

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**GÜMÜŞ ANOT UYGULAMASI VE GÜMÜŞ KAPLI ANTI
BAKTERİYEL VERTEBRA İMPLANTLARI**

Dr. Kutsal Devrim SEÇİNTİ

**BEYİN OMURİLİK VE SİNİR CERRAHİSİ ANA BİLİM DALI
UZMANLIK TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Ayhan ATTAR**

**ANKARA
2010**

ÖNSÖZ

Asistanlık eğitimim süresince mesleki bilgi, beceri ve deneyimlerinden yararlandığım değerli hocalarıma, uzmanlık tezimin meydana getirilmesinde her konuda yardımını esirgemeyen, tez hocam Doçent Doktor Ayhan Attar'a, mesleki ve sosyal hayatta desteklerini her zaman yanımda hissettiğim Operatör Doktor Melih Bozkurt'a ve Operatör Doktor Gökmen Kahiloğulları'na, tezin yazım aşamasında desteğini esirgemeyen değerli arkadaşım Doktor Hakan Özalp'e sonsuz teşekkürlerimle...

Yıllarca beraber çalıştığım ve farkına bile varmadan ikinci bir ailem haline gelen asistan arkadaşlarıma, beni "gümüş anot" terimiyle tanıştıran, hem okul hem de asistanlık dönemim boyunca ilk başvuru kaynağım olan, her aradığımda ulaşabildiğim ve her zaman doğru cevaplar, yerinde yönlendirmeler aldığım, kafamdaki "bilim insanı"nı tanımlayan, Diş Hekimi Murat Aydın'a saygılarımla...

Doktorluğu ve beyin cerrahisini sevdiren ve idealim haline gelmesini sağlayan, eğitim hayatım boyunca her zaman yanımda olan, her türlü desteği esirgemeyen, kendisiyle daima gurur duyduğum sevgili babam Operatör Doktor Celal Seçinti'ye, anneme ve kardeşime saygı, sevgi ve şükranlarımla...

En zor günlerimde, varlıklarıyla gerek sosyal hayatta gerekse mesleki hayatımda varlıklarıyla bana güç veren oğlum Ege Kaan'a ve Bilgehan Demir'e sevgilerimle....

Dr. Kutsal Devrim SEÇİNTİ

İÇİNDEKİLER

Sayfa No:

KABUL VE ONAY	i
ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	iii
KISALTMALAR DİZİNİ	v
TABLO DİZİNİ	viii
RESİM VE ŞEKİL DİZİNİ.....	ix
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. SPİNAL İMPLANT VE ENFEKSİYON.....	4
2.1.1. Spinal İmplantın Tarihçesi	4
2.1.2. İmplant Bağımlı Enfeksiyonun Epidemiyoloji ve İnsidansı	4
2.1.3. İmplant Kullanılan Cerrahi Uygulamalarda Bakteri – İmplant – Enfeksiyon İlişkisi.....	5
2.1.4. İmplant Üzerinde Gelişen Biyofilm Tabakasının Yapısı ve Özellikleri	6
2.1.5. Osteomyelit	9
2.1.5.1. Tanımı ve Genel Özellikleri	9
2.1.5.2. Akut Osteomyelit	10
2.1.5.3. Kronik Osteomyelit	10
2.2. GÜMÜŞ.....	11
2.2.1. Gümüşün Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri ve Tarihçesi.....	11
2.2.2. Tıp Tarihinde Gümüş	12
2.2.3. Bu Gün Tıpta ve Teknolojide Gümüş	14
2.3. GÜMÜŞ ANOT UYGULAMASI.....	15
2.4. GÜMÜŞÜN ve GÜMÜŞ ANOTUN ANTİMİKROBİYAL ETKİ MEKANİZMASI	18
2.5. İMPLANT ÜZERİNE GÜMÜŞ KAPLAMA YÖNTEMLERİ.....	19

2.5.1. Elektrolitik Gümüş Kaplama Yöntemi (Electroplating)	19
2.5.1.1. Klasik Yöntemler.....	19
2.5.1.2. Siyanür İçermeyen Yöntemler.....	20
2.5.2 Sol-Jel Yöntemi.....	22
2.5.2.1 Genel Bilgiler	22
2.5.2.2 Sol-jel Prosesinin Kullanıldığı Kaplama Yöntemleri.....	23
2.5.2.3 Daldırma Yöntemi ile Kaplama	23
3. MATERYAL VE METOD	25
3.1. GÜMÜŞ KAPLI SPİNAL İMPLANTLAR İLE DİĞER İMPLANTLARIN İN VİTRO VE İN VİVO KARŞILAŞTIRILMASI.....	25
3.1.1. Saf Gümüş Elektrotun ve Gümüş İçerikli Fiberlerin Antimikrobiyal Özelliklerinin Gösterilmesi (1. Çalışma).....	25
3.1.1.1. Amaç.....	25
3.1.1.2. Materyal ve Metod	25
3.1.1.3. Sonuçlar.....	26
3.1.1.4. Karar	26
3.1.2. Gümüş Kaplı İmplantların Saf Gümüş İle ve Normal Titanyum Alaşımli İmplantlarla Karşılaştırılması (2.Çalışma).....	29
3.1.2.1. Amaç.....	29
3.1.2.2. Materyal ve Metod	29
3.1.2.3. Sonuçlar.....	30
3.1.2.4. Karar	31
3.1.3. Gümüş Kaplı İmplantların Antibakteriyel Etkisinin Konvansiyonel Titanyum Alaşımli İmplantlarla Karşılaştırılması (3. Çalışma).....	31
3.1.3.1. Amaç	31
3.1.3.2. Materyal ve Metod	31
3.1.3.3. Sonuçlar.....	35

3.1.3.4. Karar	37
3.1.4. Sol-Jel Yöntemiyle Gümüş Kaplanan Vidaların Besi Yeri Test Edilmesi (4. Çalışma)	39
3.1.4.1. Amaç	39
3.1.4.2. Materyal ve Metod	39
3.1.4.2.1. Vida seçimi	39
3.1.4.2.2. Gümüş kaplama	39
3.1.4.2.3. Bakteri seçimi	40
3.1.4.2.4. Bakteri ekimi, Grupların oluşturulması ve Gümüş anot uygulaması	40
3.1.4.3. Sonuçlar	41
3.1.4.4. Karar	42
3.1.5. Sol-Jel Yöntemiyle Yapılan Kaplamalarda Mümkün Olan En Düşük Gümüş Konsantrasyonunun Belirlenmesi (5. Çalışma)	43
3.1.5.1. Amaç	43
3.1.5.2. Materyal ve Metod	43
3.1.5.3. Sonuçlar	45
3.1.5.4. Karar	46
3.1.6. Sol-Jel Yöntemi İle Yapılan Kaplamaların Antibakteriyel Etkisinin Elektrik Akımı Olmaksızın Test Edilmesi (6.Çalışma)	46
3.1.6.1. Amaç.....	46
3.1.6.2. Materyal ve Metod	46
3.1.6.3. Sonuçlar.....	48
3.1.6.4. Karar	49
3.1.7. Gümüş Kaplı İmplant Kullanılan Deney Hayvanlarının Vücut Sıvılarında ve Bazı Önemli Dokularında Gümüş Miktarının Belirlenmesi (7. Çalışma).....	49
3.1.7.1. Amaç:	49

3.1.7.2. Materyal ve Metod	49
3.1.7.2.1. Plazma ve İdrarda Gümüş Tayini.....	50
3.1.7.2.2. Karaciğer, Böbrek, Beyin, ve Kornea Örneklerinde Gümüş Tayini	50
3.1.7.3. Sonuçlar.....	51
3.1.7.4. Karar	51
3.1.8. Dokularda Histopatolojik Olarak Gümüş Aranması (8.çalışma)	51
3.1.8.1. Amaç.....	51
3.1.8.2. Materyal ve metod.....	52
3.1.8.3. Sonuçlar.....	54
3.1.8.4. Karar	54
3.1.9. Elektron Mikroskop Çalışması (9. çalışma).....	55
3.1.9.1. Amaç.....	55
3.1.9.2. Materyal ve Metod.....	55
3.1.9.2.1. Transmission Elektron Mikroskop Çalışması (TEM)	55
3.1.9.2.2. Taramalı (Scaning) Elektron Mikroskop Çalışması (SEM).....	56
3.1.9.2.3. Sonuçlar	56
3.1.9.2.4. Karar	61
3.1.10. Mekanik Dayanıklılık Deneyi (10. çalışma)	61
2.6.10.1. Amaç.....	61
3.1.10.2. Materyal ve Metod	62
3.1.10.3. Sonuçlar	62
3.1.10.4. Karar	63
3.2. GÜMÜŞ KAPLI TRANSPEDİKÜLER VİDA – ROD SİSTEMİ İLE YAPILAN KLİNİK ÇALIŞMA VE İLK 50 HASTANIN 1 YILLIK TAKİP SONUÇLARI.....	64
3.2.1. Amaç	64

3.2.2. Materyal ve Metod	65
3.2.2.1. Gümüş kaplı implantlar	65
3.2.2.2. Hasta seçimi.....	65
3.2.2.3. Uygulanan yaklaşım ve yöntemler	65
3.2.2.4. Kan ve idrarda gümüş tayini.....	68
4. BULGULAR.....	69
5. TARTIŞMA	71
6. ÖZET	75
7. SUMMARY	80
7. KAYNAKLAR	80

KISALTMALAR

Ag	: Argentum (Gümüş)
ATP	: Adenosine Triphosphate
Ca	: Calsiyum
cAMP	: Cyclic Adenosine Mono Phosphate
CFU	: Colony Forming Unit
CRP	: C-Reaktive Protein
DNA	: Deoxyribo nucleic acid
EPS	: Exopolysaccaride
ESR	: Eritrocyte Sedimentation Rate
IgG	: İmmünglobulin G
kOhm	: Kilo Ohm
MÖ	: Milattan Önce
MRG	: Manyetik Rezonans Görüntüleme
MRSA	: Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus
MS	: Milattan Sonra
NADP	: Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
PEEK	: Poly Ether Ether Kethone
RNA	: Ribonucleic Acid
SEM	: Scaning Electron Microscope
SiC	: Silisium Carbür
SPB	: Sorenson's Phosphate Buffer
Staf.	: Staphylococcus
TEM	: Transmission Electron Microscope
V	: Volt
ng	: Nanogram
µA	: Mikro Amper
µm	: Mikrometre
µg	: Mikrogram

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1: Silveron™ AG-100 gümüş kaplama sistemi ile kaplama yapabilmek için gereken parametreler.

Tablo 2: Silveron™ AG-100 gümüş kaplama sistemi ile kaplama yapabilmek için uygulanacak prosedürde kullanılacak malzemelerin miktarları.

Tablo 3: Farklı mikroorganizmaların, farklı elektrik akımı değerlerine ve farklı uygulama sürelerine verdikleri farklı cevaplar (gümüş anot uygulaması, Silverlon ve saf gümüş metali)

Tablo 4: Gümüş içeren naylon fiberlerle (Silverlon) yapılan çalışma.

Tablo 5: Deneysel gümüş anot uygulamasında gruplar, vida türleri ve elektriksel parametreler.

Tablo 6: Sol-jel yöntemiyle kaplanan vidaların zon miktarı, gruplar ve akım parametreleri.

Tablo 7: Hastalara ait genel bilgiler ve kullanılan vida sayıları.

Tablo 8: Çalışmaya dahil edilen hastaların 1 yıllık laboratuvar takip sonuçları ve gümüş miktarları.

ŞEKİLLER ve RESİMLER DİZİNİ

Sekiller:

Şekil 1: Gümüş anotun polarizasyon eğrisi

Şekil 2: Hidroliz, kondenzasyon ve hız arasındaki bağıntılar.

Şekil 3: Daldırma yöntemi

Resimler:

Resim 1: Gümüş anot uygulaması (Silverlon ve saf gümüş metali)

Resim 2: Tavşanda gümüş kaplı vida implantasyonu (peroperatif görüntü)

Resim 3: Tavşanda gümüş kaplı vida implantasyonu (postoperatif direkt grafi)

Resim 4: Deney gruplarına ait kemik doku ve komşu yumuşak dokunun histopatolojik görüntüsü.

Resim 5: Petri kutusundaki gümüş anot uygulamasında gümüş kaplı titanyum implant etrafındaki inhibisyon zonu.

Resim 6: Petri kutusundaki gümüş anot uygulamasında gümüş kaplı olmayan titanyum implant etrafında inhibisyon zonunun yokluğu.

Resim 7: Gümüş kaplı olmayan ve gümüş kaplı olan implantların aynı bakteriye karşı etkilerinin aynı Petri kutusunda görünümü.

Resim 9: % 5'lik solüsyonla kaplama

Resim 10: %2.5'lük solüsyonla kaplama

Resim 11: Kaplama yapılmamış plaka.

Resim 12: Gümüş kaplı plaka (% 2.5)

Resim 13: Sağ yarısı gümüş ile kaplanmış titanyum silindir.

Resim 14: Gümüş kaplı implant kullanılan gruba ait deneğin böbrek dokusu

Resim 15: Gümüş kaplı implant kullanılan gruba ait deneğin beyin dokusu.

- Resim 16:** Gümüş kaplı implant kullanılan gruba ait deneğin karaciğer dokusu
- Resim 17:** Gümüş kaplı implant kullanılan gruba ait deneğin kornea dokusu
- Resim 18:** Gümüş kaplı vidanın elektron mikroskopik görüntüsü.
- Resim 19:** Gümüş kaplı olmayan vidanın elektron mikroskopik görüntüsü ve biyofilm oluşumu.
- Resim 20:** Gümüş kaplı olmayan vidanın elektron mikroskopik görüntüsü, biyofilm oluşumu, hifler, mantarlar ve bakteriler.
- Resim 21:** Gümüş kaplı vidanın ve gümüş kaplı olmayan vidanın kullanıldığı gruplarda, vidaya yakın kemik dokularının elektron mikroskopik görüntüsü.
- Resim 22:** Gümüş kaplı vidanın kullanıldığı grupta böbrek dokusu (TEM çalışması).
- Resim 23:** Gümüş kaplı vidanın kullanıldığı grupta karaciğer ve beyin dokusu (TEM çalışması).
- Resim 24:** Gümüş kaplı vidanın kullanıldığı grupta kornea dokusu (TEM çalışması).
- Resim 25:** Silisyum Karbür (SiC) kullanılarak yapılan deneylerden sonra kaplamanın görüntüsü.

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Vertebra implantasyon cerrahisinde son yıllarda büyük ilerlemeler kaydedilmiştir. Özellikle kullanılan implantlardaki gelişmeler, bu implantların vertebra fraktürlerinde, neoplastik ve dejeneratif vertebra hastalıklarında kullanımını giderek artırmaktadır (1). Vertebra patolojilerinde implant kullanımı birçok avantaja sahiptir. Deforme ya da dejenere vertebranın düzeltilmesi, dekompresyon sonrasında vertebral kolonun desteklenmesi ve restorasyonu, hastaların daha hızlı ayağa kaldırılabilmesi implant uygulamasının başlıca avantajlarıdır (2). Medulla spinalis ve/veya sinir kökü hasarlanması, konak ile yabancı cisim arasındaki uyumsuzluk, cerrahideki teknik başarısızlıklar, postoperatif yüksek “implant bağımlı enfeksiyon” oranı ve tedavi maliyetlerindeki artış ise dezavantajlarıdır (3).

Diskektomi, laminektomi gibi implant kullanılmayan rutin vertebra cerrahisi uygulamalarında cerrahi enfeksiyon oranları yaklaşık olarak %1’dir (4, 5). Ancak aynı oran implant kullanımı durumunda %2.1-8.5’lara çıkmaktadır (6, 7). Bu da implant cerrahisinin enfeksiyon artırıcı yönünü ortaya koymaktadır. Cerrahi sahada ölü boşluğun olması, implant varlığı, nekrotik dokular, operasyon süresinin uzaması, operasyona katılan kişilerin sayısının bu tür operasyonlarda daha fazla olması, postoperatif enfeksiyon riskini arttırmaktadır (8). Yapılan çalışmalar, cerrahi sahada implant varlığının, tek başına hastayı hem erken hem de geç dönemde enfeksiyona duyarlı hale getirdiğini göstermiştir (9). Aynı şekilde ölü kemik dokusu ve travmatize olmuş yumuşak dokuların varlığı da enfeksiyon riskini arttırmaktadır. İmplant materyali üzerinde oluşan bakteriyel biyofilm tabakası, enfeksiyonun tedavisini güçleştiren en önemli faktördür (9). Biyofilmler, her hangi bir yüzeye, kendilerine özgü adezyon molekülleri aracılığı ile bağlanmış ağ şeklinde mikro organizma toplulukları olup, iki tabakalıdır. Alttaki tabaka maya hücrelerinden, üstteki tabaka ise hiflerden meydana gelmiştir ve daha kalındır (10,11). Biyofilmler, konak savunma faktörlerine, antibiyotiklere ve antifungallere dirençlidirler (12). Bu nedenle biyomateryallerde oluşan enfeksiyonlar, bu materyal çıkartılana kadar antibiyotik tedavisine yanıt vermez ya da çok az yanıt verir (13, 14). İmplant kullanılan vertebra operasyonu sonrasında gelişen implant bağımlı enfeksiyonlar, bu

gün bile çözülmesi zor sorunların başında gelmektedir. Hastaların yaklaşık yarısında tek başına antibiyotik tedavisi yetersiz kalır ve cerrahi girişim ile implantın çıkartılması ve bazı durumlarda da yeni bir implant sisteminin tekrar takılması kaçınılmaz olur. Ülkemizde konu hakkında yeterli veri olmasa da, ABD istatistiklerine göre bu hastaların tedavisi hasta başına 6000 ile 900.000 dolar arasında değişmektedir (1, 15, 16). Bu durum bile “enfeksiyon riskini azaltacak” bir implant geliştirmek için çalışmayı gerekli kılmaktadır.

Günümüzde impantlı vertebra cerrahisi sonrasında enfeksiyonu önlemeyi amaçlayan klinik ve deneysel çalışmalar sürmektedir. Ancak yapılan bu çalışmaların sayısı oldukça azdır vertebrada enfeksiyon ile ilgili yeterli çalışma yoktur. Tavşan vertebraında implant bağımlı enfeksiyon modelini ilk oluşturanlar Poelstra ve arkadaşları olmuştur (17). Oluşturulan bu modelde ajan patojen olarak MRSA (metisiline dirençli S.aureus) kullanılmış ve tavşan vertebraına paslanmaz çelik Kirschner teli implante edilmiştir. Günümüzde implant operasyonlarında daha çok kullanılan metal olan titanyum ile ilgili yeterli çalışma henüz mevcut değildir. Yapılan çalışmalar titanyumun biyolojik uyumunun paslanmaz çeliğe göre daha iyi olduğunu ve enfeksiyona yatkınlığının paslanmaz çeliğe göre daha az olduğunu göstermiştir (18).

Gümüş, Akdeniz kıyısındaki insanlarca, yaklaşık olarak, milattan önce 4000 yılından beri bilinmekte olan çok eski ve değerli bir metaldir. Özellikle antik dönemde Yunanistan’da gümüş madenciliği çok önemli bir ticaret maddesi olmuştur. Doğal olarak veya bakır, altın ya da kurşunla bileşik halde bulunabilir. Toksik bir metal olarak düşünülse de, asla arsenik, antimon ya da kurşunla kıyaslanamaz. Bu güne dek, hayvan veya bitki metabolizmasında önemli bir fonksiyonu olduğuna dair kanıt bulunamamıştır (19). Gümüşün toksik aktivitesi çoğunlukla lokaldir. Sistemik etkisi lokal kalmaya meyillidir çünkü gümüş çok yavaş emilir. Gümüş iyonları, proteinlere bağlanarak uygulama bölgesinde gümüş klorür çökeltileri oluştururlar. Çok az miktarda gümüş, mukoz membranlardan ya da yanık hastalarında ciltten gümüş nitrat şeklinde emilir. Absorbe edilen gümüş, vücutta geniş bir dağılım alanı bulur. Özellikle, cildin subepitelyal bölgesinde birikir. Çok fazla birikmesi sonucunda, argyria (arjiri) olarak da bilinen mavi-gri renk koyulaşmasına neden

olur. Bu pigment, gümüş sülfid ve metalik gümüştan ibarettir, tek sorun kozmetik sorundur ve kalıcıdır.

Arjiri, genelde endüstriyel maruziyet sonrasında ve 2 ile 25 yıl arasında bir zamanda yavaş yavaş gelişir. Jeneralize olmak yerine, maruziyetin olduğu bölgede lokalize olmaya meyillidir. En fazla ciltte ve solunum yollarında görülür. Jeneralize arjiri, inhalasyon ya da oral alım sonrası görülebilir (20, 21).

Diğer bazı metallerde olduğu gibi, saf gümüşün de bakteri üremesini engelleyici özelliği vardır. Bu etki “oligodinamik etki” olarak bilinir. Yanıklarda kullanılmasının sebebi bu anti bakteriyel etkidir. Metaller genel olarak pozitif yüklüdürler, yani başka bir deyişle, bir akım kaynağının pozitif ucuna bağlandıklarında ortama saldıkları iyon miktarı artarken, negatif kutba bağlanmış metalde bu özellik tam aksine sınırlandırılmış olur. Bu şekilde, bir akım kaynağının pozitif kutbuna bağlanmış gümüş elektrot için “gümüş anod” terimi, anti bakteriyel etki sağlamayı amaçlayan bu uygulama için ise “gümüş anot uygulaması” terimi kullanılmaktadır. Gümüş anot uygulamasının anti bakteriyel, anti fungal ve anti viral olduğu daha önceki çalışmalarca defalarca gösterilmiştir (22-29).

Bir taraftan implant kullanımının enfeksiyon riskini artırması, bir taraftan biyofilm yapısının bakteri, maya ve hiflerden oluşmuş olması, diğer bir taraftan da gümüşün hem antibakteriyel hem de antifungal özellik göstermesi göz önüne alındığında ve tüm veriler bir arada düşünüldüğünde gümüş kaplı bir implantın hem enfeksiyon oranını azaltacağı hem de biyofilm oluşumunu engelleyeceği öngörülebilir. Bu gümüş kaplamalı sisteme, bir de zayıf elektrik akımının gümüşün etkisini artırıcı katkısı eklendiğinde uygulamanın implant cerrahisi alanında çok farklı bir sayfa açabileceği ortadadır.

Bu çalışma; tüm bu verilerden yola çıkarak, gümüş kaplı vertebra implantlarının ve gümüş anot uygulamasının anti bakteriyel etkisini incelemeyi, uygulamanın biyofilm oluşumuna etkisini gözlemlemeyi ve gümüş ile kaplanan implantların hayati organlarda ve vücut sıvılarında gümüş birikimine neden olup olmayacağını ve gümüşe bağlı toksik bir durumun gelişip gelişmeyeceğini incelemeyi amaçlamıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. SPİNAL İMPLANT VE ENFEKSİYON

2.1.1. Spinal İmplantın Tarihçesi

Wilkins tarafından 1887 yılında, torakolomber dislokasyon nedeni ile yenidoğan bir bebekte, pediküler telleme şeklinde yapılan operasyon ilk internal fiksasyon olarak bilinir (30). Bu operasyonun ardından Hadra, 1891 yılında servikal fraktürde C6-7 spinoz çıkıntıyı telleme yoluyla servikal fiksasyon yapmıştır (31). Dr.Albee ve Dr.Hibbs, 1911 yılında tibiadan aldıkları grefti iki spinoz çıkıntı arasına koyarak vertebra cerrahisinde ilk defa füzyon uygulamışlardır (32, 33). Vertebra cerrahisinde ilk vidanın kullanımı ise 1944'de Don King tarafından faset vidalaması şeklinde yapılmıştır. İlk pedikül vidalama tekniğini ise 1959'da Don King'in yöntemini geliştiren Boucher tanımlamıştır (34). Harrington ve Knoth'un 1950'lilerde rodları kullanmaları bundan sonraki en önemli aşama olmuştur (35, 36). Günümüze kadar vertebra cerrahisinde implant kullanımı giderek artmış ve birçok yeni implant geliştirilmiş, birçoğu da gelişen teknoloji ile birlikte modifiye edilmişlerdir. Vertebra enfeksiyonlarının tarihçesi Hipokrat'a kadar dayansa da gerçek anlamda ilk çalışma Pott tarafından yapılmıştır. Pott 1779 yılında bir yazısında tüberküloza bağlı omurga absesinde drenaj önermiştir (37).

2.1.2. İmplant Bağımlı Enfeksiyonun Epidemiyoloji ve İnsidansı

Son 15 yıl içinde piyojenik vertebra osteomyelitinin görülme sıklığı artmıştır. Tüm osteomyelit olgularının yaklaşık %2-4'ünü vertebra osteomyeliti oluşturmaktadır (38, 39). Bunun birçok nedeni vardır, en başta tanı yöntemleri gelişmiş ve cerrahi girişim yapılan hasta sayısı artmıştır. Sonuç olarak implant kullanımında artış olmuştur. İmplant kullanımındaki bu artış da implant bağımlı enfeksiyon oranlarını değiştirmiştir. Özellikle vertebra cerrahisinde

enstrümantasyonun daha sık kullanılmaya başlandığı 1960'lı yıllardan başlayarak vertebra enfeksiyonlarının insidansında da artış görülmektedir (7, 17, 40). Spontan piyojenik vertebra osteomyeliti yaşlılarda, intravenöz madde ya da ilaç kullananlarda, diabetik hastalarda, immun yetmezliği olanlarda ve prostetik kalp kapağı taşıyan hastalarda daha yüksek oranlarda görülmektedir (41, 42). Diğer taraftan uzun süreli steroid kullanımı, neoplastik süreçler, kemoterapi, kronik böbrek yetmezliği ve alkol alışkanlığı da vertebra enfeksiyonlarına yatkınlığı artırmaktadır (43, 44). Spontan enfeksiyonlarda olduğu gibi, postoperatif enfeksiyon riski de aynı risk grubunda artış göstermektedir (45, 46).

İmplant kullanılmayan olgularda postoperatif enfeksiyon oranı % 2 iken implant kullanılan olgularda aynı oran %7 olarak bildirilmiştir (47). Aynı kaynakta, erişkin olgularda implant kullanılan cerrahiler sonrası enfeksiyon oranı %20 olarak rapor edilmiştir. Aynı çalışmacıların daha sonra yayınladıkları yazılarında ise profilaktik antibiyotik kullanımı sonrasında implant bağımlı enfeksiyon oranlarının %7'den %3.6'ya düştüğünü bildirilmiştir (46). Kostuik'a göre erişkinlerde implant bağımlı enfeksiyon oranı %8.5 iken (48) Roy-Camille, Louis ve Zuckerman'a göre transpediküler enstrümantasyon sonrası enfeksiyon oranı yaklaşık %6'dır (49, 50, 51). Profilaktik antibiyotik kullanılan olgularda operasyon sonrasında bildirilen enfeksiyon oranları metal implant kullanılmayan durumlarda %1 civarında iken, metal implantın kullanıldığı durumlarda % 2.1-8.5'dir (6, 7). Buradan da anlaşılacağı gibi implant kullanımı ile enfeksiyon gelişimi arasında ciddi bir ilişki bulunmaktadır.

2.1.3. İmplant Kullanılan Cerrahi Uygulamalarda Bakteri – İmplant – Enfeksiyon İlişkisi

Metal implantların kullanıldığı cerrahi girişimlerde iki önemli sorundan ilki implant bağımlı enfeksiyonlar, diğeri ise konak dokunun implanta verdiği immün cevaptır (38). Yapılan çalışmalar, implant varlığında konak dokusunun erken ve geç enfeksiyona eğiliminde artış olduğunu göstermektedir (14, 52, 53). Ölü kemik ya da travmatize olmuş yumuşak dokular da benzer etkiyi yaparlar (54). İmplantların

başarısı, temas halinde oldukları dokuların hücrelerine çok iyi yapışmalarına, implant yüzeyi ve membran molekülleri arasında kimyasal bağların oluşabilmesine bağlıdır (55, 56, 57). İmplant yüzeyine yapışmak için konağın doku hücreleri ile bakteriler arasında bir yarış başlar. İmplant yüzeyinin kaderi bu yarışın sonucuna bağlıdır. Eğer bu yarış doku tarafından kazanılırsa implantın yüzeyi bakterilerin kolonizasyonuna daha az elverişli hale gelir. Aksi halde implant yüzeyi bakteriler tarafından işgal edilecek ve enfeksiyon başlayacaktır (58). Doğal ekosistemde yapılan çalışmalar, hareketsiz yüzeylerde, bakterilerin %99.9'dan fazlasının iç yüzeylere yapışarak mikrokoloniler oluşturduklarını ve bu sayede oluşturdukları biyofilm tabakalarda yaşadıklarını göstermiştir (59). Biyomateryaller üzerinde kolonize olan bu bakteriler, aynı zamanda biyomateryallere yapışık, kalın, iki katmanlı biyofilm tabakaları içerisinde de büyürler (14, 60). İlk olarak Gristina'nın bir hastasının enfekte femur kemiğinden çıkardığı implantı incelemesi ve implant yüzeyinde glikokaliks kaplı biyofilm tabakalar içerisinde yaşayan bakteriyal mikrokolonileri göstermesinin ardından geçen zamanda (61) biyofilm formasyonunun yapısı ve komponentleri hakkında var olan bilgimiz giderek artmıştır.

2.1.4. İmplant Üzerinde Gelişen Biyofilm Tabakasının Yapısı ve Özellikleri

Biyofilmler, her hangi bir yüzeye, kendilerine özgü adezyon molekülleri aracılığı ile bağlanmış ağ şeklinde mikro organizma toplulukları olup, iki tabakalıdır. Alttaki tabaka maya hücrelerinden, üstteki tabaka ise hiflerden meydana gelmiştir ve daha kalındır (10, 11). Biyofilmler, konak savunma faktörlerine, antibiyotiklere ve antifungallere dirençlidirler (12). Biyofilm tabakaları, polinükleer lökositlerin kemotaksisinin inhibisyonunu sağlayarak opsonizasyon ve fagositozu olumsuz yönde etkilemektedirler (62, 63). Mikroorganizmanın konak hücreye ve yapay yüzeylere tutunmasından sorumlu madde "slime faktör" denilen kompleks bir yapıdır. İlk kez 1982'de Christensen tarafından *Staphylococcus epidermidis* için tanımlanmıştır ve protein, hekzoaminler, nötral şekerler ve fosforlu bileşikler gibi birçok maddeden oluşan bu faktör, %40 karbonhidrat ve %27 protein

içeren glikokaliks yapısında, hücre dışı bir maddedir (64, 65). Slime faktör, yapay yüzeylerde fibrin ve fibronektinin de katılımı ile biyofilm tabakası oluşturur ve buradan vücuda salınan mikroorganizmalar sepsise dahi neden olabilir (66, 67).

Biyofilm yapısının kütlece %97 gibi büyük bir kısmını sudur. Kompleks yapı içerisindeki diğer komponentler ise; %1-2 eksopolisakkarit (EPS), %1-2 globuler glikoproteinler ve diğer proteinler, %1-2 nükleik asit, lipit, fosfolipitlerdir. Ne var ki tüm bu oranlar mikro organizmaların çeşidine, fizyolojik özelliklerine ve gelişme ortamının doğasına bağlı olarak değişiklik gösterir (68). Polisakkarit, protein, DNA ve sudan oluşan ekstraselüler matriks, bakterinin yüzeye tutunmasını sağlar. Yüzeye sıkıca tutunan bakteri burada çoğalarak önce mikrokolonileri oluşturur, bu mikrokoloniler ise genişleyerek biyofilm tabakasını oluşturur. EPS üretimi, organizmanın yüzeye kalıcı olarak tutunması için gereklidir ve bu durum, biyofilm oluşumunun bir işaretidir. Yapılan bir çalışma, (69) *Pseudomonas fluorescens* B52 suşunun planktonik formunun ve biyofilm içindeki formunun EPS üretimini karşılaştırmış ve biyofilm içinde ramnoz, glukoz ve glukozamin dışında glukoronik asit gibi polisakkaritlerin de olduğunu ve bunların miktarlarının cam yüzeylere kıyasla paslanmaz çelik yüzeyde daha fazla olduğunu belirtmiştir. Protein, Ca²⁺ iyonları ve polisakkaritlerin varlığı biyofilm yapısını daha da sağlamlaştırmaktadır (70). Ayrıca, hidrolaz, liyaz, glikozidaz, esteraz gibi enzimler biyofilmin bileşimine ve fiziksel özelliklerine olumlu yönde etki edebilir. Bu enzimlerin birçoğu düşük molekül ağırlıklı parçalanma ürünlerinin oluşumuna neden olmakta, bunlar da biyofilimde tutunan bakterilerin metabolizmasında karbon ve enerji kaynağı olarak kullanılabilir (68).

Biyofilmler yoğun yüzeyler olarak bilinmekle birlikte, son yıllarda yapılan çalışmalarda, su ve besin maddesinin bakteriye ulaşımının sağlandığı kanal benzeri yapıların bulunduğu belirlenmiştir. Biyofilm yapısındaki bu kanallar, mikrokolonilerin hem altında hem de arasında bulunmaktadır. Besinlerin biyofilm tabanına taşınması bu özel kanallarla olmaktadır. Hücresel atıklar da biyofilmin yüzeyinde yine bu kanallarla taşınır. Biyofilm içerisine molekül taşıma işlemi, su yardımıyla olabileceği gibi, pasif difüzyonla da gerçekleşebilir. Ayrıca bu kanalların, iç bölgelere oksijen taşıdığı da belirlenmiştir (71). Bakteriyel tutunmada,

proteinler gibi organik moleküllerin yüzeye tutunmasının da önemli bir rolü vardır. Yüzey proteinleri, biyofilm matriksi içinde düzenli bir şekilde yerleşmiştir (72). Bu proteinlerin bazıları, EPS varlığında biyofilm oluşumunu hızlandırabilmektedir. Taze besiyeri sağlandıkça biyofilm gelişimi devam eder. Ortamdaki besin maddeleri tükendiğinde ise yüzey bağlantıları zayıflar ve bakteriler planktonik modlarına geri dönerler. Besin yokluğu, hücrelerin yeni besin kaynakları aramalarına, ortamlara daha iyi adapte olmalarına ve yayılmalarına neden olur (73). Yapılan bir çalışma, bu noktaya dikkat çekerek, açlık durumunda kullanılan metabolik yolun bütün biyofilm gelişim döngüsünü kapsayabileceğini belirtmiştir (74). Biyofilmler, bakterinin tutunma yüzeyine ve sonradan bakterinin tutunmasını etkileyen organik ve inorganik maddelerin varlığına bağlı olarak içinde bakterilerin bulunduğu herhangi bir sulu yüzeyde oluşabilir (75). Bakteriler, farklı tipteki yüzeylere tutunabilirler. Dolayısıyla, biyofilm oluşturabilmeleri ve bu biyofilmlerin gelişimleri de bu yüzey koşullarına göre değişebilmektedir (76). Bir örnek vermek gerekirse, *Legionella pneumophila*'nın kauçuk yüzeylere tutunma düzeyi 2.2×10^5 CFU/cm² civarında iken, etilen-propilen, polivinil klorür, polipropilen, yarı çelik, paslanmaz çelik ve cam yüzeylerde tutunma oranının daha az olduğu belirlenmiştir (77).

Bakterilerin biyomateryal üzerine yapışması ya cerrahi olarak implante edilirken ya da geçici bir bakteriyemi esnasında biyomateryallerin yüzeyine taşınması ile olur (78-81). Bir bakterinin, biyomateryal yüzeyine yapışabilmesi onun virulans faktörüdür ve hem konak savunmasına hem de antibiyotiklere karşı dirençlerini artırır (82, 83). Aynı zamanda, virulan bakterilerin implant yüzeylerine yapışmaları, onları kimyasal bakterisid ve antiseptiklerden de korur (13). Örneğin *P. aeruginosa* biyofilmlerinin büyük hücre yığınları geliştirdiği, içerdiği glukoprotein ve musinin, bakterinin tobramisine karşı direncini artırdığı belirlenmiştir (84). Yüzeylere yapışabilme özelliği hemen hemen bütün bakterilerin ortak özelliğidir ve karmaşık, çözülmesi güç, bazen de çok spesifik olaylar dizisine bağlıdır. Yapılan çalışmalarda, enfekte biyomateryallerin yüzeyinde en sık *Staf. Epidermidis* ve *Staf. Aureus* izole edilmiştir (59, 56, 85) Bu organizmalara ek olarak *E.Coli*, *Peptokoklar*, *Pseudomonas Aeruginosa*, *Proteus Mirabilis* ve *Beta Hemolitik Streptokoklar* izole edilen diğer mikroorganizmalardır (59, 56). Elde edilen mikroorganizmaların çeşitliliği metotlar geliştikçe ve çoğaldıkça artmaktadır. *Staf. epidermidis*, insan

cildinde bulunan nonpatojenik saprofitik bir bakteri olmasına rağmen implant kaynaklı enfeksiyonlarda ciddi bir patojen olduğu görülmüştür. Vasküler protezler, kontakt lensler, total eklem protezleri gibi polimer yüzeylerde ya da biyomateryalin kompleks yapısı içerisinde polimerlerin bulunduğu implantlarda daha sık enfeksiyon yapmaktadır (59). Staf. aureus ise daha çok biyometallerde, kemik, eklem ve yumuşak doku enfeksiyonlarında major etken patojendir. Füzyonun yapıldığı, ölü ya da hasar görmüş kemik dokularının bulunduğu ortamlarda Staf. aureus en sık izole edilen enfeksiyon ajanıdır.

2.1.5. Osteomyelit

2.1.5.1. Tanımı ve Genel Özellikleri

Osteomyelit, kemik ve kemik iliği mesafesindeki enfeksiyona verilen isimdir. Osteomyelit, akut ya da kronik olabilen ciddi bir hastalıktır. Akut pürülan osteomyelitlerin büyük çoğunluğu bakteriler tarafından oluşturulur. Patojen mikroorganizma üç farklı yolla kemiğe ulaşabilir;

1. Hematojen yolla

2. Doğrudan yayılımla (Komşu eklem ve yumuşak dokulardaki akut ya da kronik enfeksiyon odaklarından)

3. Açık ya da komplike kırık veya cerrahi sonrasında travmatik yolla.

Hematojen yolla gelişen osteomyelit, en sık görülen tip olup, hastaların çoğunda önceden bilinen primer enfeksiyon odağı yoktur. Bir kısmında ise belirgin bir enfeksiyon odağı mevcuttur. Staf. aureus, hematojen osteomyelit yapan ajanların başında gelmektedir. Staf. aureus'un kemik dokusuna yerleşmeyi kolaylaştıran çok sayıda kemik matriks reseptörüne sahip olması, kemiği enfekte etme eğilimini açıklamaktadır. Diğer sık görülen patojenler arasında pnömokoklar ve gram negatif bakteriler vardır. E.Coli ve Grup B Streptokoklar yeni doğanlarda osteomyelit etkeni iken, Salmonella, özellikle orak hücreli anemisi olanlarda önemli osteomyelit

etkenidir. Anaeroblara da içine alan çoklu bakteriyel enfeksiyonlar sıklıkla kemik travmalarından sonra oluşan osteomyelitlerde gözlenir. Ancak piyogenik osteomyelitli hastaların %50'sinde etken patojen, önceden uygulanan antibiyotik tedavisi, uygunsuz alınan kültür örnekleri ve uygun olmayan kültür ortamları nedeni ile saptanamamaktadır.

2.1.5.2. Akut Osteomyelit

Bakteriyel invazyon bölgesinde yoğun nötrofilik enflamatuvar infiltrasyonla karakterizedir. Enfeksiyonun kemikteki yerleşim yeri biraz da yaşa bağlıdır. Çocuklarda, uzun kemiklerin metafizlerinde kan akımı kemiğin diğer bölgelerine göre daha fazladır, bu nedenle çocuklarda akut osteomyelit, daha çok uzun kemik metafizlerini tutarken yetişkinlerde kemik enfeksiyonunun en sık görüldüğü bölge vertebra korpusudur. Bu da yine bu bölgenin yoğun kanlanmasına bağlıdır. Enfeksiyon, kemik iliği mesafesinde basınç artışına neden olur, sonuçta vasküler mesafe daralır ve kemiğin kanlanması bozulur. Bu duruma, akut enflamatuvar reaksiyon esnasında salınan enzim ve diğer toksik maddelerin yüksek konsantrasyonu da eklenince kemikte nekroz meydana gelir. Enfeksiyon, uzun kemiklerde, kortikal kemik boyunca ilerleyerek periosta ulaşır ve bazen subperiostal abse oluşturur. Subperiostal abse, çocuklarda yetişkinlere oranla daha fazla görülür çünkü periost kemiğe daha gevşek tutunmuştur. Yetişkinlerde periost, eklem kenarına sıkıca bağlı olduğundan enfeksiyonun eklem boşluğuna ulaşması çok sık rastlanılan bir durum değildir.

2.1.5.3. Kronik Osteomyelit

Kronik osteomyelit, temelde akut enfeksiyonun sekeli olarak ortaya çıkar. Enfeksiyonun devam etmesi, kronik iltihabi hücrelerin osteomyelit odağına gelmesi, osteoklastik aktivasyon, fibroblastik proliferasyon ve yeni kemik oluşumunu içeren onarım reaksiyonunu başlatır. Geniş periost parçalarının kemikten ayrılması

sonucunda sekestrum olarak bilinen irili ufaklı nekrotik kemik fragmanları oluşabilir. Sekestrum yani nekrotik kemik kalıntıları osteoklastlar tarafından rezorbe edilebilir. Bazen enfeksiyon kendini sınırlayarak daha sonradan spontan sterilizasyona giden ya da kronik enfeksiyon nidusu haline gelebilen lokalize bir apse oluşturur ki bu durum Brodi apsesi olarak bilinir. Bu koşullar altında reaktif osteblastik aktivite yeni kemik üreterek enflamasyon alanını örten involukrum'u oluşturur. Etken mikroorganizmalar ilk enfeksiyondan sonra yıllarca sekestrum içerisinde canlılıklarını sürdürebilirler. Kronik osteomyelit lezyon üzerindeki deriye açılan drenaj sinüsleri ile ve patolojik kırıklarla komplike olabilir. Ayrıca kronik osteomyelitin daha nadir görülen komplikasyonları arasında eski sinüs hatları üzerinde yassı hücreli karsinom ve daha nadir olarak da sarkomlar ve sekonder amiloidoz sayılabilir. Omurga osteomyelitinde de benzer reaksiyonlar görülür. Komşu vertebra korpuslarına muhtemelen subligamentöz yolla yayılır. Psoas kasının invaze olması ile inguinal bölgeye kadar uzanan enfeksiyonlar oluşabilir. İntervertebral diskler enfeksiyonlara karşı şaşırtıcı bir şekilde dirençlidirler.

2.2. GÜMÜŞ

2.2.1. Gümüşün Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri ve Tarihçesi

Gümüş, elementlerin periyodik tablosunda simgesi Ag olan, beyaz, parlak, kıymetli bir metalik elementtir. Atom numarası 47, atom ağırlığı 107,87 gramdır. Ergime noktası 961,9 °C, kaynama noktası 1950 °C ve özgül ağırlığı da 10,5 g/cm³tür. Çoğu bileşiklerinde +1 değerliklidir. Ag sembolü Latince argentum kelimesinden gelir.

Gümüş metali, yüz yıllardır antibakteriyel özelliklerinden dolayı kullanılmaktadır. Sümerler, şehirlerine su taşıyan boruları gümüşten yaparak suların daha temiz kalmasını amaçlamıştır. Eski batı'da süt kaplarının içine atılan metalik gümüş paraların, sütün daha uzun süre taze kalmasını sağladığı bilinmektedir. Gümüş metali, oligodinamik bir metaldir. Yani, doğaları gereği anti mikrobiyaldir. Başta bakır ve çinko olmak üzere diğer bazı metaller de oligodinamik özelliğe

sahiptir ancak sahip oldukları antimikrobiyal etki ya gümüş kadar güçlü değildir ya da bu metaller toksik metallerdir. Gümüş; inert bir metal olmasından dolayı, toksik veya alerjik özelliği bu grup içerisinde en az olan metaldir. Bu nedenle de gümüş, antibakteriyel etki için kullanılmaktadır.

Gümüşün M.Ö. 3100 yıllarında Mısırlılar ve M.Ö. 2500 yıllarında Çinliler ve Persler tarafından kullanıldığı belirtilmiştir. Yunan tarihinde Atina'daki gümüş madenlerine rastlanır. M.Ö. 800 yıllarına doğru gümüş, Nil nehri civarında yerleşmiş halk tarafından para olarak kullanılmaya başlanmıştır. Gümüşü ilk olarak Romalılar'ın işlemeye başladıkları iddia edilmektedir. Endüstri ilerledikçe daha karışık ve saf olmayan gümüş filizleri üzerinde çalışılmaya başlandı. Bugün gümüş büyük bir oranda bakır, kurşun ve çinko üretimindeki yan ürünlerden elde edilir.

2.2.2. Tıp Tarihinde Gümüş

Müslüman tıp okullarında, 8.yüzyılda, terapötik amaçlı olarak gümüş tuzlarının kullanıldığı görülmektedir (20). İbni Sina, M.S. 980'de gümüşü, gümüş içeren tabletler şeklinde kullanmış ve kan temizleyici, çarpıntı giderici ve kötü ağız kokusunu önlemek için reçete etmiştir. Diğer taraftan, oral gümüş alımı sonrasında sklerada mavimtrak renk değişikliği şeklinde ortaya çıkan ve muhtemelen tarihteki ilk arjiri vakasını da rapor etmiştir (86). Simyacılar göre gümüş beyinle ve Ay'la ilgilidir. Ay'ın beyin rahatsızlıkları ile ilişkili olduğunun düşünülmeyle başlanmasından sonra gümüş epilepsi ve akıl hastalığı tedavisinde kullanılmıştır. Gümüş nitrat, "lunar caustic" olarak anılmış ve kostik (caustic) etkisinden dolayı koterizan olarak kullanılmıştır.

Paracelcus, distile nitre ve vitriol (nitrik ve sülfirik asit) içerisinde çözülmüş gümüşün sistemik olarak kullanılmasını tavsiye etmiştir. On yedinci yüzyılda yaşamış bir doktor olan Angelo Sala, purgatif olarak ya da "zihinsel ıstırap verici durumların" düzeltilmesi için sistemik gümüş nitrat kullanımını önermiştir. Bu amaçla gümüş kullanımını takiben sistemik arjiri vakası da tarif etmiştir (20).

Gümüş ve gümüşlü bileşikler, 18. yüzyılın başlarında artık eskisi kadar kullanılmaz oldular. Diğer taraftan gümüş nitratın epilepsi ve diğer nörolojik rahatsızlıkların tedavisindeki kullanımı 19. yüzyılın sonlarına kadar devam etti. Gümüş, arsefenamin ile bileşik halinde sifiliz tedavinde kısmen bu yüzyılın ilk yarısına kadar kullanıldı (19).

Bu gün, gümüş bileşikleri sadece lokal etkileri için kullanılmaktadır. Nitrat ve gümüş-protein kompleksleri, sahip oldukları anti-bakteriyel özellikler için kullanılmaktadır. Gümüş nitrat ise bu gün yüksek konsantrasyonda yakıcı (koterizan) etki sağlamak için kullanılmaktadır (19).

Doku ve kandaki gümüş birikimi üzerine yapılan son araştırmalar, endüstriyel maruziyetin olmadığı normal popülasyonda bu metalin ng/g düzeyinde olması gerektiği yönündedir (122). Diğer taraftan bazı çalışmalar, normal popülasyonda kan ve dokulardaki gümüşün, ng/g seviyesinden çok daha fazla olabileceği yönündedir (87). Bu farklılık, seçilen popülasyonun farklılığından kaynaklanıyor olabileceği gibi, uygulanan analitik tekniğe bağlı da olabilir. Medikal uygulama ya da mesleki maruziyet sonrası gelişen arjirinin patolojik manifestasyonları pek çok araştırmacı tarafından incelenmiştir. Gettler ve arkadaşları (88), daha önceden gümüş madeninde çalışan ve tüm vücudu gri-mavi renge büründüğü için sirklerde "mavi adam" olarak gösterilere çıkan 70 yaşında bir insandan bahsetmektedirler. Gerlachs (89), çeşitli nedenlerle altın ve gümüş metali verilmek suretiyle tedavi edilen hastaların dokularındaki ve kanlarındaki gümüş ve altın miktarını saptamak için spektrografi kullanmıştır. Gaul ve Staud (90, 91), gümüş arsefenamin ve diğer organik ve kollodial gümüş kullanım öyküsü olan hastaların biyopsi materyallerini incelemiştir. Blumberg ve Nelson (92), cilt rengi gri-mavi olduğu için kurşun zehirlenmesi ön tanısı ile incelenen bir hastada yaptıkları spektrofotometrik inceleme sonrasında hastanın kan gümüş miktarının 0.5 ug /ml olduğu saptamış oysa ki normal kanın gümüş içeriğinin en fazla 5 ng/ml (ya da 5 ug/L) olması gerektiğini belirtmişlerdir. Bu hastanın daha sonra derinleştirilen öyküsünde gastro intestinal semptomları için günde 3 defa 16 mg lık gümüş nitrat kapsülleri almakta olduğu öğrenilmiştir. Bir başka kaynakta ise (93) gümüşün normal değerleri şu şekilde verilmiştir:

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

24 saatlik İdrar: $<1 \mu\text{g/gün}$ ($<9.3 \text{ nmol/gün}$)

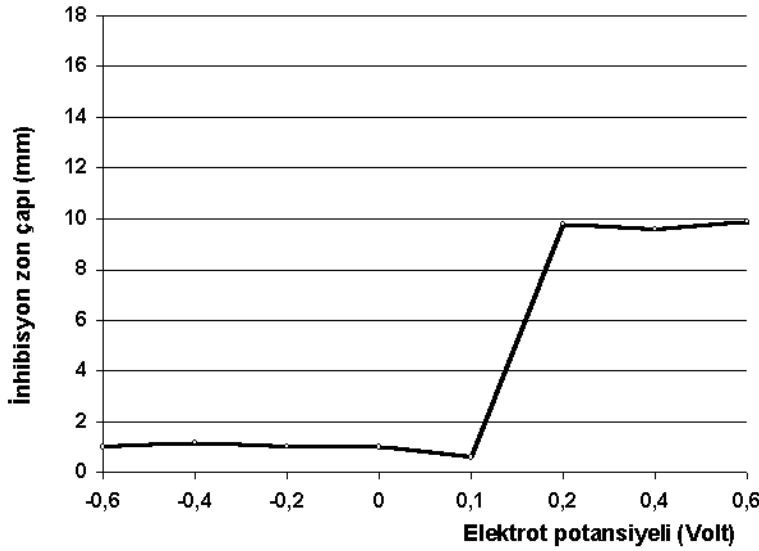
Saç kılı: $0.02-1.00 \mu\text{g/gram}$ (kuru ağırlık) ($0.2-9.3 \text{ nmol/gram}$) (kuru ağırlık)

2.2.3. Bu Gün Tıpta ve Teknolojide Gümüş

Gümüş, bu gün hala modern tıpta ve teknolojide kendisine yer bulabilmektedir. Alüminyum, antimon, kadmiyum, bakır ve kurşunla alaşım halinde endüstride, bu metallerin sertliğini, korozyon dayanımlarını, kuvvetini ve iletkenliğini artırmak için kullanılmaktadır. Havacılıkta, çeliğin kaplanması ve ayrıca telefon ve telgraf ünitelerinin parçalarında geniş bir kullanım alanı bulmuştur. Ancak özellikle son yıllarda, gümüşün fiziksel özelliklerinden çok, onun antibakteriyel ve antifungal etkilerinden faydalanılmak üzere çeşitli teknolojik uygulamalar görülmektedir. Özellikle yoğun bakım ünitelerinde trakeostomili hastalarda kullanılan gümüş kanül'ün "gümüş kaplı" olmasının tek sebebi, gümüşün antibakteriyel özelliğidir. Pediatrik yoğun bakımlar için tasarlanmış gümüş kaplı lavabolar, gümüş içeren pansuman materyalleri, gümüşlü yara bantları, çarşaf, sütür materyalleri, diyabetik hastalarda bası yaralarına karşı gümüş içeren kumaşlardan yapılmış çoraplar tıp alanında karşımıza çıkmaktadır. Ag-ion teknolojisi adı altında piyasaya sürülen ve gıdaları daha uzun süre taze tuttuğu belirtilen buzdolapları, gümüşlü (ve dolayısı ile antibakteriyel) deodorantlar da teknolojide gümüşün kendisine tekrar yer bulmaya başladığının göstergesidir.

2.3. GÜMÜŞ ANOT UYGULAMASI

Metaller genel olarak pozitif yüklüdürler, yani başka bir deyişle, bir akım kaynağının pozitif ucuna bağlandıklarında ortama saldıkları iyon miktarı artarken, negatif kutba bağlanmış metalde bu özellik tam aksine sınırlandırılmış olur. Bu şekilde, bir akım kaynağının pozitif kutbuna bağlanmış gümüş elektrot için “gümüş anot” terimi, anti bakteriyel etki sağlamayı amaçlayan bu uygulama için ise “gümüş anot uygulaması” terimi kullanılmaktadır. Gümüş anot uygulamasının anti bakteriyel, anti fungal ve anti viral olduğu daha önceki çalışmalarca defalarca gösterilmiştir (22-29). Anti mikrobik etki, ortama difüzyon yoluyla yayılan serbest gümüş iyonlarına ve gümüş bileşiklerine bağlanmaktadır (26, 94). Gümüşün spontan iyon salabilme özelliğinden ötürü, elektrik akımı uygulanmasa da saf gümüş metali etrafında zayıf bir anti mikrobiyal etki zaten vardır. Gümüş anot uygulamasında, elektrot pozitif polarlandığı için elektrot yüzeyinden serbestleşen iyon miktarı artmakta ve muhtemelen elektrik akımının itici gücünden dolayı da, serbestleşen gümüş iyonlarının buldukları ortamda daha uzağa ilerlemesi sağlanmaktadır. Bu durumda, gümüşün anti mikrobiyal etkisi katlanarak artmaktadır. Uygulanan elektrik akımı artırıldığında anti mikrobiyal etki bir yere kadar artmakta, ancak artan akım miktarıyla paralel bir artış göstermeyip 20 μ A den yukarı çıkarılan akım değerlerinde, anti mikrobiyal etkide bir artış olmamaktadır (şekil 1)



Şekil 1: Gümüş anotun polarizasyon eğrisi

Bu olay, gümüş anot uygulamasında elde edilen etkinin bir iyontoforez olmadığına kanıtıdır. Çünkü iyontoforezde, artan akım miktarıyla paralel olarak anti mikrobiyal etkinin de artması beklenmektedir (120). Gümüş iyonunun elektrottan ayrılmasındaki asıl mekanizma difüzyondur ve pozitif kutuplu elektrik akımı uygulaması bu difüzyonu artırmaktadır. Gümüşün diğer pek çok metale göre elektrot potansiyeli daha düşüktür. Bu da, diğer metallere göre çok daha düşük akım değerlerinde, daha fazla iyon emisyonuna izin vermesi ile sonuçlanır. Gümüş elektrotlar 0.2 V ile kolaylıkla polarlanabilirken, aynı polarlanma için bakır, çinko, çelik ve titanyum 1.4 V'a ihtiyaç duymaktadır. Bu nedenle, gümüş metalinin elektrik akımı ile kombine olarak biyolojik dokularda kullanılması diğer metallerden çok daha güvenlidir. İlk defa 1960 yılında Becker tarafından, canlı dokuya elektrik akımı uygulaması tarif edilmiştir. Çalışmalarında, iyileşmekte olan yara dokusunda bir akım oluştuğunu, yaranın iyileşmesini takiben de bu akımın yok olduğunu gözlemlemiş ve buna "cilt bataryası" adını vermiştir (95). Bu ilk çalışmayı takip eden diğer çalışmalarda, kronikleşen ya da iyileşmesi geciken yaralarda bu akımın kaybolduğu ya da azaldığı gözlenmiş, yara bölgesine dışarıdan akım uygulandığında ise iyileşmenin tekrar hızlandığı belirlenmiştir (95-99). Günlük şarj miktarı 2 coulomb'u geçmediği sürece elektrik akımının pozitif ve negatif kutuplarının etkileri şunlardır:

Negatif polarlanmış gümüş metali (Ag-Katot)

- 1- Proteinler itilir, çünkü proteinler negatif yüklüdür. Bu sayede onkotik basınç düşer, ödem azalır.
- 2- Nekrotik dokuda lizis gözlenir.
- 3- Granülasyon doku formasyonunun gelişimi hızlanır.
- 4- Lokal kan akımında artış olur.
- 5- Fibroblast proliferasyonu artar (100)
- 6- Kollojen sentezi artar (100)
- 7- Epitelyum hücreleri ve nötrofiller yara bölgesine çekilir (97)
- 8- Nöral rejenerasyon hızlanır (101)
- 9- Osteoblastik aktivite artar (102-104)

Pozitif polarlanmış gümüş metali (Ag-Anot)

- 1- Epitelyal büyüme ve organizasyon hızlanır.
- 2- Vazokonstrüksiyon gelişir.
- 3- Protein denatürasyonu artar.
- 4- Lipid peroksidasyonu engellenir.
- 5- Mast hücreleri itilir (98)
- 6- Histamin salınımı azalır.
- 7- Makrofajlar bölgeye çekilir.
- 8- Antiviral (105), antibakteriyel (96, 99, 104), antifungal (106) ve antitümöraldir (107, 108)
- 9- cAMP ve Prostoglandin E sentezi stimüle edilir.
- 10- Osteolitiktir (109)

Gümüş anot ile sağlanan anti bakteriyel etkinin bir özelliği de elektrik akımı kesildikten ve hatta elektrotlar ortamdaki uzaklaştırıldıktan haftalar sonra bile devam etmesidir. Yapılan bir deneyde, saf bir gümüş tel elektrot olarak kullanılmış, 4 saat boyunca 1 μ A anodik doğru akımla polarlanmış ve elde edilen anti bakteriyel etki, akımın kesilmesinden sonra 10 hafta kadar devam etmiştir ve çalışma boyunca kültür vasatı haftada 2 defa değiştirilmiştir (105). Bu deneyden de anlaşılacağı üzere, gümüş anot ile elde edilen anti bakteriyel etki uzun süre kalıcıdır.

Bir Petri kutusuna elektrotlar yerleştirilip bakteri içeren besi yeri dökülse ve elektrotlar bir doğru akım kaynağına bağlanarak mikro amper (μ A) düzeyinde akım verilse, sadece 30-45 dakikalık bir akım uygulamasından sonra bile anot etrafında bakterinin üremediği bir alan gözlenmektedir. İnhibisyon zonu olarak da tanımlanabilecek bu alanın ortalama genişliği 8-11 mm. dir (28, 110) ve akım kesildikten sonra dahi yaklaşık 2 ay boyunca üreme olmamaktadır. Bu tür çalışmalarda, besi yerinin özelliğinin bozulmadan daha uzun süre saklanması mümkün olmadığından etkinin “en az” 2 ay sürdüğü belirtilmektedir, belki de aslında çok daha uzun sürdüğü iddia edilebilir. Teorik olarak, bu uygulama için agarda, doku uygulamaları içinse uygulanan dokuda gümüş iyonları var olmaya devam edeceği için anti bakteriyel etkinin çok daha uzun süre devam edeceği düşünülebilir. Tüm bu

bilgiler ışığında, elektrik akımının “gümüş anot” uygulamasında minör rolünün olduğu ve asıl anti bakteriyel etkinin gümüş iyonlarından ve gümüş iyonlarının ortamdaki moleküllerle yaptığı elektro kimyasal bileşiklerden kaynaklandığı söylenebilir. Bu bileşiklerin çok büyük bir kısmı proteinat ve klorit komplekslerinden oluşmaktadır.

2.4. GÜMÜŞÜN ve GÜMÜŞ ANOTUN ANTİMİKROBİYAL ETKİ MEKANİZMASI

Gümüşün, sadece proteinlere değil, bakteri DNA'sına ve bakteri RNA'sına bağlanma özelliği de vardır. Radyoaktif gümüş kullanılarak yapılan bir çalışmada, gümüşün *P. aeruginosa* DNA'sına kovalent bağlarla bağlandığı ancak DNA'nın yapısını değiştirmedeği saptanmıştır (111). Aynı deneyde, gümüşün çok daha az oranda olmakla birlikte bakteri RNA'sına ve diğer komponentlere de bağlandığı gösterilmiştir. Hücre içine giren gümüş, bakterinin enerji metabolizmasını inhibe eder. Sülfidril enzimlerini inaktive eder (19), Amino, imidazol, karboksil ve fosfat grupları ile bileşik yapar (19). Sonuçta; prokaryotlarda DNA replikasyonunu bozarak mitozu engeller (19). Hücre zarının seçici geçirgenliğini bozarak hücrenin şişmesine ve sonunda ölmesine neden olur (112). Doku proteinleri ile reaksiyona girer, bu ise proteolitik bakterilerin üremesi için gereken ortamı bozar (112). Logaritmik üreme fazındaki *P.aeruginosa*'nın DNA'sına bağlanarak replikasyonu durdurur. *E.coli*'de, glukoz, gliserol, fumarat, süksinat, D-laktat ve L-laktat'ın oksidasyonunu engelleyerek hücrenin oksidatif fosforilasyonunu ve dolayısı ile ATP sentezini etkiler (113). B-galactosidase enzimini inhibe eder ve bu şekilde solunum zincirini durdurarak hücre ölümüne neden olur (29). Glukoz, gliserol, fumarat, süksinat, D ve L-laktat oksitlenirken, serbest sülfidril gruplarını ve NADPH'ın oksidasyonu inhibe olur (29, 113). Uygulanan elektrik akımı ise, bakteri hücresinin membran geçirgenliğini artırarak hem ATP'nin hem de sitoplazmik içeriğin hücre dışına kaçışına neden olmaktadır. Bu durumda bakteri metabolizması hızla kollabe olur (114). Literatürde gümüşe dirençli bakteri rapor edilse de, gümüş anot'a dirençli bir bakteri suşu henüz rapor edilmemiştir.

2.5. İMPLANT ÜZERİNE GÜMÜŞ KAPLAMA YÖNTEMLERİ

2.5.1. Elektrolitik Gümüş Kaplama Yöntemi (Electroplating)

2.5.1.1. Klasik Yöntemler

Elektrolitik metal kaplama yöntemi, bir metali başka bir metalle kaplamak amacıyla kullanılan ilk yöntemdir ve elektrik akımının metal yüzeylerden iyonları itmesi ve çekmesi prensibine dayanır. Üzeri başka bir metalle kaplanacak olan ana metal, basit bir doğru akım kaynağının negatif kutbuna bağlanır ve bu elektrot (katot), kaplanılması düşünülen metalin (bizim çalışmamızda bu metal gümüştür) tuzunu içeren bir solüsyona daldırılır. Anot olarak da tercihen yine kaplama metali olarak belirlenen metal (örneğin gümüş) seçilir. Kaplamanın oluşum hızı ve kalınlığı; ortam ısısı, akım yoğunluğu ve akım süresi ile doğru orantılıdır. Temel metalin üzerine doğrudan gümüş kaplama yapmak çok dayanıklı kaplamalar elde edilmesini engellemektedir. Bu nedenle ticari uygulamalarda, gümüş kaplama yapmak için iki tür gümüş kaplama çözeltisi kullanılır.

İlk çözelti flash (strike) çözeltisi ya da kısaca “flaş” olarak adlandırılır. Bu çözeltide gümüş derişimi oldukça azdır. Kaplanacak bir parça bu çözeltiye daldırıldığında, ortamda o kadar az gümüş iyonu vardır ki, daldırma sonucu gümüş çok az kaplanır ya da hiç kaplanmaz. Çözeltinin içinden bir akım geçtiğinde, az miktarda gümüş malzemeye kaplanır

İkinci çözelti normal gümüş kaplama çözeltisidir. Bu banyo normal kaplama derişiminde gümüş içerir ve bu banyoda parçanın üzerine kalın gümüş tabakaları kaplanır. En yaygın olarak kullanılan ve en basit yöntemdir.

Gümüş, çeşitli gümüş tuzları ve ilave bileşikler içeren birkaç banyo kullanılarak kaplanırken, ticari amaçlı kullanılan gümüş kaplama banyoları sadece siyanür banyolarıdır. Siyanür ve gümüş iyonları arasında şekillenen kompleks bileşikler öyle bir tabiata sahiptirler ki çok az gümüş iyonlaşır, bunun sonucu olarak da kaplanan gümüş beyaz, katı ve yapışık olur. Gümüş, akım tarafından çözeltinin dışına çıkmaya zorlanırken, daha fazla gümüş iyonu oluşur ve gümüş-siyanür

kompleksi, gümüş iyonları için bir depo görevi görerek onların yoğun, sıkı bir yapışıklığı olan bir kaplama oluşturmaya yetecek derecede iyonlaşmalarına izin verir.

2.5.1.2. Siyanür İçermeyen Yöntemler

Yukarıda bahsedilen siyanürlü sistemlerin dışında, siyanürsüz kaplama sağlayan sistemler de vardır. Yakın zamanda geliştirilen ve satışa sunulan bu sistemlerin en bilineni SilveronTM’dir. (Silveron AG-100 Wire Plating Application, Rhom and Haas Electronic Materials L.L.C, USA). Aşağıdaki 1.tabloda uygulamanın verileri, 2.tabloda ise 30 gram gümüş içeren 1 litre kaplama solüsyonu elde etmek için gereken malzemeler belirtilmiştir.

Tablo 1: SilveronTM AG-100 gümüş kaplama sistemi ile kaplama yapabilmek için gereken parametreler.

Parametre	Aralık	Optimum değer
Shibley Gümüş Solüsyonu 275 g/L Ag	30-45 g/L Ag	30 g/L Ag
pH	9.5-10.0	9.8
Isı	20-40 °C	30°C
Katot akım değeri	Max. 20 A/ dm ²	
Kaplama Hızı	Max. 12 µm /dk	

Tablo 2: Silveron™ AG-100 gümüş kaplama sistemi ile kaplama yapabilmek için uygulanacak prosedürde kullanılacak malzemelerin miktarları.

Gerekli Kimyasallar	Hacim/Miktar
Deiyonize su	600 ml
Silveron AG-100 A	105 g
Potasyum Hidroksit	55 g
Potasyum Nitrat	40 g
Silveron AG-100 B	35 g
Silveron AG-100 C	15 ml
Silveron AG-100 D	10 ml
Shipley Gümüş Solüsyonu 275 g/L Ag	110 ml
Deiyonize su	1 litreye tamamlayacak kadar

Prosedür (30 gram gümüş içeren 1 litre kaplama çözeltisi elde etmek için):

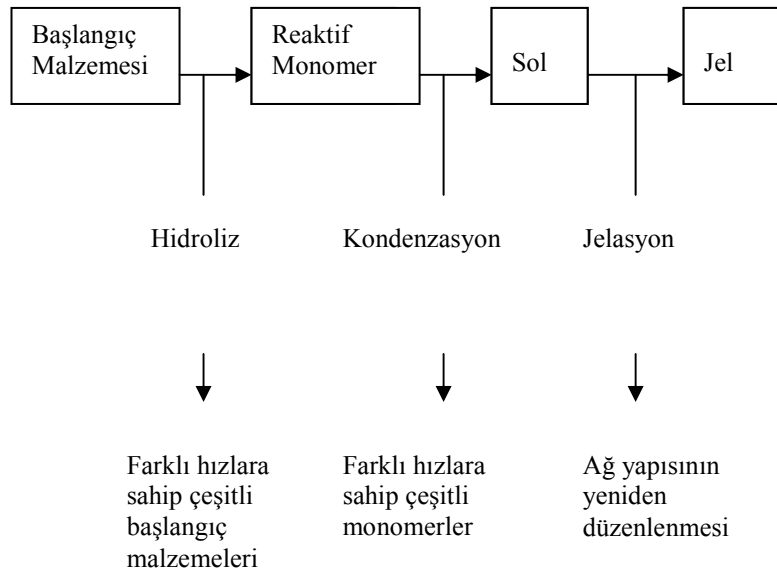
- 1- 20 °C'deki temiz bir tankın içerisine 600 ml deiyonize su eklenir.
- 2- Silveron AG-100 A, Potasyum Hidroksit, Potasyum Nitrat ve Silveron AG-100 B sırasıyla eklenir ve her biri tamamen çözülene dek karıştırılır.
- 3- Silveron-AG 100 C, Silveron AG-100 D, Shipley gümüş solüsyonu 275 g/L Ag eklenir ve karıştırılmaya devam edilir.
- 4- pH kontrol edilerek "Solderon asit HC % 50" ya da Potasyum Hidroksit solüsyonu eklemek suretiyle pH 9.8'e ayarlanır.
- 5- Çözelti hacmi 1 litre olana dek deiyonize su eklenir.

Çalışmamızda, siyanür içermemesinden dolayı Silveron™ kullanımını uygun gördük. İlk çalışmalarımızda tüm kaplamalarımızı bu yöntemle yaptık.

2.5.2 Sol-Jel Yöntemi

2.5.2.1 Genel Bilgiler

Sol-jel prosesi, düşük sıcaklıklarda ve çözelti ortamında kimyasal tepkime yoluyla anorganik yapıların sentezlenmesidir. Bu tepkimenin en önemli özelliği sıvı halden (çözelti veya kolloid çözelti) katı hale (iki veya çok fazlı jel) geçiş imkanı vermesidir. Sol-jel prosesinde, reaktif anorganik monomer veya oligomer oluşturacak herhangi bir başlangıç malzemesi kullanılabilir (Şekil 2). Sol-jel alanındaki çoğu çalışmada başlangıç maddeleri olarak $M(OR)_n$ formundaki alkoksitler (M: metal, n: değerlik, R: alkil, C_xH_{2x-1}) kullanılmaktadır. Alkoksitler uygun anorganik monomer kaynaklarıdır ve birçok organik çözücüde çözünürler (115).



Şekil 2: Hidroliz, kondenzasyon ve hız arasındaki bağıntılar.

Sol-jel tepkime mekanizmalarının çoğunun anlaşılabilmesinde geçiş metal atomlarına kıyasla daha düşük reaktiviteye sahip olan ve kontrollü çalışma imkanı verebilen silisyumlu sistemler esas alınmıştır. Genelde, bir mineral asit (örn. HCl) veya baz (NH_3) katalizin varlığında dört fonksiyonlu silisyum alkoksit monomerlerinin sentezinden silika jeller elde edilir.

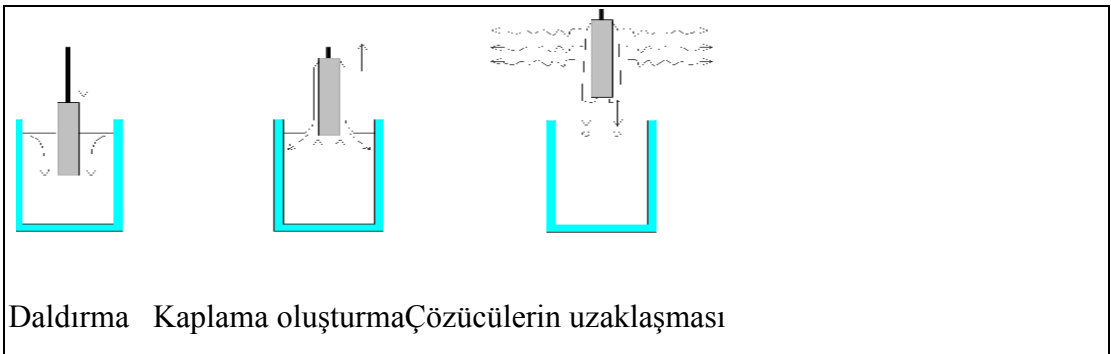
2.5.2.2 Sol-jel Prosesinin Kullanıldığı Kaplama Yöntemleri

Sol-jel prosesinde, jelleşme öncesi akışkan sol veya çözelti herhangi bir yüzey üzerine boya sektöründe yaygın olarak kullanılan daldırma, püskürtme, döndürme, akıtma, serigrafik baskı vb. kaplama teknikleriyle ince film şeklinde kaplanabilir. Fiziksel buhar biriktirme ve kimyasal buhar biriktirme gibi geleneksel kaplama tekniklerine göre en önemli avantajları yüzeyde oluşturulan kaplamanın mikro yapısının (gözenek boyutu ve hacmi, yüzey alanı vb.) kontrol edilebilmesi ve oda şartlarında çalışabilmeye izin vermesidir.

2.5.2.3 Daldırma Yöntemi ile Kaplama

Daldırma yöntemi ile kaplama, homojen kaplamaların elde edilmesinde kullanılan ve en çok bilinen kaplama yöntemidir. Düz camın sol-jel çözeltisine daldırıp ardından geri çekilmesiyle cam yüzeyinde ince kaplamalar oluşturulması deneysel ve teorik olarak 30-40 yıl önce Schroeder tarafından incelenmiştir.

Daldırma esnasında alt malzemeye tutunan sıvı film alt malzeme ile birlikte kaplama çözeltisinden dışarıya çekilir ve sıvının bir kısmı kaplama çözeltisine geri akar. Aynı zamanda bu çekiş esnasında çözücü buharlaşır ve ortaya çıkan etkiler bir dengeye ulaşarak kaplama çekişi boyunca sabit kalınlığa ulaşır. Kaplama prosesi, kaplama çözeltisinin cam ya da metal yüzeyinde kondense jel oluşturması ile başlar. Kaplanmış camlar ya da metaller daha sonra uygun ısıl işlemler uygulanır. Isıl işlem sırasında cam ya da metal ile kaplama arasındaki tepkimeler devam eder (Şekil 3).



Şekil 3: Daldırma yöntemi

Bu yöntemin avantajları:

- 1) Bir işlemle iki taraflı kaplama yapılabilmesi,
- 2) İyi derecede homojeniteye sahip kaplamalar elde edilmesi,
- 3) Çevreye karşı iyi derecede kararlılığa sahip kaplamalar elde edilmesi (dış mekan kullanımı),
- 4) Kullanılan oksitlerdeki kimyasal çeşitlilik,
- 5) Farklı şekillerdeki düz parçacıkların (çubuk, fiber, boru vb.) kolaylıkla kaplanabilmesidir.

Daldırma yönteminin avantajların yanında geniş yüzeyler için büyük daldırma kaplarına ihtiyaç duyulması ve fazla miktarda kaplama çözeltisi gerektirmesi gibi dezavantajları bulunmaktadır (116, 117).

3. MATERYAL VE METOD

3.1. GÜMÜŞ KAPLI SPİNAL İMPLANTLAR İLE DİĞER İMPLANTLARIN İN VİTRO VE İN VİVO KARŞILAŞTIRILMASI

Sol-gel yöntemi ile yapılan kaplamaların bir dizi testten geçmesi gerekiyordu. Öncelikle, daha önce yapılan elektrolitik gümüş kaplama yöntemindeki kaplamalar kadar güçlü anti bakteriyel etkisinin olup olmadığı, elektrik akımı uygulamasına vereceği cevap, fiziksel ve kimyasal dayanımı ve tabii ki biyo uyumluluğu ve toksisitesinin test edilmesi gerekmektedir. Bunun için bir dizi deney planlandı.

3.1.1. Saf Gümüş Elektrotun ve Gümüş İçerikli Fiberlerin Antimikrobiyal Özelliklerinin Gösterilmesi (1. çalışma)

3.1.1.1. Amaç:

Gümüş anot uygulamasının antibakteriyel ve anti fungal etkilerinin gösterilerek, klinikte kullanılabilirliğinin tartışılması.

3.1.1.2. Materyal ve Metod:

Ticari olarak temin edilen gümüş fiber içerikli pansuman materyalleri ve saf gümüş metalleri anot ve katot elektrodu olarak kullanılmak üzere uygun ebatlarda kesildi, mikroorganizmaların gümüş iyonlarına veya gümüşlü preparatlara verdiği doğal cevabı değerlendirmek için ise elektrik akımının uygulanmayacağı sham elektrotlar hazırlandı. Tüm elektrotlar ilgili literatürlerde belirtildiği şekilde Petri kutularına yerleştirildi. Önce genel bir bakış açısı sağlayabilmek için klinik izolatlardan elde edilen E.coli, S.aureus ve C.albicans, S.epidermidis, P.aeruginosa, K.pneumonia ve A.baumannii içeren besiyerleri Petri kutularına döküldü,

elektrotların dışarıda kalan uçlarına değişen sürelerle ve değişen değerlerde doğru akım uygulanarak 37°C'de inkübe edildi. Tüm veriler tablo 3'de özetlendi. Bu çalışmayı takiben aynı şartlar altında farklı mikroorganizmaların gümüş anot uygulamasına verdiği cevabı değerlendirmek için, ilk çalışmadan farklı klinik izolatlardan elde edilen E.coli, S.aureus ve C.albicans birbirine paralel bağlanmış petri kutularında, 8 saat boyunca 2,5 mikroamper doğru akım uygulanarak 37 °C'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası anot, katot ve sham elektrotlar çevresinde gözlenen inhibisyon zonları değerlendirildi (tablo 4).

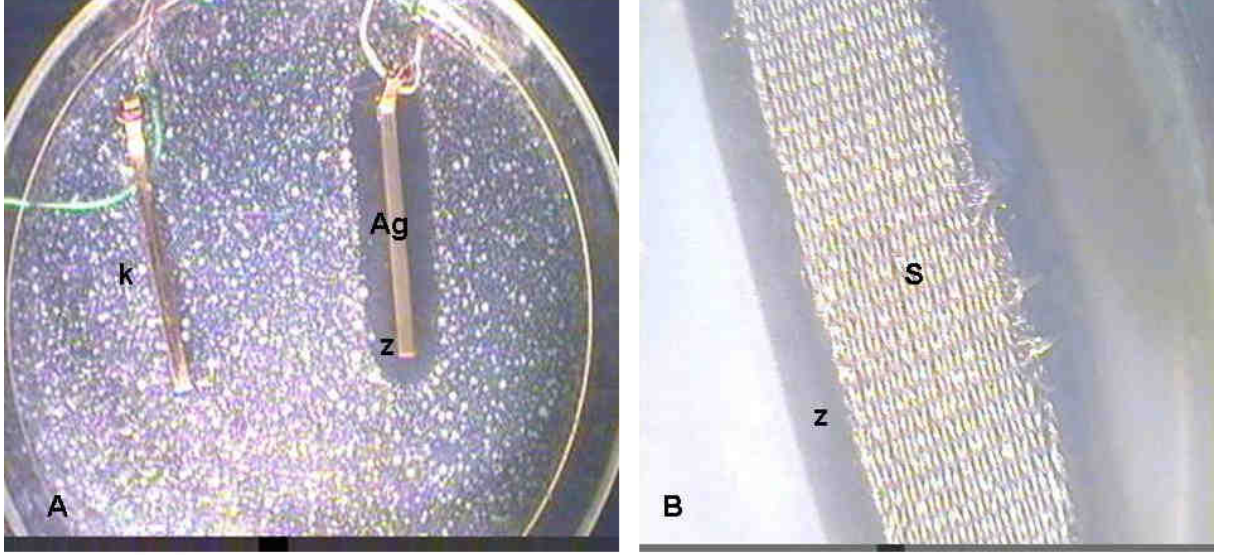
3.1.1.3. Sonuçlar:

Tüm anodik elektrotların etrafında mikroorganizma üremesinin olmadığı bir inhibisyon zonu gözlemlendi (Resim 1). Bazı bakterilerde sham ve / veya katot etrafında da inhibisyon zonu olduğu ancak bunun bakteriye veya uygulanan akım değerine spesifik bir sonuç olmadığı görüldü (tablo 3). Aynı şartların sağlanması için birbirine paralel bağlanarak aynı akımın aynı süreyle uygulandığı 2. çalışmamızda ise katodik elektrotta, E.coli içeren besi yerinde inhibisyon zonu gözlemlenmezken S.aureus ve C.albicans içeren besi yerlerinde belirgin inhibisyon zonu saptandı.

3.1.1.4. Karar:

Çalışmamız, gümüş iyonlarının bilinen antibakteriyel ve antifungal etkilerini doğrularken elektrik akımı uygulaması ile bu cevabın nasıl değiştirilebileceğini göstermiştir. Anodik uygulama gümüş iyonlarının salınımını artırarak antimikrobiyal etkiyi artırmakta, katodik uygulama, doğal iyon emisyonunu da azaltarak gümüş iyonlarının etkinliğini azaltmaktadır. Sham elektrotlara verilen cevaplar ise mikro organizmanın gümüşe karşı verdiği doğal cevabı yansıtmaktadır. Bulgularımız, gümüş iyonu içeren yara bakımı ürünlerinin elektrik akımı olmaksızın klinikte bası yaralarına karşı kullanılabilmesini, anodik akımla kombine edilerek bu etkinin artırılabilmesini ancak katodik akımın uygun bir seçim olmadığını göstermiştir. Bu

çalışmada kullanılan materyaller saf gümüş ve gümüş içerikli tekstil ürünleri olup her hangi bir kaplama yöntemi içermemektedir.



Resim 1: Saf gümüş anot (A) ve gümüş içerikli pansuman materyalinin (Silveron™) (B) zayıf elektrik akımı uygulandığında gösterdikleri antibakteriyel etki. (Bakteri: *Staf. epidermitis*)
(k : katot, Ag: saf gümüş anot, S: gümüşlü pansuman materyali (anot), z: inhibisyon zonu)

Tablo 3: Farklı mikroorganizmaların, farklı elektrik akımı değerlerine ve farklı uygulama sürelerine verdikleri farklı cevaplar

Deney Numarası	Elektrot Tipi	Microorganizma (CFU)	Zon Genişliği (mm)			Akım Miktarı(μA)	Akım Süresi
			Anot	Katot	Sham**		
1	Silverlon	A.baumannii (3 x 10 ⁴)	5	2	3	2,8	24 saat
2	Silverlon	C.albicans (2 x 10 ⁵)	3	0	0	2.0	24 saat
3	Silverlon	E.coli (1 x 10 ⁶)	5	5	kullanılmadı	1.6	3 saat
4	Silverlon*	E.coli (5 x 10 ⁵)	3	0	0	2.2	24 saat
5	Gümüş tel	E.coli (2 x 10 ⁵)	6	0	kullanılmadı	2.6	24 saat
6	Silverlon*	E.coli+ S.aureus (2 x 10 ⁵ CFU)	3	0	kullanılmadı	2.0	24 saat
7	Silverlon*	K. pneumoniae (4 x 10 ⁴)	3	1	2	2.0	24 saat
8	Silverlon*	P. aeruginosa (3 x 10 ⁵)	3	1	3	2.5	24 saat
9	Silverlon*	S.aureus (1 x 10 ⁶)	4	0	kullanılmadı	2.0	30 dakika
10	Silverlon*	S.aureus (5 x 10 ⁵)	3	0	5	2.0	24 saat
11	Gümüş tel	S.epidermidis (1 x 10 ⁵)	4	0	0	4.6	1 saat
12	Gümüş tel	S.epidermidis (3 x 10 ⁴)	4	0	0	4.6	24 saat
13	Gümüş tel	S.epidermidis (1 x 10 ⁶)	5	0	kullanılmadı	1.1	15 dakika

(*) Silverlon; gümüş ve naylon (Silver-Nylon) içeren bir yara bakım ürünüdür. İçeriğindeki gümüşün saflık derecesi yaklaşık olarak % 91 dir. Çalışmada kullanılan gümüş tellerin ise saflık derecesi yaklaşık % 99'dur. Saflık derecesi, gümüşün spontan emisyonunu engelleyen bir faktördür ve dolayısı ile emisyonu uğrayan gümüş iyonu miktarı azaldıkça zon çapı da azalmaktadır.

(**) Sham; akım uygulanmayan gümüş elektrodu ifade etmektedir. Kullanım amacı, mikroorganizmanın gümüşe verdiği cevabı elektrik akımı olmaksızın değerlendirmektir.

Farklı mikroorganizmaların, farklı elektrik akımı değerlerine ve farklı uygulama sürelerine verdikleri farklı cevaplar gösterilmektedir. Gümüş anot uygulamasına mutlaka cevap alındığına dikkat edin. İnhibisyon zonu genişliği mikroorganizmanın çeşidinden, akım değerinden ya da süresinden bağımsızdır.

Tablo 4: Gümüş içerikli naylon fiberlerle yapılan çalışmada, elektrotlar etrafında oluşan inhibisyon zonları görülmektedir. Elektrot: Silverlon™, Akım: 2.5 µA DC.

Mikroorganizma	Zon Genişliği (mm)		
	Anot	Katot	Sham
MRSA (metisilin dirençli S.aureus)	2.5	2.5	2.5
E.coli	3.5	0	1
C. albicans	3	1.5	0

3.1.2. Gümüş Kaplı İmplantların Saf Gümüş İle ve Normal Titanyum Alaşımli İmplantlarla Karşılaştırılması (2. çalışma)

3.1.2.1. Amaç:

Gümüş ile kaplanmış titanyum implantların anti bakteriyel etkilerinin, gümüş kaplı olmayan titanyum elektrotlarla ve saf gümüş elektrotlarla karşılaştırılması.

3.1.2.2. Materyal ve Metod:

Kliniğimizdeki bir dekübit ülserinden izole edilen ve klinik olarak çoklu ilaç direnci olduğu saptanan S.aureus kullanılarak hazırlanan bakteri stok solüsyonu, bakteri konsantrasyonu 1×10^6 CFU bakteri içerecek şekilde ayarlandı. Elektrolitik gümüş kaplama banyosu kullanılarak (Silveron™ AG 100) titanyum implantlar

gümüşle kaplandı. Otoklavlanarak steril hale getirilen bu implantlara birer adet steril bakır tel, kendi üzerine kıvrılmak suretiyle, lehimsiz olarak tutturuldu. Steril petri kutularına, birbirine paralel olacak şekilde yerleştirildi. Soğumakta olan, henüz sıvı haldeki 40 cc besi yerine, besi yeri ısı 30 °C ye geldiğinde 10 cc bakteri solüsyonu eklendi ve vortekslendi. Üç ayrı petri kutusuna eşit olarak bakteri ve besi yeri karışımı dökülerek soğuyup katılaşıncaya kadar beklendi. Petri kutularından birincisi anot olarak gümüş kaplı titanyum implant ve katot olarak bakır tel içermektedir. İkinci petri kutusu, anot olarak saf gümüş tel ve katot olarak da yine bakır tel içermektedir. Üçüncü petri kutusu ise anot olarak gümüş kaplı olmayan titanyum implant ve katot olarak da yine bir bakır tel içermektedir. Gümüş anot ile ilgili literatür incelendiğinde, katotta her hangi bir anti bakteriyel etki beklenmediği için, katot elektrotunun cinsi önemsizdir. Bu nedenle de bakır elektrot kullanılmıştır. Bu şekilde hazırlanan petri kutularından dışarı çıkan bakır kablolar aracılığı ile üç petri kutusu birbirine paralel olarak bağlandı ve 1,5 V pil ile çalışan bir doğru akım kaynağına bağlandı. Besi yerinin empedansı da ölçülerek ayarlanan dirençler yardımı ile tüm petri kutularına 2, 5 µA akım uygulandı. Akımın 2,5 µA seçilmesinin özel bir nedeni bulunmayıp, literatürde belirtilen 1-20 µA aralığında kalmak amaçlandı. İki saat akım uygulandıktan sonra akım kesilerek petri kutuları 37 °C de 24 saat inkübe edildi.

3.1.2.3. Sonuçlar:

İnkübasyon sonrası petri kutuları incelendiğinde sonuçlar şu şekilde idi:

1. petri kutusu, gümüş kaplı titanyum implant (anot): 6 mm inhibisyon zonu.
2. petri kutusu, saf gümüş elektrot (anot): 6 mm inhibisyon zonu
3. petri kutusu, gümüş kaplanmamış titanyum implant (anot): inhibisyon zonu yok.

Zon ölçümü, tek taraflı olarak yapıldı ve elektrodun dış kenarı ile zon sınırı arasındaki mesafe ölçüldü.

3.1.2.4. Karar:

Ölçümler sonucunda gümüş kaplı implantın anti bakteriyel etkisinin saf gümüş elektrot kadar olduğu ve aynı amaçla kullanılabilceği saptandı.

3.1.3. Gümüş Kaplı İmplantların Antibakteriyel Etkisinin Konvansiyonel Titanyum Alaşımli İmplantlarla Karşılaştırılması (3. çalışma)

Yapılan bu iki çalışmadan sonra, tavşanlar üzerinde bir ileri çalışmanın yapılması planlandı.

2.6.3.1. Amaç:

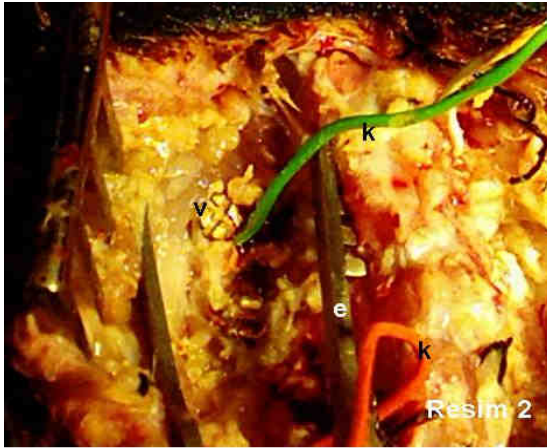
Gümüş kaplı titanyum implantların ve zayıf elektrik akımının anti bakteriyel etkisinin canlı dokuda test edilmesi.

3.1.3.2. Materyal ve Metod:

Doksan altı adet standart titanyum vidanın (3 mm çapında ve 20 mm uzunluğunda) 48 adedi, ikinci çalışmada anlatılan elektrolitik gümüş kaplama banyosu (Silveron™ AG 100) kullanılarak gümüş ile kaplandı. Kalan 48 vidaya kaplama yapılmadı. Her bir vidanın, tavşanın kemiğine girecek kısmının yüzey alanı yaklaşık olarak 1,84 cm² olarak hesaplandı. Yapılan kaplamanın kalınlığı 5-8 µm olarak hesaplandı. Kaplamanın dayanıklılığını test etmek için, bazı vidalar taze koyun vertebraına vidalanıp tekrar çıkartılarak, 2. çalışmada anlatılan şekilde besi yerinde test edildi. Vidaların hala anti bakteriyel özellik gösterdiği, kaplamanın sıyrılıp dökülmediği gözlemlendi. Çalışmada kullanılması planlanan Metisilin dirençli Stafilokokus aureus stok solüsyonu Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Enfeksiyon Hastalıkları anabilim dalından elde edildi ve + 4 °C de stoklandı.

Yirmi dört adet Yeni Zelanda tavşanı (10 haftalık ve ortalama 2250 gr ağırlığında), rastgele olarak 4 gruba ayrıldı (Grup I, n=6; II, n=6; III, n=6 ve IV, n=6). Çalışma, Ankara Üniversitesi Etik Kurulu tarafından onaylandı.

Tavşanlar, ketamine hydrochloride (Pfizer, New York, NY, USA) ve 2% xylazine hydrochloride (Bayer, Mannheim, Germany) kullanılarak sağlanan anestezinin yardımıyla opere edildi. Orta hatta yapılan vertikal bir insizyondan sonra her iki iliak kanat ortaya konuldu ve her iki tarafa ikişer adet vida için el matkabı ile delikleri hazırlandı. Deliklerin çapı 2 mm ve derinlikleri 10 mm idi. Her bir vidanın konulacağı deliğe 1×10^6 CFU bakteri ekildi. Elektrik akımı uygulanacak ve uygulanmayacak gruplarda vidalara bağlanan iyi izole edilmiş kablolar, cerrahi olarak kapatılan yaradan dışarı çıkartıldı (Resim 2, 3).



Resim 2 ve 3: kullanılan vidaların intraoperatif (resim 2) ve post operatif görüntüsü (resim3) (v: vida, (k: akım uygulanan kablo, e: ekartör)

Elektrik akımı uygulanacak gruplarda kabloların son uçları bir araya getirildi ve özel olarak hazırlanmış doğru akım kaynağının pozitif ucuna bağlandı. Bu kaynak, 1,55 volt saat pili (317-SRS16SW; Sony Energytec, Fukushima, Japan) ile çalışmaktaydı ve tavşanın sırtında, onun ulaşamayacağı yerde kolaca muhafaza edilebilmekteydi. Doğru akım kaynağının negatif kutbu ise, devreyi tamamlamak için, tavşanın sırt cildine atılan bir metal sütura bağlandı (katot elektrodun yüzey

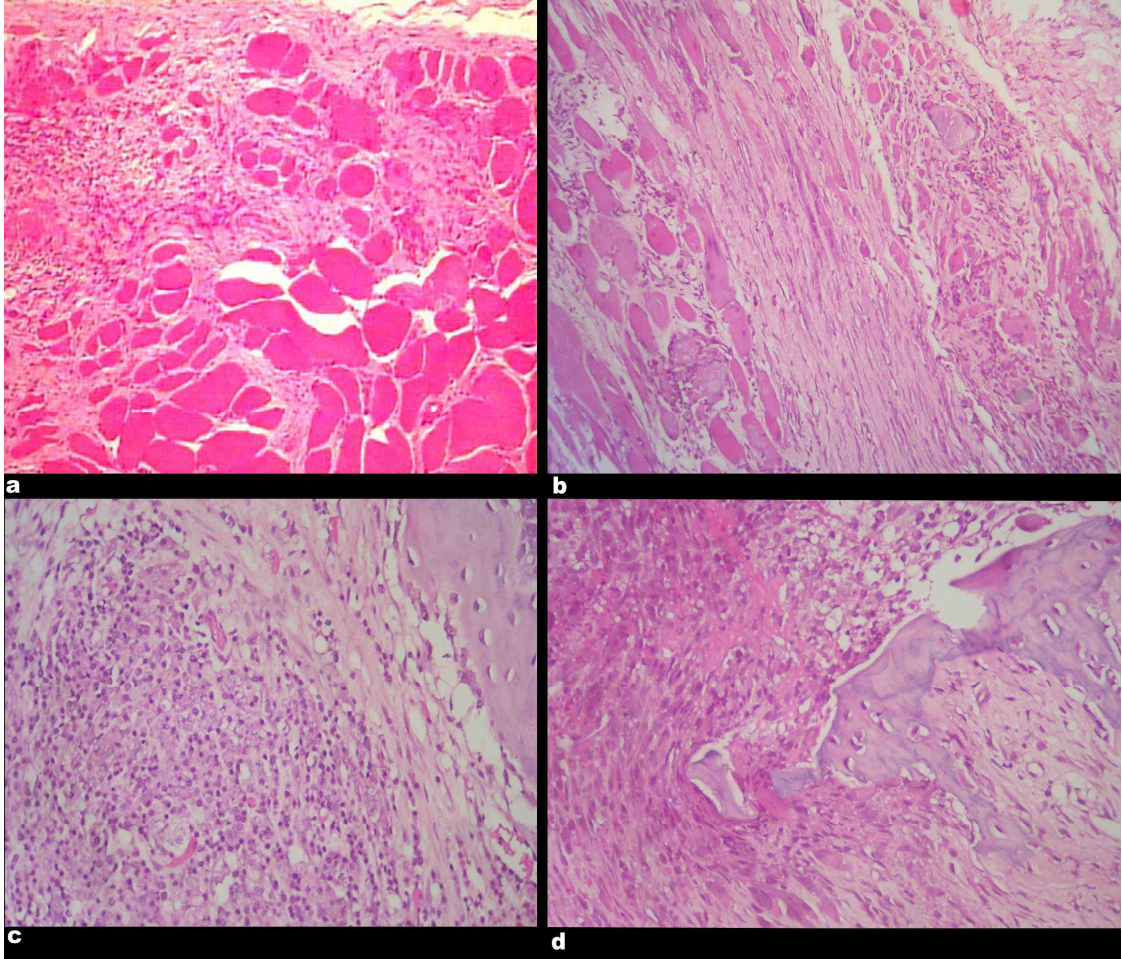
alanı 0,32 cm² olarak hesaplandı). Elektrik akımı uygulanan gruplarda devreden geçen akım 8 µA olacak şekilde ayarlandı. Operasyon sonrasında, her bir tavşanın direkt grafisi çekilerek vida konumları doğrulandı (Resim 3). Grup I'de, 8 µA doğru akım ve gümüş kaplı vidalar kullanılırken Grup II'de yine gümüş kaplı vidalar kullanıldı ancak bu sefer elektrik akımı kullanılmadı. Grup III'de, yine 8 µA doğru akım kullanıldı ancak bu sefer kullanılan vidalar gümüşle kaplanmamıştı. Grup IV'de ise gümüşle kaplanmamış vidalar kullanılırken elektrik akımı uygulanmadı (tablo 5). Bu aşamada, iki elektrot arasındaki doku empedansı, iki terminal metodu ile her bir denek için ayrı ayrı ölçülerek ortalama değeri hesaplandı. Elektrik akımı uygulanan gruplarda, akım süresi günde 2 saat ile sınırlı tutuldu ve post op. ilk 3 gün akım uygulandı. Devam eden sonraki 7 gün boyunca akım tekrar uygulanmadı. Deneklere her hangi bir antibiyotik verilmedi. Onuncu günün sonunda, tüm denekler, auricular ven yoluyla uygulanan 1 cc thiopental sodium yardımıyla sakrifiye edildi. Cerrahi sterilizasyon kurallarına uyularak vidalar çıkartıldı. Kemiklerdeki, vidalar ait delikler, 10 cc steril serum fizyolojik ile yıkandı, bu yıkama suyundan 0,1 cc alınarak yeni hazırlanmış Müeller-Hinton besi yerine ekildi.

Tablo 5: Tabloda gruplar, vida türleri ve elektriksel parametreler verilmiştir. Sadece 1. ve 3. gruplara akım verilmiştir (2 saat/gün)

Gruplar	Vidalar		Akım (mikroamper)	Süre (dakika)	Toplam Şarj (Amper/sn)	Toplam Şarj Yoğunluğu (C/cm ²)
	Ag-Ti	Ti				
Grup I (n=6)	24	0	8	360	0.17	0.015
Grup II (n=6)	24	0	0	0	0	0
Grup III (n=6)	0	24	8	360	0.17	0.015
GrupIV (n=6)	0	24	0	0	0	0

Örnekler, 37 °C de 48 saat inkübe edildi. Bakteri kolonileri her bir vidadan alınan örnek için ayrı ayrı hesaplandı ve CFU olarak rapor edildi. Her bir kültür plağının saflığı, plaklardan yapılan rastgele örneklemelerde Gram boyama ve koagülaz testi yapılarak doğrulandı. Gram pozitif, koagülaz pozitif kok varlığı S.aureus olarak değerlendirildi. Kontaminasyon şüphesi olmayan durumlarda daha

ileri incelemeye gerek duyulmadı. Her bir vida sahasını ayrı ayrı inceleyebilmek için, her bir iliak kemik tek bir vida deliği içerecek şekilde iki parçaya bölündü. Her bir kemik parçası, hemen % 10 formalin içerisine alındı ve % 20 formik asit ile dekalsifiye edildi. Parafin kesitler, haematoxylin-eosin ile boyanarak ışık mikroskopunda (Courtesy; Zeiss, Oberkochen, Germany) incelendi. Histopatolojik inceleme, birbirinden bağımsız iki ayrı patolog tarafından yapıldı (Resim 4). İnflamasyonun derecesi semikantitatif olarak belirlendi. Bu belirlemede, nötrofil lökosit infiltrasyonunu, nekroz varlığı ve yaygınlığı, devitalize kemik dokusu, kemik iliği sellülaritesi, kemik dokudaki inflamasyon gibi parametreler dikkate alındı.



Resim 4: Deney gruplarına ait kemik doku ve komşu yumuşak dokunun histopatolojik görüntüsü. Grup I'e ait örnekte inflamasyon görülmezken (a) grup II'de ılımlı inflamasyon mevcuttur (b). Gümüş kaplı olmayan vidaların kullanıldığı Grup III (c) ve IV (d)'de ise ciddi inflamasyon mevcuttu.

Veriler, Kruskal-Wallis varyant analiz testi kullanılarak değerlendirildi (118). Multiple comparison test kullanılarak her bir grup bir diğeri ile kıyaslandı. P değerinin < 0.05 olması, istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

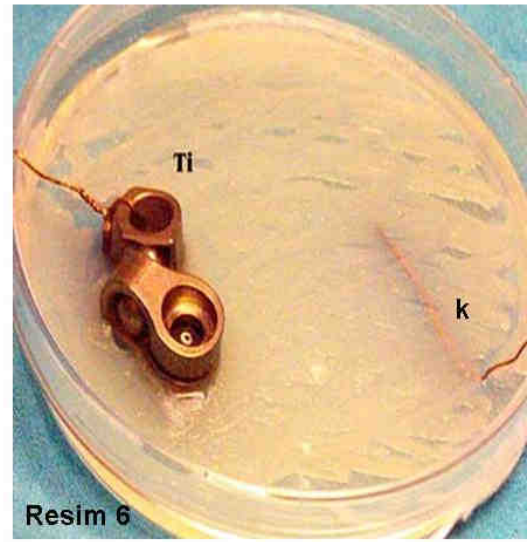
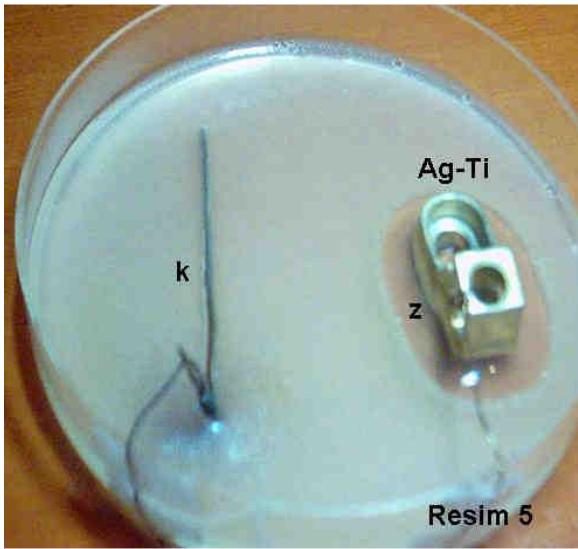
Cerrahi prosedür, tüm deneklerce kolay tolere edildi. Anot ve katot arasındaki doku empedansı ortalama 74.4 kOhm olarak hesaplandı. Akım değerleri, her bir denekte, uygulama süresi boyunca düşme eğilimi gösterdi. Bu durum, doku proteinlerinin kondansatör gibi davranarak şarj olmalarına ve buna bağlı olarak da devrenin toplam direncini artırmalarına bağlı bir durumdur. Uzun süreli akım uygulamalarında, kısa sürelerle devrenin kutuplarını değiştirerek proteinleri deşarj etmek uygun yaklaşımdır. Bizim çalışmamızda günde 2 saat akım uyguladığımız için böyle bir deşarj prosedürüne gerek duyulmadı.

3.1.3.3. Sonuçlar:

Grup I'de, ortalama bakteri sayısı 2.4 CFU, ortalama inflamatuvar hücre sayısı 3.0, kemik iliği sellülaritesi normaldi. Grup II'de, ortalama bakteri sayısı 76.0, ortalama inflamatuvar hücre sayısı 3.0 ve kemik iliği sellülaritesi normal olmakla birlikte minimal kemik dokusu inflamasyonu saptandı. Grup III'de, ortalama bakteri sayısı 161.5 CFU, ortalama inflamatuvar hücre sayısı 10.29 olarak saptandı. Kemik iliği sellülaritesi belirgin olarak artmıştı ve ciddi kemik dokusu inflamasyonu vardı. Ayrıca, iki denekte, kemik iliğinde nekrotik değişiklikler saptandı. Grup IV'de, ortalama bakteri sayısı 248.2 CFU, ortalama inflamatuvar hücre sayısı 13.0 olarak saptandı. Bu son grupta, kemik iliği sellülaritesi ciddi olarak artmıştı ve şiddetli kemik dokusu inflamasyonu ve eksuda formasyonu saptandı. Hiçbir grupta, devitalize kemik dokusu veya yeni kemik dokusu oluşumu gözlenmedi. Nekrotik değişiklikler sadece Grup III'deki iki denekte birer vida deliğinde gözlemlendi. Çoklu kıyaslama (multiple comparison test) kullanılarak, her bir grup, bakteri sayısı (bakteri sayısının 300 CFU'dan fazla olduğu vidalarda bu sayısı 300 olarak alındı) ve inflamatuvar hücre sayısı açısından diğer gruplarla kıyaslandı. Grup I ve Grup II arasında, inflamatuvar hücre sayısı bakımından istatistiksel olarak anlamlı fark olmasa da ($p>0.05$), diğer tüm kıyaslamalarda anlamlı farklılık saptandı ($p<0.001$). Bakteri

sayısı Grup IV'de en yüksekti ve en düşük bakteri sayısı Grup I'de saptandı. Ortalama bakteri sayıları bakımından tüm grupların birbiri ile arasında anlamlı farklılık bulundu ($p < 0.001$).

Petri kutularında yapılan in vitro doğrulama çalışmasında, gümüş kaplı titanyum vida etrafında, bir sınırdan diğerine yapılan ölçümde 23 mm ölçülen inhibisyon zonu gözlemlendi (Resim 5). Aynı zon, gümüş kalpı olmayan vidada gözlenmedi (Resim 6).



Resim 5 ve 6: Gümüş kaplı titanyum implantın etrafında net bir inhibisyon zonu gözlemlenirken (resim 5), aynı zonun gümüş kaplanmayan titanyum implantta (resim 6) gözlenmediğine dikkat edin. (k: katot, Ag-Ti: Gümüş kaplı titanyum anot, Ti: Gümüş kaplı olmayan titanyum, z: inhibisyon zonu)

Akım uygulamadan yapılan çalışmada ise aynı petri kabına birer adet gümüş kaplı olan ve olmayan vida konuldu. Gümüş kaplı vidada inhibisyon zonu görülürken normal titanyum vidada zon gözlenmedi (Resim 7). Zon sınırları içerisinde alınan mikrobiyolojik örneklerde ise üreme saptanmadı.



Resim 7: Gümüş kaplı olmayan (Ti) ve gümüş kaplı olan (Ag) implantın aynı agarda aynı bakteriye olan etkileri. Gümüş kaplı olmayan vidada inhibisyon zonunun (z) olmadığına ama gümüş kaplı vidada belirgin bir inhibisyon zonu olduğuna dikkat edin.

3.1.3.4. Karar:

Yapılan bu çalışma sonrasında elde edilen veriler ışığında, gümüş kaplı titanyum vidaların anti bakteriyel özellik gösterdiği saptanmış oldu (22). Ancak hala, kullanılan kaplamanın biyo uyumluluğu, toksik olup olmadığı ve elektrik akımı kullanılmadığında nasıl bir etkiye sahip olduğu gibi konular hakkında ek çalışmalara ihtiyaç duyulmaktaydı. Ayrıca, bu çalışma sonrasında gümüş anot ve gümüş kaplı implantların avantajları olsa da bazı dezavantajlara sahip olduğu da fark edildi.

Elektrolitik gümüş kaplama banyosu kullanılarak yapılan kaplamaların avantajları:

- 1- Biyo uyumludur.
- 2- Antibakteriyeldir.
- 3- Elektrik akımı ile uyarıldığında gümüş salınımına izin vererek daha güçlü antibakteriyel etki sağlar.
- 4- Elektrik akımı uygulanmadan da antibakteriyel etki gösterir.

Elektrolitik gümüş kaplama banyosu kullanılarak yapılan kaplamaların dezavantajları:

- 1- Kaplama, mekanik olarak çok dayanıklı değildir.
- 2- Tekrarlayan otoklavlama işlemleri sonrasında kararma ve renk değişimi olur.
- 3- Teoride, üzerindeki tüm gümüşün salınımına izin verme potansiyeline sahiptir.
- 4- Kaplamadaki gümüş miktarı fazladır.
- 5- Vidaların renk kodları ve üzerinde yazan rakamlar, kaplamanın altında kaldığı için okunamaz.
- 6- Daha kalın kaplama ve daha instabil yapısı dolayısı ile arjiri riski mevcuttur.

Diğer taraftan, elektrik akımı uygulaması kliniğe uyarlandığında, devreden geçen akım, devrenin empedansı, toplam şarj yükü gibi parametrelerin ölçülmesi ve uygulama boyunca güvenlik sınırları içerisinde olduğunun kontrol edilmesi temel elektrik bilgisi ve özel ilgi gerektirdiği için, her nöroşirurjyen tarafından kolaylıkla uyum sağlanamayabilecekti. Uygulamaya, bazı hastaların psikolojik olarak direnç göstereceği ve uygulamayı kabul etmeyeceği de göz önüne alındığında, elektrik akımı uygulamasının hekimin ve hastanın seçimine bırakılmasının uygun olabileceği düşünüldü.

Yukarıda sayılan bu dezavantajlardan dolayı, alternatif bir kaplama yöntemi arayışına girilerek, kaplamaların sol-jel yöntemiyle yapılması konusunda karar kılındı.

3.1.4. Sol-Jel Yöntemiyle Gümüş Kaplanan Vidaların Besi Yerinde Test Edilmesi (4. Çalışma)

3.1.4.2. Amaç:

Sol-jel prosesi kullanılarak yapılmış kaplamalarla ilgili bu ilk çalışmada, elektrik akımına yani “gümüş anot uygulaması”na bu yeni kaplamanın vereceği cevap araştırıldı. Bu amaçla, daha önceki gümüş anot çalışmasında kullanılan metot kullanıldı.

3.1.4.2. Materyal ve Metod:

3.1.4.2.1. Vida seçimi:

Bu amaçla, standart titanyum pedikül vidalar kullanıldı. İmalat aşamasındaki 6 X 45 mm ebadındaki 24 adet vida, poli aksiyel başlıkları henüz takılmamış halleriyle temin edildi (Norm Medikal, Ankara). Vidalar iki eşit gruba ayrıldı (n=12), ilk gruba sol-jel yöntemiyle gümüş kaplanırken (bakınız bir sonraki başlık) diğer gruptaki vidalara kaplama yapılmadı.. Tüm vidalara bakır kabloları önceden bağlandı ve steril edildi.

3.1.4.2.2. Gümüş kaplama:

Kaplamalar, sol-jel prosesinin “daldırma tekniği” ile yapıldı (119). Bunun için tüm vida örnekleri, daha önceden bu tür kaplamalar yaptığı bilinen bir merkeze (Akdeniz Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü) gönderilerek, standart yonteme uygun şekilde gümüş kaplanması sağlandı. İlk çalışma için % 10 gümüş içeren solüsyonlar tercih edildi. Tüm vidalar, kaplama sonrasında otoklavda steril edildi ve deney gününe dek bekletildi.

3.1.4.2.3. Bakteri seçimi:

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Enfeksiyon Hastalıkları Kliniği'nden sağlanan ve klinik izolatlardan elde edildiği belirtilen E.coli ve S.aureus ile hazırlanan bakteri stok solüsyonları kullanıldı. Bu iki bakterinin seçilmesindeki ana kriter, implant bağımlı enfeksiyonlarda ve cerrahi sonrası gelişen enfeksiyonlarda, kliniğimizde en fazla karşılaşılan mikro organizmalar olmalarıydı.

3.1.4.2.4. Bakteri Ekimi, Grupların Oluşturulması ve Gümüş Anot Uygulaması

Soğumakta olan, sıvı haldeki 120 cc Mueller Hinton besi yeri 60 cc'lik iki eşit erlene ayrıldı. Bu erlenlerden ilkinde 2 cc S.aureus solüsyonu diğerine de 2 cc E.coli solüsyonu eklendi. Bu solüsyonlar, yaklaşık olarak 1×10^4 CFU/cc bakteri içermektedir. On iki adet standart petri kutusu 6 şarlı iki gruba ayrıldı (I ve II). Birinci gruba S.aureus, ikinci gruba da E.coli ekilmesi planlandı. Her bir grup da kendi içinde 3 ayrı gruba bölündü (Ia, n=2; Ib n=2; Ic, n=2 ve IIa, n=2; IIb, n=2 ve IIc, n=2). Grup I a (n=2) ve Grup II a'ya (n=2) gümüşle kaplanmamış standart pedikül vidaları konuldu. Grup I b (n=2) ve Grup II b'ye (n=2) gümüş kaplı vidalar konuldu. Grup I c (n=2) ve Grup II c'ye (n=2) ise aynı tür bir çift vida yerine birer adet gümüş kaplı olan ve olmayan vida konuldu, bu son grup, elektrik akımı uygulanmayacak kontrol grubu olarak belirlendi. Bu şekilde yapılan düzenleme ile aynı Petri kutusunda, aynı bakterinin elektrik akımı yokluğunda gümüş kaplı olan ve olmayan vidaya verdiği cevap kıyaslanabilecekti. Grup Ia, Ib ve Ic'ye S.aureus içeren besi yerinden 10'ar cc eklenerek soğuyup katılaşması beklenildi. Grup IIa, IIb ve IIc'ye de E.coli içeren besi yerinden 10'ar cc dökülerek soğuyup katılaşması beklenildi. Dökülen besi yeri miktarı, tüm petri kutusunda yaklaşık 3 mm bir yükseklik oluşturmaktaydı. Vidaların çapının da 6 mm olduğu hatırlanırsa, besi yerinin vidaların tüm yüzeyini kaplamadığı görülecektir. Besi yerleri katılaştıktan sonra kablolar seri halde bir devre oluşturacak şekilde bir kalem pilin iki ucuna bağlanarak (Tablo 6) 48 saat boyunca 37°C de inkübe edildi. Grup I c (n=2) ve Grup

II c'ye (n=2) akım verilmedi. Devreden geçen akım 3,0 μ A olarak ölçüldü. (V:1,5 volt, R: 100 kOhm, empedans 400 kOhm, A: 3,0 μ A)

Tablo 6: Çalışmadaki hiçbir vidada inhibisyon zonu gözlenmediğine ancak buna rağmen, gümüş kaplı vidalardan alınan örneklerde bakteri üremesi olmadığına dikkat edin. Bu çalışma, kullanılan gümüş kaplamaların, zon yapmasa da implantı enfekte olmaktan koruduğunu göstermesi açısından önemli sonuçlar vermiştir.

Grup	Alt Grup	Vida	n	Bakteri	Akım	Zon	Üreme
I	a	Ag	2	S.aureus	3,0 μ A	yok	yok
	b	Ti	2	S.aureus	3,0 μ A	yok	var
	c	Ag / Ti	2	S.aureus	0	yok	yok / var
II	a	Ag	2	E.coli	3,0 μ A	yok	yok
	b	Ti	2	E.coli	3,0 μ A	yok	var
	c	Ag / Ti	2	E.coli	0	yok	yok / var

3.1.4.3. Sonuçlar:

Bu çalışmadan beklenen sonuç, gümüş anot uygulamasının, daha önceki çalışmalarda ve literatürde olduğu gibi, anti bakteriyel etkiyi artırmasıydı. Ancak çalışmada hiçbir grupta anti bakteriyel etkinin bir ifadesi olan “inhibisyon zonu”na rastlanılmadı. Teorik olarak başarılı olması gereken bu prosedürün neden başarısız olduğu, dahası gerçekten başarısız olup olmadığı açıklığa kavuşturulmalıydı. Bu amaçla, vidalar dikkatlice yerlerinden çıkartıldı, 10 cc steril serum fizyolojik içeren kaplara tek tek ve ayrı ayrı alınarak vorteksleildi. Burada amaç, vida üzerindeki bakterinin bu sıvıya geçmesini sağlamaktı. İşlem sonrasında her bir vidaya ait bu sıvılardan 1 cc alındı. Alınan bu 1 cc'lik örnek, 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} , 10^{-3} , 10^{-2} ve 10^{-1} lik dilüsyonlarda seyreltilerek steril agar plaklarında tekrar kültüre edildi (37 °C, 48 saat). Sonuçlar şaşırtıcıydı. Çünkü gümüş kaplı vidalardan alınan örneklerin hiç

birisinde üreme olmamıştı. Oysa gümüş kaplı olmayan vida örneklerinin tamamında ciddi üreme mevcuttu (ortalama 7×10^3 CFU). Bu sonuçlar yorumlandığında, gümüş kaplamanın anti bakteriyel olduğu ancak elektrik uyarısı ile etkisinin artmadığı sonucuna varıldı. Normal şartlarda, saf gümüş elektrotlarla ya da elektrolitik gümüş kaplama banyosu kullanılarak yapılan kaplamalarda, elektrik akımı uygulaması olmasa bile, uygulama yapılan gruptan daha dar olmak şartı ile yine de bir inhibisyon sonucu gözlemlendiği bilinmektedir (2, 4, 112). Bu olayın sebebi, hiç bir stimulus gerektirmeden elektrot yüzeyinden ortama yayılan aktif gümüş iyonlarıdır (24, 26, 27). Bu çalışmada dikkat çeken bir diğer nokta da, böyle bir zonun olmayışı idi. Oysa anti bakteriyel etki sağlanmıştı. Bu durumun tek açıklaması, sol-jel yöntemi ile yapılan gümüş kaplamaların içerisindeki gümüşün spontan olarak salınmaması yani komşu agar ortamına geçen gümüş iyonu olmaması idi. Vida ile temas halindeki bakteri üzerine bakterisid etkisi vardı ancak hemen yakınındaki besi yerinde aynı etkiyi göstermemekteydi. İlk bakışta, elektrolitik gümüş kaplama yöntemine kıyasla daha zayıf bir etki gibi görünse de arjiri riskinin sırf bu nedenle daha düşük olduğu fark edildi. Uygulamada fark edilen bir diğer sonuç ise, elektrik akımı uygulamasının, sol-jel prosesiyle kaplanılan vidalarda gerekli olmaması idi. Bu durum, klinik kullanımda kolaylık sağlayacaktı.

3.1.4.4. Karar:

Sol-jel yöntemi ile yapılan gümüş kaplamaların anti bakteriyel etkisinin tatmin edici boyutta olduğuna karar verildi. Ancak, bu çalışmada, anti bakteriyel etkiyi garantiye almak için % 10 gümüş içeren solüsyonlar kullanılmıştı. Bu gümüş miktarının kullanılabilir en düşük değer olup olmadığını anlayabilmek için bir dizi ek çalışma planlandı.

3.1.5. Sol-Jel Yöntemiyle Yapılan Kaplamalarda Mükün Olan En Düşük Gümüş Konsantrasyonunun Belirlenmesi (5. çalışma)

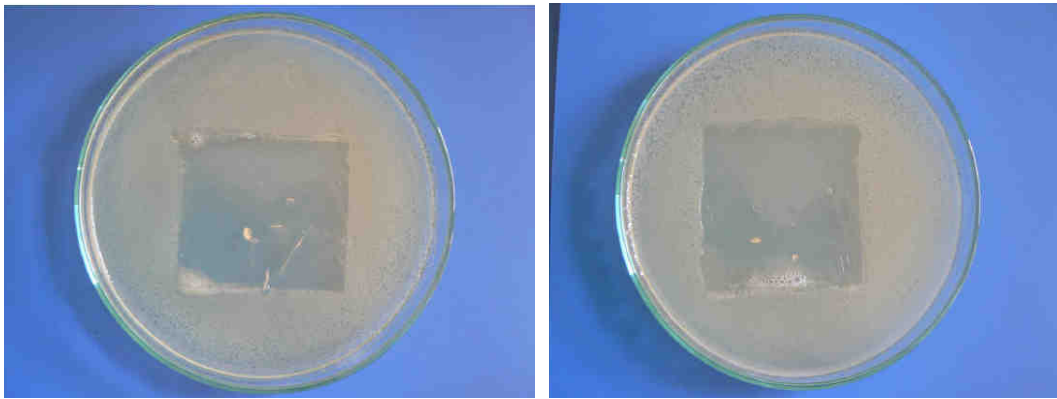
3.1.5.1. Amaç:

Bu çalışmada amaç, yapılacak kaplamalardaki en düşük ve en etkili gümüş miktarının belirlenmesi idi.

3.1.5.2. Materyal ve Metod:

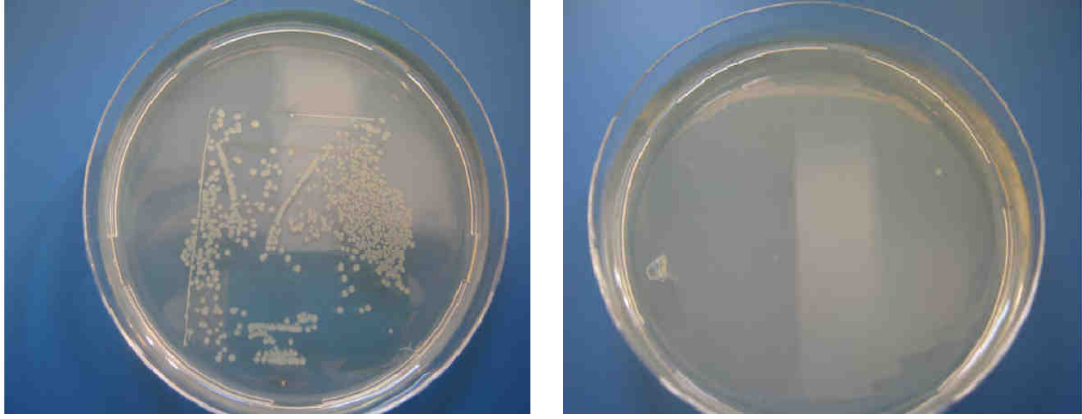
Bölüm 2.5.2'de anlatılan sol-jel prosedürü uygulanarak, kare şeklinde titanyum plakalar ve 30 mm çapında silindir şeklinde titanyum bloklar farklı konsantrasyonlarda (% 2,5 ve % 5 lik çözeltiler) gümüş içeren solüsyonlar kullanılarak gümüş ile kaplandı. Çalışmada üç ayrı test yöntemi kullanıldı. Çalışmanın özeti aşağıda verilmiştir.

I. test yöntemi: Bu yöntemde katı besi yerleri üzerine bakteri ekimi yapılarak, gümüş kaplanmış örnekler petri kutularına yerleştirildi. Örnekler, 37°C de 12 saat inkübe edildikten sonra plakalar yüzeylerden alınarak Petri kutularının fotoğrafları çekildi (Resim 9, 10).



Resim 9: % 5'lik solüsyonla kaplama **Resim 10:** %2.5'lük solüsyonla kaplama

II. Test Yöntemi: Bu yöntemde, bakteri ekimi, ilk çalışmanın aksine, Petri kutularına dökülmüş agar plakalarına değil, doğrudan kaplanmış ve kaplama yapılmamış plakalar üzerine yapıldı. Kaplamadaki gümüşün ve kaplama yapılmayan grupta da titanyumun bakteri ile temasının ve eğer olacaksa etkileşiminin sağlanması için 15 dakika beklenildi. 15 dakika sonra plakalardaki bakteri sayısının tespiti için plakalar agar üzerine kapatıldı. Bu sefer de, plakalardaki canlı bakterilerin agara geçmesi amaçlanarak 15 dakika daha beklenildi. Bu süre sonunda plakalar agar yüzeyinden alınarak petri kutuları 37°C de 24 saat inkübe edildi ve fotoğrafları çekildi (Resim 11, 12).



Resim 11: Kaplama yapılmamış plaka. **Resim 12:** Gümüş kaplı plaka (% 2.5)

III. Test Yöntemi: Bu son çalışmada ise, kare şeklinde plakalar yerine 30 mm çapında titanyum silindirler kullanıldı. Sol-jel yöntemiyle, daha önce belirtildiği şekilde kaplamaları yapıldı ancak bu sefer, disklerin yüzeyinin sadece bir yarısı kaplanırken, diğer yarısı gümüşle kaplanmadı. Diskler, steril agar içeren steril Petri kutularına yerleştirildi ve hem disklerin üzerine hem de agara bakteri ekim yapıldı. Yine 37°C de 24 saatlik inkübasyonun ardından Petri kutularındaki agarın ve titanyum disklerin fotoğrafları çekildi (Resim 13).



Resim 13: Sağ yarısı gümüş ile kaplanmış titanyum silindir.

3.1.5.3. Sonuçlar:

I.test yöntemi: Plakalar kaldırıldığında, agarın gümüş kaplı plakalara temas eden bölümlerinde üremenin olmadığı gözlemlendi. Hem % 2,5 hem de % 5 lik çözeltilerle hazırlanan kaplamaların, aynı antibakteriyel etki gösterdiği belirlendi. Bu sonuç, en düşük konsantrasyonu belirlemede bir fikir oluşturdu. Antibakteriyel etki sağlamak için %2,5 luk solüsyonla hazırlanan kaplamalar yeterli gibi görünmekteydi.

II.test yöntemi: Gümüş kaplı olmayan plakaların kapatıldığı petri kutularında bakteri üremesi olduğu, ancak, gümüş kaplı plakaların kapatıldığı petri kutularında hiç üremenin olmadığı gözlemlendi.

Bu sonuçlar, % 2,5 gümüş içeren solüsyonlarla yapılan kaplamalarda, kaplama yapılmış yüzeye, bakterinin sadece 15 dakikalık temasının bile antibakteriyel etki için yeterli olduğunu göstermiştir.

III.test yöntemi: Aynı titanyum silindirin gümüş kaplı olan yarısında bakteri üremesi yokken, kaplamanın olmadığı diğer yarısında zemindeki agar yüzeyinde olduğu kadar bakteri üremesi mevcuttur. Bu son çalışma, gümüşün antibakteriyel etkisinin varlığını olduğu kadar, titanyumun antibakteriyel etkisinin yokluğunu da görsel olarak aynı karede ortaya koyduğu için önemlidir.

3.1.5.4. Karar:

Tüm bu testler sonrasında, % 2,5 luk solüsyonla yapılan kaplamaların, % 5 lik ve % 10 luk solüsyonlarla (bakınız 5. çalışma) yapılan kaplamalardan farklı olmadığını göstermiştir. Bu nedenle, fazla gümüş kullanarak arjiri riskini artırmamak için en düşük gümüş konsantrasyonu olan % 2,5'luk solüsyonla yapılan kaplamaların bundan sonraki uygulamalarda seçilmesine karar verildi. Bu çalışma sonrasında alınan bir diğer karar ise, elektrik akımı uygulamasının bu prosedürde gerekli bir komponent olmadığı şeklindeydi.

3.1.6. Sol-Jel Yöntemi İle Yapılan Kaplamaların Antibakteriyel Etkisinin Elektrik Akımı Olmaksızın Test Edilmesi (6.Çalışma)

3.1.6.1. Amaç:

Bu çalışmada amaç, daha önce in vitro olarak anti bakteriyel özellikleri tarafımızca ispatlanan gümüş kaplı vertebra implantlarının bu etkisinin elektrik akımı kullanılmayan bir hayvan modelinde test etmek idi.

3.1.6.2. Materyal ve Metod:

Kırk sekiz adet standart titanyum vidanın (2 mm çapında ve 8 mm uzunluğunda) 24 adedi, daha önce anlatılan Sol-jel yöntemi kullanılarak gümüş ile kaplandı. Diğer 24 vidaya kaplama yapılmadı. Çalışmada kullanılması planlanan

Metisilin Dirençli Stafilokokus aureus stok solüsyonu Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji anabilim dalından elde edildi ve + 4 °C de stoklandı. Bu çalışmada özellikle biyofilm yapma kapasitesi olan suşlar seçildi. Bakteri seçimi şu şekilde yapıldı:

İbn-i Sina hastanesinin farklı kliniklerinde yatmakta olan hastalardan izole edilen 20 S.aureus örneği alındı. Bakterilerin S.aureus oldukları klasik yöntemlerle belirlendi (Gram boyamadaki morfolojileri, katalaz ve DNAz üretimi) ve pıhtılaşma faktörü üretimi ve protein A'ya karşı poliklonal IgG antikoru ve kapsüler polisakkarit oluşturabilmelerine bakılarak doğrulandı (Staphytec test; Oxoid Ltd. Basingstoke, Hampshire, England) Metisilin direnci, PCR ile MecA genine bakılarak belirlendi ve klasik metod olan oxacillin disk difüzyon testi ile doğrulandı. Metisilin duyarlı ve dirençli suşların standart kontrolleri için ise sırasıyla S. aureus ATCC 25923 ve S. aureus ATCC 700699 (Mu50) suşları kullanıldı.

Triptik soy agar kullanılarak bu bakterilerin glokoz'dan slime faktör üretme yeteneklerine bakıldı. Bunun için ise tüp yapışma metodu kullanıldı (121). Yapılan testin sonucunda suşlar slime faktör üretim seviyelerine göre 1+, 2+, 3+ ve 4+ olarak sıralandı. Çalışmaya sadece 4+ olduğu belirlenen suşlar dahil edildi.

Yirmi dört adet Yeni Zelanda tavşanı (12 haftalık ve ortalama 2500 gr ağırlığında), rastgele olarak 3 gruba ayrıldı. (Grup I, n=10; Grup II, n=10; ve Grup III, n=4). Grup I: gümüş kaplı vida ve bakteri, Grup II: titanyum vida, Grup III: vida olmaksızın bakteri içerecek şekilde planlandı. Çalışma, Ankara Üniversitesi Hayvan Etik Kurulu tarafından onaylandı.

Tavşanlar, ketamine hydrochloride (Pfizer, New York, NY, USA) ve 2% xylazine hydrochloride (Bayer, Mannheim, Germany) kullanılarak sağlanan anestezinin yardımıyla opere edildi. Orta hatta yapılan vertikal bir insizyondan sonra her iki iliak kanat ortaya konuldu ve her iki tarafa birer adet vida için el matkabı ile delikleri hazırlandı. Deliklerin çapı 2 mm ve derinlikleri 8 mm idi. Her bir vidanın konulacağı deliğe 1×10^5 CFU bakteri ekildi. Deneklere her hangi bir antibiyotik verilmedi. Yirmisekizinci günün sonunda, tüm denekler, auricular ven yoluyla uygulanan 1 cc thiopental sodium yardımıyla sakrifiye edildi. Cerrahi sterilizasyon

kurallarına uyularak vidaların buldukları kemikler 1 x 1 x 1 cm boyutunda küpler şeklinde çıkartıldı, takiben vidalar bu kemiklerden çıkartıldı. Çıkarılan vidalar ve vida deliği içeren kemikler uygun şekilde kodlanarak, ayrı ayrı steril tüplere alındı, her tüpün içerisine 2 cc steril serum fizyolojik eklendi, tüm tüpler bekletilmeden laboratuara gönderildi. Laboratuara gönderilen, içinde kemik veya vida olan tüpler vortex ile 1 dakika karıştırıldıktan sonra, suspansiyonlardan 100'er mikrolitre alınarak 1:10, 1:100 ve 1:1000 sulandırım için eşit hacimde tamponize fosfat bulunan 3'er tüpe arka arkaya aktarıldı ve her bir sulandırımından 100'er mikrolitre ayrı ayrı kanlı ve adi agar besi yerine ekilerek tek koloni düşürüldü, 24 saat ve 48 saat sonra koloni sayımı yapıldı. Bakteri kolonileri her bir vidadan ve kemikten alınan örnek için ayrı ayrı hesaplandı ve CFU olarak rapor edildi. Her bir kültür plağının saflığı, plaklardan yapılan rastgele örneklemelerde Gram boyama ve koagülaz testi yapılarak doğrulandı. Gram pozitif, koagülaz pozitif kok varlığı S.aureus olarak değerlendirildi. Kontaminasyon şüphesi olmayan durumlarda daha ileri incelemeye gerek duyulmadı. Veriler, Kruskal-Wallis varyant analiz testi kullanılarak değerlendirildi (118). Multiple comparison test kullanılarak her bir grup bir diğeri ile kıyaslandı. P değerinin < 0.05 olması, istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3.1.6.3. Sonuçlar:

Grup I'de, daha önceki çalışmalardan da beklenildiği gibi hiç üreme olmadı. Grup II'deki 10 tavşana ait 20 vida'nın 16'sında (%80) ve 20 kemik parçasının 18'inde (%90) bakteri üremesi saptandı (60-2200 koloni / ml). Grup III'deki tavşanlardan çıkartılan 8 vidanın 6'sında (%75) kemik parçasının 7'inde (%87,5) bakteri üremesi saptandı (84-2320 koloni / ml). Tüm veriler istatistiksel olarak incelendi gümüş kaplı vidaların kullanıldığı grup ile diğeri iki grup arasında anlamlı fark saptandı (p<0,001).

3.1.6.4. Karar:

Grup II ve Grup III'de bakteri üremesinin teorik olarak % 100 olması beklenirken %75-90 arasında saptanması, bazı deneklerin immün sistemlerinin mikro organizmayla olan yarışta baskın geldiği ve enfeksiyon oluşumunu engellediği şeklinde yorumlandı.

Yapılan bu çalışma sonrasında elde edilen veriler ışığında, gümüş kaplı titanyum vidaların elektrik akımı kullanılsa da, tıpkı in vitro deneylerde olduğu gibi in vivo deneylerde de anti bakteriyel özellik gösterdiği saptanmış oldu. Bundan sonraki planların, “**sol-gel yöntemi ile yapılan kaplamaların elektrik akımı uygulanmaksızın kullanılması**” üzerine kurulmasına karar verildi.

3.1.8. Gümüş Kaplı İmplant Kullanılan Deney Hayvanlarının Vücut Sıvılarında ve Bazı Önemli Dokularında Gümüş Miktarının Belirlenmesi (7. ÇALIŞMA)

3.1.7.1. Amaç:

Bu çalışmada, implant bağımlı enfeksiyonların azaltılması amacı ile geliştirilen gümüş kaplı vertebral implantların, içerdikleri gümüş iyonları nedeni ile vücut sıvıları ve bazı önemli dokularda gümüş birikimi yapıp yapmadığının incelenmesi amaçlandı.

3.1.7.2. Materyal ve Metod

Bu çalışma için, bir önceki çalışmada Grup I'i ve Grup II'yi oluşturan 20 adet beyaz Yeni Zelanda tavşanından elde edilen dokular (böbrek, karaciğer, beyin, kornea) ve periyodik olarak (operasyon sonrası 0. gün, 7. gün, 14. gün, 21. gün ve 28. günlerde) alınan kan ve idrar örnekleri kullanıldı.

3.1.7.2.1. Plazma ve İdrarda Gümüş Tayini

Serum ve idrar örneklerinden 0,250 ml alınarak 5 ml %2'lik nitrik asit ile 1/5 oranında dilüe edildi. Bu şekilde hazırlanan numuneler Perkin-Elmer Aanalyst 800 Atomik Absorbsiyon spektrofotometresinde 2,5; 5,0; 7,5 ve 10 mikrogram/L'lik standartlara karşı okunarak gümüş konsantrasyonları belirlendi. Maliyeti düşürmek amacı ile öncelikle gümüş miktarının en fazla olacağı ön görülen 28. güne ait numuneler ve bazal değeri saptamak için operasyon öncesi alınan numuneler çalışıldı.

3.1.7.2.2. Karaciğer, Böbrek, Beyin, ve Kornea Örneklerinde Gümüş Tayini

Sakrifikasyon sonrası (28. gün) alınan karaciğer, böbrek, beyin ve kornea örneklerinden 100'er mg. alındı. Saf nitrik asit ile karıştırılarak Berghof MWS-2 mikrodalga parçalama sistemi kullanılarak parçalandı ve deiyonize su ile dilüe edildi. Hazırlanan numuneler Perkin-Elmer Aanalyst 800 Atomik Absorbsiyon spektrofotometresinde, grafit fırını kullanılarak, 2,5; 5,0; 7,5 ve 10 mikrogram/kg'lik standartlara karşı okunarak gümüş konsantrasyonları belirlendi. Serum ve idrar analizinde olduğu gibi, maliyeti düşürmek amacı ile öncelikle gümüş miktarının en fazla olacağı ön görülen 28. güne ait numuneler ve bazal değeri saptamak için operasyon öncesi alınan numuneler çalışıldı.

Gümüş itrahi, genel olarak renal yolla olduğu için böbrek dokusunun; detoksifikasyonda görevli temel organ olması nedeni ile karaciğerin; literatürde gümüşün en çok biriktiği bölge olduğu bilindiği için korneanın ve uygulanması amaçlanan bölgenin merkezi sinir sistemi ile yakın ilişkisi dolaysı ile de beyin dokusunun gümüş birikimi açısından incelenmesi planlandı.

3.1.7.3. Sonuçlar

Plazma ve idrarda, çalışılan tüm numunelerde gümüş miktarı 0,005 absorbans'da < 0,125 mikrogram/L olarak belirlendi. Operasyon ncesi alınan neklerle operasyondan 28 gün sonra alınan nekler arasında fark saptanmadı. Ölçülen tüm değerler, 5 µg /L'nin altında olduğu için güvenli kabul edildi ve daha önceki tarihlerde alınan numunelerde gümüş tayini yapılmadı.

Çalışılan tüm doku numunelerinde gümüş miktarı 0,005 absorbans'da <0,125 µg /L olarak belirlendi. Operasyon ncesi alınan neklerle operasyondan 28 gün sonra alınan nekler arasında fark saptanmadı. Değerler, 5 µg/kg'nin altında olduğu için güvenli kabul edildi ve daha önceki tarihlerde alınan numunelerde gümüş tayini yapılmadı (insan için normal kan gümüş seviyesinin 0-5 µg /L olduğu bilinmektedir (122)).

3.1.7.4. Karar

Alınan sonuçlar, kullanılan gümüş kaplamalı implantlardan canlı dokuya her hangi bir gümüş salınımı olmadığını ya da mevcut salınımın saptanamayacak değerde olduğunu göstermektedir. Gümüşün bilinen doğal itrah yolu olan idrarda dahi gümüşe rastlanılmaması, serumda değerinin artmaması ve seçilen dokularda gümüşe rastlanılmaması, yöntemin güvenli bir yöntem olduğunu göstermektedir.

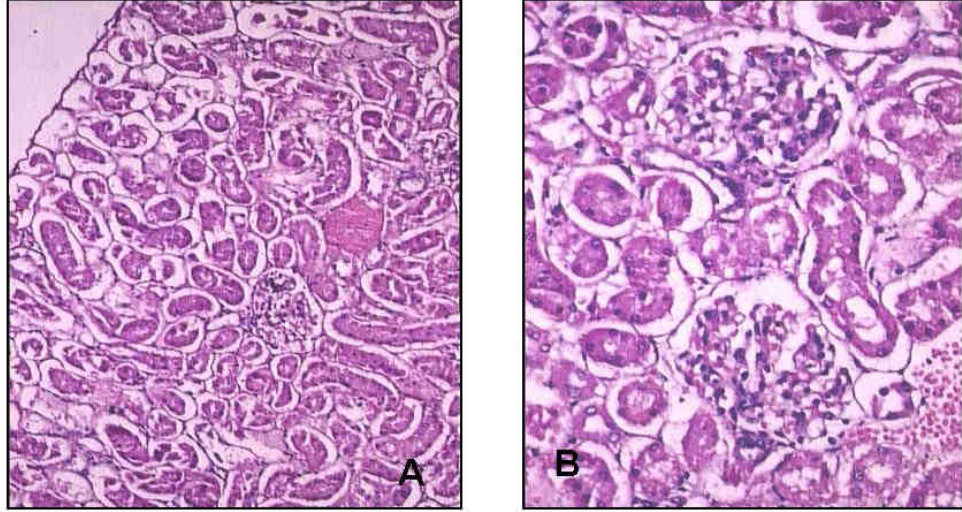
3.1.8. Dokularda Histopatolojik Olarak Gümüş Aranması (8. Çalışma)

3.1.8.1. Amaç

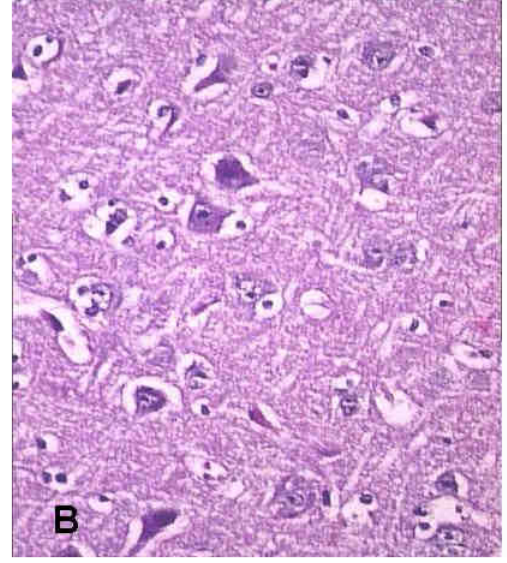
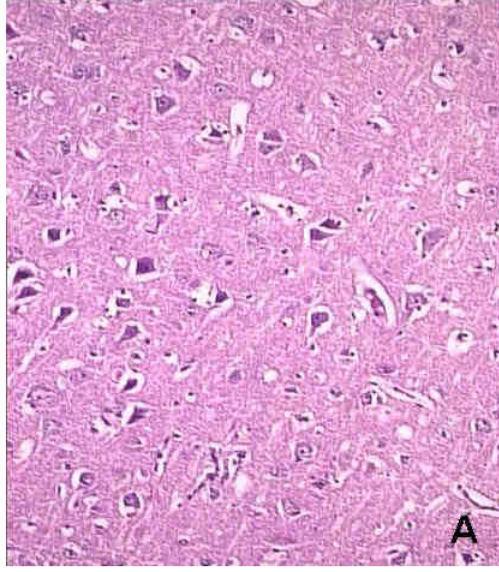
Bu çalışmada gümüş kaplı implantlara maruz kalmış deneklerin gümüş birikimi olması muhtemel bazı hayati organ ve dokularının ışık mikroskopunda incelenmesi amaçlandı.

3.1.8.2. Materyal –metod

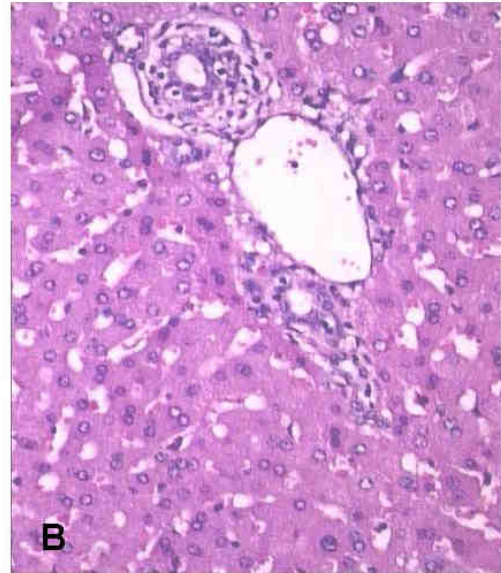
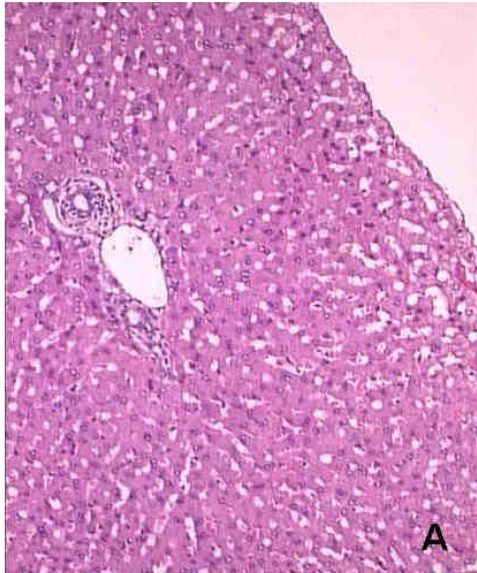
Bu çalışma için, 6.çalışma'da Grup I ve Grup II'yi oluşturan 20 adet beyaz Yeni Zelanda tavşanından elde edilen dokular (böbrek, karaciğer, beyin, kornea) kullanıldı. Sakrifikasyondan hemen sonra taze doku örnekleri alınarak %10'luk formalin içerisinde fixe edildi. Parafine gömülü 5 µm kalınlığında seri doku örnekleri haematoxylin-eosin (H&E) ile boyandı ve gümüş birikimi, hücresel şişme ya da nekroz varlığı açısından ışık mikroskobu altında birbirinden bağımsız 2 ayrı patolog tarafından incelendi (Resim 14, 15, 16, 17).



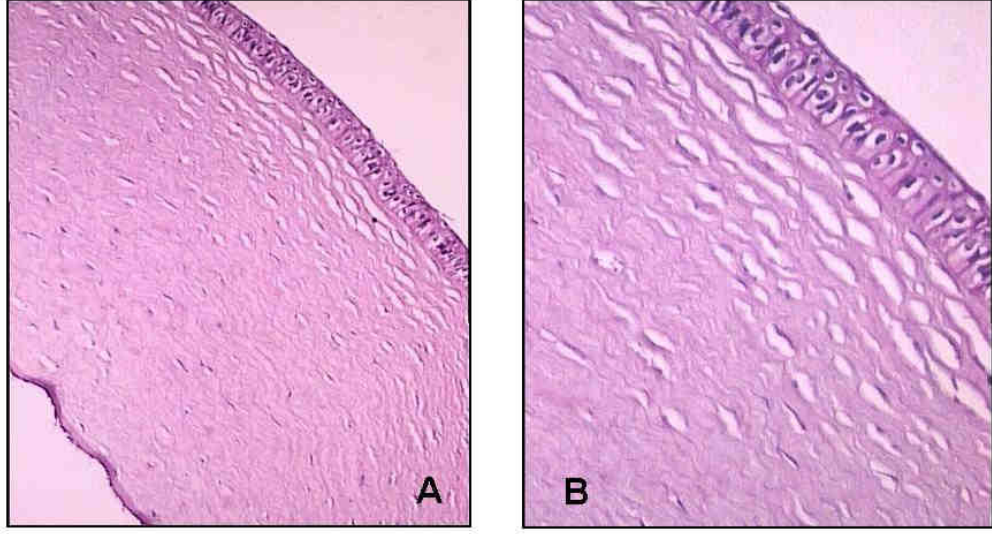
Resim 14: (A) Gümüş kaplı implant kullanılan gruba ait denek'in renal dokusu. Glomerüller ve tübüler yapının normal yapıda olduğu görülmektedir. Örnekte, metal birikimini işaret edecek herhangi bir birikim de görülmemektedir. Hematoksilen & Eozin x 200. **(B)** Aynı böbreğe ait kesitin daha büyük büyütmesi (x 400)



Resim 15: (A) Gümüş kaplı implant kullanılan gruba ait denek'in glial dokusu. Dokunun tamamen normal olduğu görülmektedir. Gümüşe ait olabilecek metalik depoziit görülmemektedir. Hematoksilen & Eozin x200 **(B)** Aynı dokunun daha büyük büyütmesi (x 400)



Resim 16: (A) Gümüş kaplı implant kullanılan gruba ait denek'in karaciğer dokusu. Dokunun histolojik olarak normal karaciğer dokusu görünümünde olduğu görülmektedir. Hematoksilen & Eozin x 200. **(B)** Aynı dokunun daha büyük büyütmesi. Gümüş depozitine dair bulguya bu örnekte de rastlanılmadı. (x 400)



Resim 17: (A) Gümüş kaplı implant kullanılan gruba ait denek'in kornea dokusu. Dokunun histopatolojik olarak normal görünümde olduğu görülmektedir. Hematoksilen & Eozin x 200. **(B)** Aynı dokunun daha büyük büyütmesi. Gümüş depositi lehine yorumlanabilecek herhangi bir birikim ya da yabancı cisim reaksiyonu görülmemektedir (x 400).

3.1.8.3. Sonuçlar

Yukarıdaki resimlerden de anlaşılacağı gibi, gümüş kaplı implantlara maruz kalan deneklerin hiç birisine ait böbrek, karaciğer, beyin ve kornea dokusunda gümüş birikimi lehine yorumlanacak bulguya rastlanılmadı. İncelenen tüm dokular, histopatolojik olarak “normal doku” özellikleri göstermekteydi.

3.1.8.4. Karar

Bu bulgular, sol-jel yönteminin zararsız ve güvenli bir yöntem olduğunu, herhangi bir doku hasarı yapmadığını histopatolojik olarak ortaya koymuştur.

3.1.9. Elektron Mikroskop Çalışması (9. çalışma)

3.1.9.1. Amaç

Bu çalışmada, sol-jel yöntemi ile gümüş kaplanan vertebral implantların biyofilm oluşumuna karşı dirençlerinin ve gümüşe maruz kalan bazı hayati organ ve dokuların ultrastrüktürel değişikliklerinin incelenmesi amaçlandı.

3.1.9.2. Materyal ve Metod

Bu çalışma için, 6.çalışma'da Grup I ve Grup II'yi oluşturan 20 adet beyaz Yeni Zelanda tavşanından elde edilen 40 adet vida (20 adet gümüş kaplı ve 20 adet normal titanyum vida) ve 40 adet kemik dokusu kullanıldı.

3.1.9.2.1. Transmission Elektron Mikroskop Çalışması (TEM)

Alınan doku örnekleri % 2,5'lik gluteraldehit çözeltisi içinde 24 saat süre ile fikse edildi. Daha sonra örnekler pH'ı 7,4 olan SPB (Sorenson's Phosphate Buffer) tampon çözeltisi ile yıkandı ve %1'lik osmium tetroksit çözeltisi ile post-fiksasyon işlemi uygulandı. Bu işlemi takiben örnekler tekrar SPB tampon çözeltisi ile yıkanarak dehidratasyon aşamasına kadar gelindi. Dehidratasyon işlemi düşükten yükseğe doğru değişen alkol konsantrasyonlarında (% 25, % 50, % 75 ve saf alkol) gerçekleştirildi ve daha sonra örnekler iki kez propilen oksit ile yıkanarak gömme işlemi hazırlık aşamalarına başlandı. Gömme işlemine hazırlık işleminin ilk aşamasında 1/1 oranında propilen oksit ve epoksi rezin gömme materyali karıştırılarak örnekler bu karışımın içerisinde 1 saat süreyle bekletildi ve 1 saatin sonunda bu karışımın üzerine aynı miktarda epoksi rezin gömme materyali ilave edilerek karışımın oranı 1/3'e çıkarıldı. Bu işlemi takiben örnekler 1 gece boyunca rotatorda bekletildi ve gömme işlemine hazırlık aşaması bu şekilde sonlandı. Bunu takiben epoksi rezin gömme materyaline plastik kapsüller kullanılarak gömülen örnekler 48 saat süre ile 60 derece sıcaklıktaki etüvde bekletildi. 48 saatin sonunda

örnekler etüvden alındı ve LKB Nova (İsveç) marka ultramikrotom cihazı ile örneklerin yarı ince kesitleri alındı, 2 µm kalınlıktaki bu kesitler metilen mavisi ile boyandı ve ışık mikroskop altında incelenerek ince kesit alınacak sahaların tespit edilmesi sağlandı. İnce kesit alınacak sahalar doku yüzeyinin trimlenmesi ile transmisyon elektron mikroskopik kesit alınabilecek doku yüzeyi büyüklüğü elde edildi. Bunu takiben, örneklerin yaklaşık 60 nm kalınlıkta olan ince kesitleri aynı ultramikrotom ile alındı. Alınan ince kesitler üranil asetat ve kurşun sitrat boyaaları ile çift kontrastlama yöntemiyle boyandıktan sonra Jeol JEM 1400 (Japonya) marka transmisyon elektron mikroskop ile incelendi. Örneklerin fotoğrafları elektron mikroskopun Orius SC 1000 CCD kamerası ile çekildi.

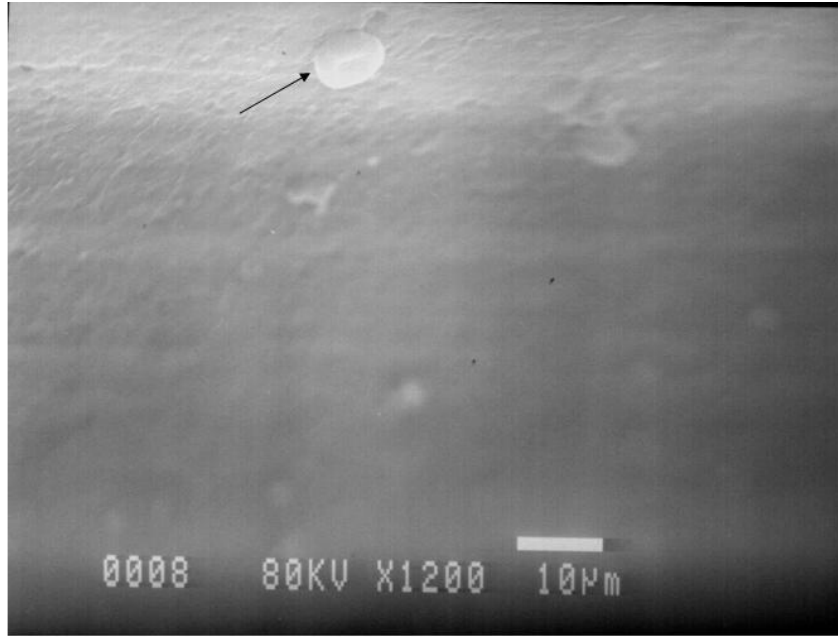
3.1.9.2.2. Taramalı (Scanning) Elektron Mikroskop Çalışması (SEM)

Alınan vida örnekleri % 2,5'lik gluteraldehit çözeltisi içinde 24 saat süre ile fikse edildi. Daha sonra örnekler pH'ı 7,4 olan SPB (Sorenson's Phosphate Buffer) tampon çözeltisi ile yıkandı ve %1'lik osmium tetroksit çözeltisi ile post-fiksasyon işlemi uygulandı. Bu işlemi takiben örnekler tekrar SPB tampon çözeltisi ile yıkanarak dehidratasyon aşamasına kadar gelindi. Dehidratasyon işlemi düşükten yükseğe doğru değişen aseton konsantrasyonlarında gerçekleştirildi. (%25, %50, %75 ve saf asetonda sıra ile 20'şer dakika bekletildi). Daha sonra örnekler BIO-RAD kaplama cihazında 100 Angstrom kalınlıkta altın-palladyum karışımı ile kaplandı ve örneklerin fotoğrafları Jeol SEM-ASID 10 marka taramalı elektron mikroskop ile alındı.

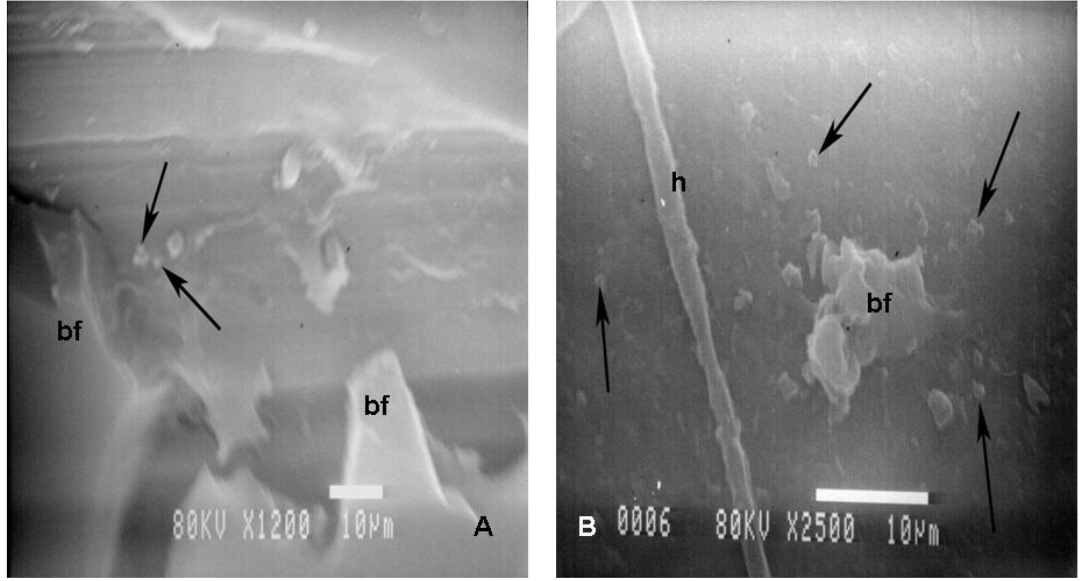
3.1.9.2.3. Sonuçlar:

Grup I'de, hiçbir vida yüzeyinde biyofilm tabakasına rastlanılmadı (resim 18). Tüm kaplama yüzeyleri hala bütünlüğünü korumaktaydı. Yani kaplamalar kemik dokusuna vidalanmaya dayanabilmişti. Grup I'e ait hiçbir vidada bakteriye rastlanılmadı, sadece bazı kemik dokularının fokal bazı bölgelerinde birkaç adet

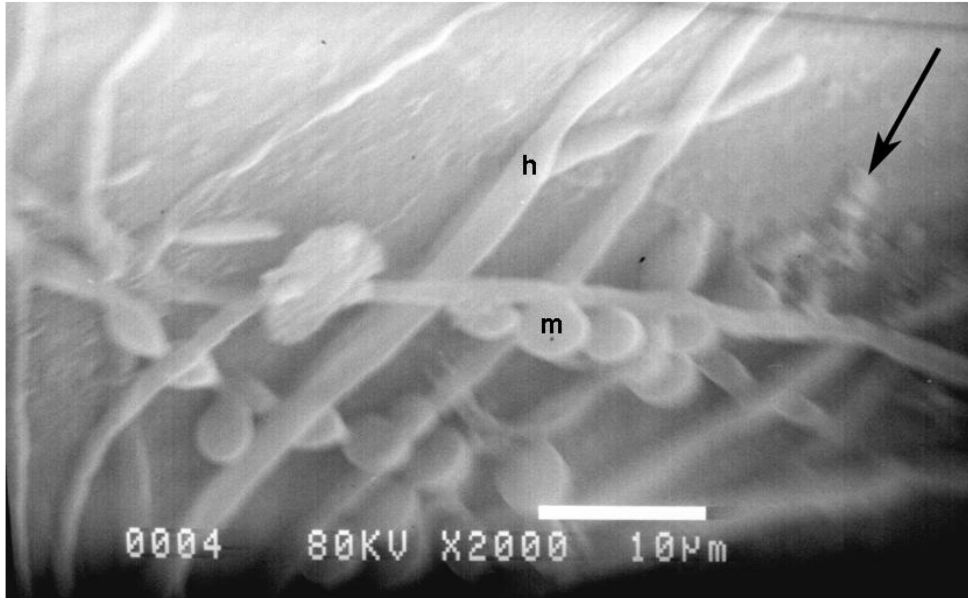
bakteriye rastlanıldı, bu bakterilerin örnek alındığı anda yaşıyor olup olmadıkları hakkında yorum yapılamadı. Grup II'de, tüm vida yüzeylerinde biyofilm formasyonu saptandı (resim 19). Biyofilm tabakası beklenildiği gibi pek çok bakteriden ve ağ şeklinde hifler ve yalancı hiflerden oluşmaktaydı (Resim 20). Grup II'ye ait kemik örneklerinde çok daha fazla sayıda, çok daha fazla örnekte ve her örneğin çok daha fazla alanında bakteriye rastlanıldı (Resim 21). Ancak bu bakterilerin de örnekleme sırasında yaşıyor olup olmadıkları hakkında yorum yapılamadı.



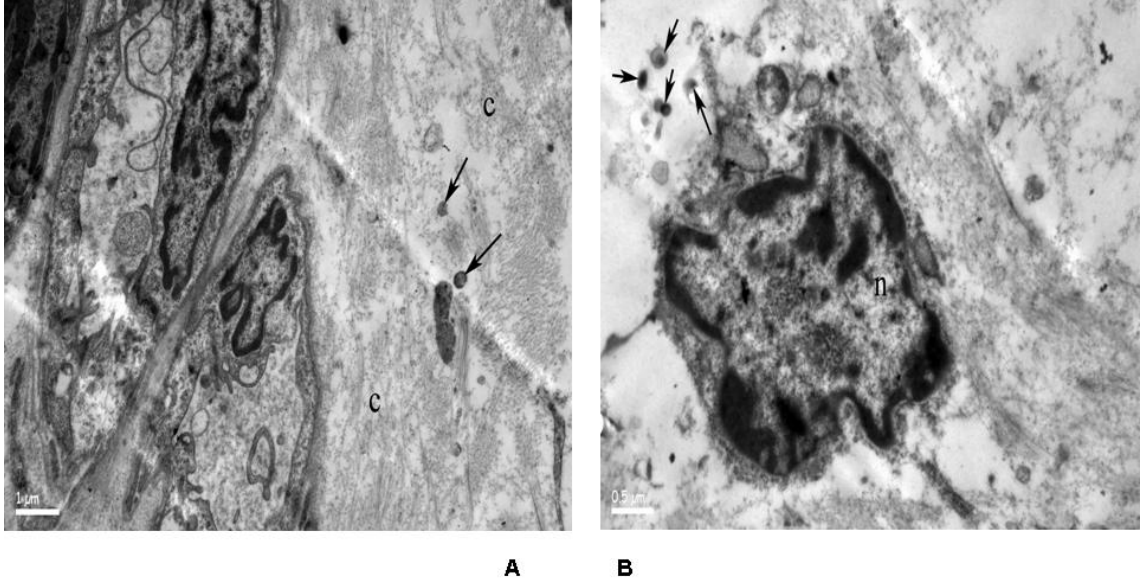
Resim 18: Gümüş kaplı vidada SEM çalışması/Vida yüzeyinde biyofilm tabakasına rastlanılmadığına, bakteri ya da hif yapısının bulunmadığına dikkat ediniz. Görüldüğü gibi, gümüş iyonları sadece antibakteriyel etki sağlamakla kalmamış, biyofilm oluşumunu da engellemiştir. Ok: eritrosit (Büyütme: orijinal boyut x 1200).



Resim 19: Gümüş kaplı olmayan vidalarla yapılan SEM çalışmasına ait iki ayrı örnek (A ve B). Her iki resimde de gümüşsüz ortamda gelişen bakteri (oklar), hif yapısı (h) ve biyofilm (bf) formasyonu görülmekte.

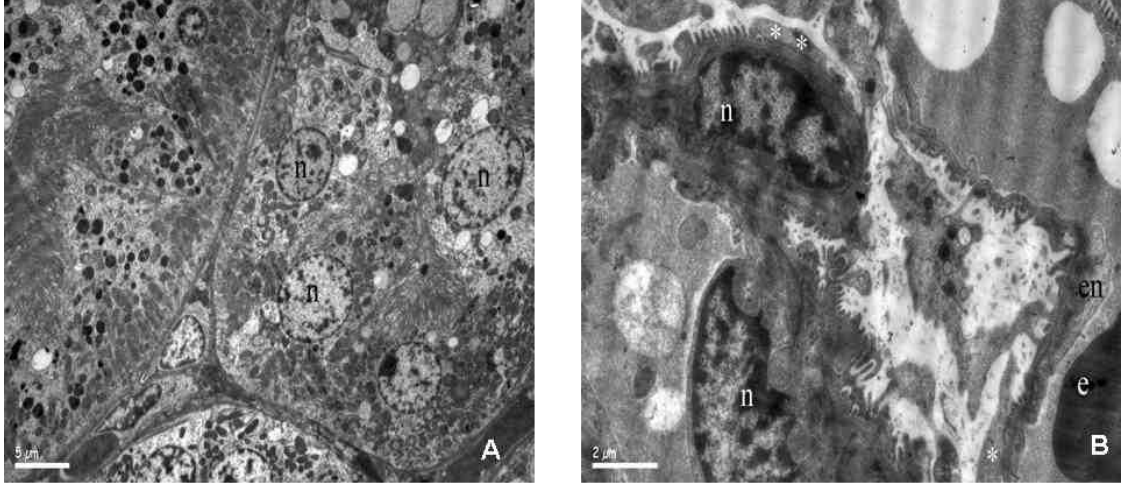


Resim 20 : Gümüş kaplı olmayan titanyum vida ile yapılan SEM çalışması. Bakteri (ok), maya (m) ve hif (h) yapıları açıkça görülmekte.

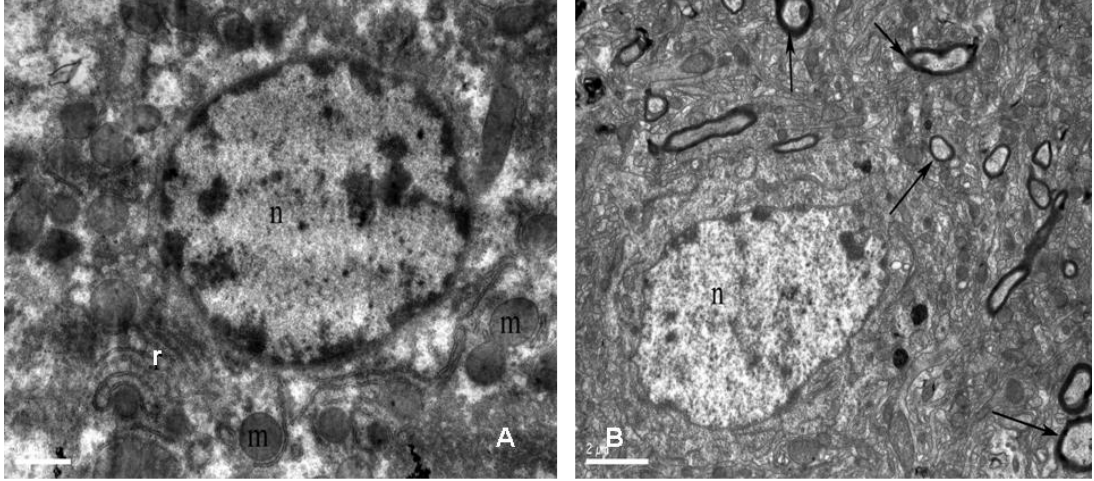


Resim 21: (A) Gümüş kaplı vidanın takıldığı kemik ile yapılan TEM çalışması. Bakteriye (oklar) nadiren rastlanmakta, bakterilerin ölü oldukları, yapılan kültürlerle gösterilmiştir. (x 15.000) **(B)** Gümüş kaplı olmayan titanyum vidaların takıldığı kemik ile yapılan TEM çalışması. Daha çok alanda, ve daha fazla sayıda bakteriye rastlanmakta (oklar). Bu bakterilerin canlı olduğu yapılan kültürlerle doğrulandı. (x 30.000). c: kollajen lifler, n:osteosit nükleusu.

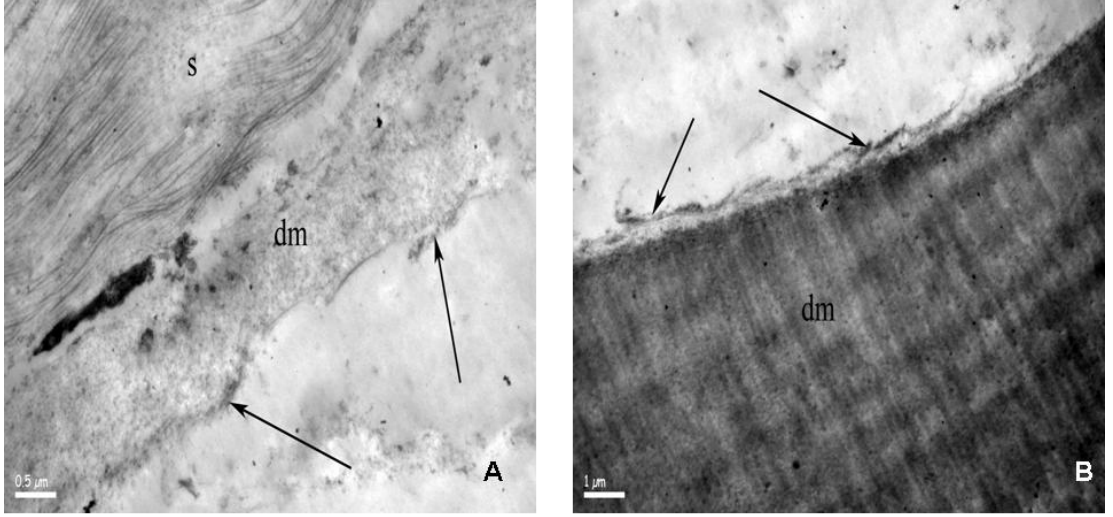
Doku incelemelerine bakıldığında, Grup I ve Grup II’de tüm doku örnekleri normal görünümdeydi. Ancak, Grup II’ye ait tek bir böbrek örneğinin birkaç fokal alanında ılımlı, geri dönüşümlü glomerüler hasar saptandı (Resim 22). Hiçbir örnekte hücresel şişme, nekroz, bakteri infiltrasyonu ve gümüş ya da titanyum birikimine işaret edecek depozitler gözlenmedi (Resim 23, 24).



Şekil 22: TEM çalışması. Gümüş kaplı vida kullanılan gruba ait örnekte böbrek dokusunun normal olduğu görülmekte. n: tübül hücresi nükleusu, orjinal büyütme X 4000 (A). Gümüş kaplı olmayan vidaların kullanıldığı gruba ait örnekte fokal bir kaç alandaki geçici glomerüler hasar dikkat çekmekte. Bu durum, muhtemelen örneğin fikse edilmesindeki gecikmeye bağlı bir durumdur. n: podosit hücresi nükleusu, *: pedisitlerde hasar ve dejenerasyon, e: kapiller lümende eritrosit, en: endotel hücresi. Orjinal büyütme x 12000 (B)



Resim 23: TEM çalışması. Gümüş kaplı vidaların kullanıldığı grupta normal karaciğer dokusu. n: hepatosit nükleusu, m: mitokondri, r: granüler endoplazmik reticulum. Orjinal büyütme x 20000 (A). Gümüş kaplı vidaların kullanıldığı grupta normal beyin dokusu. n: nöron hücresi nükleusu, ok: normal myelinli aksonlar. Orjinal büyütme x 12000 (B).



Resim 24: TEM çalışması. Gümüş kaplı vidaların kullanıldığı grupta normal kornea görüntüsü.

Ok: kornea endoteli, dm: descemet membranı, s:stroma.Orjinal büyütme x 5000 (A) ve x30000 (B)

3.1.9.2.4. Karar:

Bu çalışma, ön görüldüğü gibi, gümüş kaplı implantların biyofilm oluşumunu engellediğini göstermiştir. Çalışılan hiçbir dokuda patolojik değişikliğin olmaması ise sistemin en az gümüş kaplı olmayan titanyum vidalar kadar güvenli olduğu sonucunu çıkarmamızı sağlamıştır. Diğer taraftan, Grup II'deki glomerüler hasarın, örneğin fiksasyonundaki gecikmeyle ilişkili olabileceği düşünüldü.

4.1.10. Mekanik Dayanıklılık Deneyi (10. Çalışma)

2.6.10.1. Amaç:

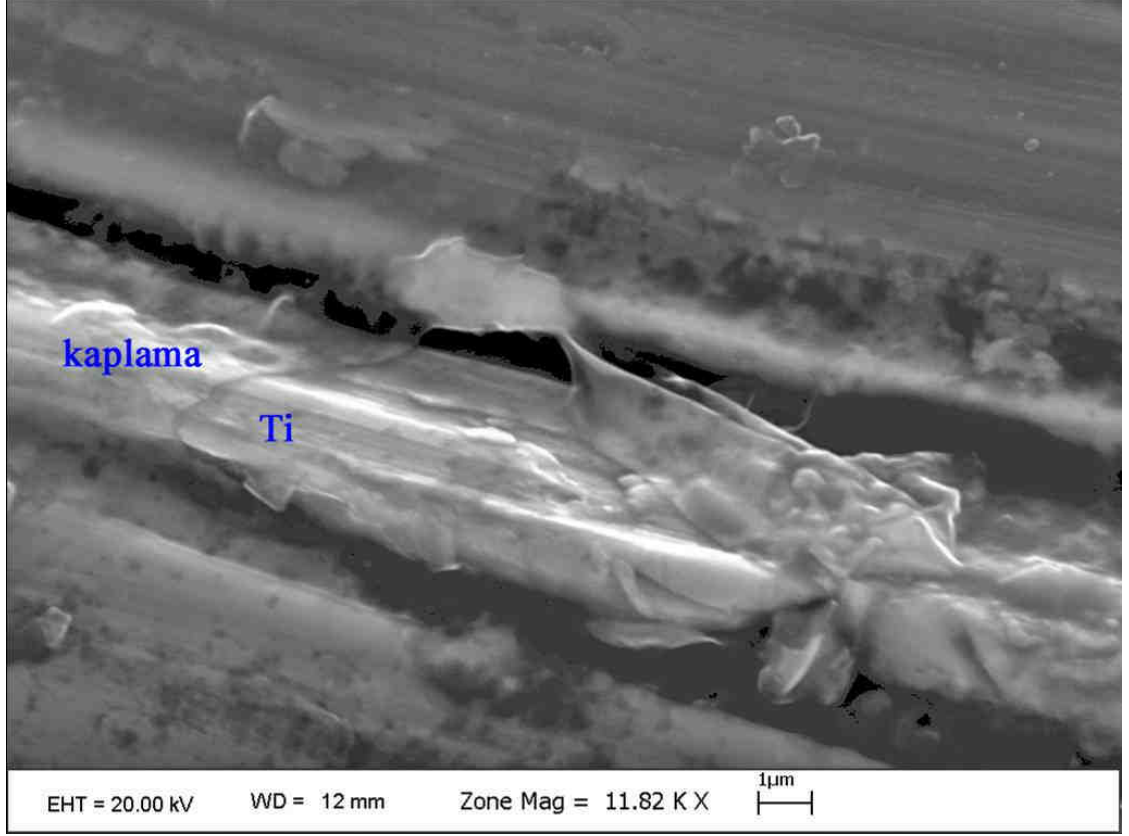
Yapılan tüm bu çalışmalardan sonra, kaplamaların tekrarlayan vidalama işlemlerine ve el aletleri ile yapılacak manüplasyonlara dayanıp dayanamayacağı, kaplamaların bu işlemlerden sonra ne durumda olacağı hakkında bir çalışma yapmaya karar verildi.

3.1.10.2. Materyal ve Metod:

On adet standart pedikül vidası (Norm medikal, Ankara, Türkiye), daha önce anlatılan yöntemle % 2,5 gümüş içeren solüsyonlar kullanılarak gümüş ile kaplandı. Tüm vidalar, sıyırılma deneyinin yapılabilmesi için Akdeniz Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümüne gönderildi. Burada, vidalar önce uygun ebattaki ahşap bloklara vidalanarak çıkartıldı. Her bir vida, 5 ayrı ahşap bloğa sırasıyla vidalandı ve geri çıkartıldı. Yapılan elektron mikroskop çalışmasında kaplamaların hala yerinde olduğu saptandı, bunun üzerine bu tür sıyırılma (abrazyon) deneylerinde kullanılan standart yöntem olan Silisyum Karbür (Si C) kullanılarak vidaların üzerindeki kaplamaların aşınmaya / sürtünmeye olan dirençleri incelendi. Aşındırma işlemi sonrasında tüm vidaların elektron mikroskop fotoğrafları çekildi (Resim 25).

3.1.10.3. Sonuçlar:

Ahşap bloklarla yapılan tekrarlayan vidalama işlemlerine tüm kaplamaların dayandığı gözlemlendi. Si C ile yapılan zorlu aşındırma deneylerinde ise kaplamaların yer yer sıyrıldığı ancak hala yeterli miktarda kaplanmış yüzeyin var olduğu belirlendi (Resim 25).



Resim 25: Silisyum Karbür (SiC) kullanılarak yapılan deneylerden sonra kaplamada yer yer dökümler olsa da hala yeterince kaplama yüzey alanı mevcuttur. Normal bir vidalama işleminde vidanın, biyolojik dokuda, bu denli bir zorlamaya maruz kalması neredeyse imkansızdır.

3.1.10.4. Karar:

Sol-jel yöntemi ile yapılan kaplamaların, kemik sertliğinde bir yüzeyin ve el aletlerinin uygulayabileceği aşındırma kuvvetinin çok üzerindeki aşındırma kuvvetlerine dayanabildiği, klinikte hiçbir zaman bu denli kuvvetlere maruz kalınmayacağı için de güvenle kullanılabilceği sonucuna varıldı.

3.2. GÜMÜŞ KAPLI TRANSPEDİKÜLER VİDA – ROD SİSTEMİ İLE YAPILAN KLİNİK ÇALIŞMA VE İLK 50 HASTANIN 1 YILLIK TAKİP SONUÇLARI

Yapılan in vitro çalışmalar, gümüş kaplı titanyum implantların saf gümüş metali kadar etkili bir anti bakteriyel özelliğe sahip olduğunu göstermiştir. Yine tüm bu çalışmalar, kullanılan gümüşün hayati organlarda birikim yapmadığını, bu dokular üzerinde toksik bir etkide bulunmadığını, kandaki değerinin artmadığını ve dahası idrarda gümüşe rastlanılmadığını yani itrahının yok ya da saptanamaz düzeyde olduğunu göstermiştir. Gümüşün itrahi normalde renal yolla olduğu için, idrarda gümüş saptanması olasıdır. Ancak, çalışmamızda böyle bir saptamamız olmamıştır. Bu durum da, kullanılan gümüşün titanyumdan ayrılarak dokulara ve kana karışmadığını yani güvenli olduğunu göstermektedir. Yapılan en son çalışma ise (çalışma 10), tekrarlayan otoklavlama işlemleri sonrasında ve cerrahi sırasında vidanın kemik dokuya birden fazla sayıda takılıp çıkartılması durumunda üzerindeki kaplamanın zarar görmediğini, çizilip dökülmediğini yani mekanik olarak da dayanıklı olduğunu göstermiştir.

Tüm bu çalışmalardan alınan sonuçlar, bizi klinik çalışma yapma konusunda cesaretlendirmiştir. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi İnsan Etik Kurulu'ndan alınan onay belgesi sonrasında gönüllü 50 hasta üzerinde klinik çalışma yapılmasına karar verildi.

3.2.1. Amaç

Gümüş kaplı transpediküler vida-rod sisteminin post operatif dönemde implant bağımlı enfeksiyon oranını değiştirip değiştirmediğinin incelenmesi ve vücut sıvılarında gümüş tayini yapılması.

3.2.2. Materyal ve Metod

3.2.2.1. Gümüş kaplı implantlar

Klinikte rutin olarak kullanılan standart transpediküler vida –rod sistemi, ortalama 50 hastaya yetecek şekilde, daha önce anlatılan Sol-jel yöntemi kullanılarak gümüş ile kaplandı (Norm Medikal, Ankara ve Mikron Makine, Ankara). Operasyon sabahı otoklavlanarak operasyon odasına alındı.

3.2.2.2. Hasta seçimi

Cinsiyet ayrımı yapılmaksızın, 25-80 yaş arası, posterior lomber stabilizasyon endikasyonu olan, ASA I-II, çalışmaya gönüllü olarak dahil olduklarını yazılı olarak beyan eden toplamda 50 hasta çalışmaya dahi edildi. Çalışmaya alınan hastaların implant bağımlı enfeksiyon gelişimi açısından özellikle yüksek riskli olması tercih sebeplerinin başında geliyordu. Bu amaçla, daha önce kliniğimizde ya da dış merkezde opere edilmiş, daha önce cerrahi enfeksiyon nedeni ile implantı çıkartılmış, pre operatif MRG’de enfeksiyon şüphesi ya da klinik olarak enfeksiyon kanıtı olan ve diyabetik hastalar çalışmaya özellikle dahil edildi. Çalışmada, yukarıda sözü geçen risk gruplarının hiç birisine sahip olmayan hastalar da mevcuttu. Hastaların demografik bilgileri tablo 7’de özetlenmiştir.

3.2.2.3. Uygulanan yaklaşım ve yöntemler

Çalışmaya kabul edilen ve imzalı onayları alınan hastalardan operasyon sabahı kan ve idrardaki gümüş miktarının bazal değerini saptamak üzere biyokimya tüpüne 5 cc kan ve 5 cc idrar alınarak stoklandı. Yine tüm hastalardan, operasyon sonrası dönemde gelişmesi muhtemel enfeksiyonun takibi ve tespiti amacı ile eritrosit sedimentasyon hızı (ESR) ve CRP örnekleri alınarak laboratuara gönderildi.

Titanyum alaşımdan yapılan ve üzeri sol-jel yöntemi ile nanopartiküler gümüş iyonu ile kaplanan “transpediküler vida – rod sistemi” kullanılarak gereken stabilizasyon operasyonu gerçekleştirildi (her hasta için kullanılan vida sayısı, tablo 7’de belirtilmiştir.).

Tablo 7: Tabloda çalışmaya dahil edilen tüm hastaların verileri özetlenmiştir.

Hasta No	Yaş	Cinsiyet	Risk Faktörü	Vida sayısı	Hasta No	Yaş	Cinsiyet	Risk Faktörü	Vida sayısı
1	48	K	N	4	26	48	E	PB	4
2	55	K	N	12	27	53	K	-	6
3	65	K	D	9	28	66	K	B, N	6
4	65	K	D	4	29	62	K	E, N	4
5	66	K	-	4	30	38	E	-	8
6	30	E	-	4	31	57	K	D	8
7	63	K	E(?)	8	32	68	K	T/E(?)	4
8	53	K	D	8	33	61	K	N	10
9	45	K	-	4	34	50	K	B, N	6
10	29	E	-	4	35	57	E	E	6
11	50	E	D	4	36	57	E	-	4
12	43	E	D	4	37	60	K	E(?)	8
13	65	K	E, N	4	38	64	K	Ds	4
14	64	E	B, N	4	39	65	K	PB	4
15	69	K	Ds, N	6	40	65	K	-	4
16	64	K	D	4	41	54	E	D	6
17	63	E	E(?)	6	42	50	K	N, PB	4
18	48	E	PB	4	43	53	K	-	8
19	67	E	-	8	44	52	K	D	4
20	48	K	N, B	4	45	67	E	-	4
21	80	E	T/E (?)	6	46	65	K	D	6
22	37	E	-	4	47	65	K	N, D	6
23	28	E	Tr, N	9	48	66	K	D	4
24	74	E	D	6	49	49	E	-	4
25	71	E	D	4	50	59	E	-	8

(N: Nüks, D: Diabet, B: Bos geliş pre op dönemde var olan (kesi yeri akıntısı olan), PB: Per op dönemde BOS geliş gözleendiği için çalışmaya dahil edilen, E: Enfeksiyon, E(?): Radyolojik olarak enfeksiyon şüphesi olan, T/E(?): Tümör / Enfeksiyon ayrımı yapılamayan, Ds: Diskitis, Tr: Travma.)

Tablo 8: Tabloda, çalışmaya dahil edilen hastaların zaman bağılı kan değerlerinin, idrar ve kandaki gümüş miktarlarının ortalamaları verilmiştir.

Zaman	Sedim	CRP	BUN	Cr	Leu	Plt	ALT	AST	GGT	Gümüş	n
0.gün	13,9	3,75	10,2	0,9	14,900	380,000	17,3	14,2	16,7	<0,125	50
10. gün	45, 8	23,65	11,8	1,1	17,870	893,000	17,0	21,5	19,3	<0,125	50
1.ay	24,2	14,16	12,0	0,8	13,220	568,000	16,8	18,9	18,9	<0,125	47
3.ay	19,1	9,08	11,9	1,0	11,300	370,000	17,2	13,2	22,8	<0,125	49
6.ay	21,3	3,80	9,3	1,2	11,450	390,000	19,5	17,6	19,3	<0,125	45
12.ay	10,9	2,57	8,9	0,9	9,700	345,000	21,4	14,6	20,2	<0,125	41

(Sedim: Eritrosit sedimentasyon hızı, CRP: C-reaktif protein, BUN: Kan üre azotu, Cr: Kreatinin, Leu: Beyaz küre, Plt: Trombosit, ALT: Alanin transaminaz, AST: Aspartat transaminaz, GGT: Gama glutamil Transaminaz, Gümüş: Kan ve idrardaki gümüş değeri).

Her hastadan post op 10. gün, post op 1. ay, post op 3. ay, post op 6. ay ve post op 12. ayda kan ve idrardaki gümüş konsantrasyonu tayini için biyokimya tüpüne 5 cc kan, yine ayrı bir biyokimya tüpüne 5 cc idrar alınarak Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyopatoloji Anabilim Dalı Laboratuvarına gönderildi. Buradaki laboratuvarında, atomik absorpsiyon spektrofotometresinde kan ve idrardaki gümüş miktarı belirlendi. Ayrıca her hastadan kan ve idrarda gümüş tayini için örnek alınan tarihlerde, tam kan sayımı, kan biyokimyası, ESR ve CRP bakılması gerekmekteydi. Bu tetkikler için hastaların kan aldırıp kliniğimize göndermelerini istemek, aynı laboratuvarında çalışmasını sağlayacağı için en uygun yaklaşımdı ancak, her hastanın kan örneğini zamanında ulaştırılamama ihtimali, geçen sürede değerlerin değişmesi ve hemoliz ihtimali gibi sorunlar düşünüldüğünde her hastanın tetkikleri kendi şehrinde yaptırması ve sonuçları bize göndermesi daha uygun bulundu. Ankara'daki tüm hastaların tetkikleri, hastanemizde yapıldı. Burada, her laboratuvarın standardizasyonu birbirinden farklı olduğundan değerler için her hangi bir minimum ve maksimum değer aralığı belirlemek mümkün olmadı. Yine de, gönderilen her örneğin, çalışıldığı laboratuvar için normal değerlerin dışında olup olmadığı özellikle kontrol edildi.

Tablo 8'den de anlaşılacağı gibi, her hasta, ilgili tarihte telefonla aranmasına rağmen, çalışmaya katılım ilk 10 gün % 100 iken 12. ayın sonunda % 82'ye (41/50 hasta) düştü.

3.2.2.4. Kan ve idrarda gümüş tayini

Daha önceki in vitro çalışmada anlatıldığı gibi hastaların serum ve idrar örneklerinden 0,250 ml alınarak 5 ml %2'lik nitrik asit ile 1/5 oranında dilüe edildi. Hazırlanan numuneler Perkin-Elmer Aanalyst 800 Atomik Absorbsiyon spektrofotometresinde 2,5; 5,0; 7,5 ve 10 mikrogram/L'lik standartlara karşı okunarak gümüş konsantrasyonları belirlendi.

5. SONUÇLAR

Çalışmaya dahil edilen 50 hastanın 2'sinde diskitis, 3'ünde daha önceki operasyonlarına bağlı BOS kaçağı, 3'ünde radyolojik ve klinik ya/ ya da mikrobiyolojik olarak kanıtlanmış enfeksiyon, 3'ünde radyolojik olarak enfeksiyon şüphesi, 14 hastada diyabet mevcuttu. Hastaların 13'ü daha önce kliniğimizde ya da dış merkezde opere edilmiş vakalardı. Pre op dönemde tümör /enfeksiyon ayrımı yapılamayan 2 hastanın her ikisi de tümör metastazı olarak rapor edildi. Bir hasta ise travmatik vertebra fraktürü neden ile dış merkezde opere edilmişti. Yetersiz dekompresyon yapılan ve stabilizasyon yapılmamış olan bu hasta da kliniğimizde opere edilerek stabilizasyon yapıldı. Sadece 3 hastada per op BOS gelişi oldu, bu hastalardaki dura defekti primer olarak sütüre edilerek onarıldı ve doku yapıştırıcı kullanıldı. Bu 3 hastadan 1 tanesi, post operatif dönemde yara yerinden BOS kaçağı devam ettiği için lomber eksternal drenaja alınarak 10 gün takip edildi. Bu hasta dışında çalışmaya alınan hiçbir hastada post operatif dönemde cerrahi yara yeri problemi olmadı. Sadece 2 hastada post op 2.gün, 1 hasta da post op 3. gün tek ölçümde fark edilen ve 38°C'yi geçen ateş yüksekliği saptandı. Bu hastalara soğuk uygulama dışında müdahale edilmedi.

Çalışılan tüm numunelerde gümüş miktarı 0,005 absorbans'da $< 0,125$ mikrogram/L olarak belirlendi. Operasyon öncesi alınan örneklerle operasyondan 12 ay sonra alınan örnekler arasında fark saptanmadı. Ölçülen tüm değerler, 5 mikrogram/L'nin altında olduğu için güvenli kabul edildi (122)

Çalışmaya dahil edilen hastalar 1 yıl boyunca takip edildiler. Post op ilk 12 ay, periyodik olarak tam kan sayımları, böbrek ve karaciğer fonksiyonları, ESR ve CRP değerleri takip edildi. Tablo 8'de, hastalara ait laboratuvar tetkiklerinin bir özeti görülmektedir. Tablodan da anlaşılacağı gibi, 12 aylık takip süresi boyunca hiç bir hastada kemik iliği supresyonunu düşündürecek tam kan sayımı sonucu saptanmadı. Post op dönemde enfeksiyon belirtisi olan beyaz küre yüksekliği de mevcut değildi. Tüm hastalarda, post op ilk 3 ay süren ve operasyona sekonder olduğu bilinen reaktif

trombosit yüksekliği ve bazı hastalarda ilk ay sonunda normale dönen ılımlı beyaz küre yüksekliği saptandı. Takip süresi içerisinde tüm bu değerler normale döndü. Çalışmaya dahil edilen hiçbir hastada, operasyon öncesi döneme kıyasla böbrek ve karaciğer fonksiyonlarında bozulma olmadı. ESR ve CRP değerlerinde ise beklenildiği üzere post op dönemde ani artış oldu ancak ilk 1 aylık sürede tüm hastalarda bu değerler normale döndü.

Çalışmaya dahil edilen hiçbir hastada klinik ve laboratuvar olarak enfeksiyon bulgusuna rastlanılmadı. Tüm hastalar ortalama 5 gün içerisinde taburcu edildi. Post operatif dönemde 2 x 750 mg oral seftriakson kullanmaları önerildi. Bu uygulama, kliniğimiz için yıllardır uygulanan rutin uygulamadan farklı değildi. Retrospektif olarak son 5 yılın ortalaması alındığında lomber stabilizasyon operasyonlarında kliniğimize ait enfeksiyon oranımız % 3 olarak belirlendi. Bu yeni uygulama ile bu oran % 0'a düşürüldü.

Hastalar kontrole geldiklerinde kesi yerleri inspeksiyon ile kontrol edildi. Literatürde, gümüş implant uygulanan bölge üzerindeki ciltte gri-mavi renk değişimi olabileceği belirtilmekteydi. Bu kontroller de aynı durumun varlığını ya da yokluğunu belirlemek amacı ile yapıldı. Hiç bir hastanın cildinde renk değişimine rastlanılmadı. Literatürde, özellikle şaşılık operasyonlarında oküler kasların kısaltılmasını takiben bu kasların kemiğe tekrar tutturulmasında gümüş metalinin kullanıldığını ve bu metale bağlı olarak da sklerada gri-mavi renk değişimi olabileceği bildirilmekteydi. Bu durum, her ne kadar implantın sistemik değil lokal etkisi sonrasında gelişse de, kontrole gelen her hasta bu açıdan da tekrar inspeksiyonla muayene edildi. Daha ileriki takiplerde (6. ve 12. ayda) Ciltte ve sklerada renk değişimi olup olmadığđı her hastaya telefonla ya da e-mail ile ulaşılarak soruldu. Hastalar 12 ay boyunca takipte tutuldu. Hiçbir hastada gümüş akümülyasyonunu düşündürecek dermal ve skleral renk değişikliği olmadı.

Kontroller sırasında bazı hastalarda tekrar lumbosakral MR görüntülemesine ihtiyaç duyuldu. Çekilen MR'larda artefakt düzeyinin klasik titanyum vidalardan farklı olmadığđı görüldü. Gümüş kaplamanın bu açıdan da güvenli olduğu ve post op kontrol görüntülemelerde sorun yaratmadığđı saptandı.

5. TARTIŞMA

Omurga cerrahisi operasyonlarından sonra uygun cerrahi şartlara ve profilaktik antibiyotiklere rağmen antibiyotiklere dirençli, implant yüzeylerinde biyofilm tabakaların oluştuğu enfeksiyonlar günümüzde ciddi bir sorun olmaya devam etmektedir. Literatüre bakıldığında bir metal implantın kullanılmadığı omurga cerrahisi girişimlerinde enfeksiyon oranları %1 civarında iken bir metal implantın kullanıldığı omurga cerrahisinde enfeksiyon oranları %2.1-8.5 arasındadır (6,7). Metal implantların kullanıldığı omurga cerrahisi operasyonlarında enfeksiyon riski 3 kat daha artmaktadır (46, 123). Medikal tedaviye yanıt vermeyen hastalarda revizyon cerrahisi kaçınılmaz olur. Tekrarlayıcı veya sürekli drenajlar, uzun süreli antibiyotik tedavisi, gereğinde enfekte implantın çıkarılması, uzun süreli hospitalizasyon ve hastaların fonksiyonel durumlarının kötüleşmesi, kemik ve kemikle ilişkili implant enfeksiyonlarında kaçınılmaz katastrofik sonuçlardır. Yapılan yıllık ameliyat sayıları göz önüne alındığında omurga cerrahisi sonrası ortaya çıkan enfeksiyonun medikal boyutunun yanında ekonomik boyutu da ciddi bir problemdir. Enfekte biyomateryallerin yüzeyinde en sık Staf. epidermidis ve Staf. aureus izole edilir (56, 59, 85). Bu organizmalara ek olarak E.coli, Peptokoklar, Pseudomonas aeroginosa, Proteus mirabilis ve Beta-hemolitik streptokoklar da sıkça izole edilen diğer mikroorganizmalardır (56, 59). Biyometallerde, kemik, eklem ve yumuşak doku enfeksiyonlarında major etken patojen Staf. aureus'tur (59). Özellikle füzyonun yapıldığı ölü ya da hasar görmüş kemik dokularının bulunduğu ortamlarda Staf. aureus en sık izole edilen enfeksiyon ajanıdır. Tahmin edilebileceği gibi, implant bağımlı enfeksiyonun tedavisini güçleştiren unsur, implant yüzeyinde gelişen biyofilm tabakasıdır. Teorik olarak her bakterinin biyofilm oluşturma potansiyeli varken, klinikte en sık biyofilm yapan bakteri olarak karşımıza Staf.epidermitis çıkmaktadır. Zaten, biyofilm gelişiminden sorumlu slime faktör de ilk defa bu bakteride bulunmuştur. Bu gün ise Staf. epidermitis dışında daha pek çok bakterinin slime faktör üretebildiği bilinmektedir. Biz de çalışmamızda, slime faktör ürettiği bilinen Staf. aureus suşu kullandık. Slime faktör; protein, hekzoaminler, nötral şekerler ve fosforlu bileşikler gibi birçok maddenin oluşturduğu karışık bir yapıdır

(64, 65). Bu faktör %40 karbonhidrat ve %27 protein içeren glikokaliks yapısında, hücre dışı bir maddedir. Slime faktörü mikroorganizmaların konak hücreye ve yapay yüzeylere adezyonundan sorumludur. Bu yüzeylerde fibrin, fibronektin ve slime faktörü ile bir biyofilm tabakası oluşmakta ve bu biyofilmden yayılan mikroorganizma çoğu kez sepsise yol açmaktadır (66, 67).

Biyofilmler, bir yüzeye yapışarak kendi ürettikleri polimerik yapıda jelsi bir tabaka içinde yaşayan mikroorganizmaların oluşturduğu topluluk olarak tanımlanabilir (124). Bu jelsi tabaka, bakteri hücreleri tarafından üretilen terminolojide “hücre dışı polimerik yapı”, “ekzopolisakarit” ya da “ekzopolimer (EPS)” adı verilen polisakkarit bazlı bir ağ yapısıdır (125). Bir başka tanımlamaya göre biyofilm, birbirine ya da bir yüzeye yapışık bakterinin organik bir polimer matriks içine gömülmesidir (126). Biyofilmler bakterileri nem, ısı ve pH değişiklikleri gibi çevresel koşullardaki değişimlerin ve ultraviyole ışığa maruz kalmanın doğuracağı zararlardan korur. Besinlerin depolanmasının ve atıkların uzaklaştırılmasının kolaylaştırılması da biyofilm oluşumunun getirdiği diğer avantajlardır. Bakterilerin kümeler halinde ve ekzopolisakarit matriks içerisinde bulunmaları sonucu fagosite edilmeleri güçleşir ve hümoral immün sistem bileşenlerinin bakterilere ulaşmaları engellenmiş olur (127).

Deney hayvanlarında omurga enfeksiyonu modeli bugüne kadar sadece Poelstra ve arkadaşları tarafından tavşan omurgasında yapılmıştır (17). Bu modelde aynı hayvanın üç farklı omurga bölgelerinde çalışılmış, cerrahi ölü boşluk ve doku hasarı oluşturulmuş ve bu sahaya MRSA inoküle edilmiştir. İmplant olarak paslanmaz çelik Kirschner teli kullanılmıştır. Ancak günümüzde omurga cerrahisinde paslanmaz çeliğin kullanımı çok sınırlıdır. Birçok merkezde paslanmaz çeliğin kullanımı terk edilmiştir. Paslanmaz çelik yerine titanyum bugün tüm omurga cerrahisi girişimlerinde tercih edilen metaldir. Yapılan çalışmalar titanyumun enfeksiyon oranlarının daha düşük olduğunu ve aynı zamanda biyo-uyumluluğunun da daha yüksek olduğunu göstermiştir (128). Bizim bu tezi oluşturan in vivo deneysel çalışmalarımızda ise vertebra yerine, manuplasyonu daha kolay olan ve histolojik yapı olarak vertebra ile aynı yapıda olduğu bilinen iliak kemik kullanılmıştır. Bakteri olarak ise slime faktör üretebilme kapasitesinde olan

Staf.aureus seçilmiştir. Staf aureus seçilmesinin sebebi, bu bakterinin özellikle kemik enfeksiyonlarında ön plana çıkması ve kendi kliniğimizde de enstrümantasyonlu vertebra cerrahisi sonrasında en sık görülen enfeksiyon ajanı olmasıdır. Seçilen suşun slime faktör üretebilen bir suş olmasının sebebi ise çalışmanın daha sonraki aşamalarında gümüş kaplı implantların biyofilm oluşumunu engelleyip engellemediğinin incelemesinin planlanmasındandır.

Literatüre bakıldığında bugüne kadar Lucke ve arkadaşlarının sıçan tibia kemiğinde yapmış oldukları enfeksiyon modeli dışında diğer araştırmacıların akut osteomyelit oluşturabilmek için 10^4 - 10^9 CFU miktarlarında bakteri ektikleri görülmektedir (3, 129-132). Lucke ve arkadaşları (133) çalışmalarında $10^2/10$ µl CFU bakteri miktarı ile enfeksiyonun oluştuğunu belirtmişlerdir. Poelstra ve arkadaşları (17) ise tavşan omurgasında MRSA ile yapmış oldukları implant ilişkili enfeksiyon modelinde en uygun bakteri sayısını 10^3 olarak belirtmişler, 10^2 bakteri ekimi yaptıkları gruptaki bazı kemik örneklerinde üremenin olmadığını göstermişlerdir. Araştırmacılar aynı zamanda 10^6 sayıda bakteri ektikleri gruplarda da pürülan akıntının olduğunu ve yer yer abse formasyonuna dönüştüğünü ifade ederek 10^6 sayısının da fazla olduğunu yazmışlardır. Ancak bu çalışmada hayvanlar bir hafta sonra sakrifiye edilmiş, sadece mikrobiyolojik değerlendirme yapılmış, patolojik inceleme yapılmamıştır. Bizim çalışmamızda 1×10^6 CFU / ml'lik stok solüsyon kullanılmıştır. Bu solüsyondan 100 µl alınmış ve bu şekilde her bir vida için 10^5 CFU bakteri kullanılmıştır.

Gümüş metali, antibakteriyel etkilerinden dolayı çok uzun yıllardır kullanılmaktadır. Yanıklarda ve konjonktivitte gümüş sülfat, gümüş nitrat ve gümüş sülfadiazin şeklinde topikal kullanımı çok iyi bilinen örneklerdir. Son 10 yılda, çeşitli firmalar tarafından bası yaralarının tedavisi için gümüş içeren pansuman malzemeleri ya da tekstil ürünleri üretilmiş ve kullanıma sunulmuştur. İlk çalışmamızda kullandığımız Silverlon™ (Argentum Medical Co. USA) da yine böyle bir malzemedir. Yoğun bakım hastalarında kullanılan plastik trakeostomi kanüllerinin bir süre sonra gümüş kanülle (aslında bakır üzerine gümüş kaplama şeklinde hazırlanmaktadırlar) değiştirildiğini, değiştirilmek zorunda olduğunu biliriz ancak çok azımız bu kanülün neden çelik ya da bakır değil de gümüş olduğunu

sorgulamışızdır. Sorunun cevabı gümüşün antimikrobiyal özellik göstermesidir. Bu kanülün yapıldığı malzeme saf gümüş değildir çünkü bu durumda maliyeti yüksek olacaktır. Çelik değildir çünkü çelik antimikrobiyal değildir, bakır değildir çünkü bakır antibakteriyeldir ancak inert değildir, doku reaksiyonu yapar. Bu durumda bakırı gümüşle kaplamak tüm sorunlara çözüm olmuştur. Görüldüğü gibi, sadece yoğun bakımlarda rutin kullanılan gümüş kaplı trakeostomi kanüllerine dahi dikkat edilip üzerinde düşünülse, titanyum vertebra implantlarının gümüşle kaplanması hastaya ve hekime kazandıracakları görülebilirdi. Gümüş, bu antimikrobiyal etkisini, mikroorganizmanın DNA, RNA ve ATP sentezindeki pek çok enzimi bloke ederek gerçekleştirmektedir. Bilindiği gibi, bir biyofilm yapısının sağlamlığı da hidrolaz, liyaz, glikozidaz, esteraz gibi enzimlerin çalışmasına bağlıdır (134). Buradan yola çıkarak, gümüşün bu enzimleri de olumsuz yönde etkileyebileceği ve bu şekilde biyofilm yapısını engelleyebileceği düşünülebilir. Biyofilm yapısının, kabaca, EPS matriks içerisine gömülü iki katlı fungal yapı (hif-pseudo hif ve maya) içerisinde yerleşmiş bakteri topluluğu olduğu düşünülürse, hem antibakteriyel hem de antifungal olan gümüşün yine biyofilm tabakası oluşumunu engellemesi beklenebilir. Bu iki nokta, çalışmamızdaki beklentimizin temelini oluşturmaktaydı ve aldığımız sonuçlar, düşüncemizin doğru olduğunu gösterdi.

“Gümüş anot” terimi, bir akım kaynağının pozitif kutbuna bağlanmış saf gümüş elektrodu ifade etmek için kullanılmaktadır ve gerek anti bakteriyel ve gerekse de antifungal olduğuna dair çok sayıda çalışma mevcuttur (24-29). Biz de çalışmalarımıza gümüş anot uygulaması ile başladık ve literatürdeki sonuçlara benzer sonuçlar aldık (22, 23). Burada elektrik akımı, hücre zarının seçici geçirgenliğini bozarak ve ATP'nin hücre dışına kaçışına neden olarak gümüşün antibakteriyel etkisini artırmaktadır. Çalışmalarımız devam ettikçe, önce kaplama yöntemimizi değiştirdik. Başlangıçta kullandığımız yöntem (electroplating), istediğimiz kadar dayanıklı kaplamalar yapmamıza olanak sağlamıyordu. Kaplama yapılmış implantlar, tekrarlayan otoklavlama işlemlerinden sonra kararıyor, kaplamalarında yer yer dökülmeler ve çatlamlar oluyordu. Bu durum, kaplamadaki gümüşün dolaşıma karışması, arjiri yapma riski ve antibakteriyel özelliğinin azalması ile sonuçlanabilirdi. Bu nedenle çalışmamızın belli bir noktasından sonra kaplamaları sol-jel yöntemi ile yapmaya karar verdik ve ilk yöntemden tamamen vazgeçtik ancak

elektrik akımı kullanma konusunda hala ısrarcıydık. Sol-jel yöntemi ile yapılan kaplamaların elektrik akımı ile yapılan in vitro deneylerinde daha önceki çalışmalarımızın aksine inhibisyon zonu göremedik. Oysa, vidalarda üreme yoktu. Akım uygulaması da zon oluşumunu sağlayamamıştı. Bu durumun tek bir açıklaması olabilirdi: Sol-jel yöntemi elektrik akımı ile stimüle edilse bile içeriğindeki gümüşün serbestleşmesine izin vermiyor ancak içerdiği gümüş, implant yüzeyinde hala antibakteriyel etki gösteriyordu. İlk yöntemimizde, implant hem kendisini hem de yaklaşık 12-14 mm çapındaki bir daire içerisinde kalan komşu kemik dokusunu enfeksiyona karşı korumaktaydı. Yeni yöntemde ise implant sadece kendisini korumaktaydı, yani etki alanı bir miktar daralmıştı ancak hedef implant bağımlı enfeksiyonu engellemekse iki yöntem de bu amaca uygun görülüyordu. Üstelik bu yeni yöntemle kaplama kolaylıkla çizilip dökülmüyor, tekrarlayan otoklavlama işlemlerinden sonra kararmıyordu. Hepsinden daha ilgi çekici olanı ise, kaplamanın tamamen şeffaf olması ve plastik yüzeylerin bile kaplanabilmesiydi. Bu durum, operasyon sırasında cerraha kolaylık sağlayan çeşitli yazı, rakam ve renklerin kaybolmaması anlamına geliyordu. Dahası, bu yöntem sayesinde sadece metaller değil, PEEK, poliüretan ve polipropilen gibi diğer implant maddeleri de kaplanabilecekti. Sol-jel yöntemiyle yapılan kaplamalarda artık elektrik akımı uygulaması da gerekli değildi, implantın etki alanı bir miktar daralmış da olsa toksik açıdan güvenilirliği artmıştı.

Sol-jel yöntemiyle yapılan daha ileri çalışmalarda, kullanılacak solüsyonun gümüş konsantrasyonunun minimum değerinin % 2.5 olması gerektiği sonucuna varıldı. Bu çalışma, gereğinden fazla gümüş kullanılmasını engelleyerek, arjiri riskini minimuma indirmesi bakımından oldukça önemliydi. Bu çalışmadan sonraki tüm çalışmalarda hep aynı konsantrasyon (%2.5) kullanıldı.

Vücut sıvılarında ve dokularda gümüş tayini için kullanılan pek çok yöntem vardır. Nötron aktivasyon analizi (135, 136), lazer mikroprob yöntemi (139), alevli (138-141) ve alevsiz (141) atomizasyonun kullanıldığı atomik absorpsiyon spektrofotometresi bu yöntemlerden bazılarıdır. Biz, daha yeni ve daha hassas olduğu için atomik absorpsiyon spektrofotometresi ile çalışmayı uygun bulduk. Yaptığımız çalışmada, cihazın kalibrasyonu mümkün olan en alt seviye olan 0,125

$\mu\text{g/L}$ 'a ayarlandı (dokular için bu seviye $0,125 \mu\text{g/kg}$ olarak alındı). Bu kalibrasyonun anlamı, cihazın bu değerin altındaki gümüş miktarını algılayamayacağı idi. Bu değer, literatürde toksik etkiye neden olmayan en yüksek gümüş değeri olan $5 \mu\text{g/L}$ 'nin $1/40$ 'ına eşitti ve çalışma için yeterli güvenlik aralığında olduğu düşünüldü. Çeşitli konsantrasyonlarda gümüş içeren kalibrasyon standartlarını doğru okuduğunu saptayarak kalibrasyonunu sağladığımız cihaz, gümüş kaplı vida kullanılan grupta $0,125 \mu\text{g/L}$ 'nin üzerinde her hangi bir değer saptayamadı. Aynı çalışmada, hiçbir doku örneğinde de kalibrasyonun alt sınırından daha yüksek bir değere rastlanılmadı. Hem spektrofotometrik çalışma, hem ışık mikroskop çalışması, hem de elektron mikroskop çalışmasında gümüş birikimine dair bir bulguya rastlanılmaması, sistemin son derece güvenli olduğu şeklinde yorumlandı. Üstelik gümüş kaplama sistemi, biyofilm oluşumunu da engellemiş görünüyordu. Özetlemek gerekirse, yeni geliştirilen “sol-jel yöntemiyle nanopartiküler gümüş iyonu kaplanmış titanyum implantlar” hem anti bakteriyel, hem non toksik, hem gümüş salınımına izin vermeyen hem de biyofilm oluşumunu engelleyerek implant bağımlı enfeksiyonların gelişmesini engelleyen sistemler olarak öne çıkmaktaydı. Üstelik kaplamalar, biyomekanik olarak da sıyrılmaya karşı dayanıklı idi.

Etik kurul onayı alındıktan sonra başlatılan ve 50 hastayla sınırlı tutulan klinik çalışmada hastalar 12 ay boyunca belirli aralıklarla, tam kan sayımı ve karaciğer ve böbrek fonksiyon testleri ile takip edildi. Bu çalışmada hastalar özellikle enfeksiyon riski yüksek olan gruptan seçildi. BOS gelişti olan hastalar ve daha önceden enfeksiyon öyküsü nedeniyle implantı çıkartılan hastalar da dahil olmak üzere hiçbir hastada post op implant enfeksiyonu gelişmedi. Bu sistem, cerrahi sahada enfeksiyon gelişimine karşı değil, implant bağımlı enfeksiyon gelişimine karşı geliştirilmiş bir sistemdir. Yani sistem, yumuşak dokuda ya da cilt altında operasyon sonrası enfeksiyon gelişmeyeceğini değil, enfeksiyon gelişse dahi bu enfeksiyonun implantı etkilemeyeceğini savunmaktadır. İmplant kendisini enfeksiyona ve dolayısıyla biyofilm oluşumuna karşı koruyacak, sonuçta çıkartılması gerekmeyecek ve hasta 2. defa opere olmak zorunda kalmayacaktır. Bilindiği gibi, implant bağımlı enfeksiyonlar, hastanede yatış süresini ve tedavi maliyetini kat kat

artırmaktadır. Bu sistemin bir başka avantajı da bu tür sorunları ortadan kaldıracak olmasıdır.

Çalışmanın ortaya koyduğu tüm umut verici sonuçlara rağmen, bu çalışmanın da, yapılan her “ilk çalışma” gibi, çok merkezli tekrarlara ve daha fazla hasta ile çalışılmaya gereksinimi vardır.

6. ÖZET

Gümüş Anot Uygulaması ve Gümüş Kaplı Anti Bakteriyel Vertebra İmplantları

Posterior lomber stabilizasyon endikasyonu olan, ASA I-II ve 25-80 yaş arasındaki 50 hasta çalışmaya dahil edildi. Hastaların pek çoğu, implant bağımlı enfeksiyon gelişimi açısından yüksek risk grubundan seçildi. Gümüşün bazal seviyesini belirlemek için tüm hastalardan operasyon öncesi dönemde 5 cc kan ve 5 cc idrar örneği alındı. Gelişmesi muhtemel enfeksiyonun takibi ve tespiti amacı ile eritrosit sedimentasyon hızı (ESR) ve CRP örnekleri alınarak laboratuara gönderildi. Titanyum alaşımdan yapılan ve üzeri sol-gel yöntemi ile nanopartiküler gümüş iyonu ile kaplanan “transpediküler vida – rod sistemi” kullanılarak gereken stabilizasyon operasyonu gerçekleştirildi. Her hastadan post op 10. gün, post op 1. ay, post op 3. ay, post op 6. ay ve post op 12. ayda kan ve idrarda gümüş konsantrasyonu tayini için 5 cc kan ve 5 cc idrar alınarak laboratuara gönderildi. Ayrıca her hastadan kan ve idrarda gümüş tayini için örnek alınan tarihlerde, tam kan sayımı, kan biyokimyası, ESR ve CRP bakıldı. Hastaların serum ve idrar örneklerinin atomik absorpsiyon spektrofotometresinde gümüş konsantrasyonları belirlendi. Çalışılan tüm numunelerde gümüş miktarı 0,005 absorbans’da $< 0,125$ mikrogram/L olarak belirlendi. Operasyon öncesi alınan örneklerle operasyondan sonraki dönemlerde alınan örnekler arasında fark saptanmadı. Ölçülen tüm değerler, 5 mikrogram/L’nin altında olduğu için güvenli kabul edildi. Tüm hastalarda, post op ilk 3 ay süren ve operasyona sekonder olduğu bilinen reaktif trombosit yüksekliği ve bazı hastalarda ilk ay sonunda normale dönen ılımlı beyaz küre yüksekliği saptandı. Çalışmaya dahil edilen hiçbir hastada, operasyon öncesi döneme kıyasla böbrek ve karaciğer fonksiyonlarında bozulma olmadı. ESR ve CRP değerlerinde ise beklenildiği üzere post op dönemde ani artış oldu ancak ilk 1 aylık sürede tüm hastalarda bu değerler normale döndü. Çalışmaya dahil edilen hiçbir hastada klinik ve laboratuvar olarak enfeksiyon bulgusuna rastlanılmadı. Tüm hastalar ortalama 5 gün içerisinde taburcu edildi. Retrospektif olarak son 5 yılın ortalaması alındığında lomber stabilizasyon operasyonlarında kliniğimize ait enfeksiyon oranımız % 3 olarak belirlendi. Bu yeni uygulama ile bu oran % 0’a düşürüldü.

Anahtar Kelimeler: Gümüş, gümüş anot, biyofilm formasyonu,

7. SUMMARY

Silver Anode Application and Silver Coated Antibacterial Vertebral Implants

Fifty patients who have indication of posterior lumbar stabilization, ASA grade I-II and ages ranged 25 to 80 were accepted for the current study. Most of the patients were in high risk of infection. For the purpose of detecting basal silver levels both in blood and in urine, 5 cc blood and 5 cc urine were taken from all patients preoperatively. For the purpose of detecting and following of any infectious process, blood samples for ESR and CRP were taken from all patients preoperatively. Stabilization operations were done by the use of nanoparticulate silver ion coated transpedicular screw-rod systems which were coated by sol-gel method. Five ml of both blood and urine samples were taken from all patients for detecting the any high levels of silver in urine and blood postoperative 10th day, 1st month, 3rd month, 6th month and 12th month. On the other hand, at the dates of urine and blood samples were taken for silver level detecting, additional blood samples were taken for biochemistry, whole blood count, ESR and CRP for the purpose of detecting any alteration in bone marrow functions, liver and kidney functions and detecting any infectious process. Silver levels were evaluated in all blood and urine samples by the use of atomic absorption spectrophotometer. Silver levels were lower than 0.125 microgram/L, at 0.005 absorbance in all samples. No difference were detected in samples between both preoperatively and 1 year later taken. Results were counted as safe, because the result were lower than 5 microgram/L. Reactive high levels of platelet count were detected first 3 months and white blood levels for 1 month. No alteration in liver, kidney and bone marrow functions were detected in any of the patients. CRP and ESR were found elevated post operatively as expected but all results turned in to normal ranges after 1 month. No infection signs were developed neither clinically nor laboratory. Patients were discharged after 5th days of operation. Post operative Infection rates of our clinic were evaluated retrospectively and found to be 3 % for the last 5 years, after lumbar stabilization procedures. With the use of this new system, the same rate was decreased to 0 %.

Key Word: Silver, silver anode, biofilm formation

7. KAYNAKLAR

- 1- Levi ADO, Dickman CA, Sonntag VKH. Management of postoperatif infections after spinal instrumentation. J Neurosurg. 1997; 86:975-980.
- 2- Paramore CG, Sonntag VKH. Advances in spinal instrumentation. Jpn J Neurosurg. 1995; 4: 111-120.
- 3- Rissing JP, Buxton TB, Weinstein RS, Shockley RK. Model of experimental chronic osteomyelitis in rats. Infect Immun 1985;47:581-586.
- 4- Gepstein R, Eismont FJ. Postoperative spine infections, in Garfin SR (ed): Complication of Spine Surgery, Baltimore: Williams&Wilkins 1989; pp302-322
- 5- Horwitz NH, Curtin JA. Prophylactic antibiotics and wound infections following laminectomy for lumbar disc herniation.A retrospective study. J Neurosurgery 1975; 43: 727-731.
- 6- Abbey DM, Turner DM, Warson JS, et al. Treatment of postoperative wound infections following spinal fusion with instrumentation. J Spinal Disord 1995; 8:278-283
- 7- Lonstein JE. Management of post-operative spine infections, in Gustillo RB(ed): Current concepts in the management of musculoskeletal infections. Philadelphia; WB Saunders 1989; pp 243-249
- 8- Sheridan RL, Tompkins RG, Burke JF. Prophylactic antibiotics and their role in the prevention of surgical wound infection. Adv Surg. 1994; 27:43-65
- 9- Gristina AG, Naylor P, Myrvik Q. Infection from biomaterials and implants: A race for the surface. Med Prog Technol. 1998; 14:205-24

- 10- Bachmann SP, VandeWalle K, Ramage G, Patterson TF, Wickes BL, Graybill JR, Lopez-Ribot JL. In vitro activity of caspofungin against *Candida albicans* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46:3591-6.
- 11- Douglas LJ. *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends Microbiol.* 2003;11:30-6.
- 12- Baillie GS, Douglas LJ. Effect of growth rate on resistance of *Candida albicans* biofilms to antifungal agents. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998; 42:1900-5.
- 13- Gristina AG, Costerton JW. Bacterial adherence to biomaterials and tissue; the significance of its role in clinical sepsis. *J Bone Joint Surg (Am)* 1985; 67-A: 264-73.
- 14- Gristina AG, Costerton JW. Bacterial adherence and the glycocalyx and their role in musculoskeletal infection. *Ort Clin North Am.* 1984; 15:517-35
- 15- Griffith HJ. Orthopedic complications. *Radiol Clin North Am.* 1995; 33:401-10
- 16- Schwab FJ, Nazarian DG, Mahmud F, Michelsen CB. Effects of spinal instrumentation on fusion of the lumbosacral spine. *Spine* 1995; 20: 2023-8
- 17- Poelstra KA, Barekzi AN, Grainger DW, Gristina AG, Schuller TC. A novel spinal implant infection model in rabbits. *Spine* 2000; 25:406-410
- 18- Arens S, Schlegel U, Printzen G, Ziegler WJ, Perren SM, Hansis M. Influence of materials for fixation implants on local infection. *J Bone Joint Surg(Br)* 1996; 78:647-51
- 19- Berman E. *Toxic Metals and Their Analysis.* London: Heyden and Sons; 1980. p. 121–145.
- 20- Hill WR and Pilsbury DM. *Argyria: The Pharmacology of Silver,* The Williams and Wilkens Company, Baltimore, MD, 1939.
- 21- Wigley JEM, Deville PM. *Proc. Roy. Soc. Med.,* 1944; 37, 648.

- 22- Secinti KD, Ayten M, Kahilogulları G, et al. Antibacterial effects of electrically activated vertebral implants. *Journal of Clinical Neuroscience* 2008; 15: 434-9
- 23- Secinti KD, Ozgural O, Tuna H, Attar A. Antibacterial and Antifungal Effects of Weak Direct Current and Silver Ions. *Turkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi* 2009;29(3);577-83.
- 24- Aydın M, Koksall F, Gunay I, et al. The effect of antibacterial silver electrodes and the nature of ion emission in the outer side of inhibition zone. *Ann Med Sci* 1994;5:52-7.
- 25- Aydın M, Gunay I, Pelit A, et al. Deposition profile of antibacterial anodic silver in root canal systems of teeth. *J Biomed Mater Res* 1997;38:49-54.
- 26- Spadaro JA. Silver anode inhibition of bacteria. *Proceedings of the First International Conference on Gold and Silver in Medicine*, Bethesda, MD, May 1987;13-14.
- 27- Berger TJ, Spadaro JA, Chapin SE, et al. Electrically generated silver ions: quantitative effects on bacterial and mammalian cells. *Antimicrob Agents Chemother* 1976;9:357-8.
- 28- Aydın M, Serin MS, Pelit A, Günay I. Silver anode induced phenotypical changes in bacteria. *Ann Med Sci* 1997;6:83-7.
- 29- Chowlishaw J, Spadaro J.A, Becker R.O; Inhibition of enzyme Induction in *E. Coli*. *Electromagnetic Biology and Medicine*. 1982;3(1):295-304.
- 30- Sonntag VKH. History of spinal disorders. In: Menezes AH and Sonntag VKH (ed.s): *Principles of spinal surgery*. McGraw-Hill, New York 1996, pp 3-23
- 31- Hadra BE. Wiring the spinous processes in Pott's disease. *Trans Am Orthop Assoc*. 1891; 4: 206-210

- 32- Albee FH. Transplantation of a portion of the tibia in to the spine for Pott's disease. JAMA 1911; 57: 885-886
- 33- Hibbs RA. An operation for progressive spinal deformities. NY Med J. 1911; 93: 1013-1016
- 34- Wiltse LL. The history of spinal disorders. Frymoyer JW.(ed): The adult spine. Principles and practice. Lippincott-Raven, Philadelphia. 1997; pp 3-40
- 35- Harrington PR. Treatment of scoliosis. J. Bone and Joint Surgery. 1962; 44A: 591-610
- 36- Knoth H, Larrick RB. Distraction fusion of the lumbar spine. Ohio State Med. 1964 12:1140-1142
- 37- Pott P. Remarks on that kind of palsy of the lower limbs which is frequently found to accompany a curvature of the spine. J Johnson. 1779, London
- 38- Antunes JL: Infection of the spine. Acta Neurochir. 1992; 116: 179-186
- 39- Patzakis MJ, Rao S, Wilkins J, Moore T, Harvey PJ. Analysis of 61 cases of vertebral osteomyelitis. Clin Orthop Relat Res. 1991; 264: 178-183
- 40- Keller RB, Pappas AM. Infection after spinal fusion using internal fixation instrumentation. Orthop Clin North Am. 1972; 3:99-111
- 41- Carragee EJ. Instrumentation of the infected and unstable spine: a review of 17 cases from the thoracic and lumbar spine with pyogenic infections. J Spinal Disord. 1997 Aug; 10 (4): 317-24
- 42- Carrangee EJ: Pyogenic vertebral osteomyelitis. J Bone and Joint Surg. 1997; 79A: 874-880
- 43- Belzenegui JL, DelVal N, Intxausti JJ, et al. Vertebral osteomyelitis in northern Spain. Report of 62 cases. Clin Exp Rheumatol. 1999; 17:447-452

- 44- Krogsgaard MR, Wagn P, Benstsson J. Epidemiology of acute vertebral osteomyelitis in Denmark: 137 cases in national patient register 1991-1993. *Acta Orthop Scand.* 1998; 69:513-517
- 45- Andrenshak TG, An HS, Hall J, Stein B. Lumbar spine surgery in the obese patient. *J Spinal Disord.* 1997; 10:376-9 35-6
- 46- Theiss SM, Lonstein JE, Winter RB. Wound infections in reconstructive spine surgery. *Orthop Clin North Am.* 1996; 27:105-10
- 47- Lonstein J, Winter R, Moe JE, Gaines D. Wound infection with Harrington instrumentation and spine fusion for scoliosis. *Clin Orthop.* 1973; 96: 222-33
- 48- Kostuik JP, Israel J, Hall JE. Scoliosis surgery in adults. *Clin Orthop.* 1973; 93:225-234
- 49- Louis R. Fusion of the lumbar and sacral spine by internal fixation. *Clin Orthop.* 1989; 203: 28-33
- 50- Roy-Camille R, Saillant G, Mazel C. Internal fixation of the lumbar spine with pedicle screw plating. *Clin Orthop.* 1986; 203:7-17
- 51- White AH, Zucherman JF, Hsu K. Lumbosacral fusions with Harrington rods and intersegmental wiring. *Clin Orthop.* 1986 Feb; 185-190
- 52- Dougherty SH, Simmons RL: Infections in bionic man: The pathobiology of infections in prosthetic devices- Part I. *Curr. Prob. Surg.* 1982; 19: 221-264
- 53- Dougherty SH, Simmons RL. Infections in bionic man: The pathobiology of infections in prosthetic devices- Part II. *Curr. Prob. Surg.* 1982; 19: 269-318
- 54- Ofluoğlu E. Sıçan omurgasında implant ilişkili enfeksiyon modeli (Uzmanlık Tezi). Bakırköy Prof. Dr. Mazhar Osman Ruh Sağlığı ve Sinir Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi III. Nöroşirurji Kliniği, İstanbul, 2004.
- 55- Albrektsson T, İbid. 1985; 1, 53

- 56- Gristina AG, Hobgood CD, Barth E. in Pathogenesis and clinical significance of coagulase-negative staphylococci, Pulverer G, Quie PG, Peters G, Eds. (Fischer Verlag, Stuttgart) 1987; pp 143-157
- 57- Kasemo B, Lausmaa J. CRC Crit.Rev.Biocompat. 1986; 2, 335
- 58- Gristina AG. Biomaterials centered infection. Microbial adhesion versus tissue integration. Science 1987; 237:1588-95
- 59- Christensen GD, Simpson WA, Beachey EH. in Bacterial Adhesion: Mechanisms and Physiological Significance. Savage DC, Fletcher MM. Eds. (Plenum, Newyork) 1985; pp 279-305
- 60- Gristina AG, Costerton JW. Bacteria-Laden Biofilms: A hazard to orthopedic prosthesis. Infect. Surg. 1984; 3: 655-662 32. Gristina AG, Kolkin J. Current concepts review. Total joint replasment and sepsis. J Bone And Joint Surg. 1983; 65-A: 128-134
- 61- Gristina AG, Costerton JW, Leake E, Kolkin J, Jon and Wright MJ. Bacteria and their relationship to biomaterials. Orthop Trans. 1981; 5: 332
- 62- Potera C. Forging a link between biofilms and disease. Science. 1999;283:1837-9.
- 63- Jansen B, Schumacher-Perdreau F, Peters G, Pulverer G. New aspects in the pathogenesis and prevention of polymer-associated foreign-body infections caused by coagulase-negative staphylococci. J Invest Surg. 1989; 2:361-80.
- 64- Kocazeybek B, Çakan H, Ayyıldız A, Küçükateş E, Gülsoy Ö, Ordu A. Cerrahi yoğun bakım ünitesinden izole edilen koagülaz negatif stafilokoklarda slime faktörü oluşturma ve bunların kemoterapötiklere dirençle ilişkisinin araştırılması. Ankem Derg. 200; 4:683-9.
- 65- Kalkancı A, Çırak Yalınay M, Mansuroğlu H, Kuştimur S. Candida türlerinde slime faktör belirlenmesi. Türk Mikrobiyol Cem Derg. 1999; 29:183-5.

- 66- Orhon H, Özbakkaloğlu B, Sürücüoğlu S, Tünger Ö, Arısoy AS. İnfeksiyon etkeni olan *Candida albicans* suşlarında slime üretimi ve antifungal ajanlara duyarlılıkları. *Türk Mikrobiyol Cem Derg.* 1998;28:103-6.
- 67- Karaca N, Koç AN, Karagöz S. Kan ve vajen örneklerinden izole edilen *Candida* türlerinin slime aktiviteleri. *Türk Mikrobiyol Cem Derg.* 2001;31:224-6.
- 68- Allison DG. 2003. The biofilm matrix. *Biofouling*, 19 (2): 139-150.
- 69- Kives J, Orgaz B, SanJos'e C. 2006. Polysaccharide differences between planktonic and biofilm-associated EPS from *Pseudomonas fluorescens* B52. *Colloids Surfaces B*, 52: 123–127
- 70- Hussain M, Wilcox MH, White PJ. 1993. The slime of coagulase negative *Staphylococci*: biochemistry and relation to adherence. *FEMS Microbiol.* 10: 191-207.
- 71- Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. 1995. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol.* 49: 711-745.
- 72- Lasa I, Penadés JR. 2006. Bap: A family of surface proteins involved in biofilm formation. *Res Microbiol* 157: 99–107.
- 73- Kolter R, Tormo A. 1993. The stationary phase of the bacterial life cycle. *Annu. Rev. Microbiol.* 47: 855 – 874.
- 74- O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R. 2000. Biofilm formation as microbial development. *Annu. Rev. Microbiol.* 54: 49-79.
- 75- Kumar CG, Anand SK. 1998. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *Int J Food Microbiol*, 42: 9–27.
- 76- Mafu AS, Roy D, Goulet J. 1990. Magny P. Attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel, glass, polypropylene and rubber surfaces after short contact times. *J Food Prot* 53: 742 - 746.

- 77- Rogers J, Dowsett AB, Dennis PJ, Lee JV, Keevil CW. 1994. Influence of plumbing materials on biofilm formation and growth of *Legionella pneumophila* in potable water systems. *Appl Environ Microbiol* 60:1842-1851.
- 78- D'Ambrosia RD, Hiromu S, Heater R. Secondarily infected total joint replacement by hematogenous spread. *J Bone and Joint Surg.* 1976; 58-A: 450-453.
- 79- Gristina AG, Costerton JW, Leake E, Kolkin J. Bacterial colonization of biomaterials: Clinical and laboratory studies. *Orthop Trans.* 1980; 4: 355.
- 80- Prince A, Neu HC. Microbiology of infections of the prosthetic joint. *Orthop Rev.* 1979; 8: 91-96.
- 81- Stinchfield FE, Bigliani LU, Neu HC, Goss TP, Foster CR. Late hematogenous infection of total joint replacement. *J Bone and Joint Surg.* 1980; 62-A: 1345-1350.
- 82- Bandyk DF, Berni GA, Theile BL, Townw JB. Aorto-femoral graft infection due to *Staf. Epidermitis*. *Arch. Surg.* 1984; 119: 102-108.
- 83- Christensen GD, Simpson WA, Bisno AL, Beachey EH. Adherence of slime-producing strains of *Staf. Epidermitis* to smooth surfaces. *Infect. and immun* 1982; 37: 318-32.
- 84- Lindsay D, Von Holy A.. Bacterial biofilms within the clinical setting: what healthcare professionals should know. *J Hosp Infect*, 2006; 1-13.
- 85- Sugarman B, Young EJ, Eds. Infections associated with prosthetic devices, 1984 (CRC Press, Boca Raton FL)
- 86- Ayres S. *Arch. Derm. Syph.* 1938; 38, 645.
- 87- Kehoe RA., Cholak J., Storey RV. *J.Nutr.* 1940; 19: 578.
- 88- Gettler AO., Rhoads CP., Weiss S. *Amer. J. Pathol.* 1927; 3: 631.

- 89- Gerlach Walter., Gerlach Werner. Virchow's Arch. Pathol. Anat. 1931; 28: 209.
- 90- Gaul LE. Staud AH. Arch. Derm. Symp. 1934; 30: 433.
- 91- Gaul LE. Staud AH. J. Amer. Med. Assoc. 1934; 104: 1387.
- 92- Blumberg H., Nelson CT. J. Amer. Med. Assoc. 1934; 103: 1521.
- 93- Norbert W. Tietz (Ed) Clinical Guide to laboratory tests. 3rd edition. W.B. Saunders Company Pennsylvania, 1995, pp:560.
- 94- Spadaro JA, Berger TJ, Barranco SD, Chapin SE, Becker RO: Antibacterial effects of silver electrodes with weak direct current. Antimic Agent Chem 1974 6:637-642.
- 95- Gentzkow GD: Electrical stimulation for dermal wound healing. Clin Res and Prac 1992; 4(6):13-17
- 96- Falcone AE, Spadaro JA: Inhibitory effects of electrically activated silver material on cutaneous wound bacteria. Plastic and Reconstructive Surgery, 1986 77:455-458.
- 97- Feedar JA, Luther CK, Gentzkow GD: Chronic dermal ulcer healing enhanced with monophasic pulsed electrical stimulation. Physical Therapy 1991 71:9-.
- 98- Reich JD, Cazzaniga AL, Mertz PM, Kerdel FA, Eaglstein WH: The effect of electrical stimulation on the number of mast cells in healing wounds. J Am ACAD Dermatol 1991 25:40-46.
- 99- Rowley BA, McKenna J, Chase G: The influence of electrical current on an infecting microorganism in wounds. Ann NY Acad Sci 1974 238:543-551
- 100- Bourguignon GJ, Bourguignon LYW: Electric stimulation of protein and DNA synthesis in human fibroblasts. FASEB 1987 1:398-402.

- 101- Yuen TGH, Agnew FW, Bullara LA, Jacques S, McCreery DB: Histological evaluation of neural damage from electrical stimulation: consideration for the selection of parameters for clinical application. *Neurosurgery* 1981 9:100-107.
- 102- Brighton CT, Robert MH: Ultrastructure of electrically induced osteogenesis in the rabbit medullary canal. *J Orthop Res* 1986 4:27-36.
- 103- Ceballos A, Pereda O, Ortega R, Balmaseda R: Electrically-induced osteogenesis in external fixation treatment. *Acta Orthopaedica Belgica* 1991 57-2:102-108.
- 104- Duellnad R, Spadaro JA, Rahn BA: Silver antibacterial bone Cement. *Clin Orthop* 1982 169:264-268.
- 105- Marino AA: Modern Bioelectricity. Electrical silver antiseptis Chapter 19, Marcel Dekker, Inc. 1988 New York and Basel
- 106- Berger TJ, Spadaro JA, Bierman R, Chapin SE, Becker RO: Antifungal properties of electrically generated metallic ions. *Antimic Agents and Chem* 1976 10:856-860.
- 107- Berger TJ, Spadaro JA, Chapin SE, Becker RO: Electrically generated silver ions: quantitative effects on bacterial and mammalian cells. *Antimic Agents and Chem* 1976 9:357-358.
- 108- Spadaro JA, Berger TJ, Chapin SE, Becker RO: Antitumor effects of silver electrodes in vitro. 3rd Annual Meeting of the society for biomaterials, 1977, NJ.
- 109- Davidovitch Z, Shanfeld JL, Montgomery PC, Lally E, Laster L, Furst L, Korostoff E: Biochemical mediators of the effects of mechanical forces and electric currents on mineralized tissues. *J Int Calcif Tissue* 1984 36:86-97.
- 110- Aydın M, Köksal F, Günay I, Serin MS, Polat S: The outzone effect of antibacterial silver electrodes and the nature of ion emission. *Ann Med Sci* 1996 5:5-9.

- 111- Modak SM, Fox CL: Binding of silver sulfadiazine to the cellular components of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem Pharm* 1990 22:2391-2404.
- 112- Aydın M. Diş Apselerinde ümüş Anot Uygulaması. Ç.Ü. Diş Hekimliği Fakültesi Mikrobiyoloji Yan Dal Bitirme Tezi. 1996, Adana.
- 113- Bragg PD, Rainnie DJ: The effect of silver ions on the respiratory chain of *Escherichia coli*. *Can Microbiol* 1974 20:883-889.
- 114- Eynard N, Sixou S, Duran N, Teissie J: Fast kinetics studies of *Escherichia coli* electrotransformation. *Eur J Biochem* 1992 209:431-436.
- 115- Scherer GW. Sintering of Sol-Gel Films. *Journal of Sol-Gel Science and Technology* 1997 8: 353–363.
- 116- Ramanathan S., Bhat R., Upadhyaya DD., Roy SK. Alumina ceramics by sol-gel technique *Bull. Mater. Sci.*, Vol. 17, No. 2, April 1994, pp. 95-103.
- 117- Lentès FT. Modelling of the Generation and the Stability of Ag Colloids. In *Thin Films on Glass*. Ed. Bach H, Krause D. Springer-Verlag, Hiedelberg, Berlin, Germany. 2003 pp:285-9.
- 118- Conover WJ. *Practical Nonparametric Statistics*. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons; 1980. p. 229–39.
- 119- Evcin A. Afyonkarahisar Kocatepe Üniversitesi Kaplama Teknikleri Ders Notları, 2006
- 120- Powell KT, Morgenthaler AW, Weaver JC. Tissue electroporation. *Biophys J. Biophysical Society* Volume 56.
- 121- Christensen, G. D., W. A. Simpson, A. L. Bisno, and E. H. Beachey. 1982. Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. *Infect. Immun.* 37: 318-326.

- 122- E.I. Hamilton, M.J. Minski and Cleary JJ. *Sci. Total Environ.* 1972-1973; 1-341.
- 123- Heggeness MH, Esses SI, Errico T, Yuan HA. Late infection of spinal instrumentation by hemotogenous seeding. *Spine*, 1995; 18;492-6.
- 124- Leone S, Molinaro A, Alfieri F, Cafaro V, Lanzetta R, Donato A, Parrilli M. The biofilm matrix of *Pseudomonas* sp. OX1 grown on phenol is mainly constituted by alginate oligosaccharides. *Carbohydr Res*, 2006; 41: 2456 – 2461.
- 125- Fujishige NA, Kapadia NN, Hirsch AM. A feeling for the microorganism: structure on a small scale. *Biofilms on plant roots. Bot J Linnean Soc*, 2006; 150 (1): 79- 88.
- 126- Poulsen LV. Microbial biofilm in food processing. *Lebensm. Wiss. u. Techn.*, 199; 32 (6): 321-326.
- 127- Çiftçi Z. Kronik tonsillitte biofilmin rolü, T.C. Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi KBB Kliniği (Uzmanlık Tezi). İstanbul, 2005.
- 128- Arens S, Schlegel U, Printzen G, Ziegler WJ, Perren SM, Hansis M. Influence of materials for fixation implants on local infection. *J Bone Joint Surg(Br)* 1996; 78:647-51.
- 129- Gerhart TN, Roux RD, Hanff PA, Horowitz GL, Renshaw AA, Hayes WC. Antibiotic loaded biodegradable bone cement for profilaxis and treatment of experimental osteomyelitis in rats. *J Orthop Res* 1993; 11: 250-255.
- 130- 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 Br* 1993; 75:111-114.

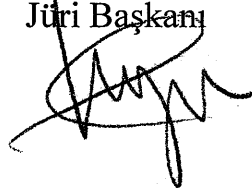
- 131- Littlewood EA, Hattenberger MR, Luscher C, Pataki A, Zak O, O'Reilly T. Local expression of tumor necrosis factor alpha in an experimental model of acute osteomyelitis in rats. *Infect Immun* 1997;65:3438-3443.
- 132- Solberg BD, Gutow AP, Baumgaertner MR. Efficacy of gentamycin-impregnated resorbable hydroxyapatite cement in treating osteomyelitis in rat model. *J Orthop Trauma* 1999; 13: 102-106.
- 133- Lucke M, Schmidmaier G, Sadoni S, Wildeman B, Schiller R, Stemberger A, Haas NP, Raschke M. A new model of implant-related osteomyelitis in rats: *J Biomed Mater Res Part B:Appl Biomater*. 2003; 67B:593-602.
- 134- Gün İ., Ekinçi FY. Biyofilmler: Yüzeylerdeki mikrobiyal yaşam. *GIDA* 2009; 34 (3): 165-173.
- 135- Nakarni RA., Ehmman WD., in *Trace Substances in Environmental Health. IV. Proc. 4th Annual Conference Trace Substances in Environmental Health. Columbia, MO, 1971.*
- 136- Cornelis R., Speecke A, Hoste J. *Anal. Chim. Acta*. 1973; 68: 1.
- 137- Marich KW., Carr WG., Treytl WJ., Glick D. *Anal. Chem*. 1970; 42; 1775..
- 138- Grabowski BF., Haney WG. *J. Pharm. Sci*. 1972; 61: 1488.
- 139- Rooney RC. *Analyst*. 1975; 100: 471.
- 140- Greig RA. *Anal. Chem*. 1975; 47: 1682.
- 141- Pickford CJ., Rossi G. *Atomic Abs. Newsletter*. 1975; 14: 78.

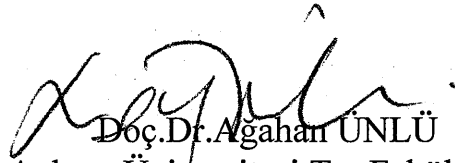
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Beyin ve Sinir Cerrahisi Anabilim / Bilim Dalı
Tıpta Uzmanlık eğitimi çerçevesinde yürütülmüş olan

" Gümüş Anot Uygulaması Ve Gümüş Kaplı Anti Bakteriyel Vertebra İmplantları" başlıklı, Dr.Kutsal Devrim Seçinti'ye ait bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **Tıpta Uzmanlık Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 18/03/2010

Prof.Dr.Nihat EGEMEN
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Beyin ve Sinir Cerrahisi Anabilim / Bilim Dalı Başkanı
Jüri Başkanı




Doç.Dr.Agahan ÜNLÜ
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Beyin ve Sinir Cerrahisi Anabilim/
Bilim Dalı

Üye

Doç.Dr.Ayhan ATTAR
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Beyin ve Sinir Cerrahisi Anabilim /
Bilim Dalı

Tez Danışmanı

