli olarak az miktarda zehir almış ve zehire karşı bağışıklık kazanmıştır, o kadar ki intihar etmek istemiş ama başaramamıştır (99). Buraya gönderme yaparak Cataldo arsenik ve radyasyonun düşük dozlarının stimulator etkisinin olduğunu ancak her ikisinin de tedavi amaçlı kullanımının düşünülmediğini, bu mantıkla ozonun neden bir istisna olduğunu soruyor.

Ozon tedavisinin, özellikle MOH ‘un kontraendikasyonları net bir şekilde literatürde belirtilmektedir. Ek olarak kronik akciğer patolojisi olan hastalarda ozondan uzak durmak akıllıca olacaktır. Diğer bir konu ise seropozitif hastalardır, bazı yayınlarda MOH kontraendikasyonu olarak kabul edilirken bu hastalıklarda işe yaradığı da savunulmaktadır (44).

Burada önemle belirtilmesi gereken konu ozon tedavisinin kontraendikasyonları kesin olmasına rağmen şu anda onaylanmış hiçbir endikasyonu olmadığıdır.

2.2.8.1. Ozon tedavisinin yapılmaması gereken durumlar

Ciddi G-6PD eksikliği (Favizm)

Hamilelik

ACE inhibitörü kullanımı

Astımlılar

Hipertiroidizm

Trombositopeni

Kalp sorunları

2.2.8.2. Komplasyonlar

Literatürde MOH sonrasında ölüm rapor edilmiştir (100). Otopside ölüm nedeni olarak gaz embolisi bildirilmiştir. Makalede otopsi sırasında dolaşım sisteminden ve kalpten önemli miktarda gaz çıktığı söylenmektedir. Yazarlara göre bunun en mantıklı nedeni hastadan alınan kan ozonlanırken kan kabının hasta ile bağlantısının kapatılmaması, dolayısıyla verilen ozon gazının direk dolaşıma katılmasıdır. Burada ölüm nedeni olarak bizzat ozon terapinin kendisi değil büyük bir uygulama hatası olduğu görülmektedir. Aksi takdirde 1-2 cc gazın ölümcül olmadığı bilinmektedir (101).

Aynı şey ozon terapi sonrası viral enfeksiyona maruz kalınması için de geçerlidir (102,103). Söz konusu komplikasyonlar ozona ait değil, uygulamaya ait komplikasyonlardır. Bakteriyel enfeksiyonlar için de bu geçerlidir (104). Ozon tedavisine atfedilen diğer bir vakada ise neden-sonuç ilişkisi kurmakta zorluk çekiliyor (105). Elbette her tedavi modalitesi gibi ozon tedavisinin de kendine özgü komplikasyonları vardır ve araştırılmalıdır. Literatürde ozonun direkt etkisinin olası olduğu vakalar da sunulmuştur (106,107). Ancak şu anda ozon terapinin yan etkilerini ve bunların mekanizmasını açıklayacak çalışmalara ihtiyaç vardır.

2.2.9. Ozon toksikolojisi (108)

2.2.9.1. Kısa dönem (akut) maruziyet

İnhalasyon:

Olası zararın miktarı konsantrasyon ve maruz kalma zamanı ile doğru orantılıdır. Unutulmamalıdır ki çok düşük dozlarda dahi ciddi sonuçlar ve

ölüm mümkün olabilir. 0.35 ppm'ye kadar oranlarda, özellikle de vücut aktivitesi fazlaysa bronşial hassasiyetle ilgili belirtiler ortaya çıkar ve 18 saate kadar sürebilir. 0.25-0.75 ppm arasındaki akut maruziyetlerde öksürme, nefes darlığı, göğüs kafesinde sıkışma hissi, dispne, boğaz kuruluğu, hırıltı, kusma ve bulantı görülür. 1 ppm' in üstünde maruziyetlerde akciğer fonksiyonlarında düşme, aşırı yorgunluk, baş dönmesi, uyuma güçlüğü ve konsantrasyonda güçlük ile siyanoz görülebilir.

Aralıklı olarak 9 ppm gibi yüksek konsantrasyonlarda hava yollarında inflamasyon başlar. İş kazalarında görülebilecek olan 11 ppm gibi bir orana 15 dakika maruz kalmak neredeyse tam bilinç kaybına neden olur. 50 ppm'ye 30 dakika maruziyet ölümcül olarak kabul edilir.

Ozonun solunum sistemine olan toksik etkileri 24 saate kadar ortaya çıkmayabilir. Ozonun bu etkilerine zamanla tolerans gelişebilir.

2.2.9.2. Uzun dönem (kronik) maruziyet

İnhalasyon:

Özellikle iş ortamında uzun süreli maruziyetlerde başağrısı, göğüs kafesinde sıkışma hissi, pulmoner ödem, burun ve boğazda irritasyon görülebilir. Ozonun karsinojen, terotojen ya da embriyotoksik olup olmadığı konusunda yeterli çalışma yoktur. Aşırı aktif olan ozon hemen ortamdaki moleküllerle reaksiyona girdiğinden ve bozunduğundan vücutta birikmesi diye bir şey sözkonusu değildir.

2.2.10. Hiperbarik oksijen tedavisi ile karşılaştırılması

Amerikan Sualtı ve Hiperbarik Tıp Derneği tarafından hiperbarik oksijen tedavisinin (HBO) 13 endikasyonu tanımlanmıştır (109) .

Bu endikasyonların büyük kısmının ozonu savunan kesimler tarafından da endikasyon kabul edildiğini biliyoruz (46). Oter ve Korkmaz' da yazılarında MOH ve HBO nun ilke olarak benzer mekanizmalara sahip olduğunu, endikasyon çalışmasının maliyet bazlı yapılması gerektiğini savunmuşlardır (110). Ancak şu anda bizzat kendisinin tartışıldığı bir modalitenin, etkinliği kanıtlanmış bir tedavi yöntemi ile karşılaştırılmasının pratik bir değeri olmadığı ortadadır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmaya Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'nun 12.12.2012 tarih ve B.30.2.PAÜ.0.20.05.07/51 sayılı onayı alındıktan sonra başlandı. Çalışmanın deney aşaması Pamukkale Üniversitesi Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezi (DEKAM)' nde, mikrobiyolojik çalışmalar Pamukkale Üniversitesi Mikrobiyoloji Laboratuvarında, histopatolojik çalışmalar Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Patoloji Laboratuvarları'nda yapıldı.

3.1. Hayvanlar ve çalışma grupları

Çalışmada ağırlıkları 1800-2600 (ortalama 2000) gram olan toplam 24 adet dişi beyaz Yeni Zelanda tavşanı kullanılması planlanırken bakteriyel inokülasyon sonrası süreçteki takipte 16 adet tavşanın ölmesi üzerine çalışmaya 16 adet aynı özelliklerde dişi Yeni Zelanda tavşanı eklenmiş olup çalışma toplamda 40 adet tavşan ile tamamlanmıştır. Hayvanlar Pamukkale Üniversitesi Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezi (DEKAM)' nde standart laboratuvar diyetiyle beslenerek standart etik kurallara uyularak izlendi.

Hayvanlar her biri 6 tavşandan oluşan dört gruba ayrıldı. Tavşanların sağ diz eklemleri kullanıldı. Birinci grup **kontrol (K)**, ikinci grup **antibiyotik (AB)**, üçüncü grup **ozon (O)**, dördüncü grup **ozon+antibiyotik (OAB)** grubu olarak adlandırıldı.

3.2. Enfeksiyon ajanının hazırlanması

Deneysel protez enfeksiyonu oluşturmak için Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvar'ında S.aureus ATCC (American

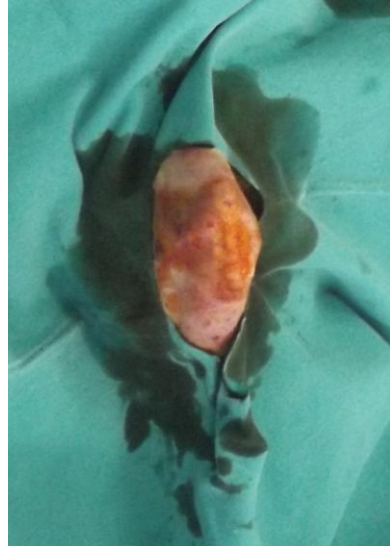
Type Culture Collection) 25923 suşu kullanıldı. Ön çalışma ile S.aureus suşunun virülansı test edildi. Kültür antibiyogram duyarlılık testi sonucunda sefazolin sodyuma duyarlıydı. Suşun %5 koyun kanlı agarda 24 saatlik inkübasyonundan sonra, üreyen koloniler kullanılarak %0,9 fizyolojik serum ile sulandırma sonrasında 2×10^5 cfu/ml'lik bakteri süspansiyonu hazırlandı. İnokülasyondan önce mikroorganizmanın bulunduğu tüpler bakteriyel proliferasyonun engellenmesi ve sayının standart olarak kalması için buzdolabında +4 °C'de saklandı.

3.3. Cerrahi müdahale ve bakteriyel inokülasyon

Cerrahi işlemler genel anestezi altında yapıldı. Anestezik ajan olarak 35 mg/kg i.m.ketamin ve 5 mg/kg i.m. xylosine kullanıldı. Tavşanlar ozon grubu, antibiyoterapi grubu, ozon+antibiyoterapi grubu ve kontrol grubu olmak üzere 4 gruba ayrıldı. Tavşanların diz lateralinden 2 cm'lik insizyon yapılarak ve eklem kapsülü açılarak femur lateral kondillerinden drill yardımı ile açılan tünele 0.1 mm kemik çimentosu uygulandı. Takiben yüksek molekül ağırlıklı polietilen (UHMWPE) washer(pul) ve vida yerleştirmeyi takiben staf. aureus inokülasyonu yapıldı ve eklem kapsülü 4/0 monoflaman polidioksanon emilebilir suture materyali ve cilt 3/0 sentetik emilmeyen suture materyali ile kapatıldı.



Şekil 1. Preop traş yapılmış tavşan sağ dizi



Şekil 2. Preop boyanmış ve steril örtülmüş sağ diz eklemi



Şekil 3. Tavşanların sağ dizlerine yerleştirilen vida ve pul örnekleri



Şekil 4. Vida ve polietilen yerleştirilmiş tavşan sağ dizi



Şekil 5. (Tavşan sağ dizi) Vida ve polietilen yerleştirildikten sonra suture edilmiş

3.4. Bakteriyel inokülasyon

Ardışık bir şekilde yapılan bu işlemlerden sonra +4 °C’de muhafaza edilen mililitrede 2×10^5 mikroorganizma içeren süspansiyonlardan diz eklemi içerisine medial portal girişi ile 1 ml miktarında dışarıya sızması önlenerek enjektörle diz eklemine verildi (Şekil 6).



Şekil 6. Bakteri süspansiyonunun diz eklemine verilışı

3.5. Cerrahi müdahale sonrası takip

İlk yedi gün boyunca hayvanların yara yeri pansumanı, klinik olarak lokal muayeneleri yapıldı ve takip edildi. Havyanlara herhangi bir şekilde immobilizasyon uygulanmadı.

Takip sürecinde; ozon grubunda, 1. Doz sonrası 1 adet tavşan öldü(ozon alımını takiben 48 saat sonra). 2. doz sonrasında 2 tavşanda ani ölüm gelişmiş olup histolojik çalışmasında 1 doz ozon almış kabul edilmiştir. 2. Doz sonrasındaki yaklaşık 40 saat sonrasında 2 adet tavşan ölmüş olup histolojik çalışmaya 2 doz ozon almış kabul edildi. 3. Doz sonrasında 1 adet tavşanda daha ani ölüm gerçekleşti ve histolojik çalışmada 2 kez ozon almış kabul edildi. Ozon grubuna yeni ilave edilen tavşanların takip süreçlerinde de 1 doz ve 2 doz ozon alan tavşanlarda 1'er

tane ölüm gerçekleşmiş olup ozon sonrasındaki takiplerinde öldükleri için histolojik çalışmaya 1 doz ve 2 doz ozon almış olarak kabul edildiler.

Antibiotik grubunda da 1 doz antibiotik sonrasında 2 adet tavşanda ölüm meydana gelmiştir. Antibiotik grubuna da 2 adet yeni tavşan ilave edilmiştir. Kontrol grubundaki tavşanlarda cerrahi işlem ve bakteriyel inokülasyon sonrasında farklı zaman dilimlerinde 6 adet tavşan ölmüş olup yerlerine aynı sayıda ve özellikte yeni tavşanlar eklenmiştir.

Herbir gruptaki ölen tavşanların yerlerine ilave edilen tavşanlara da aynı müdahaleler yapılmış olup önceden belirlenmiş olan tedavi şekilleri aynı şekilde ve sürede yapılmıştır. Kontrol grubuna da ilave edilen tavşanlara da aynı şekilde müdahale edilmiş olup 3 haftalık sürelerini doldurduktan sonra kurban edilmişlerdir.

3.6. Ozonun hazırlanması

Hayvanların sağ dizlerindeki irrigasyon sonrasındaki tedavi süreçlerindeki ozon uygulaması için elde etmiş olduğumuz “Cold Plazma Ozone Generatör” hayvan laboratuvarına yerleştirilmiş olup ozon uygulanacak her seansta her tavşan için her defasında ayrı ayrı elde edilmiş olup, elde edilen ozon vakit kaybetmeden sterilizasyon koşullarına dikkat edilerek tavşanların sağ dizlerine enjekte edilmiştir.



Şekil 7. Ozon jeneratörü (PZ-85, Cold Plazma Ozone Generator 110V-50 Hz, 110 V)

3.7. Protez enfeksiyonu gelişiminin doğrulanması

İnokülasyondan 1 hafta sonrası değerlendirilen hayvanların diz eklemi çevresinde değişen düzeylerde şişlik, ısı artışı pasif eklem hareketlerine karşı duyarlılık mevcuttu. Klinik olarak septik artrit gelişimini doğrulamak için yine anestezi altında ve steril koşullarda diz ekleminden aspirasyon yapıldı. Bazı hayvanların diz ekleminden belirgin şekilde pürülan karakterde materyal mevcuttu. Her gruptaki tavşanın dizine 1 cc sf ile irrigasyon yapıldı ve her gruptan 2 adet kültür örneği alındı. Alınan örnekler Pamukkale Üniversitesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Bakterioloji Ünitesi'ne gönderildi. Örnekler %5 koyun

kanlı agara ekilerek 35 °C’de bir gecelik inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası üreyen bakterinin S.aureus olduğu rutin mikrobiyolojik yöntemler kullanılarak doğrulandı.

Ekimden 2 gün sonra S. aureus’a karakteristik renkte kirli sarı kolonilerin tüm ekim yapılan besiyerlerinde oluştuğu görüldü. Bazı besiyerlerinde çok sayıda koloni oluşurken bazı besiyerlerinde bir ya da iki koloni oluştuğu görüldü. Besiyerlerinde bu şekilde üreme olduğunun görülmesi üzerine protez enfeksiyonu gelişimi doğrulanmış oldu.



Şekil 8. Kontrol grubundaki tavşanın bakteriyel inokülasyondan 1 hafta sonraki enfekte diz ekleminin görünümü

3.8. Hayvanların sakrifiye edilmesi

Sekizinci haftanın sonunda Ketamin HCl ve Xylazin HCl ile anestezi sağlandıktan sonra % 7,5'lik KCl (Potasyum Klorür % 7,5®, Galen İlaç San. ve Tic. A.Ş.) 5 ml intrakardiyak enjekte edilerek hayvanlar sakrifiye edildi.

Tavşanların protez enfeksiyonu oluşturulan sağ diz eklemi açığa çıkarıldıktan sonra femur distali suprakondiler bölgeden mikrotestereyle kesildi. Standart olarak bu kondillerden medial olanı histopatolojik inceleme için ayrıldı. Doku örnekleri histopatolojik inceleme için %10'luk formalin içerisinde muhafaza edildi.



Şekil 9. Kontrol grubundaki tavşanın sakrifikasyon öncesi enfekte diz ekleminin görünümü

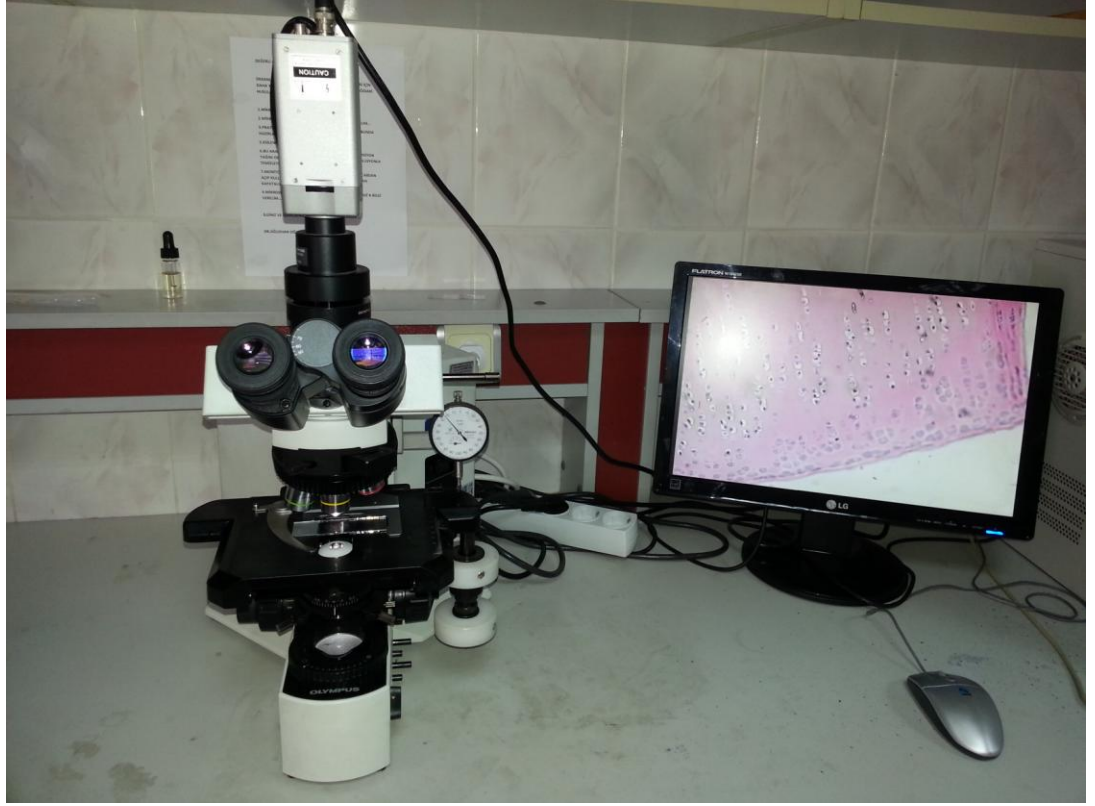


Şekil 10. Kontrol grubundaki diz ekleminin açılması sonrasında enfekte materyalin boşalması

3.9. Histopatolojik çalışma

Doku örnekleri Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Laboratuvarı'nda %10' luk nitrik oksit içerisinde dekalsifikasyon işlemine alınıp yaklaşık olarak 28 saatte dekalsifiye edildi. Daha sonra 30 dakika su ile yıkandı ve rutin doku takibine girdi. Kapalı sistem tam otomatik doku takip cihazında (Leica ASP 300) doku takibi yapıldı. Parafine gömülü bloklardan mikrotom ile 5µ'luk kesitler alınıp, preparatlar hematoksil-eozin (HE) ile boyandı. Hazırlanan preparatlar Pamukkale Üniversitesi Histoloji Laboratuvarı'nda Olympus BX51 ışık mikroskobu altında AnalySIS Research programıyla incelendi. Septik artritte kırıldak

değişikliklerinin değerlendirilmesi için Salter ve arkadaşları (86) tarafından geliştirilen modifiye edilmiş bir skorlama sistemi kullanıldı (Tablo 4).



Şekil 11.Çalışmada kullanılan ışık mikroskobu

Tablo 4. Kıkırdak hasarlarında histolojik-histokimyasal skora (Salter, 1981).

1.Kıkırdak hücre kaybı	Skor
Normal	0
%10'un altında	1
%10-%25 arasında	2
%25'in üzerinde	3
2. Erozyon veya matriks kaybı	
Normal	0
%10'un altında	1
%10-%25 arasında	2
%25'in üzerinde	3
3. Kondrositlerin kümeleşmesi	
Normal	0
%10'un altında	1
%10-%25 arasında	2
%25'in üzerinde	3
4. Yapışıkları veya pannus oluşumu	
Yapışıklık veya pannus yok	0
Sadece kıkırdak kenarlarında	1
%50'den az yüzeyi kaplamakta	2
%50'den fazla yüzeyi kaplamakta	3

3.10. İstatistiksel çalışma

Kontrol, ozon, antibiyotik ve ozon+antibiyotik grupları arasındaki histolojik farklılık Kruskal Wallis Varyans analizi kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirildi. Mann Whitney U testi kullanılarak 1 doz ozon alan grup ile 2 doz ozon alan grup istatistiksel olarak değerlendirildi. Gruplar arasındaki kültür sonuçları farklılığı (chi-square) χ^2 testi ile değerlendirildi.

4. BULGULAR

4.1. Klinik bulguların değerlendirilmesi

Tüm gruplarda cerrahi müdahale ve bakteriyel inokülasyondan sonraki ilk 48–72 saat içerisinde ısı artışı ve pasif eklem hareketlerine karşı duyarlılık başladı. Özellikle ilk 72 saat içerisinde pasif eklem hareketlerine karşı duyarlılık belirgindi. Bu bulgulara ilaveten hafif ve orta derecede şişlik de eşlik etmekteydi. Tüm tavşanlarda irrigasyon öncesi pasif eklem hareket açıklığı tamdı. Ancak eklem hareketlerine karşı duyarlılık ve bunun sonucunda direnç sözkonusuydu. Bazı tavşanların dizlerinden spontan olarak enfekte pürülan materyel gelmekteyken irrigasyon sırasında tüm hayvanların diz ekleminden değişen miktarlarda pürülan görünümde enfekte materyalin geldiği görüldü.

Sakrifikasyon öncesinde özellikle kontrol grubunda etkilenen diz eklemlerinde ileri derecede şişlik vardı. Yer yer uyluk proksimaline doğru yayılan organize abse oluşumları mevcuttu. Kontrol grubundaki bazı tavşanların dizlerinden spontan drene olan pürülan materyal mevcuttu. Pasif eklem hareketleri ileri derecede kısıtlanmıştı. Ozon grubundaki 1 ve 2 numaralı tavşanların dizlerinde spontan drene olan pürülan materyal, antibiyotik grubunda orta ve ileri derecede şişlik gözlemlendi.

Pasif eklem hareketleri hafif ve orta derecede kısıtlıydı. Ozon ve OAB gruplarında ise hafif ve orta derecede şişlik vardı. Pasif eklem hareketleri ise hafif derecede kısıtlıydı. Tüm gruplarda belirgin bir ısı artışı saptanmadı. Makroskobik olarak sakrifikasyon sonrasında inflamasyon değerlendirildiğinde, tüm gruplarda değişen derecelerde kapsülün

kalınlaştığı, sinovyal fibrotik dokunun artmış olduğu ve buna bağlı olarak değişen derecelerde hareket kısıtlılığına yol açan fibröz ankilozun geliştiği, bulanık renkte nekrotik inflamatuvar visköz sinovyal sıvı materyalin geldiği görüldü. Kontrol grubunda diğer gruplara göre özellikle eklem yük taşıyan yerlerinde, femoral kondillerin ön ve alt kısımlarında, belirgin eklem kıkırdağı hasarıyla beraber adezyonlar ve pannus oluşumu mevcuttu.

4.2. Histopatolojik inceleme sonuçları

Normal eklem kıkırdağının ışık mikroskopik görünümü Şekil 14’de görüldüğü gibidir.

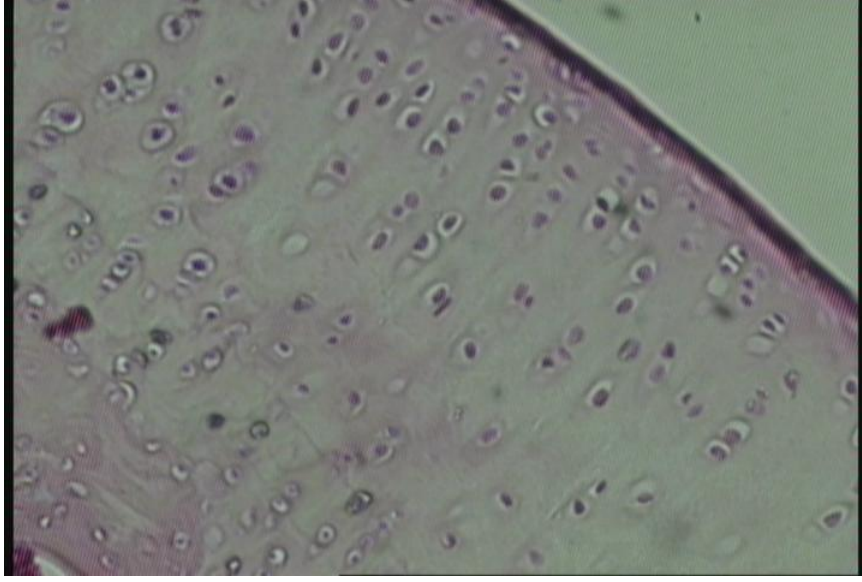
Kıkırdak hücre sayısı bakımından kontrol grubunda K-1, K-6 ‘da %10’un altında hücre kaybı; K-2, K-4 ‘te %10-25 arası hücre kaybı; K-3 ve K5’te %25’ in üzerinde hücre kaybı izlendi. Antibiyotik grubunda AB-2 ve AB-5 ‘te %10’un altında hücre kaybı izlendi. Ozon grubunda O-1, O-3 ve 1D-O-2, 2D-O-3 ‘te %10’un altında hücre kaybı; O-2, 1D-O-1, 1D-O-3, 2D-O-1, 2D-O-4 ‘te %10-25 arası hücre kaybı; 1D-O-4 ve 2D-O-2 ‘de %25’ in üzerinde hücre kaybı izlendi . Ozon-antibiyotik grubunda OAB-5 ‘te %10’un altında hücre kaybı izlendi.

Kıkırdak erozyonu bakımından kontrol grubunda K-1, K-4 ve K-6’da %10 ‘un altında kıkırdak erozyonu; K-2 ve K-5’de %10-25 arasında ve K-3 ‘te %25 ‘in üstünde kıkırdak erozyonu görüldü. Antibiyotik grubunda AB-4 ve AB-5 ‘te %10’un altında kıkırdak erozyonu vardı. Ozon grubunda O-1, O-4, 1D-O-1, 2D-O-3 ‘te %10’un altında; O-2, 1D-O-2, 1D-O-3, 1D-O-4, 2D-O-1, 2D-O-2, 2D-O-4 ‘te %25 ‘in üstünde kıkırdak erozyonu görüldü.

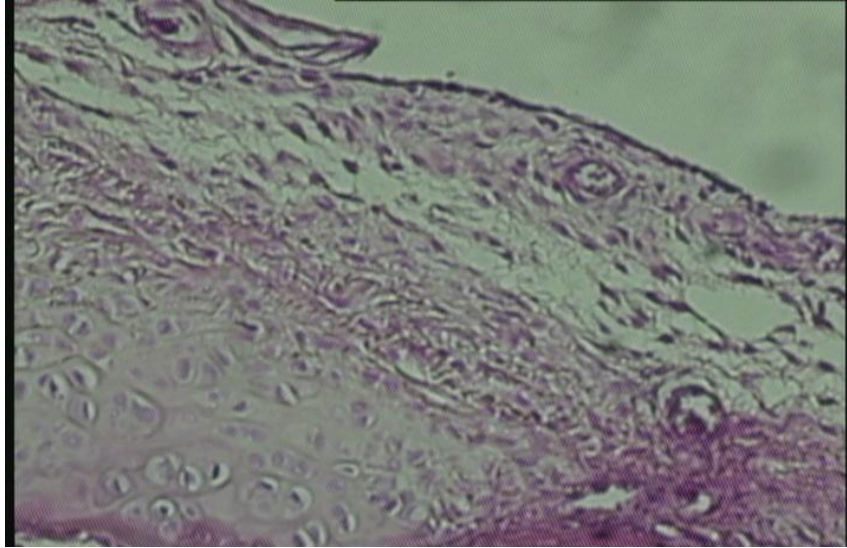
Ozon-antibiyotik grubunda ise sadece OAB-5 'te %10-25 arasında kıkırdak erozyonu görüldü.

Kondrositlerde kümeleşme bakımından kontrol grubunda K-2 ve K-4'te %10'un altında; K-1, K-5 ve K-6'da %10-25 arasında; K-3 'te %25 'in üstünde kümeleşme görüldü. Antibiyotik grubunda AB-2, AB-4 ve AB-5 'te %10'un altında kümeleşme izlendi. Ozon grubunda O-3, O-4, 1D-O-1, 2D-O-2, 2D-O-3'te %10'un altında, O-1, O-2, 1D-O-2, 1D-O-3, 2D-O-1, 2D-O-2 'de %10-25 arasında, 1D-O-4 'te %25 'in üstünde kümeleşme izlendi. Ozon-antibiyotik grubunda ise sadece OAB-5'te %10-25 arasında kümeleşme izlendi.

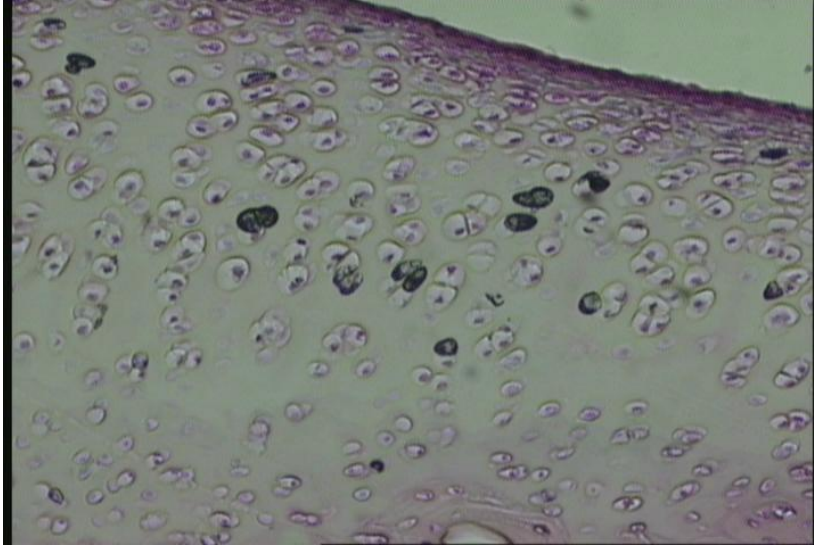
Pannus oluşumu veya adezyonlar bakımından kontrol grubunda K-1 ve K-4'te sadece kıkırdak kenarlarında; K-2 ve K-6'da %50'den az yüzeyi kaplayan pannus oluşumu; K-3 ve K-5'te %50'den fazla yüzeyi kaplayan pannus oluşumu izlendi. Antibiyotik grubunda AB-2, AB-4 ve AB-6'da yalnız kıkırdak kenarlarında pannus oluşumu izlendi. Ozon grubunda O-1, O-3, 1D-O-2, 2D-O-1 'de yalnız kıkırdak kenarlarında pannus oluşumu, O-2, 1D-O-1, 1D-O-3, 1D-O-4, 2D-O-2, 2D-O-3, 2D-O-4 'te %50'den az yüzeyi kaplayan pannus oluşumu izlendi. Ozon-antibiyotik grubunda ise OAB-4 ve OAB-5, yalnız kıkırdak kenarlarında az miktarda pannus oluşumu izlendi.



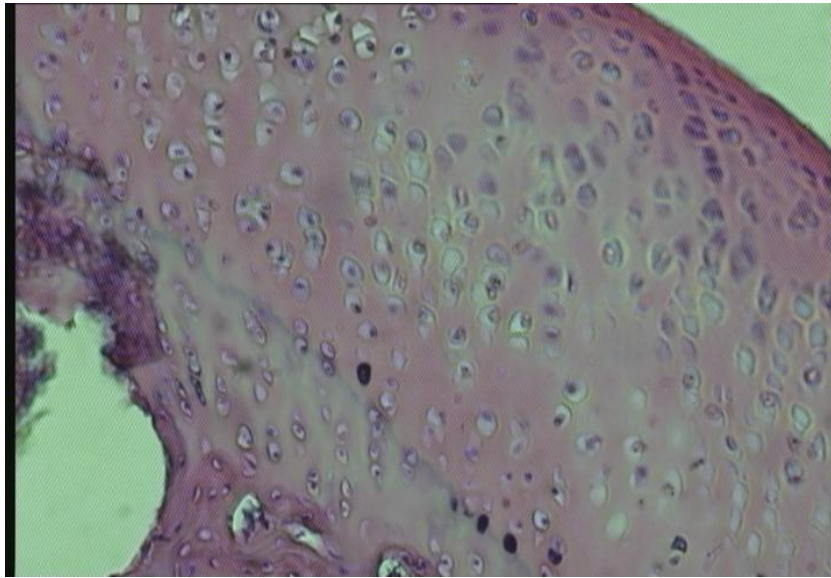
Şekil 12. Normal eklem kıkırdağının ışık mikroskopisi altındaki görünümü (HE, x10)



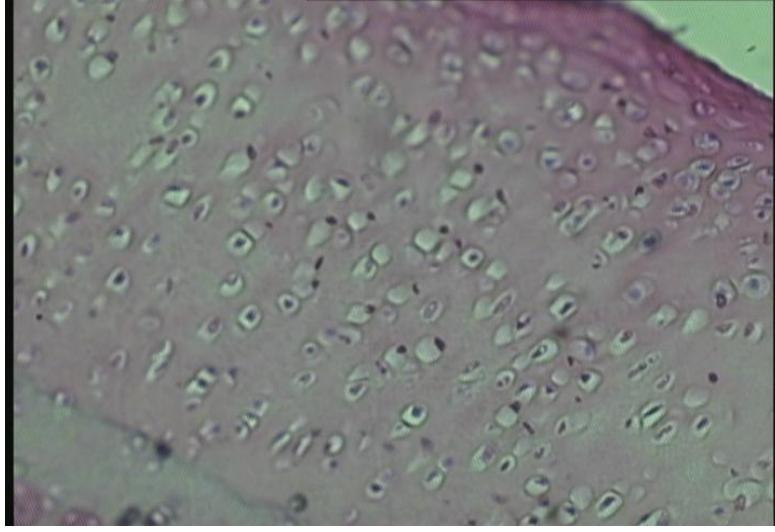
Şekil 13. K grubuna ait ışık mikroskopik görünüm (HE, x10) (Eklem kıkırdağında düzensizlik, erozyon ve kıkırdak tabakanın üstünü örten pannus oluşumu izlenmekte)



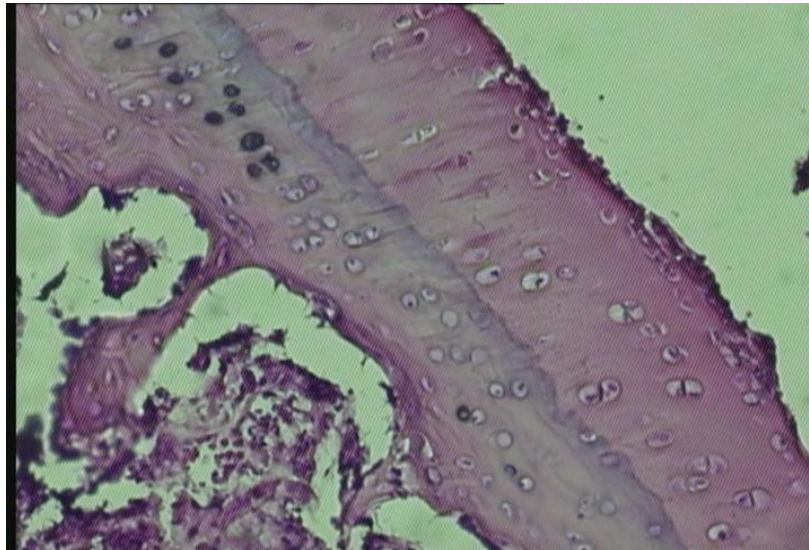
Şekil 14. AB grubuna ait ışık mikroskopik görünüm (HE, x10)
(Kondrositlerin yer yer kümeleşmesi izlenmekte)



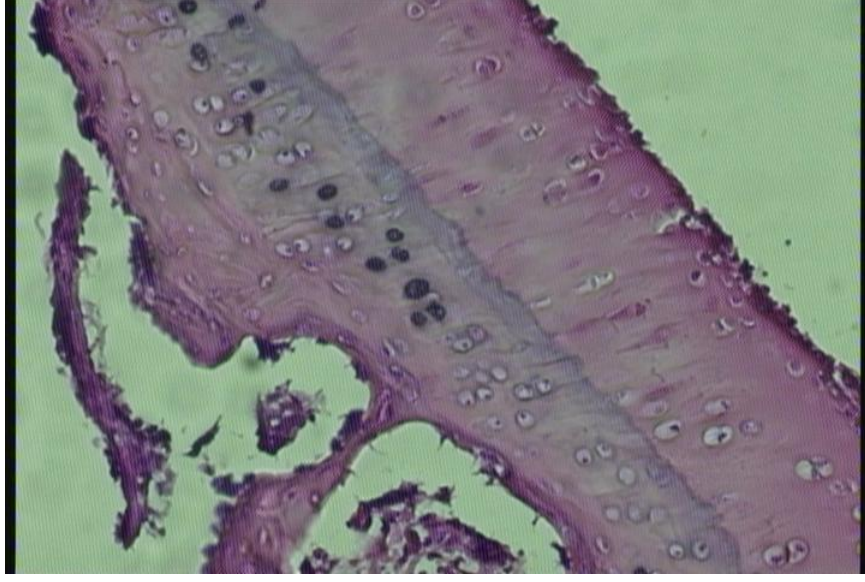
Şekil 15. O grubuna ait ışık mikroskopik görünüm (HE, x10) (Yer yer kondrositlerin kümeleşmesi izlenmekte)



Şekil 16. OAB grubuna ait normal eklem kıkırdağına yakın ışık mikroskopik görünüm (HE, x10)



Şekil 17. 2 doz ozon alan grubu ait ışık mikroskopik görünüm (HE, x10)



Şekil 18. 1 doz ozon alan grubu ait ışık mikroskopik görünüm (HE, x10)

4.3. İstatistiksel bulgular

Histopatolojik inceleme sonucu hücresel kayıp, erozyon, kondrositlerin kümeleşmesi ve pannus oluşumu açısından elde edilen skora göre dört grup arasındaki fark ayrı ayrı istatistiksel olarak incelenirken 1 doz ozon alan ile 2 doz ozon alan gruplar kendi arasında ayrı ayrı incelendi.

Grup	Histokimyasal skor	Sol diz	K	O	AB	OAB
		(n=6)	(n=6)	(n=6)	(n=6)	(n=6)
		Hayvan sayısı	Hayvan sayısı	Hayvan sayısı	Hayvan sayısı	Hayvan sayısı
Hücresel kayıp	1	6	---	3	4	5
	2	---	2	2	2	1
	3	---	2	1	---	---
	4	---	2	---	---	---
Erozyon	1	6	---	3	4	5
	2	---	3	2	2	---
	3	---	2	1	---	1
	4	---	1	---	---	---
Kümeleşme	1	6	---	2	3	5
	2	---	2	2	3	---
	3	---	3	2	---	1
	4	---	1	---	---	---
Pannus	1	6	---	3	3	4
	2	---	2	2	3	2
	3	---	2	1	---	---
	4	---	2	---	---	---

Tablo 5. Gruplardaki tavşanları histolojik-histokimyasal skor dağılımı

Grup	K (n=6)	O (n=6)	AB (n=6)	OAB (n=6)
	Grup medianı (min.-maks.)	Grup medianı (min.-maks.)	Grup medianı (min.-maks.)	Grup medianı (min.-maks.)
Hücreyel kayıp	3 (2-2)	1,66 (1-3)	1,33 (1-2)	1,16 (1-2)
Erozyon	2,66 (2-4)	1,66 (1-3)	1,33 (1-2)	1,33 (1-3)
Kümeleşme	2,83 (2-4)	2 (1-3)	1,5 (1-2)	1,33 (1-3)
Pannus	3 (2-4)	1,66 (1-3)	1,5 (1-2)	1,33 (1-2)
Toplam	11,49	6,98	5,66	5,15

Tablo 6. Grupların ortalama histolojik-histokimyasal skorları ve toplam skorları

Grup	K (n=6)	O (n=6)	AB (n=6)	OAB (n=6)	Toplam	İstatiksel analiz
	x ± ss	x ± ss	x ± ss	x ± ss	x ± ss	p
Hücreyel kayıp	3 ± 0,89	1,67±0,81	1,67±0,81	1,33±0,91	1,91±0,92	P=0,007*
Erozyon	2,67±0,82	1,67±0,82	1,33±0,52	1,33±0,82	1,75±0,89	P=0,018**
Kümeleşme	2,8± 0,75	2 ± 0,89	1,5 ± 0,55	1,3 ± 0,82	1,91±0,93	P=0,013**
Pannus	3 ± 0,89	1,67±0,82	1,5 ± 0,55	1,33±0,52	1,87±0,95	P=0,018*

* Kontrol grubu ile diğer 3 grup arasındaki farklılığı işaret etmektedir

** Kontrol grubu ile ‘antibiyotik ve ozon+antibiyotik’ arasındaki farklılığı işaret etmektedir

Tablo 7. Grupların ortalama histolojik-histokimyasal skorları ve standart sapma skorları

Gruplar kırıkta hücre kaybı açısından değerlendirildiğinde en yüksek hücre kaybı kontrol grubunda bulunmuştur ($x = 3 \pm 0,89$) ve kontrol grubundaki hücre kaybı diğer gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksektir (Kruskal Wallis Varyans Analizi, $p < 0,01$). Buna karşın O, AB, OAB gruplarının kendi arasında hücre kaybı açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır.

Kırıkta erozyonu açısından gruplar değerlendirildiğinde en yüksek kırıkta erozyonu kontrol grubunda saptanmıştır ($x = 2,67 \pm 0,82$). İkinci en yüksek hücre kaybı ozon grubunda saptanmıştır. Antibiyotik ve ozon+antibiyotik gruplarında eşit seviyede kırıkta erozyonu saptanmıştır. Kontrol ve ozon gruplarındaki kırıkta erozyonu diğer iki gruba göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksektir (Kruskal Wallis Varyans Analizi, $p < 0,05$).

Gruplar kondrosit kümeleşmesi açısından değerlendirildiğinde en yüksek kondrosit kümeleşmesi yine en fazla kontrol grubunda bulunmuştur ($x = 2,8 \pm 0,75$). İkinci en yüksek değer ozon grubunda bulunmuştur. Ozon grubun sırasıyla antibiyotik ve ozon+antibiyotik grupları takip etmiştir. Kontrol ve ozon gruplarındaki kırıkta erozyonu diğer iki gruba göre

istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksektir (Kruskal Wallis Varyans Analizi, $p<0.05$).

Yapışıklık veya pannus açısından gruplar değerlendirildiğinde en yüksek değer kontrol grubunda bulunmuştur ($x=3\pm 0,89$) ve kontrol grubundaki yapışıklık veya pannus diğer gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksektir (Kruskal Wallis Varyans Analizi, $p<0,01$). Buna karşın O, AB, OAB gruplarının kendi arasındaki değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır.

Grup	Histokimyasal skor	1 doz ozon (n=4)	
		Hayvan sayısı	Hayvan sayısı
Hücreyel kayıp	1	---	---
	2	1	1
	3	2	2
	4	1	1
Erozyon	1	---	---
	2	1	1
	3	3	3
	4	---	---
Kümeleşme	1	---	---
	2	1	2
	3	2	2
	4	1	---
Pannus	1	---	---
	2	1	1
	3	3	3
	4	---	---

Tablo 8. 1 doz ve 2 doz ozon alan grupların histolojik-histokimyasal skor dağılımı

Grup	1 doz ozon	2 doz ozon
	Grup ortalamaları (median)	Grup ortalamaları (median)
Hücresel kayıp	3	3
Erozyon	2,75	2,75
Kümeleşme	3	2,5
Pannus	2,75	2,75
Toplam	11,5	11

Tablo 9. 1 doz ozon ve 2 doz ozon alan grupların ortalama histolojik-histokimyasal skorları ve toplam skorları

Ozon alan tavşanlardan 1 doz ozon alan ile 2 doz ozon alan tavşanların histopatolojik kıkırdak hücre kaybı, kıkırdak erozyonu, kondrosit kümeleşmesi, yapışıklılıklar ve pannus oluşumu açısından ayrı ayrı olarak istatistiksel olarak değerlendirildi. İncelenen dört parametre

açısından da iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır (Mann Whitney U, $p>0,05$).

Grup	Sol diz(n=6)	K (n=6)	O (n=6)	AB (n=6)	OAB (n=6)	İstatistiksel analiz
Kültür pozitifliği	0/6	6/6	2/6	0/6	1/6	$X^2=14,8$ $P=0.002$
Yüzde (%)	%0	%100	%33	%0	%16,6	

Tablo 10. Grupların kültür pozitif sayılarını ve yüzdelerini gösteren tablo

Kültür pozitifliği açısından gruplar istatistiksel olarak değerlendirildiğinde; kontrol grubunun tamamında üreme olmuştur ($p<0.01$) ve kontrol grubu ile diğer üç grup arasında istatistiksel olarak fark bulunurken ozon, antibiotik ve ozon+antibiotik gruplarının kendi arasında fark bulunamadı ($p=0,002$).

	K	O	AB	OAB	TOPLAM
ÇTTS	6	6	6	6	24
ÇSÖTS	6	8	2	----	16
ÇDETTS	12	14	8	6	40

Tablo 11. Çalışmaya dahil edilen tavşanların dağılımını gösteren tablo

ÇTTS:Çalışmayı tamamlayan tavşan sayısı

ÇSÖTS:Çalışma sürecinde ölen tavşan sayısı

ÇDETTS:Çalışmaya dahil edilen toplam tavşan sayısı

5. TARTIŞMA

Artroplasti; toplumdaki hayat süresinin uzaması, cerrahi tekniğin gelişmesi, biyomekanik ve teknolojik ilerlemeler sayesinde birçok insana ağrısız ve normal hareket edebilme olanağı sunmuştur. Bunun yanında oluşabilecek komplikasyonlar bu başarının gölgelenmesine ve hastanın hayat kalitesinin bozulmasına neden olur. Komplikasyon oluşması hem hastayı hem de ülke ekonomisini kötü yönde etkiler. Bu nedenle komplikasyonun tedavisi yerine ortaya çıkmasının engellenmesi daha kolay ve ucuzdur.

Literatürde artroplasti sonrası enfeksiyon oranları %0.5- 5 (111) arasında bildirilmiştir. Bir çok merkezde diz protez ameliyatı sonrası %0,5 - %2 enfeksiyon oranları ile karşılaşılmaktadır (112,113,114). Protez ameliyatı sonrası gelişen enfeksiyon hasta ve cerrah açısından önemsenmesi gereken en önemli komplikasyondur. Enfeksiyon hastanede kalış süresini uzatmakta, yeni cerrahi ve antimikrobiyal tedavi ihtiyacına neden olmaktadır. Buda hem maliyeti arttırmakta hem de yüksek morbiditeye neden olabilmektedir. Gelişebilecek bir protez enfeksiyonunun 50.000 dolara yaklaşan bir maliyete sebep olacağı belirtilmektedir (115). Antimikrobiyal proflaksi ve ameliyathanelerde laminar hava akımı uygulamaları gibi tıbbi uygulamaların yapılmasına bağlı olarak protez eklem enfeksiyon oranları azalmıştır (116). Bu azalmaya rağmen enfeksiyon oranlarının halen azımsanamayacak ölçülerde olmasının başlıca etkenleri ise tanı güçlüğü ve tedavinin zorluğu olarak sayılabilir (116). Her geçen gün gelişen ve yenilenen antibiyotikler kullanılmasına rağmen

dirençli mikroorganizmaların sebep olduğu enfeksiyonlar nedeniyle tedaviye yanıt azalmaktadır. Protez yüzeyinde bakteriler tarafından oluşturulan biyofilm tabakası sebebiyle kan dolaşımının ulaşamadığı ve mikroorganizmaların yaşayıp çoğalmalarına imkan sağlayan boşluklar oluşması da yanıtı azaltan bir diğer sebeptir.

Enfeksiyon oranlarının düşürülmesinde enfeksiyondan korunma yöntemlerinin iyi uygulanması önemlidir. Bu yöntemler, hastanın ameliyat öncesi uygun şekilde hazırlanması, profilaktik antibiyotik kullanımı, ameliyathane önlemleri, antibiyotikli yıkama ve antibiyotikli çimento kullanımı olarak sayılabilir. Bu önlemler arasında sayılan antibiyotikli çimento kullanımının enfeksiyonu önlemedeki yararıyla ilgili literatürde bir çok yayın bulunmakla birlikte (117,118) bazı dezavantajları da bulunmaktadır. Bunlar çimentonun mekanik gücünü azaltması, toksisite, alerjik reaksiyon ve antimikrobial direnç olarak sayılabilir. 40 gram kemik çimentosuna toz antibiyotiğin 4,5 gramdan fazla konulması ya da sıvı antibiyotik konulması kompresif gücünü azaltmaktadır (117,119,120). Sıvı gentamisin konulmuş çimentonun potansiyel bakterisidal etkisi vardır, fakat çimentonun mekanik dayanıklılığı azalmaktadır (121).

Aseptik gevşeme nedeniyle yapılan revizyon vakalarında, primer cerrahisinde gentamisinli kemik çimentosu kullanılmış olanlarda protezde gentamisine dirençli organizmalar saptandığı bildirilmiştir (122). Derin protez enfeksiyon oranını azaltma potansiyeliyle dirençli organizmaları arttırma potansiyeli arasındaki dengeyi sağlamak zordur. Ohio State Üniversitesi'nde yapılan çalışmada antibiyotikli çimento kullanımının enfeksiyon oranını azalttığı ancak aminoglikozide dirençli bakterilerin,

özellikle Stafilokokus aureus ve koagulaz-negatif stafilokokal enfeksiyon oranının arttığı bildirilmiştir (123,124).

Önlemlere rağmen görülen bu olguların takip ve tedavisi ilk başvuru anından tedavinin tamamlanmasına kadar doğru ve etkili bir şekilde yapılmalıdır. Enfeksiyonun erken tanısının konabilmesi için şüphelenmek önemlidir. Bunun yanında özenle hastanın hikayesi alınmalı, dikkatlice fizik muayene yapılmalı ve bulgular direk grafi, artrosentez, sedimentasyon, CRP, lökosit ve sintigrafik çalışmalarla desteklenmelidir. Bununla birlikte sedimentasyon ve CRP'de cerrahi travma nedeniyle ameliyat sonrası dönemde yükselme olabilmektedir. CRP'nin tekrarlayan ölçümleri tek bir ölçümden daha kullanışlıdır (125). Eritrosit sedimentasyon hızı ve CRP nonspesifik testler olmakla birlikte, ikisinin eşzamanlı yüksekliği enfeksiyon tanısına yardımcı olabilir. Enfeksiyonlarda, sedimentasyon ve CRP eşzamanlı yüksekliğinin duyarlılığı %99, özgünlüğü %89'dur. Protez ameliyatı sonrası CRP 21 gün içinde normale dönerken, sedimentasyonun normale dönmesi 90 günü alabilir (126).

Protez enfeksiyonlarında bakteriler protez yüzeyinde tipik olarak biyofilm tabakası oluştururlar ve bu nedenle yapılan kültürlerde anlamlı sonuçlar elde edilemez (127). Özellikle antibiyotik kullanan hastalarda kültürün sınırlı bir duyarlılığı vardır (128).

Bu nedenle son yıllarda hastalardan çıkartılan prostetik materyallerin sonikasyon işlemine tabi tutulduktan sonra kültüre edilmesi üzerine çalışmalar yapılmaktadır. Yapılan çalışmalarda sonikasyon sonrası yapılan kültürlerin duyarlılığının klasik kültürden daha fazla olduğu belirtilmektedir (130).

İsviçre ve Norveç'te ortak yapılan bir çalışmada sonikasyon yöntemi duyarlı basit ve ucuz bir yöntem olarak önerilmektedir (130).

Mayo klinikte 331 hasta ile yapılan bir çalışmada normal kültürün duyarlılığı %60.8 iken, sonikasyon yöntemiyle yapılan kültürlerde bu oran %78.5 olarak belirtilmiştir. Aynı çalışmada 14 gün süreyle antibiyotik kullanan hastalarda sensitivite %45'lere kadar gerilerken sonikasyon da %75 olmuştur (131).

Protez enfeksiyonlu hastaların ilk başvuru esnasında belirti ve bulguları son derece çeşitlilik gösterebilir. Enfeksiyonun klinik olarak karşımıza çıkış biçimi tedavi seçiminde yol gösterici olmaktadır. Erken postoperatif enfeksiyonlarda enfeksiyonun ortaya çıkış zamanı, protezin korunarak tedavi edilmesine karar vermemizde önemli olmuştur. Literatürde bakıldığında bazı araştırmacılar ameliyat sonrası ilk iki haftada enfeksiyon başlayan vakalarda protez korunarak tedavi edildiğinde başarılı sonuçlar elde ettiklerini bildirirlerken, bazı araştırmacılar ise bu süreyi dört haftaya kadar uzatmaktadır (124).

Erken enfeksiyonun sadece antibiyotik baskılamasıyla tedavi edilmesinin, bakteriye karşı direnç gelişmesi, protezde gevşeme, enfeksiyonun yayılması ve septisemi gibi riskleri vardır(132). Yalnızca antibiyotik baskılamasıyla tedavi edilen olgularda tedavinin başarısızlık oranları literatürde %16.6 ile %69.2 arasında değişmektedir. Fakat literatürdeki bu olgular sadece erken enfeksiyonu değil derin enfeksiyonu da kapsamaktadır. Debritman ve antibiyotikli yıkamayla tedavi edilen erken enfeksiyonların tedavideki başarı oranları ise %0 ile %83 arasında değişmektedir(124). Debritmandan sonra ameliyat öncesi yada ameliyat

esnasında alınan kültürlerle belirlenen enfeksiyon etkenine yönelik antibiyotik intravenöz olarak 14 gün verilmeli ve daha sonra oral olarak devam edilmelidir. Enfeksiyonun klinik bulguları kaybolana kadar ve sedimantasyon ve CRP normale gelene kadar devam edilmelidir (133).

Artroplasti sonrası görülen enfeksiyonun tedavisinde tek aşamalı ve iki aşamalı teknikler sıkça uygulanmaktadır. Hastada tek aşamalı veya iki aşamalı tekniklerden hangisinin kullanılacağına karar verilmesi önemlidir. Tek aşamalı tekniğin hastanede kalış süresini kısaltması, ikinci bir ameliyat gerektirmemesi ile morbiditeyi azaltması avantajlarıdır. Literatürde tek aşamalı tedavilerde %74 oranında başarı elde edildiği bildirilmektedir (134). İntravenöz antibiyotik verilmesi sonrası yapılan iki aşamalı tedavi, tek aşamalıya göre daha iyi başarı oranı sunmaktadır. Bu tedavide protez ve çimentonun tümü çıkarılır ve yumuşak doku ve kemik debritleme yapılır. Ardından dört altı hafta intravenöz antibiyotik verilir ve yeni protez uygulanır (135). Bu tedavinin uygulandığı 65 enfekte diz protezinde %97 başarı oranı bildirilmiştir(136). Enfeksiyon etkeni farklı bir mikroorganizma olduğunda ise başarı oranı %90,7 olarak bildirilmiştir (136). En iyi sonuçlar ise intravenöz antibiyotikle beraber antibiyotik emdirilmiş çimento kullanıldığında alınmıştır (135). İki aşamalı tedavinin de bazı dezavantajları vardır. Bunlar, primer rezeksiyonla geç reimplantasyon arasında geçen sürede oluşan ağrı, mobilite güçlüğü ve diz instabilitesidir (137,138). Diğerleri ise skar dokusu oluşumu, ekstensör mekanizmada kısılma, ligamentlerde kısılma ve kapsüller retraksiyondur.

Orchard ve Stamp, Goldenberg ve Cohen, Ho ve Su'nun yapmış oldukları çeşitli deneysel ve klinik araştırmalar eklem enfeksiyonunun

erken tedavisinin önemini göstermişlerdir (139,140,141). Ayrıca Orchard ve Stamp, Bardenheier ve ark.'ın çalışmalarında birkaç günden daha uzun süren infeksiyonların ilerleyici eklem hasarına neden olduğu bildirilmiştir (141,142). Riegels-Nielsen ve ark.'nın çalışmasında S.aureus'un ekleme verilmesinden 5 ile 7 gün sonra kıkırdak kenarlarında erozyonun ve kıkırdak aşınmasının ilk bulguları görüldüğü zaman mikroskobik görünüm geriye dönüşün olmadığını göstermektedir. Yine Riegels-Nielsen'e göre enfekte bir eklemde majör kıkırdak değişiklikleri 7. günde belirgindir (143,144). Biz de çalışmamızda verdiğimiz tedavi edici ajanların eklem kıkırdak hasarına etkisini araştırdığımız için, kıkırdak hasarının başladığına inandığımız 7. gün tedavi modellerini uygulamaya çalıştık.

Salter ve ark., Nagel ve ark.'nın çalışmalarında gösterildiği gibi deneysel çalışmalarda tavşan diz eklemi stafilokokal infeksiyonlar için uygun ve elverişlidir (145,146). Yukarıda sözü geçen otörler gibi Solak ve ark., Daniel ve ark., Riegels- Nielsen ve ark. 'da eklem enfeksiyonu modelinde tavşan diz eklemine kullanmışlardır (144,147,148). Biz de hem bu otörlerin verdikleri bilgiler ışığında çalışma modelimizde tavşan diz eklemi kullanmayı uygun gördük.

S.aureus eklem enfeksiyonuna sebep olan en yaygın ajandır (144,148-155). Goldenberg ve ark.'nın yaptığı çalışmada tavşanlarda diz içine intraartiküler 10^5 S.aureus'un verilmesi majör eklem hasarı ile sonuçlanmış olup aynı şekilde N. gonorrhoeae veya S. epidermidis verilmesi eklemde inflamasyona yol açmamıştır (156). Johnson ve ark.'nın yaptığı çalışmada tavşan diz eklemine S. aureus ve Staphylococcus albus enjeksiyonu sonrası, enjeksiyondan 1 saat, 3 saat ve 24 saat sonra bu

mikroorganizmaların sinovyal sıvıdaki düzeylerine bakıldığında; 1. saatte her iki mikroorganizmanın da sinovyal sıvıda sayılarının azaldığı, 3 saat sonra belirgin bir şekilde S. albus sayısının azaldığı ve 24. saatte sinovyal sıvının tamamen steril hale geldiği, S.aureus sayısının ise 1. saatten sonra giderek arttığı bulunmuştur. (157). Rogers ve Tompsett tarafından da S.aureus'un insan PMNL içinde S.albus'a göre daha uzun süre yaşayabildiği gösterilmiştir (158).

Grup B Streptokokların kullanıldığı bir fare modelinde ise aktive T hücreleri tarafından üretilen gama interferonun (IFN- γ) eklem hasarı ve mortalite düzeyini azalttığı gösterilmiştir (159). Oysa bu modelde S.aureus kullanıldığında IFN- γ aynı zamanda septisemiden korurken eklem enfeksiyonu sıklığını ve ciddiyetini arttırmaktadır.

Bardenheier ve ark.'nın (142), Nagel ve ark. (146), Johnson ve ark. (157), Bhawan ve ark. (160), Schurmann ve ark. (161) yaptıkları çalışmalarda S.aureus'un intraartiküler enjeksiyonundan sonra dakikalar içinde pürülan sinovitin geliştiği ve takibinde subsinovyal alanda inflamasyon ve abse formasyonu, sinovyal membran nekrozu, sinovyal fagositik hücrelerin içinde organizmaların sebat etmesi, süperfisyal kıkırdak yüzeyinde bozulma ve süperfisyal subkondral kemik içine penetrasyon gösterilmiştir. Biz de çalışmamızda hem klinikte en yaygın görülen sorumlu ajan olması sebebiyle hem de deneysel araştırmalarda diğer mikroorganizmalara oranla daha patojen olması dolayısıyla deneysel protez enfeksiyonu oluşturmak için ajan patojen olarak S. aureus ATCC 25923 suşunu tercih ettik.

S. aureus'un deneysel olarak eklemde enfeksiyon oluşturan inokülasyon dozu ve miktarı ile ilgili çeşitli deneysel modellerinde farklılıklar görülmektedir. Riegels-Nielsen ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada (143) 0,5 ml serum fizyolojik içinde 10^3 S. aureus, Solak ve ark.'nın bir çalışmasında (147) 0,5 ml ve mililitrede 2×10^4 S. aureus, Williams ve ark.'nın bir çalışmasında (162) $9,2 \times 10^4$ cfu S.aureus, Eren ve ark.'nın bir çalışmasında (163) 1 ml ve mililitrede 10^3 S. aureus, Sillinger ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada (164) 1,5 ml ve $8 \times 10^8 \pm \%5$ cfu 1,5 ml S.aureus eklem enfeksiyonu modeli oluşturmak için kullanılmıştır. Bu çalışmaların ışığı altında biz de inoküle edilecek olan dozu 2×10^5 cfu/ml olarak kararlaştırdık.

Deneysel olarak Stafilokoklar tarafından enfekte edilen eklemlerin tedavisinde antibiyotikler yalnız başlarına veya başka ilaçlarla kombine edilerek uygulanmıştır. Bu deneyler uygulanan antibiyotiklerin kıkırdak yıkımını durduramadığını fakat azalttığını göstermiştir (152,153,154). Antibiyotiklerin erken dönemde başlanması bakteriyi yok etmekte fakat eklemdeki yıkımı durdurmamaktadır. Schurman ve ark. üç haftada eklem periferinde, üç ayda tamamında kıkırdak harabiyeti geliştiğini göstermiştir (161).

Mariani ve ark.'nın belirttiği gibi başarılı bir sonuç için erken teşhis ve hemen antibiyotik tedavisinin başlanması önemli olup farklı cerrahi uygulamalar arasında etkinlik açısından bir fark yoktur (165). Nord ve ark. tek başına uygun bir antibiyotikle erken tedavi yaptıklarında ya da artrotomi, artroskopik lavaj, artroskopik debridman veya iğne aspirasyonu

ile kombine edildiğinde istatistiksel olarak farklı olmayan sonuçlar bulmuşlardır (166).

Smith ve ark.'nın çalışmalarında sadece antibiyotik kullanımının stafilokok enfeksiyonunu ortadan kaldırdığı ve buna karşın meydana gelen kıkırdak hasarını engellemediği gösterilmiştir (152).

Wysenbeek ve ark.'nın yaptığı bir başka çalışmada sistemik antibiyotik ve intraartiküler kortikosteroidlerin stafilokokal septik artritte etkilerinin araştırıldığı bir deneysel çalışmada antibiyotikle birlikte steroid uygulanan grupta sadece antibiyotik uygulanan gruba göre Salter histolojik-histokimyasal skorlama sistemine göre en düşük skorun elde edildiği gösterilmiştir. Ayrıca kombine tedavi alan hayvanlarda istatistiksel olarak anlamlı daha az proteoglikan kaybı ve sinovit bulunmuştur (153).

Solak ve ark.'nın yaptığı deneysel bir eklem enfeksiyon modelinde bir grupta bakteriyel inokülasyondan önce profilaktik antibiyotik başlanarak, başka bir grupta inokülasyondan sonra antibiyotik başlanarak ve diğer grupta inokülasyondan sonra antibiyotikle beraber nonsteroidal antiinflamatuvar ilaç başlanarak bunların eklem kıkırdağı hasarı üzerine etkileri incelenmiştir. Salter tarafından geliştirilen histolojik-histokimyasal skorlama sistemi ile değerlendirme yapılmış ve eklem kıkırdak hasarının profilaktik antibiyotik uygulanan grupta gelişmediği, inokülasyondan sonra antibiyotik uygulanan ve antibiyotikle beraber nonsteroidal antiinflamatuvar ilaç uygulanan iki grupta eklemde kıkırdak hasarının meydana geldiği ve bu hasarın antibiyotikle beraber nonsteroidal antiinflamatuvar ilaç uygulanan grupta daha az eklem hasarı bulunmasına rağmen istatistiksel olarak aralarında anlamlı bir fark olmadığı bulunmuştur (154).

Septik artrit kıkırdak yüzeyine etkisini araştıran Riegels-Nielsen ve ark.'nın çalışmasında (151), inokulasyondan bir hafta sonra kıkırdak yüzeyinde yumuşama, küçük fissürler ortaya çıkmaktadır. 11.günde kıkırdak kenarlarında erozyon ve femoral kondilleri pannusun kapladığı görünmüştür. Kıkırdak yüzeyi özellikle yük binen alanlarda ileri düzeyde düzensizleşmiştir. 17. günde eklem kapsülü ve kollateral ligamanlar hasar görmüştür. Ayrıca uylukta abse oluşumu ve periartiküler kortikal harabiyet ile osteitis ve kemik iliğı alanında iltihap görülmüştür. Kıkırdak matriks kaybının arttığı ve 5 hafta sonra fragmantasyon veya subkondral kemiğe kadar erozyon ile sonlandığı gözlenmiştir. Curtiss ve Klein'in bir çalışmasında pürülan materyal ve bakteri açıkça kendi başlarına kıkırdak bozulmasında etkiye sahip olmayıp, sadece provoke edici bir mekanizma olarak görünmektedirler (167,168). Harris ve ark.'nın yaptıkları çalışmada (169) glikozaminoglikan kaybına uğrayan kıkırdakta mekanik olarak zayıflama meydana gelmekte ve bu da fibrilasyon ve fragmantasyonu kolaylaştırmaktadır.

Schurmann ve ark. (161), Riegels-Nielsen ve ark.'nın yaptığı çalışmalarda (143,144,170) gösterildiğı gibi enfekte eklemde aynı zamanda rol alan iki hasar verici süreç gözlenmektedir. İlki sinovyal membran ile kıkırdak arasında temas alanında meydana gelmektedir. İnflame ve hipertrofiye sinovyal doku kıkırdağı erode eden ve aşındıran pannus dokusuna dönüşmektedir. Diğeri ise enfekte eklemde daha genel bir reaksiyon olarak meydana gelir ve bu glikozaminoglikan kaybıdır

Çalışmamızda makroskobik olarak sakrifikasyon sonrasında inflamasyon değerlendirildiğinde, eklem kapsülünde kalınlaşma, sinovyal

fibrotik dokuda artma ve bulanık renkte nekrotik inflamatuvar visköz sinovyal sıvı materyalin gelmesi inflamasyon bulguları olarak kaydedildi. Bu bulgulara göre O, AB, OAB gruplarının her üçünde eklem kapsülü, sinovyal membran, sinovyal sıvı viskozitesi K grubuna nazaran makroskopik olarak daha normale yakındı. K grubundaki bazı hayvanların dizlerinden ise pürülan enfekte materyal gelmekteydi.

Salter'ın tanımladığı histolojik-histokimyasal skora sistemi septik artritte meydana gelen ilerleyici değişiklikleri değerlendirme için değerli bulunmaktadır. Sistem bununla birlikte subjektif bir tekniğe dayanmaktadır (143). Biz de çalışmamızda eklem kıkırdak hasarını değerlendirmede tıpkı Solak ve ark. (147), Wysesbeek ve ark. (153) gibi Salter'ın histolojik-histokimyasal skora sistemini kullandık.

Histolojik çalışma sonuçlarımıza göre kontrol grubunda antibiotik ve ozon+antibiotik grubuna göre incelenen dört histolojik parametreye göre de istatistiksel olarak fark saptanmıştır. Ozon grubunda kontrol grubuna göre hücresel kayıp ve pannus açısından istatistiksel olarak fark bulunurken kıkırdak erozyonu ve kondrosit kümeleşmesi açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. Yani ozon histolojik olarak hücresel kıkırdak kaybının önlenmesinde ve pannus oluşumunun önlenmesinde etkin kıkırdak erozyonu ve kondrositlerin kümeleşmesi açısından etkin bulunmamıştır.

1 doz ozon alan grup ile 2 doz ozon alan grup arasındaki dört histolojik parametre açısından da benzer sonuçlar elde edilmiş olup istatistiksel olarak fark saptanmamıştır.

Oda sıcaklığında renksiz, keskin kokulu bir gaz olan ozon (O_3); havadaki oksijen molekülünün (O_2) yüksek bir enerji etkisi ile atomlarına ayrışması ve bu kararsız atomların bir başka oksijen molekülü ile hızla birleşmesi sonucu oluşmaktadır (171). Doğadaki yüksek enerji, güneşten gelen UV ışıklardan veya yağmurlu havalarda çakan şimşeklerden kaynaklanmaktadır. Özellikle fırtınalardan sonra taze hava kokusu diye içimize çektiğimiz havada bu hissi oluşturan, yıldırımlar sırasında yükselmiş olan ozon konsantrasyonudur (172).

Ozon, havadaki oksijenin yüksek iletkenliğe sahip UV lambanın 185 nm'de yayınladığı radyasyona maruz bırakılmasıyla 0,03 ppm gibi düşük konsantrasyonlarda üretilmektedir . Endüstriyel ozon gazı üretimi ise yine doğadaki oluşum prensibiyle daha çok “Corona Deşarj Metodu” denen metodla elde edilirken (173) tıbbi ozon ise genellikle “Cold Plazma Ozone Generatör” denen metodla elde edilmektedir.

Bu metodla yüksek konsantrasyon ve miktarda ozon üretimi, kuvvetli bir elektriksel alandan oksijence zengin bir gazın geçirilmesiyle elde edilmektedir. Yoğun enerji nedeniyle bazı oksijen molekülleri parçalanmakta ve oluşan kararsız oksijen atomları derhal diğer oksijen molekülleriyle birleşerek üç oksijen atomlu ozon molekülünü oluşturmaktadır (172). Deşarj aralığına besleme gazı olarak hava verildiğinde kütlece %1-3, saf oksijen gazı verilmesi halinde %6 verimle ozon elde edilebilmektedir (174).

Medikal ozon daima saf ozon ve saf oksijenin karışımı şeklinde konsantrasyonu 1 ve 100 $\mu\text{g/ml}$ (%0.05– 5 O_3) arasında kullanılır. Bakterisidal fungisidal virostatiktir. Kan dolaşımını arttırır. Antioksidandır.

Bağışıklık sistemini aktive eder. Medikal ozon tedavisinde intraartiküler enjeksiyonun başta diz ve omuz eklemleri olmak üzere akut ve kronik ağrılı eklem rahatsızlıklarında yararlı ve etkin olduğu gösterilmiştir. Bu etkinin IFN- β indüksiyonu, süperoksit dismutaz aktivasyonu, TGF- β indüksiyonu ile ortaya çıktığı düşünülmektedir. Süperoksit dismutaz aktivasyonu ile oksijen radikalleri azalırken, TGF- β indüksiyonu ile kollajen, proteoglikan ve hyaluronik asit üretimi uyarılır, proteaz ve proteaz inhibitörleri arasındaki oran modüle edilir (175).

Ozon yüksek derecede oksidasyon gücüne sahip olduğu için tıpta “aktif oksijen” olarak tanımlanır. Kan dolaşımını artırma yeteneği, onu sadece dolaşım ile ilgili bozuklukların tedavisinde değil birçok hastalıkta bozulmuş olan organik fonksiyonların yeniden kazanılmasında yardımcıdır. Çoğu kez metal paralar gibi birbirine yapışık hareket eden alyuvarlar, O₃ ile karşılaşınca ayrılır, şekil değiştirir, düzenli sıralar halinde daha hızlı hareket etmeye başlarlar. Yüzeyleri genişlediğinden fazla miktarda oksijen alan alyuvarlar vücudun ihtiyacı olan bölgeye hızla ulaşabilmektedir. Örneğin ozon gazıyla oksijen oranı ve hızları artan alyuvarlar, vücudun ihtiyacı olan bölgeye hızla ulaşabilmektedirler. Örneğin ozon gazıyla oksijen oranı ve hızları artan alyuvarlar nerede sorun varsa o hastalıklı dokulara ulaşarak vücudun kendi kendini tamir kapasitesini hızlandırmaktadır. Ozon ile aktive olan hücreler sadece alyuvarlar değil ayrıca vücudun savunma hücreleri olan akyuvarlardır. Bu nedenle dışarıdan verilen ekstra ve yan etkileri olabilecek diğer tedavilerden farklı olarak ozon vücudun kendi dinamiklerini harekete geçiren doğal bir tedavi yöntemi olduğunu kabul etmek gerekir. Ozon aynı zamanda dezenfektandır(175).

Dolaşım bozukluklarının tedavisinde, enflamatuvar hastalıklarda (açık yaralar ve kolit hepatit), yanıkta etkilidir (176). Ayrıca birçok enfeksiyon durumunda (hepatit B, hepatit C, herpes enfeksiyonları, herpes zoster, papillomavirus enfeksiyonları gibi viral enfeksiyonlarda; çeşitli bakteriyel, fungal, parazitik enfeksiyonlarda) tedavi amacıyla kullanılmaktadır (175).

Sulu çözeltilerinde oldukça kararsız bir yapı gösterirken, havada ise nispeten daha kararlı olan ozon, çok hızlı bir şekilde kendiliğinden parçalanarak oksijen molekülüne dönüşmektedir (177). Ozonun depolanamaması özelliğinden dolayı endüstriyel ozon gazı üretimi uygulanacağı yerde, kapalı sistemlerde ve çeşitli özelliklerdeki ozon jeneratörleri ile gerçekleştirilmektedir. Bu jeneratörler sadece elektrik gücüyle çalışmaktadır. Bunlardan başka kimyasal, termal, kemonükleer ve elektrolitik metotlarla da ozon elde edilebilmektedir (173,178). Biz de çalışmamızda elde ettiğimiz ozon jeneratörünü hayvan laboratuvarında muhafaza etmiş olup tavşanlara uygulanacak olan tedavinin her seansında ozon elde ederek hayvanların dizlerine enjekte ettik.

Gerek mikrobiyal inaktivasyonda ozonun etkinliği çeşitli fizyolojik özelliklere bağlı olarak değişmektedir. Örneğin mikroorganizmaların ozona karşı olan duyarlılıkları ortamın sıcaklığına, nemine ve pH değerine göre değişmektedir (173). Sulu ortamda düşük sıcaklıkta ozonun çözünürlüğü arttığından etkinliği de artmaktadır. Bu durumun aksine ortam sıcaklığındaki artış da ozonun parçalanmasını hızlandırmaktadır.

Yine sulu ortamda pH değerindeki azalma ozon kararlılığını ve bu sayede de etkinliğini artırmaktadır (177). Graham (1997) yaptığı bir çalışmada sulu ortamın pH değerinin 10 civarında olması sonucunda

ozonun ani olarak parçalandığını belirtmektedir. Ozonun etkinliğini arttıran bir diğer faktör ise ortamın bağıl neminde meydana gelen artıştır (177). Ortamda yüksek nem olduğunda ozon konsantrasyonu 0,1 mg/L'nin biraz altında dahi olsa mikroorganizma inaktivasyonu gerçekleşmektedir (173).

Bu faktörlere ilaveten ozonun dezenfeksiyon gücü üzerine etki eden diğer bir faktör ise ortamın ozon talebidir. Ozon, herhangi bir seçicilik göstermeksizin, flor hariç, bulunduğu ortamdaki tüm maddelerle tepkimeye girmektedir. Flor ile reaksiyona girmemesinin nedeni ise florun oksidasyon potansiyelinin ozonun oksidasyon potansiyelinden yüksek tek element olmasıdır. İşte ozonun bu özelliği sonucunda “ortamın ozon talebi” ve “kalıntı ozon” gibi kavramlar ortaya çıkmıştır (172,173). Kalıntı ozon; ozon uygulamasının ardından ortamda belirlenebilen ozon konsantrasyonudur (173). Başka bir ifade ile suya ilave edilen ozon miktarından, suyun tükettiği ozon miktarı çıkarıldığında bulunan ozon miktarıdır (172). Ozonun oksidasyon etkinliği uygulanan ozon dozundan çok, ortamda mevcut kalıntı ozon miktarına bağlıdır. Kalıntı ozon miktarı, uygulama koşullarında ozonun stabilitesine ve ozon talebi bulunan maddelerin ortamdaki yoğunluğuna bağlı olarak değişmektedir. Ozon uygulanan ortamdaki organik ve inorganik maddelerin artması ile ozonun etkinliğini belirleyen oksidasyon gücünün bir kısmının bu bileşikleri okside etmek üzere harcanacağı belirtilmektedir (173).

Ozon, mikroorganizmaları, hücresel bileşenlerini ileri derecede oksidasyona uğratarak etkisiz hale getirmektedir. Hedef mikroorganizmanın ozonla inaktif hale getirilmesinde iki mekanizma gerçekleşmektedir. Birinci mekanizmada protein, peptid ve enzimlerin aminoasit ve sülfidril grupları

okside olmakta ve kısa peptitler oluşmaktadır. İkinci mekanizmada ise, çoklu doymamış yağ asitleri, asit peroksitlerine okside olmaktadır. Hücre zarındaki çift bağlı doymamış lipitler etkilenmekte, gram negatif bakterilerdeki lipoprotein ve lipopolisakkarit tabakaları etkilenerek hücre zarı geçirgenliğini değiştirmektedir. Ozon, herhangi bir seçicilik göstermeksizin hücre içi proteinlerini okside ederek hızlı hücre ölümlerine neden olmaktadır. Ayrıca nükleik asitlerin zarar görmesinden dolayı da hücre ölümleri gerçekleşmektedir (174).

Yine yapılmış bir başka çalışmada ozonun lökosit ve endotel hücrelerinde interferon, interlökin ve büyüme faktörlerinin yapımını indüklediği saptanmıştır (179,180) ve yara iyileşmesi, infeksiyöz hastalıklarda yapılan vaka analiz çalışmalarında olumlu etkiler göstermiştir ve geniş bir aralıktaki çeşitli enfeksiyon hastalıklarında etkin olarak uygulanmaktadır (181-183).

Ozon tedavisinin özellikle inflamatuvar sürecin yoğun olarak yaşandığı ve immün sistemin ön planda yer aldığı fizyopatolojik durumlarda tedavi edici etkisi şaşırtıcıdır. Martinez-Sanchez ve arkadaşları diyabetik ayak gelişmiş hastalarda yaptıkları çalışmada ozon tedavisinin etkinliğini değerlendirmişlerdir. Bu çalışmada ozon tedavisi uygulanan hastalarda antibiyotik tedavisi alanlara göre yara iyileşmesi hızlanmış, hastanede kalma süreleri kısalmıştır (184). Yapılan çalışmalarda ozon uygulamalarının plateletlerden PDGF, TGF- β 1 ve IL-8 gibi sitokinlerin salgılanmasını artırdığı gösterilmiştir. Kim ve arkadaşları da bunlara benzer sonuçları yaptıkları yara iyileşmesi çalışmasında göstermişlerdir. Bu

çalışmada topikal uygulanan ozon yara dokusunda PDGF, TGF ve VEGF ekspresyonunda artışa neden olmuş, yara iyileşmesini hızlandırmıştır(185).

Ozonun diğer bir uygulama şekli olan minör hemoterapide ise hastadan alınan 5 ml kan ile aynı miktarda 80–100 µl/ml konsantrasyonundaki oksijen/ozon karışımı bir dakika inkübe edilir. Bu süre zarfında ozonunun, yine aynı şekilde kanda önce çözünüp sonra da biyolojik moleküller ile reaksiyona girmesi beklenir. Sonrasında bu kan, gluteus kasına yavaşca enjekte edilir. Bu uygulama sonrasında kas içine enjekte edilen kanın doku derinliklerine ilerlerken pıhtılaşmasına rağmen hastalardan çok azı hafif şişme ve ağrıdan yakınmaktadır. Bu işlem esnasında anesteziye gerek yoktur. Tartışmalı olmakla birlikte, bu uygulamanın immünmodülatuar bir etkisinin olduğu iddia edilmekte ve etki mekanizması şu şekilde açıklanmaktadır: Enjeksiyon yerinde hafif derecede steril inflamasyon meydana gelmekte, bölgeye nötrofil ve monositler gelerek denatüre proteinleri ve parçalanmış eritrositleri fagosit etmektedir. Eğer kan içinde HCV, HBV ve HIV gibi virüsler var ise ozon tarafından inaktive edilip parçalanmış bu virüs atıkları bölgeye gelen bu immün hücreler tarafından ortadan kaldırılır. Böylece bu işlem bir çeşit aşı etkisi oluşturur ve immün sistemi bu antijenlere karşı uyardığı saptanmıştır (186).

Kültür sonuçlarının değerlendirilmesinde ise kontrol grubu ile diğer üç grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur. Antibiyotik grubundaki tavşanların hiçbirisinin dizinde üreme olmazken ozon+antibiyotik grubundan 1 adet tavşanın dizinde üreme olması pekte beklediğimiz bir sonuç değildi. Bu sonucun çıkması kontaminasyon veya herhangi bir dış faktörün sonucu veya tavşandan kaynaklanabilecek bir etki

ile oluşmuş olabilir. Bu bir adet tavşanın dizindeki üreme olması istatistiksel olarak anlamlı görülmemiştir. Ozon, antibiotik, ozon+antibiotik gruplarının kültür sonuçlarına göre kendi aralarındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

İnsan ve hayvanlardaki ozon kullanımının tartışmaları hala mevcuttur. Özellikle yüksek doz kullanımında serbest radikal formasyonları salınımına bağlı yan etkileri ve inhalasyon yolu ile verildiğinde görülen respiratuar sistemdeki iritan etkileri bu tartışmada önemli rol almaktadır. Solunan havadaki ozon gazının farklı konsantrasyonlarda gösterdiği toksik etkiler gösterilmiştir (187). Solunan havadaki O₃ konsantrasyonu 0,1 ppm olduğunda üst hava yollarında irritasyon ve salgı artışı, 1,0 – 2,0 ppm arasında rinit, öksürük, baş ağrısı, bazen öğürme ve bulantı, 2 – 5 ppm arasında 10 – 20 dk süre maruz kalındığında ilerleyici dispne, bronşiyal spazmi retrosternal ağrı, 5 ppm dozunda 60 dk maruziyette akut pulmoner ödem ve bazen respiratuar paralizi, 10 ppm dozundaki maruziyette 4 saat içinde ölüm, 50 ppm dozundaki maruziyette ise dakikalar içinde ölüm görülmüştür (187).

Ozon zehirlenmelerinin semptomları arasında başağrısı, halsizlik, gözde ve boğazda yanma hissi, keskin bir tat ve koku hissi ile öksürük yer almaktadır (188). Guzel-Seydim ve ark. 1-2 saat süreyle 0,65 ppm konsantrasyondaki ozona maruz kalmakla köpeklerin solunum hızları artarken, 4-6 hafta süresince 0,2 ppm ve daha yüksek konsantrasyonlara maruz kalım ile farelerin akciğerlerinin etkilenecek solunum yollarının zarar gördüğünü saptamışlardır (174).

Çalışmamızda cerrahi işlem sonrasında 16 adet hayvanda ölüm gerçekleşmiş olup bu 16 tavşanın 8 adedi ozon grubundaki tavşanlardan , 6 adedi kontrol grubundan, 2 adedi ise antibiyotik grubundaki tavşanlardan oluşmaktadır.Ozon grubundaki ölen tavşanların 2 tanesinde 2. dozda 10-20 µg/ml 'den 1,5 cc ozon uygulaması sonrasında ani ölüm gerçekleşmiş olup sonrasındaki tedavi dozumuz bu şekilde olmuştur.Ancak 3. dozda uygulanan ozon miktarı yine 10-20 µg/ml 'den 1 cc olmasına rağmen 3. dozda 1 adet daha tavşanda ozon uygulaması sonrasında ani ölüm görülmüştür. Bu ölümler muhtemel ozon toksisitesine veya anafilaktik reaksiyona bağlı gelişmiş olabileceği, düşünülmektedir. Ozon grubunda görülen diğer 5 ölüm ozon uygulaması sonrası en erken 40. saatte görülmesi ölümlerin sebebinin ozona bağlı olmadığını düşündürmektedir.Ozon grubundaki bu 5 tavşandaki, kontrol grubundaki 6 tavşandaki ve antibiyotik grubundaki 2 tavşandaki görülen ölümlerin muhtemel sepsise veya dış faktörlere bağlı olduğu düşünülmektedir.

6. SONUÇLAR

Tavşanlarda deneysel enfekte diz protezi modelinde enfeksiyonun eredikasyonu ve eklem kıkırdağı hasarı üzerinde intraartiküler uygulanan ozonun etkilerinin araştırıldığı bu çalışmadan şu sonuçlar çıkarılabilir:

Histolojik çalışma sonuçlarına göre en iyi sonuç OAB grubunda bulunurken, bunu sırasıyla AB, O ve K grupları izlemiştir. Kıkırdak hücre kaybının önlenmesinde ve pannus oluşumunun önlenmesinde kontrol grubu ile diğer 3 grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunurken diğer grupların kendi arasında fark bulunmamıştır. Kıkırdak erozyonu ve kondrositlerin kümeleşmesi bakımından histolojik histokimyasal toplam skor açısından ozon grubunda ile kontrol grubuna göre daha iyi bulunurken istatistiksel olarak bakıldığında kontrol grubu ile benzer sonuç elde edilmiştir.

Ozon alan gruplardan 1 doz ozon grupta histolojik-histokimyasal sonuç 2 doz alan gruba göre minimal yüksek çıksada istatistiksel olarak anlamlı görülmemiştir. 2 doz ozon alan 4 tavşanın histolojik-histokimyasal sonuçları kontrol grubu ile benzer bulunmuştur.

Kültür sonuçları incelendiğinde ise en iyi sonuç AB grubunda bulunmuşken, bunu OAB, O, ve K grupları takip etmiştir. Aslında en iyi sonucu OAB grubunda beklenirken bu grupta 1 adet tavşanda üreme görülmesi çevresel faktörlerden veya bu tavşanın kendisinden kaynaklanan bir nedenden dolayı gerçekleşmiş olabileceği düşünülmüş olup istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmemiştir. Çalışmamızda protez enfeksiyonun eredikasyonu üzerine ozonunun etkin olduğunu fakat antibiyotiklere ilave edilmesine gerek duyulmadığı sonucu çıkarılmıştır.

Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar ışığında diz protez enfeksiyonunun eradikasyonu ve kırıldak harabiyetinin önlenmesinde ozonun antibiyotikler kadar olmasada etkin olduğu fakat tedavide antibiyotiklere ilave olarak verilmesinde gerek olmadığı sonucu çıkarılmıştır.

7.ABSTRACT

ERADICATION OF INFECTION AT EXPERIMENTAL INFECTED KNEE PROTHESIS MODEL AND EFFECTS OF ANTRAARTICULAR OZONE PRACTICE ON ARTICULAR CARTILAGE

Aim:The aim of this research to find the effects of ozone on the infection eradication & prevention of cartilage damage in a animal model with infected knee.

Materials and Methods:In this model,24 New Zeland rabbit has taken an done poliyethylene washer with screw was placed on to right femur lateral condyle.In the same time Staphylococcus aureus was inoculated intraarticularly.Rabbits grouped in to 4 which were control, antibiotic, ozone+antibiotic.On the 7th day of inoculationall animals were clinically examined and there was no infection .The all knees were irraguled with 1 cc 0,09 % NaCl solution.In all groups 2 animals are chosen randomaly & their samples investigated for infection.The animals in the antibiotic group,has taken antibiotic treatment for 14 days.The animals in the ozone grup,has taken ozone treatment 3 days for week in 2 week period.The animals in the ozone+antibiotic group has taken both.The all animals are sacrificed in the end of 3rd week.The cultural samples were taken all right knees of the animalls with left knees of the control goup.Infected knees were evalutated for culturing results with histologic-histochemical scorning.

Signs: The statistical significant difference between the control group with rest in culturing & histologic-histochemical scoring results. This was not the case in the rest. Although it was not reached into the statistical significance, the histological-histochemical scores were lowest in the ozone+antibiotic group, and the culturing results in the antibiotic group.

Results: The reducing effect of the ozone on the synovial inflammation & cartilage damage can be attributed in to its antibacterial & antiinflammatory effects. The ozone addition is not needed in the infection eradication & prevention of cartilage damage in the knee prosthesis infections.

Key words: Cartilage damage, ozone, prosthesis infections.

8. KAYNAKLAR

1. COOPER,C.(1997).Osteoarthritis and Related Disorders. Epidemiology. In:Rheumatology. Klippel JH, Dieppe PH (eds), 2nd Edition, London, Mosby, 2.1-2.8
2. Riley LH. The evolution of arthroplasty of the knee. Instructional Course Lectures. Rosemont: American Academy of Orthopaedic Surgeons, 1974; 23: 1.
3. Zimmerli W, Trampuz A, Ochsner PE. Prosthetic-joint infections. *N Engl J Med*2004; 351:1645
4. Bowden GHW, Li YH. Nutritional influences on biofilm development. *Adv Dent Res* 1997; 11: 81-99.
5. Mc Elfresh E. History of Arthroplasty. Morrey BF,editor. Joint Replacement Arthroplasty. New York: Churchill Livingstone, 1991;3.
- 6.Tooms RE. Arthroplasty of ankle and knee. Crenshaw AH, editor.Campbell's Operative Orthopaedics. 8th ed. St. Louis: Mosby-Year Book Inc. 1992;15: 390.
7. Insall JN. Historical development, classification and characteristics of knee prostheses. Insall JN editor. Surgery of the knee. 2nd ed. New York: Churchill Livingstone Inc. 1993;677.
- 8.Riley LH. The evolution of arthroplasty of the knee. Instructional Course Lectures.Rosemont: American Academy of Orthopaedic Surgeons, 1974; 23: 1.
9. Aydoğdu S, Sur H. Total diz protezleri. Ege R editör. Diz sorunları. Ankara: Bizim Büro Basımevi, 1998;391-403.
10. Guyton JL, Crockarell JR, Jr. Arthroplasty of ankle and knee. Campbell's Operative Orthopaedics. 10th ed. St. Louis: Mosby Inc, 2003;243-313.

11. Vince KG. Principles of condylar knee arthroplasty. Issues evolving. Instructional Course Lectures. Rosemont: AAOS 1993;42: 315.
12. Tooms RE, Harkess, JW. Arthroplasty: introduction and overview. Crenshaw AH, editor. Campbell's Operative Orthopaedics. 8th ed, St. Louis: Mosby-Year Book Inc, 1992;14: 371.
- 13.Şener N. Total diz artroplastisi revizyonları (Uzmanlık Tezi). İstanbul: İstanbul Tıp Fakültesi, 1997
14. .Aoran A Poss R. Teratment of infected total knee arthroplasty using articulating spacer. Clin Orthop. 430, 2005; 125-131
15. McDonald DA. The infected joint replacement: prevention, diagnosis and treatment. Current Orthop. 9; 1995: 21
16. Poss R. Factors influencing the incidence and outcome of infection following total joint arthroplasty. Clin. Orthop. 182;1984: 117-125
17. Thornhill TS. Total knee infection. Callaghan JJ. OKU. Hip and knee reconstruction.Rosemont. American Acedemy of Orthopedic Surgeons. Vov 44. 1995; 297
18. Speller DCE. Microbiology of infected joint prosthesis. Seminars in 1: 1986; 1
19. Bannister GC. Infections in hip and knee prosthesis. Current Opinion in Orthop. 2. 1991; 65
20. Costertand JW. Ritter MA. Bacterial biofilms. A common cause of persistent infections. Science 284; 1999; 1318-1322
21. Andrel JN. Role of nutrrient limitation and stationary phase existence in Klepsiella Pneumonia biofilm resistance to ampicillin and ciprofloksasin. Antimicrop agents. Chemother 2003; 47; 1251-1256

22. Teksworth K. Infection after total knee arthroplasty evaluation and treatment. *Current opinion in orthopaedics*. 14: 2003; 45-51
23. Lindgvist C, Slatis P: Dental bacteremia: a neglected cause of arthroplasty infections. *Acta orthop Scand* 56 : 1985, 506
24. Johnson DP : Infection after knee arthroplasty. *Acta Orthop Sxan (Suppl 252)*: 1993,1
25. Ritter MA : Intra operative controls for bacterial contamination during total knee replacement. *Orthop Clin North Am* 20 (1): 1989, 49
26. Ritter MA : Intra operative controls for bacterial contamination during total knee replacement. *Orthop Clin North Am* 20 (1): 1989, 49
27. Irvine GB :Prevention of infection in orthopaedic surgery . Baret D (ed). *Essential basic sciences for orthopaedics*. Trombridge , Butterworth-Heinmann Ltd. 1994, 148.
28. Brause BD : Infected total knee replacement. *Orthop Clin North Am* 13(1) : 1982,245
29. Lindgvist C, Slatis P: Dental bacteremia: a neglected cause of arthroplasty infections. *Acta orthop Scand* 56 : 1985, 506
30. Brause BD : Infected total knee replacement. *Orthop Clin North Am* 13(1) : 1982, 245
31. Weiss APC, Krackow KA.persistent wound drainage after primary total knee arthroplasty. *J Artroplasty* 8 (3):1993, 295-300
32. Insall JN , Hass SB. *Complications of total knee arthroplasty*.insall JN (ed) *Surgery of total knee*, 2 nd edition.new york, Churchill Livingstone Inc.1993, 892

33. Windsor RE. Insall JN. Management of the infected TKA. Insall JN (ed) Surgery of the knee, 2 nd edition. New york, Churchill Livingstone Inc.1993, 959
34. Hofmann AA. Treatment of infected total knee artroplasty using an articulating spacer. 2 -12 years experience. Clin Orthop. 430. 2005; 125-131
35. Hayakawa K. Treatment of infected TKA. Infectious diseases in clinical practise 14: 2006; 211-216
- 36.Schofroth M, Zimmerli W. Infections. Ochsner PE ed. Total hip replacement. Berlin, Springer Verlog 2003; 65-90
37. Zimmerli W. Prostetic joint infections. The new England journal medicine 351; 2004; 1645-1651
38. Parvizi J. Periprosthetic joint infections. In: Lieberman JR (eds). AAOS Compre-hensive Orthopaedic Review.2009;1067-1073.
- 39.Munjal S. Ritter MA. Revision total knee arthroplastpy. Planning, contraversies and managment infections. Jim FH ed. AAOS instructural course lectures. vol 50 St Louis Mosby 2001; 367
40. Rand JA. Supracondylar fracture of the femur associated with polyethylene wear after total knee arthrplasty. J Bone Joint Surg 76 A: 1994, 1389
41. Jaureguito, J.W., Eliot, J.S., Lietner, T.,et al. The effects of arthroscopic partial lateral meniscectomy in an otherwise normal knee: a retrospective review of fonctional , clinical and radiographic results, Arthroscopy 11: 1995, 29
42. Laskin R. Patell G. Total knee replacement in the post patellectomy patient, J Arthropasty 9:1994,109.

43. Aaron A. Treatment of infected total knee arthroplasty using an articulating spacer *Clin. Orthop* 430. 2005, 125-131
44. Beck EG, Wasser G, Viebahn-Hansler R. The current status of ozone therapy empirical developments and basic research. *Forsch Komplementarmed.* 1989; 5:61-75 (İngilizce versiyonu).
45. Ozler M, Oter Ş, Korkmaz A. Ozon gazının tıbbi amaçlı kullanılması. *TAF Prev Med Bull.* 2009; 8(1):59-64.
46. Bocci VA. Scientific and medical aspects of ozone therapy. State of the art. *Arch Med Res.* 2006; 37(4): 425-35.
47. Uysal N, Schapira RM. Effects of ozone on lung function and lung diseases. *Curr Opin Pulm Med* 2003; 9(2):144-50.
48. Bocci VA. Tropospheric ozone toxicity vs. usefulness of ozone therapy. *Arch Med Res.* 2007;38(2): 265-67.
49. Viebahn-Haensler R. Milestones of medical ozon. 15th Ozone World Congress of the International Ozone Association. September 2001, London, England. Available from: http://www.ozonosan.de/milestones_of_medical_ozone_17.htm .
50. Pryor WA, Squadrito GL, Friedman M. The cascade mechanism to explain ozone toxicity: The role of lipid ozonation products. *Free Radic Biol Med* 1995 (6);19:935-41.
51. Uppu RM, Pryor WA. The reactions of ozone with proteins and unsaturated fatty acids in reverse micelles. *Chem Res Toxicol.* 1994;7(1):47-55.
52. Hernandez, FA. To what extent does ozone therapy need a real biochemical control system? Assessment and importance of oxidative stress. *Arch Med Res.* 2007;38(5): 571-8.

53. Halliwell B, Clement MV, Long LH. Hydrogen peroxide in the human body. *FEBS Lett* 2000;486(1):10-3.
54. Bocci V, Aldinucci C, Bianchi L. The use of hydrogen peroxide as a medical drug. *Riv Ital Ossigeno Ozonoterapia*. 2005;4:30-39.
55. Rice-Evans C, Miller NJ. Total antioxidant status in plasma and body fluids. *Methods Enzymol*. 1994; 234: 279-93.
56. Mendiratta S, Qu Z-C, May JM. Erythrocyte ascorbate recycling: antioxidant effects in blood. *Free Radic Biol Med*. 1998;24(5):789-97.
57. Antunes F, Cadenas E. Estimation of H₂O₂ gradients across biomembranes. *FEBS Lett* 2000; 475: 121-6.
58. Dianzani MU. 4-Hydroxynonenal and cell signalling. *Free Radic Res*. 1998;28(6):553-60.
59. Snyder SH, Baranano DE. Heme oxygenase: a font of multiple messengers. *Neuropsychopharmacology*. 2001;25(3):294-8.
60. Bocci V. OZONE. A New Medical Drug. Dordrecht, The Netherlands:Springer;2005.
61. Bocci V, Luzzi E, Conradeschi F, Paulescu L, Rossi R, Cardaioli E, et al. Studies on the biological effects of ozone. 4. Cytokine production and glutathion levels in erythrocytes. *J Biol Regul Homeost Agents*. 1993(4); 7:133-8.
62. Valacchi G, Bocci V. Studies on the biological effects of ozone: 11. Release of factors from human endothelial cells. *Mediat Inflamm*. 2000;9(6):271-6.
63. Frehm EJ, Bonaventura J, Gow AJ. S-nitrosohemoglobin: An allosteric mediator of NO group function in mammalian vasculature. *Free Radic Biol Med* 2004;37(4):442-53.

64. Bocci V, Valacchi G, Rossi R, Giustarini D, Paccagnini E, Pucci AM, et al. Studies on the biological effects of ozone: 9. Effects of ozone on human platelets. *Platelets*. 1999; 10(2-3): 110-16.
65. Tylicki L, Lizakowski S, Biedunkiewicz B, Skibowska A, Neweglowski T, Chamienia A, et al. Platelet function unaffected by ozonated autohaemotherapy in chronically haemodialysed patients. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2004;15(7):619-22.
66. Bocci V, Paulesu L. Studies on the biological effects of ozone: 1. Induction of interferon gamma on human leucocytes. *Haematologica* 1990;75(6):510-5.
67. Bocci V, Luzzi E, Corradeschi F. Studies on the biological effects of ozone: 5. Evaluation of immunological parameters and tolerability in normal volunteers receiving ambulatory autohaemotherapy *Biotherapy*. 1994;7(2):83–90.
68. Cross CE, Reznick AZ, Packer L, Davis PA, Suzuki YJ, Halliwell B. Oxidative damage to human plasma proteins by ozone. *Free Radic Res Commun*. 1992;15(6): 347-52.
69. Goldstein BD, Balchum OJ. Effect of ozone on lipid peroxidation in the red blood cell. *Proc Soc Exp Biol Med* 1967; 126(2): 356-8.
70. Bocci V. Ozone as Janus: This controversial gas can be either toxic or medically useful. *Mediators Inflamm*. 2004;13(1): 3-11.
71. Bocci V. Is it true that ozone is always toxic? The end of a dogma? *Toxicol Appl Pharmacol*. 2006; 216(3): 493-504.
72. Schulz S: Ein neues Tiermodell zur integralen Messung von Heilvorgängen bei kleinen Labortieren am Beispiel von ozoniertem Olivenol [A new

- animal model for the integral measurement of healing processes in small laboratory animals with ozonized olive oil as example]. *Dtsch Tierarztl Wochenschr / Ger Vet Med Weekly* 1981; 88:60-4.
73. Gracer, R.I., Bocci, V. Can the combination of localized “proliferative therapy” with “minor ozonated autohemotherapy” restore the natural healing process? *Med Hypotheses*. 2005; 65(4):752-9.
74. Dolphin S, Walker M. Healing accelerated by ionozone therapy. *Physiotherapy*. 1979; 65(3):81-2.
75. Turcic J, Hancevic J, Antoljack T, Zic R, Alfrevic I. Effects of ozone on how well split-thickness skin grafts according to Thiersch take in war wounds. Results of prospective study. *Langenbecks Arch Chir*. 1995;380(3):144-8.
76. Lim Y, Phung AD, Corbacho AM, Aung HH, Maioli E, Reznick AZ, et al. Modulation of cutaneous wound healing by ozone: Differences between young and aged mice. *Toxicol Lett*. 2006;160: 127-34.
77. Polosa R, Sapsford RJ, Dokic D, Cacciola RR, Prosperini G, Devalia JL, et al. Induction of the epidermal growth factor receptor and its ligands in nasal epithelium by ozone. *J Allergy Clin Immunol*. 2004;113(1):120-6.
78. Bocci V, Valacchi G, Corradeschi F, Aldinucci C, Silvestri S, Paccagnini E, et al. Studies on the biological effects of ozone: 7. Generation of reactive oxygen species (ROS) after exposure of human blood to ozone. *J Biol Regulat Homeost Agents* 1998; 12(3): 67-75.
79. Bocci V, Valacchi G, Corradeschi F, Fanetti G. Studies on the biological effects of ozone: 8. Effects on the total antioxidant status and on interleukin-8 production. *Mediators Inflamm*. 1998; 7(5):313-7.

80. Margalit M, Attias E, Attias D, Zimran A, Matzner Y. Effect of ozone on neutrophil function in vitro. *Clin Lab Haematol*, 2001. 23(4): 243-7.
81. Jordan L, Beaver K, Foy S. Ozone treatment for radiotherapy skin reactions: Is there an evidence base for practice? *Eur J Oncol Nurs*. 2002; 6 (4): 220-7.
82. Akkus, I., Kalak, S., Vural, H., 1996. Leukocyte lipid peroxidation, superoxide dismutase, glutathione peroxidase and serum and leukocyte vitamin C levels of patients with type II diabetes mellitus. *Clin. Chem. Acta* 344 (2), 221–7.
83. Atalay, M., Laaksonen, D.E., Niskanen, L., 1997. Altered antioxidant enzyme defenses in insulin-dependent diabetic men with increased resting and exercise-induced oxidative stress. *Acta Physiol. Scand.* 161 (2), 195–201.
84. Atalay, M., Laaksonen, D.E., Niskanen, L., 1997. Altered antioxidant enzyme defenses in insulin-dependent diabetic men with increased resting and exercise-induced oxidative stress. *Acta Physiol. Scand.* 161 (2), 195–201.
85. Bocci V, Zanardi I, Huijberts MSP, Travagli V. Diabetes and chronic oxidative stress. A perspective based on the possible usefulness of ozone therapy. *Diab Met Syndr: Clin Res Rev*. 2010 (basımda); 1-5.
86. Al-Dalain SM, Martinez G, Candelario-Jalil E, Menendez S, Re L, Giuliani A, et al. Ozone treatment reduces markers of oxidative and endothelial damage in an experimental diabetes model in rats. *Pharmacol Res* 2001;44(5):391–6.

87. Martí'nez G, Al-Dalain SM, Mene'ndez S, Giuliani A, Leo'n OS. Ozone treatment reduces blood oxidative stress and pancreas damage in streptozotocin induced diabetes model in rats. *Acta Farmaceutica Bonaerense* 2005;24:491–7.
88. Martí'nez-Sa'nchez G, Al-Dalain SM, Mene'ndez S, Re L, Giuliani A, Candelario- Jalil E, et al. Therapeutic efficacy of ozone in patients with diabetic foot. *Eur J Pharmacol* 2005;523(1-3-):151–61.
89. Tylicki L, Niew GT, Biedunkiewicz B, Burakowski S, Rutkowski B. Beneficial clinical effects of ozonated autohemotherapy in chronically dialysed patients with atherosclerotic ischemia of the lower limbs-pilot study. *Int J Artif Organs*. 2001;24(2):79–82.111. Clavo B, Perez JL, Lopez L, Suarez G, Lloret M, Rodriguez V, et al. Effect of ozone therapy on muscle oxygenation. *J Altern Compl Med* 2003;9(2):251–6.
90. Biedunkiewicz B, Tylicki L, Niewegloski T, Burakowski S, Rutkowski B. Clinical efficacy of ozonated autohemotherapy in hemodialyzed patients with intermittent claudication: an oxygen-controlled study. *Int J Artif Organs*. 2004;27(1):29–34.
91. De Monte A, van der Zee H, Bocci V. Major ozonated autohemo therapy in chronic limb ischemia with ulcerations. *J Alt Compl Med*. 2005; 11(2):363–7.
92. Sharma M, Hudson JB . Ozone gas is an effective and practical antibacterial agent. *Am J Infect Control*. 2008;36(8):559-63.
93. Agrillo A, Ungari C, Filiaci F, Priore P, Iannetti G. Ozone Therapy in the treatment of avascular bisphosphonate-related jaw osteonecrosis. *J Craniofacial Surg*. 2007;18(5): 1071-5.

94. Agrillo A, Petrucci MT, Tedaldi M, Mustazza MC, Marino SM, Galluci C, et al. New Therapeutic Protocol in the Treatment of Avascular Necrosis of the Jaws. *J Craniofacial Surg.* 2007;17(6): 1080-3.
95. Bocci VA. Tropospheric ozone toxicity vs. usefulness of ozone therapy. *Arch Med Res.* 2007;38(2): 265-67.
96. Cataldo F, Gentilini L. On the action of ozone on whole bovine blood. *Polym Degrad Stab.* 2005;89(3): 527-33.
97. Travagli V, Zanardi L, Bocci V. A realistic evaluation of the action of ozone on whole human blood. *Int J Biol Macromol.* 2006; 39(4):317-20.
98. F. Cataldo. How a superficial interpretation of a scientific result can be used as a pretext for the publicity of ozone therapy. *Int J Biol Macromol.* 2005; 37 (5): 289-90.
99. Ozone therapy: myth and fact. *Türk plastik rekonsraktif ve estetik cerrahi dergisi.* Cilt 19/Sayı 3
100. Marchetti D, La Monaca G. An unexpected death during oxygenozone therapy. *Am J Forensic Med Pathol.* 2000; 21(2):144-7.
101. Oppenheimer MJ, Durant TM, Lynch P. Body position in relation to venous air embolism and the associated cardiovascular respiratory changes. *Am J Med Sci* 1953;225(4):362-3.
102. Daschner FD. Hepatitis C and human immunodeficiency virüs infection following ozone autohaemotherapy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1997;16(8):620.
103. Faustini A, Capobianchi MR, Martinelli M, Abbate I, Cappiello G, Peruci CA. A cluster of Hepatitis C virus infections associated with ozone- enriched

transfusion of autologous blood in Rome, Italy. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2005; 26(9):762-7.

104. Gazzeri R, Galarza M, Neroni M, Esposito S, Alfieri, A. Fulminating septicemia secondary to oxygen-ozone therapy for lumbar disc herniation. *Spine.* 2007;32(3): E121-3.

105. Ventral and dorsal root injury after oxygen-ozone therapy for lumbar disk herniation Ginanneschi F, Cervelli C, Milani P, Rossi A. *Surg Neurol.* 2006;66(6): 619-21.

106. Lo Giudice G, Valdi F, Gismondi M, Prosdocimo G, de Belvis V. Acute bilateral vitreoretinal hemorrhages following oxygenozone therapy for lumbar disk herniation. *Am J Ophthalmol.* 2004;138(1):175-7.

107. Corea F, Amici S, Murgia N, Tambasco N. A case of vertebrobasilar stroke during oxygenozone therapy. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* 2004;13(6):259-261.

108. Topical Ozone Therapy for the Treatment of Diabetic Leg Ulcers, CCOHTANo.82002. Available from: <http://www.cadth.ca/media/pdf/234No8ozonetherapyreassesse.pdf>

109. Feldmeier JJ, Chairman and Editor. The Hyperbaric Oxygen Therapy Committee Report; Undersea and Hyperbaric Medical Society: Kensington, 2003.

110. Oter S, Korkmaz A. Relevance of hyperbaric oxygen to ozone therapy. *Arch Med Res.* 2006; 37 (7): 917-8.

111. Culver DH, Horan TC, Gaynes RP, Martoni WJ, Jarvis WR, Emori TG, et al. Surgical wound infection rates by wound class, operative procedure, and patient risk index. *Am J Med,* 1991; 91:152-157.

112. Widmer AF. New developments in diagnosis and treatment of infection in orthopedic implants. *Clin Infect Dis.*2001;33(Supp2):s.94-106.
113. NIH consensus conference: Total hip replacement. NIH Consensus Development Panel on Total Hip Replacement. *JAMA.*1995;273(24):1950–6.
114. Berbari EF, Hanssen AD, Duffy MC, Steckelberg JM, Ilstrup DM, Harmsen WS, et al. Risk factors for prosthetic joint infection: case-control study. *Clin Infect Dis.*1998;27(5):1247-54
115. Sculco TP. The economic impact of infected total joint arthroplasty. *Instructional Course Lectures.*1993;42:349-51.
116. Protez Enfeksiyonlarına Medikal ve Cerrahi Yaklaşım / Prosthetic Joint Infections Medical and Surgical Approach Hanefi Cem Gül, Cumhuri Artuk, Cemil Yıldız. Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji, Ortopedi ve Travmatoloji, Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Ankara, Türkiye
117. William AJ, Hanssen AD, Greenwald AS. Antibiotic loaded bone cement for infection prophylaxis in total joint replacement. *J Bone Joint Surg,* 2006; 88-A: 2487-2500.
118. Chiu FY, Chen CM, Lin CF, Lo WH. Cefuroxime impregnated cement in primary total knee arthroplasty. *J Bone Joint Surg Am.* 2002;84:759-62.
119. Lautenschlager EP, Jacobs JJ, Marshall GW, Meyer PR Jr. Mechanical properties of bone cements containing large doses of antibiotic powders. *J Biomed Mater Res.* 1976;10:929-38.
120. Lautenschlager EP, Marshall GW, Marks KE, Schwartz J, Nelson CL. Mechanical strength of acrylic bone cements impregnated with antibiotics. *J Biomed Mater Res.* 1976;10:837-45.

121. Seldes RM, Winiarsky R, Jordan LC, Baldini T, Brause B, Zodda F, Sculco TP. Liquid gentamicin in bone cement: a laboratory study of a potentially more costeffective cement spacer. *J Bone Joint Surg Am.* 2005;87:268-72.
122. Tunney MM, Patrick S, Gorman SP, Nixon JR, Anderson N, Davis RI, Hanna D, Ramage G. Improved detection of infection in hip replacements. A currently underestimated problem. *J Bone Joint Surg Br.* 1998;80:568-72.
123. Wininger DA, Fass RJ. Antibiotic-impregnated cement and beads for orthopedic infections. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996;40:2675-9.
124. Segawa H, Tsukayama DT, Kyle RF, et al. Infection after total knee arthroplasty. *J Bone Joint Surg,* 1999; 81-A: 1434-45.
125. Zimmerli W, Ochsner PE. Management of infection associated with prosthetic joints. *Infection* 2002; 30: 99-108.
126. Parvizi J. Periprosthetic joint infections. In: Lieberman JR (eds). *AAOS Comprehensive Orthopaedic Review.* 2009;1067-1073.
127. Sonication of Removed Hip and Knee Prostheses for Diagnosis of Infection Andrej Trampuz, M.D., Kerryl E. Piper, M.S., Melissa J. Jacobson, A.S., Arlen D. Hanssen, M.D., Krishnan K. Unni, M.D., Douglas R. Osmon, M.D., Jayawant N. Mandrekar, Ph.D., Franklin R. Cockerill, M.D., James M. Steckelberg, M.D., James F. Greenleaf, Ph.D., and Robin Patel, M.D.
128. Improved Diagnosis of Periprosthetic Joint Infection by Multiplex PCR of Sonication Fluid from Removed Implants_Yvonne Achermann,^{1†} Markus Vogt,^{1,2} Michael Leunig,² Ju¨rg Wu¨st,³ and Andrej Trampuz^{4*}
129. Microbiologic Diagnosis of Prosthetic Shoulder Infection by Use of Implant Sonication_Kerryl E. Piper,¹ Melissa J. Jacobson,¹ Robert H.

Cofield,² John W. Sperling,² Joaquin Sanchez-Sotelo,² Douglas R. Osmon,¹ Andrew McDowell,⁵ Sheila Patrick,⁵ James M. Steckelberg,¹ Jayawant N. Mandrekar,³ Marta Fernandez Sampedro,¹ and Robin Patel^{1,4*}

130. In Vitro Effect of Ultrasound on Bacteria and Suggested Protocol for Sonication and Diagnosis of Prosthetic Infections_Tor Monsen,^{1,4,5*} Elisabeth Lovgren,¹ Micael Widerstrom,³ and Lars Wallinder² Department of Clinical Bacteriology¹ and Department of Orthopedics,² University Hospital of Umeå, SE-90185 Umeå, Sweden; Department of Infectious Diseases, Hospital of Östersund, SE-83183 Östersund, Sweden³; and Department of Medical Microbiology, St. Olavs University Hospital,⁴ and Institute of Laboratory Medicine, Children's and Women's Health

131. Sonication of Removed Hip and Knee Prostheses for Diagnosis of Infection Andrej Trampuz, M.D., Kerry E. Piper, M.S., Melissa J. Jacobson, A.S., Arlen D. Hanssen, M.D., Krishnan K. Unni, M.D., Douglas R. Osmon, M.D., Jayawant N. Mandrekar, Ph.D., Franklin R. Cockerill, M.D., James M. Steckelberg, M.D., James F. Greenleaf, Ph.D., and Robin Patel, M.D

132. Guyton JL, Crockarell JR, Jr. Arthroplasty of ankle and knee. Campbell's Operative Orthopaedics. 10th ed. St. Louis: Mosby Inc, 2003;243-313.

133. Dixon P, Parish N, Cross J. Arthroscopic debridement in the treatment of the infected total knee replacement. J Bone Joint Surg Br 2004; 86: 39-42.

134. Hanssen AD, Rand JA. Evaluation and treatment of infection at the site of a total hip or knee arthroplasty. Inst Course Lect 1999; 48: 111-22.

135. Leone JM, Hansen AD. Management of infection at the site of a total knee arthroplasty. J Bone Joint Surg Am 2005; 87: 2336-48.

136. Pring DJ, Marks L, Angel JC. Mobility after amputation for failed knee replacement. *J Bone Joint Surg Br* 1988; 70: 770-1.
137. Silva M, Tharani R, Schmalzried TP. Results of direct exchange or debridement of the infected total knee arthroplasty. *Clin Orthop* 2002; 404: 125-31.
138. Buechel FF, Femino FP, D'Alessio J. Primary exchange revision arthroplasty for infected total knee replacement: a long term study. *Am J Orthop* 2004; 33: 190-8.
139. Orchard RA, Stamp WG. Early treatment of induced suppurative arthritis in rabbit knee joints. *Clin Orthop Relat Res* 1968;59:287-93.
140. Goldenberg DL, Cohen AS. Acute infectious arthritis. A review of patients with nongonococcal joint infections (with emphasis on therapy and prognosis). *Am J Med* 1976; 60(3):369-77.
141. Ho G, Su EY. Therapy for septic arthritis. *JAMA* 1982;247(6):797-800.
142. Bardenheier JA, Morgan HC, Stamp WG. Treatment and sequelae of experimentally produced septic arthritis. *Surg Gynecol Obstet* 1966;122(2):249-54.
143. Riegels-Nielsen P, Frimodt-Moller N, Sorensen M, Jensen JS. Rabbit model of septic arthritis. *Acta Orthop Scand* 1987;58:14-9
144. Riegels-Nielsen P, Frimodt-Moller N, Sorensen M, Jensen JS. Synovectomy for septic arthritis. *Acta Orthop Scand* 1991;62:315-8.
145. Salter RB, Bell RS, Keeley FW. The protective effect of continuous passive motion on living articular cartilage in acute septic arthritis: an experimental investigation in the rabbit. *Clin Orthop Relat Res* 1981;159:223-47.

146. Nagel DA, Albright JA, Hollingsworth JW. Studies on the pathophysiology and some host defense factors in staphylococcal arthritis in the rabbit and on the relationship of septic inflammation rate. *Yale J Biol Med* 1966;39(2):119-28.
147. Solak S, Aydın E, Akdoğan M, et al. Joint cartilage alterations in experimental septic arthritis with antibiotic and nonsteroidal antiinflammatory drug treatment. *Joint Dis Rel Surg* 2000;11(1):60-4.
148. Daniel D, Akeson W, Amiel D, Ryder M, Boyer J. Lavage of septic joints in rabbits: effect of chondrolysis. *J. Bone Joint Surg Am* 1976;58(3):393-5.
149. Canale ST. *Campbell's Operative Orthopaedics* (10 th ed.) Mosby Inc., Philadelphia 2003; pp 685-711.
150. Nade S. Acute Septic Arthritis in Infancy and Childhood. *J Bone Joint Surg Br* 1983;65(3):234-41.
151. Riegels-Nielsen P, Frimodt-Møller N, Sørensen M, Jensen JS. Rabbit model of septic arthritis. *Acta Orthop Scand* 1987;58:14-9
152. Smith RL, Schurman DJ, Kajiyama G, Mell M, Gilkerson MS. The effect of antibiotics on the destruction of cartilage in experimental infectious arthritis. *J. Bone Joint Surg Am* 1987;69(7):1063-8.
153. Wysenbeek AJ, Leitman M, Amit M, et al. Experimental septic arthritis in rabbits treated by a combination of antibiotics and steroid drugs. *Clin Exp Rheum* 1996;14:507-12.
154. Solak S, Aydın E, Akdoğan M, et al. Joint cartilage alterations in experimental septic arthritis with antibiotic and nonsteroidal antiinflammatory drug treatment. *Joint Dis Rel Surg* 2000;11(1):60-4.

155. Lane J, Falahee M, Wojtys E, Hankin F, Kaufer H. Pyoarthrosis of the knee. Treatment considerations. *Clin Orthop Relat Res* 1990;252:198-204.
156. Goldenberg DL, Chisholm PL, Rice PA. Experimental models of bacterial arthritis: a microbiologic and histopathologic characterization of the arthritis after the intraarticular injections of *Neisseria gonorrhoeae*, *Staphylococcus aureus*, group A streptococci, and *Escherichia coli*. *J Rheumatol* 1983;10(1):5-11.
157. Johnson AH, Campbell WG, Callahan BC. Infection of rabbit knee joints after intraarticular injection of *Staphylococcus aureus*. Comparison with joints injected with *Staphylococcus albus*. *Am J Pathol* 1970;60(2):165-77.
158. Rogers DE, Tompsett R. The survival of staphylococci within human leukocytes. *J Exp Med* 1952;95(2):209-30.
159. Shirliff M, Mader J. Acute septic arthritis. *Clin Microbiol Rev* 2002;15(4):527-44.
160. Bhawan J, Das Tandon H, Roy S. Ultrastructure of synovial membrane in pyogenic arthritis. *Arch Pathol* 1973;96(3):155-60.
161. Schurman DJ, Johnson BL, Amstutz HC. Knee joint infections with *Staphylococcus aureus* and *Micrococcus* species. *J Bone Joint Surg Am* 1975;57(1):40-9.
162. Williams RJ, Smith RL, Schurman DJ. Septic arthritis. Staphylococcal induction of chondrocyte proteolytic activity. *Arthritis Rheum* 1990;33(4):533-41
163. Eren A, Duygu K, Onur U, Firdevs G, Varol S, Nuri K. Effects of early phase intraarticular osmic acid (OsO₄) therapy of experimental septic arthritis on joint cartilage. *Joint Dis Rel Surg* 2001;12(1):61-70.

164. Sillinger T, Than P, Kocsis B, Lörinczy D. DSC measurement of cartilage destruction caused by septic arthritis. *J Therm Anal Cal* 2005;82(1):221-3.
165. Serkedjieva J, Manolova N, Bankova V. Anti-influenza virus effect of some propolis constituents and their analogues (esters of substituted cinnamic acid). *J Nat Prod* 1997;55(3):294-302.
166. Nord KD, Dore DD, Deeney VF, et al. Evaluation of treatment modalities for septic arthritis with histological grading and analysis of level of uronic acid, neutral protease, and interleukin-1. *J Bone Joint Surg Am* 1995;77(2):258-65.
167. Curtiss PH Jr, Klein L. Destruction of articular cartilage in septic arthritis: in vitro studies. *J Bone Joint Surg Am* 1963;45:797-806.
168. Curtiss PH Jr, Klein L. Destruction of articular cartilage in septic arthritis: in vivo studies. *J Bone Joint Surg Am* 1965;47(8):1595-604.
169. Harris Jr ED, Parker HG, Radin EL, Krane SM. Effect of proteolytic enzymes on structural and mechanical properties of cartilage. *Arthritis Rheum* 1972;15(5):497-503.
170. Riegels-Nielsen P, Jensen JS. Septic arthritis of the knee: five cases treated with synovectomy. *Acta Orthop Scand* 1984;55(6):657-9
171. Guzel-Seydim, Z. , Bever Jr. , P.I., Grene, A.K. (2004b). Efficacy of ozone to reduce bacterial populations in the presence of food components. *Food Microbiology*, 21: 475-479.
172. DURAN K., M. BAHTİYAR, A.E. KÖRLÜ, S. PERİNÇEK, D. ÖZDEMİR. 2006. Dogal Ozon. *Tekstil ve Konfeksiyon*, 2: 75-79.
173. Ekici, L., Sa_ dıç, O., Kesmen, Z. (2006). Gıda endüstrisinde alternatif bir dezenfektan: Ozon. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 1: 47-57.

174. Guzel-Seydim, Z., Grene, A.K., Seydim, A.C. (2004a). Use of ozone in the food industry. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 37: 453-460.
175. *Turkiye Klinikleri J Med Sci* 2008;28(Suppl):S245-S247
176. Viebahn-Haensler R. Uygulama biçimleri ve kullanım alanları. Tedavi uygulamaları. Balkan B, çeviri editörü. *Ozonun Tıpta Kullanımı*. 1.Baskı. İstanbul: Medikal Ozon Oksijen Derneği; 2005. p. 53-65.
177. Zhou, H. ve Smith, D. W., 2002, Advanced Technologies in Water and Wastewater Treatment, *J. Environ. Eng. Sci.*, 1, 247-264.
178. Kevin G.B., Amy, C.L.W. (1992). *Staphylococcus aureus*: Growth and enterotoxin production in mushrooms. *Journal of Food Science*, 57: 70703.
179. Bocci VA, Paulesu L. Studies on the biological effects of ozon: Introduction of interferon gamma on human leucocytes. *Haematologica* 1990; 75:510-515
180. Di Paolo N, Bocci V, Gaggiotti E. Ozone Therapy. *Int. J Artif Organs* 2004; 27:168-175
181. Stübinger S, Sader R, Filippi A. The use of ozone in dentistry and maxillofacial surgery: a review. *Quintessence Int.* 2006; 37(5): 353-9.
182. Nogales CG, Ferrari PH, Kantorovich EO, Lage-Marques JL. Ozone therapy in medicine and dentistry. *J Contemp Dent Pract.* 2008; 9(4): 75-84.
183. Bocci V. The case for oxygen-ozonotherapy. *Br J Biomed Sci.* 2007; 64(1): 44-9.

184. Martínez-Sánchez G, Al-Dalain SM, Menéndez S, Re L, Giuliani A, Candelario-Jalil E, Alvarez H, Fernández-Montequín JI, León OS. Therapeutic efficacy of ozone in patients with diabetic foot. *Eur J Pharmacol.* 2005; 523(1-3): 151-61.
185. Kim, J.G., Yousef, A.E., Dave, S. (1999b). Application of ozone for enhancing the microbiological safety and quality of foods. *Journal of Food Protection*, 62: 1071-1087.
186. Bocci VA. Scientific and Medical Aspects of Ozone Therapy. State of the Art. *Arch Med Res* 2006; 37:425–35.
187. Bocci V, Ozone a new medical drug. published by Springer, Dordrecht, The Netherlands. 2005. 75–85.
188. Ekici, L., Sa_dıç, O., Kesmen, Z. (2006). Gıda endüstrisinde alternatif bir dezenfektan: Ozon. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 1: 47-57.

