

T.C
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

GÜMÜŞ İYON KATKILI KALSIYUM FOSFAT
SERAMİKLERİN KRONİK OSTEOMYELIT
DENEY MODELİNDE ETKİNLİĞİNİN
ARAŞTIRILMASI, HAYVANLARDA
DENEYSEL ÇALIŞMA

Dr.Zeynel Mert ASFUROĞLU

Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı
TIPTA UZMANLIK TEZİ

ESKİŞEHİR
2016

T.C
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

GÜMÜŞ İYON KATKILI KALSİYUM FOSFAT
SERAMİKLERİN KRONİK OSTEOMYELIT
DENEY MODELİNDE ETKİNLİĞİNİN
ARAŞTIRILMASI, HAYVANLARDA
DENEYSEL ÇALIŞMA

Dr.Zeynel Mert ASFUROĞLU

Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı
TIPTA UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Prof.Dr.Nusret KÖSE

ESKİŞEHİR

2016

TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI

T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA

Dr. Zeynel Mert ASFUROĞLU'na ait “Gümüş iyon katkılı kalsiyum fosfat seramiklerin kronik osteomyelit deney modelinde etkinliğinin araştırılması, hayvanlarda deneysel çalışma” adlı çalışma jürimiz tarafından Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı'nda Tıpta Uzmanlık Tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Tarih: 06/01/2016

Jüri Başkanı

Prof.Dr. Nusret KÖSE

Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı

Üye

Prof. Dr. Abdurrahman ÖZÇELİK

Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı

Üye

Doç. Dr. Gökhan MARALCAN

Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi

Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı

Eskişehir

Osmangazi

Üniversitesi

Tıp

Fakültesi

Fakülte

Kurulu'nun..... Tarih veSayılı Kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Enver İHTİYAR

Dekan

TEŞEKKÜR

Bu çalışma süresince ve tüm asistanlığım boyunca bilimsel faaliyetler konusundaki engin bilgilerini benden esirgemeyen tez danışmanım Prof. Dr. Nusret Köse'ye, tez konusunu seçerken beni yönlendiren ve çalışmanın başlangıç aşamasında bana yardım eden Op. Dr. Ahmet Küçük'e, deneklerin cerrahi işlemlerinde birlikte çalıştığım araştırma görevlisi arkadaşlarım Anıl Akceylan, Faruk Adıgüzel ve Hüseyin Çeliksöz'e, histopatolojik inceleme sırasında ve sonuçların değerlendirilmesinde bana sonsuz kolaylık sağlayan Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Varol Şahintürk'e, çalışmada kullanılan implantların yapımında emeği geçen Prof. Dr. Aydın Doğan'a Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı'ndaki uzmanlık eğitimi sürem boyunca oluşturdukları hoşgörülü ortam yanında bana aktardıkları bilgi ve deneyimleri ile eğitimimde emeği geçen tüm hocalarıma en derin teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Asfuroğlu, Z.M. Nano Gümüş İyon Katkılı Kalsiyum Fosfat Seramiklerin Kronik Osteomyelit Deney Modelinde Etkinliğinin Araştırılması. Hayvanlarda Deneysel Çalışma. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı Tıpta Uzmanlık Tezi Eskişehir, 2016. Bu çalışmada önce tavşan tibialarında deneysel olarak osteomyelit geliştirildi. Ardından enfekte bölgenin debridmanı sonrasında boşluk olan bölgeye nano-gümüş iyon katkılı kalsiyum fosfat seramikten yapılmış yapay kemik greftleri yerleştirildi, hem defektin ortadan kalkması hem de enfeksiyonun lokal tedavisinin etkinliği incelendi. Çalışmada 24 adet tavşan denek olarak kullanıldı. Denekler üç gruba ayrıldı. Birinci gruba antibiyotikli kemik çimentosu (AKÇ), ikinci gruba nano-gümüş iyon katkılı kalsiyum fosfat seramik yapıda boncuklar (G-KFB) ve üçüncü gruba gümüş iyonu içermeyen nano-kalsiyum fosfat seramik boncuklar (KFB) uygulanarak etkinlikleri karşılaştırıldı. Bekleme süresi onuncu haftada sonlandırıldı. Ardından denekler kurban edilerek gruplar kıyaslandı. Bulgular incelendiğinde KFB ve AKÇ grubunda yer alan deneklerde tedavi sonrasında radyografilerde osteomyelit bulgularının devam ettiği, alınan yara yeri kültürlerinde Stafilokokkus Aureus üremesinin mevcut olduğu, makroskopik olarak apse gibi enfeksiyona ikincil belirtilerin olduğu gözlemlendi. Ayrıca histopatolojik inceleme sonrasında bu iki grupta kemik histolojisinde lökosit varlığı, granülasyon ve fibrozis dokusu, kemik kaybı, havers genişlemesi, periost reaksiyonu gibi kemik iltihabını gösteren bulgulara rastlandı. G-KFB grubunda ise onuncu hafta sonunda yapay greftin kemikle tamamen bütünleştiği ve yeni kemik oluşumunun başladığı histolojik olarak görüldü. G-KFB grubu, KFB grubu ile kıyaslandığında kemik yapım oranının ve osteoid doku oluşum yüzdesinin G-KFB grubunda daha fazla olduğu istatistiksel olarak kanıtlandı ($p<0,001$). Gümüş iyonunun antimikrobiyal özellikleriyle desteklenen nano-kalsiyum fosfat seramik yapıda boncuklar tedavide hem yeni kemik oluşumunu arttırmakta hem de yüksek antimikrobiyal etki göstermektedir. Sonuç olarak gümüş katkılı kalsiyum fosfat temelli yapay kemik greftlerinin kronik osteomyelit olgularının tedavisinde etkili olabilecek bir yöntem olduğu düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Osteomyelit, Gümüş, Kalsiyum Fosfat Seramikler, Nano.

ABSTRACT

Asfuroğlu, Z.M. Efficiency of Nano Silver Ion Doped Calcium Phosphate Ceramics in Experimental Model of Chronic Osteomyelitis. Experimental Study in Animals. Eskişehir Osmangazi University, Faculty of Medicine, Medical Thesis in Department of Orthopedics and Traumatology. Eskişehir, 2016. In the present study, we established an experimental model of osteomyelitis in rabbits. Twenty-four rabbits were used in the present study. Following the debridement of the infected area, artificial bone grafts, which were made of nano-silver ion enhanced calcium phosphate ceramide, were placed in the void region. The removal of the defect, and the efficacy of the local infection treatment were investigated. Following the establishment of experimental osteomyelitis, the animals were divided into three groups. Animals in the first group received antibiotic-containing bone cement (ABC). Animals in the second group received nano-silver ion enhanced calcium phosphate ceramide beads (S-CPC). Animals in third group received nano-calcium phosphate ceramide (CPC) beads, lacking silver ions. The efficacy of these treatment modalities was compared. Posttreatment radiographical examinations in the ABC and CPC groups showed osteomyelitis findings, and *Staphylococcus Aureus* growth in the wound site cultures. Macroscopical examination showed symptoms secondary to infection, including abscess and puss. In addition, histopathological examination showed the presence of leukocytes in the bone histology, granulation, and fibrotic tissue, bone loss, enlarged havers, and periosteal reaction, indicating bone infection. On the other hand, histological examination confirmed the complete integration of the implant at the end of 10th week, and denovo bone formation in the S-CPC group. Compared with the CPC group, the rate of bone and osteoid tissue formation were significantly higher in the S-CPC group ($p<0,001$). Beads, with a nano-calcium phosphate ceramide structure, when supported with antimicrobial features of silver ions, increase bone formation and show a high level of antimicrobial effect. Taken together, artificial bone grafts based on silver-containing calcium phosphate, shows this to be a promising substance with potential as a treatment method for patients with chronic osteomyelitis.

Key words: Osteomyelitis, silver, calcium phosphate ceramics, nano

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
TABLolar DİZİNİ	xi
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1. Tanım	3
2.2.Sınıflama	3
2.3. Patogeneze	7
2.4. Osteomyelit Tedavisinde İmplant Yüzey Modifikasyonları	16
3. GEREÇ VE YÖNTEM	23
3.1. Antibakteriyel Toz Sentezi	23
3.2. Gümüş İyon Katkılı Kalsiyum Fosfat Seramik Üretimi	24
3.3. Hayvan Modelinde Çalışma Planı	26
4. BULGULAR	38
4.1. Grupların Röntgenogram Örnekleri ve Klinik Fotoğraflar	38
4.2. Grupların Tibia Kesitlerinin Makroskopik Görüntü Örnekleri	43
4.3. Deneklerin Yara Yeri Kültürü Sonuçları	49
4.4. Histopatolojik İnceleme Sonrası Bulgular	50

	Sayfa
4.5. Gümüş Toksikite Çalışması	55
5. TARTIŞMA	56
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	65
KAYNAKLAR	66



SİMGELER VE KISALTMALAR

Ag	Gümüş
AgNO ₃	Gümüş nitrat
AHO	Akut hematojen osteomiyelit
Ca(OH) ₂	Kalsiyum hidroksit
CFU	Colony forming unit
COX	Siklooksijenaz
CRP	C-reaktif protein
H. İnfluenza	Heamophilus Influenzae
HAP	Hidroksiapatit
IL	İnterlökin
İv	İntravenöz
MİK	Minimum inhibitör konsantrasyon
mm	Milimetre
MRG	Manyetik rezonans görüntüleme
MRSA	Metisiline dirençli staphyococcus aureus
MSCRAMM	Microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules
NAGA	N-asetil glukozamin
Nano-CAPs	Nano boyutlarda kalsiyum fosfat
NO	Nitrik Oksit
OFA	Ortofosforik asit
PIA	Polisakkarit interselüler adhezin
PMMA	Polimetilmetakrilat
S. Aureus	Staphylococcus Aureus
S. Epidermidis	Staphylococcus Epidermidis

SEM	Taramalı elektron mikroskobu
-SH	Sülfidril
Tc-99m	Teknesyum-99m
TCP	Trikalsiyum fosfat
TİCAM	Tıbbi ve Cerrahi Deneysel Araştırma Merkezi
TiO ₂	Titanyum dioksit
TMP/SMX	Trimetoprim-Sulfametaksazol
TNF	Tümör Nekroz Faktör
XRD	X-ray diffraction

ŞEKİLLER

	Sayfa
2.1 Cierny-Mader Evreleme Sistemine Göre Anatomik Sınıflama	5
2.2. Biyofilm Oluşum Aşamaları	12
3.1. Antibakteriyel Toz Üretim Akım Şeması	23
3.2. Antibakteriyel Tozun XRD Örgü Düzeni	24
3.3. Kırık Yüzey SEM Görüntüsü ve Por Büyüklükleri	25
3.4. Tavşan Tibiasının Cerrahi İşleme Hazırlanması	28
3.5. Tibia Proksimal Medialden Longitudinal Cilt İnsizyonu	28
3.6. Kemik Pencere Açılması	29
3.7. Kemik Pencerenin Kaynatıldıktan Sonra Görünümü	29
3.8. Kaynatılan Kemik Korteksin Tekrar Yerleştirilmesi	30
3.9. Denekte Abse Formasyonu	30
3.10. Denekte Oluşan Osteomyelit Tablosu Grafileri	31
3.11. İmplantların Steril Edilmiş Kullanıma Hazır Hali	33
3.12. Antibiyotikli Kemik Çimentosu Hazırlanışı	33
3.13. Deneğe Antibiyotikli Kemik Çimentosu Uygulaması	34
3.14. Deneğe İmplantın (Boncuk) Uygulanması	34
3.15. İmplantın Defekt Bölgesine Yerleştirilmesi	35
3.16. Deneklerin Barındığı Kafes Sistemi	35
4.1. 1 numaralı denek. Röntgenogram görüntüleri	38
4.2. 2 numaralı denek. Röntgenogram görüntüleri	39
4.3 15 numaralı denek. Röntgenogram görüntüleri	40
4.4. 12 numaralı denek. Röntgenogram görüntüleri	41
4.5. 19 numaralı denek. Röntgenogram görüntüleri	42
4.6. 23 numaralı denek. Röntgenogram görüntüleri	43

	Sayfa
4.7. 2 numaralı denek. Makroskopik kesit görüntüsü	44
4.8. 3 ve 4 numaralı denekler. Makroskopik kesit görüntüsü	44
4.9. 6 ve 8 numaralı denekler. Makroskopik kesit görüntüsü	45
4.10 9 numaralı denek. Makroskopik kesit görüntüsü	45
4.11. 10 numaralı denek. Makroskopik kesit görüntüsü	46
4.12. 14 ve 15 numaralı denekler. Makroskopik kesit görüntüsü	46
4.13. 16 numaralı denek. Makroskopik kesit görüntüsü	47
4.14. 17 ve 18 numaralı denekler. Makroskopik kesit görüntüsü	47
4.15. 19 numaralı denek. Makroskopik kesit görüntüsü	48
4.16. 21 numaralı denek. Makroskopik kesit görüntüsü	48
4.17. AKÇ grubuna ait histolojik kesit görüntüsü	50
4.18. AKÇ grubuna ait histolojik kesit görüntüsü	50
4.19. G-KFB grubuna ait histolojik kesit görüntüsü	51
4.20. G-KFB grubuna ait histolojik kesit görüntüsü	51
4.21. KFB grubuna ait histolojik kesit görüntüsü	52
4.22. KFB grubuna ait histolojik kesit görüntüsü	52

TABLÖLAR

	Sayfa
2.1. Kronik Osteomiyelitte Cierny-Mader Evreleme Sistemi	5
2.2. Sık Görülen Osteomiyelit Etkenleri	10
2.3. S.aureus Osteomiyelitinde Antibiyoterapi	14
2.4. Osteomiyelitte Diğer Antibiyoterapi Seçenekleri	14
3.1. Sıcaklığa Bağlı Ag Miktarının Değişimi	26
3.2. Deneklerin 3 Gruba Ayrılması ve Uygulama Planı	32
4.1. Grupların Yara Yeri Kültür Sonuçları	49
4.2. Grupların Semikantitatif Olarak Skorlanması	53
4.3. Semikantitatif Skorelama Sonrası Ortalama Puanlar	53
4.4. Kesitlerin Kemik Oluşumu Açısından Yüzey Alanı Ölçümleri	54

1.GİRİŞ

Osteomiyelit, mikroorganizmaların neden olduğu kemik ve kemik iliği enfeksiyonudur. Bu enfeksiyon bölgesel kalabildiği gibi kemik iliği, kemik zarı ve yumuşak dokuya da yayılım gösterebilir. Günümüzde yüksek enerjili yaralanmaların daha sık görülmesi ve buna bağlı olarak doku yıkımlarının daha fazla olması nedeniyle kronikleşme eğilimi gösterebilen önemli bir hastalıktır (1,2).

Uzun süreli parenteral antibiyotik tedavisi ve nekrotik kemik dokuların cerrahi debridmanı osteomiyelitte temel tedavi yaklaşımıdır. Etkili dozda uzun süreli antibiyotik kullanımı vücutta sistemik toksisiteye yol açabilmektedir. Bunun yanı sıra bu yöntemlerin uygun biçimde kullanılmasına rağmen sık tekrarlama görülebilmektedir. Bu nedenle kemik enfeksiyonlarının tedavisinde yeni tedavi yöntemlerine gereksinim duyulmaktadır.

Antibiyotiklerin özellikle enfeksiyon bölgesinde yüksek konsantrasyonlara ulaşmasını sağlamak için lokal antibiyotik uygulamaları ve taşıyıcı sistemler geliştirilmiştir. Bu sayede sistemik toksisite oluşturmada antimikrobiyallerin lokal olarak yüksek konsantrasyonlarda olabilmesi olasıdır.

Antimikrobiyallerin istenen bölgede yüksek konsantrasyonlarda olabilmelerini sağlamak amacıyla kullanılan antimikrobiyal taşıma sistemlerinde taşıyıcı malzeme biyobozunmaz ve biyobozunur olmak üzere 2 farklı biçimde olabilmektedir. Biyobozunmaz antibiyotik taşıyıcılar temel olarak mikroorganizmaların tutunmayı tercih ettikleri malzeme yüzeyinde etkili olabilmektedir. Antibiyotik içeren polimetilmetakrilat (kemik çimentosu, PMMA) boncuklar biyobozunmaz taşıyıcıların tipik örneğidir ve uzun yıllar kronik osteomiyelit tedavisinde sıklıkla kullanılmışlardır. Bu malzemelerin kısmen (%50-60) etkili olduğu gösterilmiştir. Bu malzemenin antibiyotik taşıyıcı olarak hazırlanması sırasında ortaya çıkacak ısıdan dolayı antibiyotik seçimi oldukça sınırlanmaktadır (3). Buna ek olarak antibiyotik taşıyıcı olarak kullanılan PMMA vücut tarafından yok edilebilen bir malzeme değildir ve kullanılan antibiyotik işlevini tamamladığında yani antibiyotik salınımı tamamlandığında (genellikle 2-4 haftada) PMMA'nın çıkarılması için ikinci bir operasyona gereksinim duyulabilmektedir (4). Bu malzeme çıkarıldığında kemikte boşluklar kalmaktadır. Geriye kalan bu ölü boşluklar genellikle kemik greftleri ile doldurulur. Son yıllarda kemik enfeksiyonlarının lokal tedavisinde daha iyi sonuçlar

elde edilebilmesi için biyobozunur taşıma sistemleri kullanılmaya başlanmıştır.

Biyobozunur polimerler (polilaktik asit ve poliglikolik asit), beta-trikalsiyum fosfat, kalsiyum hidroksiapatit, kalsiyum sülfat, kalsiyum alginat, kollajen, çitosan ve benzerleri denenmiştir (3,5). Bu yöntemle kronik osteomyeliti tamamen eradike edebilmek için gereken yüksek lokal antimikrobiyal konsantrasyonları elde edilirken implantın cerrahi olarak çıkarılmasına gereksinim olmayacaktır. Bunlara ek olarak biyobozunur malzeme debridmanla ortaya çıkan ölü boşlukları ortadan kaldırmakta ve lokal kemik dokusunun iyileşmesine katkıda bulunmaktadır.

Kemik enfeksiyonlarında antibiyotik taşıyıcı olarak kullanılan poröz seramiklerin mükemmel bir biyouyumluluk gösterdiği, birbiriyle ilişkili por yapısına sahip olduğu ve bu özelliği nedeniyle porlar içerisine antibiyotiklerin çekilebileceği gösterilmiştir (5,6). Osteomyelit sağaltımındaki en büyük sorunlar; enfeksiyon odağında bakterisit etki gösterecek antibiyotik konsantrasyonunun sağlanamaması ve gelişebilecek antibiyotik direncidir. Bir antibiyotiğin yeterli sürede ve etkili bir konsantrasyonda enfekte bölgede bulunması gerekmektedir (6). İmplant ilişkili enfeksiyonların tedavisinde başarılı olduğu gösterilmiş olan nano gümüş iyon katkılı kalsiyum fosfat seramiklerin benzer biçimde kronik kemik enfeksiyonu sağaltımında da başarılı olacağı düşünülmektedir. Kalsiyum fosfat seramikten yapılmış yapay kemikler uygulandıkları bölgede yeni kemik oluşumu için çatı oluşturarak debridman sonrası oluşan defektli bölgenin yerine yeni kemik oluşumunu sağlayacaktır. Yapay kemiğin alıcı kemiğe inkorporasyonu sırasında ortamda bulunacak nano gümüş iyonları geride kalmış mikroorganizmaların eradikasyonunu sağlayabileceği düşünülmektedir. Kemik ile ilişkili enfeksiyonlarda etkinliği gösterilmiş olan gümüş; toksisitesinin düşük olması, mikroorganizmaların tolerans geliştirmemesi ve güçlü antimikrobiyal etkinliğe sahip olması gibi avantajlara sahiptir.

Yapmış olduğumuz çalışmada tavşanlarda deneysel olarak kronik osteomyelit geliştirilmiştir. Ardından enfekte bölgenin debridmanı sonrasında boşluk olan bölgeye nano gümüş iyon katkılı kalsiyum fosfat seramikten yapılmış yapay kemik greftleri yerleştirilmiş olup, hem defektin ortadan kalkması hem de enfeksiyonun lokal tedavisinin etkinliği incelenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tanım

Osteomiyelit, bir mikroorganizmanın enfeksiyöz ve inflamatuvar süreçler ile kemik dokuda hasar oluşturması sonucu ortaya çıkan ilerleyici karakterde bir hastalıktır (1,7). Kemiğin sadece bir bölümü tutulabildiği gibi medüller kanal, periost, korteks ve çevre yumuşak dokuların tümü bu tabloya katılabilir.

20. yüzyılın ortalarına kadar osteomiyelitli hastaların yaklaşık 1/5'i hayatını kaybetmekteyken, günümüzdeki medikal ve cerrahi tedavi seçenekleri, sterilite anlayışı, hasta bakımında özen ile artık osteomiyelit nedeniyle oluşan ölüm olguları görülmeyip, bu hastalığa bağlı oluşan sekel oranı %5 düzeyine indirgenmiştir (8). Osteomiyelitin tedavisi; uygun antimikrobiyal tedavi seçimi için enfeksiyon hastalıkları uzmanının, yumuşak doku kaybı olan vakalarda doku örtümünün sağlanması için plastik cerrahın müdahil olduğu multidisipliner bir yaklaşım gerektirmektedir (9).

Osteomiyelit hastaları çeşitli modaliteli ve uzun süreli antibiyotik tedavileri almış olmalarına rağmen çoğu kez enfeksiyonu engellenemeyen olgulardır. Tekrarlayan operasyonlar çoğu hastada gereklidir. Osteomiyelitin bu kronik seyirli hali, gerek fiziksel ve gerekse psikiyatrik olarak hastaların hayat kalitesini kısıtlayan bir hastalık olarak karşımıza çıkmaktadır.

2.2. Sınıflama

Osteomiyelit sınıflaması, enfeksiyon oluş şekli, enfeksiyona konağın cevap tipi ve hastalığın süresi gibi birkaç kriter üzerinde şekillenir.

Semptomların süresine bağlı olarak akut, subakut, kronik olarak; enfeksiyon mekanizmasına göre eksojen osteomiyelit (açık kırıklar, iatrojenik, enfekte lokal dokudan bulaş ile) veya hematojen osteomyelit (bakteriemi sonucu ile ortaya çıkan) olarak; konak faktörler esas alınarak piyojenik veya nonpiyojenik olarak sınıflanabilir.

2.2.1 Hastalığın Süresine Göre Sınıflama

- a. Akut Osteomiyelit
- b. Subakut Osteomiyelit
- c. Kronik Osteomiyelit

- c1. Aktif kronik osteomyelit
- c2. İnaktif kronik osteomyelit

Akut Osteomyelit

Çoğunlukla pediatrik çağda gözlenen ve genelde akut enflamasyon bulgularının ve periostitin mevcut olup, radyolojik olarak radyolüsen görünümün ortaya çıktığı ilk 6 haftayı tanımlamada kullanılır (10).

Subakut Osteomyelit

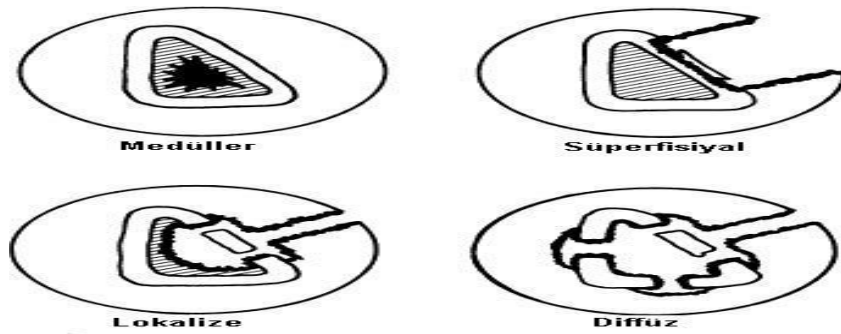
Mikroorganizmanın virülansı düşük olup mikroorganizma virülansı ve vücut direnci arasında bir denge varlığı halinde; inflamasyon yerleşme ve semptom vermesi yönünden sınırlı olarak meydana gelir. Teşhis tipik olarak 2 haftadan daha uzun süreli gecikmeyle konmaktadır (1,9). Subakut osteomyelit için Gledhill sınıflaması ve Roberts ve arkadaşlarının ortaya koymuş olduğu modifiye sınıflama kullanılmaktadır (1,9,11).

Kronik Osteomyelit

Kronik osteomyelit kemik dokusunda mikroorganizma invazyonu ile nekroza neden olan ve debridman gerektiren enfeksiyon olarak tanımlanır. Kemik içerisinde bir veya daha fazla odak halinde pürülan materyal, sekestrum veya granülasyon dokusunu bulundurabilen, aralıklı akut alevlenmelerin görülebildiği bir formdur. Günümüzde en yaygın olarak Cierny Mader sınıflaması kullanılmaktadır. Sınıflama, fizyolojik ve anatomik kriterlere dayanarak enfeksiyonun evresini tayin eder (9).

Tablo 2.1. Kronik Osteomiyelitte Cierny Mader Evreleme Sistemi

Anatomik Tip		
1	Medüller	Endosteal hastalık
2	Süperfisyal	Örtüm defekti nedeniyle kortikal yüzey enfektedir
3	Lokalize	İnstabilite yaratmadan çıkarılabilen sekestrem
4	Diffüz	Diğer tiplerin kombinasyonu ve debridman öncesi ya da sonrası mekaniki instabilite
Fizyolojik Sınıflama		
Konak A	Normal	Lokal damarlanması iyi olan sağlam immuniteli konak
Konak B	Bozulmuş	İmmüniteyi veya yara iyileşmesini bozan lokal ya da sistemik faktörlerin varlığı
Konak C	Engelleyici	Minimal sakatlık, engelleyici morbidite ve/veya kür için kötü prognoz



Şekil 2.1. Cierny-Mader evreleme sistemine göre anatomik sınıflama

Fizyolojik ve anatomik evreleme birlikte kullanılarak sınıflama yapmak mümkündür. Bu da antibiyoterapi ve cerrahi tedavinin derecesini ve şeklini belirlemede önemli bir yol gösterici olarak rol almaktadır.

2.2.2. Hastalığın Oluş Mekanizmasına Göre Sınıflandırma

a) Eksojen Osteomyelit

Travmatik eksojen osteomyelit

İyatrojenik (cerrahi sonrası) eksojen osteomyelit

Kontaminasyonla oluşan eksojen osteomyelit

b) Hematojen Osteomyelit

Birincisi; travma veya cerrahi girişim esnasında ya da kontaminasyon yolu ile dışarıdan bulaşma ile ortaya çıkar.

İkincisi; vasküler sistem ile organizmanın başka bir yerinden taşınan etkenlerin kemikte yerleşmesi tarzında hematojen bulaşma şeklidir. Hematojen form bakteriyemi sonucu ortaya çıkar.

2.2.3. Konağın Cevabına Göre Sınıflandırma

a) Piyojenik Osteomyelit

Gram-pozitif etkenlerle oluşan piyojenik osteomyelit

Gram-negatif etkenlerle oluşan piyojenik osteomyelit

Anaerobik etkenlerle oluşan piyojenik osteomyelit

b) Piyojenik olmayan(granülomatöz) Osteomyelit

Aside dirençli bakterilerle oluşan osteomyelit

Spiroketlerle oluşan osteomyelit

Mantarlarla oluşan osteomyelit

Enfeksiyon etkeninin cinsine göre organizmada genellikle bu iki cevaptan biri meydana gelir. En sık rastlanan şekli; genellikle Staphylococcus'ların neden olduğu fulminan piyojenik enfeksiyon şeklidir. Daha az oranda piyojenik olmayan etkenlerle, klasik olarak aside dirençli bakterilerle oluşan, yavaş gidişli granülomatöz enfeksiyon görülür (9,10).

2.2.4. Waldvogel Sınıflandırması

Waldvogel sınıflandırmasında hastalığın oluş şekli, süresi ve etkenin hangi yoldan bulaştığı önem kazanmaktadır. Hastalık 4 gruba ayrılarak incelenir.

- I. Hematojen Osteomiyelit (sekonder veya dolaylı yoldan meydana gelen osteomiyelit)
- II. Primer Osteomiyelit (direkt yoldan meydana gelen osteomiyelit)
- III. Vasküler hastalıklarla beraber olan osteomiyelit
- IV. Kronik Osteomiyelit

Fakat bu sınıflama cerrahi tedavi ve antibiyoterapi için rehber olmamaktadır (11).

2.3. Patogenez

Kemik dokusunun harabiyetinden üç mekanizma sorumlu tutulur (12).

1. Bakterinin salgıladığı endotoksinlerin yaptığı hasar (bakteriyel lipopolisakkarit)
2. Bakterinin osteoklastik aktiviteyi tetiklemesi
3. Kemik matriks sentezinin engellenmesi

Günümüzde mikroorganizmanın tetiklediği inflamatuvar yanıtın kemik hasarındaki rolü açıkça ortaya konmuştur. Bu mekanizmalarda interlökin-1 (IL-1), interlökin-6 (IL-6), interlökin-11 (IL-11), nitrik oksit (NO) ve tümör nekrozis faktör (TNF) gibi sitokinler rol oynar (13,14). In vitro deneylerde kemik yıkımının COX-siklooksijenaz enzimi blokajı ve anti IL-1 serumu ile önüne geçilebilmesi bunu destekler niteliktedir (15).

İnflamasyonun bir diğer kolu olan lökotrienlerin de osteoklastik aktiviteyi arttırdığı kanıtlanmıştır (16). Tüm bu nedenlerden dolayı tedavide antibiyotik ile birlikte anti-inflamatuvar ajanların kullanılması tedavinin başarısını arttıracaktır.

Başta *Staphylococcus Aureus* (S.aureus) olmak üzere herhangi bir mikroorganizma inflamasyonun fitilini ateşleyip bu karmaşık inflamasyon olaylarının gelişmesine neden olabilir. Sonuç olarak osteoklast aktivasyonu ve osteoblastların mitozunun inhibisyonu ile kemik yıkımı gerçekleşebilir (12,13). Artan doku basıncı nekroze neden olup, abse ve ölü kemikler (seksr) antibiyotiklerin etkilerini güçleştirebilir (17,18)

2.3.1 Konağa Ait Risk Faktörleri

Konjenital ve sonradan kazanılmış olarak incelenebilir.

Konjenital sebepler içerisinde; orak hücreli anemi, kronik granülomatöz hastalıklar, hipergamaglobulinemi, lökosit adhezyon defektleri, hemofililer, kompleman defektleri gibi immün sistemi zayıflatan hastalıklardan bahsedilebilir.

Sonradan kazanılmış sebepler içerisinde radyoterapi maruziyeti, *human immunodeficiency virus* (HIV) enfeksiyonları, sigara, diyabetes mellitus, malignite, organ nakli ve dializ hastalar, üremi, malnutrisyon kendilerine yer bulur.

2.3.2 Osteomiyelit Etkenleri

Hastane enfeksiyonlarında osteomiyelit etkeni olarak sıklıkla koagülaz (-) stafilokoklar karşımıza çıkmaktadır (1,8,10). *S.aureus*, özellikle akut hematojen osteomiyelitte en çok izole edilen mikroorganizmadır. *Staphylococcus Epidermidis* (*S.Epidermidis*) ise implant yerleştirilen cerrahi girişimlerden sonra tekrarlayan enfeksiyonlara sebep olabilir (8). Protez sonrası enfeksiyonlarda propionibakteriler rol oynayabilir.

Akut hematojen osteomiyelitli infantlarda, *S.aureus* halen sıklıkla izolatlarda görülmekte, ancak B grubu streptokoklar ve gram negatif koliformlar da sıklıkla bulunmaktadır. *S.aureus* veya gram negatif organizmalar, %40'tan fazlası multifokal tutulumlu olan, yenidoğan yoğun bakım ünitesinde tedavi geçiren prematüre infantlarda bulunan ortopedik enfeksiyonların yaygın nedenleridir (9).

Haemophilus Influenzae (*H.influenzae*) enfeksiyonları başlıca 6 ay-4 yaş arası çocuklarda primer olarak ortaya çıkar. Bu organizmaya karşı rutin immünizasyonlardan dolayı bu enfeksiyonun insidansında dramatik olarak düşüş vardır (9).

Yetişkin hastalarda vertebra tutulumlarında Gram negatif organizmaların, travma sonrası gelişen osteomiyelitlerde miks floranın, eroin bağımlılarında *Pseudomonas*'ın, uzun süre hastane ortamında kalarak kataterize edilen hastalarda fungal etkenlerin ve hemglobinopatili hastalarda *Salmonella* cinsi bakterilerin rol oynadığı bilinmektedir (9).

Yenidoğan enfeksiyonlarında B grubu streptokoklar, özellikle çocuklarda ayakta oluşan delici yaralanmalar sonrasında *Pseudomonas* etkeni düşünülmelidir. Anaerob bakterilerin neden olduğu enfeksiyonlar giderek artmaktadır ve mutlaka bu etkenler de akılda tutulmalıdır.

Osteomiyelit gelişiminde rol oynayan etkenlerden, insanın normal mukoza ve

cilt florası sıklıkla göz ardı edilir (2). Normal florada, çevredeki vaskülarite, pH, oksijen seviyesi, sıcaklık gibi parametreler kılavuzluğunda, insanın yaşamı boyunca genellikle durağan olan bu mikroorganizmalar zaman zaman zararlı mikroorganizmalar ile yarışarak immüniteyi desteklerken, bazen de bu mikroorganizmalarla hastalığı ortaya çıkaran etken olarak karşılaşılır. Ortopedik enfeksiyonlarda en çok cilt florası konu edilip, perine, parmak araları, koltuk altı gibi muhafazalı alanlar, gövde ve kol gibi açıktaki alanlara nispeten daha çok mikroorganizma bulundurulur. Isı, cilt üzerindeki yağ tabakası, ter çoğaldıkça gram negatif bakteri görülme ihtimali de yükselir (2)

Protez operasyonlarından sonra yara yeri enfeksiyonlarında S.aureus (çoğu kez perine ve burun kavitesinde bulunup floranın ortalama olarak %10-40'ını kapsar) ve S.epidermidis (normal aerobik cilt florasında dominant mikroorganizma) en sık etkenler olup, postoperatif dönemde yara yeri enfeksiyonu görülme olasılığı ortalama %2'dir (8). Dermatolojik rahatsızlığı olanlarda cilt bariyer görevini yitireceğinden S.aureus'un kolonize olma durumu %80'lere kadar çıkabilmektedir. Ayrıca normal cilt florasında gram negatif basiller, propionibakteriler, streptokoklar da kendilerine yer bulmaktadır. Deri eklerinden olan tırnağın çevresi, periungal bölgenin florasında ek olarak Mucor, Aspergillus, Penicillum tipi mantarlarla da karşılaşılır. Oral kavitede viridans streptokoklar ve beta-hemolitik streptokok suşları ağırlıklı olarak kendilerine yer bulur. Dental girişimlerin ertesinde bu floranın ortalama %25'i geçici olarak kana karışmakta olup, bu tür girişimler, özellikle protezi olan hastalarda profilaktik antibiyotik uygulamasını icap ettirir (11,12). Preoperatif uygun bir dezenfektanla yapılacak cilt temizliği ile sebace bezler ve kıl foliküllerindeki mikroorganizmalar tamamen eradike edilemese dahi miktarları önemli ölçüde düşürülebilir.

Tablo 2.2. Sık görülen osteomyelit etkeni mikroorganizmalar ve ilişkili klinik durum

<u>Mikroorganizmalar</u>	<u>İlişkili klinik durum</u>
<i>S. aureus</i>	Tüm osteomyelitlerin en sık nedeni
<i>Koagülaz(-) stafilokoklar</i>	Ortopedik fiksasyon aletleri varsa
<i>Streptokoklar</i>	Diabetes mellitus, ısırık yaraları (yenidoğan GBS)
<i>Enterobacteriaceae</i>	Nozokomial enfeksiyon veya Kontamine açık kırıklar
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	IV ilaç kullanıcıları, yenidoğanlar
Anaerob bakteriler	Diabetik ayak yaraları ile ilişkili osteomyelitler, insan ve hayvan ısırıkları
<i>Salmonella spp, Streptococcus pneumoniae</i>	Orak hücreli anemi

2.3.3 Bakterilerin Patojenite Özellikleri

Bağışıklık sistemi sağlam olan bireylerde enfeksiyon oluşması için gereken bakteri sayısı, lokal ya da sistemik problemleri olan hastalara göre çok daha fazladır. Yapılan çalışmalar doğrultusunda deney grubunun en az %50'sinde hastalık oluşturabilecek bakteri miktarları belirlenebilir. Genelde bu miktar 10^{6-8} cfu/ml olarak hesaplanmıştır. Çalışmalar bu değerin insanlar için çok daha düşük düzeylerde olduğunu tahmin etmektedir (7).

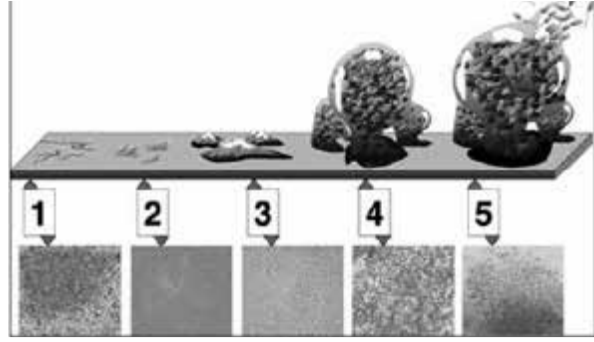
Osteomyelitinin en sık rastlanan etkeni olan *S.aureus*; osteoblastlara yerleşip hücre içinde small-colony variants olarak adlandırılan bir süreçle metabolizmasını değiştirerek ortama adapte olur (19,20). *S.aureus* kemiğin yapısında yer alan kollajen olmayan osteonektin, osteokalsin, proteoglikan ve sialoprotein gibi protein yapıtaşlarını hedef alır. Protein-A salgısı ile kompleman sistemini inhibe eder ve nötrofilleri lizise uğratan lökosidin adlı maddeyi üretir (2).

Kollajen bağlayan protein ve fibronektin bağlayan protein yapıları, *S.aureus* ve *S. Epidermidis*'in patojenitesini etkiler (21,22).

Ortopedik cerrahilerden sonra ortaya çıkan enfeksiyonlarda önemli virülans faktörlerinden biri organizmanın biyomateriyallere ve organik dokulara adhezyon ve biyofilm oluşturma kapasitesi olup, biyofilm, bakterilerin birbirlerine ve materyallere bağlanarak oluşturduğu polisakkarit yapılı, jele benzeyen bir tabakadır (20). Biyofilm

yapısı, konağın immun sistem elemanlarının ve tedavi amacıyla kullanılan antibiyotiklerin organizmalara ulaşmasını engelleyen bir tampon görevi görür (23,24). Vücuttaki biyofilmlerin çoğu cerrahi sırasında yapılan işlemler sayesinde cilt florasının derin dokulara ve implant üzerine kolayca erişebilmesi sebebiyle stafilokok grubu mikroorganizmalarca üretilir (20). Vücut içinde bulunan yabancı cisimler tanınır slime faktörü denilen yapıyı oluşturmak üzere laminin, fibronektin, vitronektin, kollajen ve fibrinojen içeren bir protein tabakası tarafından çevrilip mikroorganizma hem implanta hem de organik dokulara tutunma becerisi gösterebilir (12,22,25,26,27). Ayrıca stafilokokkal mikroorganizmaların çeperinde “microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules” (MSCRAMM) denen yapı, slime faktörü ile sıkı bir adhezyon yapıp glikokaliks tabaka (biyofilm) oluşur (2). Bu bağlantıda gram pozitif bakterilerin membran yapısında yer alan teikoik asit molekülü büyük yer alır (28,29). Biyofilm tabakasının ana maddesi temel olarak karbonhidrat grubu üyesi bir madde olan NAGA’dır (N-asetil glukozamin) ve iki farklı polisakkarit yapısı içerir. Polisakkarit interselüler adhezin (PIA) de denilen tip 2 polisakkarit yapısı interselüler agregasyonu düzenleyip, hidrofilik yüzeylere fizikokimyasal bağlarla tutunma özelliğine sahip olan mikrobiyal komponent olma vasfını taşır (30). Vücuttaki implanta tutunma iki aşamada olur. Birinci aşamada hidrofobik güçler, Van der Waals güçleri gibi fizikokimyasal çekimler ile mikrobun yüzeye adhezyonu (yapışma fazı), ikinci aşamada özel protein yapılarla slime faktörü oluşması ve bakterilerin birikmeye devam etmesi (birikme fazı) oluşur (31,32,33). Her adımda pek çok moleküler yapı rol alırken, “biofilm associated protein” her iki süreçteki ana yapıdır. Sonuçta implant yüzeyi çok tabakalı hücre yığınları içeren biyofilm tabakası ile örtülür (34,35,36,37).

Biyofilm tabakası düzeni incelendiğinde, arasından kanalların geçtiği mercan kayalıklarına benzeyen yapı ve mantar şekilli uzantılı bir oluşum görülmektedir. Bu kanallar aracılığı ile ortamdaki maddelerin kullanımı, atık maddelerin de uzaklaştırılması söz konusudur (38,39,40).



1. Dönüşümlü tutunma 2. Geri dönüşümsüz tutunma 3. Koloni gelişimi 4. Biyofilm olgunlaşması 5. Biyofilm hücrelerinin koparak ayrılması

Şekil 2.2 Biyofilm oluşma aşamaları (29. Kaynaktan alınmıştır).

2.3.4 Kronik Osteomiyelit Patogenezi

Kemikte nekroza sebep olan ve debridman gerektiren osteomiyelit formu kronik osteomiyelit olarak adlandırılabilir (41). Kronik olgularda enfekte ve nekroze kemik sekestr olarak tanımlanır. Bu dokunun reaktif olarak gelişen sklerotik kemik dokusuyla çevrelenmesi involukrum olarak tanımlanmıştır. Bu bölge mikroorganizmalar için bir yuva görevi görür. Kemik içindeki enfekte odak, sklerotik, skarlaşmış kas ve cilt altı dokusuyla ve kalınlaşmış periostumla çevrilmiş rölatif olarak avasküler kemikle sarılmıştır. Skar dokusunun bu avasküler kılıfı sistemik antibiyotikleri temelde etkisiz kılar (9). Enfekte zeminde zamanla yeni kemik oluşumu devam edeceğinden, involukrumun yoğunluğu ve kalınlığı artar. Bu oluşum enfeksiyonun devam ettiği süre boyunca haftalar ve aylarca devam eder. Hem endosteumdaki hem de involukrumdaki yeni kemik oluşumları zaman içerisinde medüller kanalı kapatır. Özellikle çocuklarda; vücut immün sistemi ile ya da cerrahi olarak sekestrumun rezeke edilmesi ile kalan ölü boşluk yeni kemik ile doldurulurken, erişkinlerde ise bu ölü boşluk fibröz doku ile dolar. Erişkinlerde genellikle bir sinüs traktı ile cilt yüzeyine açılım söz konusu olabilir (1).

Kronik osteomiyelitte ikincil enfeksiyon görülme oranı yaygındır. Sinüs traktlarından alınan örneklerde genellikle üreme gözlenir (42).

Fizik muayenede özellikle yumuşak dokuların durumu, kemik stabilitesi ve etkilenmiş ekstremitenin nörovasküler durumu dikkate alınmalıdır. Eritrosit sedimentasyon hızı ve c-reaktif protein çoğu hastada artar ancak laboratuvar bulguları genellikle osteomiyelit tanısı koymak için yeterli değildir. Kronik osteomiyelit tanısında altın standart yöntem etkilenmiş kemikten histolojik ve mikrobiyolojik

tetkikler için alınacak biyopsi materyalleridir. (2)

Tanı yöntemlerinden düz radyografler başvurulacak ilk tetkik olmalıdır. Kemikteki periost reaksiyonları, kortikal yıkım osteomiyelit tanısını destekler. Bilgisayarlı tomografi sekestrum dokusunun ayrıntılı incelemesi için çalışılabilir. Sinografi; sinüs traktı varlığında sinüs yolunu detaylı göstermesi açısından aydınlatıcıdır (9). MRG yumuşak doku durumu için kullanışlıdır. Kemik sintigrafisi artmış kan akımı ve osteoblastik aktiviteyi gösterir. Tc-99m kemik taraması spesifik değildir, lökosit işaretlenmiş Galyum taramaları bakterilerin olduğu bölgelerdeki artmış akımı gösterir ve daha spesifiktir. Indiyum-111 işaretli lökosit taramaları teknesyum veya galyum taramalarından daha sensitiftir (9).

2.3.5 Tedavi

Osteomiyelit tedavisi multidisipliner bir yaklaşım gerektirir. Tedavideki ana prensip nekrotik dokuların radikal bir şekilde temizlenmesi ölü boşlukların doldurulması ve uzun süreli uygun antibiyotik tedavisidir (9,41). Abse oluşmuş akut olgularda ve kronik osteomiyelitte cerrahi esastır. Amaç sekestr, enfekte ve skar halindeki yumuşak dokuları debride etmek ve kemiğin kanlanması için uygun vasküler yatak oluşturmaktır. Debridmanın yetersiz kalması hastalığın tekrarlamasına, akut olguların kronik hale gelmesine sebebiyet verebilir. Debridmanlar ve geniş yumuşak doku rezeksiyonları sonrasında rekonstrüksiyon gerektirecek defektler oluşabilir. Böyle bir durum oluşması halinde plastik ve rekonstrüktif cerrahın tedaviye eşlik etmesi gerekecektir. Tedavinin en önemli basamaklarından olan antibiyoterapi için mutlaka enfeksiyon hastalıkları uzmanından görüş alınmalıdır. Enfeksiyon etkeninin ya da etken olabilecek bakterinin antibiyotik duyarlılığının belirlenmesi, uygun doz ve yeterli süre kullanımı için enfeksiyon hastalıkları uzmanının görüşü tedavide yol gösterici olmaktadır. Kullanılacak antibiyotiğin bakterisidal etkisinin yanı sıra, kemik dokusuna yüksek oranda penetre olabilmesi önemlidir. Yapılan çalışmalarda kemik dokusuna en iyi penetre olan antibiyotik olarak klindamisin gösterilmiştir. Kemiğe geçişi iyi olan diğer antibiyotikler vankomisin, nafsilin, tobramisin, sefazolin ve sefalotindir (7).

Tablo 2.3. S.aureus osteomiyelitinde antibiyoterapi seçenekleri

Etken	Tedavi	Doz
Penisiline duyarlı	Penisilin G	8-12 milyon U/gün; 4 saatte bir i.v
Penisiline dirençli	Nafsilin, oksasilin	150-200 mg/kg/gün; 6 saatte bir i.v
	Sefazolin	75-100 mg/kg/gün; 8 saatte bir i.v
	Klindamisin	15-20 mg/kg/gün; 8 saatte bir i.v
	TMP-SMX	8-10 mg/kg/gün; 8 saatte bir i.v
Metisilin dirençli	Vankomisin	20-30 mg/kg/gün; 12 saatte bir i.v
	Teikoplanin	12 mg/kg/gün; 3 doz 12 saat; daha sonra 24 saat ara ile

i.v: İntravenöz; TMP/SMX: Trimethoprim-sulfamethoxazole.

Tablo 2.4. Diğer bakterilerle ortaya çıkan osteomiyelitte antibiyoterapi seçenekleri

Etken	Tedavi	Doz
<i>Streptococcus spp.</i>	Penisilin G	8-12 milyon U/gün; 4 saatte bir i.v
	Sefazolin	75-100 mg/kg/gün; 8 saatte bir i.v
	Klindamisin	15-20 mg/kg/gün; 8 saatte bir i.v
Enterik Gram negatif basiller	Siprofloksasin	1.5 g/gün; 12 saatte bir i.v
	Sefotaksim, seftizoksım	75-100 mg/kg/gün; 8 saatte bir i.v
	Seftazidim, sefoperazon	
	Seftriakson	1-2 g/gün i.v
	İmipenem	2-4 g/gün; 6 saatte bir i.v
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Piperasilin-tazobaktam	4.5 g/gün; 8saatte bir i.v
	Sefepim	2 g/gün; 8saatte bir i.v
	İmipenem + aminoglikozid*	500 mg/gün; 6 satte bir i.v
	Seftazidim + siprofloksasin	75-100 mg/kg/gün; 8 saatte bir i.v + 400 mg/gün; 12 saatte bir i.v
Anaerob	Metranidazol	2 g/gün; 6 saatte bir i.v
	Klindamisin	2-4 g/gün; 6 saatte bir i.v
Mikst enfeksiyon	Amoksisilin + klavulonat	3-4 g/gün; 8 saatte bir i.v /p.o
	Ampisilin + sulbaktam	8-12 g/gün; 4-6 saatte bir
	İmipenem	2-4 g/gün; 6 saatte bir i.v

i.v: İntravenöz; *: Aminoglikozidler günde tek doz uygulanır.

Ortopedik cerrahi işlemlerde uygun profilaksi kullanımı ile osteomiyelit önlenebilmektedir ve osteomiyelitin önlenmesi tedavisinden daha kolay ve ucuzdur. Ameliyat öncesi hazırlıklarda antimikrobiyal yıkama, dezenfektanlı sabunlar ile cildin temizliği, uygun saha temizliği (tırış, parmak araları ve koltuk altı gibi nemli bölgelerin izolasyonu vs.), laminar akımlı ameliyat odaları, profilaktik antibiyotik kullanımı enfeksiyon oranlarını %0.5'e kadar düşürmektedir (43).

Hiperbarik oksijen tedavisi son yıllarda özellikle diyabetes mellitusa bağlı osteomiyelit tedavisinde kullanılmaya başlanmış ve bu yöntemin etkili olduğu bazı yayınlarda bildirilmiştir. Bu tedavide doku oksijen konsantrasyonları artırılır ve böylelikle anaerob bakteriler yaşayamaz, artan oksijen miktarı fibroblast aktivitesine katkıda bulunur (44).

İlik içinden oyma (reaming) tedavi için bir seçenek olabilir. Bu yöntem ile lokal kan dolaşımının arttığı ve iyileşme sağlandığı bildirilmiştir (45). Oyma işlemi

sırasında akciğer embolisi riski olduğundan kan dolaşımını arttırıcı alternatif cerrahi metodlar tanımlanmıştır (46).

Lokal antibiyotik uygulamaları kronik osteomyelit tedavisinde yardımcı olarak kullanılabilir. Yapılan çalışmalarda ilk olarak kemik çimentoları içine antibiyotikler katılarak uzun süreli lokal yüksek konsantrasyonda salınım sağlanabileceği gösterilmiştir (47). Kemik çimentosuna hangi antibiyotiğin, hangi miktarda karıştırılacağı konusunda literatürde farklı görüşler mevcuttur. Genelde vankomisin ya da gentamisin kullanılmakla birlikte tobramisin ve daptomisin ile ilgili yapılan çalışmalar bulunmaktadır (48).

Biyolojik sindirilebilir materyaller içine antibiyotik katılması, kalsiyum fosfat gözenekli seramik bloklar içine antibiyotik emdirilerek kemik defekti olan bölgeye uygulanması gibi lokal salınım esaslı yöntemler son zamanlarda artarak uygulanmaktadır.

Lokal salınım ile kronik osteomyelit tedavisinde seçilecek olan antibiyotik ile ilgili; sorumlu ajana etkili olmalı, MİK (Minimum inhibitör konsantrasyonu) lokal salınım ile tercihen 10 kat daha fazla sağlanmalı, sistemik dolaşıma geçmemeli, yan etkisi çok az veya hiç olmamalı, vücut ısısında dengeli ve suda çözünebilir olmalı, süper enfeksiyona yol açmamalı gibi kriterler aranmalıdır (49). Tüm bu tedavilere rağmen uzun süreli osteomyelit hastalarında malignite gelişimi, majör arteriyel yetmezlik, majör sinir hasarı ve eklem fonksiyonunu bozan ciddi eklem sertliği oluşur ise son çare olarak amputasyon seçeneği gündeme gelebilir (9).

2.3.6. Osteomyelit Tedavisinde Nanoteknoloji Kullanımı

Latince “nanus” kelimesinden gelen nano kelimesi cüce anlamına gelmektedir. Bilim alanında nano kelimesinin günümüzdeki anlamı ise metrenin milyarda biri anlamına gelen teknik bir ölçü birimidir. Nanometre; bir metrenin milyarda biri ölçüsünde bir uzunluğu temsil eder ve bu da yaklaşık olarak ard arda dizilmiş 3 ya da 5 atom kadar eder (50).

Nanoteknoloji yaşayan sistemlere moleküler seviyelerde müdahale etme olanağı yaratabilir. Yaşayan organizmalar ile etkileşime geçebilecek boyutlarda araçlar üretilmesi ile birçok yeni teşhis ve sağaltım yöntemlerinin gelişmesi olasıdır. Sadece hastalığın bulunduğu ve yayıldığı bölgelere saldırarak ilaç veren makineler, insan vücudu içinde hareket edilmesine imkan sağlayan teşhis araçları,

nanoteknolojinin tıp ve sağlık sektörü üzerine potansiyel uygulamaları olarak gösterilebilir (51).

Nanoteknolojik gelişmelere paralel olarak nano boyuttaki materyallerin implant teknolojisinde kullanılması ile yeni jenerasyon ortopedik implantlar üretilmektedir. Bu implantlar antimikrobiyal ve osteokonduktif özellikte olup, böylece daha biyouyumludur. Yine nanoteknoloji sayesinde kemiğin ve kırıkdağın yerini alabilecek materyaller geliştirilmektedir. Nanomateryal implantlar özellikle osteokonduktif bir etki oluştururlar. Nano-seramikler bunun için uygun bir örnektir. Ayrıca nanoteknoloji ile birlikte kemiğin nanoboyuttaki yapısı incelenerek kemik benzeri greftler oluşturulmaktadır (52).

Son yıllarda nanoteknoloji ile ilgili yapılan çalışmaların artması ve bu alandaki ilerlemeler sonucunda osteomyelit tedavisinde yeni bir sayfa açılmıştır. Lokal biyobozunur taşıyıcılarda nano boyutlarda yapılan yüzey modifikasyonları ile birlikte yeni kemik oluşumu için iskele görevi gören biyoaktif, toksisite riskinin olmadığı ve antibiyotik salınımının çok iyi kontrol edilebildiği sistemler geliştirilmiştir (51,52).

2.4. Osteomyelit Tedavisinde İmplant Yüzey Modifikasyonları

Osteomyelitin profilaksi ve tedavisinde ortopedik implantların yüzey uyumluluğunu desteklemek ve osteoindüktif malzemeler üretmek için yüzey modifikasyonları uygulanmıştır. Günümüze kadar implantların yüzeylerindeki bakteri tutunmasını engellemek amacı ile farklı yüzey modifikasyonları araştırılmıştır. Bu modifikasyon yöntemleri arasında istenilen fonksiyonları elde etmek amacı ile yüzeye malzeme ilave edilmesi, yüzeyin kimyasının ve topografyasının değiştirilmesi ve yeni topografya için geçerli yüzeyden malzeme ulaştırılması sayılabilir (49).

Bakteri kolonizasyonunun engellemek amacı ile yüzey modifikasyonlarında hidrofilik poliüretanlar, polietilen glikol ve polietilen oksit gibi polimerlerin kullanımı denenmiştir. Bu polimerler pasif kaplamalardır ve implant yüzeyine bakteri yapışmasını fizikokimyasal özellikleri azaltmaktadır. Ancak etkileri kısıtlıdır.

Birkaç yıldır devam eden çalışmalar ile implantların mikrobiyal kontaminasyonunu kontrol etmek ve engellemek amacı ile yeni yöntemler

geliştirilmiştir. Bu yöntemler arasında en etkin olanı implant yüzeylerine antimikrobiyal özellik kazandırılmasıdır. Birçok farklı yüzey modifikasyonu ve kaplama teknikleri kullanılabilmektedir. İmplant yüzeylerinin antimikrobiyal etkiye sahip olabilmesi için; implant yüzeyine direkt antibiyotik emdirilmesi, antimikrobiyal ajanların immobilizasyonu, nitrikoksit (NO) içeren malzemeler, titanyum dioksit (TiO₂) filmler ve bakır gibi aktif ve antimikrobiyal etkiye sahip metaller ile kaplanması gibi yöntemler araştırılmıştır (49).

Gümüş antimikrobiyal etkinliği iyi bilinen bir elementtir ve tıpta damar, üriner ve peritoneal kateterler, damarsal greftler, kalp kapak protezleri ve dikiş materyalleri gibi malzemelerde kullanılmaktadır. Literatürde bazı yazarların in-vitro başarılı sonuçlar bildirmelerine karşın, bazı yazarlar da çalışmalarında gümüş kaplı tıbbi implantların enfeksiyona karşı başarısının gösterilemediğini bildirmişlerdir. Gümüş kaplı implant yüzeylerinden yetersiz gümüş salınımı ya da hiç salınamaması ile potansiyel gümüş toksisitesinin neden olduğu kısıtlamalar literatürdeki çelişkili sonuçların görülmesinin olası nedenidir (53).

2.4.1 Antibiyotik Emdirilmesi

Ortopedi ve travmatolojide enfeksiyon profilaksisinde veya tedavisinde antibiyotikler sistemik olarak kullanılabileceği gibi, lokal olarak da kullanılabilmektedir. Bu sayede hedef dokuda yüksek konsantrasyon sağlanırken sistemik yan etkiler azaltılmış olur. Antibiyotiklerin lokal uygulanmasında taşıyıcı olarak en sık kemik çimentosu kullanılmaktadır (54). Ancak bunun yanında kollajen, apatit-cam seramikler, fibrin örtüleri, polilaktik/poliglikolik implantlar kullanılabilmektedir. Ancak bu taşıyıcıların elde edilmesi daha zordur, maliyetleri daha yüksektir ve etkileri sınırlıdır (55).

2.4.2 Kalsiyum Fosfat Seramiklerin Kullanımı

Seramikler genellikle inorganik, non-metalik materyaller olarak bilinir. Seramiklerin ortopedideki majör uygulamaları total kalça ve diz replasmanı ile ilgilidir. Bunun dışında seramik kompozitler kemik iyileşmesini arttırmak için tek başlarına ya da osteojenik, osteoindüktif veya osteokondüktif özellikteki başka materyallerle birlikte kullanılabılır. Ayrıca seramikler antibiyotik taşıyıcısı olarak da kullanılabılır. Seramiklerin metallere göre en önemli avantajı , konak doku ile

biyolojik etkileşime girebilmesidir. Seramiğin biyoaktivitesi, eğer hücre ya da büyüme faktörü taşımıyorsa, osteokondüktivite ile sınırlıdır. Gözenekli bozunabilir seramikleri kemiğe implante etmenin temel amacı defektif bölgede doğal doku replasmanını sağlamaktır (56).

Hidroksiapatit, trikalsiyumfosfat, oktakalsiyum fosfat bu yapılara örnek olarak verilebilir.

Hidroksiapatit (HAP) ortopedik cerrahide kullanılan metalik implantların biyoaktivitesini arttırmak amacıyla implantların yüzeyine kaplanabilmektedir. HAP ile kaplı implantlarda metal iyon salınımı azalmakta, indüklenen osteointegrasyon sayesinde hızlı kemik oluşumu ve bu sayede güçlü bir kemik-implant tutunma yüzeyi elde edilmektedir (56). Bu avantajların yanı sıra, hidroksiapatit kaplamanın enfeksiyon açısından olumsuz yönlerinin de bulunduğu bildirilmiştir. Birçok çalışma hidroksiapatit kaplamanın yüzey pürüzlülüğü yarattığını, hidrofobik bir ortama neden olduğunu, yüzeyin elektrik yükünü elektropozitifleştirdiği için enfeksiyon riskini arttırdığını bildirmiştir (57). Literatürde bu görüşe karşı çıkan çalışmalar da mevcuttur. Moroni ve arkadaşları hidroksiapatit kaplı eksternal fiksator çivilerinin çivi yolu enfeksiyonunu azalttığını, bu işlemi implant kemik ara yüzeyini azaltarak sağladığını belirtmişlerdir (58). Yapılan bir başka çalışmada Opalchenova ve arkadaşları invitro ve invivo çalışmalarda kalsiyum fosfat seramiklerin antibakteriyel etkinlikte olduğunu vurgulamışlardır (59).

2.4.3 Nitrik Oksit İçeren Sistemler

Bir implantın etrafında antibakteriyel ortam oluşturmak için kullanılan bir diğer yöntemde nitrik oksitin (NO) implant yüzeyinde serbest bırakılmasıdır. NO yüksek reaktiviteye sahip iki atomlu bir radikaldır. Adhezyonu ve agregasyonu engellemektedir. İn vitro çalışmalar ile NO'nun potansiyel bir antimikrobiyal ajan olduğu ve gram-pozitif, gram-negatif bakterilere karşı etkin olduğu kanıtlanmıştır (60). NO konsantrasyon bağımlı olarak implant kaynaklı enfeksiyonların engellenmesinde kullanılabilecek bir yöntemdir. Ancak NO'nun kan ve doku sisteminde düşük yarı ömre sahip olması ve bakterisidal aktivite mekanizmasından dolayı bakteri dayanımı gelişiminin kısıtlı olması kullanımını engellemektedir (61).

2.4.4 Titanyum Dioksit Filmler

Yapılan çalışmalarda ortopedik cerrahide biyouyumluluğu ve korozyon dayanımından dolayı yaygın olarak kullanılan titanyum ve titanyum alaşımı implantların ultraviyole radyasyona tabi tutularak fotoaktif film oluşumu sağlanmıştır. Bu işlem sonrasında titanyumun osteokondüktif etkisinin arttığı ve osteoblast sayısının çoğaldığı saptanmıştır.

TiO₂ kaplanmış implantlar ile kaplanmamış olan implantların antimikrobiyal özelliklerinde büyük bir farklılık gözlenmemiştir. İki malzeme de antibakteriyal etkiye sahiptir ve sitotoksik etkileri bulunmamaktadır. İmplant yüzeyini kaplayan TiO₂ filmi çok ince olsa bile antimikrobiyal ajan görevi görmektedir (62).

2.4.5 Gümüş ve Gümüş İçeren Kaplamalar

Gümüş Latince Argentum kelimesinden gelen periyodik cetvelde Ag simgesi ile gösterilen, beyaz, parlak, değerli, metal elementidir. Özağırlığı 10,5 g/cm, erime noktası yaklaşık 961,9 derece, kaynama noktası 1950 derece olup çoğu kez +1 değerlikli olarak bileşiklerde yer alır.

Gümüşün antimikrobiyal etkisi ilk olarak Yunan tarihinde Herodot'un yazılarında içme suyunun temizlenmesi amacı ile kullanımı olarak karşımıza çıkmaktadır. Tıp alanında kullanımı ise VIII. Yüzyıldan itibaren yaygınlaşmış, Hipocrates gümüş preperatlarını ülser tedavisi ve yara iyileşmesini desteklemek amacı ile kullanmıştır. Gümüşün medikal kullanımı eskiden beri bilinmektedir. Oftalmia neonatarum profilaksisinde ve yanıklı hastalarda yara yeri bakımında gümüş uzun zamandan beri kullanılmaktadır (63,64).

Gümüşün tıpta kullanımının böylesine eski bir tarihi olmasına rağmen implantların yüzeylerinin kaplanması için kullanımı özellikle son yıllarda önem kazanmıştır ve bu konuyla ilgili pek çok araştırma yapılmaktadır. Bu çalışmalarda amaç implant ilişkili enfeksiyonların önüne geçilmesidir. Bu amaca yönelik olarak kataterler ve özellikle ortopedik implantların yüzey kaplamalarında gümüş içeren sistemlerin kullanılması giderek artan oranlarda ilgi çekmektedir.

Gümüşün implant yüzeyi kaplamasında tercih edilmesinin nedenleri, kullanılan dozlarda lokal ve sistemik toksik etkilerinin görülmeysi, etkisinin uzun süre korunabilmesi ve bakteriyel direnç göstermemesidir. (53,65,66).

İmplant yüzeylerinin gümüş ile kaplanmasındaki amaç özellikle implant

ilişkili enfeksiyonların ortadan kaldırılması veya sıklığının azaltılmasıdır. Yapılan birçok çalışmada metal implant yüzeylerinin gümüş ile kaplanması antibakteriyel etki göstermiş olup, toksik etki görülmemiştir (67,68).

Gümüşün bir diğer avantajı birçok farklı madde ile birlikte kullanılabilmesidir. Literatürde gümüş katkılı hidroksiapatit kaplamalar, gümüş-hidroksiapatit-titanyum kaplamalar, gümüş-titanyum kompozit filmler gibi farklı kombinasyonlarda çalışmalara rastlamak mümkündür (52,69).

İmplantların gümüş ile kaplanmasının pek çok farklı şekli mevcut olup başlıcaları; elektrolitik gümüş kaplama yöntemi, sol-jel yöntemi, sputter yöntemi, plazma sprej kaplama yöntemi, elektro sprej yöntemi ve daldırma (dip-coating) yöntemidir (70).

Gümüşün yüksek konsantrasyonda kullanımı sonucu oluşan toksik etki neticesinde görülen tabloya “arjiri” denilmektedir. İbni Sina 10. Asrın sonuna doğru gümüş içerikli tabletler halinde gümüş kullanıp bunu da kötü ağız kokusunu önleyici, kan temizleyici, çarpıntı giderici amaçla reçete etmiştir. Diğer taraftan, oral gümüş alımı ertesinde skleral mavimtrak diskolorasyon ile beliren belki de kayıtlı ilk arjiri vakasını da bildirmiştir (71).

Tıbbi kullanım ya da mesleki temas sonrası gelişen arjiri irdelenirse, Gettler ve arkadaşlarının, gençliğinde gümüş madeninde çalışan ve tüm vücudu gri-mavi renge büründüğü için sirklerde “mavi adam” olarak sunulan 70 yaşında bir insandan, Blumberg ve Nelson’un, cilt rengi gri-mavi olan bir hastayı kurşun intoksikasyonu öntanısıyla tetkik ettiklerinde, yapılan spektrofotometrik incelemeler neticesinde, kanda 0,5 mikrogram/ml gümüş (normalde 0,5 ng/ml seviyesinde –binde bir oranında- olması beklenir) tespit edilip bu durumun sebebi irdelendiğinde de, bu hastanın anamnezinde gastrointestinal semptomları için günde 3 defa 16 mg’lık gümüş nitrat kapsülleri aldığından bahsettiklerini görmekteyiz (72, 73).

Literatür incelendiğinde gümüşün normal aralıkları şu şekilde verilmiştir (74,75):

Serum: $2,1 \pm 1,5 \mu\text{g/L}$ ($19,5 \pm 13,9 \text{ nmol/L}$)

Plazma: $0,68 \pm 0,33 \mu\text{g/L}$ ($6,3 \pm 5,8 \text{ nmol/L}$)

Saf trombosit: $29 \pm 18 \text{ ng/gram}$ (ıslak ağırlık) ($269 \pm 167 \text{ nmol/gram ıslak ağırlık}$)

24 saatlik idrar: < 1µg/gün (<9,3 nmol/gün)

Saç kılı: 0,02-1,00 µg/gram (kuru ağırlık) (0,2-9,3 nmol/gram)

Gümüşün Antimikrobiyal Etki Mekanizması

Gümüş iyonlarının antimikrobiyal etkisi onların enzim ve proteinlerindeki tiyol (sülfidril, -SH) gruplarıyla yakın ilişkisine bağlıdır. İntrasellüler gümüş, bakterinin enerji metabolizmasını bloke etmekte olup fosfat, sülfidril, karboksil, amino ve imidazol gruplarına affinitesi olup nihayetinde; prokaryot canlılarda DNA çoğalmasını bloke ederek mitoz bölünmeyi engellemektedir. Sellüler membranın selektif permeabilite özelliğini kaybettirip hücrenin konjesyone olup neticede lizisine yol açar, dokudaki mevcut proteinler ile etkileşime girip ya da gümüş klorid kompleksleri oluşturarak, proteolitik bakterilerin mitozu için esansiyel olan çevrenin yapısını bozar (66,72).

Psuedomonas Aeroginosa'nın bölünmesini inhibe eder; hücre zarı ve içeriğini bozar. Virüsit etki -SH gruplarına bağlanma sonucunda oluşur. Mantar gruplarına bağlanarak bunlar üzerinde etkili olur. Gümüş mikroorganizmalardan potasyum salınımına neden olur; sitoplazma ve sitoplazma membranındaki pek çok enzim gümüş etkisinin hedef yeridir (66,75).

Gümüşün antibakteriyel etkinliği gümüş konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Yüksek gümüş konsantrasyonlarında antibakteriyel etki artmaktadır. Gümüş birçok bakteriye karşı antibakteriyel etki göstermektedir. Kemik ve cerrahi alan enfeksiyonlarından sorumlu olan en önemli bakteri *S. Aureus* bu bakterilerin başında gelmektedir.

Gümüşün stafilokoklar için minimum inhibitör konsantrasyonu (MIC) 0,5-10mg/L ve minimal bakterisidal etki konsantrasyonu (MBC) 2-20 mg/L'dir. *Psödomonas* ve *Gonokoklar*, *Stafilokoklara* göre daha kolay etkilenirler. Bunun sebebi, gram (+)'lerin mürein (peptidoglikan) duvarının (10 nm), gram (-)'lerin duvarından (2-3 mm) daha kalın olmasıdır. Gümüş yüksek konsantrasyonda iken bakterisidal etkiyi içeren emilim sürecinde mürein tabakasına geçer, bakterisidal etki gümüş-DNA-şelat kompleksi oluşmasıyla ortaya çıkar. Giderek artan hidrojen iyon konsantrasyonu bakteriyel müreinde yarışmalı olarak gümüş ile yer değiştirir (76).

Gümüşün antienfektif aktivitesinde, çevreye difüzyon yoluyla yayılan serbest haldeki gümüş iyonları ve gümüş bileşikler sorumlu tutulmaktadır. Gümüşün

kendiliğinden iyon salabilme özelliği mevcut olup, ortamda elektrik akımı varlığı olmasa dahi saf gümüş metali çevresinde zayıf bir antimikrobiyal etkinlik buludurmaktadır (72).

Gümüş iyonu elektrik kaynağının pozitif (+) ucuna bağlanırsa gümüş anot, negatif (-) ucuna bağlanırsa gümüş katod elde edilir. Bu şekilde gümüşün, ortama saldığı serbest iyon miktarı değişmektedir. Gümüş anot uygulamasında, gümüş elektrot pozitif kutuplandığı için elektrot yüzeyinden ortama salınan gümüş iyonu miktarı artar. Literatür incelendiğinde, gümüşe dirençli bakteri suşları bildirilmişse bile, gümüş anot'a dirençli bir bakteri suşu henüz rapor edilmemiştir (77).



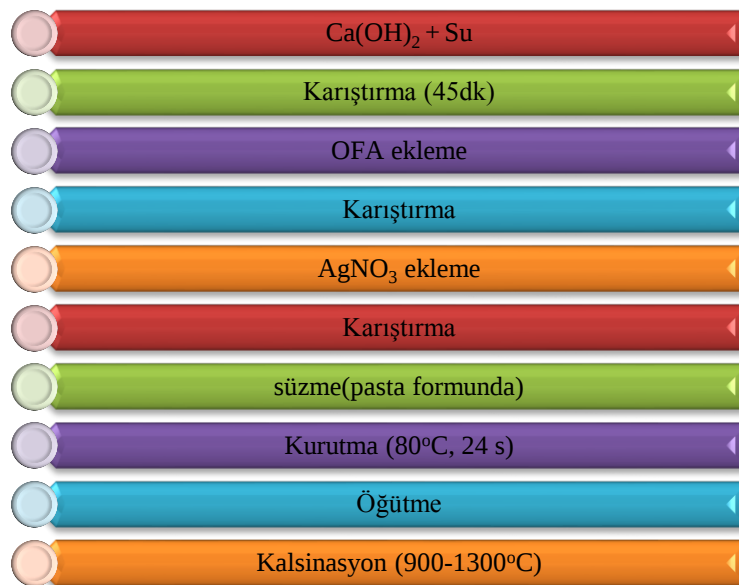
3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma “Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıbbi ve Cerrahi Deneysel Araştırma Merkezi” (TİCAM) bünyesinde yapılmış olup, çalışma için hayvan deneyleri yerel etik kurulunun 27.02.2013 tarihli, 174-1 karar numaralı öneri ve onayı alınmıştır. Aynı zamanda çalışma “Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu” tarafından “Özel Ödenekle Karşılanacak Projeler” kapsamında 2014-334 proje kodu ile desteklenmiştir.

3.1 Antibakteriyel Toz Sentezi

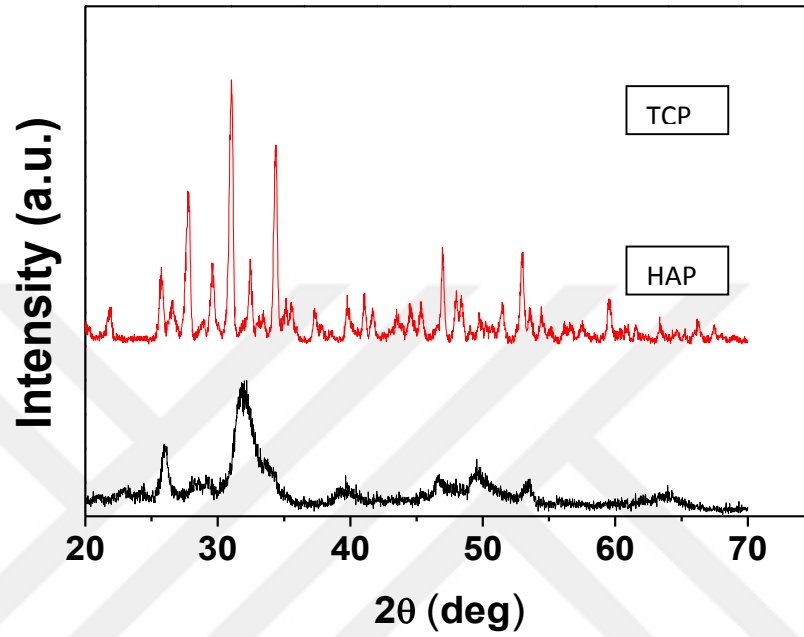
Çalışma için üretilen kalsiyum fosfat seramik yapıda greft implantları ve bu implantın gümüş içerikli antibakteriyel toz kaplaması Anadolu Üniversitesi Malzeme Bilimi ve Mühendisliği Bölümü’nde yer alan Elektro-seramik laboratuvarlarında yapılan çalışmalar sonucu oluşturulmuştur.

Antibakteriyel toz sentezinde başlangıç hammaddesi olarak Ca(OH)_2 (kalsiyum hidroksit) kullanılmıştır. İstenilen fazları oluşturmak için ısı işlem dışında sentez esnasında yapıya OFA (ortofosforik asit) ilave edilmiştir. Sisteme antibakteriyel özelliği kazandıran ise AgNO_3 (gümüş nitrat) ilavesi ile beraber ortama yayılan Ag (gümüş) iyonlarıdır. Toz sentezi üretimi tamamlandıktan sonra toza ısı işlem uygulanmıştır. Hidroksiapatit (HAP) ve Trikalsiyum fosfat (TCP) gibi istenilen fazların oluşması sağlanmıştır.



Şekil 3.1. Antibakteriyel toz üretim akım şeması

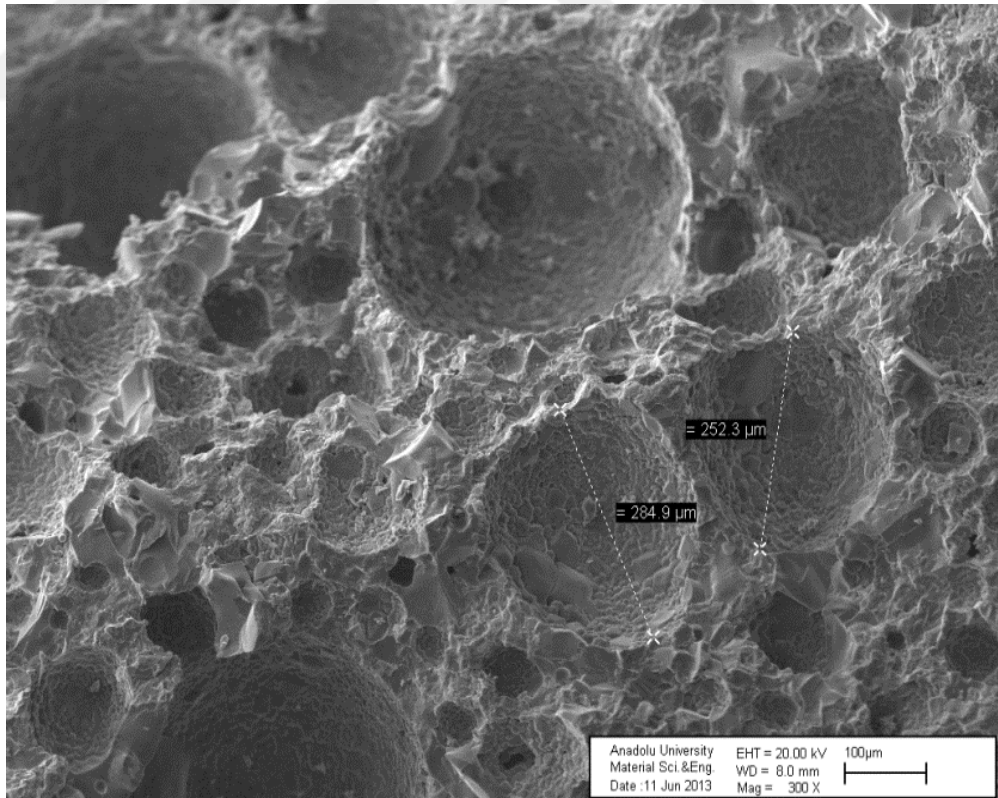
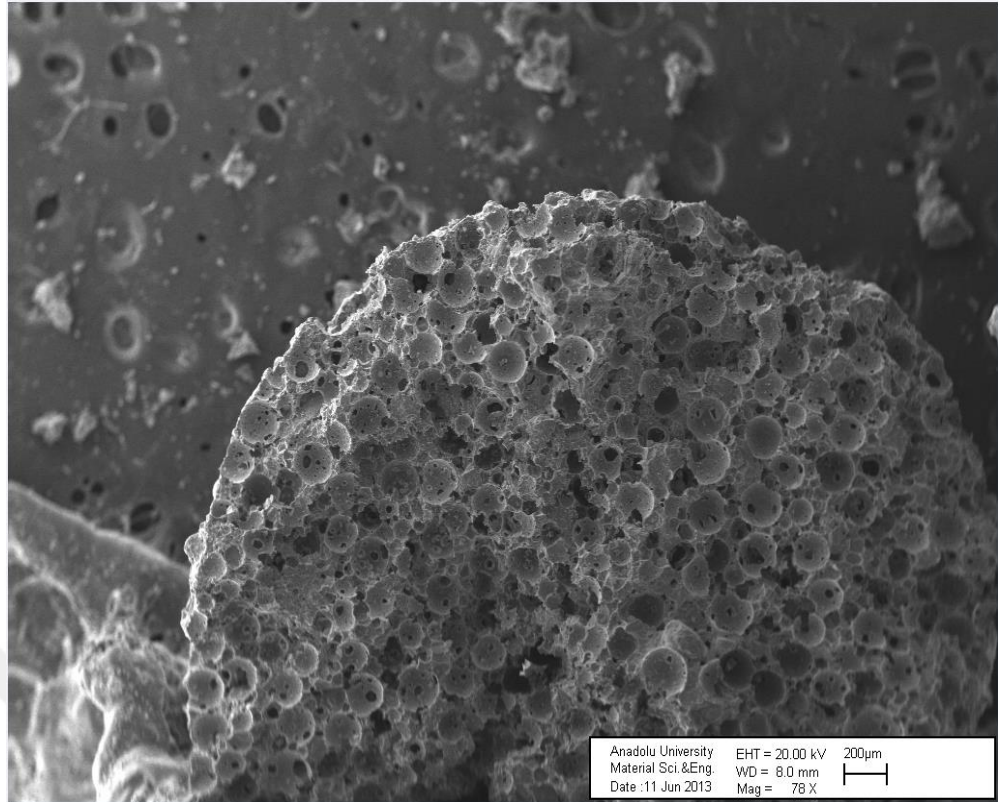
Isıl işlemten sonra yapıda oluşan fazları analiz etmek için XRD (X-Ray Diffarction) tekniği kullanılmaktadır. Şekil 3.2’de HAP ve TCP fazlarına ait XRD örgü desenleri verilmiştir.



Şekil 3.2 Antibakteriel tozun XRD örgü deseni

3.2 Gümüş İyon Katkılı Kalsiyum Fosfat Seramik Boncukların Üretimi

Kalsiyum fosfat esaslı porous boncuklar pletizer yöntemiyle üretilmişlerdir. İstenilen faz oranları ile birlikte tozun yaklaşık %1’ i kadar organik bağlacı ilave edilmiştir, bununla birlikte yapıya poly strene bilyeler ilave edilerek yapının boşluklu olması sağlanmıştır. Üretilen boncukların faz oluşumları ve yapının stabil olması için yaklaşık 1200-1300°C sıcaklıkları arasında sinterlenmişlerdir. Sinterlenen boncukların kırık yüzey mikro yapıları ve oluşan boşlukların boyutları SEM (Taramalı Elektron Mikroskopu) ile incelenmiştir. Şekil 3.3’de kırık yüzey boncukların SEM görüntüleri verilmiştir. Farklı sıcaklıklarda sinterlenen boncukların elemental analizleri için XRF tekniği kullanılmaktadır. Bu teknik ile yapıda ne kadar Ag kaldığını tespit etmek mümkündür. Tablo 4.1’de farklı sinterleme sıcaklıklarındaki XRF sonuçları verilmiştir.



Şekil 3.3. Kırık yüzey SEM görüntüsü ve porların boyutları

Tablo 3.1. Sıcaklığa bağlı Ag miktarının değişimi

Name	initial	900	1000	1100	1200	1300
TCP	4,32 µgr	4,31 µgr	-	4,30 µgr	3,97 µgr	3,96 µgr
HAP	4,97 µgr	4,68 µgr	4,6 µgr	4,38 µgr	4,1 µgr	-

3.3 Hayvan Modelinde Çalışma Planı

Yapılması planlanan hayvan çalışması öncesinde gerçekleştirilecek olası sorunları görmek ve bunlara çözüm üretebilmek adına ilk etapta pilot çalışma yapıldı. Pilot çalışma sırasında hayvanların cerrahi işlemlerinin nasıl yapılacağı, hangi cerrahi aletlere ihtiyaç duyulacağı, hayvanların barınmasında karşımıza çıkabilecek problemler ve hayvanların ne kadar süre canlı kalabileceği gibi nihai çalışma sırasında önümüze çıkabilecek sorunlar gözlemlendi ve çözümü kararlaştırıldı. Ayrıca çalışma multidisipliner olarak planlandığından Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı ile Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nın öneri ve görüşleri not edilip esas çalışma sırasında bu önerilere uyuldu. Sonuç olarak pilot çalışma sonrasında cerrahi aletler, kullanılacak tıbbi malzemeler, deney hayvanları, barınma materyalleri net olarak tanımlandı ve temin edildi. Ardından Anadolu Üniversitesi Malzeme Bilimi ve Mühendisliği Bölümü'nde yer alan Elektro-seramik laboratuvarlarında yapılan çalışmalar sonucu Gümüş İyon Katkılı Kalsiyum Fosfat Seramikleri üretildi. Zaman planlanması yapıldı ve çalışma başladı.

Çalışma 3 aşama olarak planlandı. İlk aşamada tavşanlarda kronik osteomyelit modeli oluşturuldu. Kronik osteomyelit tanısı mikrobiyolojik, klinik ve radyografik tetkikler ile kanıtlandı. Ardından tavşanlar üç gruba ayrıldı ve üç ayrı tedavi yöntemi ile kronik osteomyelit tedavi süreci 10 hafta takip edildi. Takip süresinin belirlenmesinde esas kriter olarak hayvanların genel durumu göz önünde bulunduruldu. Hayvanlara takip süresince ek antibiyoterapi verilmediğinden dolayı bazı hayvanlarda sepsis benzeri tablo oluşmaya başladığından etik değerler göz önüne alınarak çalışma takibin onuncu haftasında sonlandırıldı. Ardından tavşanlar kurban edilerek uygun histolojik, mikrobiyolojik örnekler alındı.

Çalışma için 24 adet Yeni Zelanda türü ortalama 2 kg ağırlığında tavşan

temin edildi. Barınma ihtiyaçları için standartlara uygun olarak kafesler temin edildi. Hayvanlar “Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıbbi ve Cerrahi Deneysel Araştırma Merkezi” (TİCAM) bünyesinde opere edilip cerrahi öncesi ve cerrahi sonrası bakımları burada yapıldı. Yem, su gibi barınma ihtiyaçları TİCAM personelleri tarafından karşılandı. Tüm cerrahi işlemler veteriner hekim gözleminde gerçekleştirildi.

Tüm hayvanlara cerrahi müdahale öncesi, anestezi protokolü olarak atropin premedikasyonundan 15 dakika sonra xylazine 5 mg/kg intramusküler ve ketamin 50 mg/kg intramusküler olarak uygulandı. Anestezi işlemi TİCAM sorumlu veteriner hekimi gözetiminde gerçekleştirildi.

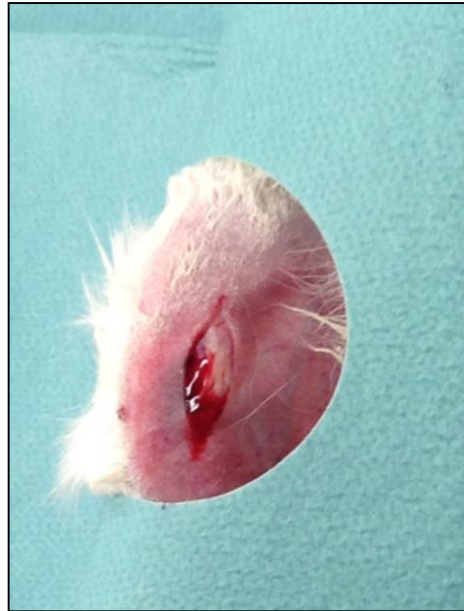
3.3.1. İlk Aşama - Deneysel Kronik Osteomyelit Oluşturulması

Çalışmanın ilk aşamasında tüm tavşanlarda osteomyelit oluşturulması planlandı. Bunun için fakültemiz Tıbbi Mikrobiyoloji bölümü tarafından her denek için 10^8 cfu S.aureus suşları hazırlandı.

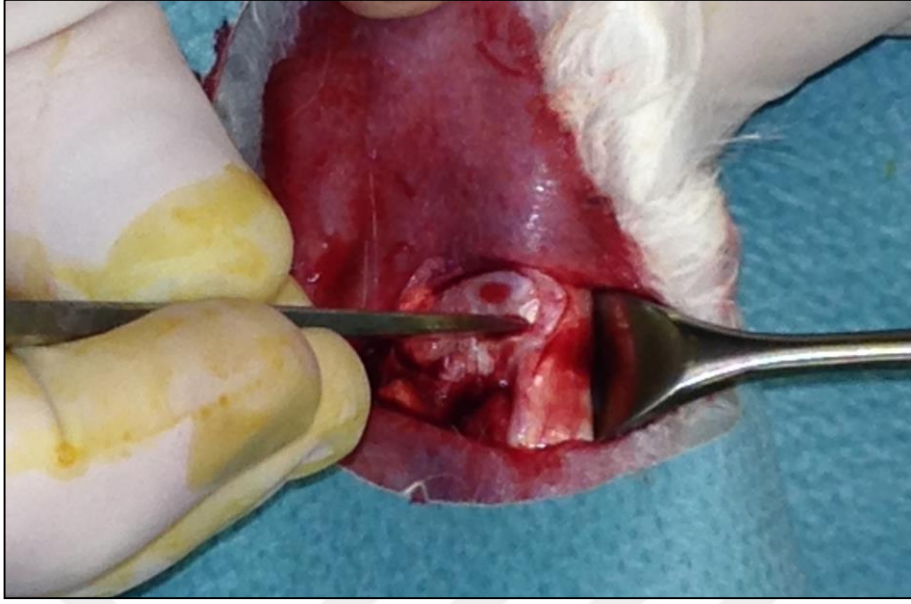
Tüm tavşanlarda olası karışıklığı engellemek için sağ tibialara cerrahi müdahalede bulunuldu. Uygun saha temizliğini takiben, tibia proksimal medialde yaklaşık olarak tibial tüberosit seviyesinden baldır uzun eksenine boyunca yaklaşık 3 cm’lik cilt kesisi yapıldı. Periost sıyrıldı. Ardından yaklaşık 1 cm²’lik bir kortikal kemik pencere osteotom yardımı ile kaldırıldı. Kaldırılan korteks, kemikte nekroz oluşturarak osteomyelit gelişimine zemin hazırlaması amacıyla hazırda bekletilen kaynamış serum fizyolojik solusyonunun içine atılarak haşlandı. Açılan tibia medullasına 10^8 cfu Metisiline Dirençli Staphylococcus Aureus (MRSA) suşları uygun şekilde enjekte edildi ve kaynatılan korteks ile kemik pencere kapatıldı. Cilt altı 3/0 vicryl ve cilt 3/0 kalınlığında prolen dikiş iplikleriyle primer olarak kapatıldı. Tavşanların dikişlere zarar vermemesi için pansuman yapıldı ve cerrahi işlem sonlandırıldı.



Şekil 3.4. Tavşan tibiasının anestezi sonrası uygun saha temizliği ve batikon ile temizlenmesinin ardından cerrahi işleme hazırlanması



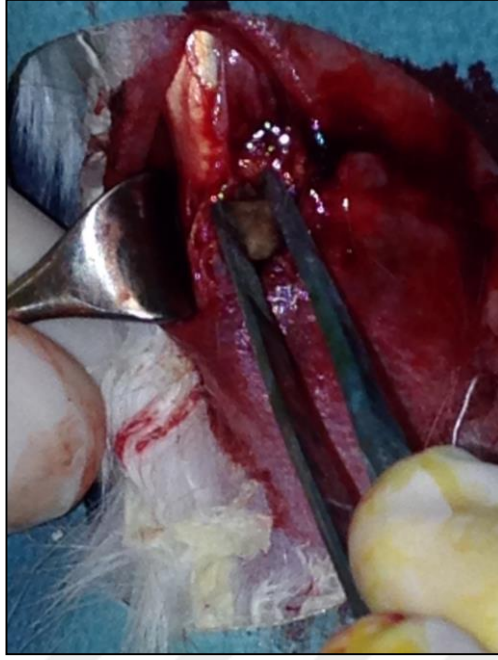
Şekil 3.5. Tibia proksimal medialden longitudinal cilt insizyonu



Şekil 3.6. Tibiada osteotom yardımı ile kemik pencere açılması

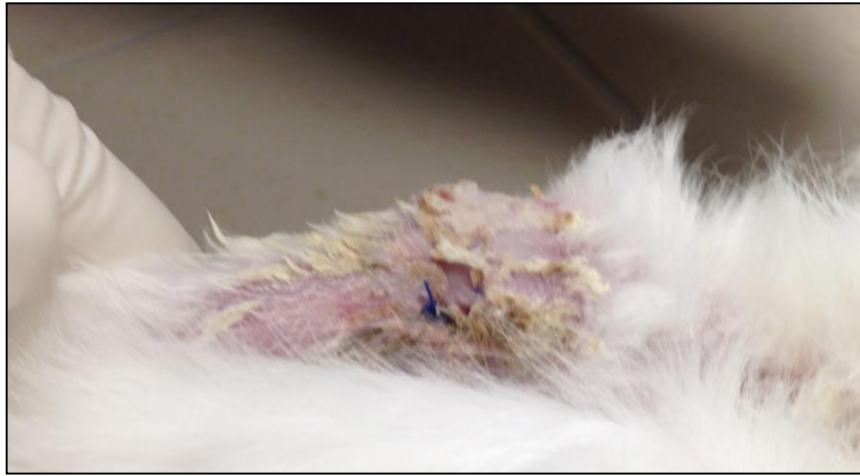


Şekil 3.7. Çıkarılan kemik pencerenin kaynatıldıktan sonraki görünümü



Şekil 3.8. Kaynatılan kemik korteksin tekrar kapak olarak yerleştirilmesi

Çalışmanın bu ilk aşamasında 24 tavşana da aynı işlem uygulandı ve herhangi bir gruplandırma yapılmadı. Kronik osteomyelit gelişimi için *S.aureus* ekimi yapılan bu cerrahi işlemlerden sonra tavşanlar gözlem altına alındı. Ağrı kesici olarak, yapılan literatür çalışması sonucunda flunixin meglumin (Fundamin, Bavet İlaç Sanayi) 0,5 mg/kg olarak intramusküler şekilde cerrahi sonrası günde 3 defa uygulandı. Tavşanlara antibiyoterapi uygulanmadı. Osteomyelit gelişimini görmek için yara yerleri iki gün aralıklarla kontrol edildi.



Şekil 3.9. İlk cerrahiden 7 gün sonra makroskopik olarak görülen abse formasyonu

İlk cerrahi işlemden sonra 7. gün itibariyle tavşanların insizyon bölgelerinde akıntı oluşumu ve abse formasyonu görülmeye başlandı (Şekil 3.9). İlk cerrahiden sonra onikinci gün 7 numaralı tavşanın genel durumu kötüleşti ve ardından veteriner hekimin kontrolü sonrasında tavşanda sepsis tablosunun gelişmiş olma ihtimalinin yüksek olduğu belirtildi ve tavşan exitus olarak kabul edildi. 7 numaralı tavşan böylece çalışmadan çıkmış oldu.

İlk cerrahi işlemden 3 hafta sonra osteomyelit gelişimini göstermek için tüm tavşanlar incelendi. Tüm tavşanlarda abse formasyonunun devam ettiği, akıntı mevcut olduğu ve enfeksiyon tablosu varlığı makroskopik olarak görüldü. 23 tavşana da direkt radyogram ile tibia incelemesi yapıldı. Grafler değerlendirildi ve osteomyelit bulgularından olan periost reaksiyonunun tüm grafilerde mevcut olduğu görüldü (Şekil 3.10).



Şekil 3.10. İlk cerrahiden 3 hafta sonra oluşan osteomyelit tablosu grafileri

3.3.2. İkinci Aşama-İmplantların Uygulanması

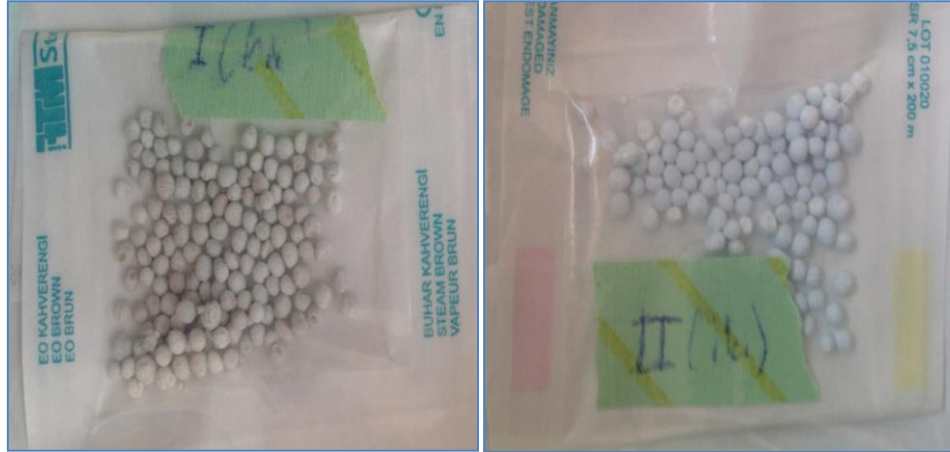
Bu aşamada osteomyelit oluşturulan tavşanlarda antibiyotikli kemik çimentosu, gümüş iyon katkılı kalsiyum fosfat boncuklar ve gümüş iyonu olmayan kalsiyum fosfat boncukların tedavi etkinliklerinin karşılaştırılması planlandı. Çalışmanın tarafsız olabilmesi için Anadolu Üniversitesi Malzeme Mühendisliği bölümünce üretilen boncuklardan hangilerinin gümüşlü olduğu tarafımıza bildirilmedi. İmplantlar 1 numaralı ve 2 numaralı implant olarak kodlandı. Tavşanlar numaralandırıldı ve 3 gruba ayrıldı. 1-8 numara arası tavşanlara antibiyotikli kemik

çimentosu, 9-16 numara arasındaki tavşanlara 1 numaralı implant ve 17-24 numara arasındaki tavşanlara 2 numaralı implant uygulanması kura sonucunda planlandı.

Tablo 3.2. Deneklerin 3 gruba ayrılması ve uygulama planı

1. Grup : Antibiyotikli Kemik Çimentosu	2. Grup: 1 no'lu implant	3. Grup: 2 no'lu implant
1 no'lu denek	9 no'lu denek	17 no'lu denek
2 no'lu denek	10 no'lu denek	18 no'lu denek
3 no'lu denek	11 no'lu denek	19 no'lu denek
4 no'lu denek	12 no'lu denek	20 no'lu denek
5 no'lu denek	13 no'lu denek	21 no'lu denek
6 no'lu denek	14 no'lu denek	22 no'lu denek
	15 no'lu denek	23 no'lu denek
8 no'lu denek	16 no'lu denek	24 no'lu denek

Çalışmanın ikinci aşamasında ilk cerrahi operasyonda yapılmış olan insizyonlardan girildi. Akıntı olan yerlerden sürüntü örnekleri alındı ve fakültemiz mikrobiyoloji bölümüne gönderildi. Mikrobiyoloji bölümünde kanlı agara ekilen örneklerin hepsinde S.aureus üremesi olduğu görüldü ve osteomiyelit tanımız desteklendi.

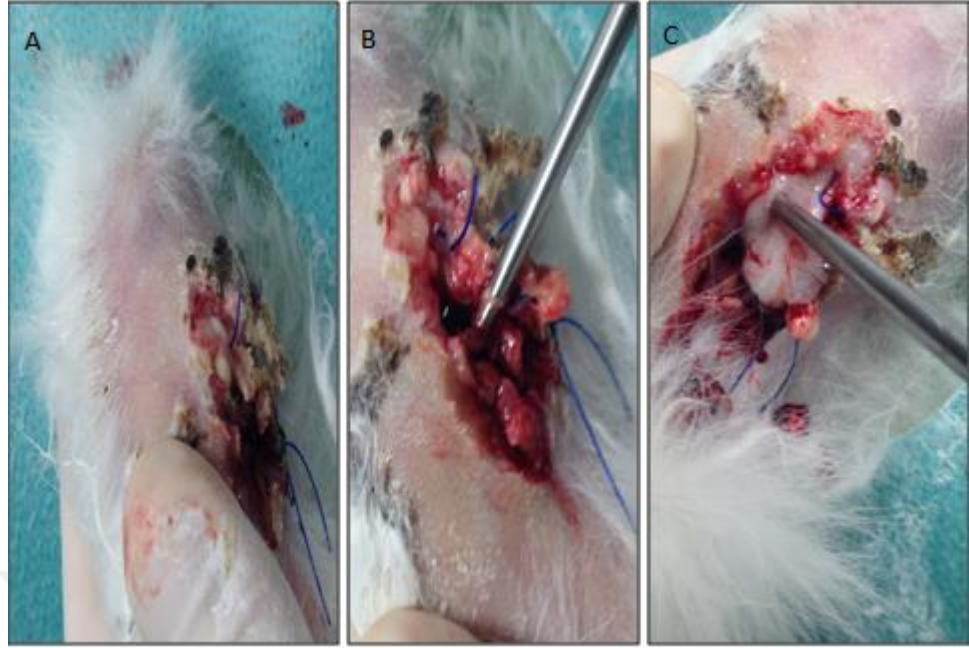


Şekil 3.11. İmplantların (boncuklar) steril edilmiş kullanıma hazır hali

1, 2, 3, 4, 5, 6 ve 8 numaralı tavşanların eski insizyon yerinden girildikten sonra daha önce açılmış olan kemik korteksteki kapak kaldırıldı. Medülla kürete edildi. Debridman sonrasında antibiyotikli kemik çimentosu bölgeye uygulandı. Antibiyotikli kemik çimentosu için klasik akrilik polimetilmetakrilat (PMMA) 40 gr'lık çimentoya tedavi dozu olarak 2 gr vankomisin karıştırıldı. Karışım işlemi steril böbrek küvet içerisinde elle yapıldı (Şekil 3.12)

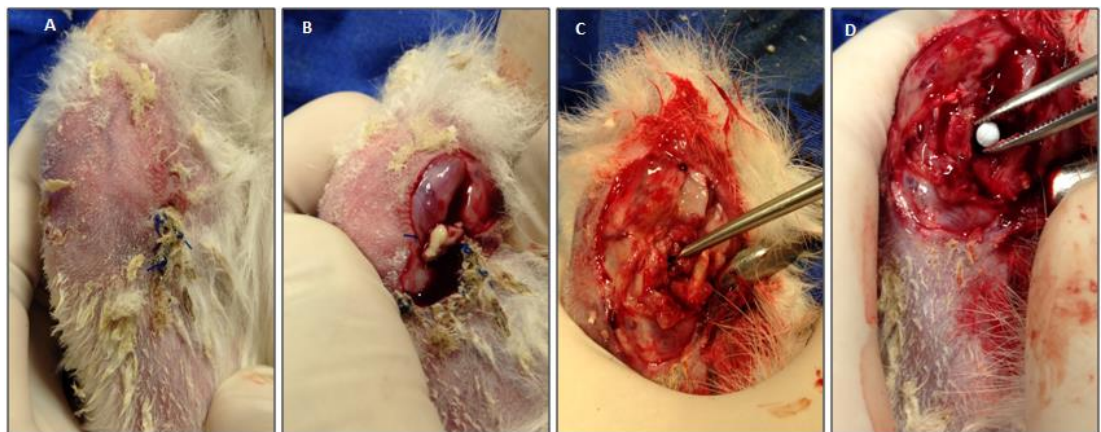


Şekil 3.12. Antibiyotikli kemik çimentosu hazırlanışı



Şekil 3.13. A. Abse formasyonu ve enfektif görünüm, B. Bölgenin kürete edilmesi, C. Antibiyotikli kemik çimentosu uygulanması

İkinci ve üçüncü grubu oluşturan tavşanların ikinci aşama cerrahilerinde de eski insizyon bölgesinden girildi. Enfekte görülen bölge debride edildi. İlk cerrahi de açılan kemik pencere tekrar osteotom yardımı ile kaldırıldı. Medulla kürete edildi. Tarafımıza teslim edilen 1 ve 2 no'lu olarak kodlanan implantlar steril şekilde medullayı dolduracak şekilde defekt alanına yerleştirildi.



Şekil 3.14. A. Abse görünümü, B. Cilt kesisinden sonra püy gözlenmesi, C. Uygun debridman ve küretaj, D. Boncukların uygulanışı



Şekil 3.15. İmplantların defekt bölgesine yerleştirilmesi (yaklaşık 4-5 adet implant medullayı dolduracak şekilde ezilerek uygulandı)

İmplant (boncuk) yerleştirme işlemlerinden sonra kemik üzeri yumuşak dokuyla örtüldü ve cilt uygun şekilde kapatıldı. Deneklerin yara bölgesine zarar vermesini engellemek için pansuman yapıldı ve sargı bezi ile sarıldı. Denekler osteomyelit tedavi sürecini izlem amacıyla kontrol altına alındı.

Herbir denek için tek kafes olacak şekilde daha önceden hazırlanan ve TİCAM’nde bulunan ayrı bir oda içinde deneklerin takibi yapıldı.



Şekil 3.16. Deneklerin barındığı kafes sisteminin görünümü

Deneklerin takibinde herhangi bir antibiyoterapi uygulanmadı. Genel durumları gözlemlendi. 3 günlük aralıklar ile yara yerlerinin bakımı yapıldı. Takibin 14.

gününde 5 numaralı deneğin genel durumunun bozulduğu gözlemlendi ve takibin 16. gününde 5 numaralı denek exitus olarak kayıt edildi. Veteriner hekim görüşüne göre exitusun sebebinin sepsis veya enfeksiyona bağlı olarak gelişmiş olabileceği bilgisi verildi. Bu şekilde deneklerdeki kayıp sayısı ikiye çıktı.

Çalışmanın bu aşamasından sonra 10 hafta gözlemlendi. Bu bekleme süresinin belirlenmesinde özellikle birinci gruptaki deneklerin genel durumlarının iyice kötüleşmeye başlaması, beslenme gibi ihtiyaçlarını dahi yerine getirememeleri önemli bir etken oldu. Etik değerler göz önüne alındığında tedavi etkinliğini değerlendirmemiz için bekleme süremiz onuncu haftada sonlandırıldı. Bunun ardından deneklerin sakrifiye işlemine ve sonuç değerlendirme aşamasına geçildi.

3.3.3. Deneklerin Sakrifiye Edilmesi ve Sonuçların Değerlendirilmesi

Denekler anestezi altında dekapitasyon ile sakrifiye edildi. Sakrifikasyon işleminden önce ikinci ve üçüncü grup deneklerden kan örneği alındı. Bu kan örnekleri sedimentasyon, C-reaktif protein ve gram boyama için ilgili tüple alındı. Sakrifikasyon işleminden sonra deneklerin işlem gören alt ekstremitesi kalça ekleminde dezartiküle edildi. Dezartiküle edilen materyallerin 2 yönlü grafileri çekildi. Ardından numaralandırma işlemi kontrol edildi ve materyaller fakültemiz Histoloji ve Embriyoloji Anabilim dalına götürüldü. Tibiaların işlem gören bölgelerinden steril şekilde mikrobiyolojik sürüntü örnekleri alındı. Histopatolojik tetkikler için uygun kesitler alınarak dekalsifikasyon işlemi için dekalsifikasyon sıvısına (Surgipath Decalsifier 2) konuldu. Dekalsifikasyon işlemi için beklemeye geçildi.

Deneklerin sakrifikasyonu sonrasında implant (boncuk) kullanılan iki grup için rastgele seçilen üçer denekten karaciğer, böbrek ve beyin örnekleri alındı. Bu örnekler Anadolu Üniversitesi Çevre Mühendisliği Bölümü'ne teslim edildi ve toksik çalışma uygulandı.

Dekalsifiye işlemi ve histolojik preparatların hazırlanma süreci yaklaşık iki haftalık zaman aldı. Bu süreç içerisinde deneklerden alınan kan örneklerinin sonuçları, toksik çalışma sonuçları ve mikrobiyolojik örnek sonuçları toparlanarak kayıt edildi. Bu aşamadan sonra sonuçların değerlendirilmesine başlandı.

Histopatolojik İnceleme Yöntemi

Deney hayvanlarından elde edilen kemikler dekalsifiye edildikten sonra olağan histolojik doku takip yöntemiyle parafin bloklar haline getirildi. 4-5 µm kalınlığında kesitler alınarak hematoksilen-eozin boyama tekniği ile boyandılar. Boyanan kesitler kör olarak binoküler ışık mikroskobu ile incelendi ve önceden belirlenen kriterlere göre semikantitatif skorlama yapıldı (78). Grupları temsil eden mikrograflar mikroskoba monte edilmiş dijital kamera ile çekildi.

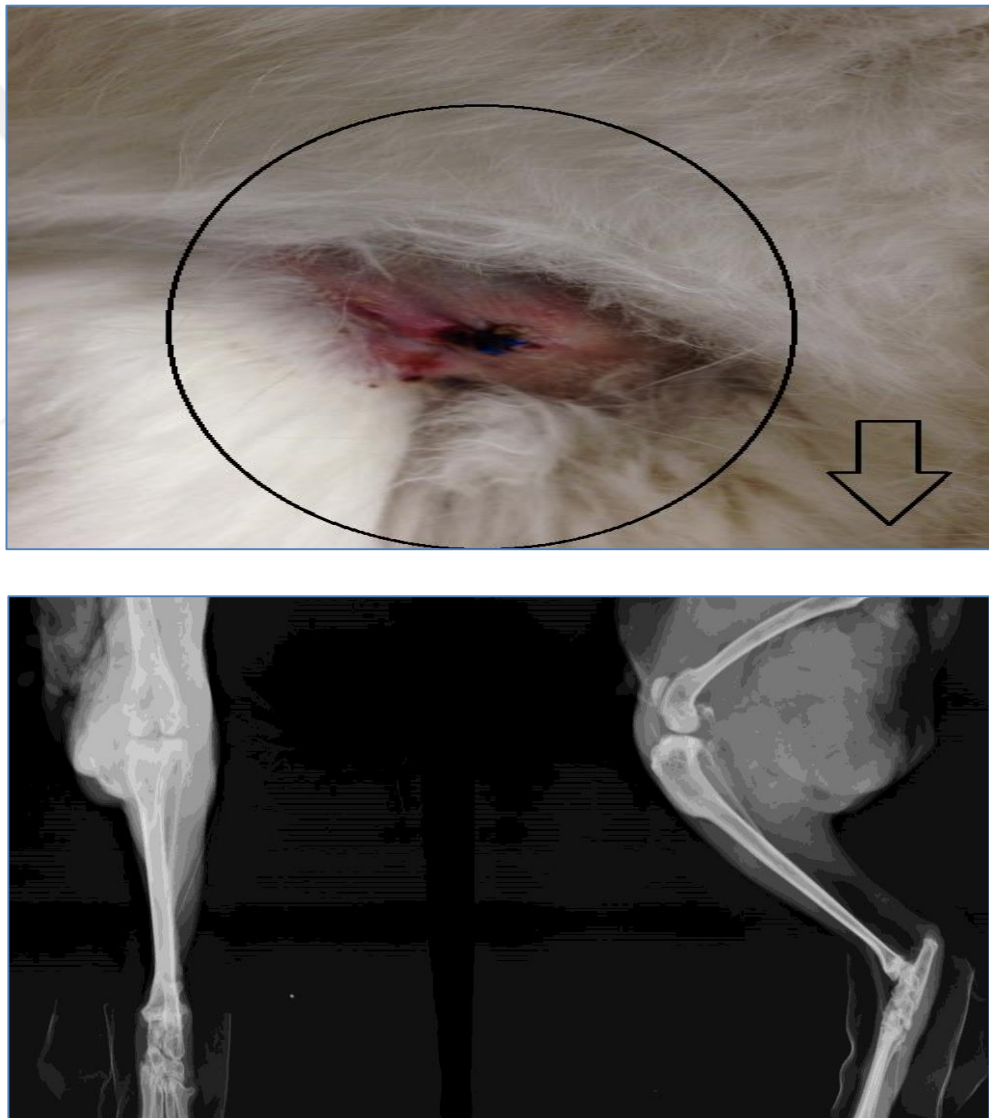


4. BULGULAR

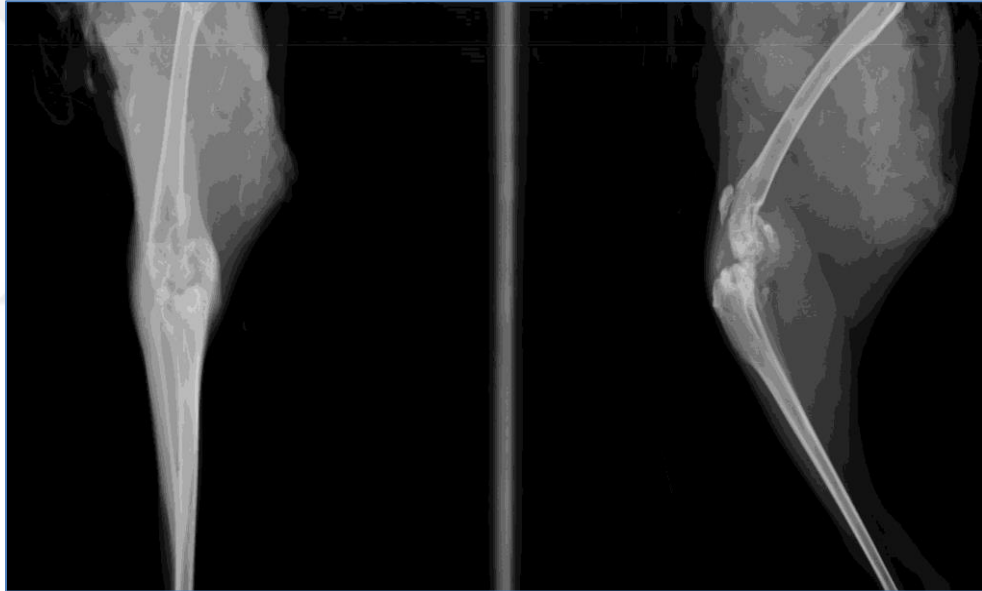
Bulguların değerlendirilirken implantların hangisinin Nano-gümüş iyon katkılı kalsiyum fosfat seramik, hangisinin nano-kalsiyum fosfat seramik olduğu tarafımıza açıklandı. Buna göre 1 numaralı implantın (2. Grup) Nano-gümüş iyon katkılı kalsiyum fosfat seramik, 2 numaralı implantın (3. Grup) ise Nano-kalsiyum fosfat seramik olduğu gözönünde bulundurularak bulgular yorumlandı.

4.1 Grupların Röntgenogram Örnekleri ve Klinik Fotoğraflar

4.1.1 Antibiyotikli Kemik Çimentosu Grubu



Şekil 4.1. 1 numaralı denek. Kemik defekti ve sklerotik alanların devamının görüntüsü

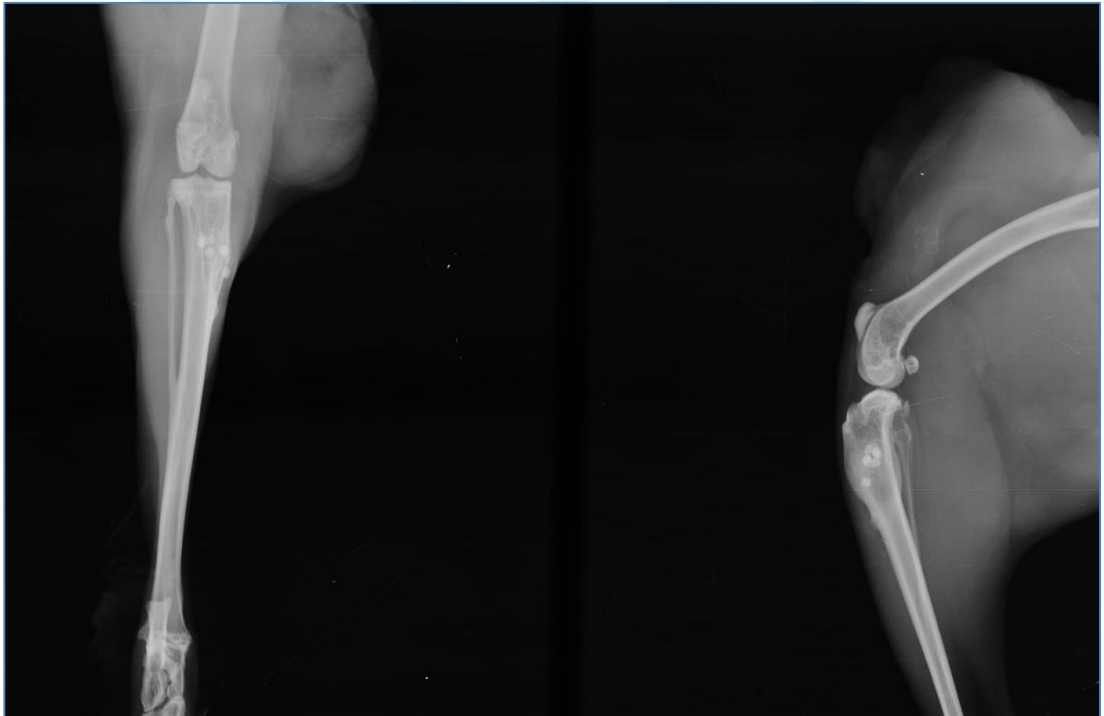
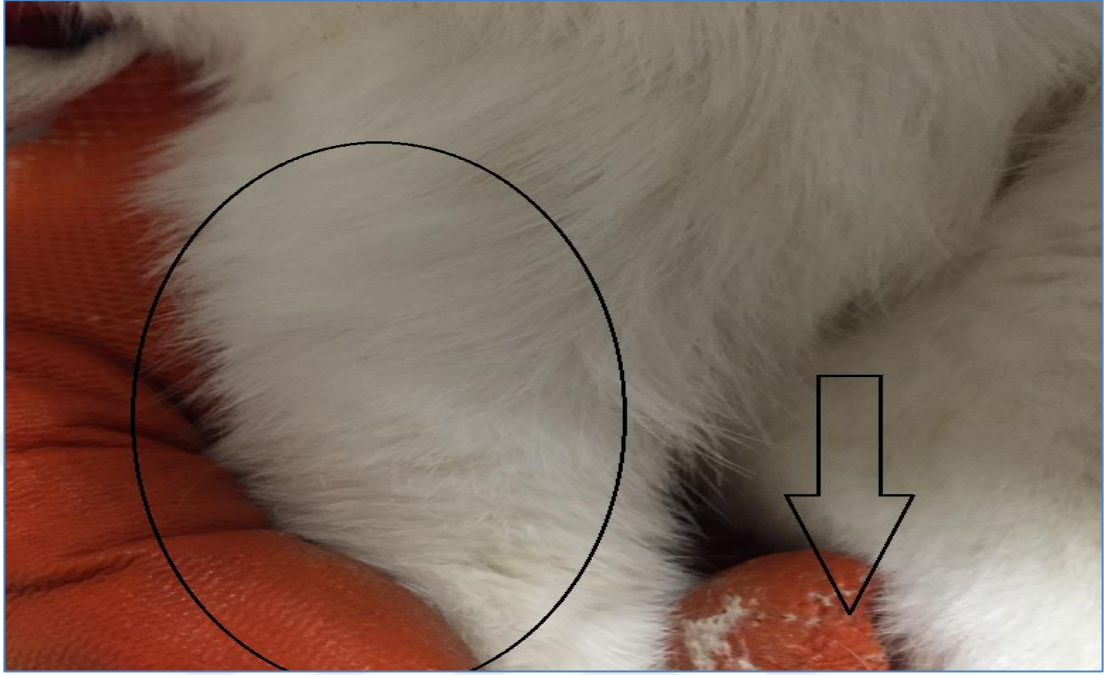


Şekil 4.2. 2 numaralı denek. Eklem destrüksiyonu, sklerotik alanlar ve kemik enfeksiyonunun radyolojik görünümü

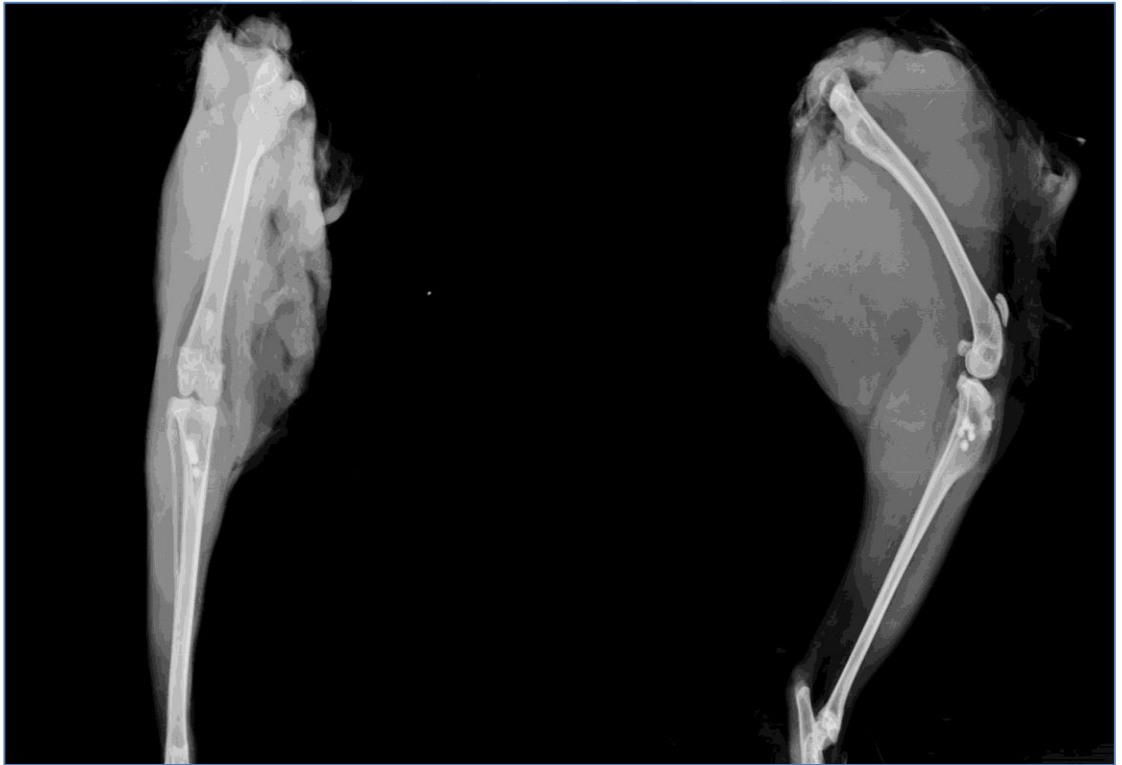
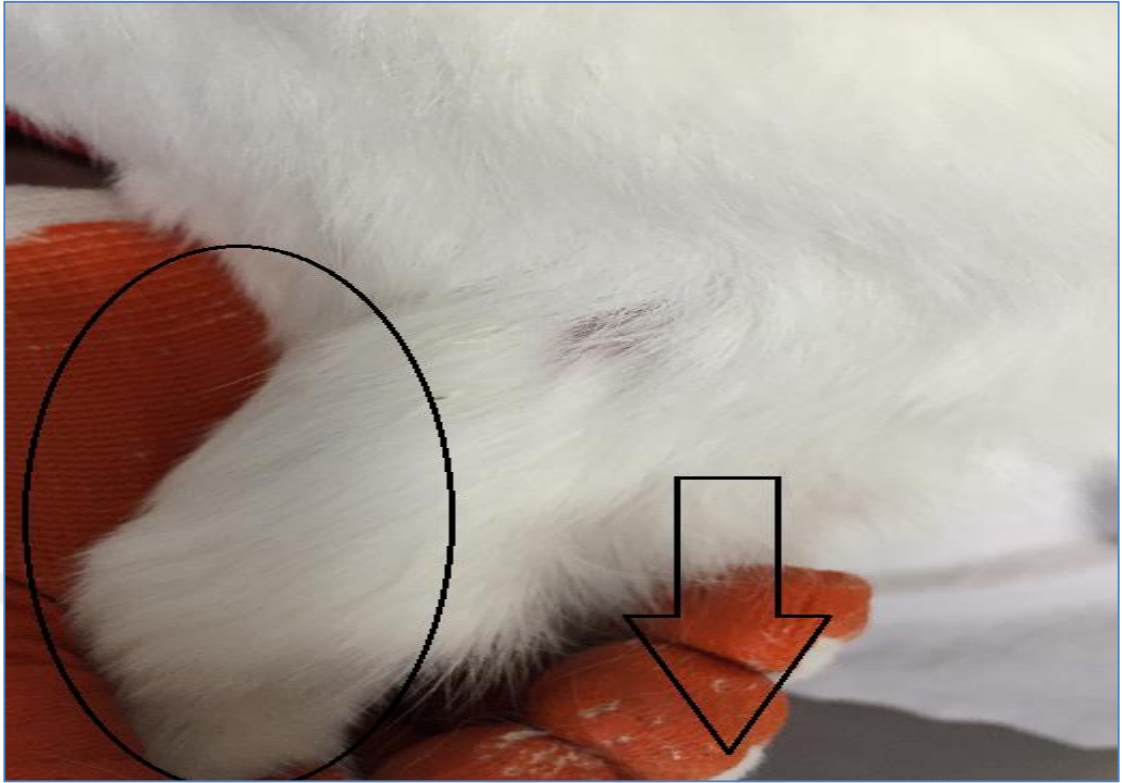
Antibiyotikli kemik çimentosu ile tedavi edilen birinci gruptaki deneklerin son radyogramları incelendiğinde kemik enfeksiyonu tablosunun gerilemediği, aksine deneklerde eklem çizgilerinin bozulmaya başladığı ve destrüksiyonların olduğu görüldü. Klinik olarak abse ve püy oluşumu gibi enfeksiyon bulguları devam etmekte idi. Klinik ve radyografik olarak birinci grupta kemik enfeksiyonu tedavisi başarısız oldu.

4.1.2 Nano-Gümüş İyon Katkılı Kalsiyum Fosfat Kemik Grefti (Boncuk)

Grubu



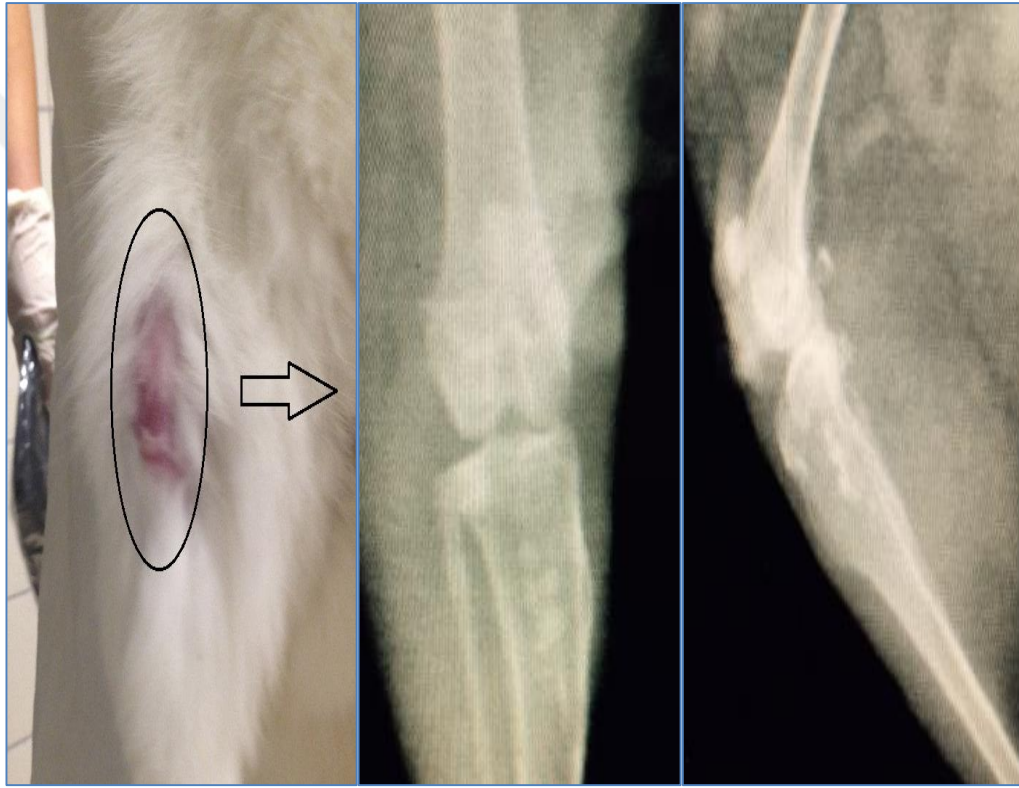
Şekil 4.3. 15 numaralı denek. İmplantlar defekti doldurmuş, enfeksiyon bulgusu yok, eklem yüzeyleri düzgün



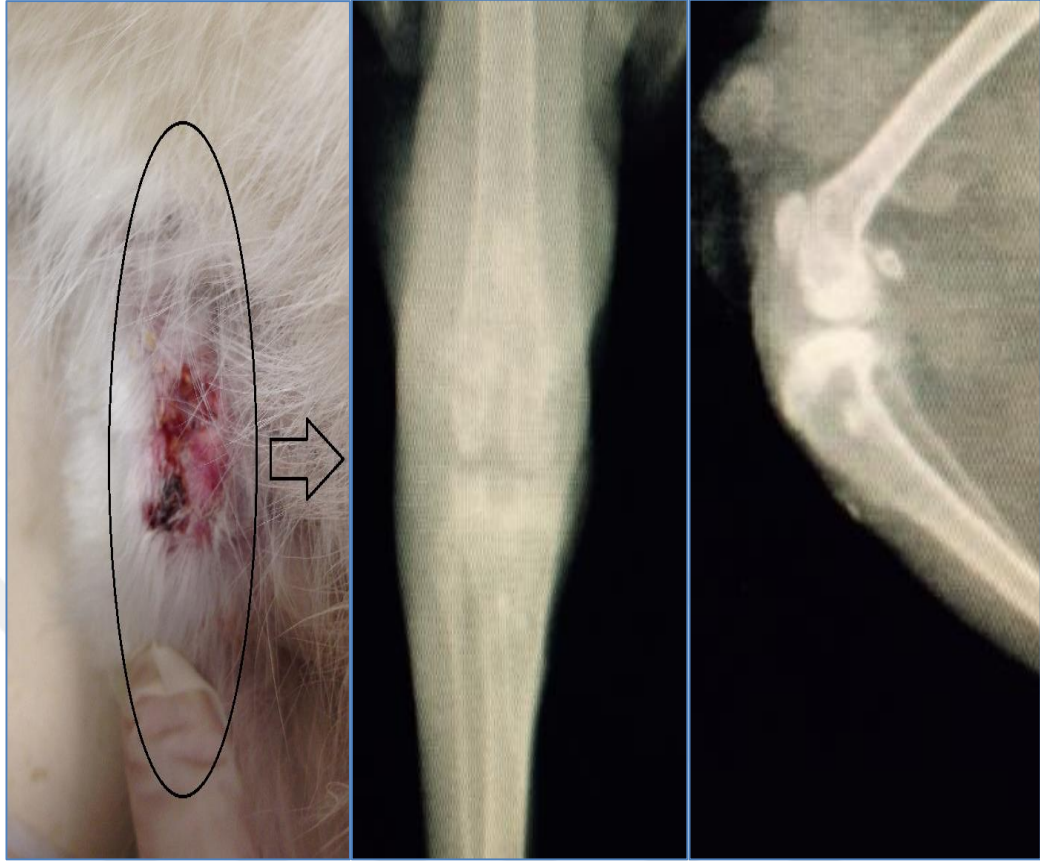
Şekil 4.4. 12 numaralı denek. İmplantlar defekti doldurmuş, enfeksiyon bulgusu yok

Nano-gümüş iyon katkılı kalsiyum fosfat seramik kemik greftleri (G-KFB) kullanılan grupta deneklerin radyogramları incelendiğinde enfeksiyona ikincil görülebilecek periostal reaksiyon, sklerotik alanlar ve eklemdede destrüksiyonun olmadığı görüldü. Defektlerin implant ile dolduğu gözlemlendi. Klinik olarak eski insizyon bölgesinde enfeksiyona ikincil bulgulara (abse, hiperemi, püy) rastlanmadı. Klinik ve radyografik bulgulara göre G-KFB grubunda enfeksiyon tedavi edildi.

4.1.3 Nano-Kalsiyum Fosfat Seramik (Gümüşsüz) Kemik Grefti (Boncuk) Grubu



Şekil 4.5. 19 numaralı denek. Eklem hattı bozulmuş, skleroze alanlar mevcut



Şekil 4.6. 23 numaralı denek. Sklerotik odaklar mevcut, eklem hattı bozulmuş

Gümüş iyonu içermeyen nano kalsiyum fosfat yapıda kemik greftlerinin (KFB) uygulandığı grubun radyografileri incelendiğinde; eklem hattının bozulduğu, kemikte periostal reaksiyonların varlığı, sklerotik odaklar ve kemik defektleri mevcuttu. Aynı zamanda cerrahinin yapıldığı alan incelendiğinde insizyon alanında hiperemik alanlar ve abse oluşumu vardı. KFB uygulanan grupta klinik ve radyolojik olarak enfeksiyon bulguları devam etmekte idi.

4.2 Grupların Tibia Kesitlerinin Makroskopik Görüntü Örnekleri

Grupların ilgili kemik bölgesinden mikroskopik inceleme için kesit alınırken aynı zamanda makroskopik bulgular da kayıt edildi.

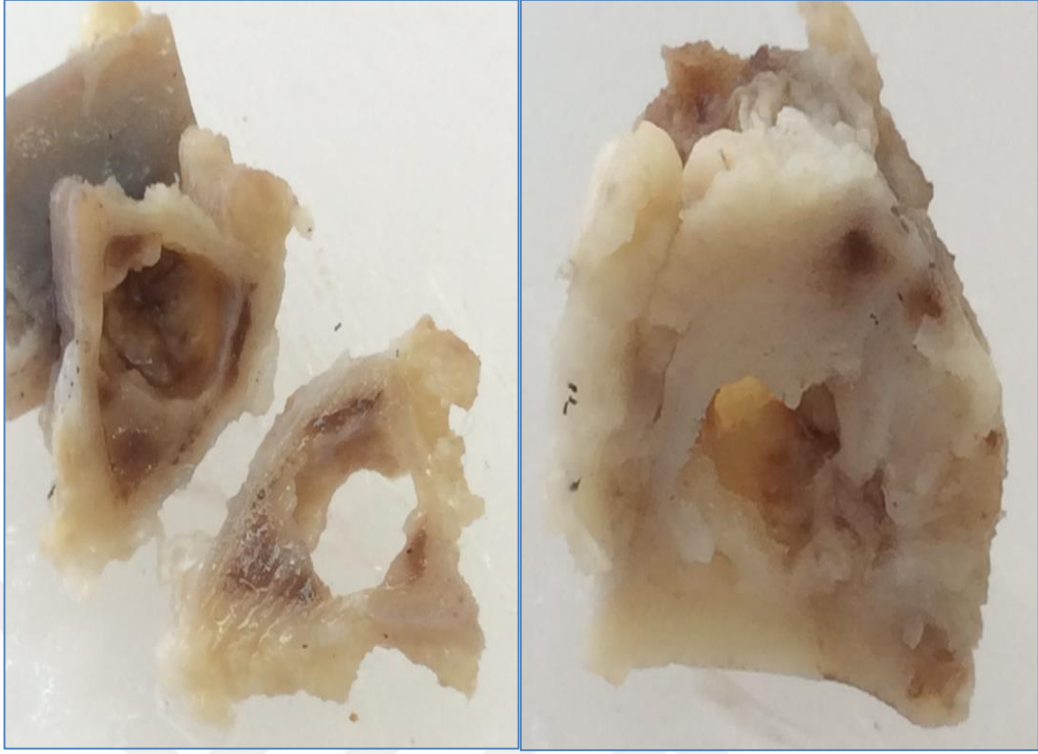
4.2.1 Antibiyotikli Kemik Çimentosu Grubu



Şekil 4.7. 2 numaralı denek. Medullada nekroz ve defekt mevcut, püy mevcut

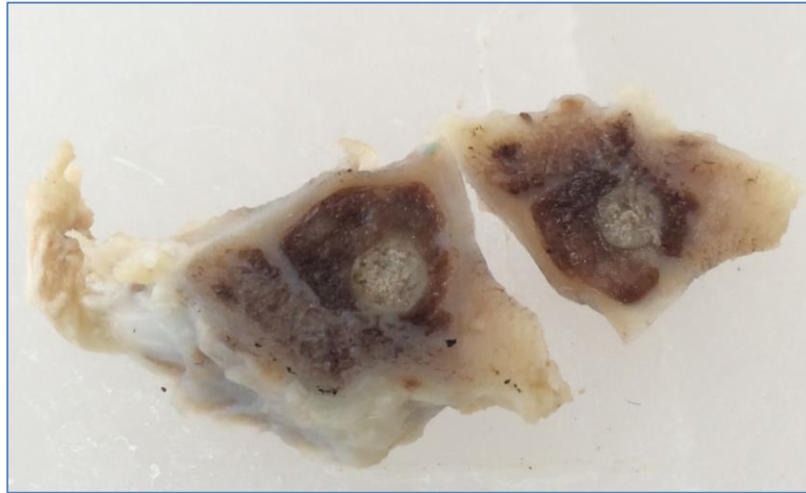


Şekil 4.8. 3 ve 4 numaralı denekler. Kemik medullada defekt mevcut, püy ve nekrotik dokular görülmekte

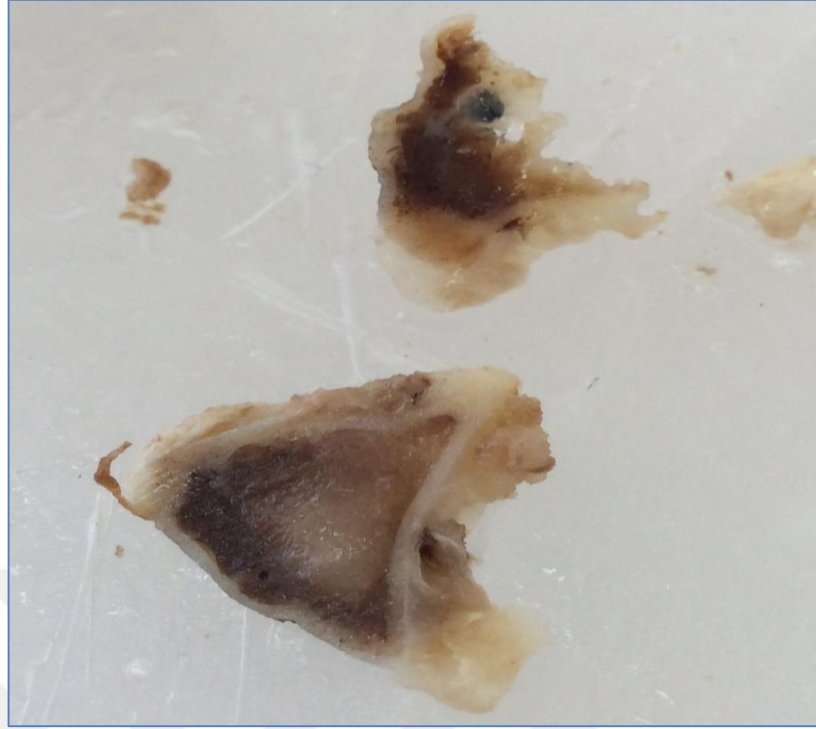


Şekil 4.9. 6 ve 8 numaralı denekler. Belirgin medullar defekt mevcut, püy oluşumu mevcut

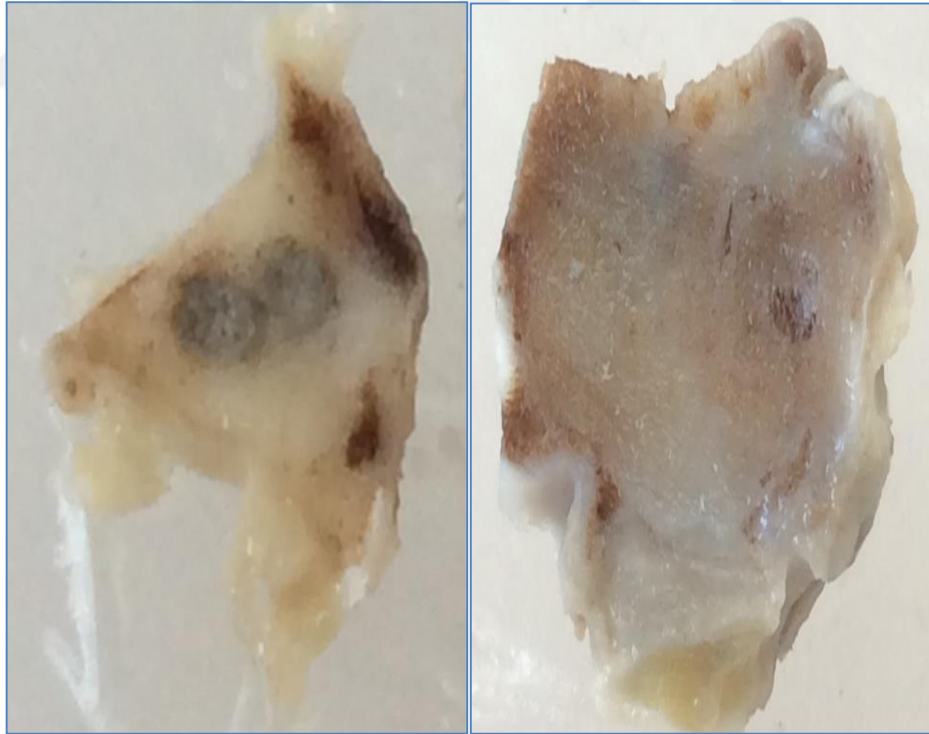
4.2.2 Nano-Gümüş İyon Katkılı Kalsiyum Fosfat Kemik Grefti (Boncuk) Grubu



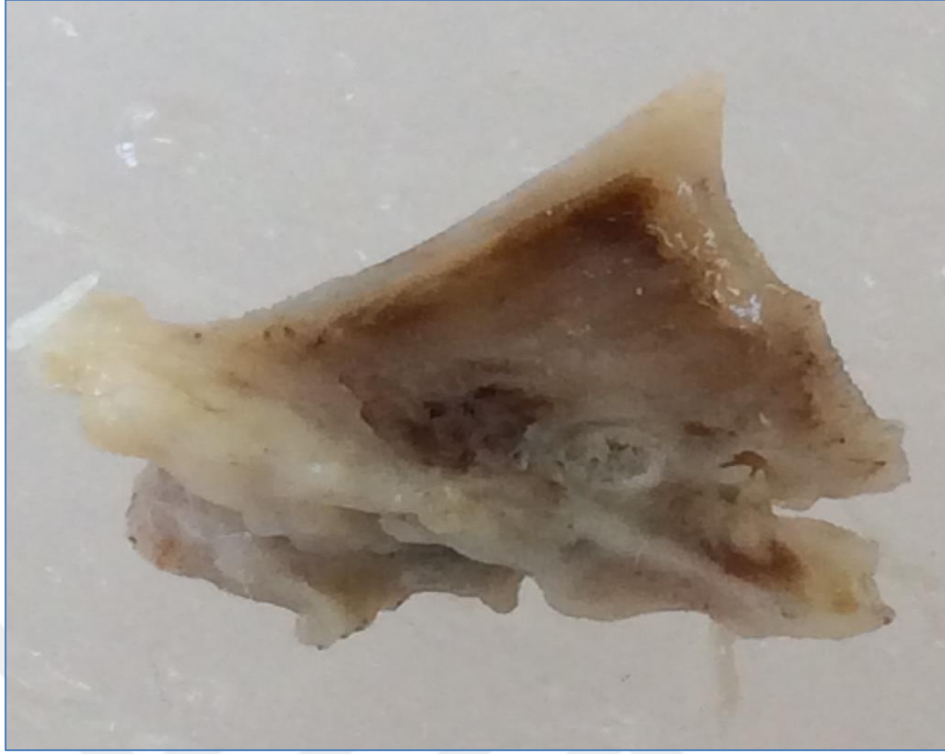
Şekil 4.10. 9 numaralı denek. İmplant medulladaki defekti doldurmuş, püy yok



Şekil 4.11. 10 numaralı denek. Defekt implant tarafından doldurulmuş, püy yok

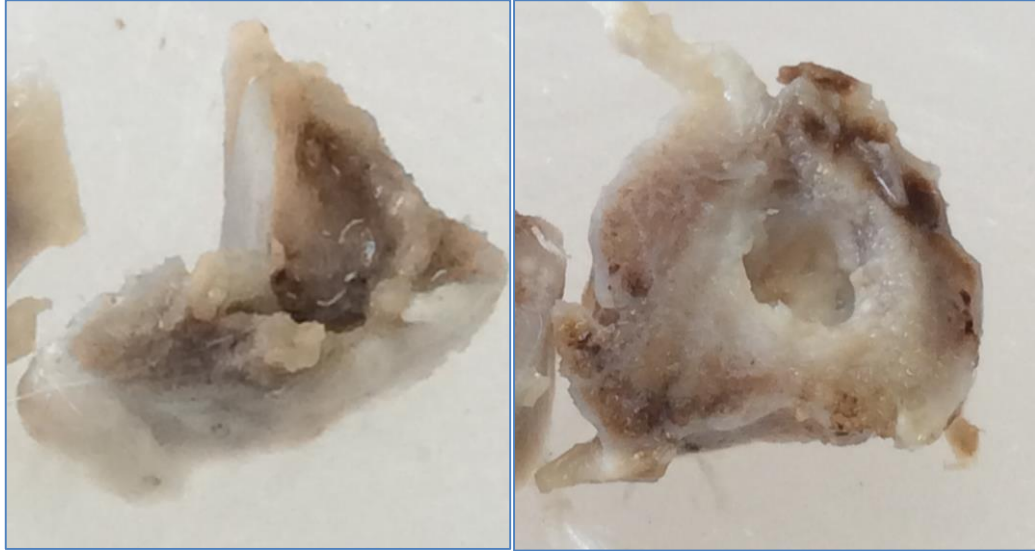


Şekil 4.12. 14 ve 15 numaralı denekler. Defekt yok, püy yok, implant defekti doldurmuş

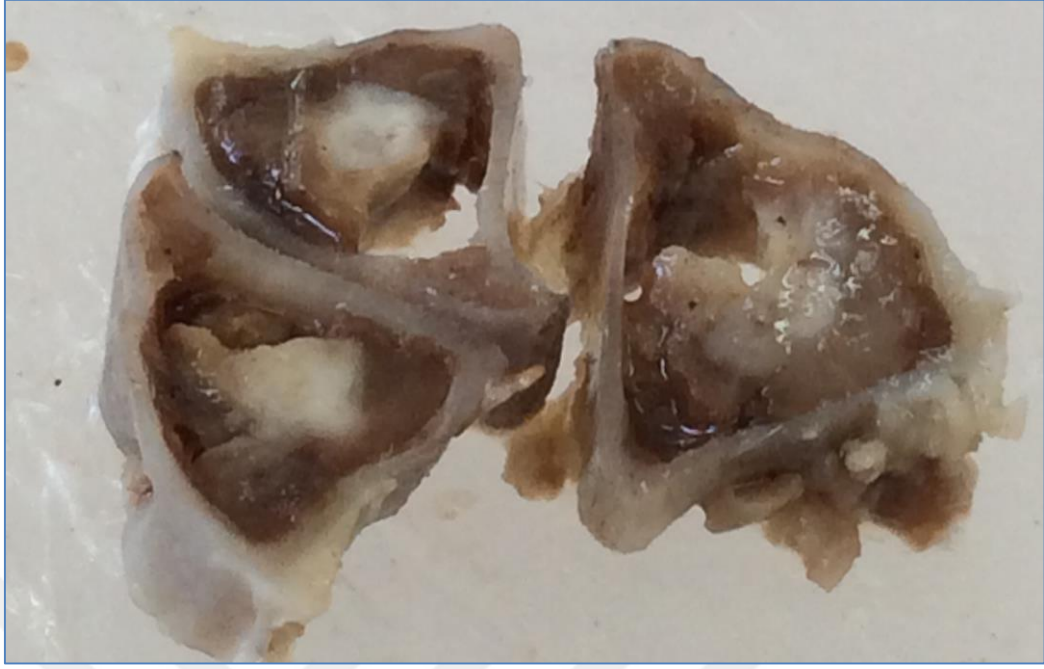


Şekil 4.13. 16 numaralı denek. Defekt yok, püy yok, implant defekti doldurmuş

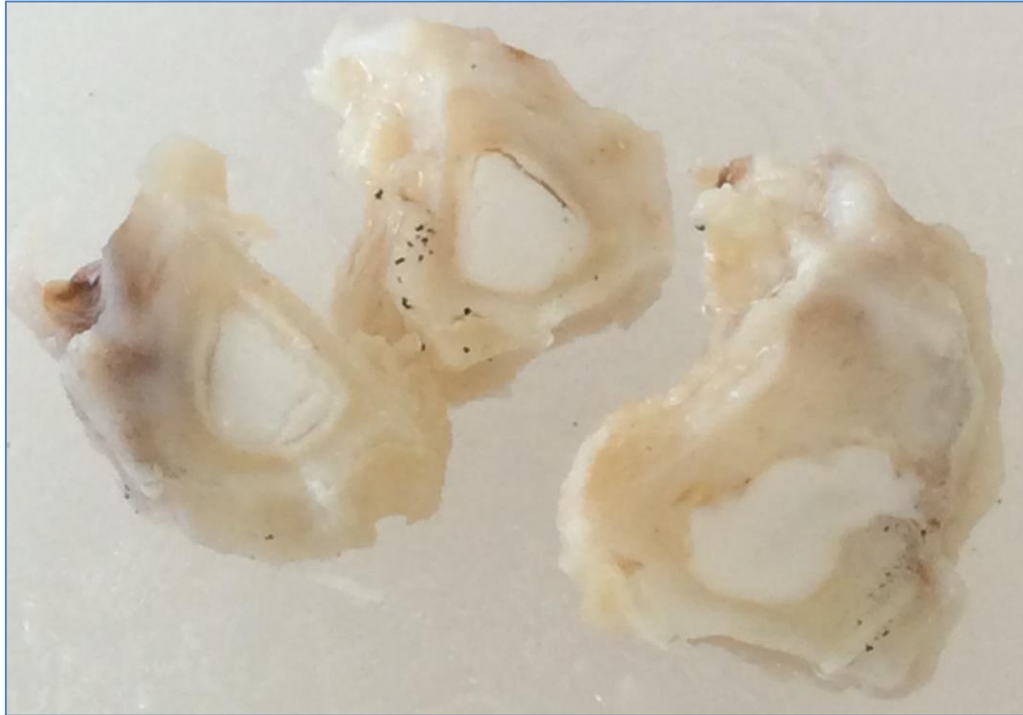
5.2.3 Nano-Kalsiyum Fosfat Seramik (Gümüşsüz) Kemik Grefti (Boncuk) Grubu



Şekil 4.14. 17 ve 18 numaralı denekler defekt mevcut, püy oluşumu ve enfektif görünüm mevcut



Şekil 4.15. 19 numaralı denek. Nekroz mevcut, püy ve defekt mevcut



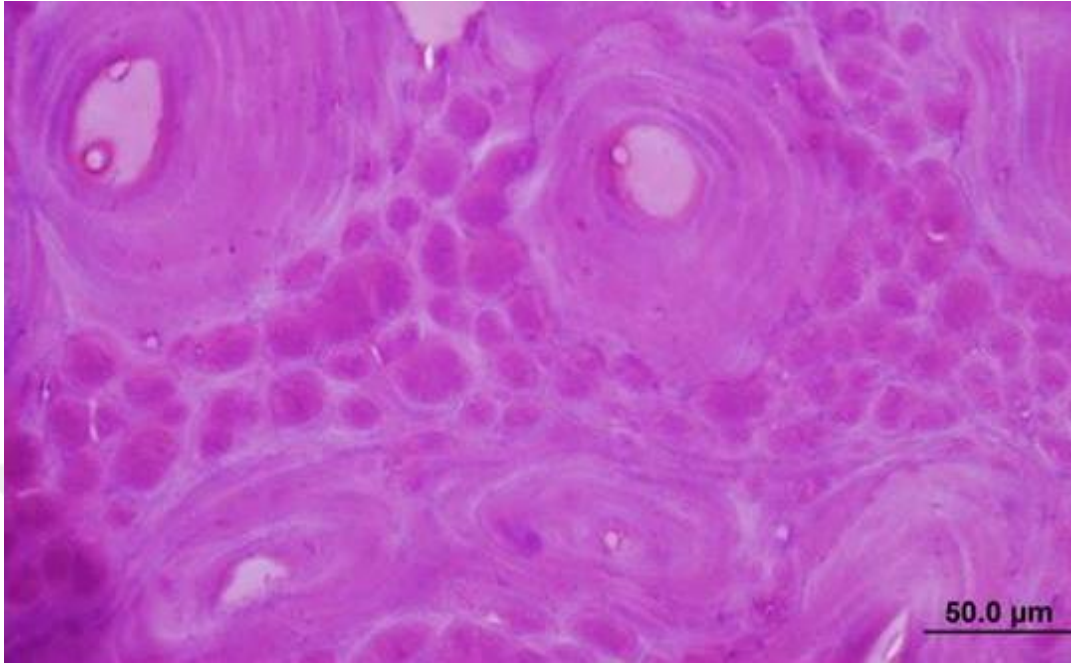
Şekil 4.16. 21 numaralı denek. Enfeksiyonun gerilememesi sonucunda dolmayan belirgin medüller defekt mevcut

4.3 Deneklerin Yara Yeri Kültürü Sonuçları

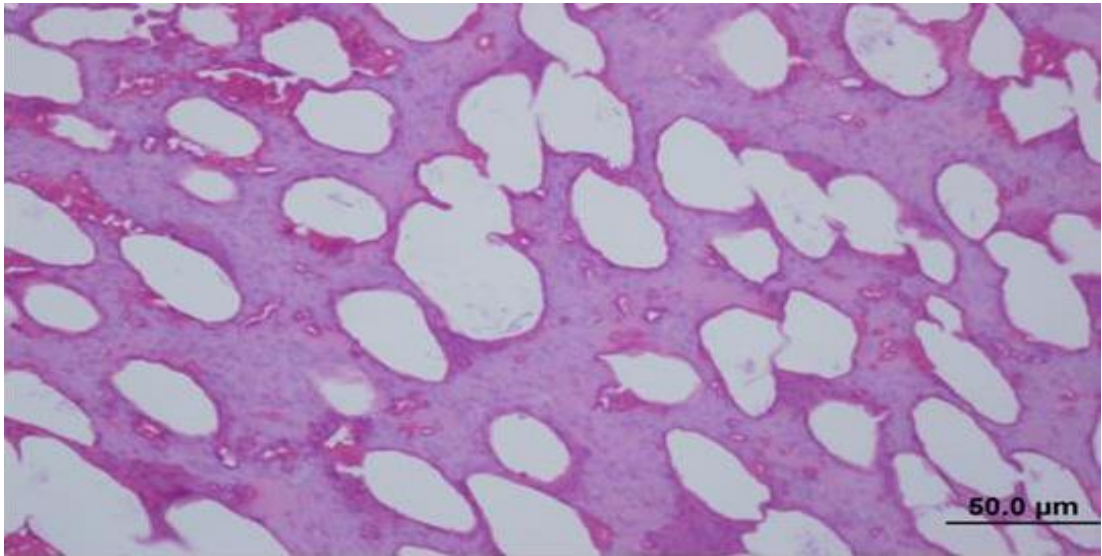
Tablo 4.1. Grupların Yara Yeri Kültürü Sonuçları

Denek Numarası-Grup	<i>S. Aureus</i> Üremesi
1-Antibiyotikli Kemik Çimentosu	Üreme Yok
2-Antibiyotikli Kemik Çimentosu	Üreme Yok
3- Antibiyotikli Kemik Çimentosu	Üreme Yok
4- Antibiyotikli Kemik Çimentosu	Orta yoğunluk (10^3 - 10^4 cfu)
6- Antibiyotikli Kemik Çimentosu	Orta yoğunluk (10^3 - 10^4 cfu)
8- Antibiyotikli Kemik Çimentosu	Üreme Yok
9-Nano-Gümüş İyon Katkılı Kalsiyum Fosfat	Üreme Yok
10-Nano-Gümüş İyon Katkılı Kalsiyum Fosfat	Üreme Yok
11-Nano-Gümüş İyon Katkılı Kalsiyum Fosfat	Orta yoğunluk (10^3 - 10^4 cfu)
12-Nano-Gümüş İyon Katkılı Kalsiyum Fosfat	Üreme Yok
13-Nano-Gümüş İyon Katkılı Kalsiyum Fosfat	Üreme Yok
14-Nano-Gümüş İyon Katkılı Kalsiyum Fosfat	Üreme Yok
15-Nano-Gümüş İyon Katkılı Kalsiyum Fosfat	Üreme Yok
16-Nano-Gümüş İyon Katkılı Kalsiyum Fosfat	Üreme Yok
17-Nano-Kalsiyum Fosfat (Gümüşsüz)	Üreme Yok
18-Nano-Kalsiyum Fosfat (Gümüşsüz)	Yoğun ($>10^4$ cfu)
19-Nano-Kalsiyum Fosfat (Gümüşsüz)	Orta yoğunluk (10^3 - 10^4 cfu)
20-Nano-Kalsiyum Fosfat (Gümüşsüz)	Orta yoğunluk (10^3 - 10^4 cfu)
21-Nano-Kalsiyum Fosfat (Gümüşsüz)	Orta yoğunluk (10^3 - 10^4 cfu)
22-Nano-Kalsiyum Fosfat (Gümüşsüz)	Orta yoğunluk (10^3 - 10^4 cfu)
23-Nano-Kalsiyum Fosfat (Gümüşsüz)	Orta yoğunluk (10^3 - 10^4 cfu)
24-Nano-Kalsiyum Fosfat (Gümüşsüz)	Yoğun ($>10^4$ cfu)

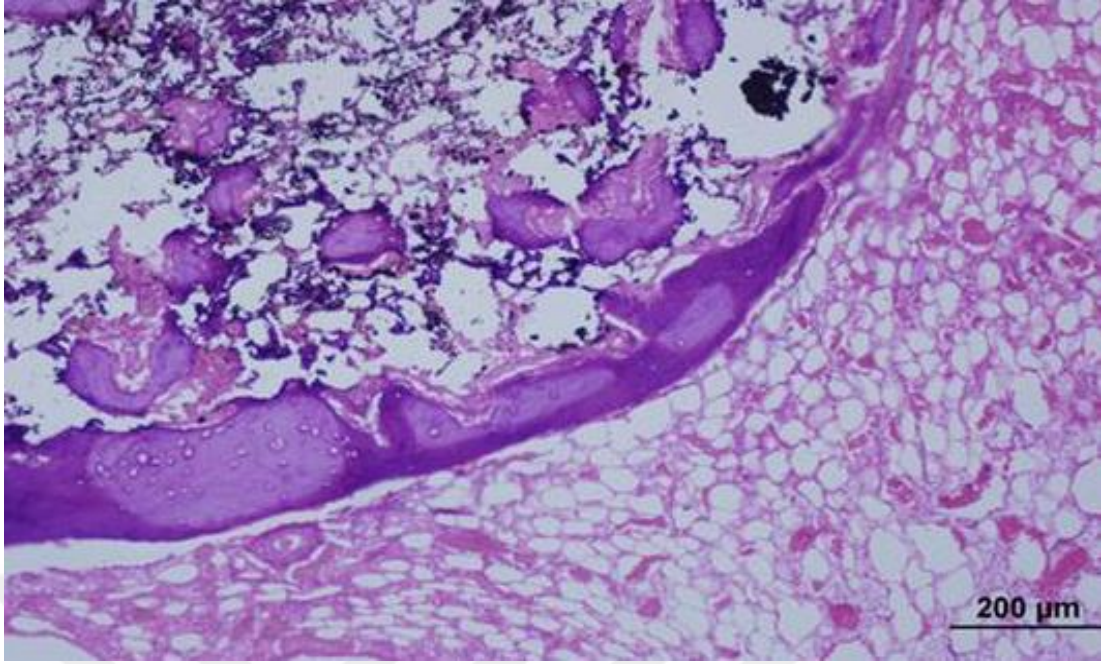
4.4 Histopatolojik İnceleme Sonrası Bulgular



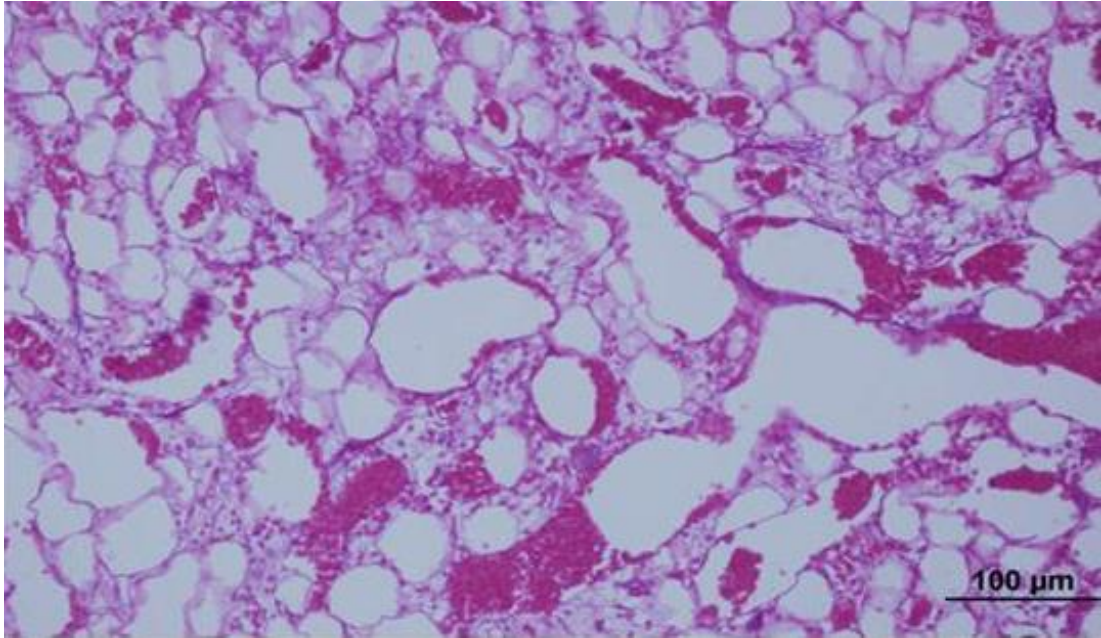
Şekil 4.17. Antibiyotikli kemik çimentosu uygulanan gruba ait kemik dokusu. Havers kanallarının iltihabi materyaller ile dolu olduğu, Havers lamellerinin ve osteonların bütünlüğünü kaybettiği görülmekte



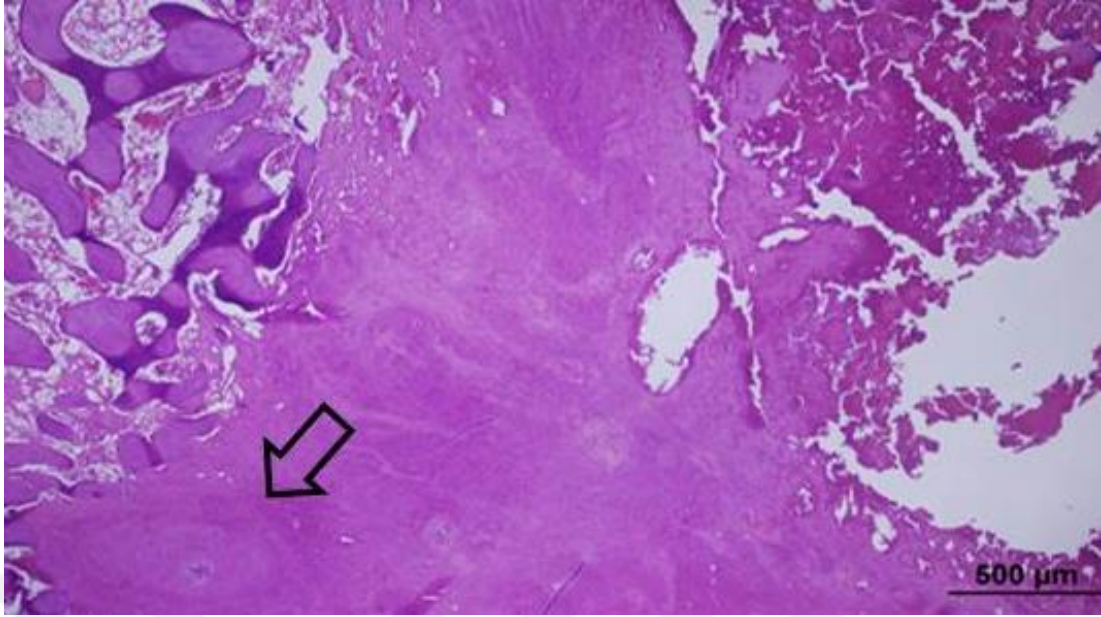
Şekil 4.18. Antibiyotikli kemik çimentosu kullanılan gruba ait görüntüde kemik iliğinde iltihaplanmanın devam ettiği görülmekte



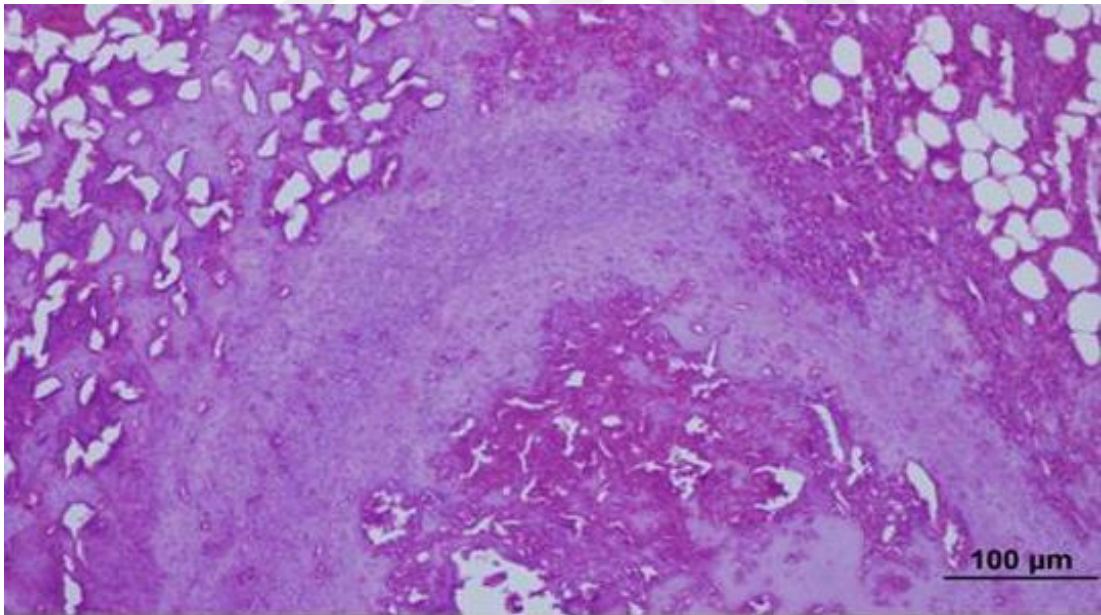
Şekil 4.19. Gümüşlü implant kullanılan deneğe ait kemik dokusunda iskele bölgesinde kemik alanlarının oluştuğu ve iltihabi hücrelerin belirgin oranda azaldığı görülmekte



Sekil 4.20. Gümüşlü implant kullanılan gruba ait kemik iliğinde iltihaplanmanın belirgin olarak azaldığı görülmekte



Şekil 4.21. Gümüşsüz implant uygulanan gruba ait kemik dokusu. Kemik dokusunda hasarlanmanın devam ettiği, iltihabi hücrelerin belirgin yoğunluk gösterdiği ve mikroabse (ok) oluşumu görülmekte



Şekil 4.22. Gümüşsüz implant uygulanan gruba ait kemik dokusu. Kemikleşmenin gerçekleşmediği ve iltihabın belirgin şekilde devamı görülmekte

4.4.1. Histolojik Kesitlerin Semikantitatif Olarak Skorlanması

Üniversitemiz Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı ile birlikte incelenen histolojik kesitler inceleme ardından daha niceliksel bulgulara ulaşılabilmesi için semikantitatif olarak skorlandı. Histopatolojik değerlendirmede medüller kavitede ve kortikal kemikte lökosit, mikroabse formasyonu, granülasyon dokusu ve fibrozisin kortikal kemikte hasar, havers genişlemesi ve periostal reaksiyonun miktarları sayısal verilere dönüştürüldü. (Tablo 4.2, 4.3).

Tablo 4.2. Grupların Semikantitatif olarak skrolama tablosu

HAYVAN NO (SAĞ)	MEDÜLLER KAVİTE				KORTİKAL KEMİK								TOPLAM HASAR SKORU
	lökosit	mikroabse	granülasyon dokusu	fibrozis	lökosit	mikroabse	granülasyon dokusu	fibrozis	kortikal hasar	Havers genişlemesi	periostal reaksiyon		
1	1	0	4	3	0	0	2	3	0	3	0	16	
2	4	0	2	3	0	0	2	2	3	3	0	19	
3	2	0	3	2	0	0	2	2	2	3	0	16	
4	3	0	3	2	0	2	2	2	2	2	1	19	
5	S	P	E	S	İ	M	E	N		Y	O	K	
6	2	0	2	2	2	0	2	1	0	2	0	13	
7	S	P	E	S	İ	M	E	N		Y	O	K	
8	2	0	3	3	0	0	2	2	2	2	0	16	
9	1	0	2	1	0	1	2	2	0	2	0	11	
10	2	0	2	2	0	0	1	1	1	1	0	10	
11	2	0	2	2	0	0	1	2	0	2	0	11	
12	2	0	2	2	0	0	0	0	1	1	0	8	
13	1	0	1	2	0	0	2	0	0	2	0	8	
14	3	0	2	2	0	0	1	1	1	0	0	10	
15	1	0	1	2	0	0	1	1	0	3	0	9	
16	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	
17	3	2	3	3	0	0	3	2	0	3	0	19	
18	3	4	3	2	0	0	2	2	0	3	2	21	
19	2	2	0	0	0	0	1	1	0	0	0	6	
20	3	3	3	2	0	0	3	2	1	2	0	19	
21	3	4	3	2	0	0	3	1	3	2	2	23	
22	4	0	2	0	3	2	2	1	2	2	3	21	
23	4	0	3	1	0	0	3	1	2	2	0	16	
24	3	0	3	1	0	0	3	1	2	2	0	15	

GRUPLAR:

1-8: ANTİBİYOTİK+ÇİMENTO

9-16: İSKELE+GÜMÜŞ

17-24: SADECE İSKELE

ANAHTAR:

0: YOK

1: HAFİF

2: ORTA

3: ÇOK

4: AĞIR

Tablo 4.3. Semikantitatif skrolama sonrasında ortalama puanlar

HAYVAN NO (SAĞ)	MEDÜLLER KAVİTE				KORTİKAL KEMİK							TOPLAM HASAR SKORU
	lökosit	mikroabse	granülasyon dokusu	fibrozis	lökosit	mikroabse	granülasyon dokusu	fibrozis	kortikal hasar	Havers genişlemesi	periostal reaksiyon	
ÇİMENTO	2,33	0,00	2,83	2,50	0,33	0,33	2,00	2,00	1,50	2,50	0,17	16,50
GÜMÜŞ	1,50	0,00	1,50	1,75	0,00	0,13	1,00	0,88	0,38	1,38	0,00	8,50
İSKELE	3,13	1,88	2,50	1,38	0,38	0,25	2,50	1,38	1,25	2,00	0,88	17,50

KRİTERLERE GÖRE EN İYİ (BOLD) VE EN KÖTÜLER (İTALİK)

HAYVAN NO (SAĞ)	MEDÜLLER KAVİTE				KORTİKAL KEMİK							TOPLAM HASAR SKORU
	lökosit	mikroabse	granülasyon dokusu	fibrozis	lökosit	mikroabse	granülasyon dokusu	fibrozis	kortikal hasar	Havers genişlemesi	periostal reaksiyon	
ÇİMENTO	2,33	0,00	2,83	2,50	0,33	0,33	2,00	2,00	1,50	2,50	0,17	16,50
GÜMÜŞ	1,50	0,00	1,50	1,75	0,00	0,13	1,00	0,88	0,38	1,38	0,00	8,50
İSKELE	3,13	1,88	2,50	1,38	0,38	0,25	2,50	1,38	1,25	2,00	0,88	17,50

4.4.2 Histolojik Kesit Bulgularının Kantitatif Olarak Karşılaştırılması

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı ile birlikte gümüş kullanılan ikinci grup ile gümüş kullanılmayan sadece kalsiyum fosfat seramiklerin kullanıldığı üçüncü grup kesitlerin yüzey alanları ölçülerek istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır. Kesitlerdeki kemik doku alanı, osteoid doku alanı ve boşluk alanları milimetre (mm) cinsinden hesaplanıp yüzde olarak oranları bulunmuştur (Tablo 4.4). Bu alanlar ölçülürken ikinci gruptan 6 deneğin kesitleri ölçüme uygun olarak değerlendirilmiştir. Üçüncü gruptan ise 4 deneğin kesitleri incelenmiştir. 17, 22, 23 ve 24 numaralı deneklerde enfeksiyona bağlı olarak kemik yapımı ve osteoid doku miktarı o kadar azalmıştır ki ölçülememiştir.

Bu niceliksel sonuçlar karşılaştırıldığında gümüş iyon katkılı kalsiyum fosfat seramiklerinin kullanıldığı grupta, gümüş iyonu içermeyen kalsiyum fosfat seramiklerin kullanıldığı gruba göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde kemik yapımının ve osteoid doku yüzdesinin fazla olduğu sonucuna varılmıştır ($p<0.001$).

Tablo 4.4. Kesitlerin kemik oluşumu açısından yüzey alanı incelemesi

Alanlar mm ² dir.	TOTAL ALAN	BOŞLUK	KEMİK	OSTEOİD	% kemik	% osteoid	% osteoid+kemik		YÜZDE KEMİK	Gümüş + iskele	n=6	MEDIAN	Q25-Q75
Gl-9	5,131	2,573	1,885	0,673	36,7	13,1	49,9			iskele	n=4		
Gl-10	1,170	0,510	0,484	0,198	41,4	16,9	58,3						
Gl-11	2,867	0,703	1,206	0,958	42,1	33,4	75,5						
Gl-12	3,127	1,124	1,307	0,681	41,8	21,8	63,6					MEDIAN	Q25-Q75
Gl-15	1,325	0,596	0,036	0,721	2,7	54,4	57,1		YÜZDE OSTEOİD	Gümüş + iskele	n=6	19,3	12,9-38,7
Gl-16	0,711	0,041	0,163	0,506	23,0	71,2	94,2			iskele	n=4		
i-18	1,475	0,222	0,019	0,181	1,3	12,3	13,6						
i-19	2,544	0,291	0,004	0,130	0,2	5,1	5,3		Mann-Whitney Test				
i-20	1,278	0,149	0,008	0,190	0,6	14,9	15,5						
i-21	1,069	0,179	0,028	0,330	2,6	30,9	33,5						

4.5 Gümüş Toksisite Çalışması

Gümüş iyonunun organlarda birikip birikmediğini göstermesi açısından implant (boncuk) kullanılan iki gruba ait deneklerden sakrifikasyon işlemi sırasında karaciğer, beyin ve böbrek dokuları alındı. Dokular distile su ile yıkayıp Anadolu Üniversitesi Çevre Mühendisliği Bölümü'ne teslim edildi. Örnekler ayrılıp, yabancı dokulardan temizlendikten sonra uygun kurutulma işlemine ve ardından HNO_3 ve HClO_4 asit ilavesi ile mineralizasyon işlemine tabi tutuldu. Organik yıkımı biten örnekler siyah bant filtreden süzülerek %10'luk HCL ile 50 ml'ye tamamlandı. Tüm analizler Varian Spectra A 250 Plus Model Atomik Absorpsiyon Spektrofotometresi'nde yapıldı.

Analiz sonucunda gönderilen hiçbir numunede gümüş iyonuna rastlanmadığı belirtildi.

5.TARTIŞMA

Osteomiyelit mikroorganizmaların sebep olduğu infeksiyöz ve inflamatuvar süreçler sonrasında kemik ve ona bağlı yumuşak dokularda akut-kronik hasarlanmalara neden olan ilerleyici karakterde bir hastalıktır (1,2). Kronik osteomiyelitte güncel tedavi algoritması; ölü kemik ve kanlanması bozuk yumuşak dokuların uzaklaştırılması, ortaya çıkan ölü boşlukların doldurulması ve lokal ve/veya sistemik antibiyotik tedavisinden oluşmaktadır. Tedavide en uygun yöntemin bulunması açısından farklı tedavi şekillerini içeren yayınlar mevcut olmasına rağmen etkinlik ve başarıyı arttırmak, tekrarlama sıklığını azaltmak ve kronikleşmeyi engellemek için sürekli yeni çalışmalar yapılmaktadır.

Bu çalışma deneysel bir çalışma olarak tasarlanmış ve ilk aşamada hayvanlarda osteomiyelit oluşturulmuştur. Patel ve ark.ının yapmış olduğu literatür taramasında tavşan, rat, fare, kuş, köpek, koyun ve keçilerde deneysel osteomiyelit oluşturma aşamaları tanımlanmıştır. Hangi hayvanın seçileceği konusunda yapılacak olan araştırmanın niteliğine vurgu yapılmıştır (78). Biz etik koşulları ve planladığımız cerrahi tekniği gözönünde bulundurularak tavşanı seçtik.

Reizner ve ark.ın yapmış olduğu bir başka literatür taramasında ise seçilmiş olan deneklere göre deneysel osteomiyelit yöntemleri tanımlanmıştır. Buna göre tavşanlarda osteomiyelit oluşturmak için 10^8 cfu Metisilin Dirençli Stafilokokus Aureus (MRSA) tibia proksimaline inoküle edilmiş ve bu şekilde sepsis gelişmediği histolojik olarak net görülebilen osteomiyelit oluşabildiği belirtilmiştir (79). Çalışmamızda bu baz alınarak mikrobiyoloji bölümünce tarafımıza verilen 10^8 cfu MRSA kullanıldı. Ayrıca bu ajanın kullanımının bir diğer nedeni; sebep olduğu enfeksiyonun sağaltımının geniş antibiyotik direnci nedeniyle zor ve zahmetli olmasıdır. Sahip olduğu biyofilm oluşturabilme yeteneğiyle de konak savunmasından korunabilmektedir.

Osteomiyelitte tanı aşaması tedavinin doğru yapılması için önemlidir. Tanıyı doğrulamak için cerrahi sırasında enfekte alanlardan alınan örnekler kullanılmaktadır (80). Çalışmamızda deneysel olarak oluşturulan osteomiyelitin tanısını koymak için alınan kültürlerin hepsinde en sık etken olan S.Aureus üremesi saptandı. Tanı radyografik olarak periost reaksiyonlarının ve sklerotik odakların gösterilmesi ile güçlendirildi.

Osteomyelit tedavisinde sistemik olarak kullanılan antibiyotikler ölü kemik ve nekrotik içerikle dolu kavitelere iyi geçiş yapamadıklarından sınırlı etkiye sahiptirler. Bu antibiyotikler aynı nedenlerle çok yüksek doz ve uzun süre verildiklerinden yan etki, sistemik toksisite, uzun hastanede kalış süresi, yüksek maliyet ve ek cerrahi gereksinim dezavantajlarına sahiptirler. Bu nedenle son zamanlarda lokal taşıyıcı sistemler ve lokal antibiyotik uygulamaları ile ilgili araştırmalar ilgi çekmektedir (6).

Lokal taşıyıcı sistemler ile birlikte; sistemik olarak uygulanan antibiyotik tedavisinin yan etkilerinden kaçınılmakta, gelişebilecek antibiyotik direnci engellenmekte, geri dönüşü olmayan kemik kaybının önüne geçilmekte ve tedavi maliyetleri düşürülmektedir. Tüm bu nedenler ile 1970'li yıllardan itibaren Polimetilmetakrilat (PMMA) yapıda boncuklar lokal antibiyotik taşıyıcı olarak kullanılmıştır (47). Halen lokal taşıyıcı olarak altın-standart kabul edilen PMMA'nın bir takım olumsuzlukları vardır. Bunlar kısaca; biyobozunur olmaması, biyofilm oluşumuna yol açabilmesi, cerrahi ile çıkarılma gereksinimi ve kontrolsüz antibiyotik salınımı olarak özetlenebilir (81). Bu eksiklikler nedeniyle biyobozunur taşıyıcı sistemler geliştirilmeye başlanmıştır. Bu yöntem ile kronik osteomyelit tedavisinde gereken yüksek lokal antimikrobiyal konsantrasyonlar elde edilirken implantın cerrahi olarak çıkarılmasına gereksinim olmayacaktır. Ek olarak biyobozunur malzemeler ile kemikteki ölü boşluklar ortadan kalkmakta ve lokal kemik dokusunun iyileşmesi hızlanmaktadır (82,83)

Biyobozunur polimerler (polilaktik asit ve poliglikolik asit), beta-trikalsiyum fosfat, kalsiyum hidroksiapatit, kalsiyum sülfat, kalsiyum alginat, kollajen, çitosan ve benzerleri taşıyıcı sistem olarak denenmiştir.

Humprey ve ark.1 yapmış olduğu çalışmada gentamisin içeren kollajeni taşıyıcı olarak kullanmış ve bu maddeyi 45 adet tavşan femurunun meduller kanalına implante etmişlerdir. 28 gün boyunca antibiyotik salınımının devam edebildiğini, antibiyotiğin lokal kemik konsantrasyonunun yüksek, sistemik konsantrasyonunun ise düşük olduğunu göstermişlerdir. Bu şekilde sistemik toksisiteden kaçınarak lokal olarak güvenli bir şekilde antibiyotik etkisinin arttırıldığını belirtmişlerdir. (84).

Korkusuz ve ark.1 parenteral antibiyotikler ve cerrahi debridmanın, tek başına veya antibiyotik emdirilmiş akrilik kemik çimento ile birlikte, tüm enfeksiyonları

ortadan kaldırmak konusunda başarısız olduğunu, lokal olarak implante edilen antibiyotik-seramik hidroksiapatit kalsiyum kompozitlerin metal implantların çıkartılmadan dahi sıçanlarda osteomyelit tedavisinde başarılı olduğunu göstermişlerdir (5).

Tavşanlarda deneysel osteomyelit modelinde antibiyotik taşıyıcı olarak trikalsiyum fosfatı kullanan Lambotte ve ark.1 antibiyotik olarak kullanılan gentamisin'in kısmen etkili olduğunu ancak osteomyelit'in tam sterilizasyonu konusunda başarılı olamadığını bildirmişlerdir (85).

Biyobozunur kalsiyum fosfatın taşıyıcı olarak kullanıldığı teikoplanin uygulamasının kronik osteomyelit oluşturulmuş tavşanlarda başarılı olduğu Lazarettos ve ark.1 tarafından gösterilmiştir (86).

Börzsei ve ark.1 kronik osteomyelit oluşturdukları tavşanlarda piperasilin ve tazobaktam yüklenmiş polimetilmetakrilat kapsüllerinin uygulandığı 12 tavşanın ancak 7'sinde tam iyileşme sağlayabildiğini göstermişlerdir. Bu da biyobozunur olmayan sistemlerin yetersizliğini ortaya koymaktadır (87).

Webb ve ark.1 2007 yılında yapmış oldukları çalışmada modern ortopedik cerrahide PMMA kemik çimentolarının kullanım şeklini ve antibiyotik seçeneklerini gözden geçirmişlerdir. %5 oranında (antibiyotik/PMMA) kullanılan antibiyotik'in kemik çimentosunun dayanıklılığını etkilemediği gösterilmiştir (88). Çalışmamızda antibiyotik dozu bu şekilde hesaplanarak 40 gram PMMA kemik çimentoya 2 gram Vankomisin eklenip el ile karıştırarak antibiyotikli kemik çimentosu hazırlandı. Antibiyotik seçiminde Vankomisin özellikle Staphylococcus Aureus enfeksiyonlarına karşı olan bakterisid etkisi nedeniyle seçildi. PMMA kemik çimentosu kullanılarak aynı zamanda biyobozunmaz bir taşıyıcı sistem ile biyobozunur nanoteknoloji yardımlı hazırlanan taşıyıcı sistemler karşılaştırılmış oldu. Literatüre uygun olarak antibiyotikli PMMA kullanılan grupta kemik enfeksiyon bulguları belirgin olarak gözlemlendi, aynı zamanda direkt grafilerde eklem destrüksiyonu diğer gruplara oranla daha belirgin idi. Histopatolojik inceleme de ise tibia kesitlerinde abse, lökosit varlığı, yüksek oranda granülasyon dokusu ve fibrozis oluşumu gibi enfeksiyona ikincil bulgular vardı.

Gelişen teknoloji ile birlikte biyobozunur taşıyıcılar içerisinde "nano" boyutlardaki sistemler de yer almaya başlamıştır. Desai ve Uskokovic'in yapmış

olduğu araştırma sonucunda nanoboyutlardaki kalsiyum fosfat'ın (CAPs) lokal antibiyotik taşınmasında en doğal ajan olabileceği ileri sürülmüştür. Yine aynı araştırmada Nano-CAP'ın kemiğin doğal mineral yapısında olduğu, kemiğin dayanıklılığına katkı sağlayabileceği, biyoaktif, biyoemilebilir ve osteokondüktif özellikte olduğu, toksisite riskinin olmadığı, nano boyutlarda olmasından dolayı hazırlık aşamasının çevreye zarar vermediği ve son olarak pek çok farklı hazırlama fazıyla birlikte antibiyotik salınımının çok iyi kontrol edilebildiği belirtilmiştir (82).

Yine nano-teknoloji temelinde yapılan bir başka çalışmada ise Ji-Le Jiang, Yun Feli-Li ve arkadaşları tavşanlarda kronik osteomyelit tedavisinde vankomisin yüklü nano-hidroksiapatit boncukların etkisini incelemişlerdir. Toplam 45 tavşanın kullanıldığı ve kontrol grubu mevcut olan bu çalışmada vankomisin yüklü nano-hidroksiapatit boncukların kronik osteomyelit tedavisinde etkin olduğu aynı zamanda oluşan kemik defektlerini de etkili şekilde doldurabildiği gösterilmiştir (83). Bizim çalışmamızda da ikinci ve üçüncü grup deneklerde nano-kalsiyum fosfat seramik kemik greftleri (boncuk, KFB) kullanıldı. İkinci grupta kullanılan implant aynı zamanda gümüş iyonu içermekte idi (G-KFB). Gümüş iyon katkılı kalsiyum fosfat seramiklerin kemik enfeksiyonunu tedavi edebildiği, yeni kemik oluşumu için iskele görevi görerek osteointegrasyonu arttırdığı sonucuna varıldı. Histopatolojik kesitlerden milimetrekare (mm^2) cinsinden alan hesaplaması yapıldı, nano-implantların kullanıldığı iki grupta da yeni kemik oluşumunu gösteren osteoid dokular vardı. Böylece literatüre paralel olarak osteomyelit tedavisinde nano-kalsiyum fosfat seramiklerin iskele görevi gördüğü kanıtlandı.

Gümüş iyonu antimikrobiyal özelliği bilinen ve uzun zamandır endüstri, gıda ve sağlık alanlarında antimikrobiyal olarak kullanılabilen bir iyondur. Gümüşün antimikrobiyal etki mekanizması genel olarak mikroorganizmaların proteinlerindeki tiyol gruplarıyla ilişkisinden kaynaklanmaktadır (66). Nano-teknolojik gelişmelere paralel olarak gümüş iyonunun nano boyutlardaki partiküllerinin oluşturulması ile birlikte yepyeni bir antimikrobiyal tedavi seçeneği gündeme gelmiştir. Franci ve ark.'ının yayınladığı inceleme yazısında gümüş nanopartiküllerinin gram-pozitif ve gram-negatif bakterilere karşı antimikrobiyal özellik gösterdiği ve bu özellik ile pek çok enfeksiyöz hastalıkta tedavi edici ya da koruyucu olarak kullanılabildiği belirtilmiştir. Bu ajanın özellikle S.aureus karşısında bakteriyel DNA inhibisyonu ve

sitoplazma hasarı ile geri dönüşsüz hasar yarattığı literatür özeti ile ortaya konmuştur. Yine aynı yazıda gümüş nanopartiküllerinin sitotoksikite sonucu oluşturabileceği muhtemel zararın çok az bir ihtimal olduğu söylenmiştir (89).

2011 yılında Hwan ve ark.ının yapmış olduğu deneysel çalışmada Gümüş nanopartiküllerinin Staphylococcus Aureus bakterisinin hücre zarı geçirgenliğini arttırdığını, hücre içi laktat-dehidrogenaz enzim aktivitesini düşürdüğünü sonuç olarak bakteride asma yaprağı görünümü oluşturarak ölümüne neden olduğunu kanıtlamışlardır (90).

2008 yılından itibaren Eskişehir’de Osmangazi Üniversitesi ile Anadolu Üniversitesinin bu konuyla ilgili ortak çalışmaları mevcuttur. Bu çalışmalarda ortopedik implantların bakteriler tarafından istilasını önlemek amacıyla nano teknoloji ile gümüş elementi kullanılmıştır. Bu çalışmada kullandığımız boncuk şeklindeki gümüş iyon katkılı kalsiyum fosfat seramik yapay kemik greftleri daha önce eksternal fiksator ve protez implantlarında kaplama olarak hayvan deneyleri ile çalışılmıştır. Tıbbi implant yüzeylerine uygulamak için geliştirilen gümüş iyonu içeren kalsiyum fosfat bazlı seramik nano toz kaplamanın implant ilişkili enfeksiyonların önlenmesinde etkili olduğu ve uygulanan formu ile biyolojik dokulara karşı toksik olmadığı bildirilmiştir (91).

Bahsedilen çalışmalar ile daha önce kaplama olarak enfeksiyondan koruma amaçlı kullanılan bu maddenin, farklı bir formda (örn: boncuk formunda) başlıbaşına bir implant olarak da osteomyelitin sağaltımında kullanılabileceği fikrinden yola çıkılarak bu çalışma planlanmıştır. Sonuç olarak yapmış olduğumuz çalışmada kalsiyum fosfat seramiklerine nanoteknoloji kullanarak eklenen gümüş iyonunun kronik osteomyelit deney modelindeki etkinliği araştırıldı.

Gümüşün kullanımını sınırlayan en önemli faktör toksik potansiyelidir. Gümüş bazı organlarda birikebilmekte ve buna bağlı olarak sistemik toksik etki gösterebilmektedir. Deri, kornea, dişeti, karaciğer, böbrek, adrenal bez, dalak, sinir sistemi ve kas dokusu gümüşün birikime uğrayabildiği dokulardan bazılarıdır (92,93). Gümüşün sistemik toksisitesinin en sık görülen şekli arjiri’dir. Arjiri’de gümüş çeşitli dokularda birikir ve renk değişikliği meydana gelebilir. Klinikte karaciğer fonksiyonlarında bozulma, böbrek bazal membranında hasar ile birlikte glomerülonefrit, kemik iliği toksisitesi ile birlikte lökopeni meydana gelebilir.

Gümüş kan-beyin bariyerini aşamaz ancak aksonel taşıma ile sinir sistemi patolojileri de oluşabilir (94). Bu toksik etkilerin ortaya çıkması için gerekli gümüş miktarı ise 4-6 gr.'dır (95).

Arjiri gümüşün organlarda birikmesi ile oluşan kronik bir süreçtir. Peki gümüşün akut dönemde toksik etkisi var mıdır? Maneewattanapinyo ve ark.ının yapmış olduğu çalışmada 5000mg/kg gümüş nano partiküller oral olarak farelere verilmiş ve akut dönemde mortaliteye ya da toksisite belirtilerine rastlanmamıştır (96,97). Literatüre bakıldığında gümüş nanopartiküllerinin inhalasyon yoluyla veya direkt olarak deriye süspansiyon olarak verildiği çalışmalarda dahi gümüşün akut toksik etkilerine rastlanmadığı görülmüştür (98,99). Çalışmamızda deneklere gümüş içeren boncuk yapıda implant yerleştirildikten sonra yapılan takiplerde deride veya korneada herhangi bir renk değişikliği, dermal lezyon ya da genel durumda bozulmaya yol açabilecek akut toksikasyon belirtilerine rastlanmadı. Kullandığımız implantı geliştirilme sürecinde yapılan çalışmalarda daha önce aynı implant için kan değerlerinde gümüş iyonu araştırıldığından bu çalışmada kan örneklerinde gümüş iyonuna bakılmadı. Fakat deneklerden alınan karaciğer, böbrek ve beyin numunelerinin hiçbirinde gümüş iyonuna rastlanmadı.

Gümüş kanıtlanmış toksik potansiyeline rağmen antimikrobiyal olarak canlı dokularda kullanılabilir mi? Hussmann ve ark.ının yapmış olduğu çalışmada gümüş kaplı megaprotezler hem enfeksiyonun tedavisi için hem de profilaktik olarak tümörlü olgularda kullanılmış ve sonuçlar gümüş içermeyen protez uygulanan grup ile karşılaştırılmıştır. Gümüş içeren protezler ile tekrar-enfeksiyon oranının azaldığı, daha kısa hastanede kalış süresinin olduğu görülmüştür. Protez etrafındaki dokulardan ameliyat sonrası alınan numunelerde gümüş iyon konsantrasyonunun arttığı ve bunun enfeksiyon oranlarını düşürmede etkili olabileceği belirtilmiştir. Ayrıca çalışmada gümüş içeren protez kullanılan 18 hastanın hiçbirinde gümüşün toksik etkisine rastlanmamıştır (100). 2015 yılında yayınlanan bir başka çalışmada ise gümüş kaplı tümör tipi protez kullanılan 85 hasta ile gümüş içermeyen tümör tipi protez kullanılan 85 hasta karşılaştırılmıştır. Gümüş kaplı protez kullanılan hastalarda periprotezik enfeksiyon oranının gümüş kullanılmayan gruba kıyasla yaklaşık 2 kat daha az olduğu (%11,8'e %22,4) rapor edilmiştir (101). Hardes ve ark.ının yapmış olduğu benzer bir çalışmada ise kemik sarkomu mevcut olup yüksek

enfeksiyon riski taşıyan 51 hastaya gümüş kaplı endoprotez uygulanmış ve bu hastaların klinik sonuçları gümüşsüz titanyum endoprotez uygulanan 74 hasta ile karşılaştırılmıştır. Gümüş grubunda periprostetik enfeksiyon oranı %5.9, gümüş kullanılmayan grupta ise %17.6 olarak görülmüştür(102). Gümüşün kemik enfeksiyonlarında mevcut olan antimikrobiyal etkisi literatür ile uyumlu olarak çalışmamızda da görüldü. Nano-gümüş iyon katkılı kalsiyum fosfat seramiklerinin (G-KFB) kullanıldığı ikinci grup deneklerde radyolojik ve histopatolojik olarak kemik enfeksiyon bulgularının gerilediği görüldü. Ayrıca ikinci grupta 8 denekten sadece 1'inde sakrifikasyon sonrası alınan yara yeri kültüründe orta yoğunlukta üreme gözlemlendi. Diğer 7 denekte ise üreme gözlenmedi. Biz gümüşün toksisite risklerine rağmen antimikrobiyal olarak kullanılabileceği görüşüne sahibiz.

Hidroksiapatit (HA) kalsiyum fosfat ailesinde yer alan biyoaktif bir seramiktir. HA ortopedide metal implantların biyoaktivitesini artırmak amacı ile implantların yüzeyine kaplanabilir. Bu sayede implant yüzeyinde hidroksiapatitin indüklediği osteointegrasyon ile hızlı kemik oluşumu elde edilebilir (103,104). Literatüre bakıldığında HA ile ilgili enfeksiyonun şiddetini arttırdığını gösteren in vivo çalışmalar mevcuttur. Bunun sebebi olarak HA kaplamanın yüzey pürüzlülüğünü arttırdığı ve yüzeyin elektropozitif karaktere dönerek hidrofobik ortam sağladığı ileri sürülmüştür (57,58). Bu çalışmaların aksine kalsiyum fosfat seramiklerin enfeksiyonu engellediğine dair yayınlar da mevcuttur. Opalchenova ve ark.1 yaptıkların invivo ve invitro çalışmalarda kalsiyum fosfat seramiklerin antibakteriyel etkinlikte olduğunu vurgulamışlardır (59). Bu çalışmada üçüncü grubu oluşturan deneklere gümüş içermeyen kalsiyum fosfat seramikler uygulandı. Üçüncü grubun sonuçlarına baktığımızda radyolojik ve histopatolojik olarak kemik enfeksiyonunun devam ettiği görüldü. Ayrıca bu gruptan elde edilen son yara yeri kültürlerinde sadece 1 denekte üreme olmadı, diğer 7 denekte MRSA üredi. Dolayısıyla herhangi bir antimikrobiyal eklenmeden uygulanan HA kemik enfeksiyonunu tedavi edemedi. Buna rağmen gümüş iyon katkılı HA boncukların kullanıldığı gruptaki kadar olmasa da gümüşsüz HA'nın de osteointegrasyona katkı sağladığı histopatolojik olarak tespit edildi.

Son yıllarda HA sadece kaplama olarak değil aynı zamanda tek başına kemik grefti olarak da kullanılmaktadır. Özellikle nano-HA'e artan bir ilgi sözkonusudur.

2014 yılında yapılan bir çalışmada diş defektlerinde nano boyuttaki HA ve beta-trikalsiyum fosfat kemik greftlerinin, kemik defektlerindeki etkinliği değerlendirilmiştir. Direkt radyograflardan yapılan ölçümler ile alınan sonuçlarda nano-HA'nın 6 aylık süre sonunda kemik defektlerini beta-trikalsiyum fosfat greftlerden daha iyi doldurduğu sonucuna varılmıştır (105). Bizim sonuçlarımızda da buna benzer olarak nano-HA boncukların kullanıldığı ikinci ve üçüncü grupta kemik defektleri radyolojik olarak antibiyotikli PMMA kullanılan gruba göre daha iyi dolduruldu. Buna ek olarak gümüş iyonu eklenen greftlerin olduğu grupta (G-KFB) gümüşsüz gruba göre daha çok kemik oluşumu olduğu yapılan kantitatif testler ile kanıtlandı.

Lokal biyobozunur sistemler ile ilgili en büyük kaygı yeterli osteointegrasyon olmaması ve buna bağlı ek problemlerin gelişebilmesidir. Osteomiyelit konusunda en yetkin yazarlardan biri olan George Cierny 2011 yılındaki yeni yazısında “Son otuz yılda geliştirilen yenilikçi teknolojiler içinde önemli bir yere sahip olan biyoçözünür lokal antibiyotik taşıma sistemlerinin sonradan potansiyel yabancı cisim olarak davranacak malzemelerin dezavantajlarını ortadan kaldıracabileceğini, ancak bu biyoçözünür malzemelerde yük taşıyamama, uygulama sonrası içsel kimyasal uyumsuzluk nedeniyle sertleşememe ve bozunmaları sırasında ortaya çıkan yan ürünler nedeniyle olguların %28’inde inflamasyon ve buna bağlı fistüle yaralara neden olma olasılığı gibi olumsuzluklar görülebileceği”ni bildirmiştir (106). Dolayısıyla lokal biyobozunur bir sistemin etkisinin incelendiği bir çalışmada bulguların mikroskopik düzeyde incelenip osteointegrasyonun ve kullanılan implantın kemik yapımına etkisinin gösterilmesi önem kazanmaktadır. Çalışmada bu nedenle histopatolojik incelemeye büyük önem verildi.

Yeni kemik oluşum miktarının ve kemik iyileşme düzeyinin kantitatif olarak sayısal veriler ile hesaplanması teknik olarak zordur. Literatür incelendiğinde bu detay ile ilgili çalışmamıza ışık tutatacak verilere rastlanmadı. Histopatolojik bulgular detaylandırılırken kemik enfeksiyonuna ikincil gelişebilecek patolojik işaretler tanımlandı. Kortikal kemikte kayıp, havers genişlemesi, periost reaksiyonu, medüller kemikte ve kortikal kemikte lökosit varlığı, mikroabse formasyonu gibi bulgulara mikroskopi düzeyinde bakıldı. Ayrıca granülasyon dokusu oluşumu miktarı ve fibrozis düzeyleri de not edildi. Osteoid doku miktarı ve yeni kemik

oluşumu kesitlerin yüzey alanı ölçümleri ile sayısal verilere dönüştürüldü. Bunun sonucunda kullanılan nano-iyon bazlı biyobozunur taşıyıcı sistemin kemik oluşumundaki iskele görevi kontrol grubuyla kıyaslanmış oldu (Tablo 5.2, 5.3).

Gümüş iyon katkılı kalsiyum fosfat seramiklerin kullanıldığı ikinci denek grubunda kemik hasarının ve kemik enfeksiyonuna ikincil patolojik bulguların miktarı, antibiyotikli kemik çimentosu kullanılan birinci gruptan ve gümüş iyonu olmayan kalsiyum fosfat seramiklerin kullanıldığı üçüncü gruptan daha az olarak saptandı (Tablo 5.3). Ayrıca histopatolojik olarak kemik iyileşmesinin ve kemik yeniden şekillenmesinin başladığı, implantın iskele görevi görerek kemik oluşumunu arttırdığı görüldü.

Bu çalışmada eksiklik olarak değerlendirilebilecek bir nokta şudur; deneklerin takibinin onuncu haftasında, özellikle birinci ve üçüncü gruba dahil olan deneklerde, ileri derecede huzursuzluk ve beslenme ihtiyacını karşılayamama durumu mevcuttu. Hayvan deneylerinde çalışmayı sonlandırmak için tanımlanan “insani son nokta” olarak tercüme edebileceğimiz “human endpoint” denilen kriterler mevcuttur (107). Bu kriterler gözönüne alınarak deneklerin izlem süreleri onuncu haftada sonlandırıldı. Bizim öngörümüz gruplara uygulanan nano-implantlardan sonra izlem süresi uzatılabilseydi osteointegrasyon ve dolayısıyla yeni kemik oluşum miktarı daha da artabilirdi.

Çalışmamızda ki bir diğer eksiklik ise deneklerin sakrifikasyon işlemi öncesinde alınan kan örneklerinin değerlendirilmesi aşamasında meydana geldi. Deneklerden enfeksiyon belirteci olması amacıyla alınan kan örneklerinden c-reaktif protein (crp) ve eritrosit sedimentasyon hızı (esr) ölçümü planlandı. Fakat crp ölçümü için kullanılması gereken tavşana türüne özel elisa kiti (108) temin edilemedi, dolayısıyla bu kan tetkikleri çalışılmadı.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuçlar:

1. Nano gümüş iyon katkılı kalsiyum fosfat seramik yapıda oluşturulan boncuk şeklinde yapay kemik grefti (G-KFB) osteomiyelit sağaltımında antibiyotikli kemik çimentosu (AKÇ) ve gümüşsüz kalsiyum fosfat seramik grefte (KFB) göre daha etkilidir.
2. G-KFB, KFB ile histopatolojik olarak karşılaştırıldığında osteointegrasyon ve yeni kemik oluşum miktarı daha fazladır ($p<0,001$).
3. Bulgular; yeni geliştirilen bu yapay kemik greftinin (G-KFB) gümüş iyon içeriğinin etkili bir antibakteriyel güce sahipken olası toksik etkilerden de yoksun olduğunu göstermektedir.
4. Gümüşün akut veya kronik herhangi bir toksisite belirtisine rastlanmamış, karaciğer, böbrek, beyin ve dalak dokularında gümüş iyonu bulunmamıştır.
5. AKÇ; enfeksiyonu engelleyememiş ve kemik defektini dolduramamıştır.

Öneriler:

Osteomiyelitin sağaltımında biyobozunur taşıyıcı sistemler gün geçtikçe önem kazanmaktadır. “Nanoteknoloji” kullanılarak üretilen ve gümüş iyonunun antimikrobiyal özelliği ile zenginleştirilen bu yeni yapay kemik grefti hayvan deneyinde başarılı sonuç vermiştir. Bir sonraki aşamada bu implantın insan deneylerinin yapılması gerekmektedir. İnsan üzerinde yapılacak karşılaştırmalı çalışmalar sonucunda bahsedilen implant gelecek için umut vaad etmektedir.

KAYNAKLAR

1. Lazzarini L, Mader JT, Calhaoun JH: Osteomyelitis in long bones. J Bone Joint Surgery. 2004, 86-A(10):2305-2318
2. Osteomyelit Patofizyolojisi ve Tedavi Prensipleri, Öztuna V. TOTBİD(Türk Ortopedi ve Travmatoloji Birliği Derneği) Dergisi, 2005, Cilt: 4 Sayı 1-2
3. Yenice İ., Çalış S., Kaş H.S., Özalp M., Ekizoğlu M. and Hıncal A.A. 2002. Biodegradable implantable teicoplanin beads for the treatment of bone infections. Int J Pharm, 242: 271-275.
4. Sanchez E, Baro M, Soriano I, Perera A, Evora C. In vivo-in vitro study of biodegradable and osteointegrable gentamicin bone implants. Eur. J. Pharm. Biopharm. v.52, n2, p.151-158, 2001
5. Korkusuz F, Uchida A, Shinto Y, Araki N, Inoue K, Ono K. Experimental implant-related osteomyelitis treated by antibiotic-calcium hydroxyapatite ceramic composites. J. Bone Joint Surg. v.75, n.1, p.111-114, 1993.
6. M. Itokazu *et al.*, Development of Porous Apatite Ceramic for Local-Delivery of Chemotherapeutic Agents. Journal of biomedical materials research, 39(4), 1998, pp. 536-538
7. Mader JT: Animal models of osteomyelitis. Am J Med 1985, 78 (suppl 6B): 213-217.
8. Principles and Practice of Infectious Diseases. Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds) Churchill Livingstone, Philadelphia, 2005, s: 1332-7
9. Osteomyelitis. In: Campbell's Operative Orthopaedics, Canale ST (ed), Mosby Year Book, St. Louis, 2008, p:695-722
10. Evans R.P, Nelson C.L, Lange T.A: Pathophysiology of Osteomyelitis. In McCollister Evarts M. (eds) Surgery of the Musculoskeletal system 2nd ed; Vol. 5: 4301-4312. Churchill Livingstone, New York, 1990
11. Cierny. G, Mader J.T. Adult Chronic Osteomyelitis: Overview. In D'Ambrosia R.D. (eds); Orthopaedic Infections: 31:47 Slack Incorporated, New Jersey, 1989

12. Nair SP, Meghji S, Wilson M, Reddi K, White P, Henderson B: Bacterially induced bone destruction: mechanisms and misconceptions. *Infect Immun* 1996, 64(7):2371-80.
13. Millar SJ, Goldstein EG, Levine MJ, Hausmann E: Modulation of bone metabolism by two chemically distinct lipopolysaccharide fractions from *Bacteriodes gingivalis*. *Infect Immun* 1986, 51(1):302-6.
14. Riancho JA, Salas E, Zarrabeita MT, Olmos JM, Amado JA, Fernandez-Luna JL, Gonzales-Macaias J: Expression and functional role of nitric oxide synthase in osteoblast-like cells. *J Bone Miner Res* 1995, 10(3):439-46
15. Ishiara Y, Nishiara T, Maki E, Noguchi T, Koga T: Role of interleukin-1 and prostoglandin in vitro bone resorption induced by *Actinobacillus avtinomycetemcomitans* lipopolysaccharide. *J Periodontal Research* 1991, 26(3):155-16
16. Franchi-Miller C, Saffar JL: The 5-lipoxygenase inhibitor BWA4C impairs osteoclastic resorption in a synchronized model of bone remodeling. *Bone* 1995, 17(2):185-91.
17. Carl W. Norden. Experimental Chronic Staphylococcal Osteomyelitis in Rabbits: Treatment with Rifampin Alone and Combination with Other Antimicrobial Agents. University of Pittsburgh School of Medicine, Pittsburgh, Pennsylvania, 1983
18. Jon T. Mader, Kenneth Adams, Louis Morrison. Comparative evaluation of cefazolin and clindamycin in the treatment of experimental *Staphylococcus Aureus* osteomyelitis in rabbits. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Oct. 1989, 1760-1764
19. Hudson MC, Ramp WK, Nicholson NC, Williams AS, Nousiaien MT: Internalization of *Staphylococcus aureus* by cultured osteoblasts. *Microb Pathog* 1995, 19(6): 409-419
20. Gotz F: *Staphylococcus* and biofilms. *Mol Microbiol* 2002, 43(6):1367-1378

21. Ryden C, Yacoub AI, Maxe I, Heinegard D, Oldberg A, Franzen A, Ljungh A, Rubin K. Specific binding of bone sialoprotein to *Staphylococcus aureus* isolated from patients with osteomyelitis. *Eur J Biochem* 1989, 184(2):331-336
22. Nilsson M, Frykberg L, Flock JI, Pei L, Lindberg M, Guss B: A fibrinogen binding protein of *Staphylococcus epidermidis*. *Infect Immun* 1998,66(6):2666-2673
23. Baselga R, Albizu I, De La Cruz M, Del Cacho E, Barberan M, Amorena B: Phase variation of slime production in *Staphylococcus aureus*: implications in colonization and virulence. *Infect Immun* 1993,61(11):4857-4862
24. Gracia E, Lacleriga A, Monzon M, Levia J, Oteiza C, Amorena B: Application of a rat osteomyelitis model to compare in vivo and in vitro the antibiotic efficacy against bacteria with high capacity to form biofilms. *J Surg Res* 1998, 79(2): 146-153
25. Herrmann M, Vaudaux PE, Pittet D, Auckenthaler R, Lew PD, Schumacher-Pedreau F, Peters G, Waldvogel FA: Fibronectin, fibrinogen and laminin act as mediators of adherence of clinical staphylococcal isolates to foreign material. *J Infect Dis* 1988, 158(4):693-701
26. Hussein M, Heilmann C, Peters G, Herrmann M: Teichoic acid enhances adhesion of *Staphylococcus epidermidis* to immobilized fibronectin. *Microb Pathog* 2001, 31(6):261-270
27. Galliani S, Viot M, Cremieux A, Van der Auwera P. Early adhesion of bacteremic strains of *Staphylococcus epidermis* to polystyrene: influence of hydrophobicity, slime production, plasma, albumin, fibrinogen and fibronectin. *J Lab Clin Med* 1994, 123(5):685-692
28. Doç. Dr. Serhan Sakarya . Biyofilm yapısı ve infeksiyon hastalıklarının virülans ve tedavisindeki rolü. *Kli. Mik. Journal Cilt: 18 Özel Sayı: 1 Kasım 2005*
29. Akan E, Kınık Ö. Biyofilm oluşum mekanizması ve biyofilmlerin gıda güvenliğine etkisi. *J of food and food science* 14:42-51, 2014
30. Lahiji A, Esterhai JL: Principles of Treatment of Infection and Antimicrobial Therapy. In: Chapman's Orthopaedic Surgery, Szabo MR, Marder R, Vince

- KG, Mann RA, Lane JM, McLain RF, Rab G (eds). Lippincott Williams&Wilkins, Philadelphia, 2001, s:3505-3532
31. Lambe DW Jr, Ferguson KP, Mayberry-Carson KJ, ToberMeyer B, Costerton JW: Foreign-body-associated experimental osteomyelitis induced with *Bacteriodes fragilis* and *Staphylococcus epidermidis* in rabbits. Clin Orthop 1991, 266:285-294.
 32. Sonnen GM, Henry NK. Pediatric bone and joint infections. Diagnosis and antimicrobial management. Pediatr Clin North Am 1996;43:933-47
 33. Prober CG. Current antibiotic therapy of communityacquired bacterial infections in hospitalized children: bone and joint infections. Pediatr Infect Dis 1992;11:156-9
 34. Syrogiannopoulos GA, Nelson JD. Duration of antimicrobial therapy for acute suppurative osteoarticular infections. Lancet 1988;1:37-40. 1
 35. Steer AC, Carapetis JR. Acute hematogenous osteomyelitis in children: recognition and management. Paediatr Drugs 2004;6:333-46
 36. Starr CL. The classic: acute hematogenous osteomyelitis. 1922. Clin Orthop Relat Res 2005;439:13-6
 37. Dabov GD. Osteomyelitis. In: Canale ST, editor. Campbell's operative orthopaedics. 10th ed. Philadelphia: Mosby; 2002. p. 661-84. Çeviri editörü: Akgün I. Ankara: Hayat Tıp Kitapçılık; 2007.s. 661-84
 38. Stott NS, Zions LE, Holtom PD, Patzakis MJ. Acute hematogenous osteomyelitis. An unusual cause of compartment syndrome in a child. Clin Orthop Relat Res. 1995 Aug; (317): 219-222
 39. Dr. Serkan Akçay, Uzmanlık Tezi, Uzun kemiklerde kronik osteomyelitin debridman ve antibiyotikli küreler ile tedavisi ve erken dönem klinik sonuçlar İstanbul 2007
 40. Unkilo-Kallio L, Kallio MS, Eskola, Peltde H: Serum C-reactive protein, erythrocyte sedimentation rate, and white blood cell count in acute hematogenous osteomyelitis of children. Pediatric, 1994,93:59-62

41. Browner BD. Chronic osteomyelitis. In: Browne BD, Levine AM, Jupiter JJ, Trafton PG, Krettek C, editors. *Skeletal trauma basic science, management, and reconstruction*. 4th ed. Philadelphia: Saunders; 2009. p.589-614.
42. Mackowiak PA, Jones SR, Smith JW: Diagnostic value of sinus-tract cultures in chronic osteomyelitis. *JAMA*. 1978 Jun 30;239(26):2772-5
43. Alonge TO, Ogunlade SO, Salawu SA, Fashina AN. Microbial isolates in open fractures seen in the accident and emergency unit of a teaching hospital in a developing country. *West Afr Med* 2002;21:302-4
44. Wang J, Li F, Calhoun JH, Mader JT. The role and effectiveness of adjunctive hyperbaric oxygen therapy in the management of musculoskeletal disorders. *J Postgrad Med* 2002; 48:226-31
45. Walenkamp GH. Chronic osteomyelitis. *Acta Orthop Scand* 1997;68:497-506
46. Lök V, Bal E, Sebik A, Aydınok H. Long-term results of treatment including creation of a gutter and muscle transposition for chronic sclerosing osteomyelitis. *Acta Orthop Traumatol Turc* 2009;43:510-4
47. Buchholz HW, Engelbrecht H. Depot effects of various antibiotics mixed with Palacos resins. *Chirurg* 1970;41:511-5.
48. Schade VL, Roukis TS. The role of polymethylmethacrylate antibiotic-loaded cement in addition to debridement for the treatment of soft tissue and osseous infections of the foot and ankle. *J Foot Ankle Surg* 2010;49:55-62
49. Rushton N. Applications of local antibiotic therapy. *Eur J Surg Suppl* 1997; 578:27-30
50. International Organization for Standardization (ISO 1000:1992: SI units and recommendations for the use of their multiples and of certain other units. Geneva. Switzerland: ISO:1992
51. Silva GA. Introduction to nanotechnology and its applications to medicine. *Surg. Neurol.* 2004;61:216-20
52. Catledge SA, Fries MD., Vohra YK., Lacefield WR. Nanostructured ceramics for biomedical implants. *J Nanosci Nanotech* 2002;2:1-20.

53. Bosetti M, Masse A, Tobin E, Cannas M. Silver coated materials for external fixation devices: in vitro biocompatibility and genotoxicity. *Biomaterials*. 2002;23:887-92
54. Evans RP, Nelson CL. Gentamicin-impregnated polymethyl methacrylate beads compared with systemic antibiotic therapy in the treatment of chronic osteomyelitis. *Clin Orthop Relat Res*. 1993;295:37-42
55. Kannellakopoulou, K, Giamarellos-Bourboulis EJ. Carrier systems for the local delivery of antibiotics in bone infections. *Drugs*. 2000;59:1223-32
56. Korkusuz F, Korkusuz P. Kalsiyum hidroksiapatit seramiklerin ortopedide kullanımı. *Acta Ortop Traumatol Turc* 1997;31:63-7
57. Laure B, Besnier J.M, Bergemer-Fouquet A.M, Marquet-Van Der Mee, Damie F, Quentin R, Favard L, Rosset P. Effect of hydroxyapatite coating and polymethylmethacrylate on stainless steel implant-site infection with *Staphylococcus epidermidis* in a sheep model. *J Biomed Mater Res*. 2008;84(1): 92-98
58. Moroni A, Heikkila J, Magyar G, Toksvig-Larsen S, Gianni S. Fixation strength and pin tract infection of hydroxyapatite-coated tapered pins. *Clin Orthop Relat Res*. 2001(388);209-217
59. Opalchenova G, Dyulgerova E, Petrov O.E. Effect of calcium phosphate ceramics on Gram-negative bacteria resistant to antibiotics. *J Biomedical Mater Res*. 1996(32):473-79
60. Nablo BJ, Prichard HL, Butler RD, Klitzman B, Schoenfisch MH. Inhibition of implant-associated infections via nitric oxide release. *Biomaterials*. 2005(26):6984-6990
61. Frost MC, Reynolds MM, Meyerhoff ME. Polymers incorporating nitric oxide releasing/generating substances for improved biocompatibility of blood-contacting medical devices. *Biomaterials*. 2005(26):1685-93
62. Harges J, Ahrens H, Gebert C, Streitberger A, Buerger H, Erren M, Günsel A, Wedemeyer C, Saxler G, Winkelmann W, Gosheger G. Lack of toxicological

- side-effects in silver-coated megaprosthesis in humans. *Biomaterials*. 2007(28) 2869-2875
63. Laga M, Meheus A, Piot P. Epidemiology and control of gonococcal ophtalmia neonatarum. *Bulletin of the World Health Organization*. 1989;67(5), 471-78
 64. Klase H. Historical review of the use of silver in the treatment of burns. I early uses. *Burns*. 2000(26):117-130
 65. Valappil SP, Pickup DM, Carrol DL. Effect of silver content on the structure and antibacterial activity of silver doped phosphate-based glasses. *Antimicrob Agents Ch*, 2007:4453-4461
 66. Zhao G, Stevens SE. Multipl Parameters fort he compharensive evaluation of the susceptible of echerichia coli to the silver ion. *Biomaterials*. 1998(11):27-32
 67. Alt V, Bechert T, Steinrücke P, Wagener M, Seidel P, Dingeldein E, Domann E, Schnettler R. An in vitro assessment of the antibacterial properties and cytotoxicity of nanoparticulate silver bone cement. *Biomaterials*. 2004(18):4383-91
 68. Shimazaki T, Miyamoto H, Ando Y, Noda I, Yonekura Y, Kawano S, Miyazaki M, Mawatari M, Hotokebuchi T. In vitro antibacterial and silver-releasing properties of novel thermal sprayed silver-containing hydroxyapatite coating. *J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomat*. 2010(92):386-89
 69. Page K, Pelgrave RG, Parkin IP, Wilson M, Savin SLP, Chadwick AV. Titania and silver-titania composite films on glass-potent antimicrobial coatings. *J Mater Chem*. 2007(17):95-104
 70. Yrd. Doç Dr Atilla Evcin. Afyonkarahisar Kocatepe Üniversitesi Kaplama Teknikleri Ders Notları. 2006
 71. Akhil Wadhera and Max Fung. Systemic argyria associated with ingestion of colloidal silver. *Dermatology Online Journal* 2005, 11(1):12.
 72. Gettler AO., Rhoads CP., Weiss S. A Contrubition to the pathology of generalized argryia with a discussion of the fate of silver in the human body. *Amer. J. Pathol*. 1927;3:631.

73. Blumberg H., Nelson CT. Argyremia: Detection Of Unsuspected And Obscure Argyria By The Spectrographic Demonstration Of High Blood Silver. J. Amer. Med. Assoc. 1934; 103:1521
74. Norbert W. Tietz (Ed) Clinical Guide to laboratory tests. 3rd edition. W.B. Saunders Company Pennsylvania, 1995, pp:560
75. Dr. Kutsal Devrim Seçinti, Uzmanlık Tezi, Gümüş Anot Uygulaması ve Gümüş Kaplı Anti Bakteriyel Vertebra İmplantları, Ankara, 2010.
76. J.M. Schierholz, I.C Lucas. Efficacy of silver-coated medical devices. Journal of Hospital Infection. 1998 40:257-262
77. Dr Spardaro JA. Silver Anode inhibition of bacteria. Proceedings of the First International Conference on Gold and Silver in Medicine, Bethesda, MD, May 1987; 13-14
78. Petty W, Spanier S, Shuster JJ, Silverthorne C. The influence of skeletal implants on incidence of infection: Experiment in a canine model. J. Bone Joint Am. 1985;67:1236-1244
79. W. Reizner, J.G Huner, N.T O'Malley, R.D Southgate, E.M Schwarz, S.L Kates. A Systemic review of animal models for Staphylococcus aureus osteomyelitis. Eur Cell Mater; 27: 196-212. 2015
80. Perry CR, Pearson RL, Miller GA. Accuracy of cultures of material from swabbing of the superficial aspect of the wound and needle biopsy in the preoperative assessment of osteomyelitis. J Bone Joint Surg Am. 1991; 73: 745-9.
81. Barth RE, Vogely HC, Hoepelman AI, Peters EJ. "To bead or not to bead?" Treatment of osteomyelitis and prosthetic joint-associated infections with gentamicin bead chains. Int J Antimicrob Agents. 2011; 38(5):371-375.
82. Desai A, Uskokovic V. Calcium phosphate nanoparticle: a future therapeutic platform for the treatment of osteomyelitis? Ther Deliv. 2013 June; 4(6): 643-645.

83. Ji-Le Jiang, Yun-Fei Li, Tao-Lin Fang, Jian Zhou, Xi-Lei Li, Yi-Chao Wang, Jian Dong. Vancomycin-loaded nano-hydroxyapatite pellets to treat MRSA induced chronic osteomyelitis with bone defect in rabbits. *Inflamm. Res.* (2012)61:207–215
84. Humphrey JS, Mehta S, Seaber AV, Vail TP. Pharmacokinetics of a degradable drug delivery system in bone. *Clin Orthop Relat Res* 1998: 218-24.
85. Lambotte JC, Thomazeau H, Cathelineau G, Lancien G, Minet J, Langlais F. Tricalcium phosphate, an antibiotic carrier: a study focused on experimental osteomyelitis in rabbits. *Chirurgie*. 1998 Dec; 123(6):572-9.
86. Lazarettos J, Efstathopoulos N, Papagelopoulos PJ, Savvidou OD, Kanellakopoulou K, Giamarellos-Bourboulis EJ, Nikolau V, Kapranou A, Papalois A, Papachristou G. A bioabsorbable calcium phosphate delivery system with teicoplanin for treating MRSA osteomyelitis. *Clin Orthop Relat Res*. 2004 Jun; (423):253-8
87. Börzsei L, Mintal T, Koos Z, Kocsis B, Helyes Z, Kereskai L, Nyarady. Examination of a novel, specified lokal antibiotic therapy through polymethylmethacrylate capsules in a rabbit osteomyelitis model. *J Chemotherapy*. 2006; 52(2):73-9.
88. Webb JC, Spencer RF. The role of polymethylmethacrylate bone cement in modern orthopaedic surgery. *J Bone Joint Surg*. 2007;89:851-7.
89. Gianluigi Franci, Annarita Falanga, Stefania Galdiero, Luciana Polomba, Mahendra Rai, Giancarlo Morelli, Massimiliano Galdiero. Silver Nanoparticles as Potential Antibacterial Agents. *Molecules* 2015;20:8856-8874
90. Kim Soo-Hwan, Hyeong-Seon Lee, Deok-Seon RYU, Soo-Jae Choi, Dong-Seok Lee. Antibacterial Activity of Silver-nanoparticles Against *Staphylococcus aureus* and *Echerichia coli*. *Korean J. Microbial. Biotechnol.* 2011. Vol.39, No.1, 77-85
91. Kose N., Otuzbir A., Peksen C., Kiremitci A., Dogan A. A Silver ion-doped calcium phosphate-based ceramic nanopowder-coated prosthesis increased infection resistance. *Clin Orthop Relat Res*. 2013; 417(8):2532-9

92. Fung MC, Bowen DL. Silver products for medical indications: Risk-benefit assessment. *Clinical Toxicology*. 34; 1:119-126.
93. Cutting K, White R, Edmonds M. The safety and efficacy of dressing with silver addressing clinical concerns. *Int Wound J*. 2007;4:177-184.
94. Trop M, Novak M, Rodl D, Helborn B, Kroel W, Goessler W. Silver-coated dressing acticoat caused raised liver enzymes and argyria-like symptoms in burn patient. *J Trauma*. 2006;60:648-652
95. Tweden KS, Cameron JD, Razzouk AJ, Holmberg WR., Kelly SJ. Biocompatibility of silver-modified polyester for antimicrobial protection of prosthetic valves. *J Heart Valve Dis*. 1997; 6(5):553-61
96. Gamelli RL, Paxton TP, O'Reilly M. Bone marrow toxicity by silver sulfadiazine. *Surg Gynecol Obs*. 1993;177(2):115-20
97. Maneewattanapinyo P., Banlunara W., Thammacharoen C., Ekgasit S., Kaewamatawong T. An evaluation of Acute Toxicity of Colloidal Silver Nanoparticles. *Journal of Veterinary Medical Science* 2011; 73(11) 1417-1423
98. Sung JH., Ji JH., Song KS. Acute Inhalation toxicity of silver nanoparticles. *Toxicology and Industrial Health* 27(2):149-154
99. Kim T., Kim M., Park H. Size dependent cellular toxicity of silver nanoparticles. *Journal of Biomedical Materials Research*. 2012; Vol. 100A, Issue 4
100. Hussmann B., Johann I., Kauther MD., Landgraeber S., Jager M., Landemans S. Measurement of the silver ion concentration in wound fluids after implantation of silver-coated megaprotheses: Correlation with clinical outcome. 2013; BioMed Research International. Article ID 763096
101. Wafa H., Grimer RJ., Reddy K., Jeys L., Abudu A., Carter SR., Tillman RM. Retrospective evaluation of the incidence of early periprosthetic infection with silver-treated endoprotheses in high-risk patients. *Bone Joint J*. 2015; 97-B:252-7

102. Harges J, von Eiff C, Streitbuerger A, et al. Reduction of periprosthetic infection with silver-coated megaprotheses in patients with bone sarcoma. *J Surg Oncol* 2010;101:389-395
103. Browne M, Gregson PJ. Effect of mechanical surface pretreatment on metal ion release. *Biomaterials*. 2000; 21: 385-392
104. Yang Y, Kim K, Ong JL. A review on calcium phosphate coatings produced using a sputtering process. An alternative to plasma spraying. *Biomaterials* 2005;26:327-337
105. Rohit Jain, Harjit Kaur, Snjiv Jain, Diljit Kapoor, Tarun Nanda, Megha Jain. Comparison of Nano-Sized Hydroxyapatite and Beta-Tricalcium Phosphate in the Treatment of Human Periodontal Intrabony Defects. *Journal of Clin and Diagnostic Research*. 2014; 8(10):74-78
106. Surgical treatment of osteomyelitis. Cierny G. *Plast Reconst Surg*. 2011; Jan; 127 Suppl 1:190-204.
107. OECD Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. 2012
108. Michael Torzewski, Ahmed Bilal Waqar, Jianglin Fan. *Animal Models of C-Reactive Protein*. Hindawi Publishing Corporation. 2014/10.11.55

