

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ



TAVŞANLARDA *CANDIDA ALBICANS* İLE DENEYSEL OLARAK
OLUŞTURULAN KERATİTİSİN TEDAVİSİNDE OZON TEDAVİSİNİN
ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

Proje No:TSA-2016-6849

Proje Türü:Normal Araştırma Projesi

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:

Prof. Dr. İhsan KELEŞ
ERÜ Veteriner Fakültesi
İç Hastalıkları Anabilim Dalı

Araştırmacının Adı Soyadı
Birimi/Bölümü

Prof. Dr. Ayşe Nedret KOÇ
ERÜ Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Prof. Dr. Vehbi GÜNEŞ
ERÜ Veteriner Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı
Doç. Dr. Latife ÇAKIR BAYRAM
ERÜ Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı
Doç. Dr. Mustafa Altay ATALAY ()
ERÜ Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Doç. Dr. Hatice ARDA
ERÜ Tıp Fakültesi Göz Hastalıkları Anabilim Dalı
Yrd. Doç. Dr. Kemal VAROL
MAKÜ Burdur Gıda Tarım ve Hayvancılık MYO Veterinerlik Bölümü
Öğr. Gör. Dr. İlknur KARACA BEKDİK
ERÜ Veteriner Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı
Arş. Gör. Gencay EKİNCİ
ERÜ Veteriner Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı

Ocak 2018

KAYSERİ

TEŞEKKÜR: Bu çalışmaya verdikleri destekten dolayı Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne ve Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi Koordinatörü Prof. Dr. Adem KALINLI'ya Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi çalışanlarına teşekkür ederiz.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZET	6
ABSTRACT	7
1. GİRİŞ AMAÇ VE KAPSAM	9
2. GENEL BİLGİLER	10
2.1. Kornea	11
2.1.1. Kornea metabolizması	12
2.1.2. Kornea fizyolojisi	12
2.1.3. Kornea Enfeksiyonları	13
2.2. Fungal Keratit	13
2.2.1. Etiyoloji	14
2.2.2. Tanı	14
2.2.3. Tedavi	14
2.2.3.1. Medikal Tedavi:	14
2.3. Ozon	16
2.3.1 Ozonun Üretimi	17
2.3.2. Medikal Ozon ve Etki Mekanizması	18
2.3.3. Ozon Tedavisinin Klinik Etkileri	20
2.3.4. Ozonun Uygulanma Yöntemleri	21
2.3.4.1. Ozonun Topikal Olarak Uygulanması	22
2.3.4.1.1. Endikasyonları	22
2.3.4.2. Ozonlanmış Su	22
2.3.4.2.1. Endikasyonları	23
2.3.4.3. Perioksik Yağ (Ozonlanmış yağlar)	23
2.3.4.3.1. Endikasyonları	23
2.3.4.3.2. Ozonlanmış Yağın Özellikleri	23
2.3.5. Ozonun antibakteriyel etkinliği	24
2.3.6. Diğer uygulamalar	24
3. GEREÇ VE YÖNTEM	25
3.1. Yöntem	25
3.2. Hayvan Materyali	26
3.3. Hayvan Deneyleri	26
3.4. <i>C. albicans</i> Etkenin Üretilmesi	29
3.5. Antimikrobiyal Etkinliğin Değerlendirilmesi	29
3.6. Deneysel olarak keratitisin oluşturulması	29
3.6.1. Keratitisin Değerlendirilmesi	29
3.6.2. Neovaskülarizasyonun Değerlendirilmesi	30
3.6.3. Korneada bulanıklığın değerlendirilmesi	30
3.6.4. Konjonktivitisin değerlendirilmesi	30
3.6.5. Keratitis enfeksiyonunun değerlendirilmesi	31
3.7. Sitoloji	31
3.8. Histopatolojik inceleme	31
3.8.1. Cytospin Teknik	31
3.8.2. Keratitisin histopatolojik olarak değerlendirilmesi	32
3.9. Ozon Yağı Materyali	32
3.9.1. Zeytinyağının Ozonlanması	32
3.9.2. Ozon Yağının Analizi	33

3.9.2.1. Asitlik Tayini	33
3.9.2.2. İyot Sayısı Tayini	33
3.9.2.3. Peroksit Sayısı Tayini	33
3.9.2.4. Para Anisidin Değeri	33
3.9.2.5. pH'nın Belirlenmesi	33
3.9.2.6. Vizkozitenin Belirlenmesi	34
3.10. Ozonlanmış distile su	34
3.11. % 3'lük fluconazole damla ve fluconazole	34
3.12. İstatistiksel analiz	34
4. BULGULAR	35
4.1. Ozonlanmış yağ analiz bulguları	35
4.2. Klinik Ve Mikrobiyolojik Bulgular	35
4.3. Histopatolojik Bulgular	51
4.3.1. Negatif Kontrol Grubunda Histopatolojik Bulgular	51
4.3.2. Enfekte Kontrol Grubunda Histopatolojik Bulgular	52
4.3.3. Tedavi Gruplarında Histopatolojik Bulgular	52
4.4. Sitolojik Bulgular	52
5. TARIřMA SONUÇ	59
6. KAYNAKLAR	62
7. EKLER	

TABLÖLAR

	Sayfa No
Tablo 1. Gözde keratit bulguları	35
Tablo 2. Gözde korneal bulanıklık bulguları	37
Tablo 3. Gözde korneal ülser bulguları	38
Tablo 4. Gözde konjunktivit bulguları	40
Tablo 5. Tedavi öncesi ve tedavi sonrası gözde üreyen <i>C. albicans</i> miktarı.	42

RESİMLER

	Sayfa No
Resim 1. Tedavi öncesi ve tedavi sonrası gözde üreyen <i>C. albicans</i> miktarı.	44
Resim 2. Grup 1’de (FLU+OZY grubu) tedavi öncesi ve sonrası fotoğraflar.	45
Resim 3. Grup 2’de (FLU grubu) tedavi öncesi ve sonrası fotoğraflar.	46
Resim 4. Grup 3’te (OZY grubu) tedavi öncesi ve sonrası fotoğraflar.	47
Resim 5. Grup 4’te (FLU+ODS grubu) tedavi öncesi ve sonrası fotoğraflar.	48
Resim 6. Grup 5’te (ODS grubu) tedavi öncesi ve sonrası fotoğraflar.	49
Resim 7. Grup 6’da (Enfekte kontrol grubu) tedavi öncesi ve sonrası fotoğraflar.	50
Resim 8. Grup 7’de (Negatif kontrol grubu) tedavi öncesi ve sonrası fotoğraflar.	51
Resim 9. Enfekte grubun (Grup 6) Hematoxylin–eosin ile boyanmış preparatları.	54
Resim 10. Enfekte grubun (Grup 6) Pas (Periodic acid Schiff) le boyanmış preparatları.	55
Resim 11. Tedavi grubunun (Grup 1-2) Hematoxylin–eosin ile boyanmış preparatları	56
Resim 12. Tedavi gruplarının (Grup 3-5) Hematoxylin–eosin ile boyanmış preparatları	57
Resim 13. Oküler yüzeyin sitospin tekniğiyle hazırlanan Hematoxylin–eosin (A, B, D, H) ve Papanicolaou (C, E, F, G) ile boyanmış preparatları	58

Tavşanlarda *Candida albicans* ile Deneysel Olarak Oluşturulan Keratitisin Tedavisinde Ozon Tedavisinin Etkinliğinin Araştırılması

Özet: Bu çalışmada tavşanlarda *Candida albicans* ile deneysel olarak oluşturulan keratitisin tedavisinde ozonlanmış zeytinyağının antibakteriyel, antiinflamatuvar etkinliğinin ve fluconazole ile sinerjizmasını araştırılmıştır. Çalışmada canlı ağırlıkları 2-2,5 kg arasında değişen, 42 adet 3-4 aylık, Yeni Zelanda beyaz erkek tavşanlarından rastgele 37 tanesine *Candida albicans* suşu intrastromal olarak enjekte edildi ve daha sonra tavşanlar rastgele altı gruba ayrıldı. Kalan 5 hayvan ise negatif kontrol grubunu oluşturdu. Gruplarda hayvan sayısı Grup 1, 2, 3, 4, 5, 7 (**n=5 tavşan, 10 gözü/grup**), Grup 6 (**n=12 tavşan, 24 gözü/grup**) şeklinde oluşturuldu. **Gruplar;** **Grup 1'**de topikal olarak % 3'lük fluconazole damla ve ozonlanmış zeytinyağı damlası, **Grup 2'**de topikal olarak % 3'lük fluconazole damla, **Grup 3'te** distile su ile dilüe edilmiş ozonlanmış zeytinyağı damlası, **Grup 4'te** topikal olarak % 3'lük fluconazole damla ve 22 µg/ml ozon içeren distile su damlası, **Grup 5'te** topikal olarak 22 µg/ml ozon içeren distile su damlası, **Grup 6'da** fosfatla tamponlanmış tuzlu su (PBS) damla uygulandı. **Grup 7'de** de steril PBS inokülasyonundan 24 saat sonra steril PBS damla uygulandı. Tedavi uygulamadan 48 saat sonra her 12 saatte bir 22 gün boyunca uygulandı. Mantar inokülasyonundan 48 saat sonra ve 3, 8, 12, 16, 20, 24. günlerde kornea opasitesi, korneada neovaskülarizasyon, bulanıklık ve konjuntivitis değerlendirildi. **Grup 6'da** çalışma başlangıcında 2 hayvan, mantar inokülasyonundan 48 saat sonra 5 hayvan, 24. Gün sonunda **Grup 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7'deki** tüm hayvanlar uyutulduktan sonra kornealar mikrobiyolojik histopatolojik inceleme için çıkarıldı. Mikrobiyolojik bulgularda gruplar arası 24. gün üreyen maya miktarlarında karşılaştırıldığında: Grup 6 ile Grup 1, 2, 3, 4, 5, 7 arasında üreyen maya miktarlarında istatistiksel ($p<0,05$) farklılık olduğu belirlendi. Grup içi üreyen maya miktarlarında karşılaştırıldığında; Grup 1, 2, 3, 4, 5'te 48. saat ile 24. gün arasında istatistiksel ($p<0,05$) farklılık olduğu belirlendi. Klinik bulgulardan kornea opasitesi, korneada neovaskülarizasyon, bulanıklık ve konjuntivitis değerlerinin gruplar arası ve grup içi istatistiksel olarak karşılaştırmasında; gruplar arasında; Grup 6 ile Grup 1, 2, 3, 4, 5, 7 arasında 20 ve 24. günlerde istatistiksel ($p<0,05$) farklılık olduğu, grup içi karşılaştırmada ise Grup 1, 2, 3, 4, 5'te 48. saat ile 20 ve 24. günler arasında istatistiksel ($p<0,05$) farklılık belirlendi.

Sonuç olarak bu çalışmada deneysel olarak oluşturulan fungal keratitisin tedavisinde elde edilen klinik, mikrobiyolojik, sitolojik histopatolojik veriler sonucunda ozonlanmış zeytinyağının ve ozonlanmış distile suyun etkili olduğu görülmüştür. Ayrıca ozonlanmış zeytinyağının ve ozonlanmış suyun, fluconazole ile birlikte etki gösterdiği bu çalışma ile kanıtlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Ozon, Ozonlanmış zeytinyağı, keratitis, deneysel keratitis, *Candida albicans*

Studies on the Effectiveness of Ozone Therapy on the Treatment of Experimentally induced Keratitis with *Candida albicans* in Rabbits

Abstract: In the present study, we investigated the antibacterial, antiinflammatory activity and synergism of ozonated olive oil with fluconazole in the treatment of experimentally induced keratitis with *Candida albicans* in rabbits. In the study, *Candida albicans* strains were intrastromally injected into 37 randomly selected New Zealand white male rabbits out of 42 rabbits which were 3-4 months of age, weighing 2 to 2.5 kg. After *Candida albicans* inoculation, the rabbits were randomly divided into six groups. The remaining 5 animals constituted the negative control group. The Groups were composed of as 1, 2, 3, 4, 5, 7 (n = 5 rabbits, 10 eyes / in each group) and Group 6 (n = 12 rabbits, 24 eyes / in the group). To Group 1; Topical 3% fluconazole drop and ozonized olive oil, to Group 2; topical 3% fluconazole drop, to Group 3; ozonated olive oil drop diluted with distilled water. to Group 4, a drop of 3 % fluconazole and a drop of 22 µg / ml ozone containing distilled water, to Group 5; a drop of 22 µg / ml ozone containing distilled water and to Group 6; a drop of phosphate buffered saline (PBS) were applied. To Group 7; sterile PBS was also applied dropwise 24 hours after sterile PBS inoculation. The treatment was applied 48 hours after *Candida albicans* inoculation and the treatment continued for 22 days for every 12 hours. Corneal opacity, corneal neovascularization, turbidity, and conjunctivitis were evaluated 48 hours after fungal inoculation and on days 3, 8, 12, 16, 20. In group 6, 2 animals at the beginning of the study, 5 animals 48 hours after fungal inoculation, at 24th day, all animals in Groups 1, 2, 3, 4,

5 and 7 were sacrificed and corneas were removed for microbiological histopathologic examination.

In microbiological findings, when 24th day cultured yeast amount compared between groups: there were statistically significant difference ($p < 0,05$) in the amount of yeast produced between Group 6 and Group 1, 2, 3, 4, 5, 7. When the amount of yeast production compared within groups; there were statistically significant difference ($p < 0,05$) between 48th hour and 24th day in Group 1, 2, 3, 4, 5. Statistical comparison of corneal opacity, corneal neovascularization, turbidity, and conjunctivitis values between clinical findings from group to group and within groups; among the groups; statistically significant ($p < 0,05$) difference between Group 6 and Groups 1, 2, 3, 4, 5, 7 on days 20 and 24, significant ($p < 0,05$) difference between 48th hour and 20th and 24th days in Group 1, 2, 3, 4, 5 were determined in intra-group comparison.

In conclusion, ozonated olive oil and ozonated distilled water were found to be effective in clinical, microbiological and cytological histopathological data obtained in the experimental treatment of fungal keratitis in this study. It has also been proven by this study that ozonated olive oil and ozonated water act together with fluconazole.

Key words: Ozone, Ozonated olive oil, keratitis, experimental keratitis, *Candida albicans*

1. GİRİŞ AMAÇ VE KAPSAM

Kornea hastalıkları, kataraktan sonra görme kaybının en önemli nedenlerinden biridir. Tüm dünyada, tek taraflı körlüğün en sık sebebi enfeksiyöz keratitlerdir (Altan, 2010; Whitcher ve ark., 2001). Kornea ülserlerinde hastalığın klinik özellikleri diğer enfeksiyöz keratitleri taklit edebildiği için, ajanın bakteriyel mi fungal mi olduğu, başlangıçta saptanamayabilir. Etiyolojik olarak fungal keratitin en sık nedenleri *Candida* ve *Aspergillus* türleridir (Tanure ve ark., 2000). Fungal keratitlerde, görme sonuçları sıklıkla diğer enfeksiyöz keratitlere göre daha kötüdür. Buna bağlı olarak, yanlış tanı ve uygunsuz tedavi sık karşılaşılan sorunlardır. Son 40 yıl süresince hastalığın sıklığında artış olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (Altan, 2010; Tanure ve ark., 2000). Gelişmekte olan ülkelerde yüksek insidans ve tedaviye alınan zayıf yanıt nedeni ile ya da yeterli etkinlikte antifungal ilaçların olmaması ve tanının gecikmesi sebebiyle ağır seyretmekte, endoftalmiye kadar ilerleyebilmekte ve buna bağlı olarak görme kaybının önde gelen nedenleri arasında yer almaktadır (Thomas, 2003; Dursun ve ark., 2003). Geniş spektrumlu antibiyotik ve streoidlerin yaygın kullanımı, kontakt lens kullanımı, oküler yüzey hastalıkları fungal keratit gelişimine katkıda bulunan faktörlerden bazılarıdır. Fungal keratit gelişimi için en önemli risk faktörü olduğu için kırsal alanda ağaç dalı ve benzeri organik maddeler ile olan travmalarda, fungal ajanlar akılda tutulmalıdır (Altan, 2010). Çoğu antifungal ilaçlar yüzeysel mikozlara karşı etkilidir ama derin mantar infiltrasyonlarına karşı mücadelede daha az başarılıdırlar. Özellikle, keratomikozun tedavisi çoğu zaman sınırlı doku penetrasyonu ve dar antimikrobiyal spektrumu ve şu anda mevcut antifungal ajanların toksisitesi nedeniyle hayal kırıklığına sebep olmaktadır (Behrens-Baumann ve ark., 1999). Ayrıca enfeksiyöz hastalıklarda aşırı miktarda ilaç kullanımı, kısa süreli tedavi fungal şüphelere karşı direnç gelişimine yol açmış ve antimikrobiyal ajan yeni tedavi yöntemleri arayışına yönlendirmiştir (Garcia-Ruiz ve ark., 2013; Koç ve ark., 2011; Koç ve ark., 2016). Bu tedavi yöntemlerinden biri de ozon tedavisidir (Geweely 2006; Ouf ve ark., 2016).

Ozon üç oksijen atomundan oluşan bir kimyasal bileşiktir. Ozon (O₃) ve iki atomlu atmosferik oksijenin (O₂) yüksek enerji taşıyan formudur (Bocci, 2010). Ozon güçlü oksidan etkisi ile içme suları ve kirli suların dezenfeksiyonunda kullanılır. Atmosferi kirletmeyen bu maddeye karşı hiçbir bakteriyel direnç bugüne kadar rapor edilmemiştir. Yakın zamanda ozonun farklı formları tıbbi endikasyonların geniş bir alanında kullanılmaktadır. Ozon, bakterilerin nükleik asitlerine zarar verir ve bu etkinin tRNA yapısal analizinde; bozulmanın tercihen guanin kalıntılarındaki olduğu görülmüştür (Sawadaishi ve ark., 1986; Shinriki ve

ark., 1981). Sawadaishi ve ark (1986) süper sarmallı DNA ozonolizi hem proteinlerin hem de lipidlerin bakteriyel membranların ozon ile reaksiyonlarında önemli hedefler olduğunu göstermiştir. Ozon, amino asit ve moleküler ağırlığı farklılıklarına rağmen triptofan kalıntılarında proteinleri böler. Bu sistemin uygulanması, *Helicobacter pylori* ve *S. aureus* tarafından oluşturulan epidermisin enfeksiyonlarının neden olduğu derin enfeksiyonların tedavisine kadar daha geniş ve kapsamlı olabilir. Farklı şekilde ozon içeren solüsyonlar otit, göz içi enfeksiyonları ve vajinit gibi farklı enfeksiyonlara karşı başarıyla kullanılmaktadır (Bocci, 2006b, Geweely, 2006; Kutlubay ve ark., 2013).

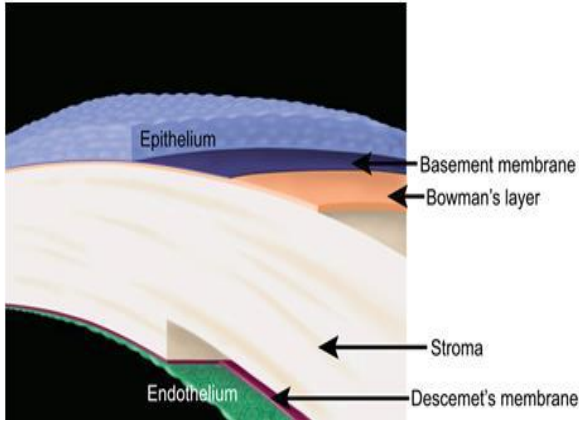
Bu bilgiler ışında, bu çalışmada deneysel olarak oluşturulan fungal keratitisin tedavisinde ozonlanmış zeytinyağının etkisi hakkında bilgi sahibi olarak yeni bilgiler elde edilecektir. Ayrıca mevcut çalışmada yapılan sitoloji ile birlikte klinik ve histopatolojik veriler sonucunda ozonlanmış zeytinyağının ve distile suyun gözde ne gibi etkiler oluşturabileceği hakkında bize bilgiler verecek ve klinik uygulamalara da büyük katkı sağlayacaktır.

Sonuç olarak yapacağımız bu deneysel çalışmadan beklentimiz, ozonlanmış zeytinyağı ve ozonlanmış distile su uygulamasının fungal keratit tedavisindeki etkinliğini ve güvenilirliğini araştırarak literatüre ve klinik uygulamalara katkıda bulunmaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kornea

Kornea gözün ön kısmının merkezinde yer alan çevresindeki diğer dokulardan farklı olarak saydam, damarsız bir doku tabakasıdır. İki önemli fonksiyonu vardır. İlk olarak göze gelen ışığın retinaya yönlendirilmesini sağlar. İkinci olarak gözü korur ve enfeksiyon girişini engeller. Ayrıca sklera ile birlikte oküler konturun devamını sağlar. Korneadaki kollajen dokusu mekanik direnci oluşturur ve gözün iç kısmını hasardan korur. Pürüzsüz yüzeyi ise görsel netliği sağlar. Korneanın horizontal çapı 11-12 mm, vertikal çapı 10-11 mm civarındadır. Yaklaşık 43 dioptrilik kırma gücü ile gözün refraktif gücünün 2/3'ünden fazlasını meydana getirir Korneal doku beslenmesini gözyaşından, limbal bölge çevresindeki kapiller ağlardan ve humor aközden sağlar (Öztekin, 2004; Metindoğan, 2009; Bulam Kılıç, 2014; İnan, 2015).



(Bulam Kılıç, 2014).

Kornea dıştan içe doğru anatomik olarak 5 tabakadan meydana gelir;

1- Epitel tabakası (30-50 mikron)

2- Bowman tabakası (8-14 mikron)

3- Stroma (400-700 mikron)

4- Desme membranı (3-12 mikron)

5- Endotel tabakası (4-6 mikron) (Metindoğan, 2009; Ersöz, 2010; Bulam Kılıç, 2014; İnan, 2015).

Epitel tabakası: Nonkeratinize çok katlı yassı epitelden meydana gelmiştir. Üstte yüzey hücreleri, ortada kanatsız hücreler, altta bazal membran ile Bowman tabakasına bitişik bazal hücreler yer alır. Sürekli mitoz bölünme ile bazal kısımdan kendini yeniler.

Korneal kök hücreler limbusun bazal hücre tabakasında lokalize sınırsız kendini yenileme kapasitesine sahiptirler. Kornea epitelisi ortalama her 7 günde rejenerasyona uğrar. Üst kısımdaki hücreler dökülerek gözyaşı ile birleşir. Epitel tabakası mikroorganizmalara karşı bariyer görevi yapar.

Bowman tabakası Bu tabakada hücre yoktur. Hasarlanınca yenilene olmaz. Duyu sinirleri Bowman tabakasında seyreder ve epitelium hücreleri arasında sonlanır.

Stroma tabakası Tüm korneanın % 90 ını oluşturmaktadır. Düzenli sıralanmış kollajen fibriller ihtiva eder ve böylece korneanın saydamlığına katkıda bulunur. Ekstraselüler bölge proteoglikan yapısında ki madde (keratan sülfat, kondroidin sülfat vb) ile doludur. Kollajen lifler arasında fibroblastlar (keratositler) yerleşmiştir. Ayrıca korneada Dua tabakası olarak adlandırılan stroma ile Descemet membranı arasında altıncı bir tabaka da tanımlanmıştır.

Descement membranı: İnce kollajen liflerden meydana gelmiştir. Stromadan kolaylıkla ayrılabilir. Rejenere olabilir.

Endotel tabakası: Bu tabaka tek sıra hekzagonal hücrelerden meydana gelmiştir. Rejenerasyon kabiliyetine sahip değildir. Azalan hücrelerin yerini komşu hücreler genişleyerek doldurur. Humor aköze karşı bariyer görevi yapar. Korneanın saydamlığının devamında önemli görevi vardır. Endotelyal metabolik aktif bikarbonat pompa aktivitesi ile stromal su içeriği sabit tutulur (% 75). Fazla sıvıyı kornea dışına pompalar. Endotel hücrelerindeki harabiyette kornea ödemi meydana gelir. Kalıcı değişiklikler yapar ve görme bozulur (Metindoğan, 2009; Öztekin, 2004; Bulam Kılıç, 2014; İnan, 2015).

2.1.1. Kornea metabolizması

Korneanın saydamlığı ve dehidratasyonunun devamlılığı için enerji gereksinimine ihtiyacı vardır. Kornea glikozu aköz hümörden temin etmektedir (Farjo ve ark., 2009). Gözyaşı ve limbal kapillerler yolu ile glikoz kazancı daha düşük seviyededir. Korneada glikoz “Krebs siklusu” ile enerjiye dönüştürülmektedir. Krebs siklusu da oksijene gereksinim duyar. Kornea endoteli gerekli oksijeni aköz hümörden, epitel ve stroma ise limbal damarlardan ve gözyaşında çözünmüş oksijenden karşılar. Epitel düzeyinde glikoz, glikojen olarak depo edilir. Epitel stromaya oranla daha yüksek oranlarda ATP, glikojen ve oksidatif enzimler ihtiva eder.

Kornea endotelinin Krebs siklusu yanında, pentoz fosfat şantı ile çalışabilecek özellikleri vardır. Bu yol yardımı ile kornea epiteli lipid sentezi yapabilmektedir.

Elektrolit seviyeleri karşılaştırıldığında; kornea stroması Na^+ , epitel ise K^+ iyonu açısından zengindir. İodoasetat gibi metabolik zehirlerle korneanın Krebs siklusu (glikoz) bloke edilirse korneada su tutlumu ve ödem tablosu meydana gelecektir. Epitel ve endotel metabolizması ATP yokluğundan bozulacak ve Na^+-K^+ ATP az pompası çalışmadığından korneada elektrolit ve su tutulumu şekillenecektir (Öztekin, 2004; Bulam Kılıç, 2014)..

2.1.2. Kornea fizyolojisi

Kornea ışığın retinaya ulaşmasını sağlamak için ışık kırıcı saydam bir ortam sağlamaktadır. Korneanın saydamlığı, avasküler yapısından, su içeriği düzeyini sabit tutulmasından ve stromadaki uniform yapıdaki kollajen diziliminden kaynaklanmaktadır.

Endoteldeki aktif bikarbonat pompası, endotel ve epitelin bariyer fonksiyonu relatif dehidratasyona katkıda bulunur.

İntakt epitelden yağda eriyen moleküller geçebilirken, stromadan suda eriyebilenler geçer. Hem yağda hem suda eriyebilen özellikte olmaları gerekmektedir (İnan, 2015).

2.1.3. Kornea Enfeksiyonları

Gözün saydam tabakasının (Kornea) iltihaplanması olarak tanımlanır. Gözde görülen hastalıklardan; kornea hastalıkları, kataraktan sonra görme kaybının en önemli nedenlerinden biri olarak bilinir.

a.Enfeksiyöz Keratit

Bakteriyel keratit

Viral keratit

Keratomikoz (Fungal keratit)

Akantamoeba keratiti

b.İntersitisiyel keratit

c.Non-enfeksiyöz keratit

Ekspozure keratit

Nöroparalitik keratit (Altan, 2010; Whitcher ve ark., 2001)

2.2. Fungal Keratit

Enfeksiyöz keratitler, tüm dünyada tek taraflı körlüğün en yaygın nedenidir (Altan, 2010; Whitcher ve ark., 2001). Fungal keratitlerin insidansı, risk faktörleri, neden olan mantarın tipi ve etyolojik ajanları, coğrafi bölgelere ve iklime göre farklılık göstermektedir. Etken olarak fungal ajanlar;Hindistan'daki enfeksiyöz ülserlerin % 51,9'unu, daha ılıman bir iklime sahip Amerika Birleşik Devletleri'nde Korneal ülserlerinin % 8'ini oluşturdukları bilinmektedir (Srinivasan ve ark., 1997; Varaprasathan ve ark., 2004). Süpüratif bakteriyel keratitler ile herpetik stromal keratitlerin ayırıcı tanısında fungal korneal infeksiyon

(keratomikoz) hiçbir zaman unutulmamalıdır. Normal sağlıklı kornea epiteli mantarlara karşı dirençlidir. Fungal keratitlerle bakteriyel keratitlere oranla daha az karşılaşılmaktadır. İlk olgunun tanımlandığı yıllardan günümüze, oküler enfeksiyonların tedavisindeki gelişmelere rağmen son 40 yıl içinde enfeksiyöz keratitlerin insidansında artış görülmektedir. Bitkisel travmalar, uzun süre topikal antibiyotik ve steroidlerin yaygın kullanımı ve cerrahi uygulamalardaki artış, vücut direncin zayıflaması gibi nedenler sık görülme sebeplerinden biridir. Etiyolojik olarak fungal keratitin en yaygın sebebi *Candida* (C.), *Aspergillus* türleridir. Oküler enfeksiyonların tedavisindeki gelişmelere rağmen, fungal keratitler oftalmolojinin hali hazırda en ürkütücü hastalıklarından biridir (Tanure ve ark., 2000).

2.2.1. Etiyoloji

Travma (bitkisel veya organik materyaller ve hayvanlar tarafından), topikal steroid kullanımı, kornea yüzey hastalıkları, çevresel faktörler (nem, yağmur, rüzgâr), geçirilmiş göz cerrahisi, İmmünolojik yetersizlik ve diyabet.

2.2.2. Tanı

Klinik olarak bakteriyel keratitten kesin ayrımı güçtür. Korneal kazıntıdan direk mikroskopik inceleme, kültür ekimi tanı da kullanılır. Derine yerleşim eğilimi bulunmasına rağmen tanı için aşırı kazıma yapma tedavi sonrası görme seviyesini azaltabilir. PCR hızlı tanı ve tiplendirme sağlar fakat pahalı bir yöntemdir. Non invaziv olarak konfokal mikroskopi derine yerleşmiş filamentöz keratitte büyük mikroorganizmaları göstermede yardımcı olur (Inan, 2015).

2.2.3. Tedavi

Fungal keratitlerin tedavisi medikal ve cerrahi olarak iki şekilde olabilir.

2.2.3.1. Medikal Tedavi:

Spesifik antifungal ajanların kullanımının yanı sıra, nonspesifik önlemleri de içermektedir. Eşlik eden anterior üveit varlığında sikloplejiklerin kullanılması veya sekonder

enfeksiyonla baş edebilmek için geniş spektrumlu antibakteriyellerin tedaviye eklenebilir (Altan, 2010; Thomas, 2003).

Fungal enfeksiyonların tedavisinde kullanılan ilaçlar 5 grupta incelenebilir (Altan, 2010; Thomas, 2003; Thomas, 2007; Srinivasan, 2004; Matsumoto, 2005).

a- Polienler: Natamisin, amfoterisin-B

b- Azoller: Miconazole, itraconazole, fluconazole, ketoconazole, econazole, voriconazole

c- Flusitosin: 5-Fluorositosin

d- Yeni antifungal ajanlar (Ekinokandinler): Mikafungin, kaspofungin, anidulafungin.

e- Diğerleri: Direkt antifungal olmayıp, fungal enfeksiyonların tedavisinde kullanımı

bildirilmiş ajanlardır. Povidon iyot, poliheksametilen biguanid, klorheksidin, gümüş sülfadiazin bu grupta yer almaktadır.

Topikal % 5 natamisin veya % 0,15 amfoterisin-B yüzeysel keratitlerde ilk tercihtir. Derin lezyonlarda oral, ketoconazole, itraconazole veya fluconazole, subkonjonktival veya intravenöz mikonazol tedaviye eklenmelidir (Altan, 2010; Thomas, 2003; Thomas, 2007). Ciddi filamentöz keratitlerde 200-600 mg/gün oral ketokonazol ve ciddi maya keratitlerinde 200-400 mg/gün oral fluconazole eklenmesi tercih edilmektedir. Oral itraconazole (200 mg/gün) geniş spektrumlu bir etkiye sahiptir ve tüm *Aspergillus* ve *Candida* türlerine etki eder. *Fusarium* 'a karşı etkinliği ise değişkendir (Altan, 2010) Sistemik tedavi; enfeksiyon derinse, topikal tedaviye yanıtsızsa veya ön kamara yayılımından kuşkulanılıyorsa uygulanmıştır. Mikroskopide hifalar görülmüş, kültürde de filamentöz mantar üremişse topikal %5 natamisin en uygun ilaç olarak gözükmektedir, topikal % 0,15 amfoterisin-B ise ona alternatiftir. Natamisinin oftalmik kullanım için hazırlanmış % 5'lik süspansiyon formu ticari olarak bazı ülkelerde mevcuttur

Fusarium, *Aspergillus*, *Curvularia* ve *Candida* kaynaklı keratitlerde iyi sonuç vermektedir (Altan, 2010; Thomas, 2003; Thomas, 2007; Prajna ve ark., 2003; Avunduk ve ark., 2003). Deneysel *Aspergillus*, *Fumigatus* keratitinde topikal ve oral fluconazolenin karşılaştırıldığı bir çalışmada, her 2 kullanım şeklinin etkinlik yönünden farklılık göstermediği ve iyi bir tedavi alternatifi olabileceği sonucuna varılmıştır (Avunduk ve ark., 2003). Diğer yandan, *Aspergillus* ve diğer *Filamentöz* keratitlerde topikal ve sistemik itraconazolenin uygulandığı 42 gözde korneal ülserin % 72 oranında düzeldiği bildirilmiştir (Agarwal ve ark., 2003) Buna karşılık, filamentöz fungal keratitlerde topikal % 5 natamisin ve % 1

itraconazole'nin karşılaştırıldığı başka bir çalışmada natamisin halen ilk tercih olduğu, itraconazole'nin ise natamisin olmadığı durumlarda özellikle *Aspergillus* veya *Curvularia* keratitlerinde kullanılabileceği sonucuna varılmıştır (Kalavathy ve ark., 2005). Mikroskopide maya mantarı veya psödohifalar görülmüşse ve kültürde *Candida* veya *Cryptococcus* üremişse topikal % 0,15 amfoterisin-B ilk seçenektir, Olmadığı yerde % 5 natamisin, % 2 flukonazol, % 1 mikonazol veya % 1 flusitosin kullanılabilir. Hızlı direnç gelişimi nedeniyle flusitosinin tek başına kullanımı tercih edilmez (Altan, 2010; Thomas, 2003; Thomas, 2007). Amfoterisin-B flusitosinle kombine edildiğinde etkisinin arttığı saptanmışsa da, korneanın maya mantarlarıyla gelişen enfeksiyonlarının çoğu tek başına amfoterisin-B'ye cevap vermektedir. Amfoterisin-B *Aspergillus* tarafından oluşturulan filamentöz keratitlerin tedavisinde de önerilmektedir (Altan, 2010). *Fusarium* üzerine ise etkili değildir (Srinivasan, 2004). Kullanıma hazır oftalmik preparatı yoktur, intravenöz kullanım için mevcut olan toz formundan hazırlamak gereklidir. % 0,5 amfoterisin-B emdirilmiş kollajen shield'lerin, özellikle *Candida* keratitlerinin tedavisinde iyi sonuç verdiği de bildirilmektedir (Altan, 2010; Thomas, 2003).

2.3. Ozon

Ozon üç oksijen atomundan oluşan bir kimyasal bileşiktir. Ozon (O₃) ve iki atomlu atmosferik oksijenin (O₂) yüksek enerji taşıyan formudur. Oksijen molekülünün kararlı haline karşın ozon, kararsız bir moleküldür (Bocci, 2005). Ozon daha çok atmosferin üst tabakalarında bulunan bir moleküldür. Atmosferdeki ozonun % 90'ına yakını stratosfer tabakası içinde % 10'luk ozon miktarı ise troposfer tabakası içerisinde yer alır (Özler ve ark., 2009). Doğal ozon sürekli olarak stratosferde üretilir (Bocci ve ark., 2009). Atmosferin stratosfer tabakasında bulunan bu ozon molekülleri ultraviyole ışınlarının etkisiyle oluşur. Ozon gazının oluşması için değişik frekansta ışınlar gerekmektedir. Ozon aynı zamanda ultraviyole ışınları da absorbe eder (Rowland, 2006).

Cristian Friedrich Schonbein (1799-1868); ozonu, 1840 yılında oksijen varlığında, elektrik pili üzerinde çalışırken keşfetmiştir ve süper aktif oksijenin bir türü olabilen, elektrik ve keskin koku içeren bir gazın ortaya çıkışını farketmiştir. Bu kokuyu yıldırım fırtına boyunca hissedebiliriz. Çünkü yeryüzü ile bulutlar arasındaki elektiriğin boşalımı atmosferik oksijenden, ozonun oluşumunu kolaylaştırır (Bocci, 2004; Bocci, 2005; Bocci 2010).

Keşfedildikten sonra ilk olarak dezenfeksiyon amacıyla kullanılmaya başlanmıştır (Özler ve ark., 2009).

Birinci Dünya Savaşı boyunca ozonun Alman askerlerindeki post-travmatik gangrende tedavi edici gaz olarak kullanılması ilk medikal uygulama olarak görülür. Fakat öne sürülen ilk büyük adım, fizikçi Joachim Hansler'in (1908-1981) medikal kullanım güvenilir ozonizeri icat etmesidir. Ozonun Tıp'ta kullanım fikri yüzyıllar boyunca yavaş yavaş gelişmiştir ve bu fikir, antibiyotik eksikliği ve ozonun dezenfektan özelliği sebebiyle teşvik edilmiştir (Bocci, 2005; Bocci, 2010).

Ozonun pratikte ilk kullanıcısı İsveç diş hekimi E.A. Fisch'dir (1899-1966). Daha sonra cerrah Dr. E. Payr ozonu, gangrenoz pulpitis tedavisinde kullanmış ve cerrahide ozon tedavisinin çok önemli bir yere sahip olduğunu anlamıştır.

1936 yılında Fransa'da Dr. P. Aubourg ozon gazının kronik kolitis ve fistül tedavisinde rektal olarak verilmesini önermiştir. Dr. Payr ozonu küçük cam şırınga ile damara enjekte eden ilk doktor olarak tarihe geçmiştir (Bocci, 2005; Bocci ve ark., 2009; Bocci, 2010).

2.3.1 Ozonun Üretimi

Ozon, istikrarsızlığından dolayı sadece kullanımına ihtiyaç duyulduğu zaman üretilmesi gerekir. Ozon terapistleri; güvenilir, toksik olmayan ve yeniden üretilabilir ozon jeneratörüne sahip olmalıdırlar. Jeneratör; Inob 361 L, paslanmaz çelik, 2.kalite saf titanyum, payreks cam, teflon, viton ve polürant gibi ozona en dayanıklı ve ozon oksidasyonundan dolayı ozonun dışarı çıkışına engel olan maddelerden üretilmelidir. Güvenilir fotometre vasıtasıyla ozon konsantrasyonunun doğru zamanda ölçümüne olanak veren bir jeneratör alınması özellikle tavsiye edilir (Jacqueline, 1881; Bocci, 2005; Bocci, 2010).

Kullanılmamış ozon, çevrede yayılamayabilir. Bu nedenle ozon, bir elektrik termostatu aracılığıyla yaklaşık 70°C'de sürdürülebilen, ağır metal asiti içeren gerekli patlayıcı içinde, katalitik reaksiyonla oksijene ayrıştırılmalıdır (Bocci, 2005; Bocci, 2010).

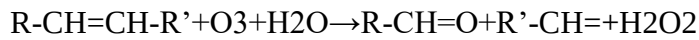
Medikal ozon jeneratörü, 4.000 ile 13.000 Volt arasında arka arkaya farklı voltaj değerleri kurabilen bir elektrik programıyla ilişkili yüksek voltaj (2-4) tüplerinden oluşur. Sistemde elektrik boşaltma ozonatörü olarak bilinen ozon jeneratörü, ozonu, oksijenin krona olarak adlandırılan elektriği ortaya çıkarmak için yüksek voltaj ve topraklama arasındaki

boşluğa geçişi sırasında üretir. Elektrik boşaltımıyla ortaya çıkan enerji, üç ozon molekülünü oluşturabilen, fazlaca oksijen molekülü içeren oksijen atomundaki bu moleküllerin parçalanmasına olanak verir. Jeneratör, saf medikal oksijen ile beslenir ve jeneratör hortumunun ağızlığında, % 5 ozon ve % 95 oksijenden oluşan gaz, doğru ve hafif bir basınçla elde edilebilir. Ozon sentezine, elektrik boşalımındaki ozon ayrışımı ile aynı zamanda gerçekleşen enerji çıkışı olanak verir. Ortaya çıkan hava, medikal kullanım amacı için uygun değildir. Çünkü bu gaz karışımı oksijen ve ozonun yanı sıra % 78 nitrojen ve değişebilen yüksek miktarlarda toksik NOx (Nitrik oksit) içerir (Jacqueline, 1881; Bocci, 2005; Bocci, 2006b; Bocci ve ark., 2009; Bocci, 2010).

2.3.2. Medikal Ozon ve Etki Mekanizması

Ozon, Henry kanununda olduğu gibi basınç ve ozon konsantrasyonuna bağlı olarak diğer gazlar gibi suda çözünebilir ve reaksiyona girmez kapalı bir şişede durabilir. Diğer taraftan biyolojik sıvılarda tamamen çözünebilir (Jacqueline, 1881; Bocci, 2005; Bocci, 2010).

Ozon gazı vücut içerisinde doymamış yağ asitleriyle, antioksidanlarla, askorbik asitle, ürik asitle, sülfidril grubu taşıyan (SH) tilol bileşikleriyle reaksiyona girer. Yine ozonun dozuna göre karbonhidratlar, enzimler, DNA, RNA da etkilenir. Bütün bu bileşikler oksidasyonda elektron verirler. Ana reaksiyon aşağıdaki gibidir.



Bu reaksiyonda sitimülasyon ürünü olan bir mol hidrojen peroksit (H₂O₂) reaktif oksijen türevleri olan (ROT)'u oluşturken iki mol hidrojen peroksit ise lipid oksidasyon ürünü (LOÜ) oluşmaktadır. Temel ROT molekülü olan hidrojen peroksit çeşitli reaksiyonlarda ozonun taşıyıcısı olarak görev alır (Bocci, 2005; Bocci, 2006b; Bocci ve ark., 2009; Bocci, 2010).

Sonuç olarak ozonun biyolojik etkilerinin meydana gelmesi olayında serbest radikallerin varlığı önemli yer tutmaktadır. Bu serbest radikaller çoğu patolojik reaksiyonların aktivasyonunda, yine hücrede çeşitli reaksiyonların ara basamaklarında devreye giren ve reaksiyon sonucunda ortaya çıkan maddelerdir (Özler ve ark., 2009). Serbest radikaller hücrede endojen ve ekzojen kaynaklı etmenler sonucunda oluşurlar ve bir veya daha fazla eşleşmemiş elektrona sahip kısa ömürlü, kararsız molekül ağırlığı düşük ve çok etkin molekül

olarak tanımlanırlar (Mercan, 2004). Bunlar canlıda oksijensiz solunum sırasında mitokondri ve fagositlerde solunum patlaması sonucu oluşur (Özler ve ark., 2009).

Çeşitli çevre kirleticilerine maruz kalma oksidatif strese neden olabilir (Mercan, 2004). Ayrıca oksidatif stresin çeşitli hastalıklara da yol açtığı bilinmektedir (Droge, 2001). Oksidatif stres vücudun antioksidan savunması ile hücrelerin lipid tabakasının peroksidasyonuna neden olan serbest radikal üretimi arasındaki dengesizlik olarak tanımlanır. Serbest radikaller hidroksil, süperoksit, nitrik oksit ve lipid peroksit gibi farklı kimyasal yapılar içerirler.

Bu serbest radikallerin aynı zamanda toksik etkileri de vardır (Mercan, 2004). Bu nedenle aerobik canlılar bu toksik etkilerden kurtulmak için antioksidan sistemleri geliştirmiştir. Bunlardan Non enzimatik olanlar; ürik asit, askorbik asit, protein (özellikle albumin), protein olmayan tiyoller, vitamin E ve bilirubindir. Enzimatik olanlar ise süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ile glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon transferaz (GST), glutatyon (GSH) ve glutatyon redüktazdan (GR) oluşan glutatyon sistemidir (Bocci ve ark., 2009; Özler ve ark., 2009). Ozon oksidatif stresi zararsız (toksik olmayan bir şekilde artırır. Bu enzimler sayesinde (MDA osidatif stresi (SOD), katalaz (CAT) ile glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon transferaz (GST), glutatyon (GSH) ve glutatyon redüktazdan (GR)) antioksidan mekanizmayı aktive eder (Bocci, 2010).

Hidrojen peroksitin iki etkisi vardır. Bunlardan birinin etkisi; eritrositlere 2,3 difosfohliserat düzeyini arttırarak hemoglobin oksijen eğrisinin sağa kaymasına neden olmaktadır (Bocci ve ark., 2009). Eritrositler oksijeni dokulara salınımını kolaylaştırır (Vallaci ve ark., 2000). Böylece, dokulara oksijenin daha kolay gitmesi sağlanır (Özler ve ark., 2009). Dokulara oksijenin kolay dağılmasının nedeni nitrik oksit salınımının artması sonucu vazodilatasyona sebep olmasıdır (Vallaci ve ark., 2000). Sonuç olarak plazma konsantrasyonunda hidrojen peroksitin hücre içine girmesinin kolaylaşması sonucunda lökosit ve endotelial hücreler üzerindeki interferon, interleokin ve transforme edici büyüme faktör yapımını arttırır (Özler ve ark., 2009). Aynı zamanda lökositler ozonun kanla temas etmesi sonucunda sitokinleri de üretirler (Terasaki ve ark., 2001). Buradan ozonun biyolojik etkilerinin immun sistemi aktive ettiği açık bir şekilde görülmektedir (Terasaki ve ark., 2001). Genellikle ozon tedavisi bu etkilerinden dolayı yangısal hastalıklarda, bağışıklık sisteminin harekete geçirilmesi gerektiği durumlarda tedavi amaçlı uygulanabilir (Güler, 2009).

Diğer bir şekilde ifade etmek gerekirse Ozon gazı plazmaya geçtikten sonra ya ROT oluşur ya da LOÜ oluşur. ROT eritrositlerde oksijenin dokulara daha kolay geçmesini, lökositlerde immun sisteminin uyarılmasını, trombositlerde büyüme faktörlerinin salınmasını sağlar. LOÜ ise endotelde NOx salgılanmasının artmasına, kemik iliğinde oksidatif strese dirençli eritrosit yapımı ve artmış kök hücre aktivasyonuna, diğer organlarda ise antioksidan enzim miktarlarında artışa sebep olur (Bocci, 2006b).

2.3.3. Ozon Tedavisinin Klinik Etkileri

Ozon tedavisinin çeşitli etki meknizmaları vardır. Bunlar;

1. Retikülo-endotelyal sistemi stimüle eder ve dokuların iyileşme mekanizmasını destekler (Maslennikov ve ark., 2008).
2. Bakteri, virüs, mantar, maya ve protozoaları inaktive eder (Elvis ve Ekta, 2011).
3. Güçlü germisid aktivitesine sahiptir. Fosfolipidlerin ve lipoproteinlerin oksidasyonu ile bakteriyel hücre zar bütünlüğünü bozar. Böylece pek çok patojen mikroorganizmanın hücre duvarını parçalayabilir. Bu özelliğinden dolayı enterovirüsler, koliform bakteriler, Staphylococcus aureus ve Aeromona hydrophilia enfeksiyonlarına karşı etkilidir. (Maslennikov ve ark., 2008; Elvis ve Ekta, 2011).
4. Sirküler plazmid DNA' yı açar ve bakteriyel proliferasyonu azaltır (Maslennikov ve ark., 2008).
5. Ozon peroksidasyon yolu ile viral kapsid, virüs-hücre temasını ve üreme döngüsünü bozar (Elvis ve Ekta, 2011).
6. Fungisit etkilidir. Bu sayede kandida büyümesini inhibe eder (Kutlubay ve ark., 2010; Kutlubay ve ark., 2013).
7. Ozonun hemostatik etkisi doza bağlıdır. Düşük konsantrasyonlarda parenteral uygulanmalar fibrinolitik aktivitede artış, trombositik ve hemostazisin koagulatif düzeylerinde azalmaya neden olurken, harici kullanım için uygulanan yüksek konsantrasyonlar, hiper koagulatif etkiye sahiptir.
8. Ozonun detoksifikasyon etkisi; karaciğer ve böbrekte metabolik aktivasyon ile ortaya çıkar. Böylece organlardan toksik bileşiklerin nötralizasyonu ve atılımı sağlanır.

9. Ozonun analjezik etkisi; albuminolizis ürünleri olarak adlandırılan ve hasarlı dokuda sinir uçlarının üzerinde hareket, ağrı ve cevap şiddetini belirleyen algopeptiditlerin oksidasyonu ile sağlanır. Analjezik etki, antioksidan sistemin normalleşmesine neden olur. Bunu hücre zarların lipit peroksidasyonunun toksik moleküler ürünlerin miktarının azalması sonucunda, membranda bulunan enzimlerin işlevini değiştirerek ATP sentezine katılımını sağlayarak, organ ve dokuların yaşamsal aktivitelerini koruyarak yapar.

10. Ozonun Anti-enflamatuar etkisi; ozonun çift bağ içeren bileşikler arakidonik asit (20: 4) ve onun derivatlarından, özellikle prostaglandinleri okside etme kapasitesi vardır. Bu bileşikler biyolojik aktif maddelerin gelişimine katılırlar ve inflammatuar süreci sürdürürler. Bunun yanı sıra, ozon dokulardaki inflamasyon yerinde metabolik reaksiyonları ve pH'ı düzenler. Ozonun bu etkilerinden dolayı bronşiyal astımda kullanılabilir (Maslennikov ve ark., 2008).

11. Glutasyon, katalaz, superoksit dismutaz gibi antioksidan enzimlerin seviyesini artırır ve serbest radikallerin eliminasyonunu hızlandırır (Bocci ve ark., 2009).

12. Eritrositlerde glikolizi aktive eder, böylece;

a. Oksijenin hemoglobinden ayrılmasını sağlayarak doku oksijenizasyonunu artırır.

b. Glikoliz sonucunda acetyl coenzyme-A'nın oluşumunu artırır.

c. Mitokondriyal transport sistemini aktive eder ve tüm hücrelerin metabolizmasını artırır. Böylece mutajenik değişimlere karşı hücre savunmasını güçlendirir.

d. Eritrositlerin esnekliğini, kanın akışkanlığını artırır ve parsiyel oksijen basıncını (PO₂) yükseltir. Böylece hasarlı bölgelerin daha çok kanlanması sağlanır. Ayrıca eritrositlerdeki rulo formasyonunu azaltır.

13. Düşük dozlarda lökositöz ve fagositozu indükler ve immün sistemi stimüle eder. Yüksek dozlarda ise immün sistemi inhibe eder (Bocci ve ark., 2009; Kutlubay ve ark., 2010; Kutlubay ve ark., 2013).

2.3.4. Ozonun Uygulanma Yöntemleri

Ozon çok farklı yollarla verilebilir (Bocci, 2006b). Ozon intravenöz, intramuskuler, intraartiküler, intraplevral, intrarektal ve intradiskal olarak uygulanabildiği gibi aynı zamanda topikal olarak da uygulanabilir (Bocci ve ark., 2009; Özler ve ark., 2009).

Ozon kullanımında dikkat edilmesi gereken bazı durumlar vardır. Ozon, damara gaz olarak enjekte edilmemelidir çünkü bu gazın % 95'i oksijen içerdiğinden dolayı oksijen embolisine yol açma riski vardır. Ayrıca ozon kesinlikle saf olarak verilmemelidir. Ozon özellikle belli oranda oksijenle karıştırılarak verilmelidir. Bu karışımın oksijen oranı % 95'den az ozon oranı ise % 5'ten fazla olmamalıdır. Aynı zamanda atmosfer havası dışarıda bırakılmalıdır. Çünkü nitrojen dioksit (N_2O_2) ozon gazı gibi oluşabilmektedir. Tüm işlemler sırasında ozona dayanıklı malzemenin (paslanmaz çelik, nötral cam ve teflon) kullanılması gerekmektedir (Bocci, 2006b).

Ozon tedavisinde uygulanan yöntemlerden bazıları şunlardır:

Majör Ozon Otohemoterapi, minor Ozon Otohemoterapi, ozon Gazının Rektal Yolla Verilmesi, Ozon Enjeksiyonu (Deri Altı ve Deri İçi Ozon Uygulanması, lokal olarak; gaz halinde (Bütün Vücudun Ozon Gazına Maruz Kalması, Oksijen ve Ozon Gazı Karışımı),ozonlanmış yağlar ve ozonlanmış su şeklinde uygulanır (Beck, 1998; Bocci, 2005; Bocci, 2010; Magalhaes ve ark., 2012).

2.3.4.1. Ozonun Topikal Olarak Uygulanması

Ozon gazının lokal olarak uygulanması birinci dünya savaşından bu yana devam etmektedir. Ozonlanmış su ve perioksik yağ şeklinde uygulanır.

2.3.4.1.1. Endikasyonları

Eksternal ülser, yanma, süperenfeksiyon, deri lezyonları, lokal enfeksiyonlar, göz yaralanmaları ve enfeksiyonları (Beck, 1998).

2.3.4.2. Ozonlanmış Su

Ozonlanmış su, günümüzde çok önem kazanmıştır. Ozon su içerisinde molekül halde bulunur. Yüksek kaliteli ozon jenaratöründe bidistile su kullanılır ve maksimum doygunluğa ulaşır. 20 mg ozon/ml oda sıcaklığında elde edilir. Bu karışım hemen dokuyla temas ettirilmelidir (Beck, 1998; Federov ve ark., 2006).

2.3.4.2.1. Endikasyonları

Lokal enfeksiyon, ulkus kururitis (bacak lezyonları), dekübitis ülser, *miyozitis*, miyotik enfeksiyon, herpes simpleks, herpes zoster, yanma (süper enfeksiyon), ameliyat öncesi ve sonrası durulama, göz yaralanmaları ve enfeksiyonları, cerrahi operasyon sonrası yara üzerine (scar), bakteriyel ve travmatik orjinli ödemde (Beck, 1998). Helikobakter pylori ile alakalı gastroduodenal patolojilerde kullanılır (Federov ve ark., 2006).

2.3.4.3. Perioksik Yağ (Ozonlanmış yağlar)

Medikal yağının ozon gazıyla karıştırmasıyla oluşur. Ozonun dezenfektan özellikleri de ozonlu bitkisel yağ kullanımında ortaya konmuştur. Ozonlu yağ, ozonlu tuzlu su ile karşılaştırıldığında antiseptik etkinliğinin birkaç yüz kez daha yüksek olduğu bulunmuştur. Ozonlanmış yağ ışık geçirmeyen koyu bir kaptan muhafaza edilmelidir. Oda sıcaklığında 4 ay muhafaza edilebilir. Buz dolabında ise bu süre 2 yıldır (Maslennikov ve ark., 2008).

2.3.4.3.1. Endikasyonları

İyileşmesi uzun süren yaralanamalarda, yanma, lokal enfeksiyonlarda, deri enfeksiyonlarında, ulkus kururitis, dekübitis ülser, tırnak mikozisinde

2.3.4.3.2. Ozonlanmış Yağın Özellikleri

Ozonlanmış zeytin yağı (OZY), zeytin yağı katılaşmaya kadar ozonlanmasıyla oluşur (Miura ve ark., 2001). Ticari olarak temin edilebilir bitkisel yağlara ozon uygulaması kimyasal türlerin oluşmasına yol açar. Oluşan bu ozonlanmış yağ türevleri dermatolojik hastalıklarda tedavi edici özelliklerinden sorumludur. Son yıllarda, bu ürünler ciddi deri problemlerinde bir dizi topik dezenfektan olarak başarılı bir şekilde kullanılmaktadır (Zanardi ve ark., 2008). Avrupa ülkelerinde ozonlanmış zeytin yağı topikal olarak kutanöz yaraları dezenfekte etmek ve yara iyileşmesine katkıda bulunmak için kullanılmaktadır (Beck, 1998; Miura ve ark., 2001). Ozon pek çok alanda dezenfektan olarak kullanılan güçlü bir antioksidandır. Ozonun *Candida albicans* ve *Aspergillus niger* gibi patojenik mantarları inaktive ettiği Coronel ve ark

(2002) tarafından bildirilmiştir. Ozonlanmış yağ doğal olarak birçok ülkede hazırlanmaktadır. Fakat ozonlanmış yağın kimyasal verileri standart hazırlıkları ve antimikrobiyal aktiviteleri ile ilgili bilgiler sınırlıdır. Pek çok ülkede saf zeytinyağının ozonlanması için tamamen katılaşması gerekmektedir. Bu katılaşma içinde iki günlük bir zaman dilimine ihtiyaç vardır. OZY'nin terapötik etkileri ve değerli bir antimikrobiyal aktiviteye sahip olması nedeniyle; bakteri, virüs ve mantarlara karşı yaygın kullanılmaktadır. OZY'nin fizikokimyasal özelliklerinin belirlenmesinde ozonizasyon süreci takip etmek için kullanılan ve ozonlu zeytinyağının karakterini ve kalitesini belirleyen peroksit, asitlik ve iyot değerleri büyük bir öneme sahiptir (Geweely, 2006).

2.3.5. Ozonun antibakteriyel etkinliği

Ozon antibakteriyel, antiviral ve antifungal etkinliği çok iyi olan ajanlardan biri olarak kabul edilmektedir (Valacchi ve ark., 2005). Antibiyotiklere karşı geliştirmiş bakteriler için fakir ülkeler tam aktif ve henüz direnci gelişmemiş olan ozonu kullanırken, zengin ülkeler pahalı ve etkili olmayan antibiyotikleri kullanmaktadırlar. Ozon yaraların, anaerobik enfeksiyonların, trofik ülser ve yanıkların tedavisi için ya su buharıyla doymuş ozona dirençli kapta iyice karıştırılmış oksijen-ozon gaz karışımı olarak, ya da daha iyisi ozonla karıştırılmış, iki kere damıtılmış su ve yağ olarak kullanılabilir. Selülitler, apseler, anal fissürler, dekübituslar, çıbanlar, fungal hastalıklar, çıban sonrası yaralar, diş eti iltihapları, kronik kemik enfeksiyonları, karın zarı enfeksiyonları, sinüs iltihapları, ağız iltihapları, vulva ve vajinanın birlikte iltihapları ve rahatsızlık veren yaralar ozon terapisiyle hızlı bir şekilde tedavi edilebilir. Çünkü ozon solüsyonları temizleyici bir etki gösterir ve antibiyotiklere dayanıklı veya anaerobik bakterileri öldüren güçlü bir dezenfektan olarak rol oynar. Genel olarak, ozon solüsyonları kanamayı kontrol eder, metabolizmayı güçlendirir ve enfeksiyonu azaltır (Bocci, 2005; Bocci, 2010).

2.3.6. Diğer uygulamalar

Ozon enjeksiyonu, deri altı ve deri içi ozon uygulanması lokal uygulamadır (Beck, 1998; Magalhaes ve ark., 2012).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Yöntem

Bu Çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi Tarafından TSA-2016-6849 proje numarası ile Normal Araştırma Projesi olarak desteklenmiş, Erciyes Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezinde yapılmış ve Hayvan Deneyleri için izin belgesi 13.01.2016 tarihli 01 toplantı sayılı ve 16/014 karar nolu Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulundan alınmıştır. Çalışmada canlı ağırlıkları 2-2,5 kg arasında değişen, 42 adet, 3-4 aylık yaşlı, Yeni Zelanda ırkı, beyaz, erkek tavşanı kullanıldı. Kırk iki adet genç Yeni Zelanda beyaz tavşanından 37 tanesine *C. albicans* suşu intrastromal olarak enjekte edildi ve 48 saat sonra tavşanlar rastgele altı gruba ayrıldı. **Grup 1** (n=5) topikal olarak % 3'lük fluconazole damla ve ozonlanmış zeytinyağı damlası ile tedavi edildi; **Grup 2** (n=5) topikal olarak % 0,3'lük fluconazole göz damlası ile tedavi edildi; **Grup 3** (n=5) ozonlanmış zeytinyağı damlası ile tedavi edildi; **Grup 4** (n=5) topikal olarak % 3'lük fluconazole damla ve 22µg/ml ozon içeren distile su damlası ile tedavi edildi; **Grup 5** topikal olarak 22µg/ml ozon içeren distile su damlası ile tedavi edildi; **Grup 6** (n=12) Enfekte kontrol grubunda, enfeksiyon oluşturulduktan sonra fosfatla tamponlanmış tuzlu su damla (PBS) ile tedavi edildi. **Grup 7** (n=5) Negatif kontrol grubunda, steril PBS inokülasyonundan sonra, PBS diğer gruplarla aynı şekilde uygulandı. Topikal antibiyotik, distile su ile dilüe edilmiş ozonlanmış zeytinyağı, 22µg/ml ozon içeren distile su damlası ve steril PBS inokülasyondan sonra 48 saat sonra 22 gün boyunca boyunca her 8 saatte bir damlatıldı. Mantar inokülasyonundan önce, inokulasyondan 48 saat sonra tedaviye başlamadan önce ve 3, 8, 12, 16, 20, 24. günlerde mikrobiyolojik analiz için swap alındı. Mantar inokülasyonundan 48 saat sonra ve 3, 8, 12, 16, 20, 24. günlerde kornea opasitesi değerlendirmek için slit lamp biomikroskop ile incelendi. Yine mantar inokülasyonundan 48 saat sonra ve 3, 8, 12, 16, 20, 24. günlerde korneada neovaskülarizasyon, bulanıklık ve konjunktivitis değerlendirildi. Gözlerden mantar inokülasyonundan önce, inokulasyondan 48 saat sonra ve 3, 8, 12, 16, 20, 24. günlerde uygulamadan önce stioji için örnek alındı. **Grup 6**'da çalışma başlangıcında 2 hayvan, mantar inokülasyonundan 48 saat sonra 5 hayvan, 24. Gün sonunda **Grup 1, Grup 2, Grup 3, Grup 4, Grup 5, Grup 6 ve Grup 7**'deki bütün hayvanlar ksilazin ve ketamin sedasyonunu takiben intrakardiyak pentobarbital enjeksiyonu ile ötenazi edilecek. Kornealar mikrobiyolojik histopatolojik inceleme için çıkarılacak.

3.2. Hayvan Materyali

Çalışmanın hayvan materyalini; canlı ağırlıkları 2-2,5 kg arasında değişen, 42 adet, 3-4 aylık yaşlı, Yeni Zelanda ırkı, beyaz, erkek tavşan oluşturdu. Hayvanlar; Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı tarafından ruhsatlandırılmış özel çiftliklerden temin edildi. Hayvanlar standart tavşan kafeslerinde (her bir tavşan ayrı kafeste olacak şekilde) tutuldu ve hayvanlara yemler adlibitum olarak verildi ve oda ısısı yaklaşık $21 \pm 1^{\circ}\text{C}$, ışıklandırma 12 saat ışık (06:00-18:00) 12 saat karanlık olacak şekilde ayarlandı.

3.3. Hayvan Deneyleri

Tüm gruplarda denemeler tavşanların aklimatizasyon (bir hafta) süreci sonrası başlatıldı. Aklimatizasyon ve deney sürecinde, tavşanlar standart diyet ile beslendi, yem ve su erişimleri serbest bırakıldı. Hayvanlar rastgele 7 gruba ayrıldı. Gruplar **Grup 1, Grup 2, Grup 3, Grup 4, Grup 5 ve Grup 7**'de, (5 tavşan, 10 gözü / grup) **Grup 6**.'da (12 tavşan, 24 gözü / grup) şeklinde oluşturuldu.

Grup 1. (n=5) topikal olarak % 3'lük fluconazole damla ve ozonlanmış zeytinyağı damlası ile tedavi edilecek tavşan grubu; % 3'lük fluconazole damla ve distile su ile dilüe edilmiş ozonlanmış zeytinyağı inokülasyondan 48 saat sonra 21 saat boyunca her 8 saatte bir damlatıldı. Mantar inokülasyonundan önce, inoklosyondan 48 saat sonra tedaviye başlamadan önce ve 3, 8, 12, 16, 20, 24. günlerde mikrobiyolojik analiz için swap alındı. Mantar inokülasyonundan 48 saat sonra ve 3, 8, 12, 16, 20, 24. günlerde kornea opasitesi değerlendirmek için slit lamp biomikroskop ile incelendi. Yine mantar inokülasyonundan 48 saat sonra ve 3, 8, 12, 16, 20, 24. günlerde korneada neovaskülarizasyon, bulanıklık ve konjuntivitis değerlendirildi. Gözlerden Gözlerden mantar inokülasyonundan önce, inokulasyondan 48 saat sonra ve 3, 8, 12, 16, 20, 24. günlerde uygulamadan önce stioloji için örnek alındı. Yirmi dördüncü gün sonunda da gruptaki hayvanlar ksilazin ve ketamin sedasyonunu takiben intrakardiyak pentobarbital enjeksiyonu ile ötenazi edildi. Kornealar mikrobiyolojik histopatolojik inceleme için çıkarıldı.

Grup 2. (n=5) topikal olarak % 3'lük fluconazole damla tatbik edilecek tavşan grubu; %3'lük fluconazole damla, inokülasyondan sonra 48 saat sonra 21 saat boyunca her 8 saatte bir damlatıldı. Mantar inokülasyonundan önce, inoklosyondan 48 saat sonra tedaviye

başmadan önce ve 3, 8, 12, 16, 20, 24. günlerde mikrobiyolojik analiz için swap alındı. Mantar inokülasyonundan 48 saat sonra ve 3, 8, 12, 16, 20, 24. günlerde kornea opasitesi değerlendirmek için slit lamp biomikroskop ile incelendi. Yine mantar inokülasyonundan 48 saat sonra ve 3, 8, 12, 16, 20, 24. günlerde korneada neovaskülarizasyon, bulanıklık ve konjuntivitis değerlendirildi. Gözlerden Gözlerden mantar inokülasyonundan önce, inokulasyondan 48 saat sonra ve 3, 8, 12, 16, 20, 24. günlerde uygulamadan önce stioloji için örnek alındı. Yirmi dördüncü gün sonunda da gruptaki hayvanlar ksilazin ve ketamin sedasyonunu takiben intrakardiyak pentobarbital enjeksiyonu ile ötenazi edildi. Kornealar mikrobiyolojik histopatolojik inceleme için çıkarıldı.

Grup 3. (n=5) ozonlanmış zeytinyağı damlası uygulanacak tavşan grubu; distile su ile dilüe edilmiş ozonlanmış zeytinyağı inokülasyondan sonra 48 saat sonra 21 saat boyunca her 8 saatte bir damlatıldı. Mantar inokülasyonundan önce, inoklosyondan 48 saat sonra tedaviye başmadan önce ve 3, 8, 12, 16, 20, 24. günlerde mikrobiyolojik analiz için swap alındı. Mantar inokülasyonundan 48 saat sonra ve 3, 8, 12, 16, 20, 24. günlerde kornea opasitesi değerlendirmek için slit lamp biomikroskop ile incelendi. Yine mantar inokülasyonundan 48 saat sonra ve 3, 8, 12, 16, 20, 24. günlerde korneada neovaskülarizasyon, bulanıklık ve konjuntivitis değerlendirildi. Gözlerden Gözlerden mantar inokülasyonundan önce, inokulasyondan 48 saat sonra ve 3, 8, 12, 16, 20, 24. günlerde uygulamadan önce stioloji için örnek alındı. Yirmi dördüncü gün sonunda da gruptaki hayvanlar ksilazin ve ketamin sedasyonunu takiben intrakardiyak pentobarbital enjeksiyonu ile ötenazi edildi. Kornealar mikrobiyolojik histopatolojik inceleme için çıkarıldı.

Grup 4. (n=5) topikal olarak % 3'lük fluconazole damla ve 22µg/ml ozon içeren distile su damlası ile tedavi edilecek grup; %'3'lük fluconazole damla, ozonlanmış distile su, inokülasyondan sonra 48 saat sonra ve inokülasyon sonrası 21 gün boyunca her 8 saatte bir damlatıldı. Mantar inokülasyonundan önce, inoklosyondan 48 saat sonra tedaviye başmadan önce ve 3, 8, 12, 16, 20, 24. günlerde mikrobiyolojik analiz için swap alındı. Mantar inokülasyonundan 48 saat sonra ve 3, 8, 12, 16, 20, 24. günlerde kornea opasitesi değerlendirmek için slit lamp biomikroskop ile incelendi. Yine mantar inokülasyonundan 48 saat sonra ve 3, 8, 12, 16, 20, 24. günlerde korneada neovaskülarizasyon, bulanıklık ve konjuntivitis değerlendirildi. Gözlerden Gözlerden mantar inokülasyonundan önce, inokulasyondan 48 saat sonra ve 3, 8, 12, 16, 20, 24. günlerde uygulamadan önce stioloji için örnek alındı. Yirmi dördüncü gün sonunda da gruptaki hayvanlar ksilazin ve ketamin

sedasyonunu takiben intrakardiyak pentobarbital enjeksiyonu ile ötenazi edildi. Kornealar mikrobiyolojik histopatolojik inceleme için çıkarıldı.

Grup 5. (n=5) topikal olarak 22µg/ml ozon içeren distile su damlası ile tedavi edilecek grup; Ozonlanmış distile su inokülasyondan 48 saat sonra ve inokülasyon sonrası 21 gün boyunca her 8 saatte bir damlatıldı. Mantar inokülasyonundan önce, inoklosyondan 48 saat sonra tedaviye başlamadan önce ve 3, 8, 12, 16, 20, 24. günlerde mikrobiyolojik analiz için swap alındı. Mantar inokülasyonundan 48 saat sonra ve 3, 8, 12, 16, 20, 24. günlerde kornea opasitesi değerlendirmek için slit lamp biomikroskop ile incelendi. Yine mantar inokülasyonundan 48 saat sonra ve 3, 8, 12, 16, 20, 24. günlerde korneada neovaskülarizasyon, bulanıklık ve konjuntivitis değerlendirildi. Gözlerden Gözlerden mantar inokülasyonundan önce, inokulasyondan 48 saat sonra ve 3, 8, 12, 16, 20, 24. günlerde uygulamadan önce stioloji için örnek alındı. Yirmi dördüncü gün sonunda da gruptaki hayvanlar ksilazin ve ketamin sedasyonunu takiben intrakardiyak pentobarbital enjeksiyonu ile ötenazi edildi. Kornealar mikrobiyolojik histopatolojik inceleme için çıkarıldı.

Grup 6. (n=12) Enfekte kontrol grubunda, fosfatla tamponlanmış tuzlu su damla (fosfatla tamponlanmış %0.9 NaCl, pH 7.4,) ile tedavi edilecek grup Steril PBS, mantar inokülasyonundan 48 saat sonra ve inokülasyon sonrası 21 gün boyunca her 8 saatte bir damlatıldı. Mantar inokülasyonundan önce, inoklosyondan 48 saat sonra tedaviye başlamadan önce ve 3, 8, 12, 16, 20, 24. günlerde mikrobiyolojik analiz için swap alındı. Mantar inokülasyonundan 48 saat sonra ve 3, 8, 12, 16, 20, 24. günlerde kornea opasitesi değerlendirmek için slit lamp biomikroskop ile incelendi. Yine mantar inokülasyonundan 48 saat sonra ve 3, 8, 12, 16, 20, 24. günlerde korneada neovaskülarizasyon, bulanıklık ve konjuntivitis değerlendirildi. Gözlerden Gözlerden mantar inokülasyonundan önce, inokulasyondan 48 saat sonra ve 3, 8, 12, 16, 20, 24. günlerde uygulamadan önce stioloji için örnek alındı. Yirmi dördüncü gün sonunda da gruptaki hayvanlar ksilazin ve ketamin sedasyonunu takiben intrakardiyak pentobarbital enjeksiyonu ile ötenazi edildi. Kornealar mikrobiyolojik histopatolojik inceleme için çıkarıldı.

Grup 7. (n=5) Negatif kontrol grubunda, fosfatla tamponlanmış tuzlu su damla (fosfatla tamponlanmış %0.9 NaCl, pH 7.4) ile tedavi edilecek grup Steril PBS, steril PBS inokülasyondan 48 saat sonra ve inokülasyon sonrası 21 gün boyunca her 8 saatte bir damlatıldı. Steril PBS inokülasyonundan 3, 8, 12, 16, 20, 24 günlerde kornea opasitesi değerlendirmek için slit lamp biomikroskop ile incelendi. Yine steril PBS inokülasyonundan 48 saat sonra ve 3, 8, 12, 16, 20, 24. günlerde korneada neovaskülarizasyon, bulanıklık ve

konjunktivitis değerlendirildi. Gözlerden PBS inokülasyonundan önce, inokulasyondan 48 saat sonra ve 3, 8, 12, 16, 20, 24. günlerde uygulamadan önce stioloji için örnek alındı. Yirmi dördüncü gün sonunda da gruptaki hayvanlar ksilazin ve ketamin sedasyonunu takiben intrakardiyak pentobarbital enjeksiyonu ile ötenazi edildi. Kornealar mikrobiyolojik histopatolojik inceleme için çıkarıldı.

3.4. *C. albicans* Etkenin Üretilmesi

C. albicans suşu Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji laboratuvarından temin edilecek. *C. albicans* suşu Sabouroud Dextrose Agar'a) ekildi, 37°C'de 24 saat inkübe edildi. Oluşan koloniler tekrar pasajlanacak. Elde edilen taze kültür pepton brotta süspanse edildikten sonra spektrofotometrik methodla McFarland 0,5 olacak şekilde (Densimat Biomérieux spektrofotometre cihazı) serum fizyolojik içerisinde 2.5×10^5 CFU/ml (Colony-forming unit/mililitre) olacak şekilde süspansiyon haline getirildi ve inokulasyon yapılincaya kadar +4°C bekletildi.

3.5. Antimikrobiyal Etkinliğin Değerlendirilmesi

Ozonlanmış zeytinyağının (OZY), ve Fluconazole'nin antimikrobiyal etkinliği; CLSI M27-A3 ve M27S referans yöntemine göre antifungal duyarlılık testi ile belirlendi.

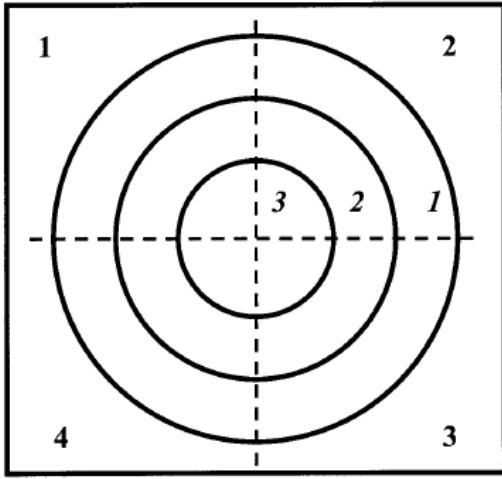
3.6. Deneyssel olarak keratitisin oluşturulması

C. albicans standart suşunun inokulasyonu için 37 adet 2-2,5 kg ağırlığında 3-4 aylık yaşlı, beyaz Yeni Zellanda tavşanı kullanıldı. Hayvanlara Görme ve Oftalmoloji Araştırma Derneği'nin kılavuzlarına göre insanca muamele edildi. Anestezi, ketamin hidroklorür (35 mg/kg) ve ksilazin hidroklorür (3.5 mg/kg) ile kas içi tatbik edilmek suretiyle yapılacak. Anestezi altına alınan hayvanlar stereoskopik mikroskop altında yerleştirilecek. Göz kapağı tel kapak spekulumu kullanarak açık konumda sabitlendi. Daha fazla anestezi için bir damla % 0.5'lik proparacain (ALCAİN/ALCON) göze damlatıldı. Yaklaşık olarak 2,500 cfu *C. albicans* içeren 10 µl (2.5×10^5 cfu/ml) bakteriyel süspansiyon 30-gauge iğne içeren mikro enjektör ile inrastromal olarak her bir kornea içine enjekte edildi. Sağlıklı olması için ön göz odasında stromaya penetre edilmedi.

3.6.1. Keratitisin Değerlendirilmesi

Tüm gözler bir araştırmacı tarafından mantar inokülasyonundan 48 saat sonra ve 3, 8, 12, 16, 20, 24. günlerde kornea opasitesi değerlendirildi. Derecelendirme şeması daha önce tarif edilmiştir (Beisel ve ark., 1983, Oksuz ve ark., 2005) ve aşağıdaki gibi kullanılacaktır: grade 0 = göz enfekte olmamış kontrol göze makroskopik özdeş; grade 1 = enjeksiyon alanında soluk donukluk; grade 2 = enjeksiyon alanında yoğun donukluk; grade 3 = tüm ön segmentini kapsayan yoğun donukluk ve evre 4 = korneada perforasyon.

3.6.2. Neovaskülarizasyonun Değerlendirilmesi



Vaskülarizasyonun her iki kadranda olması periferik sirküler neovaskülarizasyon daha şiddetli olduğunu gösterir.

Bu nedenle, yukarıdaki iki basamaklı sistem geliştirilmiştir:

Kornea merkezine olan uzaklığa için kodlanmış kod ilk basamak (1-2-3), ikinci basamak kodu hangi kadranda neovaskülarizasyon meydana geldiği (1, 2, 3, 4). ve kadrant sayısı, bu bize istatistiksel olarak karşılaştırılabilir sayısal kod elde etmemizi sağlar. Örneğin (21) birinci kadranda ve orta kornea neovaskülarizasyonunu için kodlanmış bir kod, (13) üçüncü kadranda periferik neovaskülarizasyon (Schreiber ve ark., 2003).

3.6.3. Korneada bulanıklığın değerlendirilmesi

Kornea bulanıklığı aşağıdaki ölçeğe göre değerlendirilmiştir: 0, net kornea; 1, minör ödem; 2, ikiden fazla çeyrek dairede kornea bulanıklığı; 3, toplam kornea bulanıklığı (Schreiber ve ark., 2003).

3.6.4. Konjonktivitisin değerlendirilmesi

Konjonktivit kızarıklık derecesi ile deęerlendirilmiřtir: (1 dūřuk, 2 orta ve 3 yūksek). (Schreiber ve ark., 2003).

3.6.5. Keratitis enfeksiyonun değerlendirilmesi

Mantar inokūlasyonundan ōnce, inoklosyondan 48 saat sonra mikrobiyolojik analiz iēin swap alındı. **Grup 6**'da ēalıřma bařlangıcında 2 hayvan, mantar inokūlasyonundan 48 saat sonra 5 hayvan, 24. Gūn sonunda **Grup 1, Grup 2, Grup 3, Grup 4, Grup 5, Grup 6** ve **Grup 7**'deki būtūn hayvanlar ksilazin ve ketamin sedasyonunu takiben intrakardiyak pentobarbital enjeksiyonu ile ōtenazi edildi. Kornealar; limbusda yaklařık olarak orta gōze kadar geniřletilmiř bir koronal kesi yapmak iēin steril bir neřter bıēak kullanarak gōzlerden diseke edildi. Kornealar steril mikro diseksiyon makası ile ters limbusun kesimini tamamlandıktan sonra ēıkarıldı. Kornealar steril % 1'lik 1 ml proteoz peptonda homojenize edildi. Her ōrnek direkt ve 1/1000 sulandırılarak (0.1 ml) Sabouraud Dextrose Agar plakaları ūzerine inokule edildi ve 37 °C de 24 saat inkūbe edilecek. Koloniler sayıldı. Tūm kantitatif kūltūrler duplike halinde ēalıřıldı ve her bir gōz iēin sonuēların ortalaması alındı. Sonuēlar korneal numunenin milimetre bařına organizmaların sayısı log₁₀ olarak ifade edildi.

3.7. Sitoloji

Gōzlerden mantar inokūlasyonundan ōnce, inokulasyondan 48 saat sonra ve 3, 8, 12, 16, 20, 24. gūnlerde uygulamadan ōnce stioloji iēin ōrnek alındı.

Lokal anestezi: Fırēa sitolojisi ōrneklerini almak amacı ile incelenecek olan tavşanların sağ ve sol gōzlerine % 0.5'lik proparacain (ALCAİN/ALCON) damlatılarak anaztezisi sağlandı (ēakır ve ark., 2011).

3.8. Histopatolojik inceleme

3.8.1. Cytospin Teknik

Konjunktival fırça örnekleri her bir gözden alındı. Bu amaçla insanlarda kullanılan özel bir fırça (Cytobrush, Gynobrush Plus, Germany) ile korneal hücreler toplandı. Her bir göze anestezi uygulanmadan sonra örnekler oküler yüzeyden fırçalarının döndürülmesiyle alındı. Fırçalar fikzatif solüsyona alındı (Cytospin collection fluid, Thermo Shandon 6768001, USA). Megafunnellara alınan fikzatifler 1500 devirde 15 dakika sitosantrifüj edildi (Cytospin; Thermo Shandon Southern Ltd, Cheshire, England).Toplanan hücreler poly L-lysin li camlara alındı. Sitosantrifüj edilen ıslak camlar kurutularak Hematoxylin-eosin (HE) ve PAP (Papanicolau) ile boyandı ve mounting medium (Merck) ile kapatıldı. Kesitler ışık mikroskopunda incelenerek fotoğraflandı. Resimler (Olympus DP71 mikroskopla uyumlu digital kamera (Olympus DP71) ve dijital program ile (DP Controller and the DP Manager) ile çekildi(Yağmur ve ark., 1979; Bolzan ve ark., 2005; Çakır ve ark., 2011).

3.8.2. Keratitisin histopatolojik olarak değerlendirilmesi

Grup 6'da çalışma başlangıcında 2 hayvan, mantar inokülasyonundan 48 saat sonra 7 hayvan, 24. Gün sonunda **Grup 1, Grup 2, Grup 3, Grup 4, Grup 5, Grup 6** ve **Grup 7**'deki bütün hayvanlar ksilazin ve ketamin sedasyonunu takiben intrakardiyak pentobarbital enjeksiyonu ile ötenazi edildi. Kornealar mikrobiyolojik histopatolojik inceleme için çıkarıldı. Korneanın histopatolojik incelemelerin yapılması için % 10'luk formol solüsyonunun içine konuldu. Alınan örnekler rutin takip işlemlerinden geçtikten sonra parafin bloklara alındıktan sonra 5 m kalınlığında hazırlanan kesitlere; Haemotoksilen-Eozin (HE), PAS (Periodic Acit Schiff) boyama uygulandı. Her bir preparat en az 4 mikroskop sahası x10, x40, and x100 büyütmede değerlendirildi.

Kesitler ışık mikroskopunda incelenerek fotoğraflandı. Resimler (Olympus BX-51 mikroskopla uyumlu digital kamera ve digital program ile (DP Controller and the DP Manager) ile çekildi.

3.9. Ozon Yağı Materyali

Deneme hayvanlarına uygulanan ozon yağının hazırlanmasında taze zeytinyağı kullanıldı. ZY meteryalini Ege, Türkiye bölgesinde yetiştirilen zeytinlerden oluşturdu. Deneyisel çalışmalar için gerekli olan ZY ve OZY izmirde ticari bir firmadan sertifikalandırılmış olarak (Aktifoks, Işık Kozmetik) temin edildi.

3.9.1. Zeytinyağının Ozonlanması

10 litre zeytinyağı saatte 25 gram ozon üreten Hansler marka ozon cihazıyla 18°C-20°C’de 10 gün boyunca ozonlandı (Aktifoks, Işık Kozmetik).

3.10.2. Ozon Yağının Analizi

ZY ve OZY’nin asitlik, iyot sayısı, perosit sayısı, pH, vizkozite tayinleri ve P-Anisidin değeri analizleri aşağıda belirtildiği gibi yapıldı.

3.9.2.1. Asitlik Tayini

Asitlik tayini; TS EN ISO 660 / Ocak 2010, Hayvansal ve Bitkisel Yağlar-Asit Sayısı ve Asitlik Tayini yöntemine göre Erciyes Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü’nde yapıldı.

3.9.2.2. İyot Sayısı Tayini

İyot Sayısı Tayini TS 4961 EN ISO 3961 / Şubat 1997, Hayvansal ve Bitkisel Yağlar-iyot Sayısı Tayini yöntemine Erciyes Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü’nde yapıldı.

3.9.2.3. Peroksit Sayısı Tayini

Peroksit sayısı tayini TS EN ISO 3960 / Ocak 2010, Hayvansal ve Bitkisel Katı ve Sıvı Yağlar-Peroksit Değeri Tayini yöntemine göre Erciyes Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü’nde yapıldı.

3.9.2.4. Para Anisidin Değeri

P-Anisidin (P-Anisidin) değeri AOCS (American Oil Chemists' Society) 1989. Official Method Cd 18-90 medhoduna göre ölçümü Erciyes Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü’nde yapıldı.

3.9.2.5. pH'nın Belirlenmesi

pH bir pH metre cihazında (WTW 315i weilheim Almanya) ile oda sıcaklığında 24°C'de Erciyes Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Bölümü'nde belirlendi.

3.9.2.6. Vizkozitenin Belirlenmesi

Ozonlanmış zeytinyağı ve zeytinyağının vizkozitesi titreşimli viskozimetre cihazı (AND SV-10 Japonya) ile oda sıcaklığında 24°C'de Erciyes Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Bölümü'nde belirlendi.

3.10. Ozonlanmış distile su

Distile su medikal ozon cihazında (Evozone Basic Plus GMBH Germany) 22µg/ml ozon içeren distile su şeklinde olacak şekilde ozonlandıktan sonra göze damlatılmak üzere hazır hale getirildi.

3.11. % 3'lük fluconazole damla ve fluconazole

Fluconazole ve % 3'lük fluconazole damla (Fluzamed % 0,3 göz damlası World Medicine) ticari firmadan temin edildi.

3.12. İstatistiksel analiz

Klinik bulguların gruplar arası ve grup içi karşılaştırmaları Kruskal-Wallis testi ile analiz edildi. Mikrobiyolojik bulgular grup içi ve gruplar arası karşılaştırmalar, tekrarlı ölçümlerde iki yönlü varyans analizi yapılarak belirlendi. Çoklu karşılaştırma testi olarak Benferoni testi kullanıldı. İstatistiksel analizler; IBM SPSS 22.0 for Windows paket programları ile gerçekleştirildi. *P* değeri anlamlı <0.05 kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Ozonlanmış yağ analiz bulguları

Ozonlanmış zeytin yağının analizi sonucunda: **Peroksit sayısı**; 1352.1126 mmol - mEq/ kg, **Asit sayısı**; 8.9951 unit, **İyot sayısı**; 2,2040 unit, **P-Anisidine değeri**; 0,516 mmol/g, **Vizkozite**; 32.5°C 1000 centipoise. pH 24 °C 2.1 olarak belirlendi.

4.2. Klinik Ve Mikrobiyolojik Bulgular

Tablo 1. Gözde keratit bulguları.

Gruplar	G.1(n=10) $\bar{x} \pm ss$ m(min-max)	G.2. (n=10) $\bar{x} \pm ss$ m(min-max)	G.3.(n=10) $\bar{x} \pm ss$ m(min-max)	G.4.(n=10) $\bar{x} \pm ss$ m(min-max)	G.5.(n=10) $\bar{x} \pm ss$ m(min-max)	G.6.(n=10) $\bar{x} \pm ss$ m(min-max)	G.7.(n=10) $\bar{x} \pm ss$ m(min-max)
48.saat	2,40±0,51 ^{bc} 2,00 (2,00-3,00)	2,50±0,52 ^a 2,50 (2,00-3,00)	2,60±0,51 ^a 3,00 (2,00-3,00)	2,70±0,48 ^a 3,00 (2,00-3,00)	2,90±0,31 ^a 3,00 (2,00-3,00)	2,60±0,51 ^a 3,00 (2,00-3,00)	0,00±0,00* 0,00 (0,00-0,00)
4.gün	2,70±0,48 ^a 3,00 (2,00-3,00)	2,80±0,42 ^a 3,00 (2,00-3,00)	3,00±0,66 ^a 3,00 (2,00-4,00)	3,10±0,56 ^a 3,00 (2,00-4,00)	3,40±0,51 ^a 3,00 (3,00-4,00)	3,20±0,42 ^{abc} 3,00 (3,00-4,00)	0,00±0,00* 0,00 (0,00-0,00)
8.gün	3,10±0,56 ^a 3,00 (2,00-4,00)	3,20±0,63 ^a 3,00 (2,00-4,00)	3,30±0,67 ^a 3,00 (2,00-4,00)	3,10±0,56 ^a 3,00 (2,00-4,00)	3,40±0,51 ^a 3,00 (3,00-4,00)	3,50±0,52 ^{abc} 3,50 (3,00-4,00)	0,00±0,00* 0,00 (0,00-0,00)
12.gün	3,10±0,56 ^a 3,00 (2,00-4,00)	3,20±0,63 ^a 3,00 (3,00-4,00)	3,20±0,63 ^a 3,00 (2,00-4,00)	2,70±0,67 ^a 3,00 (3,00-4,00)	2,70±0,67 ^{ac} 3,00 (2,00-4,00)	3,60±0,51 ^{bc} 4,00 (3,00-4,00)	0,00±0,00* 0,00 (0,00-0,00)
16.gün	2,40±0,51 ^{ab} 2,00 (2,00-3,00)	2,60±0,51 ^{bc} 3,00 (2,00-3,00)	2,50±0,52 ^{ab} 2,50 (2,00-3,00)	2,50±0,52 ^{ab} 2,50 (2,00-3,00)	2,40±0,51 ^{ab} 2,00 (2,00-3,00)	3,50±0,52 ^{abc} 3,50 (3,00-4,00)	0,00±0,00* 0,00 (0,00-0,00)
20.gün	1,00±0,00 ^{bc**+} 1,00 (1,00-1,00)	1,30±0,48 ^{bc*} 1,00 (1,00-2,00)	1,10±0,31 ^{b*} 1,00 (1,00-2,00)	1,20±0,42 ^{b*} 1,00 (1,00-2,00)	1,00±0,47 ^{bc**+} 1,00 (0,00-2,00)	3,60±0,51 ^c 4,00 (3,00-4,00)	0,00±0,00** 0,00 (0,00-0,00)
24.gün	0,60±0,51 ^{b**+} 1,00 (0,00-1,00)	0,90±0,31 ^{b*} 1,00 (0,00-1,00)	0,70±0,48 ^{b*} 1,00 (0,00-1,00)	0,80±0,42 ^{b*} 1,00 (0,00-1,00)	0,50±0,52 ^{b**} 0,50 (0,00-1,00)	3,60±0,5 ^c 4,00 (3,00-4,00)	0,00±0,00** 0,00 (0,00-0,00)

Gruplar; Grup 1. (n=5 tavşan, 10 gözü/grup) *C.albicans* ile keratit oluşturulan ve topikal olarak % 3'lük fluconazole damla ve ozonlanmış zeytinyağı damlası uygulanan tavşan grubu (FLU+OZY grubu); **Grup 2. (n=5 tavşan, 10 gözü/grup)** *C. albicans* ile keratit oluşturulan ve topikal olarak % 3'lük fluconazole damla uygulanan tavşan grubu (FLU grubu); **Grup 3. (n=5 tavşan, 10 gözü/grup)** *C. albicans* ile keratit oluşturulan ve distile su ile dilüe edilmiş ozonlanmış zeytinyağı damlası uygulanan tavşan grubu (OZY grubu); **Grup 4. (n=5 tavşan, 10 gözü/grup)** *C. albicans* ile keratit oluşturulan ve topikal olarak % 3'lük fluconazole damla ve 35µg/ml ozon içeren distile su damlası uygulanan tavşan grubu (FLU+ODS grubu); **Grup 5. (n=5 tavşan, 10 gözü/grup)** *C. albicans* ile keratit oluşturulan ve topikal olarak 22µg/ml ozon içeren distile su damlası uygulanan tavşan grubu (ODS grubu); **Grup 6. (n=12 tavşan, 24 gözü/grup)** *C. albicans* ile keratit oluşturulan ve fosfatla tamponlanmış tuzlu su damla (PBS) damla uygulanan tavşan grubu.(Enfekte kontrol grubu); **Grup 7. (n=5 tavşan, 10 gözü/grup)** steril PBS inokülasyonundan 24 saat sonra steril PBS damla uygulanan tavşan grubu (Negatif kontrol grubu). *: aynı sıradaki çalışma grubuyla kontrol grubu arasında istatistiksel farkı göstermektedir. (*:p<0,05). Grup içi ölçümler arası karşılaştırmada; farklı küçük harf(a-c) içeren sütunlar arasında fark vardır : (p<0,05).

Gruplar arası ölçümler karşılaştırıldığında; Grup 7 ile Grup 1 arasında 48. dakika ($p<0,011$), 4.gün ($p<0,020$), 8. gün ($p<0,005$), 12. gün ($p<0,045$), 16. gün ($p<0,014$) ve 20. gün ($p<0,001$) ölçümlerinde istatistiksel ($p<0,05$) farklılık vardır. Grup 7 ile Grup 2 arasında 48. dakika ($p<0,003$), 4.gün ($p<0,006$), 8. gün ($p<0,000$), 12. gün ($p<0,000$), 16. gün ($p<0,001$), 20. gün ($p<0,020$) ve 24. gün ($p<0,024$) ölçümlerinde istatistiksel ($p<0,05$) farklılık vardır. Grup 7 ile Grup 3 arasında 48. dakika ($p<0,001$), 4.gün ($p<0,000$), 8. gün ($p<0,001$), 12. gün ($p<0,001$), 16. gün ($p<0,004$) ve 20. gün ($p<0,007$) ölçümlerinde istatistiksel ($p<0,05$) farklılık vardır. Grup 7 ile Grup 4 arasında 48. dakika ($p<0,000$), 4.gün ($p<0,000$), 8. gün ($p<0,005$), 12. gün ($p<0,000$), 16. gün ($p<0,004$) ve 20. gün ($p<0,002$) ölçümlerinde istatistiksel ($p<0,05$) farklılık vardır. Grup 7 ile Grup 5 arasında 48. dakika ($p<0,000$), 4.gün ($p<0,000$), 8. gün ($p<0,000$), 12. gün ($p<0,045$), 16. gün ($p<0,014$) ve 20. gün ($p<0,022$) ölçümlerinde istatistiksel ($p<0,05$) farklılık vardır. Grup 7 ile Grup 6 arasında 48. dakika ($p<0,001$), 4.gün ($p<0,000$), 8. gün ($p<0,000$), 12. gün ($p<0,000$), 16. gün ($p<0,000$), 20. gün ($p<0,000$) ve 24. gün ($p<0,000$) ölçümlerinde istatistiksel ($p<0,05$) farklılık vardır. Grup 6 ile Grup 1 arasında 20. gün ($p<0,001$) ve 24. gün ($p<0,001$) ölçümlerinde, Grup 6 ile Grup 2 arasında 20. gün ($p<0,029$) ve 24. gün ($p<0,044$) ölçümlerinde, Grup 6 ile Grup 3 arasında 20. gün ($p<0,003$) ve 24. gün ($p<0,003$) ölçümlerinde, Grup 6 ile Grup 4 arasında 20. gün ($p<0,010$) ve 24. gün ($p<0,012$) ölçümlerinde, Grup 6 ile Grup 5 arasında 20. gün ($p<0,001$) ve 24. gün ($p<0,000$) ölçümlerinde istatistiksel ($p<0,05$) farklılık vardır.

Grup içi ölçümler karşılaştırıldığında, Grup 1’de 20. gün ile 4. gün ($p<0,013$), 8. gün ($p<0,000$) ve 12. gün ($p<0,000$) arasında, 24. gün ile 48. saat ($p<0,047$), 4. gün ($p<0,003$), 8. gün ($p<0,000$) ve 12. gün ($p<0,000$) arasında istatistiksel ($p<0,05$) farklılık vardır. Grup 2’de 20. gün ile 4. gün ($p<0,047$), 8. gün ($p<0,003$) ve 12. gün ($p<0,003$) arasında, 24. gün ile 48. saat ($p<0,047$), 4. gün ($p<0,004$), 8. gün ($p<0,000$), 12. gün ($p<0,000$) ve 16. gün ($p<0,040$) arasında istatistiksel ($p<0,05$) farklılık vardır. Grup 3’de 20. gün ile 4. gün ($p<0,009$), 8. gün ($p<0,001$) ve 12. gün ($p<0,002$) arasında, 24. gün ile 48. saat ($p<0,040$), 4. gün ($p<0,001$), 8. gün ($p<0,000$) ve 12. gün ($p<0,000$) arasında istatistiksel ($p<0,05$) farklılık vardır. Grup 4’te 20. gün ile 48. saat ($p<0,040$), 4. gün ($p<0,001$), 8. gün ($p<0,001$) ve 12. gün ($p<0,047$) arasında, 24. gün ile 48. saat ($p<0,000$), 4. gün ($p<0,000$), 8. gün ($p<0,000$) ve 12. gün ($p<0,009$) arasında istatistiksel ($p<0,05$) farklılık vardır. Grup 5’de 20. gün ile 48. saat ($p<0,028$), 4. gün ($p<0,000$) ve 8. gün ($p<0,000$) arasında, 24. gün ile 48. saat ($p<0,004$), 4.

gün ($p<0,000$), 8. gün ($p<0,000$) ve 12. gün ($p<0,040$) arasında istatistiksel ($p<0,05$) farklılık vardır. Grup 6'da 12. gün ($p<0,033$) ile 48. saat arasında, 20. gün ile 48. saat ($p<0,047$) arasında, 24. gün ile 48. saat ($p<0,047$) arasında istatistiksel ($p<0,05$) farklılık vardır. Grup 7'de grup içi ölçümler arasında istatistiksel ($p>0,05$) farklılık yoktur (Tablo 1).

Tablo 2. Gözde korneal bulanıklık bulguları.

Gruplar	G.1.(n=10) $\bar{x} \pm ss$ m(min-max)	G.2. (n=10) $\bar{x} \pm ss$ m(min-max)	G.3.(n=10) $\bar{x} \pm ss$ m(min-max)	G.4.(n=10) $\bar{x} \pm ss$ m(min-max)	G.5.(n=10) $\bar{x} \pm ss$ m(min-max)	G.6.(n=10) $\bar{x} \pm ss$ m(min-max)	G.7.(n=10) $\bar{x} \pm ss$ m(min-max)
48.saat	2,70 $\pm$ 0,48 ^d 3,00 (2,00-3,00)	2,70 $\pm$ 0,48 ^d 3,00 (2,00-3,00)	2,80 $\pm$ 0,42 ^d 3,00 (2,00-3,00)	3,10 $\pm$ 0,31 ^a 3,00 (3,00-4,00)	3,00 $\pm$ 0,47 ^a 3,00 (2,00-4,00)	2,80 $\pm$ 0,78 3,00 (2,00-4,00)	0,00 $\pm$ 0,00** 0,00 (0,00-0,00)
4.gün	2,90 $\pm$ 0,56 ^a 3,00 (2,00-4,00)	2,70 $\pm$ 0,48 ^a 3,00 (2,00-3,00)	2,80 $\pm$ 0,42 ^a 3,00 (2,00-4,00)	2,90 $\pm$ 0,31 ^a 3,00 (2,00-3,00)	3,10 $\pm$ 0,31 ^a 3,00 (3,00-4,00)	3,00 $\pm$ 0,00 3,00 (3,00-3,00)	0,00 $\pm$ 0,00** 0,00 (0,00-0,00)
8.gün	2,80 $\pm$ 0,63 ^a 3,00 (2,00-4,00)	2,80 $\pm$ 0,42 ^a 3,00 (2,00-3,00)	3,10 $\pm$ 0,31 ^a 3,00 (3,00-4,00)	3,20 $\pm$ 0,42 ^a 3,00 (3,00-4,00)	3,00 $\pm$ 0,47 ^a 3,00 (2,00-4,00)	3,30 $\pm$ 0,48 3,00 (3,00-4,00)	0,00 $\pm$ 0,00** 0,00 (0,00-0,00)
12.gün	2,80 $\pm$ 0,42 ^a 3,00 (2,00-4,00)	2,90 $\pm$ 0,3 ^a 3,00 (2,00-3,00)	2,90 $\pm$ 0,56 ^a 3,00 (2,00-4,00)	3,00 $\pm$ 0,66 ^a 3,00 (2,00-4,00)	2,60 $\pm$ 0,51 ^a 3,00 (2,00-3,00)	3,50 $\pm$ 0,52 3,50 (3,00-4,00)	0,00 $\pm$ 0,00** 0,00 (0,00-0,00)
16.gün	2,10 $\pm$ 0,31 ^{ac} 2,00 (2,00-3,00)	2,30 $\pm$ 0,48 ^{ac} 2,00 (2,00-3,00)	2,10 $\pm$ 0,31 ^{ac} 2,00 (2,00-3,00)	2,30 $\pm$ 0,48 ^{ac} 2,00 (2,00-3,00)	2,00 $\pm$ 0,00 ^{ab} 2,00 (2,00-2,00)	3,30 $\pm$ 0,48 3,00 (3,00-4,00)	0,00 $\pm$ 0,00** 0,00 (0,00-0,00)
20.gün	0,90 $\pm$ 0,31 ^{b**+} 1,00 (0,00-1,00)	1,30 $\pm$ 0,48 ^{b*} 1,00 (1,00-2,00)	1,10 $\pm$ 0,31 ^{b*} 1,00 (1,00-2,00)	1,20 $\pm$ 0,42 ^{b*} 1,00 (1,00-2,00)	1,00 $\pm$ 0,47 ^{b**} 1,00 (0,00-2,00)	3,50 $\pm$ 0,52 3,50 (3,00-4,00)	0,00 $\pm$ 0,00** 0,00 (0,00-0,00)
24.gün	0,50 $\pm$ 0,52 ^{bc**+} 0,50 (0,00-1,00)	0,80 $\pm$ 0,42 ^{bc*} 1,00 (0,00-1,00)	0,60 $\pm$ 0,51 ^{bc*} 1,00 (0,00-1,00)	0,70 $\pm$ 0,42 ^{bc*} 1,00 (0,00-1,00)	0,40 $\pm$ 0,51 ^{b**} 0,00 (0,00-1,00)	3,50 $\pm$ 0,52 3,50 (3,00-4,00)	0,00 $\pm$ 0,00** 0,00 (0,00-0,00)

Gruplar; Grup 1. (n=5 tavşan, 10 gözü/grup) *C.albicans* ile keratit oluşturulan ve topikal olarak % 3'lük fluconazole damla ve ozonlanmış zeytinyağı damlası uygulanan tavşan grubu (FLU+OZY grubu); **Grup 2. (n=5 tavşan, 10 gözü/grup)** *C. albicans* ile keratit oluşturulan ve topikal olarak % 3'lük fluconazole damla uygulanan tavşan grubu (FLU grubu); **Grup 3. (n=5 tavşan, 10 gözü/grup)** *C. albicans* ile keratit oluşturulan ve distile su ile dilüe edilmiş ozonlanmış zeytinyağı damlası uygulanan tavşan grubu (OZY grubu); **Grup 4. (n=5 tavşan, 10 gözü/grup)** *C. albicans* ile keratit oluşturulan ve topikal olarak % 3'lük fluconazole damla ve 35µg/ml ozon içeren distile su damlası uygulanan tavşan grubu (FLU+ODS grubu); **Grup 5. (n=5 tavşan, 10 gözü/grup)** *C. albicans* ile keratit oluşturulan ve topikal olarak 22µg/ml ozon içeren distile su damlası uygulanan tavşan grubu (ODS grubu); **Grup 6. (n=12 tavşan, 24 gözü/grup)** *C. albicans* ile keratit oluşturulan ve fosfatla tamponlanmış tuzlu su damla (PBS) damla uygulanan tavşan grubu.(Enfekte kontrol grubu); **Grup 7. (n=5 tavşan, 10 gözü/grup)** steril PBS inokülasyonundan 24 saat sonra steril PBS damla uygulanan tavşan grubu (Negatif kontrol grubu). *: aynı sıradaki çalışma grubuyla kontrol grubu arasında istatistiksel farkı göstermektedir:(*: $p<0,05$). Grup içi ölçümler arası karşılaştırmada; farklı küçük harf(a-c) içeren sütunlar arasında fark vardır : ($p<0,05$).

Gruplar arası ölçümler karşılaştırıldığında; Grup 7 ile Grup 1 arasında 48. dakika ($p<0,002$), 4.gün ($p<0,000$), 8. gün ($p<0,003$), 12. gün ($p<0,002$) ve 16. gün ($p<0,006$) ölçümlerinde istatistiksel ($p<0,05$) farklılık vardır. 20. gün ($p<0,068$) ölçümlerinde istatistiksel ($p>0,05$) farklılık yoktur. Grup 7 ile Grup 2 arasında 48. dakika ($p<0,002$), 4.gün ($p<0,003$), 8. gün ($p<0,004$), 12. gün ($p<0,001$), 16. gün ($p<0,000$) ve 20. gün ($p<0,001$) ölçümlerinde istatistiksel ($p<0,05$) farklılık vardır. Grup 7 ile Grup 3 arasında 48. dakika

($p<0,000$), 4.gün ($p<0,000$), 8. gün ($p<0,001$), 12. gün ($p<0,001$), 16. gün ($p<0,006$) ve 20. gün ($p<0,008$) ölçümlerinde istatistiksel ($p<0,05$) farklılık vardır. Grup 7 ile Grup 4 arasında 48. dakika ($p<0,000$), 4.gün ($p<0,000$), 8. gün ($p<0,005$), 12. gün ($p<0,000$), 16. gün ($p<0,004$) ve 20. gün ($p<0,002$) ölçümlerinde istatistiksel ($p<0,05$) farklılık vardır. Grup 7 ile Grup 5 arasında 48. dakika ($p<0,000$), 4.gün ($p<0,000$), 8. gün ($p<0,000$), 12. gün ($p<0,020$), 16. gün ($p<0,024$) ve 20. gün ($p<0,025$) ölçümlerinde istatistiksel ($p<0,05$) farklılık vardır. Grup 7 ile Grup 6 arasında 48. dakika ($p<0,001$), 4.gün ($p<0,000$), 8. gün ($p<0,000$), 12. gün ($p<0,000$), 16. gün ($p<0,000$), 20. gün ($p<0,000$) ve 24. gün ($p<0,000$) ölçümlerinde istatistiksel ($p<0,05$) farklılık vardır. Grup 6 ile Grup 1 arasında 16. gün ($p<0,008$), 20. gün ($p<0,001$) ve 24. gün ($p<0,001$) ölçümlerinde, Grup 6 ile Grup 2 arasında 20. gün ($p<0,038$) ve 24. gün ($p<0,039$) ölçümlerinde, Grup 6 ile Grup 3 arasında 16. gün ($p<0,008$), 20. gün ($p<0,004$) ve 24. gün ($p<0,003$) ölçümlerinde, Grup 6 ile Grup 4 arasında 20. gün ($p<0,011$) ve 24. gün ($p<0,012$) ölçümlerinde, Grup 6 ile Grup 5 arasında 16. gün ($p<0,002$), 20. gün ($p<0,001$) ve 24. gün ($p<0,000$) ölçümlerinde istatistiksel ($p<0,05$) farklılık vardır.

Grup içi ölçümler karşılaştırıldığında; Grup 1’de 20. gün ile 48. saat ($p<0,013$), 4. gün ($p<0,000$), 8. gün ($p<0,009$) ve 12. gün ($p<0,004$) arasında, 24. gün ile 48. saat ($p<0,003$), 4. gün ($p<0,000$), 8. gün ($p<0,002$) ve 12. gün ($p<0,001$) arasında istatistiksel ($p<0,05$) farklılık vardır. Grup 2’de 20. gün ile 48. saat ($p<0,033$), 4. gün ($p<0,033$), 8. gün ($p<0,011$) ve 12. gün ($p<0,004$) arasında, 24. gün ile 48. saat ($p<0,002$), 4. gün ($p<0,002$), 8. gün ($p<0,001$) ve 12. gün ($p<0,000$) arasında istatistiksel ($p<0,05$) farklılık vardır. Grup 3’de 20. gün ile 48. saat ($p<0,023$), 4. gün ($p<0,003$), 8. gün ($p<0,002$) ve 12. gün ($p<0,007$) arasında, 24. gün ile 48. saat ($p<0,002$), 4. gün ($p<0,000$), 8. gün ($p<0,000$) ve 12. gün ($p<0,001$) arasında istatistiksel ($p<0,05$) farklılık vardır. Grup 4’te 20. gün ile 48. saat ($p<0,003$), 4. gün ($p<0,013$), 8. gün ($p<0,001$) ve 12. gün ($p<0,013$) arasında, 24. gün ile 48. saat ($p<0,000$), 4. gün ($p<0,002$), 8. gün ($p<0,000$) ve 12. gün ($p<0,002$) arasında istatistiksel ($p<0,05$) farklılık vardır. Grup 5’de 20. gün ile 48. saat ($p<0,002$), 4. gün ($p<0,001$) ve 8. gün ($p<0,002$) arasında, 24. gün ile 48. saat ($p<0,000$), 4. gün ($p<0,000$), 8. gün ($p<0,000$) ve 12. gün ($p<0,011$) arasında istatistiksel ($p<0,05$) farklılık vardır. Grup 6’da ve Grup 7’de grup içi ölçümler arasında istatistiksel ($p>0,05$) farklılık yoktur (Tablo 2).

Tablo 3. Gözde korneal ülser bulguları.

Gruplar	G.1(n=10) $\bar{x} \pm ss$ m(min-max)	G.2. (n=10) $\bar{x} \pm ss$ m(min-max)	G.3.(n=10) $\bar{x} \pm ss$ m(min-max)	G.4.(n=10) $\bar{x} \pm ss$ m(min-max)	G.5.(n=10) $\bar{x} \pm ss$ m(min-max)	G.6.(n=10) $\bar{x} \pm ss$ m(min-max)	G.7.(n=10) $\bar{x} \pm ss$ m(min-max)
48.saat	2,60 $\pm$ 0,51 ^a 3,00 (2,00-3,00)	2,50 $\pm$ 0,52 ^a 2,50 (2,00-3,00)	2,70 $\pm$ 0,48 ^a 3,00 (2,00-3,00)	2,80 $\pm$ 0,42 ^a 3,00 (2,00-3,00)	2,90 $\pm$ 0,31 ^a 3,00 (2,00-3,00)	2,60 $\pm$ 0,51 ^a 3,00 (2,00-3,00)	0,00 $\pm$ 0,00* 0,00 (0,00-0,00)
4.gün	2,80 $\pm$ 0,42 ^a 3,00 (2,00-3,00)	2,70 $\pm$ 0,48 ^{ac} 3,00 (2,00-3,00)	2,80 $\pm$ 0,63 ^a 3,00 (2,00-4,00)	3,10 $\pm$ 0,56 ^a 3,00 (2,00-4,00)	3,30 $\pm$ 0,48 ^a 3,00 (3,00-4,00)	3,10 $\pm$ 0,0,31 ^{ab} 3,00 (3,00-4,00)	0,00 $\pm$ 0,00* 0,00 (0,00-0,00)
8.gün	3,30 $\pm$ 0,48 ^a 3,00 (3,00-4,00)	3,60 $\pm$ 0,51 ^a 4,00 (3,00-4,00)	3,50 $\pm$ 0,52 ^a 3,50 (3,00-4,00)	3,40 $\pm$ 0,51 ^a 3,00 (3,00-4,00)	3,40 $\pm$ 0,51 ^a 3,00 (3,00-4,00)	3,40 $\pm$ 0,51 ^{ab} 3,00 (3,00-4,00)	0,00 $\pm$ 0,00* 0,00 (0,00-0,00)
12.gün	3,30 $\pm$ 0,48 ^a 3,00 (3,00-4,00)	3,20 $\pm$ 0,63 ^a 3,00 (2,00-4,00)	3,10 $\pm$ 0,56 ^a 3,00 (2,00-4,00)	2,70 $\pm$ 0,67 ^a 3,00 (2,00-4,00)	2,60 $\pm$ 0,51 ^{ac} 3,00 (2,00-3,00)	3,60 $\pm$ 0,51 ^{ab} 4,00 (3,00-4,00)	0,00 $\pm$ 0,00* 0,00 (0,00-0,00)
16.gün	2,50 $\pm$ 0,52 ^{ab} 2,50 (2,00-3,00)	2,60 $\pm$ 0,51 ^{ab} 3,00 (2,00-3,00)	2,60 $\pm$ 0,51 ^a 3,00 (2,00-3,00)	2,70 $\pm$ 0,4 ^{ac} 3,00 (2,00-3,00)	2,50 $\pm$ 0,70 ^{ab} 2,00 (2,00-4,00)	3,70 $\pm$ 0,48 ^b 4,00 (3,00-4,00)	0,00 $\pm$ 0,00* 0,00 (0,00-0,00)
20.gün	1,00 $\pm$ 0,00 ^{b***} 1,00 (1,00-1,00)	1,30 $\pm$ 0,48 ^{bc*} 1,00 (1,00-2,00)	1,10 $\pm$ 0,31 ^{b*} 1,00 (1,00-2,00)	1,20 $\pm$ 0,42 ^{bc*} 1,00 (1,00-2,00)	1,00 $\pm$ 0,47 ^{b***} 1,00 (0,00-2,00)	3,60 $\pm$ 0,51 ^{ab} 4,00 (3,00-4,00)	0,00 $\pm$ 0,00** 0,00 (0,00-0,00)
24.gün	0,60 $\pm$ 0,51 ^{b***} 1,00 (0,00-1,00)	0,90 $\pm$ 0,31 ^{b*} 1,00 (0,00-1,00)	0,70 $\pm$ 0,48 ^{b*} 1,00 (0,00-1,00)	0,80 $\pm$ 0,42 ^{b*} 1,00 (0,00-1,00)	0,50 $\pm$ 0,52 ^{bc**} 0,50 (0,00-1,00)	3,60 $\pm$ 0,51 ^{ab} 4,00 (3,00-4,00)	0,00 $\pm$ 0,00** 0,00 (0,00-0,00)

Gruplar; Grup 1. (n=5 tavşan, 10 gözü/grup) *C.albicans* ile keratit oluşturulan ve topikal olarak % 3'lük fluconazole damla ve ozonlanmış zeytinyağı damlası uygulanan tavşan grubu (FLU+OZY grubu); **Grup 2. (n=5 tavşan, 10 gözü/grup)** *C. albicans* ile keratit oluşturulan ve topikal olarak % 3'lük fluconazole damla uygulanan tavşan grubu (FLU grubu); **Grup 3. (n=5 tavşan, 10 gözü/grup)** *C. albicans* ile keratit oluşturulan ve distile su ile dilüe edilmiş ozonlanmış zeytinyağı damlası uygulanan tavşan grubu (OZY grubu); **Grup 4. (n=5 tavşan, 10 gözü/grup)** *C. albicans* ile keratit oluşturulan ve topikal olarak % 3'lük fluconazole damla ve 35µg/ml ozon içeren distile su damlası uygulanan tavşan grubu (FLU+ODS grubu); **Grup 5. (n=5 tavşan, 10 gözü/grup)** *C. albicans* ile keratit oluşturulan ve topikal olarak 22µg/ml ozon içeren distile su damlası uygulanan tavşan grubu (ODS grubu); **Grup 6. (n=12 tavşan, 24 gözü/grup)** *C. albicans* ile keratit oluşturulan ve fosfatla tamponlanmış tuzlu su damla (PBS) damla uygulanan tavşan grubu.(Enfekte kontrol grubu); **Grup 7. (n=5 tavşan, 10 gözü/grup)** steril PBS inokülasyonundan 24 saat sonra steril PBS damla uygulanan tavşan grubu (Negatif kontrol grubu). *: aynı sıradaki çalışma grubuyla kontrol grubu arasında istatistiksel farkı göstermektedir.(*:p<0,05). Grup içi ölçümler arası karşılaştırmada; farklı küçük harf(a-c) içeren sütunlar arasında fark vardır : (p<0,05).

Gruplar arası ölçümler karşılaştırıldığında; Grup 7 ile Grup 1 arasında 48. dakika (p<0,001), 4.gün (p<0,002), 8. gün (p<0,004), 12. gün (p<0,000), 16. gün (p<0,015) ve 20. gün (p<0,020) ölçümlerinde istatistiksel (p<0,05) farklılık vardır. Grup 7 ile Grup 2 arasında 48. dakika (p<0,005), 4.gün (p<0,008), 8. gün (p<0,000), 12. gün (p<0,000), 16. gün (p<0,005), 20. gün (p<0,001) ve 24. gün (p<0,024) ölçümlerinde istatistiksel (p<0,05) farklılık vardır. Grup 7 ile Grup 3 arasında 48. dakika (p<0,000), 4.gün (p<0,002), 8. gün (p<0,000), 12. gün (p<0,001), 16. gün (p<0,005) ve 20. gün (p<0,007) ölçümlerinde istatistiksel (p<0,05) farklılık vardır. Grup 7 ile Grup 4 arasında 48. dakika (p<0,000), 4.gün (p<0,000), 8. gün (p<0,001), 12. gün (p<0,043), 16. gün (p<0,001) ve 20. gün (p<0,002) ölçümlerinde istatistiksel (p<0,05) farklılık vardır. Grup 7 ile Grup 5 arasında 48. dakika (p<0,000), 4.gün (p<0,000), 8. gün (p<0,001), 16. gün (p<0,020) ve 20. gün (p<0,022) ölçümlerinde istatistiksel (p<0,05) farklılık vardır. 12. gün (p<0,045) ölçümlerinde istatistiksel (p>0,05) farklılık yoktur. Grup 7 ile Grup 6 arasında 48. dakika (p<0,001), 4.gün

($p<0,000$), 8. gün ($p<0,001$), 12. gün ($p<0,000$), 16. gün ($p<0,000$), 20. gün ($p<0,000$) ve 24. gün ($p<0,000$) ölçümlerinde istatistiksel ($p<0,05$) farklılık vardır. Grup 6 ile Grup 1 arasında 16. gün ($p<0,045$), 20. gün ($p<0,001$) ve 24. gün ($p<0,001$) ölçümlerinde, Grup 6 ile Grup 2 arasında 20. gün ($p<0,029$) ve 24. gün ($p<0,044$) ölçümlerinde, Grup 6 ile Grup 3 arasında 20. gün ($p<0,003$) ve 24. gün ($p<0,003$) ölçümlerinde, Grup 6 ile Grup 4 arasında 20. gün ($p<0,010$) ve 24. gün ($p<0,012$) ölçümlerinde, Grup 6 ile Grup 5 arasında 16. gün ($p<0,0034$), 20. gün ($p<0,001$) ve 24. gün ($p<0,000$) ölçümlerinde istatistiksel ($p<0,05$) farklılık vardır.

Grup içi ölçümler karşılaştırıldığında; Grup 1’de 20. gün ile 4. gün ($p<0,023$), 8. gün ($p<0,000$) ve 12. gün ($p<0,000$) arasında, 24. gün ile 48. saat ($p<0,023$), 4. gün ($p<0,005$), 8. gün ($p<0,000$) ve 12. gün ($p<0,000$) arasında istatistiksel ($p<0,05$) farklılık vardır. Grup 2’de 20. gün ile, 8. gün ($p<0,004$) ve 12. gün ($p<0,000$) arasında, 24. gün ile 4. gün ($p<0,016$), 8. gün ($p<0,000$), 12. gün ($p<0,000$) ve 16. gün ($p<0,040$) arasında istatistiksel ($p<0,05$) farklılık vardır. Grup 3’de 20. gün ile 4. gün ($p<0,040$), 8. gün ($p<0,000$) ve 12. gün ($p<0,004$) arasında, 24. gün ile 48. saat ($p<0,028$), 4. gün ($p<0,006$), 8. gün ($p<0,000$) ve 12. gün ($p<0,000$) arasında istatistiksel ($p<0,05$) farklılık vardır. Grup 4’te 20. gün ile 48. saat ($p<0,040$), 4. gün ($p<0,003$), 8. gün ($p<0,001$) ve arasında, 24. gün ile 48. saat ($p<0,007$), 4. gün ($p<0,000$), 8. gün ($p<0,000$), 12. gün ($p<0,023$) ve 16. gün ($p<0,019$) arasında istatistiksel ($p<0,05$) farklılık vardır. Grup 5’de 20. gün ile 48. saat ($p<0,028$), 4. gün ($p<0,000$) ve 8. gün ($p<0,000$) arasında, 24. gün ile 48. saat ($p<0,004$), 4. gün ($p<0,000$) ve 8. gün ($p<0,000$) arasında istatistiksel ($p<0,05$) farklılık vardır. Grup 6’da 16. gün ile ($p<0,028$), 48. saat arasında istatistiksel ($p<0,05$) farklılık vardır. Grup 7’de grup içi ölümmler arasında istatistiksel ($p>0,05$) farklılık yoktur (Tablo 3).

Tablo 4. Gözde konjunktivit bulguları.

Gruplar	G.1.(n=10) $\bar{x} \pm ss$ m(min-max)	G.2. (n=10) $\bar{x} \pm ss$ m(min-max)	G.3.(n=10) $\bar{x} \pm ss$ m(min-max)	G.4.(n=10) $\bar{x} \pm ss$ m(min-max)	G.5.(n=10) $\bar{x} \pm ss$ m(min-max)	G.6.(n=10) $\bar{x} \pm ss$ m(min-max)	G.7.(n=10) $\bar{x} \pm ss$ m(min-max)
48.saat	2,50 $\pm$ 0,52 ^{ac} 2,50 (2,00-3,00)	2,40 $\pm$ 0,51 ^{ac} 2,00 (2,00-3,00)	2,50 $\pm$ 0,52 ^{ad} 2,50 (2,00-3,00)	2,60 $\pm$ 0,51 ^{ac} 3,00 (2,00-3,00)	3,00 $\pm$ 0,00 ^a 3,00 (3,00-3,00)	2,40 $\pm$ 0,51 ^a 2,00 (2,00-3,00)	0,00 $\pm$ 0,00 ^{**} 0,00 (0,00-0,00)
4.gün	2,80 $\pm$ 0,42 ^a 3,00 (2,00-3,00)	2,90 $\pm$ 0,56 ^a 3,00 (2,00-4,00)	2,90 $\pm$ 0,56 ^a 3,00 (2,00-4,00)	3,20 $\pm$ 0,63 ^a 3,00 (2,00-4,00)	3,20 $\pm$ 0,42 ^a 3,00 (3,00-4,00)	3,40 $\pm$ 0,51 ^{ab} 3,00 (3,00-4,00)	0,00 $\pm$ 0,00 ^{**} 0,00 (0,00-0,00)
8.gün	3,10 $\pm$ 0,56 ^a 3,00 (2,00-4,00)	3,10 $\pm$ 0,56 ^a 3,00 (2,00-4,00)	3,10 $\pm$ 0,56 ^a 3,00 (2,00-4,00)	3,30 $\pm$ 0,48 ^b 3,00 (3,00-4,00)	3,10 $\pm$ 0,56 ^b 3,00 (2,00-4,00)	3,50 $\pm$ 0,52 ^{ab} 3,50 (3,00-4,00)	0,00 $\pm$ 0,00 ^{**} 0,00 (0,00-0,00)
12.gün	3,30 $\pm$ 0,48 ^a 3,00 (3,00-4,00)	3,40 $\pm$ 0,51 ^a 3,00 (3,00-4,00)	3,20 $\pm$ 0,63 ^a 3,00 (2,00-4,00)	3,00 $\pm$ 0,81 ^a 3,00 (2,00-4,00)	2,90 $\pm$ 0,87 ^a 3,00 (2,00-4,00)	3,70 $\pm$ 0,48 ^b 4,00 (3,00-4,00)	0,00 $\pm$ 0,00 ^{**} 0,00 (0,00-0,00)
16.gün	2,30 $\pm$ 0,48 ^{ab} 2,00 (2,00-3,00)	2,60 $\pm$ 0,51 ^a 3,00 (2,00-3,00)	2,90 $\pm$ 0,56 ^{ac} 3,00 (2,00-4,00)	2,60 $\pm$ 0,51 ^{ac} 3,00 (2,00-3,00)	2,20 $\pm$ 0,42 ^{ab*} 2,00 (2,00-3,00)	3,30 $\pm$ 0,48 ^a 3,00 (3,00-4,00)	0,00 $\pm$ 0,00 ^{**} 0,00 (0,00-0,00)
20.gün	1,00 $\pm$ 0,00 ^{bc*} 1,00 (1,00-1,00)	1,10 $\pm$ 0,31 ^{bc*} 1,00 (1,00-2,00)	1,10 $\pm$ 0,31 ^{bcd*} 1,00 (1,00-2,00)	1,10 $\pm$ 0,31 ^{bc*} 1,00 (1,00-2,00)	,80 $\pm$ 0,42 ^{b*} 1,00 (0,00-1,00)	3,40 $\pm$ 0,51 ^{a**} 3,00 (3,00-4,00)	0,00 $\pm$ 0,00 ^{**} 0,00 (0,00-0,00)
24.gün	0,60 $\pm$ 0,51 ^{b*} 1,00 (0,00-1,00)	0,80 $\pm$ 0,42 ^{b*} 1,00 (0,00-1,00)	0,60 $\pm$ 0,51 ^{bc*} 1,00 (0,00-1,00)	0,80 $\pm$ 0,42 ^{b*} 1,00 (0,00-1,00)	0,40 $\pm$ 0,51 ^{b*} 0,00 (0,00-1,00)	3,50 $\pm$ 0,52 ^{**} 3,50 (3,00-4,00)	0,00 $\pm$ 0,00 ^{**} 0,00 (0,00-0,00)

Gruplar; Grup 1. (n=5 tavşan, 10 gözü/grup) *C.albicans* ile keratit oluşturulan ve topikal olarak % 3'lük fluconazole damla ve ozonlanmış zeytinyağı damlası uygulanan tavşan grubu (FLU+OZY grubu); **Grup 2. (n=5 tavşan, 10 gözü/grup)** *C. albicans* ile keratit oluşturulan ve topikal olarak % 3'lük fluconazole damla uygulanan tavşan grubu (FLU grubu); **Grup 3. (n=5 tavşan, 10 gözü/grup)** *C. albicans* ile keratit oluşturulan ve distile su ile dilüe edilmiş ozonlanmış zeytinyağı damlası uygulanan tavşan grubu (OZY grubu); **Grup 4. (n=5 tavşan, 10 gözü/grup)** *C. albicans* ile keratit oluşturulan ve topikal olarak % 3'lük fluconazole damla ve 35µg/ml ozon içeren distile su damlası uygulanan tavşan grubu (FLU+ODS grubu); **Grup 5. (n=5 tavşan, 10 gözü/grup)** *C. albicans* ile keratit oluşturulan ve topikal olarak 22µg/ml ozon içeren distile su damlası uygulanan tavşan grubu (ODS grubu); **Grup 6. (n=12 tavşan, 24 gözü/grup)** *C. albicans* ile keratit oluşturulan ve fosfatla tamponlanmış tuzlu su damla (PBS) damla uygulanan tavşan grubu.(Enfekte kontrol grubu); **Grup 7. (n=5 tavşan, 10 gözü/grup)** steril PBS inokülasyonundan 24 saat sonra steril PBS damla uygulanan tavşan grubu (Negatif kontrol grubu). *: aynı sıradaki çalışma grubuyla kontrol grubu arasında istatistiksel farkı göstermektedir.(*:p<0,05). Grup içi ölçümler arası karşılaştırmada; farklı küçük harf(a-c) içeren sütunlar arasında fark vardır : (p<0,05).

Gruplar arası ölçümler karşılaştırıldığında; Grup 7 ile Grup 1 arasında 48. dakika (p<0,001), 4.gün (p<0,010), 8. gün (p<0,001), 12. gün (p<0,001), 16. gün (p<0,046) ve 20. gün (p<0,005) ölçümlerinde istatistiksel (p<0,05) farklılık vardır. Grup 7 ile Grup 2 arasında 48. dakika (p<0,006), 4.gün (p<0,003), 8. gün (p<0,003), 12. gün (p<0,001), 16. gün (p<0,001), ve 20. gün (p<0,001) ölçümlerinde istatistiksel (p<0,05) farklılık vardır. Gruplar arası ölçümler karşılaştırıldığında, Grup 7 ile Grup 3 arasında 48. dakika (p<0,001), 4.gün (p<0,003), 8. gün (p<0,003), 12. gün (p<0,001), 16. gün (p<0,000) ve 20. gün (p<0,001) ölçümlerinde istatistiksel (p<0,05) farklılık vardır. Grup 7 ile Grup 4 arasında 48. dakika (p<0,000), 4.gün (p<0,000), 8. gün (p<0,000), 12. gün (p<0,008), 16. gün (p<0,001) ve 20. gün (p<0,001) ölçümlerinde istatistiksel (p<0,05) farklılık vardır. Grup 7 ile Grup 5 arasında 48. dakika (p<0,000), 4.gün (p<0,000), 8. gün (p<0,000) ve 12. gün (p<0,0017) ölçümlerinde istatistiksel (p<0,05) farklılık vardır. 16. gün (p<0,133), 20. gün (p<0,070) ölçümlerinde istatistiksel (p<0,05) farklılık yoktur. Grup 7 ile Grup 6 arasında 48. dakika (p<0,006), 4.gün (p<0,000), 8. gün (p<0,000), 12. gün (p<0,000), 16. gün (p<0,000), 20. gün (p<0,000) ve 24. gün (p<0,000) ölçümlerinde istatistiksel (p<0,05) farklılık vardır. Grup 6 ile Grup 1 arasında 20. gün (p<0,002) ve 24. gün (p<0,002) ölçümlerinde, Grup 6 ile Grup 2 arasında 20. gün (p<0,006) ve 24. gün (p<0,025) ölçümlerinde, Grup 6 ile Grup 3 arasında 20. gün (p<0,008) ve 24. gün (p<0,002) ölçümlerinde, Grup 6 ile Grup 4 arasında 20. gün (p<0,006) ve 24. gün (p<0,025) ölçümlerinde, Grup 6 ile Grup 5 arasında 16. gün (p<0,023), 20. gün (p<0,000) ve 24. gün (p<0,000) ölçümlerinde istatistiksel (p<0,05) farklılık vardır.

Grup içi ölçümler karşılaştırıldığında; Grup 1’de 20. gün ile 4. gün ($p<0,011$), 8. gün ($p<0,001$) ve 12. gün ($p<0,000$) arasında, 24. gün ile 48. saat ($p<0,023$), 4. gün ($p<0,002$), 8. gün ($p<0,000$) ve 12. gün ($p<0,000$) arasında istatistiksel ($p<0,05$) farklılık vardır. Grup 2’de 20. gün ile 4. gün ($p<0,05$), 8. gün ($p<0,001$) ve 12. gün ($p<0,000$) arasında, 24. gün ile 4. gün ($p<0,001$), 8. gün ($p<0,000$), 12. gün ($p<0,000$) ve 16. gün ($p<0,033$) arasında istatistiksel ($p<0,05$) farklılık vardır. Grup 3’de 20. gün ile 4. gün ($p<0,019$), 8. gün ($p<0,003$), 12. gün ($p<0,001$) ve 16. gün ($p<0,028$) arasında, 24. gün ile 4. gün ($p<0,003$), 8. gün ($p<0,000$), 12. gün ($p<0,000$) ve 16. gün ($p<0,004$) arasında istatistiksel ($p<0,05$) farklılık vardır. Grup 4’te 20. gün ile 4. gün ($p<0,001$), 8. gün ($p<0,001$) ve 12. gün ($p<0,009$) arasında, 24. gün ile 48. saat ($p<0,033$), 4. gün ($p<0,000$), 8. gün ($p<0,000$), 12. gün ($p<0,003$) ve 16. gün ($p<0,047$) arasında istatistiksel ($p<0,05$) farklılık vardır. Grup 5’de 20. gün ile 48. saat ($p<0,004$), 4. gün ($p<0,001$), 8. gün ($p<0,003$) ve 12. gün ($p<0,011$) arasında, 24. gün ile 48. saat ($p<0,001$), 4. gün ($p<0,000$), 8. gün ($p<0,000$) ve 12. gün ($p<0,011$) arasında istatistiksel ($p<0,05$) farklılık vardır. Grup 6’da 12. gün ($p<0,005$) ile 48. saat arasında istatistiksel ($p<0,05$) farklılık vardır. Grup 7’de grup içi ölçümler arasında istatistiksel ($p>0,05$) farklılık yoktur (Tablo 4).

Neovaskülarizasyon ve hipopion çok az birkaç hayvanda görüldü için istatistiksel analiz yapılmadı. Veriler önemli olmadığı için bulgulara girilmedi.

Tablo 5. Tedavi öncesi ve tedavi sonrası gözde üreyen *C. albicans* miktarı.

Gruplar	Tedavi öncesi 48. saat üreyen maya miktarı (CFU/ml) ($\bar{x} \pm s$)	Tedavi sonrası 24. gün üreyen maya miktarı (CFU/ml) ($\bar{x} \pm s$)
Grup 1	6288306,76 $\pm$ 10328053,02a	28044,72 $\pm$ 65932,37a*
Grup 2	6288306,76 $\pm$ 10328053,02a	67178,55 $\pm$ 113716,07a*
Grup 3	6288306,76 $\pm$ 10328053,02a	31101,83 $\pm$ 82930,96a*
Grup 4	6288306,76 $\pm$ 10328053,02a	59471,68 $\pm$ 94132,90a*
Grup 5	6288306,76 $\pm$ 10328053,02a	14168,09 $\pm$ 24914,97a*
Grup 6	6288306,76 $\pm$ 10328053,02a	4568366,95 $\pm$ 8403236,35b
Grup 7	0,0 $\pm$ 0,0a	0,0 $\pm$ 0,0a

Gruplar; Grup 1. (n=5 tavşan, 10 gözü/grup) *C.albicans* ile keratit oluşturulan ve topikal olarak % 3’lük fluconazole damla ve ozonlanmış zeytinyağı damlası uygulanan tavşan grubu (FLU+OZY grubu); **Grup 2. (n=5 tavşan, 10 gözü/grup)** *C. albicans* ile keratit oluşturulan ve topikal olarak % 3’lük fluconazole damla uygulanan tavşan grubu (FLU grubu); **Grup 3. (n=5 tavşan, 10 gözü/grup)** *C. albicans* ile keratit oluşturulan ve distile su ile dilüe edilmiş ozonlanmış zeytinyağı damlası uygulanan tavşan grubu (OZY grubu); **Grup 4. (n=5 tavşan, 10 gözü/grup)** *C. albicans* ile keratit oluşturulan ve topikal olarak % 3’lük fluconazole damla ve 35µg/ml ozon içeren distile su damlası uygulanan tavşan grubu (FLU+ODS grubu); **Grup 5. (n=5 tavşan, 10 gözü/grup)** *C. albicans* ile keratit oluşturulan ve topikal olarak 22µg/ml ozon içeren distile su damlası uygulanan tavşan grubu (ODS grubu); **Grup 6. (n=12 tavşan, 24 gözü/grup)** *C. albicans* ile keratit oluşturulan ve fosfatla tamponlanmış tuzlu su damla

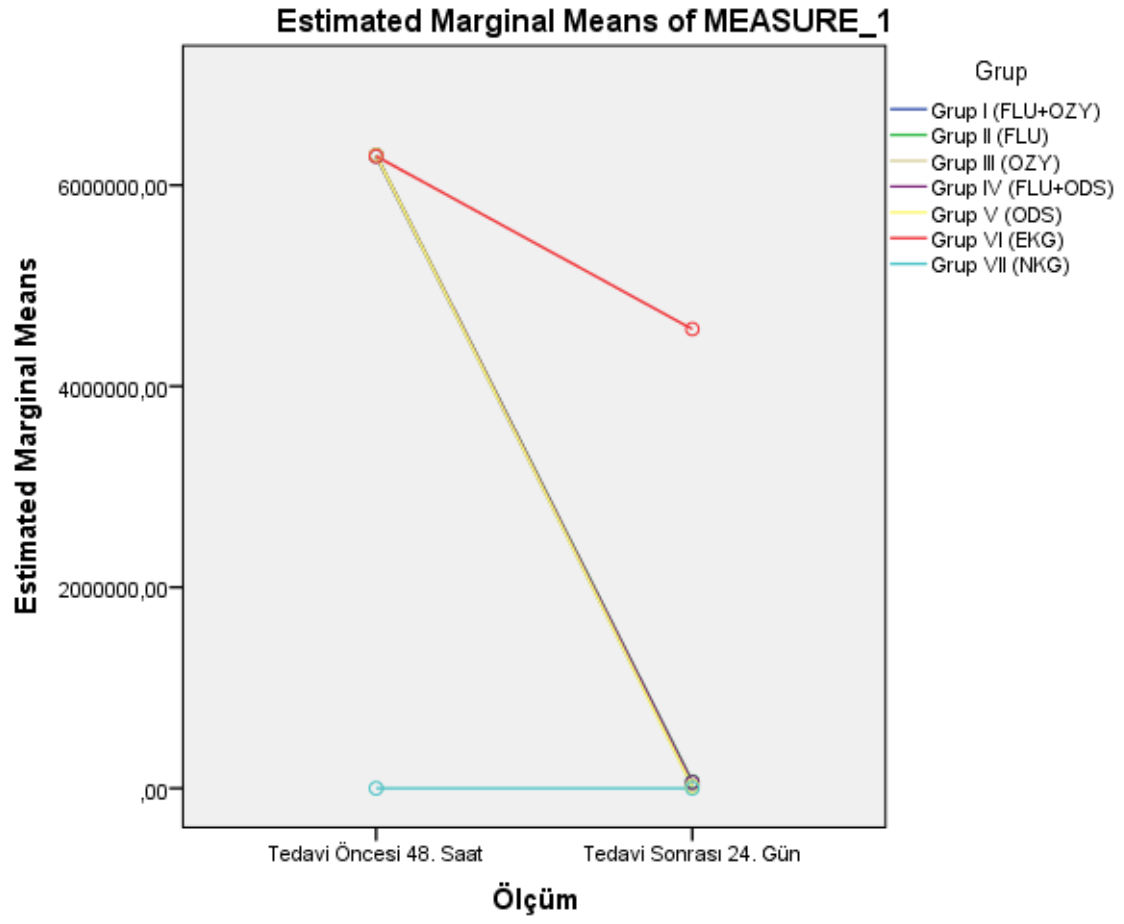
(PBS) damla uygulanan tavşan grubu.(Enfekte kontrol grubu); **Grup 7. (n=5 tavşan, 10 gözü/grup)** steril PBS inokülasyonundan 24 saat sonra steril PBS damla uygulanan tavşan grubu (Negatif kontrol grubu). *: aynı sıradaki çalışma grubuyla kontrol grubu arasında istatistiksel farkı göstermektedir:(*: $p<0,05$). Grup içi ölçümler arası karşılaştırmada; farklı küçük harf(a-c) içeren sütunlar arasında fark vardır : ($p<0,05$).

Gruplar arası 48. saat üreyen maya miktarlarında karşılaştırıldığında herhangi bir istatistiksel ($p>0,05$) farklılık yoktur.

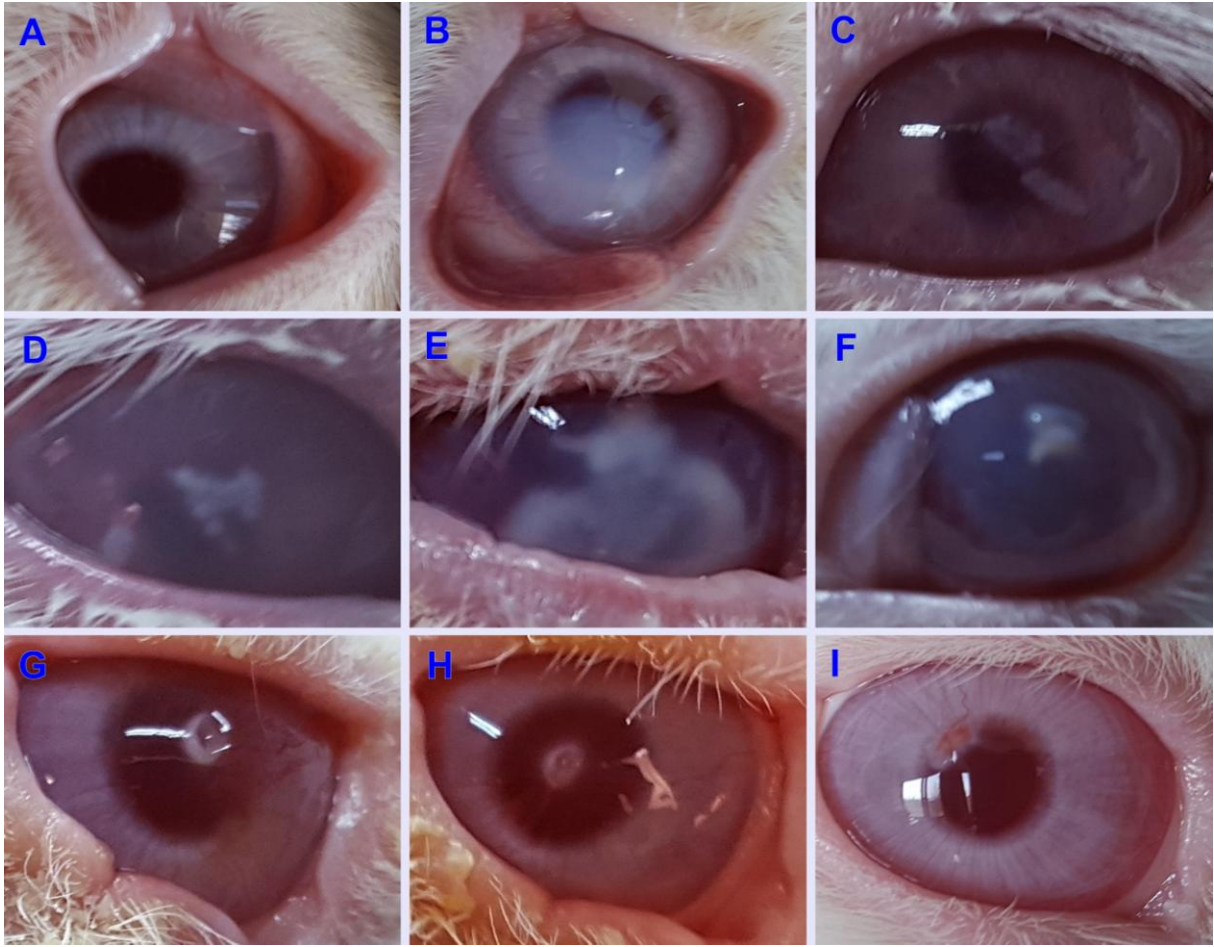
Gruplar arası 24. gün üreyen maya miktarlarında karşılaştırıldığında: Grup 6 ile Grup 1 ($p<0,046$), Grup 2 ($p<0,050$), Grup 3 ($p<0,046$), Grup 4 ($p<0,049$), Grup 5 ($p<0,044$) ve Grup 7 ($p<0,043$) üreyen maya miktarlarında istatistiksel ($p<0,05$) farklılık vardır.

Grup içi üreyen maya miktarlarında karşılaştırıldığında; Grup 1’de 48. saat ve 24. gün arasında istatistiksel ($p<0,030$) farklılık vardır. Grup 2’de 48. saat ve 24. gün arasında istatistiksel ($p<0,030$) farklılık vardır. Grup 3’de 48. saat ve 24. gün arasında istatistiksel farklılık ($p<0,029$) vardır. Grup 4’te 48. saat ve 24. gün arasında istatistiksel ($p<0,030$) farklılık vardır. Grup 5’de 48. saat ve 24. gün arasında istatistiksel ($p<0,029$) farklılık vardır. Grup 6’da ve Grup 7’de 48. saat ve 24. gün arasında istatistiksel ($p>0,05$) farklılık yoktur (Tablo 5).

Resim 1. Tedavi öncesi ve tedavi sonrası gözde üreyen *C. albicans* miktarı.

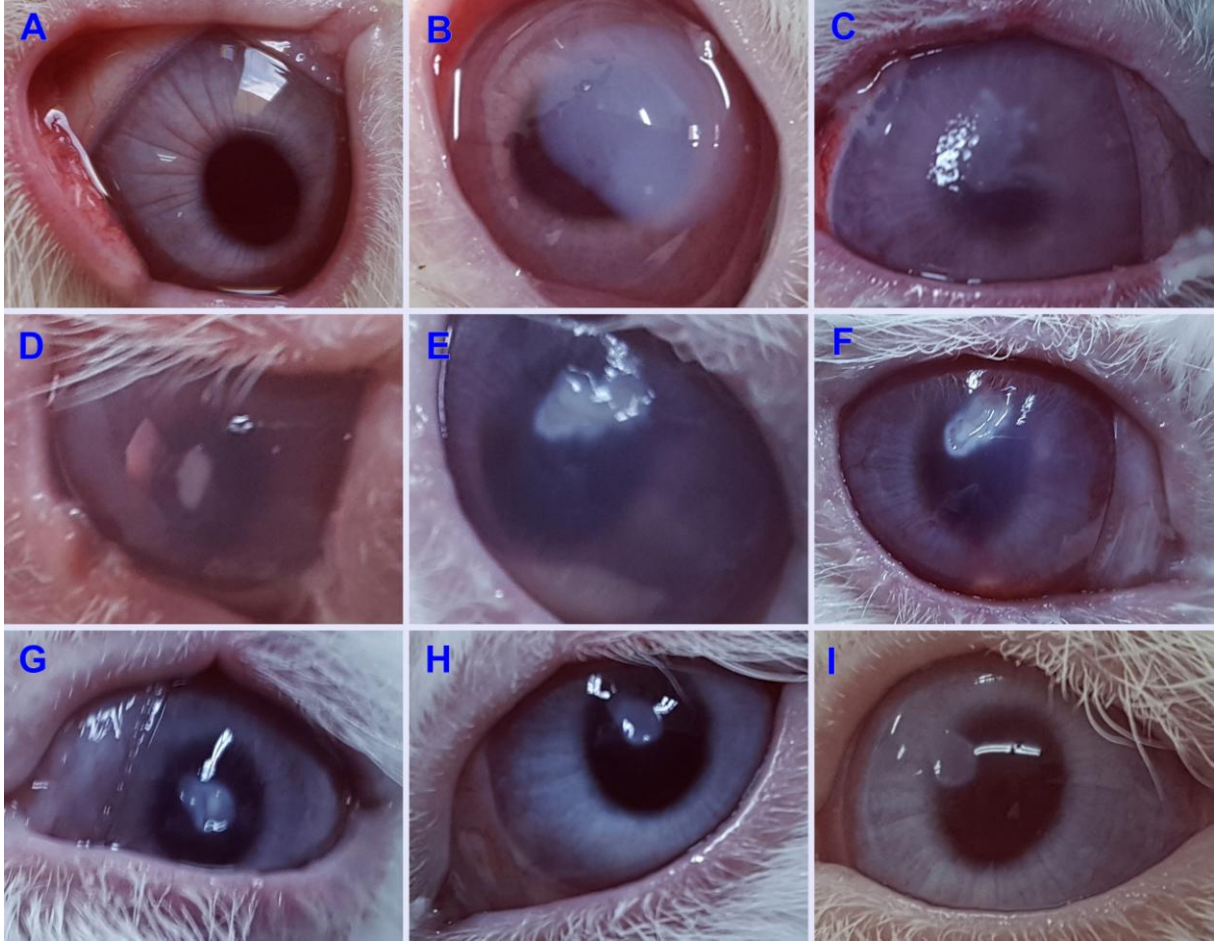


Resim 2. Grup 1’de (FLU+OZY grubu) tedavi öncesi ve sonrası fotoğraflar.



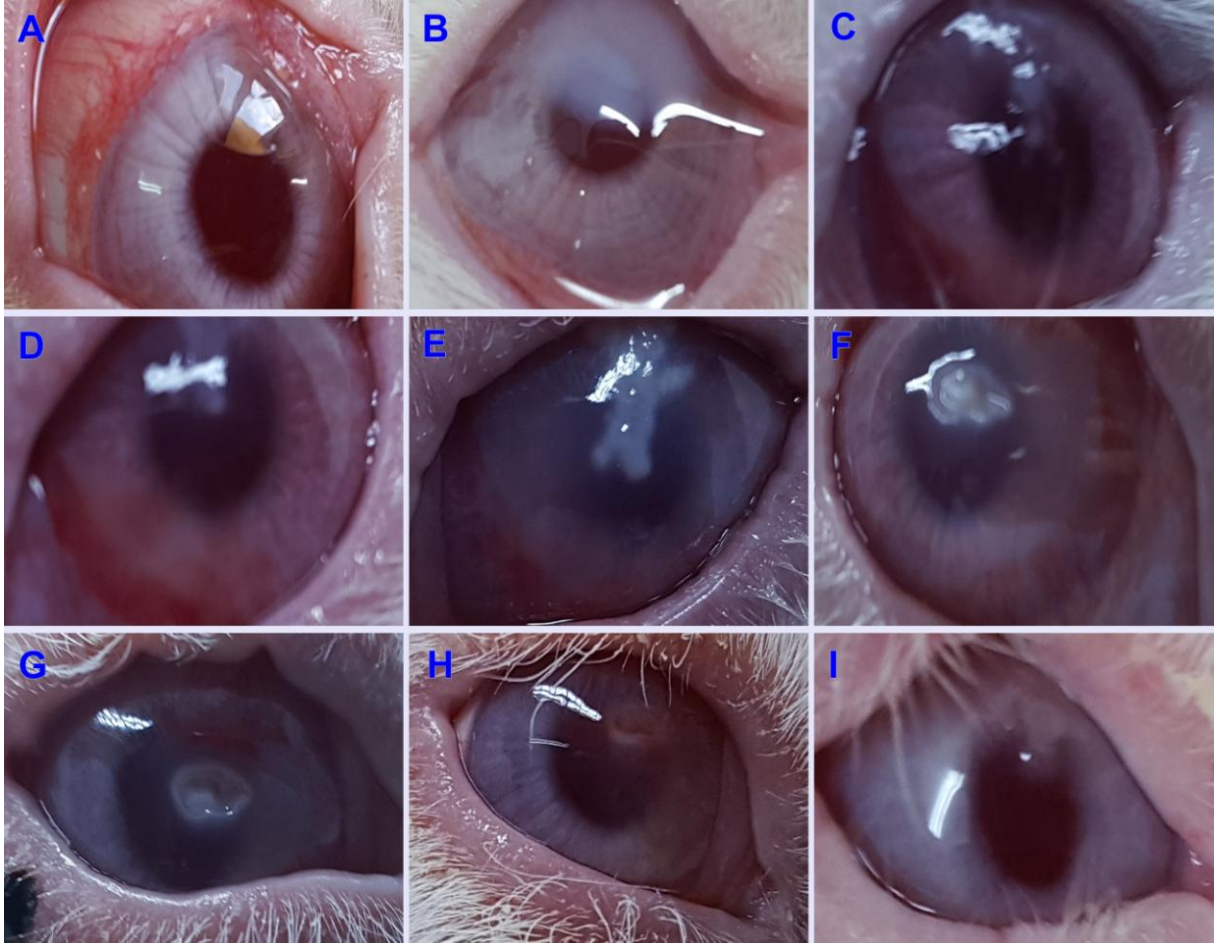
A: 0. saat *C. albicans* suşu uygulama öncesi ; **B:** 0. saat *C. albicans* suşu uygulama sonrası; **C:** 48. saat *C. albicans* suşu uygulandıktan sonra ve tedavi öncesi; **D:** tedavi sonrası 4. gün; **E:** tedavi sonrası 8. gün; **F:** tedavi sonrası 12. gün; **G:** tedavi sonrası 16. gün; **H:** tedavi sonrası 20. gün; **I:** tedavi sonrası 24. gün.

Resim 3. Grup 2’de (FLU grubu) tedavi öncesi ve sonrası fotoğraflar.



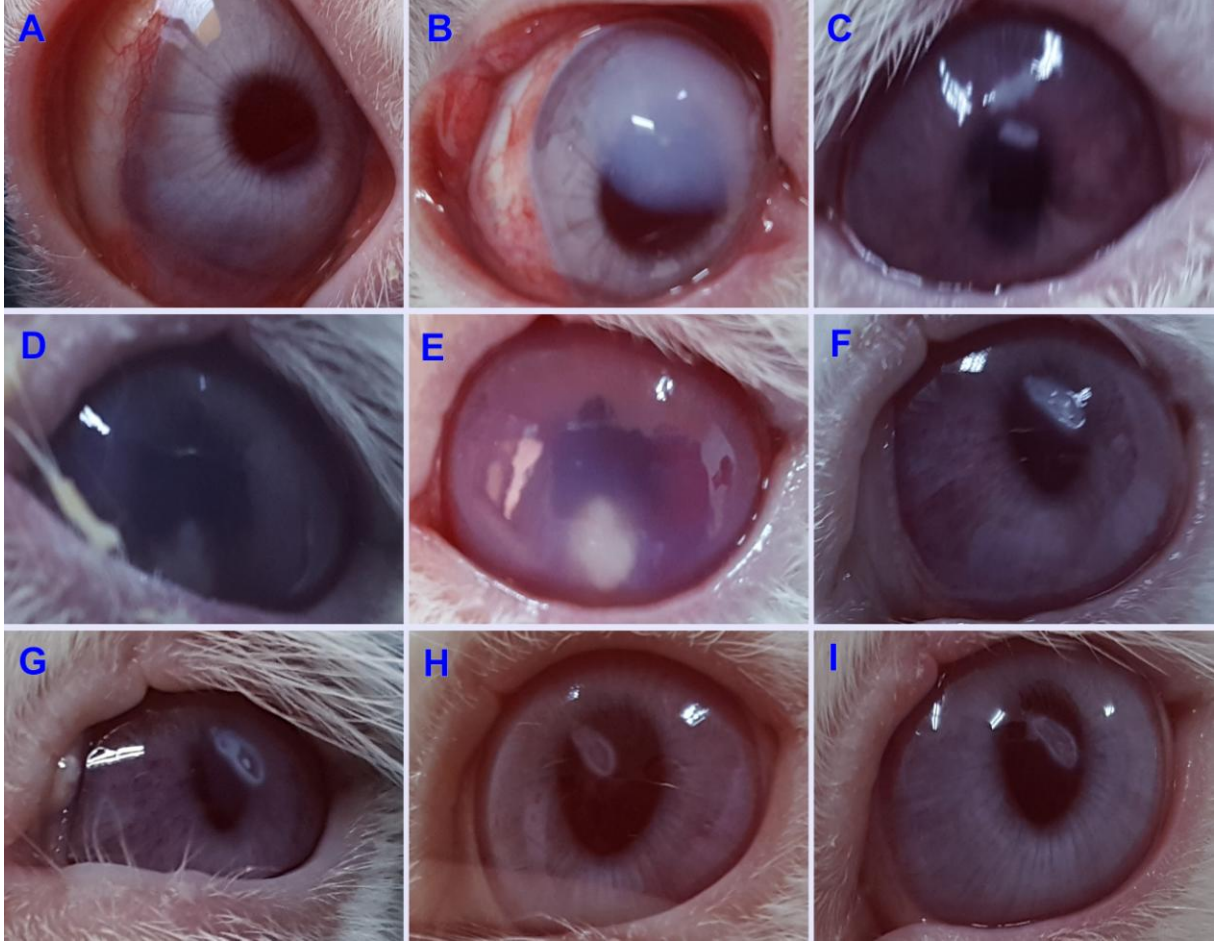
A: 0. saat *C. albicans* suşu uygulama öncesi ; **B:** 0. saat *C. albicans* suşu uygulama sonrası; **C:** 48. saat *C. albicans* suşu uygulandıktan sonra ve tedavi öncesi; **D:** tedavi sonrası 4. gün; **E:** tedavi sonrası 8. gün; **F:** tedavi sonrası 12. gün; **G:** tedavi sonrası 16. gün; **H:** tedavi sonrası 20. gün; **I:** tedavi sonrası 24. gün.

Resim 4. Grup 3'te (OZY grubu) tedavi öncesi ve sonrası fotoğraflar.



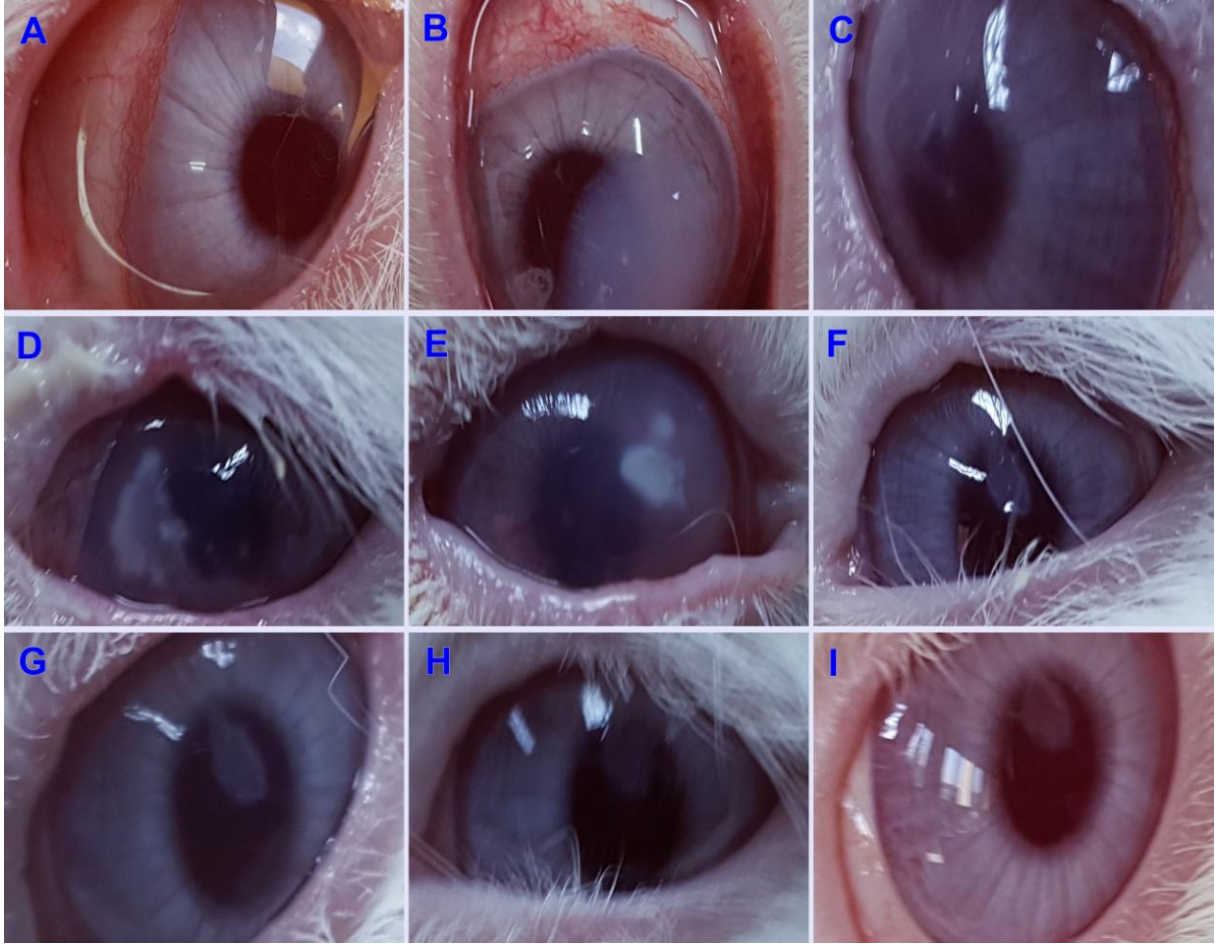
A: 0. saat *C. albicans* suşu uygulama öncesi ; **B:** 0. saat *C. albicans* suşu uygulama sonrası; **C:** 48. saat *C. albicans* suşu uygulandıktan sonra ve tedavi öncesi; **D:** tedavi sonrası 4. gün; **E:** tedavi sonrası 8. gün; **F:** tedavi sonrası 12. gün; **G:** tedavi sonrası 16. gün; **H:** tedavi sonrası 20. gün; **I:** tedavi sonrası 24. gün.

Resim 5. Grup 4'te (FLU+ODS grubu) tedavi öncesi ve sonrası fotoğraflar.



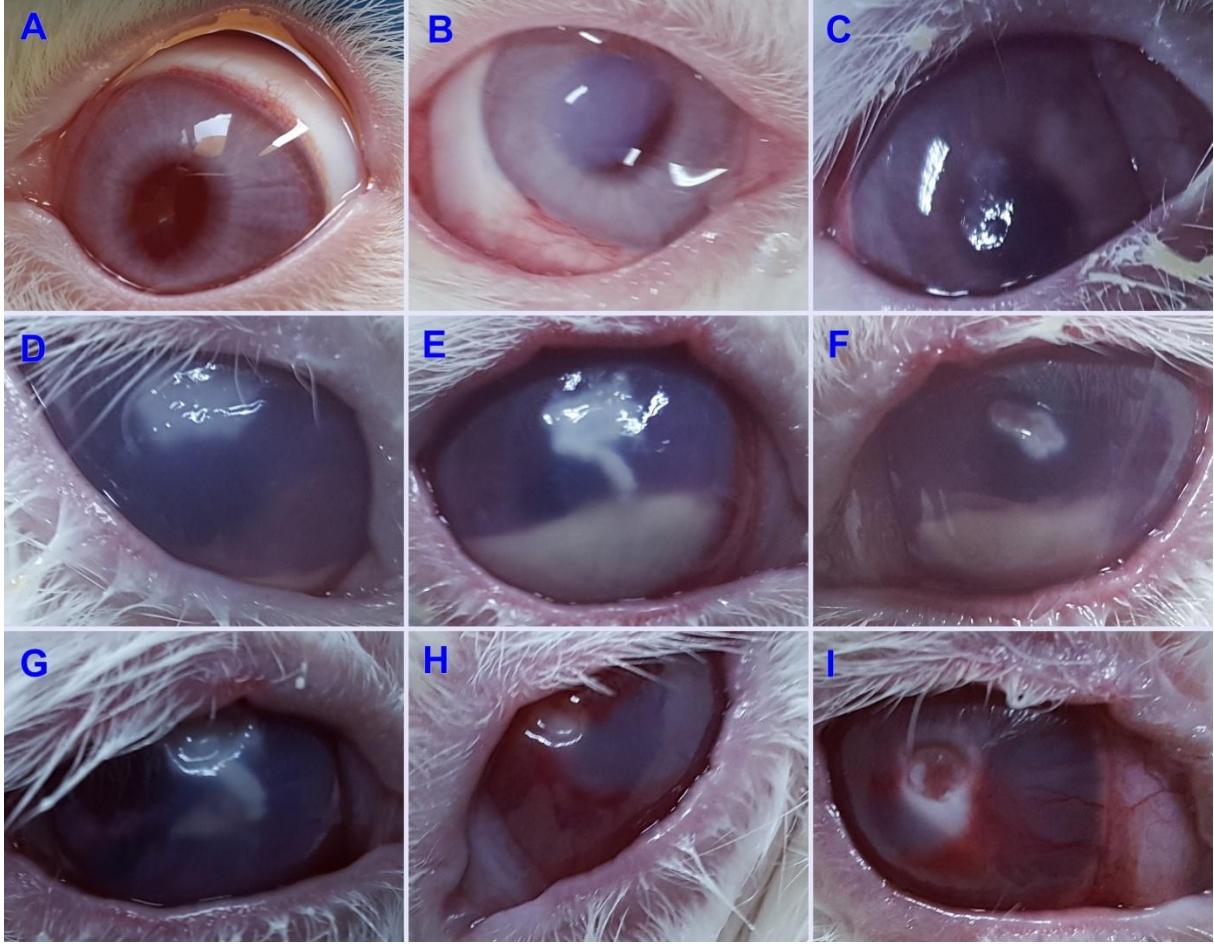
A: 0. saat *C. albicans* suşu uygulama öncesi ; **B:** 0. saat *C. albicans* suşu uygulama sonrası; **C:** 48. saat *C. albicans* suşu uygulandıktan sonra ve tedavi öncesi; **D:** tedavi sonrası 4. gün; **E:** tedavi sonrası 8. gün; **F:** tedavi sonrası 12. gün; **G:** tedavi sonrası 16. gün; **H:** tedavi sonrası 20. gün; **I:** tedavi sonrası 24. gün.

Resim 6. Grup 5’te (ODS grubu) tedavi öncesi ve sonrası fotoğraflar.



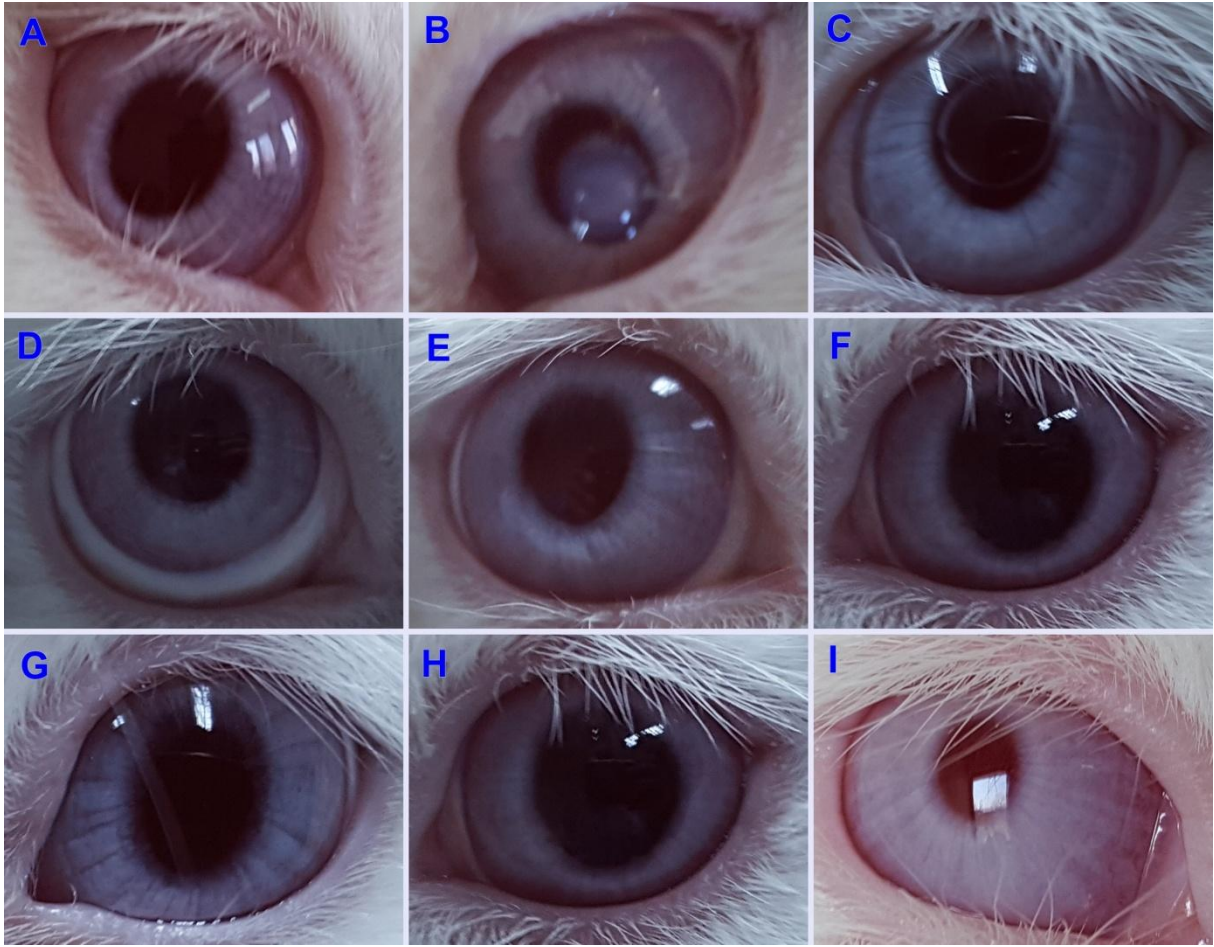
A: 0. saat *C. albicans* suşu uygulama öncesi ; **B:** 0. saat *C. albicans* suşu uygulama sonrası; **C:** 48. saat *C. albicans* suşu uygulandıktan sonra ve tedavi öncesi; **D:** tedavi sonrası 4. gün; **E:** tedavi sonrası 8. gün; **F:** tedavi sonrası 12. gün; **G:** tedavi sonrası 16. gün; **H:** tedavi sonrası 20. gün; **I:** tedavi sonrası 24. gün.

Resim 7. Grup 6’da (Enfekte kontrol grubu) tedavi öncesi ve sonrası fotoğraflar.



A: 0. saat *C. albicans* suşu uygulama öncesi ; **B:** 0. saat *C. albicans* suşu uygulama sonrası; **C:** 48. saat *C. albicans* suşu uygulandıktan sonra ve tedavi öncesi; **D:** tedavi sonrası 4. gün; **E:** tedavi sonrası 8. gün; **F:** tedavi sonrası 12. gün; **G:** tedavi sonrası 16. gün; **H:** tedavi sonrası 20. gün; **I:** tedavi sonrası 24. gün.

Resim 8. Grup 7’de .(Negatif kontrol grubu) tedavi öncesi ve sonrası fotoğraflar.



A: 0. saat PBS uygulama öncesi ; **B:** 0. saat PBS uygulama sonrası; **C:** 48. saat PBS damla uygulama öncesi; **D:** PBS damla uygulama sonrası 4. gün; **E:** PBS damla uygulama sonrası 8. gün; **F:** PBS damla uygulama sonrası 12. gün; **G:** PBS damla uygulama sonrası 16. gün; **H:** PBS damla uygulama sonrası 20. gün; **I:** PBS damla uygulama sonrası 24. gün.

4.3. Histopatolojik Bulgular

Alınan gözlerden hazırlanan hematoxilen–eozin (HE) ile boyalı preparatlarda oküler dokular farklı büyütme ile incelendi. Candida uygulanan gözlerde korneada hücresel düzeyde değişiklikler tespit edildi.

4.3.1. Negatif Kontrol Grubunda Histopatolojik Bulgular

Işık mikroskopik incelemesinde korneanın beş kattan oluştuğu gözlemlendi. Çok katlı skuamöz nonkeratinize tabakada bazal kolumnar hücreler, ara poligon hücreler ve yüzeysel skuamöz hücreler mevcuttu Korneal epitel altında (Bowman'ın tabakası) duruyordu. Sekonder propria düzenli aralıklarla düzenlenmiş kollajen liflerden ve dağılmış iğ şekilli stromal hücrelerden

oluşmuştu.. Descemet membranı stromanın hemen altında mevcuttu ve Descemet'in endoteli tarafından örtülmüştü.

Kontrol grubunda normal korneal morfoloji gözlemlendi. Bu grupta stromanın lamellar yapısı düzenlidir. Korneal epitel hücrelerin büyüklüğünde ve seklinde herhangi bir değişiklik mevcut değildir. Keratositler düzgün bir şekilde sıralanmıştır. Keratin mevcut değildir (Resim 10A).

4.3.2. Enfekte Kontrol Grubunda Histopatolojik Bulgular

Enfekte grupta stromada oldukça yoğun nötrofil lökosit ve histiosit infiltrasyonu dikkati çekti. Stromal ödem ile birlikte stromal kalınlığın belirgin şekilde arttığı gözlemlendi. Epitel tabakası tek katlı en fazla 3 sıralı hücrelerden ibaret olup şiddetli keratin mevcuttu. Özellikle anterior stromaya yakın kollagen tabakası nı oluşturan hücrele düzensiz yapıdaydı. Fungal keratitli kornea materyalinde ağırlıklı olarak gözlenen inflamatuvar hücreler, polimorfonükleer lökositler değişen derecelerde de lenfosit ve plazma hücreler de mevcuttu Stromada koagülasyon nekrozu belirgindi. Filamentöz mantarlar, derinde stroma lamelleri arasında gözlemlendi (Resim 9, 10).

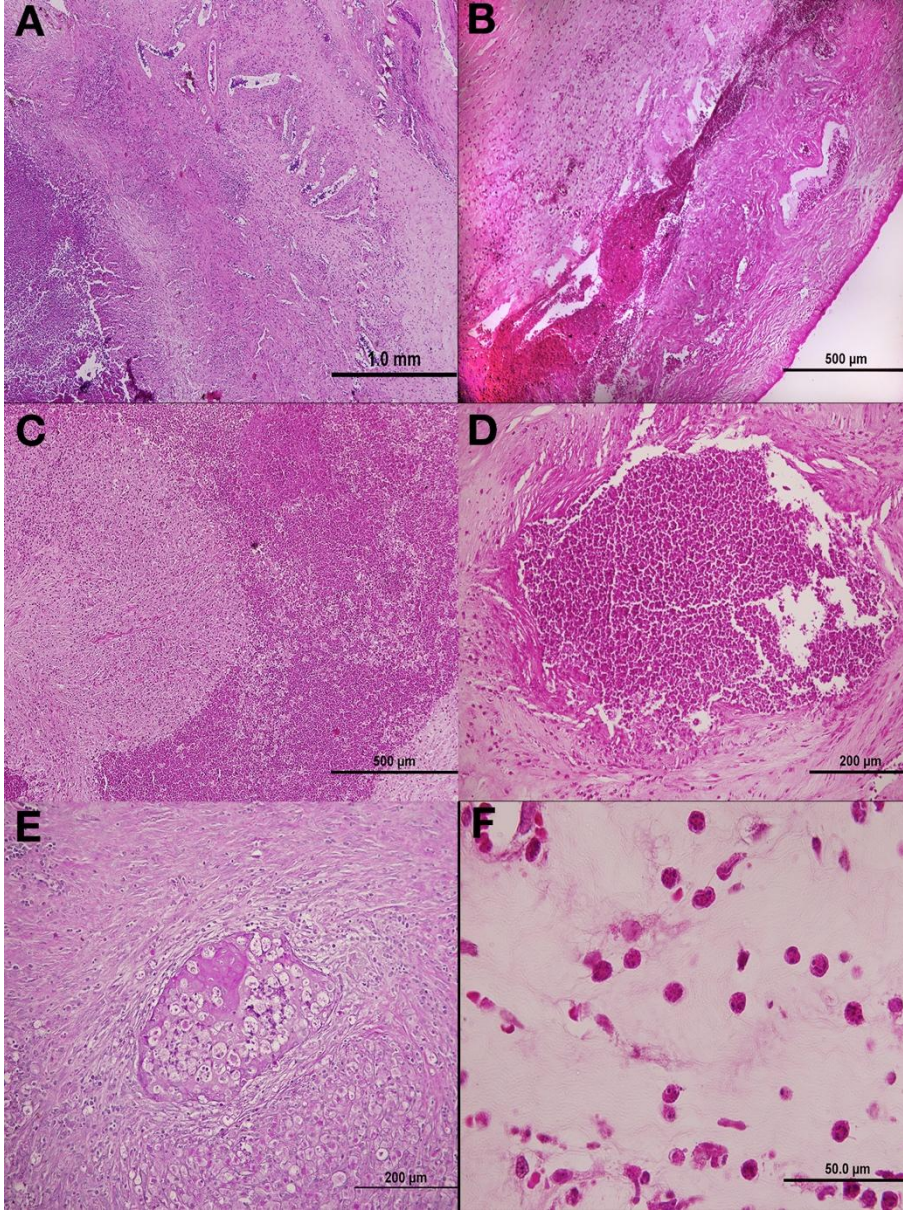
4.3.3. Tedavi Gruplarında Histopatolojik Bulgular

Tedavi gruplarında (Grup 1-5) korneal keratin miktarı oldukça azdı. Bu gruplardan grup 1, 3 ve 5 hücre infiltrasyonu diğer tedavi gruplarına oranla hemen tamamen ortadan kalkmıştı. Grup 2 ve 4 te kontrol grubuna oranla stromal hücre infiltrasyonu belirgindi. Özellikle sadece flukanozole uygulanan grupta korneal stromada hücre infiltrasyonu ve ödem, diğer tedavi gruplarına göre daha şiddetliydi. Tedavi gruplarından arasında grup 1 ve grup 5 diğerleriyle kıyaslandığında korneal stromada hücresel infiltrasyon önemli oranda azalmıştı. Bu gruplar kontrol grubuna oldukça benziyordu (Resim 11, 12).

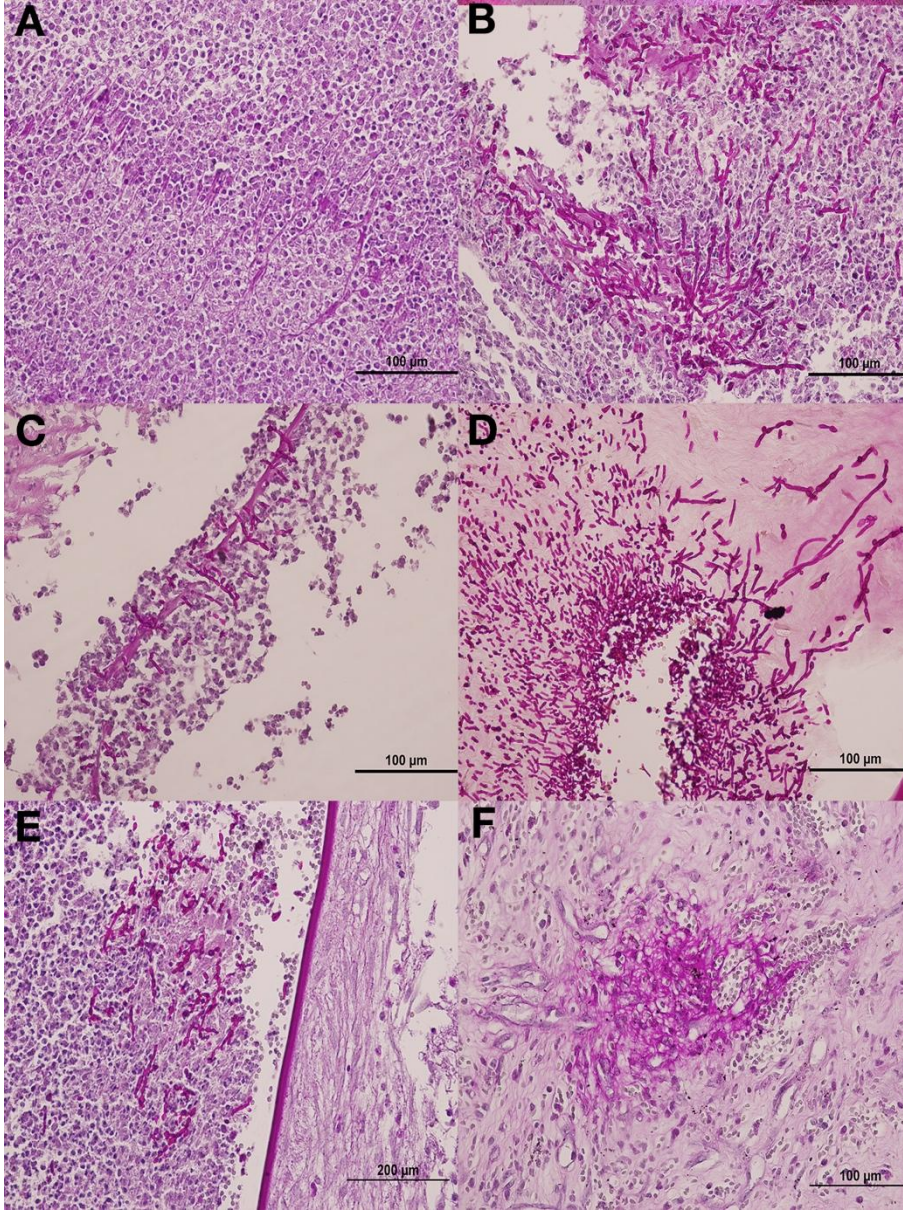
4.4. Sitolojik Bulgular

Korneal epitel hücrelerin morfolojik görünimleri değerlendirildi. Sitolojik örneklerde yeterli hücresellik mevcuttu. Okuler yüzeyin sitolojik incelemesinde kontrol ve tedavi grubundaki tavşanların gözlerinde konjunktivanın normal kolumnar epitel hücreleri, yuvarlak küçük hücreleri, korneanı kornifiye olmayan skuamöz epiteli gözlendi. Bu hücreler eozinofilik sitoplazmalı sekil ve büyüklük bakımından benzerdi (Resim 13A, D, H, I).

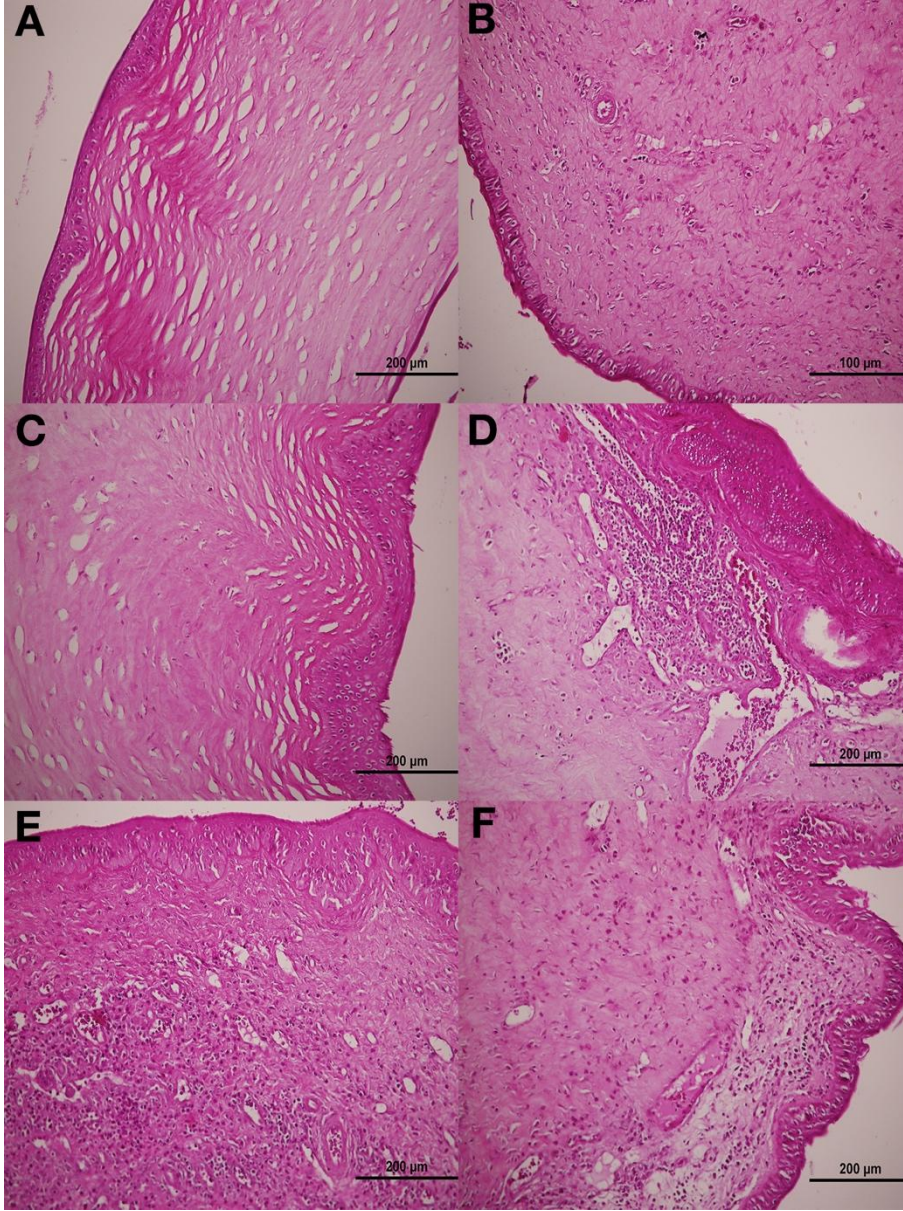
Enfekte gruptaki tavşanlarda yoğun polimorfonükleer nötrofiller, lenfosit ve makrojalarla dikkati çeken konjunktivitis ve keratitis gözlendi. Özellikle korneal ülserli vakalarda epitel hücrelerinde displazik değişiklikler mevcuttu. Bazı vakalarda bol sitoplazmalı piknotik çekirdekli, çekirdek/sitoplazma oranının oldukça azaldığı hücrelerle karakterize skuamöz metaplazisi de dikkati çekti. Fungal keratitli kornea materyalinde ağırlıklı olarak gözlenen inflamatuvar hücreler, polimorfonükleer lökositlerdi, değişen derecelerde lenfosit ve plazma hücreleridir (Resim 13B, C, E, F, G).



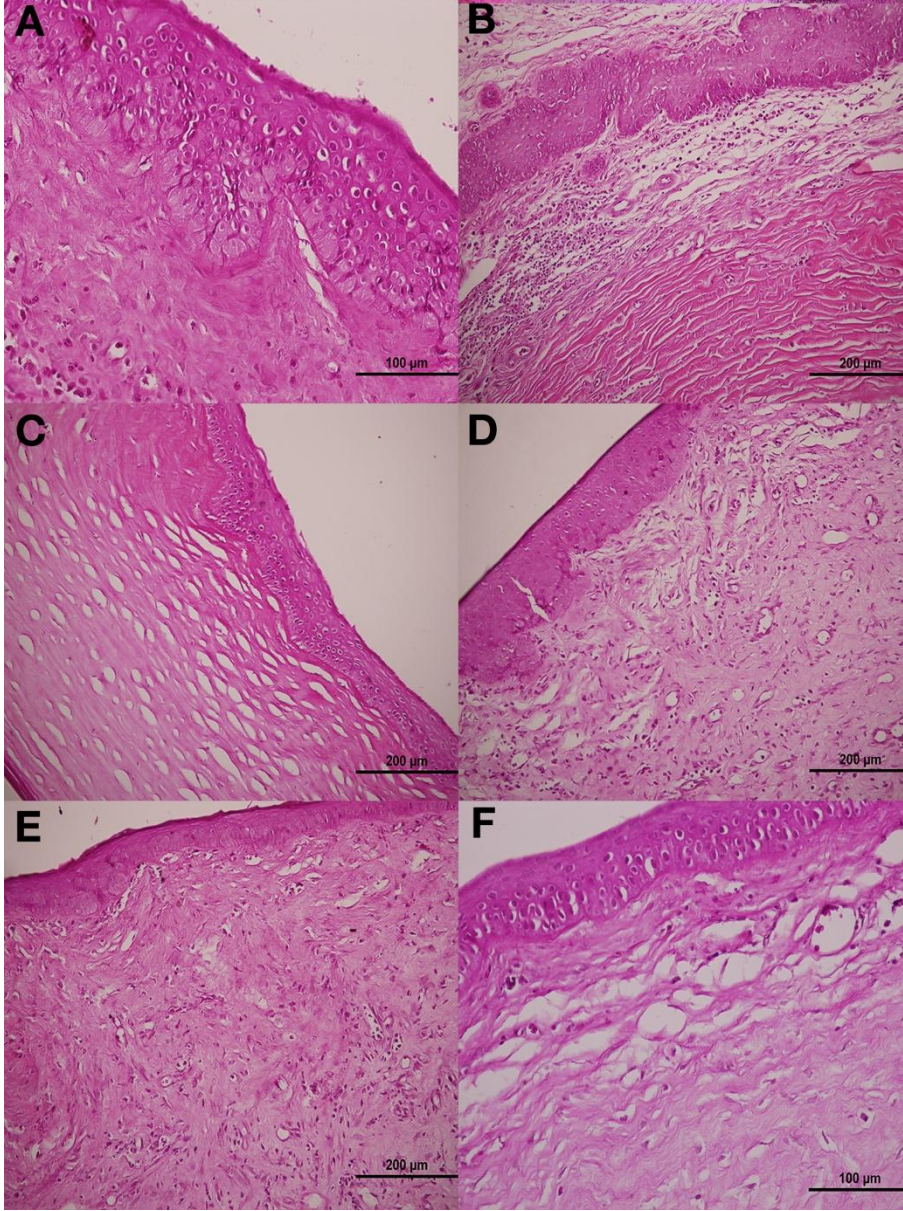
Resim 9. Enfekte grubun (Grup 6) Hematoxylin–eosin ile boyanmış preperatları. Keratokonjunktivitis, diffuz, şiddetli, akut, nötrofilik (suppurative) ve fokal korneal ülser, göze çarpıcı periferik korneal vaskularizasyon ve bu alanlarda *Candida* benzeri mantar etkenleri. (A) Stromanın tamamında yoğun neovasküler damarlar, korneal yapıların ortadan kalkmış (B) Superfisiyal stroma da yangısal hücre infiltrasyonu ülser ve kanama. (C-D) Derin stromada dejeneratif alanlar yanında purulent apse ve stromal nekroz. Bar: (1mm) A, 500µm (B, C), 200µm (D, E), 50µm (F).



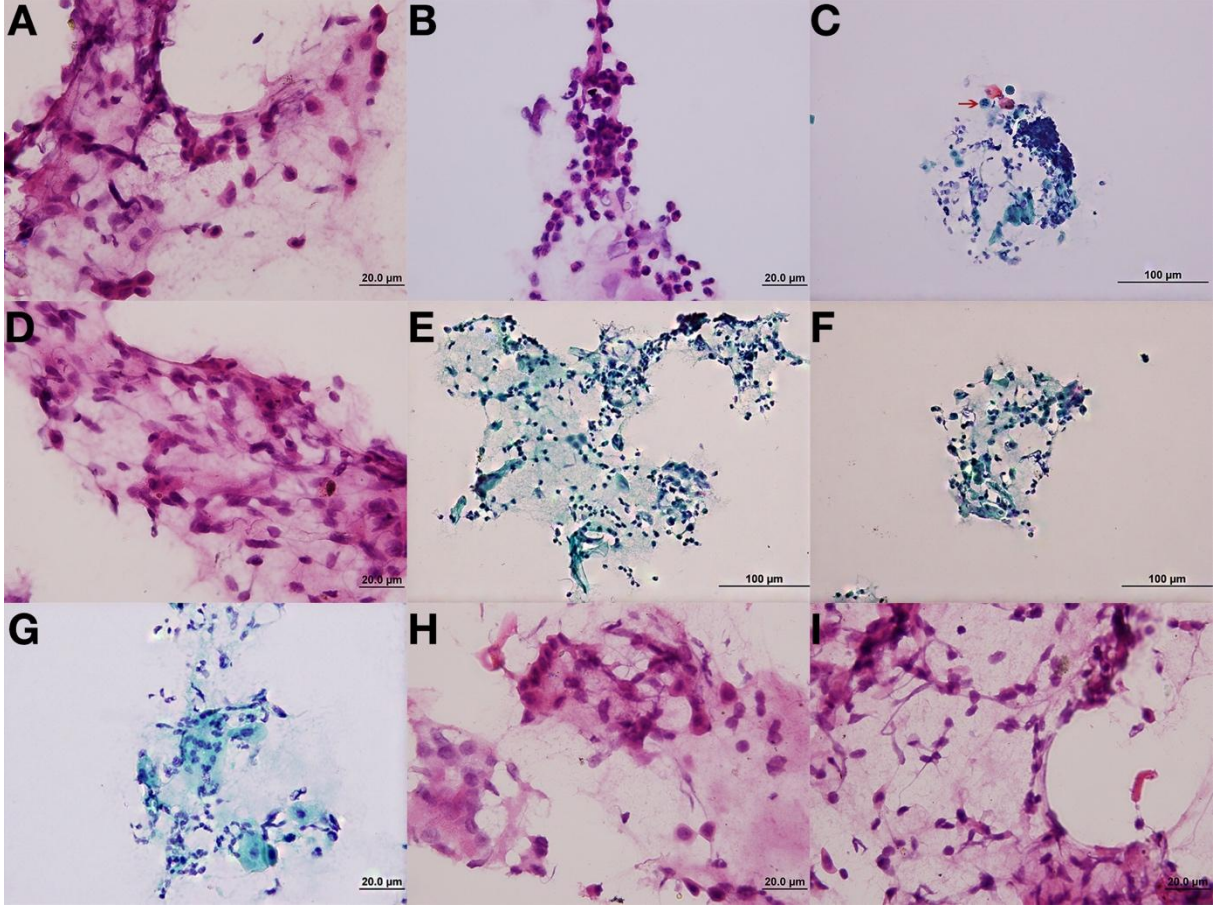
Resim 10. Enfekte grubun (Grup 6) Pas (Periodic acid Schiff) le boyanmış preparatları. (A-D) Fungal hifa and spor benzeri konidia stromal yoğun dejenere nötrofil lökosit ve histiosit infiltrasyonu ile birlikte. (E, F) derin stomatitiste hifa invazyonu. Descemet's membrane ve ön kamaraya invaze olmuş mantar hifa ve sporları. Bar: 100µm (A-D, F), 200µm (E).



Resim 11. Tedavi grubunun (Grup 1-2) Hematoxylin–eosin ile boyanmış preperatları (A) Kontrol göz, normal tavşan kornea. (B, C) Normal korneal yapı, kombinetedavi grubu, Grup1(Fluconazole ve ozonlanmış zeytinyağı uygulanan grup) (3D). Süperfisiyal stromada hücre infiltrasyonu, neovaskülarizasyon, epitelde hiperplazi Grup 2. (Fluconazole uygulanan grup. (E, F) Stromada hafif hücre infiltrasyonu, neovaskülarizasyon, Grup 2 (Fluconazole uygulanan grup) Bar: 100µm (B), 200µm (A, C, D-F).



Resim 12. Tedavi gruplarının (Grup 3-5) Hematoxylin–eosin ile boyanmış preperatları (A) Epitel hiperplazik stromal ödem, ozonlanmış zeytinyağı uygulanan (Grup 3). (B) Süperfisiyal stromada çok hafif hücre infiltrasyonu, epitelde hiperplazi Grup 4. (Fluconazole ve ozonlanmış distile su uygulanan kombine grup.) (C-F) Stromada hafif neovaskülerizasyon, Grup 5 (Ozonlanmış distile su uygulanan grup). Bar: 100µm (B), 200µm (A, C, D-F).



Resim 13. Oküler yüzeyin sitospin tekniğiyle hazırlanan Hematoxylin–eosin (A, B, D, H) ve Papanicolaou (C, E, F, G) ile boyanmış preparatları. (A) Kontrol göz, normal tavşan kornea. (B, C) Keratokonjunktivitis ve kornea ülserini gösteren yoğun nötrofil lökositler ile skuamöz epitel hücreler. Dejeneratif nötrofil lökositler ve mantar hücreleri (ok). Reaktif korneal epitel hücreleri, Konjunktival epitel hücrelerini de içeren çok sayıda mononükleer hücreleri (makrofaj, lenfosit, plazma hücresi) gösteren fırça örneği. (E, F, G) Tedavi gruplarından Grup 2 ve 4’te hiperkromazi ve nükleer pleomorfizm gösteren, sitoplazmaları belirgin ve nükleo-sitoplazma oranı artmış olan displazik hücreler. (D, H, I) Tedavi gruplarından Grup 1, 3 ve 5’te kontrol grubuna benzer hücre popülasyonu. Normal korneal, konjunktival hücreler. Az sayıda yangısal hücreler. Bar: 100µm (E,F), 20µm (A, B, D, G, H, I).

TARTIŞMA VE SONUÇ

Fungal keratitlerin medikal tedavisiyle ilgili birçok çalışma vardır. Ancak bunların çoğu kontrollü çalışmalar olmaktan çok, küçük olgu serilerinin sonuçlarının bildirildiği çalışmalardır. Aynı tedavi bazılarınca başarılı olarak bildirilirken, bazılarınca başarısız olmuş ve penetran keratoplasti uygulaması gerekmiştir. Fungal keratit tedavisinin başarısı spesifik antifungal tedavinin erken başlanması ve kullanılan ajanın kornea epitelini penetre etme özelliği ile yakından ilişkilidir. Mevcut antifungal ajanların çoğunun fungistatik olması, ilaç direnci gelişmesi, ideal ilaç kombinasyonları hakkında yeterli bilgiye sahip olunmaması, tedaviyi sınırlayan faktörlerdir (Altan, 2010; Thomas, 2003; Thomas, 2007).

Korneal enfeksiyonlar, görme sisteminde ciddi ve kalıcı hasarlara neden olabilirler. Mevcut görme düzeyini korumak için gerekli ilaç tedavisi ya da uygun cerrahi tedavi yapılmayan durumlarda körlüğün önemli bir nedeni olmaya devam etmektedir. Günümüzde, farklı tipte kornea enfeksiyonlarının yeterli olarak tedavisine olanak sağlayan çeşitli grup antibiyotikler mevcuttur. Ancak antibiyotiklere karşı artan direnç, göz sağlığını korumak için yeni tedavi yöntemlerine ihtiyaç duymaktadır (Bulam Kılıç, 2014)

Enfeksiyöz keratitlerin tedavisinde, antimikrobiyal ilaçların etkinliği kanıtlanmış olmasına rağmen, bu ilaçlara karşı artan mikroorganizma direnci nedeniyle yeni tedavi yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Özellikle hastalık durumunda gözün ön bölgesinde vaskülarizasyon ve hızlı sikatrizasyon gerekli yapıların varlığının yanı sıra antibakteriyel ve antiviral etki de gereklidir (Vigna and Mendenez-Cepero 2007). Bu patolojiler geleneksel tedaviler ile tedavi edilecek olursa zor ve uzun bir zaman alabileceği için teorik olarak, bu durumda, ozon tedavi dikkate alınabilir. Ozon kayda değer bir mikrop öldürücü etkiye sahiptir. Ozonun virüs, bakteri ve mantarlara karşı antimikrobiyal etkileri, in vitro ve in vivo olarak kanıtlanmıştır. Enfeksiyöz keratitlerin tedavisinde ozon kullanımıyla ilgili sınırlı sayıda literatür bilgisi mevcuttur. Göz alanında ozon tedavisi tatmin edici kullanımı tarif edilmiştir. İnsanlarda ve veteriner göz ön segment lokalize yapılarda değişikliklerin tedavisi (özellikle herpetik keratit olarak), için, subkonjunktival ozon uygulaması ve ozonun rektal ile birlikte ozonlu ayçiçeği yağı (OLEOZON®) göz damlası kullanımı, Insuflasyon, bağışıklık sistemini güçlendirme etkisi sayesinde etki ettiği bilinmektedir (Gierek-Lapinska ve ark., 1993; Ferrer ve ark., 1996; Diadori ve ark., 1996; Pina ve ark., 1997; Lezciano ve ark., 1998; Diadori ve ark., 1999; Kashiwagi ve ark., 2001; Copello ve ark., 2003; Vigna ve Mendenez-Cepero, 2007).

Gözde ozon terapi Küba başta olmak üzere incelenmiştir. Ozon tedavisi ile retinit pigmentosa, glokom, yaşa bağlı dejeneratif retina makula dejenerasyonu, keratoconjunctivitis ve kornea ülserini insan tıbbında belirli bir şekilde tedavi ettiği bildirilmiştir (Gierek-Lapinska ve ark., 1993; Ferrer ve ark., 1996; Diadori ve ark., 1996; Pina ve ark., 1997; Lezcano ve ark., 1998; Diadori ve ark., 1999; Kashiwagi ve ark., 2001; Copello ve ark., 2003).

Bu bilgilere paralel olarak bizim çalışmamızda, mikrobiyolojik bulgulara gruplar arası 24. gün üreyen maya miktarlarında karşılaştırıldığında: Grup 6 ile Grup 1, 2, 3, 4, 5, 7 arasında üreyen maya miktarlarında istatistiksel ($p<0,05$) farklılık olduğu belirlendi. Grup içi üreyen maya miktarlarında karşılaştırıldığında; Grup 1, 2, 3, 4, 5'te 48.saat ile 24. gün arasında istatistiksel ($p<0,05$) farklılık olduğu belirlendi (Tablo 5, Resim 1).

Vigna ve Mendenez-Cepero 2007; klinik olarak 9 kedide sadece basit keratit veya yüzeysel ülser; 15 kedide yangısal semtomlarla birlikte ile herpetik rhinotracheitisi mevcut olan 24 herpetik keratitli kediye günde üç kez ikişer damla OLEOZON® kolonyum, uygulamışlar tedavisinin 5-6 gün içerisinde delinmiş kornea ülseri vakası olmadığını ve çok düşük reaktivasyon yüzdesi (% 8) sınırlandırıldığını sadece iki yavru kedide subakut rinokonjunktivit tekrar ortaya çıktığını bildirmişlerdir. Aynı çalışmada klinik olarak kemozis, fotofobi ve göz sekresyonuyla ilişkili ciddi akut konjunktivit olan Chlamidiophila Felis konjunktivitisli 17 kediye günde üç kez iki damla OLEOZON® kolonyum, uygulamışlar Tedaviden 3 gün sonra tüm kedi yavruları, antibiyotiklere dirençliler de dahil olmak üzere büyük bir iyileşme göstermiş ve 10 günlük tedaviden sonra tüm kediler tamamen iyileşme gösterdiğini bildirmişlerdir. Miks keratokonjunktivitis (Herpes virüs + Chlamydia + mikoplazma) rinokonjunktivite benzer şiddetli kemozis, göz sekresyonu ve kornea ülseri bulunan 7 kedide 3-36 T OLEOZON® kolonyum, 8 saatte bir iki damla, ayrıca Tropikamid% 0.12 (bir muhtemel sineşileri önlemek için günde iki kez damla). 6 günlük tedaviden sonra ödem kaybolduğunu ve 15 gün sonra semptomların tam olarak çözülmesini, herpetik kornea ülserlerinin iyileşmeni kaydettiklerini bildirmişlerdir. İki perfore Ülserli, 1 desemetoselli ve 4 derin Ülserli 7 kedinin tedavisinde OLEOZON® kolonyum her 6 saatte bir üç damla ve her saat 8 saatte bir damla Tropikamid% 0.12' kullanmışlar, 6 olguda iyileşme sağlamışlar, birinde (perforat ülseri) korneada kikatografi yapılmışlar, ancak front sinir şikayetlerini önleyememişlerdir. Derin ülserler için 7-9 gün içinde tam iyileşme sağlamışlardır, 7 gün içinde desemetosel, 10 gün sonra delinmiş ülserler için kornea kikatografisi yapmışlar ve 30 gün içinde mükemmel şekilde şeffaf görüntü elde etmişlerdir. Çeşitli nedenlerden oluşan

kornea ülseri olan ve konjunktival greft ile tedavi ettikleri 4 kedide grefti günde 6 kez, üç damla OLEOZON® kolliyum ve% 0.12 Tropikamid ile her 8 saatte bir damla tedavi etmişler, 48 saat sonra greft vaskülarizasyona uğramış ve parçayı günde 3 kez OLEOZON® kolliyum damlası ile tedavi ederek kornea saydamlaşmış ve göz korunduğunu bildirmişlerdir. ve konjunktiva grefti ile tedavisinde etkili olduğu bildirilmiştir. Fakat bu çalışmalar klinik vaka çalışmalarından ibarettir ve ayrıntılı stoloji ve histopatolojik incelemeleri içeren deneysel fungal keratitisin flukenazolle karşılaştırmalı olarak hem ozonlanmış yağın hemde ozonlanmış distile suyun kullanıldığı herhangi bir bilimsel çalışmaya rastlanmamıştır.

Bizim klinik bulgularımızda ise klinik bulgulardan kornea opasitesi, korneada neovaskülarizasyon, bulanıklık ve konjuntivitis değerlerinin gruplar arası ve grup içi istatistiksel olarak karşılaştırmasında; gruplar arasında; Grup 6 ile Grup 1, 2, 3, 4, 5, 7 arasında 20 ve 24. günlerde istatistiksel ($p<0,05$) farklılık olduğu, grup içi karşılaştırmada ise Grup 1, 2, 3, 4, 5'te 48. saat ile 20 ve 24. günler arasında istatistiksel ($p<0,05$) farklılık belirlendi (Tablo 2-5).

Histolojik bulgularda ise Enfekte grupta stromada oldukça yoğun nötrofil lölosit ve histiosit infiltrasyonu dikkati çekti. Stromal ödem ile birlikte stromal kalınlığın belirgin şekilde arttığı gözlemlendi. Epitel tabakası tek katlı en fazla 3 sıralı hücrelerden ibaret olup şiddetli keratin mevcuttu. Özellikle anterior stromaya yakın kollagen tabakası nı oluşturan hücrele düzensiz yapıdaydı. Fungal keratitli kornea materyalinde ağırlıklı olarak gözlenen inflamatuvar hücreler, polimorfonükleer lökositler değişen derecelerde de lenfosit ve plazma hücreler de mevcuttu Stromada koagülasyon nekrozu belirgindi. Filamentöz mantarlar, derinde stroma lamelleri arasında gözlemlendi (Resim 9, 10). Tedavi gruplarında (Grup 1-5) korneal keratin miktarı enfekte kontrol grubuna oranla oldukça azdı. Enfekte kontrol grubunda fungal keratitli kornea materyalinde ağırlıklı olarak gözlenen inflamatuvar hücreler, polimorfonükleer lökositler değişen derecelerde de lenfosit ve plazma hücreler de mevcuttu Stromada koagülasyon nekrozu belirgindi. Filamentöz mantarlar, derinde stroma lamelleri arasında gözlemlendi Tedavi gruplarında ise grup 1, 3 ve 5 hücre infiltrasyonu diğer tedavi gruplarına oranla hemen tamamen ortadan kalkmıştı. Grup 2 ve 4 te kontrol grubuna oranla stromal hücre infiltrasyonu belirgindi. Özellikle sadece flukanazol uygulanan grupta korneal stromada hücre infiltrasyonu ve ödem, diğer tedavi gruplarına göre daha şiddetliydi. Tedavi gruplarından arasında Grup 1 ve Grup 5 diğerleriyle kıyaslandığında korneal stromada

hücresele infiltrasyon önemli oranda azalmıştı. Bu gruplar kontrol grubuna oldukça benziyordu (Resim 10, 11, 12).

Sitolojik örneklerde ise yeterli hücresellik mevcuttu. Okuler yüzeyin sitolojik incelemesinde kontrol ve tedavi grubundaki tavşanların gözlerinde konjunktivanın normal kolumnar epitel hücreleri, yuvarlak küçük hücreleri, korneanı kornifiye olmayan skuamöz epiteli gözlemlendi. Bu hücreler eozinofilik sitoplazmalı şekil ve büyüklük bakımından benzerdi (Resim 12A, D, H, I). Enfekte gruptaki tavşanlarda ise yoğun polimorfonükleer nötrofiller, lenfosit ve makrojalarla dikkati çeken konjunktivitis ve keratitis gözlemlendi. Özellikle korneal ülserli vakalarda epitel hücrelerinde displazik değişiklikler mevcuttu. Bazı vakalarda bol sitoplazmalı piknotik çekirdekli, çekirdek/sitoplazma oranının oldukça azaldığı hücrelerle karakterize skuamöz metaplazisi de dikkati çekti. Fungal keratitli kornea materyalinde ağırlıklı olarak gözlenen inflamatuvar hücreler, polimorfonükleer lökositlerdi, değişen derecelerde lenfosit ve plazma hücreleridi (Resim 13B, C, E, F,G).

Behrens-Baumann ve ark., 1990 tavşanlarda *C. albicans* ile deneysel olarak oluşturulan keratitisin tedavisinde günde 10 kez 1 damla fluconazole'yi enfeksiyon oluşumundan 48 saat sonra 24. günün sonunda fluconazole'nin etkili olduğunu bildirmişlerdir.

Bizim çalışmamızda da fluconazole damla günde 2 kez 1 damla enfeksiyondan 48 saat sonra uygulandı ve 24. günün sonunda *C. albicans* miktarı enfekte kontrol grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel farklılık gözlemlenmiştir. Ozonlanmış zeytinyağı ve ozonlanmış distile su grubunda üreyen *C. albicans* miktarı fluconazole uygulanan gruptan daha azdır. Ayrıca ozonlanmış zeytin yağı ve ozonlanmış distile su ile birlikte kullanıldığında ozonlanmış zeytin yağı ve ozonlanmış distile suyun tek başına kullanımına oranla daha etkili olduğu görülmüştür. Ama tedavi grupları arasında üreme miktarı çok yakındır ve istatistiksel bir farklılık olmayıp tüm tedavi grupları enfekte kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel farklılık görülmüştür.

Sonuç olarak bu çalışmada deneysel olarak oluşturulan fungal keratitisin tedavisinde elde edilen klinik, mikrobiyolojik, sitolojik histopatolojik veriler sonucunda ozonlanmış zeytinyağının ve ozonlanmış suyun etkinli olduğu görülmüştür. Ayrıca ozonlanmış zeytinyağının ve ozonlanmış suyun fluconazole ile birlikte etki gösterdiği bu çalışma ile ortaya konmuştur.

Bu çalışma bize göstermiştir ki ozonlanmış zeytinyağı ve ozonlanmış distile su uygulamasının fungal keratit tedavisindeki etkinliğini kanıtlanmıştır

Ayrıca, bu çalışma sonucunda tıp hekimliği veteriner hekimliği açısından oftalmolojik enfeksiyonların tedavisinde ozonun farklı formlarının etkili olduğu görülmüştür.

KAYNAKLAR

Altan S. Fungal Keratitli Olgularımız, 2010. Uzmanlık Tezi, Çukurova Üniversitesi, Tıp Fakültesi Uzmanlık Tezi Adana sy:2-29.

Avunduk AM, Beuerman RW, Warnel ED, Kaufman HE, Greer D. Comparison of efficacy of topical and oral fluconazole treatment in experimental *Aspergillus* keratitis. *Curr Eye Res* 2003;26: 113-7.

Agarwal PK, Roy P, Das A, Banerjee A, Maity PK, Banerjee AR. Efficacy of topical and systemic itraconazole as a broad-spectrum antifungal agent in mycotic corneal ulcer. A preliminary study. *Indian J Ophthalmol* 2001;49: 173-6.

AOCS. "Acid Value. AOCS Official Test Method Cd 3a-63 For." In Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society, edited by D. Firestone5th. Champaign, IL: American Oil Chemists' Society. 1998a.

AOCS. "Iodine Value of Fats and Oils. WIJS Method. AOCS Official Method Cd 1-25:." In Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society, edited by D. Firestone5th. Champaign, IL: American Oil Chemists' Society. 1998b.

AOCS. "Peroxide Value. AOCS Official Method Cd 8-53:." In Official Methods and Recommended Practices of AOCS, edited by D. Firestone5th. Champaign, IL: American Oil Chemists' Society. 1998c.

AOCS. "P-Anisidine Value. AOCS Method Cd 18-90 (11): Official Method." In Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society, edited by D. Firestone6th. Champaign, IL: American Oil Chemists' Society. 2011.

Babacan A. Ozon, Ozonterapi ve Klinikte Kullanımı. *Tıp Bilimleri Dergisi*, 2008; 28(6): 245-247.

Başarı F. Çeşitli Klinik Örneklerden İzole Edilen Beta-Hemolitik Streptokokların Gruplandırılması Ve Antibiyotiklere Dirençlerinin Araştırılması. Uzmanlık Tezi, Şişli Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi. 2007; 2.

Batı Kutlu S. Çeşitli Klinik Materyallerden İzole Edilen *Staphylococcus Aureus* Suşlarında Metisilin Direnci Ve E -Test İle Vankomisin Mıc Değerlerinin Araştırılması. Uzmanlık Tezi

T.C. Sağlık Bakanlığı Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği İstanbul. 2006; 6-26.

Beck EG, Wasser G, Viebahn-Hänsler R. The Current Status of Ozone Therapy Empirical Developments and Basic Research Review Article, *Forsch Komplementärmed*, 1998;5: 61-75.

Behrens-Baumann W, Klinge B, Ruchel R. Topical fluconazole for experimental candida keratitis in rabbits. *British journal of ophthalmology*, 1990;74(1): 40-42.

Bilgehan H. Klinik Mikrobiyoloji. 8. Baskı, İzmir. 1994; 212-229,

Bocci V. Ozone. A New Medical Drug, Dordrecht, The Netherlands: Springer. 2005; 1-250

Bocci V. Is it True that Ozone is Always Toxic? The end of a dogma. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2006a;216(3): 493–504.

Bocci V, Carlo A. Biochemical Modifications Induced in Human Blood by Oxygenation-Ozonation, *J Biochem Molecular Toxicology*, 2006;20(3): 33-138.

Bocci V. Scientific and Medical Aspects of Ozone Therapy. *state of the art, Archives of Medical Research*, 2006;37: 425–435,

Bocci V, Borrelli E, Travagli V, Zanardi I. The Ozone Paradox: Ozone Is a Strong Oxidant as Well as a Medical Drug, *Med Res Rev*, 2009;29(4): 646-82.

Bocci V. Ozone. A New Medical Drug, 2nd edition. Dordrecht, The Netherlands: Springer. 2010; 1-250

Bolzan A, Brunelli AJ, Castro M, Souza M, Souza J, Laus J. Conjunctival impression cytology in dogs. *Veterinary Ophthalmology*, 2005; 8(6): 401-405.

Bulam Kılıç, B. Korneal Kollajen Çapraz Bağlama Tedavisinin Deneysel Bakteriyel Keratit Modelindeki Etkisinin Araştırılması Ve Topikal Antibiyotik Tedavisi Ve Kombine Tedavi İle Karşılaştırılması, Başken Üniversitesi Tıp Fakültesi Uzmanlık Tezi Ankara 2014. Sy:3-12.

Çakır L, Hızlısoy H, Abay S, Kutsal O. Investigation of ocular surface cytology (brush-impression techniques) and Bacteriological Agents in dogs with Conjunctivitis and Healthy, *Cytopathology*, 2011;22(1): 19

Çakır L, Gümüşsoy KS, Kutsal O, Tunç AS, "Evaluation Of Brush Cytology (Cytospin Technique) And Cultural Results In The Diagnosis Of Keratoconjunctivitis In A Goat Herd ", *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 2014;61: 35-41.

Clinical and Laboratory Standards Institute. (CLSI). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard. 3th ed., CLSI Document M27- A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute. 2008.

Clinical and Laboratory Standards Institute. (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; fourth informational supplement, CLSI Document M27-S4. Wayne PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012.

Copello M, Eguía F, Menéndez S, Menéndez N. Ozone therapy in patients with Retinitis Pigmentosa. *Ozone-Sci Eng*, 2003;25(3): 223-32.

Cottew GS. Caprine-ovine mycoplasmas. Academic press, New York, 1979.

Delgado-Roche L, Martínez-Sánchez G, Re L. Ozone Oxidative Preconditioning Prevents Atherosclerosis Development in New Zealand White Rabbits *J Cardiovasc Pharmacol* 2013; 61(2): 160-165.

Diadori A, Bocci V, Carraro F, Nuti A, Corradeschi F, Ferrari G, Sabatini L, Silvestri S and Frezzotti R. Ozonotherapy and age-related macular degeneration a pilot study. In F. Ceccherelli and F. Giron, eds. *L'Ozonoterapia nel 2000*. Torino: Edizioni Libreria Cortina, 1999;33-45.

Diadori A, Nuti A, Ferrari G, Corradeschi F and Bocci V. Ozone therapy: a new perspective in ophthalmology. *Vision Res*, 1996;36: 418.

Droge W. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiol, Rev.*, 2002;82: 47–95.

Dursun D, Fernandez V, Miller D, Alfonso EC. Advanced Fusarium keratitis progressing to endophthalmitis. *Cornea* 2003;22(4): 300-303.

[Elvis](#) AM, [Ekta](#) JS. Ozone Therapy: A Clinical Review *J Nat Sci Biol Med*. 2011;2(1): 66–70.

Ferrer L, Santos D, Menéndez S y Pérez Z. Ozonoterapia y magnetoterapia: nuevos métodos en la rehabilitación del paciente con glaucoma crónico simple. *Rev Cubana Oftalmol* 1996; 9(2):102-9.

Garcia-Ruiz JC, Lopez-Soria L, Olazabal I, Amutio E, Arrieta-Aguirre I, Velasco-Benito V, Pontón J, Moragues MD. Invasive infections caused by *S. capitata* in patients with haematological malignancies: report of five cases and review of the antifungal therapy *Revista Iberoamericana De Micología*, 2013;30:248–255.

Geweely NS. Antifungal activity of ozonized olive oil (Oleozone). *International Journal of Agriculture and Biology*, 2006;8:670-675.

Gierek-Lapinska A, Antoszewski Z, Myga B Skowron J. Preliminary report on using therapeutic ozone in infectious conjunctivitis and keratitis and in corneal degeneration. *Klin Oczna* 1992;94: 5-6.

Gürel E. Tıpta Ozon Tedavisinin Yeri. *Sağlıklı Yaşam Tarzı Dergisi*, 2009;1;92-101.

Harris E. Antiphospholipid antibodies. *British Journal of Haematology*. 1990;74(1):1-9.

İnan S. Kornea Hastalıkları. *Journal of Clinical and Analytical Medicine*, 2015 pp. 1-19. DOI: 10.4328/DERMAN.3942

Jacqueline Ik. Kirk-Othmer encyclopedia of chemical technology. 3rd ed. John Wiley & Sons. 1981.

Kalavathy CM, Parmar P, Kalamurthy J. Comparison of topical itraconazole 1% with topical natamycin 5% for the treatment of filamentous fungal keratitis. *Cornea* 2005;24: 449-52.

Kashiwagi K, Saito K, Wang YD, Takahashi H, Ishijima K, Tsukahara S. Safety of ozonated solution as an antiseptic of the ocular surface prior to ophthalmic surgery. *Ophthalmologica*, 2001;215(5): 351-356.

Koc AN, Silici S, Kasap F, Kasap F, Hörmet-Öz HT, Mavus-Buldu H, Ercal BD. Antifungal activity of the honeybee products against *Candida spp.* and *Trichosporon spp.* *Journal of Medicinal Food* 2011;14:128-134.

Koc AN, Atalay MA, Timur D, Demir G, Kaynar L. Molecular epidemiology and antifungal susceptibility of *Saprochaete capitata* (Blastoschizomyces capitatus) isolates causing nosocomial infection in Kayseri/Turkey. *The Journal of infectious diseases* 2016;1-8. doi: 10.1080/23744235.2016.1176246

Kutlubay Z, Bağlam S, Engin B, Tüzün Y. Dermatolojide Ozon Tedavisi. *Türkiye Klinikleri J Dermatol-Special Topics*. 2013;6(1): 8-12.

Kutlubay Z, Engin B, Serdaroglu S, Tüzün Y. Dermatolojide Ozon Tedavisi. *Dermatoz*, 2010;1(4): 209-216.

Lezcano I, Molerio J, Gómez M, Contreras R, Roura G, Díaz W. Actividad in vitro del OLEOZON® frente a agentes etiológicos de infecciones en la piel. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 1998;28(13):105-109.

Magalhaes FNDO, Dotta L, Sasse A, Teixeira, MJ, Fonoff ET. Ozone Therapy as a Treatment for Low Back Pain Secondary to Herniated Disc: A Systematic Review and Meta-analysis of Randomized Controlled Trials Pain Physician. 2012;15: 115-129.

Matsumoto Y, Dogru M, Goto E, Fujishima H, Tsubota K. Successful topical application of a new antifungal agent, micafungin, in the treatment of refractory fungal corneal ulcers: Report of three cases and literature review. *Cornea* 2005;24:748-53.

Maslennikov OV, Kontorshchikova CN, Grubkova IA. Ozone therapy in Practice. Health Manual. -Nizhny Novgorod Russia, 2008; 6-8.

Mercan U. Toksikolojide Serbest Radikallerin Önemi YYU Vet Fak Derg. 2004;15(1-2): 91-96.

Metindoğan S. İzotretinoin Kullanılan Olgularda Okuler Yüzey Değişiklikleri Ve Konfokal Mikroskopik Bulguları Başken Üniversitesi Tıp Fakültesi Uzmanlık Tezi Ankara 2009;12-13.

Microbial and parasitic infections of the cornea and sclera. In: *American Academy of Ophthalmology. Basic and Clinical Science Course. External Disease and Cornea. Section 8.* San Fransisco; 2003;173-175.

Murray CJL, Lopez AD (eds). The global burden of disease: A comprehensive assessment of mortality and disability from diseases, injuries, and risk factors in 1990 and projected to 2020. Cambridge, Harvard School of Public Health. 1996; 1-43.

Nelson JD. Impression cytology. *Cornea* 1988;7: 71- 81.

Özler M, Öter Ş, Korkmaz A. Ozon Gazının Tıbbi Amaçlı Kullanılması. *TAF Prev Med Bull*, 2009;8(1): 159-64.

Öztekin A. Yüksek Riskli Keratoplasti Hastalarında %2'lik Siklosporin A 'nin Etkisi Sağlık Bakanlığı Dr. Lütfi Kırdar Kartal Eğitim ve Araştırma Hastanesi Uzmanlık Tezi İstanbul 2004;6-13.

Ouf SA, Moussa TA, Abd-Elmegeed AM, Eltahlawy SR. Anti-fungal potential of ozone against some dermatophytes. *Brazilian Journal of Microbiology* 2016; 698-702.

Piña JC, Mapolón Y, Palma M, Recio E, Harrys C, Rodríguez M. Application of ozone in Patients with Keratitis. 4th International Symposium on Ozone Applications. Cuba, March 1997; 1-9.

Prajna NV, John RK, Nirmalan PK, Lalitha P, Srinivasan M. A randomised clinical trial comparing 2 % econazole and 5% natamycin for the treatment of fungal keratitis. *Br J Ophthalmol* 2003;87:1235-1237.

Prajna NV, Nirmalan PK, Mahalakshmi R, Lalitha P, Srinivasan M. Concurrent use of 5% natamycin and 2% econazole for the management of fungal keratitis. *Cornea* 2004; 23:793-6.

Reth M. Hidrojen Peroksit as Second Messenger in Lymphocyte Aktivation *Nature immunology volume* 2002; 3(12).

Roche LD, Martínez-Sánchez G, Ozone Oxidative Preconditioning Prevents Atherosclerosis Development in New Zealand White Rabbits *J Cardiovasc Pharmacol*, 2013; (61)160–165

Rowland FS. Stratospheric ozone depletion. *Phil Trans R Soc, B.*, 2006;361: 769-790.

Schreiber W. Olbrisch A, Vorwerk CK, Ko"nig W, Baumann WB. Combined Topical Fluconazole and Corticosteroid Treatment for Experimental *Candida albicans* Keratomycosis IOVS, 2003;44(6): 62634-3643.

Srinivasan M. Fungal keratitis. *Curr Opin Ophthalmol* 2004;15:321-7.

Srinivasan M, Gonzales CA, George C, Cevallos V, Mascarenhas JM, Asokan B. Epidemiology and aetiological diagnosis of corneal ulceration in Madurai, South India. *Br J Ophthalmol* 1997;81: 965–971.

Steinberg, D. Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. *J Biol Chem* 1997;272(34): 20963-20966.

Tanure MA, Cohen EJ, Sudesh S, Rapuano CJ, Laibson PR. Spectrum of fungal keratitis at Wills Eye Hospital Philadelphia, Pennsylvania. *Cornea* 2000;19:307-312.

Terasaki N, Ogata A, Ohsuka H, Tamura K, Hoshi F, Koiwa M, Kawamura S. Changes of Immunogial Respons After Experimentally Ozonated Autohemoadminasration in Calves. *J. Vet. Med. Sci*, 2001;63(12):1327-1330.

Thomas PA. Fungal infections of the cornea. *Eye* 2003;17:852-862.

Thomas PA. Current perspectives on ophthalmic mycoses. *Clin Microbiol Rev* 2003;16:730-97.

Valacchi, G. Bocci, V. Studies on the biological effects of ozone: 11. Release of factors from human endothelial cells. *Mediators Inflamm*, 2000;9: 271–276.

Varaprasathan G, Miller K, Lietman T, Whitcher JP, Cevallos V, Okumoto M. Trends in the etiology of infectious corneal ulcers at the F. I. Proctor Foundation. *Cornea* 2004;23:360–364.

Vigna I, Menéndez-Cepero, Silvia. Ozone therapy application in different ophthalmologic diseases: study of 59 cases (Aplicación de la ozonoterapia en diferentes enfermedades oftalmológicas: estudio de 59 casos). *Revista Electronica de Clinica Veterinaria*, 2007;2(11): 1-9.

Whitcher JP, Srinivasan M, Upadhyay MP. Corneal blindness: a global perspective. *Bull World Health Organ* 2001;79: 214–221.

Yağmur M, Ersöz C, Ersöz TR, Varinli S. Brush technique in ocular surface cytology. *Diagn Cytopathol*. 1997;17(2):88-91.