

**T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ACİL TIP
ANABİLİM DALI**

Tez Yöneticisi
Doç. Dr. Mustafa Burak SAYHAN

**KEMİK DEFEKTİ OLUŞTURULAN RATLARDA
CHITOSAN ACETATE'İN ERKEN KEMİK
İYİLEŞMESİ ÜZERİNE ETKİSİ**

(Uzmanlık Tezi)

Dr. Ebru GÜLER

EDİRNE -2013

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince edindiğim bilgi ve beceriyi kazanmamdaki yardım, sabır ve hoşgörülerini için, tez danışmanım ve Anabilim Dalı Başkanım Doç. Dr. Mustafa Burak SAYHAN'a, Prof. Dr. Mutasım SÜNGÜN'e ve Doç. Dr. Cemil KAVALCI'ya, tez çalışmalarım sırasında bana destek veren Yrd. Doç. Dr. Mert ÇİFTDEMİR ve Yrd. Doç. Dr. Nuray CAN'a teşekkür ederim. Bugünlere gelmemde büyük payı olan babam Halil GÜLER ve biricik annem Emine GÜLER'e, her türlü desteğini esirgemeyen ve bana her zaman güvenen abim Engin GÜLER'e ve ailesine teşekkürü borç bilirim. Son olarak manevi desteği ile beni yalnız bırakmayan Nihat SARIKAYA'ya çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER	3
KEMİK DOKUSUNUN GENEL ÖZELLİKLERİ	3
KIRIK TANIMI	7
KIRIK İYİLEŞMESİ	7
LOKAL KANAMA DURDURUCU AJANLAR	11
CHITOSAN	11
GEREÇ VE YÖNTEMLER	14
BULGULAR	21
TARTIŞMA	25
SONUÇLAR	28
ÖZET	30
SUMMARY	32
KAYNAKLAR	34
EKLER	

SİMGE VE KISALTMALAR

CAB : Chitosan Acetate Bandage

NaCl : Sodyum klorür

HE : Hemotoksilen-Eozin

GİRİŞ VE AMAÇ

Trafik kazaları, darp, yüksekten düşme, ateşli silah yaralanması, spor yaralanmaları ve iş kazaları ile oluşan kas iskelet sistemi yaralanmaları, sebep oldukları morbidite ve mortalite ile dünyanın pek çok yerinde toplumsal bir sağlık sorunu haline gelmiştir (1,2). Bu travmaların tamamına yakınında kemik kırıkları oluşmaktadır. Kırığı oluşturan zorlama damar, sinir, kırık uçları çevresindeki yumuşak doku veya organlara zarar verebilir (3). Bu da kırığa en kısa zamanda ve en etkin yolla müdahale etme gerekliliğini ortaya çıkarmaktadır.

Dıştan veya içten gelen zorlamalarla kemik ve ilgili yumuşak dokunun bütünlüğünün tam veya kısmen bozulmasına kırık denir (3-5). Kırık iyileşmesi yumuşak doku iyileşmesine oranla daha yavaş ilerler. Bu da tedavi sırasında oluşabilecek sorunları beraberinde getirmektedir. Kaynama gecikmesi veya kaynamamanın hastalarda yaptığı kronik, fonksiyonel ve fizyolojik bozukluk, artan hasta morbiditesi ve stres gibi sorunların yanında, neden olduğu ekonomik zararlar araştırmaları kırık iyileşmesine yöneltmiştir (3,6). Özellikle genç nüfusu etkilemesi iş gücü kaybı, sakatlık ve erken yaşta ölüme neden olabilmesi bakımından önemlidir (2,7,8). Hipokrat'ın eserlerinde de kırık ve yumuşak doku travmaları ve tedavileri ile ilgili bilgilere sıkça rastlanmaktadır (9). Kırık iyileşmesini hızlandırmada etkili, düşük maliyetli ve güvenilir ajanların geliştirilmesi hem hastanın günlük yaşantısına daha çabuk dönmesini sağlayacak hem de ekonomik bir tedavi seçeneği sunacaktır (3).

Kırık iyileşmesini etkileyen faktörler ile ilgili günümüze kadar birçok çalışma yapılmış ve bunların bir kısmı klinikte kullanım alanı bulmuştur (3,9,10).

Chitin yengeç, karides gibi kabuklu deniz canlılarının dış iskeletlerinde, kelebek kanatlarında, bazı bakteri ve mantarların hücre duvarlarında bulunan ve doğada selülozdan sonra ikinci sıklıkta bulunan biyopolimerdir (11). Chitin'in deasetilasyonu ile elde edilen,

reaktif fonksiyonel amino grupları sayesinde çeşitli fonksiyonlar kazanan Chitosan'ın tıp ve eczacılık alanlarında cerrahi sütür materyalleri, kontrollü ilaç salınımı, kontakt lens, yapay kan damarları olarak kullanımı araştırılmaktadır (12).

Son yıllarda, dokular üzerine hemostatik ve antimikrobiyal etkileri göz önünde bulundurularak bandaj formları üretilen ve insan vücuduna toksik olmadığı yapılan çalışmalarla gösterilen Chitosan klinik kullanımda yerini almıştır.

Kırık iyileşmesi bir çok disiplini ilgilendirdiğinden yapılan literatür taramasında bir çok çalışma görülmektedir. Literatürde Chitosan'ın doku rejenerasyonunda etkili olduğuna dair çalışmalar mevcuttur ancak kemik iyileşmesi üzerinde etkisini gösteren kısıtlı sayıda çalışma tespit edilmiştir. Biz bu çalışmamızda; kemik defekti oluşturulan ratlarda Chitosan Acetate Bandage'in (CAB) erken kemik iyileşmesi üzerine etkisini inceledik.

GENEL BİLGİLER

KEMİK DOKUSUNUN GENEL ÖZELLİKLERİ

Kemik canlıda dengeyi sağlayan, iyi kanlanması ve innervasyonu olan, ekstraselüler matriksin kalsiyum ve fosfat tuzlarıyla mineralleşmesini tamamladığı dayanıklı bir destek dokudur (13). Uygulanan strese göre değişebilen, uyum sağlayabilen dinamik bir yapıdır. Bütünleşmiş birçok hücreden oluşur, metabolik ve biyolojik olarak aktif bir dokudur. Vücudumuzun yapıtaşı olan temel iyon ve minerallerin vücutta konsantrasyonunun sağlanmasında önemli rol oynar. Yaşamsal organları destekleyen en sert dokulardan biridir. Beyni, göğüs ve batin içi organları korur. Kan yapımında ve rezervuarında görev alır (14,15). Kemik, değişen fonksiyonel ihtiyaçlara ve mekanik streslere adapte olup yapısını değiştirebilen bir dokudur. Kemik dokusu değişen vasküler, endokrin ve beslenme düzeylerine adapte olabilmektedir.

Kemik Oluşumu ve Gelişme

Kemiklerde gelişim ve büyüme embriyolojik dönemde başlar ve erişkin hayata kadar devam eder. Biyokimyasal, hormonal, hücrel ve patolojik olayların birbirini izlemesiyle gelişir. İki tip gelişme paterni gösterir:

İntramembranöz kemikleşme: Mezenkimal bağ dokusundan oluşan yeni kemik gelişimidir. Vücudumuzda yassı kemiklerde (kafatası, sternum gibi), yüz kemiklerinde (mandibulanın processus coronoideus ve simfizisi dışındaki bölgeler), kısa ve uzun kemiklerin kompakt kısımlarında bulunur (13). Doğumdan sonra, kemik defektlerinin yenilenmesi ve kırık iyileşmesi sırasında reaktif olur (16,17).

Enkondral kemikleşme: Hiyalin kıkırdak modelde, osteoprogenitor hücrelerin invazyonu sonrasında primer kemikleşme merkezi ortaya çıkar. Uzun kemiklerdeki epifiz sekonder kemikleşme merkezidir. Bu iki merkezin arasında büyümeyi sağlayan fizis bölgesi bulunur. Fiziste kondrosit gelişimi ve dönüşümü gerçekleşir. Üç alandan oluşur:

Rezerv alanı: İstirahattaki hücrelerin gelişimleri için gerekli ürünlerin depo yeridir.

Proliferatif alan: Hücre proliferasyonu ve matriks oluşumu alanıdır. Yüksek oksijen basıncı ve yüksek proteoglikan konsantrasyonu ile uzunlamasına büyüme gerçekleşir.

Hipertrofik alan: Olgunlaşma, dejenerasyon ve geçici kalsifikasyon alanlarından oluşur, hücreler boyut olarak büyür, içerdikleri kalsiyum miktarı artar, apoptoz gerçekleşir (13,18). Osteoblastların aktif olduğu bu bölgede düşük oksijen basıncı ve düşük proteoglikan düzeyi ile kıkırdak kalsifikasyonu gerçekleşir. Vücuttaki kemikleşmenin en önemli yöntemidir (16,19). Fizislerdeki büyüme sırasında ve kırık sonrasında oluşan sekonder iyileşme enkondral kemikleşme örnekleridir (17).

Periost kemik yüzeyinde bulunan osteoblastlar kemiklerin enine büyümesi ve kırık iyileşmesi sırasında apozisyonel kemikleşme gösterir ve lameller kemik oluşur.

Kemikler enkondral kemikleşmeyle boyuna büyüme gösterirken, intramembranöz kemikleşmeyle enine büyüme gösterir (16).

Kemik Histolojisi

Hücresel elemanlar ve matriks: Kemik iki kısımdan oluşur; hücreler ve matriks. Kemiğin hücresel elemanları; osteoblastlar, osteositler, osteoklastlar, mezenkimal osteoprogenitör hücreler, kemik iliği hücreleri ve kemiğin büyüme ile gelişimini düzenleyen immün sistem hücrelerinden oluşur (15,16).

Matriks ise, organik ve inorganik matriks olmak üzere incelenir. İnorganik matriks, kalsiyum hidroksiapatit ve osteokalsiyum fosfattan oluşur. Organik matriks, kollajen, proteoglikanlar, glikoproteinler, büyüme faktörleri, sitokinler, fosfolipidler ve fosfolipoproteinlerden oluşmaktadır. Kemiğin yapısal bütünlüğünü sağlayan matriksin üretilmesi ve yenilenmesi kemiğin hücresel elemanları tarafından sağlanır (20).

Osteoprogenitör hücrelerin kaynağı mezenkimal kök hücrelerdir. Mitozla büyüeyebilen ve osteoblastlara farklılaşabilme özelliğindeki bu hücreler kemik yapımı için önemlidir (16). Kemik büyümesi ve kırık iyileşmesi durumlarında aktifleşerek osteoblastlara farklılaşırlar. Periostun derin tabakasında ve Havers kanallarında bulunurlar.

Osteoblastlar, matür hücrelerdir. Tip 1 kollajen ve kemik organik matriks yapımında görevlidir. Sinyal proteinlerini salgılayarak kemik gelişimini hormonal olarak yönetirler (13,21).

Osteositler, lakünalar içine yerleşmiş matrikste yer alan matür hücrelerdir. Kemik dokusunun beslenmesinden sorumludur. Kalsiyum ve fosfor konsantrasyonunun düzenlenmesinde önemlidir (13,21).

Osteoklastlar, monosit öncülerinden oluşan çok çekirdekli dev hücrelerdir. Kollajenaz, asit fosfataz ve diğer proteolitik enzimleri içerirler. Kemik yüzeyine bu enzimleri salgılayarak kemiğin erimesini sağlarlar. Bu bölgelerde oluşan çukurluklara Howship lakünleri denir. Kemik yapımı, şekillenmesi ve rezorbsiyonunda aktif rol oynarlar (13,16,20,21).

Paratiroid hormon, osteositleri inhibe ederken osteoklastları uyarır. Kalsitonin ise tam zıt etkiye sahiptir (15,16).

Kemik zarları: Kemik dış ve iç yüzeylerini örten periosteum ve endosteum adlı zarlarla çevrilidir. Periosteum, eklem yüzleri hariç tüm kemiği saran vasküler konnektif bağ dokusu tabakasıdır. Kemiğin beslenmesini, tamirini, gelişimini ve desteğini sağlamada önemlidir. Yapısında temel olarak kollajen ve elastik lifler vardır ve ligaman, tendon ve eklem kapsüllerinin yapışmasına olanak verir (16). Periosteum kanlanması iyi, iki tabakalı bir zardır. Dış tabaka kalındır; düzensiz yoğun bağ dokudan oluşan bu tabaka fibröz tabaka olarak adlandırılır. Metabolizma için gerekli olan damarları ve lenfatikleri içerir. Buradan uzanan kollajen fibriller periostu kemiğe bağlar ve bu fibrillere Sharpey fibrilleri denir. Daha ince ve zayıf iç tabaka ise; hücreden zengin, osteojenik tabaka, cambium olarak bilinen, gevşek bağ dokusundan oluşan tabakadır. Bu hücreler pluripotent hücre özelliğinde olup kırık iyileşmesinde ve kemiğin enine büyümesinde önemlidir (13). Endosteum tabakası kemik içindeki bütün kaviteleri kaplayan ve tek katlı osteojenik hücreden oluşan ince bir tabakadır. Osteojenik özelliği olmasının yanında hematopoetik hücre yapabilme özelliği de vardır. Kemiği saran bu zarlar kemiğin beslenmesi, büyümesi ve onarımı için gerekli olan osteoblast yapımında görevlidir.

Kemik kan akımı: Kemik, vücutta dakika kan akımının yaklaşık %5-10'unu alır. İyi kanlanma kırık iyileşmesinde kesinlikle gereklidir. Anjiogenezi azaltan maddeler kaynamayı olumsuz etkilerken, kan akımını artıran maddeler kırık iyileşmesini hızlandırır (5,22).

Kemiğin beslenmesi üç yolla olur:

1- Metafizo-epifiziel sistem

- 2- Periosteal sistem
- 3- Besleyici arter sistemi

Kemiğin Yapısı

Kemik dokusu makroskopik olarak kortikal (kompakt) ve spongioz (trabeküler) kemik olarak iki gruba ayrılır:

Kortikal (kompakt) kemik: İskeletin % 80'ini oluşturur. İyi bir şekilde organize olmuş merkezinde Havers kanalının seyrettiği Havers sistemlerinden (osteon) oluşur. Bu sistem arteriol, venül, kapiller, sinir ve lenfatik kanalı içerir. Havers kanalları birbirleri ile Volkman kanalları aracılığıyla ilişki halindedir. Volkman kanalları periosteumdan endosteuma kadar uzanır. Havers sistemlerinin bir parçası olan dairesel kemik kanalları arasında lakünalar bulunur ve bu lakünalar ışınal tarzda her yönde seyreden kanaliküller içerir. Tüm bu bağlantılar kemik hücresinin beslenmesi için şarttır. Kortikal kemikteki hücre döngüsü yavaştır ve osteoblast ve osteoklastların aktif olduğu osteonun uç kısmında meydana gelir (14,15).

Spongioz (trabeküler) kemik: Kompakt kemiğe göre yoğunluğu daha azdır ancak daha yüksek remodelizasyon hızına sahiptir. Trabeküller arasında bulunan küçük boşluklarda da kemik iliği bulunur. Havers ve Volkman kanalları bulunmayan bu kemik endosteumdan beslenir. Trabeküler kemik uzun kemiklerin uçlarında ve vertebralarda bulunur. Trabeküler kemik plaklar halinde birbiri ile bağlantılı olduğundan, yüksek metabolik aktivite göstermesi yanında, kemiğe yansıyan çeşitli basınç yüklerine karşı kemiğin dayanma gücünü arttırması nedeniyle önemlidir (15). Kemik üzerindeki yük ve strese göre remodelizasyon ve şekil değişiklikleri meydana gelmektedir (Wolff yasası) (18,23).

Kemikler mikroskopik yapılarına göre immatür (woven) ve matür (lamellar) kemik olarak iki guruba ayrılır:

Primer (woven) kemik: Yüksek hücre döngüsü ve içeriği olan, daha az organize olmuş katmanları ile daha yüksek su içeren, lamellar kemikten daha zayıf, deforme olabilen bir yapıya sahip olan bu kemik, embriyolojik iskelet yapısında, tendon ve ligaman yapışma yerlerinde, büyüme plaklarında, kırık iyileşmesi esnasında oluşan kallus yapısında, kemik yapımını uyarıcı medikal tedavilerde ve bazı metabolik hastalıklarda (Paget hastalığı, Osteogenezis İmpperfekta) oluşur (13,14).

Sekonder (lamellar) kemik: Doğumdan sonra immatür kemiğin yerini alır. Havers sistemi bulunan lameller kemikte bu sistemler arasında düzensiz şekilli ve değişik büyüklükte kemik alanları vardır. Bu alan ara lameller sistemi adını alır (13). Ara lameller sistemi ile Havers sistemi “Cement line” adı verilen keskin bir hat ile ayrılır. Üzerine etkiyen yük dağılımına göre karmaşık biçimde düzenlenmiş, kortikal veya spongios yapıda izlenen, olgun kemik dokusudur (20).

Kemiklerin Sınıflandırılması

Kemikler boyut ve şekillerine göre sınıflandırılır:

Kısa kemikler: Yaklaşık olarak aynı boyutlara sahiptirler (tarsal kemikler, karpal kemikler, vertebra) (14,15).

Uzun kemikler: Femur, tibia ve humerusta olduğu gibi kalın duvarlı tübüler yapıda olan diafiz ve diafizin her iki tarafında bulunan geniş yapıda metafiz ve epifizden oluşur. Diafizin kalın kortikal duvarı metafize doğru inceler ve genişler.

Yassı kemikler: Diğerlerinden daha kısa olup tek boyuta sahiptirler (skapula, iliak kanatlar) (14,16).

KIRIK TANIMI

Kırık, kemik dokusundaki devamlılığın veya başka bir deyişle, kemiğin anatomik bütünlüğünün bozulmasıdır. Kemiklerde skar dokusu bırakmadan şekil ve fonksiyon olarak orjinaline en yakın şekilde iyileşme olmaktadır. Kırık tam veya kısmi, basit ya da parçalı, açık veya kapalı olabilir. Parçalı kırık ikiden fazla kemik fragmanının olduğu kırıkları, açık kırık ise derinin bütünlüğünün de bozulduğu kırıkları içerir (3,6). Bir kemik kırıldığında kırık kemik uçlarında deplasmana neden olabilir. Bu da matriks hasarına, hücre ölümüne, periosteum ve endosteumda yırtıklara yol açabilir (19,24).

KIRIK İYİLEŞMESİ

Primer ve sekonder olarak iki tipte kırık iyileşmesi görülür:

Primer Kemik İyileşmesi

Kallus oluşumunun görülmediği, direkt kemik oluşumu ile sonuçlanan rijit osteosentez uygulanan ayrılmamış kırıklardaki iyileşme tipidir. Kırıkta süreç olmadığından intramembranöz kemikleşmeye benzetilir (25).

Sekonder Kemik İyileşmesi

Kırık iyileşmesinde daha sık görülen ve kallus oluşumunun görüldüğü doğal iyileşme durumudur. Enkondral kemikleşmeye benzer oluşum gösterir (25).

Kemik iyileşmesi, skar dokusu gelişmeden doku rejenerasyonun olması bakımından, benzersiz dinamik bir mekanizmadır. Kırık oluşumundan düzenli kemik doku ile kırık uçları birleşinceye kadar devam eder. Histolojik olarak iyileşme süresindeki evreleri birbirinden tamamen ayırmak mümkün değildir ve her evre kendinden bir önceki veya bir sonraki evre içerisinde yer alır. Histolojik görünümüne göre yapılan sınıflamalarda bazı farklılıklar hariç, genel olarak aynı bulgular kabul edilmiştir (3,23).

De Palma'ya göre kırık iyileşmesi dört fazda incelenir (26):

1-Birincil hücresel kallusun oluşum fazı

a-Hematom fazı

b-Birincil hücresel kallusun oluşumu

2-Birincil hücresel kallusun damarlanma fazı

3-Hücresel kallusun kemikleşme fazı

4-Kemiğin yeniden şekillenme fazı

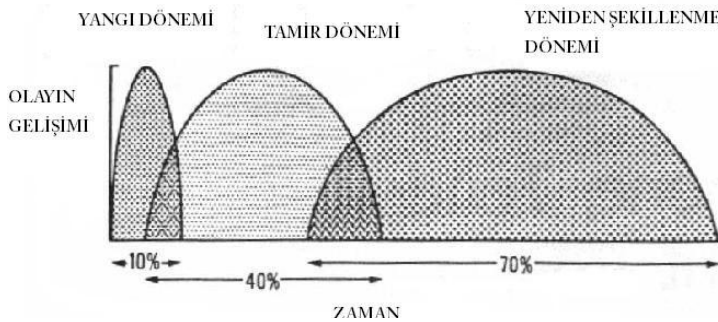
Cruess ve Dumont'a göre kırık iyileşmesi üç evreden oluşur (27):

1- Yangı (inflamasyon) evresi

2- Onarım(reperasyon) evresi

3- Yeniden şekillenme(remodeling) evresi

Kırık oluşumunu takiben kemik bütünlüğünün yeniden sağlanabilmesi amacıyla organizmada birçok değişiklik şekillenir. Kırık iyileşmesi oldukça karmaşık bir olaydır ve 3 evreye ayrılır (28). Bu evreler yangı, onarım, yeniden şekillenme (remodeling) olarak sıralanabilir. Şekil 1'de kırık iyileşmesinin evreleri gösterilmiştir (28). Tüm doku travmalarında olduğu gibi kırıklarda da, ilk verilen cevap inflamasyondur.



Şekil 1. Kırık iyileşmesinin evreleri (28)

İnflamasyon dönemi: Kırık iyileşmesi için gerekli temel öğeleri içeren kırık hematomunun ilk oluşumu ve organizasyonunun başlangıç dönemidir (19,23). Kırık sonrasında, kırık hematomu şekillenmeye başlar, kırık ve kemik oluşumunun başlangıç dönemine kadar devam eder (1-7 gün). Oluşan hematoma sayesinde kırık uçları bir arada tutulur (16). Şekillenen fibrin, kırık uçları arasında ince bir ağ oluşturur. Fibroblastlar kırık bölgesine ulaşır ve kırık uçlarını birbirine bağlayan kollajen salgırlar. Kırık bölgesinde genç granülasyon dokusu oluşmaya başlar. Bu hematoma bölgeye osteoblast ve kondroblastlara dönüşecek olan prekürsör hücreler gelir ve matriks oluşumu başlamış olur (16,23,29).

Kırık bölgesinde ilk 24 saat içinde damarlarda vazodilatasyon ve plazma ekstravazasyonuna bağlı olarak ödem oluşur. Akut yangı hücreleri olan polimorf çekirdekli lökositler, lenfosit ve monositler ödemli bölgeye gelir ve nekrotik dokuları fagosite ederler, kallus oluşumuna da katkıda bulunurlar (19,24). Kılcal damar tomurcuklanmasında erken dönemde periosteal damarlar, geç dönemdeyse besleyici damarlar rol alır. Normal periosteal arterlerden farklı olan bu damarlar, kallus dokusunu beslerler. Fibrin ağından yeni kemik oluşumu için hücre çoğalması başlar. Fibrin içindeki öncü hücreler, farklı dokuları oluşturmak için farklılaşmaya hazırdır. İnflamatuvar dönemin iki ya da üçüncü gününde kırık bölgesinde periosteum ve endosteum kaynaklı osteoblast ve kondroblast sayılarında artış gözlenir. Gelişen bu olaylardan sonra osteogenezis başlar (24).

Onarım dönemi: Kırık oluştuktan hemen sonra başlayan onarım dönemi, 7-12 gün içerisinde belirgin hale gelir. İlk basamağında hematoma organize olur ve lokal olarak uyarılan mezenkimal kaynaklı, çok yönlü gelişim gücüne sahip öncü hücrelerin; yeni damar, fibroblast, matriks ve destek hücreleri oluşturmak üzere farklılaşmasıyla devam eder. Bu öncü hücreler periosteumda bulunan osteojenik tabakadan, granülasyon dokusu içinden ve daha az olarak da endosteumdan köken almaktadır (29). İlk olarak kılcal damarlardan hematoma içine giren kollajen salgılayan fibroblastlar değişikliğe uğrar. Kondroblastlar da kollajen sentezine katılır. Yeniden oluşan bu yeni kemiğin gerilmeye karşı dayanıklılığı, içerdiği kollajen miktarı ile ilişkilidir. İlk oluşan kırık kallus ilerleyen evrelerde kemik kallusa dönüşür (19,23,24).

Yumuşak kallus: Ağrı ve şişliğin gerilemesi damarlanmadaki artış ve hücre sayısının artışıyla karakterizedir. Subperiosteal yeni kemik oluşumu ve kırık uçlarında kondroblastlar gözlenir (30).

Sert kallus: Yumuşak kallusun kırık uçlarının birbirine tutunmasını sağladıktan sonra sert kallus şekillenmeye başlar ve tam kaynama gerçekleşene dek devam eder (3-4 ay).

Yumuşak kallus enkondral kemikleşme ve intramembranöz kemikleşme ile kalsifiye olarak sert doku haline gelir. Kondroblastlar osteoblastlara dönüşür ve osteoid üretilmeye başlar. Periosteum ve endosteum kaynaklı osteoblastlar da osteoid yapımına katkıda bulunur. Kalsiyum tuzlarının da (hidroksiapatit) ortama çökmesi ile sert kallus şekillenmiş olur. 4-6 hafta sonunda kırık kaynaması gerçekleşmiş olur (31).

Yeniden şekillenme (remodeling) dönemi: Onarım döneminin ortalarında başlayan, aylar hatta yıllar sürebilen, kırık iyileşmesinin en uzun dönemidir. Onarım döneminde oluşan immatür kemik yerini matür kemiğe bırakır ve gereksiz kallus rezorbsiyona uğrar.

Yeniden şekillenme evresinde dört olay gerçekleşir (3,24,32):

1-Kalsifiye kırıkta yerini osteoid dokuya bırakır ve birincil trabeküler doku oluşur.

2-Oluşan trabeküler doku lameller kemik dokuya değişir.

3-Kompakt kemik uçlarındaki kallus dokusu, lameller kemikten yapılmış ikincil osteonlara değişir. Lameller kemik, kas kuvveti ve mekanik streslere paralel düzenlenen osteonlarla güçlü kemik haline dönüşür.

4-Kemik medullası yeniden şekillenir. Kanal içindeki kallus, osteoklastlar tarafından fagosite edilir ve boşluklar yeniden düzenlenir.

Kaynamayı Etkileyen Faktörler

Hastaya bağlı faktörler:

Yaş: İskelet gelişimi tamamlanmamış olan çocuklarda kemiğin remodeling ve rejenerasyon yeteneği fazla olduğundan kırık iyileşmesi belirgin derecede hızlıdır (3,23,28,33,34).

Beslenme: Kemik iyileşmesi metabolik ihtiyaçları % 20-25 oranında artırmaktadır. Bu oran, çoklu kırık ve enfeksiyon varlığında daha da artmaktadır (23,33,34).

Metabolizma: Kortikosteroidler iyileşmeyi baskımlarken, tiroid hormonu, kalsitonin ve anabolik steroidler iyileşmeyi uyarmaktadır (35).

Hastanın sağlık durumu: Hastada mevcut olan hastalıklar ve ilaç kullanımı kırık iyileşmesini olumsuz etkilemektedir (34).

Nikotin: Nikotinin kırık iyileşmesi üzerinde olumsuz etkileri yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (33,34).

Travmaya bağlı faktörler:

Travma şiddeti: Yaygın doku hasarı ve enfeksiyon riskinin yüksek olduğu açık kırıklar ile yüksek enerjili travmalar sonucunda meydana gelen kırıklarda iyileşme olumsuz etkilenir. Kırık bölgesine olan yumuşak doku interpozisyonu da kırık iyileşmesini olumsuz etkilemektedir (23,33).

Eklem içi kırıklar: Eklem hareketleri ve eklem sıvısının kırık hattına girmesi nedeniyle kırık iyileşmesi olumsuz etkilenir (23,34).

Segmente kırıklar: Dolaşım bozulduğu için kırık iyileşmesi olumsuz yönde etkilenmektedir (23,33-35).

Dokuya bağlı faktörler: Kortikal kemikte osteoprogenitör hücrelerin daha az proliferasyonu ve kanlanması trabeküler kemiğe oranla daha zayıf olması kemik iyileşmesini olumsuz etkilemektedir. Kırık bölgesindeki nekrotik dokular iyileşmeyi olumsuz etkilemektedir. Patolojik kırıkların iyileşmesi de primer hastalık nedeniyle olumsuz etkilenmektedir. Kemikteki enfeksiyonun da kaynamayı olumsuz etkilediği bilinmektedir (3,33,34).

Tedaviye bağlı faktörler: Kırık uçları arasındaki mesafenin fazla bırakıldığı ya da kırık uçlarının hareketli kaldığı yetersiz redüksiyon durumlarında kaynama gecikir (3,34,35).

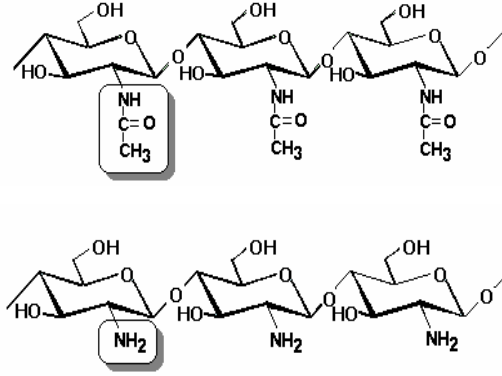
LOKAL KANAMA DURDURUCU AJANLAR

Teknolojinin ilerlemesiyle hücresel ve moleküler olaylar zinciri daha ayrıntılı incelenmiştir. Bu da travma ve yaralanma durumlarında yeni tedavi ajanlarının geliştirilmesine olanak sağlamıştır. İnsan kaynaklı fibrin veya trombinden elde edilen çeşitli hemostatik ajanlar ile *Urtica dioica*, *Vitis vinifera*, *Glycyrrhiza glabra*, *Alpinia officinarum*, *Thymus vulgaris* bitkilerinin karışımı ile elde edilen Ankaferd Blood Stopper[®], yara yerinde trombosit ve koagülasyon faktörleri konsantrasyonunu sıvı absorpsiyonu yaparak arttıran, QuickClot[®], dolaşımdaki hücreleri toplayarak dokuya yapışma gösteren HemCon Bandage[®] lokal kanama durdurucu ajan olarak kullanım alanı bulmuştur. Farklı özellikleri ve etki mekanizmaları ile bu hemostatik ajanlar hala birçok çalışmaya konu olmaktadır (2,36-38).

CHİTOSAN

Chitosan molekül ağırlığı 300-1000 kD arasında değişen moleküler formülü poli-1,4 D-glikozamin (aminopolissakkarit, poli-N-Asetil glikosaminoglikan) olan, deniz kabuklarının sert kabuklarında doğal olarak bulunan Chitin'in deasetilasyonu ile oluşan bir

biyopolimerdir (39-41). Şekil 2’de Chitin ve Chitosan’ın kimyasal görünümü gösterilmiştir (41).



Şekil 2. Chitin ve Chitosan’ın kimyasal görünümü (41)

Chitosan’ın, toksik özellikte olmaması, çevreye zarar vermeden biyolojik olarak parçalanabilir özellikte olması ve vücut içerisinde tamamen zararsız ürünlere (amino şekeri) parçalanması nedeniyle yan etkisi de bulunmamaktadır (42).

Nontoksik ve biyolojik parçalanabilirliği olan Chitosan çözelti, toz pudra, granüller ve fibriller halinde ticari preparat olarak elde edilebilmektedir (43-45). Chitosan, kullanım amacına göre formüle edilip, veterinerlik, dişçilik, kozmetik, biyomedikal alanlarda kullanılmaktadır (46). Yapısındaki amino ve hidroksil grupları sayesinde büyüme faktörleri, antibiyotikler ve anti-inflamatuar ilaçlar Chitosan yüklenebilir.

Chitosan kişisel bakım ürünlerinde, yiyeceklerde koruyucu ürün olarak, çöp arıtma sektöründe, tohumların kaplanmasında, pestisit ve herbisitlerin kontrollü salınımı ile zirai ilaçlamada, enzim ve hücrelerin immobilizasyonu ile kimyasal ajanların kontrollü salımında kullanılmaktadır (40,47).

Chitosan mezenkimal hücrelerin osteoblastlara farklılaşmasını hızlandırırken kemik oluşumunu azaltan fibroblastların fonksiyonlarını da azaltarak kemik oluşumunu artırıcı yönde etki gösterir (48). İnvitro ve invivo Chitosan’ın çeşitli formülasyon ve farklı molekül ağırlıklarıyla yapılan bir çok araştırmada kemik defektlerinde osteogenik aktiviteyi arttırdığı ve herhangi bir yan etkiye sebep olmadığı gösterilmiştir (47).

Rat kafatasında kemik defekti oluşturularak yapılan bir çalışmada Chitosan uygulanmayan deneklerde 4. haftada defektin fibröz bağ doku ile dolduğu ve çok az kemik dokusu oluştuğu görülmüştür (49). Klokkevold ve ark. (48), Chitosan’ın kemik oluşumunda osteoblast farklılaşmasını artırdığını ileri sürmüşlerdir. Greene ve ark. (50), kırık sabitlenmesi

amacıyla kullanılan ve infeksiyon için odak oluşturabilen paslanmaz çelik vidaları Chitosan ile kaplayarak yaptıkları çalışmada büyük oranda *S. aureus* infeksiyonunun engellendiğini ve antibiyotik kaplı Chitosan'ın tedavide kullanılabileceğini önermişlerdir.

Chitosan'ın patojen mikroorganizmalar üzerine bakterisidal özellikleri bulunmaktadır. Farklı deasetilasyon derecelerinde ve ortam şartları değiştirilerek; Chitosan'ın farklı moleküler ağırlığa sahip formlarının antimikrobiyal özelliklerinin farklı olduğu gözlenmiştir. Jeon ve ark. (51), Chitosan'ın molekül ağırlığının bakterilerin inhibisyonunda önemli bir faktör olduğunu, Tsai ve ark. (52) da pH değeri 6.0 olan bir ortamda yaptıkları çalışmada Chitosan'ın deasetilasyon derecesi arttıkça antimikrobiyal aktivitenin de arttığını ileri sürmüşlerdir. Gerasimenko ve ark. (53), düşük molekül ağırlığına sahip %85 deasetilasyon dereceli Chitosan'ın *S. aureus* ve *E. coli* gibi hem gram pozitif hem de gram negatif bakterilerin üremelerini baskıladıklarını saptamışlardır.

Chitosan'ın antibakteriyel özellikleri yanında antifungostatik özellikleri de bulunmaktadır. Tsai ve ark. (52), yaptıkları araştırmada Chitosan'ın mantarlar üzerine etkisinin bakterilerden daha düşük olduğunu ileri sürmüşlerdir. Cuero ve ark. (54) ise Chitosan'ın (N-carboxymethyl) *A. flavus* ve *A. parasiticus* üremesini yarı yarıya; bu küflerin toksin üretimini ise % 90'ın üzerinde bir oranda azalttıklarını rapor etmişlerdir.

Hemostatik ajan olarak kullanıma girmiş olan Chitosan klasik pıhtılaşma yolundan bağımsız şekilde, eritrosit hücre membranı ile etkileşerek hemostaz sağlamaktadır (55). Eğitim gerektirmeden kolay kullanılabilir olması ile aynı anda birçok yaralının olduğu durumlarda eksternal kanamalara müdahale etmede başarılı şekilde kullanılmıştır (37,56-58).

Yara iyileşmesinde Chitosan ve türevleri inflamatuvar hücre fonksiyonlarını artırarak olumlu etki göstermektedir (59-61). Yanık iyileşmesinde ve enfekte yaralarda Chitosan kullanılmış ve elde edilen olumlu sonuçlarla tedavide kullanılabileceği ileri sürülmüştür. Çakmak ve ark. (62), *S.aureus* enjekte ettikleri cerrahi alanda Chitosan'ın etkilerini araştırmış ve infeksiyona karşı Chitosan'ın koruyucu etki yapabileceğini raporlamışlardır. Burkatovskaya ve ark. (63) ve Dai ve ark. (64) yaptıkları benzer iki çalışmada *P. aeruginosa* ve *P. mirabilis* ile enfekte edilen 3. derece yanıkta Chitosan kullanmışlar ve başarılı sonuçlar elde etmişlerdir.

Chitosan ile yapılan invitro ve invivo çalışmalarda analjezik etkisinin de olabileceği iddia edilmektedir (65). HemCon Bandage® GuardaCare™ (HemCon Medical Technologies, Inc. Portland, U.S.A) ise sıkıştırılmış chitosan acetate içeren bir malzemedir. Hemostatik ajan olarak geliştirilmiş ve kullanıma girmiştir (57,66).

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi 07/12/2012 tarih ve 2012.09.01 sayılı Etik Kurulu onayı alındıktan sonra rastgele seçimle belirlenen onarlı 2 gruptan oluşan, ağırlıkları 180-200 gram arasında değişen toplam 20 adet Sprague-Dawley tipi rat çalışmaya alındı. Deney hayvanları laboratuvarından temin edilen hayvanlar; deney boyunca uygun ısı, ışık ve karanlık koşullardaki kafeslerde barındılar. Kafeslerinde sürekli rahatça ulaşabildikleri gıda ve su bulunduruldu. Sağlık Araştırmaları Ulusal Topluluğu'nun "Laboratuvar Hayvanları Bakım Prensipleri" ve Laboratuvar Hayvan Kaynakları Enstitüsü ile Ulusal Sağlık Enstitüsünün yayınladığı, "Laboratuvar Hayvanlarının Bakım Ve Kullanım Kılavuzu" doğrultusunda deney hayvanları çalışması yapıldı (67). Çalışma, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Birimi ve Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirildi.

ÇALIŞMA GRUPLARI

Grup NaCl (n= 10): Kemik defekti oluşturulması sonrasında defektin serum fizyolojik ile irrigedilmesi şeklinde işlem yapılan ve 7. günde kemik segmenti alınan grup.

Grup CAB (Chitosan Acetate Bandage) (n= 10): Kemik defekti oluşturulması sonrasında defekte CAB emdirilmesi şeklinde işlem yapılan ve 7. günde anestezi uygulanması sonrası kemik segmenti alınan grup.

DENEKLERİN HAZIRLANMASI

Deneklerin, 50 mg/kg dozda ketamine hydrochloride (Ketalar flk; Pfizer İlaçları Ltd.Sti, İstanbul, Türkiye) ve 10 mg/kg xylazine hydrochloride (Rompun; Bayer, Türk Kimya San. Ltd. Sti. İstanbul, Türkiye) intramuskuler enjeksiyonu ile anestezi sağlandı (Şekil 3). Ratlar ısıtıcı lamba altında masaya yatırıldı (Şekil 4). Lokal saha temizliği Polividon İyot (Batticonâ Solüsyon, Adeka, Samsun, Türkiye) ile yapıldı.



Şekil 3. Ketamine hydrochloride ve xylazine hydrochloride intramuskuler enjeksiyonu ile anestezi sağlanması



Şekil 4. Cerrahi işlem öncesi ratlara pozisyon verilmesi

DEFEKT OLUŐTURMA

Tibia distalinde, anterior cilt üzerinde 5 mm uzunluğunda longitudinal cilt insizyonu yapıldı (Şekil 5). Cilt, cilt altı bağ dokusu geçildi ve tibialis anterior kasının lateralize edilmesinin ardından, periost membran kemik yüzeyinden alındı. Tibia distalinde anterior kısımda uzunluğu 5 mm, geniŐlięi 1 mm, derinliği 1 mm olacak Şekilde kemik defekti elektrikli matkap kullanılarak oluşturuldu (Şekil 6). Kemik defektinin uygunluğunun sağlanması için matkap ucuna defekt boyutuna karŐılık gelen boyutlara sahip 1 mm uzunlukta iŐaretlenmiŐ 1mm çapında paslanmaz elik stent yerleŐtirildi.



Şekil 5. Tibia anteriorunda cilt insizyonu



Şekil 6. Matkap ile kemik defekti oluşturulması

Oluşturulan defekt sonrasında grup NaCl'de defekt sadece serum fizyolojik ile irrigé edildi ve herhangi bir ilaç uygulanmadı. Grup CAB'de defekti kaplayacak şekilde, boyutta CAB kesilerek defekt kaplandı (Şekil 7).



Şekil 7. Kemik defektine chitosan acetate bandaj uygulanması

Her iki grupta 5/0 propilen (polypropylene, Prolene®; Ethicon, USA) kullanılarak kas ve cilt sütürasyonu gerçekleştirildi. Cerrahi sonrasında tüm ratlar kendilerine ayrılmış olan kafeslere alındı. Perioperatif ve postoperatif dönemde hiçbir denek kaybedilmedi ve hiçbir denekte komplikasyon saptanmadı. Aynı gün içerisinde rutin beslenmelerine devam eden deneklere hareket kısıtlayıcı hiçbir uygulama yapılmadı. Deneklerin tümünün postoperatif birinci günün sonunda serbest bir şekilde mobilize oldukları gözlemlendi. Uzman veteriner kontrolünde izlendi. 7 gün boyunca herhangi bir diyet kısıtlaması yapılmadan standart rat yemi ve çeşme suyu ile beslendi.

Deneyin 7. gününde ratların anestezisi sonrası femur distalinden ayak bileğine kadar anteriordan orta hat longitudinal cilt insizyonu yapıldı. Cilt ve cilt altı bağ dokular geçildi. Tibialis anterior kasının tendonu vertikal olarak kesildi ve diz eklemi kapsülüne ulaşıldı (şekil 8). Diz eklemine stabilize eden anterior kapsül, çapraz bağlar ve posterior kapsül anteriordan posteriora doğru ayrıldı (Şekil 9).

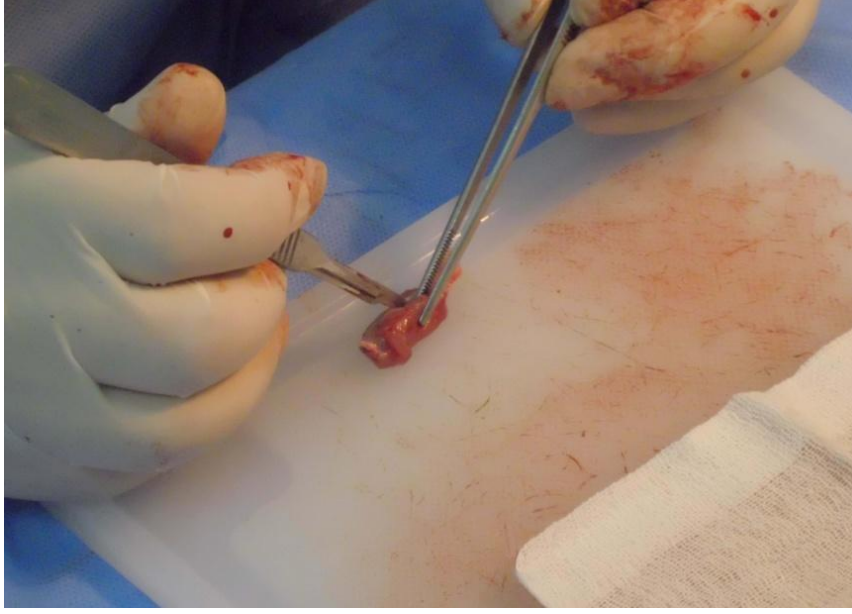


Şekil 8. Diz eklemi kapsülüne ulaşım

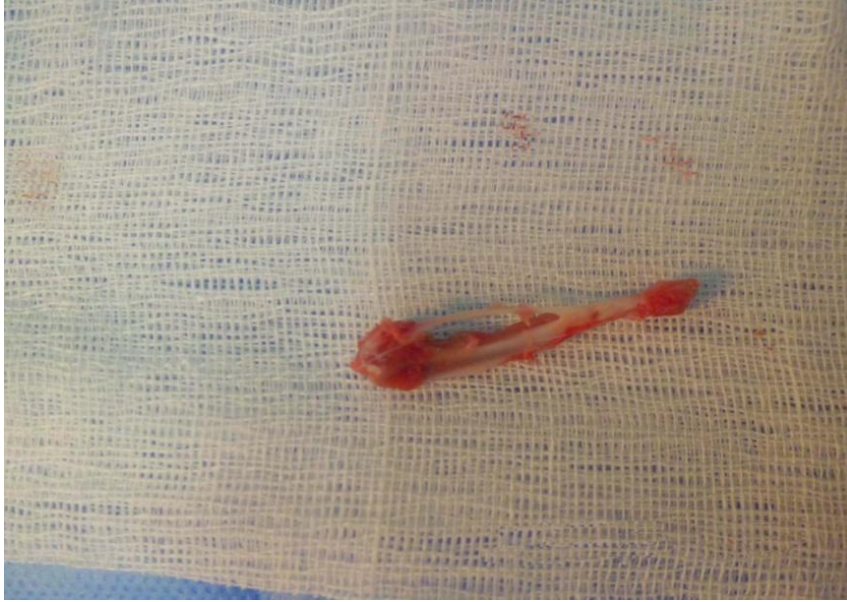


Şekil 9. Diz eklemi dezartikülasyonu

Tibiannın anteromedial yüzünden tibialis anterior kasının diseksiyonu gerçekleştirildi. Peroneal kaslar tibiannın posterolateral yüzünden diseke edildi extensör ve fleksör kaslar anterior ve posterior tibiadan proksimalden distale diseke edilerek ayak bileğine ulaşıldı. Aşil tendonu ve ayak bileği eklem kapsülü kesilerek bacak segmenti yumuşak dokudan arındırıldı (Şekil 10-11).



Şekil 10. Kemik segmentinin yumuşak dokudan arındırılması



Şekil 11. Yumuşak dokudan arındırılmış kemik segmenti

Her deneğin tibiasının diz ve ayak bileği dezartikülasyonu uygulanmak suretiyle alınmasının ardından servikal dislokasyon yöntemi ile sakrifiye edildi.

DOKU HAZIRLANMASI VE HİSTOPATOLOJİK İNCELEMELER

Kemik doku örneklerindeki histopatolojik incelemeler Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirildi. Histopatolojik inceleme için alınan her bir kemik segmenti %10'luk formaldehid solusyonu içerisinde bir gece 4° C de fikse

edilmesini takiben saline ile yıkandı ve örnekler yeterli dekalsifikasyon sağlanana kadar formik asitte bekletildi. Fiksasyon sonrasında parafine gömülen segmentler ince kesitler elde edilecek şekilde mikrotom ile kesildi. Doku kesitleri Hematoksilen-Eozin ve Mason-Trikrom boyası ile boyanarak bir patolog tarafından ışık mikroskopunda kantitatif olarak değerlendirildi. Değerlendirme için Olympus BX 51 modeli mikroskop kullanıldı ve doku kesitlerinin resimlerinin çekilmesi için Zeiss Axioplan 2 Imaging MC80 DX kamera kullanıldı.

İnflamatuar yanıt, fibrozis ve yeni kemik oluşumu (osteoblastik aktivite) skorları bu evrelerle ilişkili hücrelerin sayımı ve bunların toplam hücre sayısına oranı tespit edilerek belirlendi. %0-25 yok (Evre 1), % 25-50 hafif (Evre 2), % 50-75 orta (Evre 3), % 75-100 ileri (Evre 4) şeklinde yorumlandı.

İSTATİSTİKSEL ANALİZ

İstatistiksel değerlendirme, 10240642 seri numaralı SPSS 20 istatistik programı kullanılarak yapıldı. İstatistiksel analizler için ki kare testi kullanıldı. Tüm istatistikler için anlamlılık sınırı $p < 0.05$ kabul edildi.

BULGULAR

Histopatolojik değerlendirmede kemik defekti oluşturulmasının 7. gününde gruplar arası inflamatuvar yanıt skorları (Evre 4) karşılaştırıldığında; chitosan uygulanan grupta inflamatuvar yanıt skoru, normal salin uygulanan gruba göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek tespit edildi ($p=0.010$).

Denek sayılarının inflamatuvar yanıt skoru evrelerine göre dağılımı Tablo 1’de ayrıntılı olarak verilmiştir.

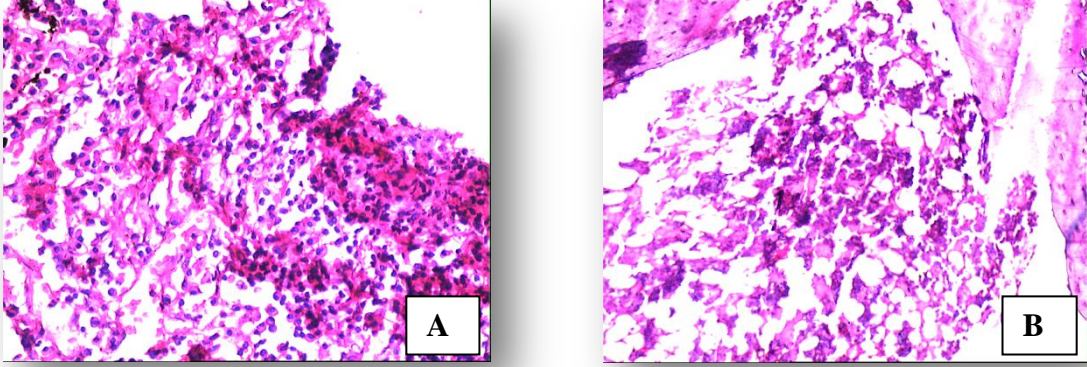
Tablo 1. Denek sayılarının inflamatuvar yanıt skoru evrelerine göre dağılımı

İnflamatuvar Yanıt Skoru	Grup NaCl (n=10)	Grup CAB (n=10)	p*
Evre I	4	0	0.043
Evre II	4	0	0.043
Evre III	1	3	0.291
Evre IV	1	7	0.010

NaCl: Sodyum Klorür; **CAB:** Chitosan Acetate Bandage.

*ki kare testi, * $p<0.05$.

Sodyum klorür grubu ile CAB gruplarının inflamatuvar yanıt skoruna (Evre 4) ait histopatolojik görüntü rnekleri Şekil 12’de verilmiştir.



Şekil 12. Skor 4 inflamatuvar yanıt: A-NaCl grubu, B-CAB grubu (H&EX100)

Histopatolojik değerlendirmede kemik defekti oluşturulmasının 7. gününde gruplar arası osteoblastik aktivite skorları (Evre 4) karşılaştırıldığında; chitosan uygulanan grupta osteoblastik aktivite skoru, normal salin uygulanan gruba göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek tespit edildi ($p=0.005$).

Denek sayılarının osteoblastik aktivite skoru evrelerine göre dağılımı Tablo 2’de ayrıntılı olarak verilmiştir.

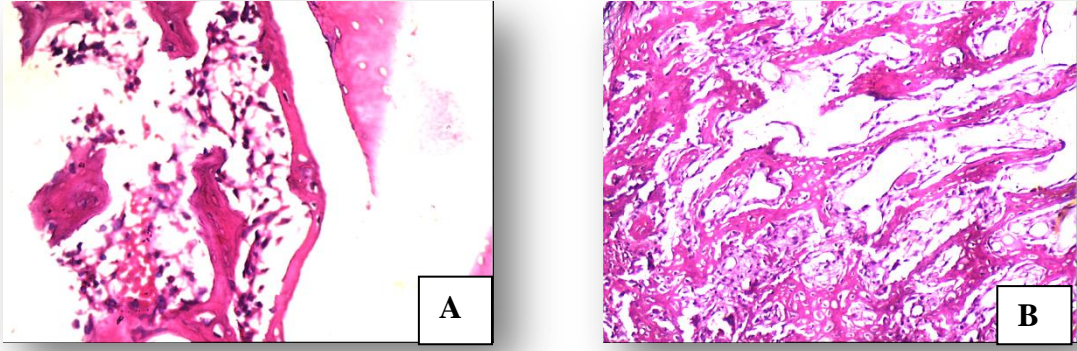
Tablo 2. Denek sayılarının osteoblastik aktivite skoru evrelerine göre dağılımı

Osteoblastik Aktivite Skoru	Grup NaCl (n=10)	Grup CAB (n=10)	p*
Evre I	4	0	0.043
Evre II	5	0	0.016
Evre III	1	4	0.152
Evre IV	0	6	0.005

NaCl: Sodyum Klorür; **CAB:** Chitosan Acetate Bandage.

*ki kare testi, * $p<0.05$

Sodyum klorür grubu ile CAB gruplarının osteoblastik aktivite skorlarına (Evre 4) ait histopatolojik görüntü örnekleri Şekil 13’de verilmiştir.



Şekil 13. Skor 4 osteoblastik aktivite: A-NaCl grubu, B-CAB grubu (H&EX100)

Histopatolojik değerlendirmede kemik defekti oluşturulmasının 7. gününde gruplar arası fibrozis skorları (Evre 3, 4) karşılaştırıldığında; chitosan uygulanan grupta fibrozis skoru, normal salin uygulanan gruba göre yüksek olmasına rağmen, istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0.175$, $p=0.105$).

Denek sayılarının fibrozis skoru evrelerine göre dağılımı Tablo 3’de ayrıntılı olarak verilmiştir.

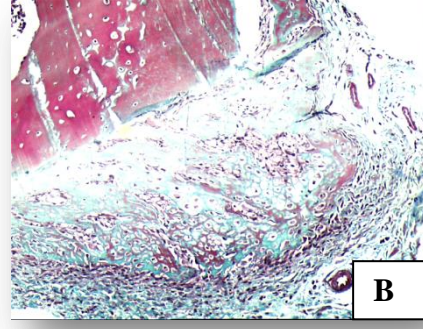
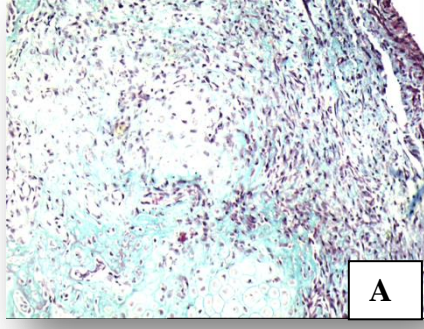
Tablo 3. Denek sayılarının fibrozis skoru evrelerine göre dağılımı

Fibrozis Skoru	Grup NaCl (n=10)	Grup CAB (n=10)	p*
Evre I	4	0	0.043
Evre II	4	2	0.314
Evre III	2	5	0.175
Evre IV	0	3	0.105

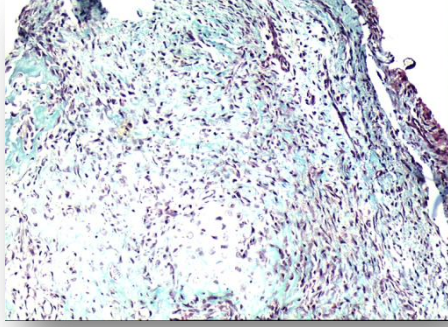
NaCl: Sodyum Klorür; **CAB:** Chitosan Acetate Bandage.

*ki kare testi, * $p<0.05$.

Sodyum klorür grubu ile CAB gruplarının fibrozis skorlarına (Evre 3, 4) ait histopatolojik görüntü örnekleri Şekil 14ve Şekil 15’de verilmiştir.



Şekil 14. Skor 3 fibrozis: A-NaCl grubu, B-CAB grubu (Mason-TrikromX100)



Şekil 15.CAB grubu Skor 4 fibrozis (Mason-TrikromX100)

TARTIŞMA

Kırık iç veya dış kuvvetler sonrası kemiğin anatomik bütünlüğünün tam veya kısmen bozulması olarak açıklanabilir (3-5,68). Kırık iyileşmesi günümüzde dahi bazı yönleri ile tam olarak anlaşılammış histolojik evrelerin bulunduğu karmaşık bir olaylar zinciridir. Histolojik olarak evreler birbirlerinden net sınırlarla ayrılmazlar, her dönem kendinden bir önceki veya bir sonraki dönemi kapsamaktadır (21).

Tüm dokuların hasarında olduğu gibi kemikte de hasara ilk yanıt yangıdır (68). Kemik defekti oluştuğunda periost, çevre yumuşak dokularda ve damarlarda yaralanma meydana gelebilir. Defekt çevresinde lenf ve kan birikerek hematoma oluşturur. Trombosit ve trombotik faktörler pıhtılaşmayı sağlamak için bu bölgeye toplanırlar. Oluşan hematoma kırık iyileşmesinde önemli bir role sahiptir (21,68).

Hematoma bulunan trombosit ve kemik yapılarından çok çeşitli büyüme faktörleri ve sinyal proteinleri (sitokinler) salgılanmaktadır. Bu büyüme faktörleri ve proteinler kırık iyileşmesini sağlayan hücre göçü, periost kaynaklı osteoblastların çoğalması ve fibrin onarım dokusu matriks oluşumu için oldukça önemlidir. (26,31,69). Sinyal proteinleri ve büyüme faktörlerinin etkisiyle akut inflamasyon kaskadı daha da ilerler. Yaralanma bölgesine göç eden polimorf nüveli lökosit, makrofaj ve fibroblastlar fibrin matriks yapılı onarım dokusuna katılırlar. Fibrin matriks içindeki öncü hücreler kemik yapımı için çoğalmaya başlarlar. Makrofajlardan salınan sitokinler yaralanma bölgesine lenfosit göçünü uyararak nekrotik dokuların geri emilimini sağlar ve kırık iyileşmesinde olumlu etkileri olan osteoklastik aktiviteyi ve çoğalmayı arttırarak ortamdaki ölü kemik dokularının temizlenmesinde görev alırlar (21).

Kemikte hasar oluşumunun ardından kemik matriksten ve nekrotik alandan salgılanan proteinler öncü hücrelerin osteoblastlara ve osteoklastlara farklılaşmasını sağlayarak kemiğin oluşumunu sağlar (47).

Kırık iyileşmesi, oldukça karmaşık patofizyolojik olayları içermesi ve sağaltımında multidisipliner yaklaşımlara gerek olmasından dolayı araştırmacıların üzerinde birçok çalışma yaptıkları bir alandır. Yapılan literatür taramasında bir çok çalışmaya rastlanılmaktadır (21,26,31,68-80). Kırık iyileşmesini olumlu etkileyen ajanların bir kısmı klinikte kullanım alanı bulmuştur (3,9,10).

Kemik iyileşmesinde kullanılan ideal materyalin kemik onarımı üzerine etkili, uygulanması kolay nitelikleri bulunmalıdır. Doğada bulunan kaynaklardan bol miktarda elde edilebilen bir biyopolimer olan Chitosan'ın, vücuda toksik özelliğinin olmaması, yüksek biyoyumu yanında doku rejenerasyonunu uyarıcı etkileri de bulunmaktadır (40,73).

Chitosan'ın toz, jel, sulandırılmış formu ve bandaj şeklinde kullanım türleri bulunmaktadır. Chitosan antimikrobiale ajan olarak, kemik dokusunun yerini alarak ve hemostatik aktivite göstererek yara iyileşmesini hızlandırmakta ve bu özellikleri sayesinde doku mühendisliği alanında yeni ufuklar açmaktadır (70).

Shin ve ark. (74) tibia hasarında deri altı bağ dokusuna nanofiber Chitosan membranlarını implante ederek yaptıkları çalışmada, Chitosan'ın kemik iyileşmesi üzerine olumlu etkilerinin olduğunu rapor etmişlerdir. Ezoddini ve ark. (70) ise rat tibiasında oluşturdukları defekte Chitosan'ı toz halinde uygulamışlar ve yeni kemik oluşumlarını değerlendirmişlerdir. Benzer şekilde Chitosan'ın kemik oluşumunu anlamlı derecede artırdığını göstermişlerdir.

Literatür taramalarında; daha önceki kemik iyileşme modellerinde CAB uygulanmasına ilişkin bilgiye rastlanılmamıştır. Çalışmamızda Chitosan'ı bandaj şeklinde kullanarak kemik defektlerine temasla birlikte (emdirerek) lokal absorpsiyonu artırmayı amaçladık.

Li ve ark. (75) tavşanlarda eklem dışı tendon-kemik iyileşme modelini kullanarak yaptıkları çalışmada greftin kemiğe tutunduğu yüzeyde Chitosan'ın mikroskobik olarak osteogenezi artırdığını rapor etmişlerdir. Bununla birlikte Spin Neto ve ark. (71,72) ratların kalvariumunda oluşturulan kemik defekti üzerine Chitosan'ın etkisini inceledikleri farklı iki çalışmada da yeni kemik oluşumunun kontrol grubuna göre anlamlı farklılık göstermediğini tespit etmişlerdir.

Önceki çalışmalarla kıyaslandığında yeni kemik oluşumu ve osteoblastik aktivite ile ilgili olumlu sonuçlarımız bazı çalışmalarla benzer iken, bazı çalışmalarla farklılıklar göstermektedir. Bu durum uygulanan teknik, seçilen denek ve kemiklerdeki farklılıklarla ilişkili olabilir (70-72,75).

Kemik defektindeki iyileşmenin daha iyi aydınlatılabilmesi amacıyla akut dönemde inflamasyonun göstergeleri olan inflamatuvar hücrelerin ve sinyal proteinlerinin durumunu inceleyen çalışmalar yapılmıştır (61,76,77).

Usami ve ark. (76) Chitosan'ın inflamatuvar hücrelerin hasarlı bölgeye göçlerini arttırdığı ve iyileşmeyi aktive eden sinyal proteinlerinin salgılandığını göstermişlerdir. Başka çalışmalarda da benzer şekilde Chitosan'ın erken dönemde polimorf nüveli lökositler ve makrofajlar gibi inflamatuvar hücrelerin aktivasyonunu artırarak kemik iyileşmesinin ilk basamağı olan inflamasyonu hızlandırıcı özelliğinin olduğu gösterilmiştir (61,73,77,80). Bizim çalışmamızda da kemik iyileşmesinin erken döneminde Chitosan'ın inflamasyonu arttırdığı tespit edildi.

Asikainen ve ark. (78) yaptıkları bir çalışmalarında, uzun süren fibroblast aktivasyonunun eşlik ettiği kronik inflamasyonun kemik iyileşmesini geciktirdiğini tespit etmişlerdir. Chitosan kemik iyileşmesinin erken döneminde fibroblastların bu bölgeye göçünü artırarak kollajen sentezini arttırmaktadır ancak bu artan fibroblast aktivitesinin uzun süre devam etmesi kemik iyileşmesini olumsuz yönde etkilemektedir (79). Yine benzer bir bakış açısıyla değerlendirdiğimizde; Ezoddini ve ark. (70) rat tibialarında oluşturdukları defekte Chitosan uygulaması sonrası yeni kemik oluşumuna olumlu etkilerini gözlemledikleri çalışmalarında, ilk haftada gözlenen fibrozisin ikinci haftada azaldığı ve dördüncü haftada ise tamamen kaybolduğunu raporlamışlardır. Çalışmamızda CAB uygulanması sonrası yedinci gün incelenen örneklerde; değişen derecelerde fibrozis görülürken, geç dönemlere ait fibrozis skorlarının çalışılmamış olması iyileşmenin geç dönemi hakkında net bir kanıya ulaşmamıza engel teşkil etmektedir. Bu durum çalışmamız için kısıtlılık olarak kabul edilebilir.

SONUÇLAR

Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Acil Tıp Anabilim Dalı'nda planlanan çalışmamızda kemik defekti oluşturulan ratlarda Chitosan Acetate Bandage'nin kemik iyileşmesi üzerine etkisini inceledik.

Çalışmamız Trakya Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarı'nda üniversitemiz Acil Tıp ve Patoloji Anabilim Dallarının ortaklaşa çalışması ile gerçekleştirilmiştir. Deneysel olarak kemik defekti oluşturulan ratlarda Chitosan Acetate Bandage'nin kemik iyileşmesi üzerine etkisi; rat tibia kemiğindeki histopatolojik değişiklikler değerlendirilerek şu sonuçlara ulaşıldı:

1. Kemik defekti oluşturulmasının 7. gününde gruplar arası osteoblastik aktivite skorları (Evre 4) karşılaştırıldığında; Chitosan uygulanan grupta osteoblastik aktivite skoru, normal salin uygulanan gruba göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek tespit edildi.
2. Kemik defekti oluşturulmasının 7. gününde gruplar arası inflamatuvar yanıt skorları (Evre 4) karşılaştırıldığında; Chitosan uygulanan grupta inflamatuvar yanıt skoru, normal salin uygulanan gruba göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek tespit edildi.
3. Kemik defekti oluşturulmasının 7. gününde gruplar arası fibrozis skorları (Evre 3, 4) karşılaştırıldığında; Chitosan uygulanan grupta fibrozis skoru, normal salin uygulanan gruba göre yüksek olmasına rağmen, istatistiksel olarak anlamlı değildi.
4. Kemik defekti oluşturulan ratlarda kullandığımız Chitosan Acetate Bandage'nin kemik iyileşmesi üzerine etkisinin, histopatolojik değerlendirmeler göz önüne alındığında olumlu olabileceği sonucuna varılmıştır.

5. Çalışmamızda tek başına histopatolojik değerlendirmeler göz önüne alınmış olup, gelecekte birlikte yapılacak olan histopatolojik ve biyokimyasal değerlendirmelerle daha kapsamlı olabilecek sonuçlara ulaşılabilir.

ÖZET

Kırık iyileşmesi, oldukça karmaşık patofizyolojik olayları içermesi ve sağaltımında multidisipliner yaklaşımlara gerek olmasından dolayı araştırmacıların üzerinde birçok çalışma yaptıkları bir alandır. Kırık iyileşmesini olumlu etkileyen ajanların bir kısmı klinikte kullanım alanı bulmuştur. Kemik iyileşmesinde kullanılan ideal materyalin kemik onarımı üzerine etkili, uygulanması kolay nitelikleri bulunmalıdır.

Bölümümüzde planlanan ve Trakya Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarı'nda ve üniversitemiz Acil Tıp ve Patoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilen çalışmamızda kemik defekti oluşturulan ratlarda Chitosan Acetate Bandage'nin kemik iyileşmesi üzerine etkisini inceledik.

Tibiasında kemik defekti oluşturulan ve her biri on rat içeren iki çalışma grubu oluşturuldu. Birinci grupta; defekt serum fizyolojik ile irrigate edildi ve 7. günde kemik segmenti alındı. İkinci grupta; defekte Chitosan Acetate Bandage emdirildi ve 7. günde kemik segmenti alındı.

Örnekler osteoblastik aktivite, inflamatuvar yanıt ve fibrozis skorları yönünden histopatolojik olarak değerlendirildi. İstatistiksel analizler için ki kare testi kullanıldı. Tüm istatistikler için anlamlılık sınırı $p < 0.05$ kabul edildi.

Yedinci gün değerlendirilen osteoblastik aktivite (Evre 4), inflamatuvar yanıt (Evre 4) skorları Chitosan uygulanan grupta normal salin uygulanan gruba göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek tespit edilirken, fibrozis skorları (Evre 3, 4) yönünden gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmedi.

Sonuç olarak kemik defekti oluşturulan ratlarda Chitosan Acetate Bandage'nin kemik iyileşmesi üzerine histopatolojik değerlendirmeler göz önüne alındığında olumlu olabileceği sonucuna varılmıştır.

Anahtar kelimeler: Chitosan Acetate, kemik iyileşmesi, travma

EFFECTS OF CHITOSAN ACETATE ON EARLY BONE HEALING IN THE RATS THAT CREATE BONE DEFECT

SUMMARY

Bone healing is a complex process which includes pathophysiologic events that need a multidisciplinary approach. Because of that most authors have studies on this process. The agents which effect the bone healing positively, have a clinic usage. The best material to use for bone healing have to be effected on bone repair, and easy to use.

In our study, which is planned in our department and carried out in Trakya University Experimental Animal Studies Laboratory, we aimed to investigate the effects of Chitosan Acetate Bandage on bone healing.

Two separate study groups were formed each one including ten rats that crate defects on their tibias. In the first group, the defect had been irrigated by serum phisiologic and the bone biopsies had taken form bone on the seventh day. In the second group, Chitosan Acetate Bandage had applied to the defect and the bone biopsies had taken form bone on the seventh day.

The samples evaluated histopathologically for osteoblastic activite, inflamatory response and fibrosis scores. Ki kare test was employed to statistically analysis of the data and the significance line accepted as $p < 0.05$.

Osteoblastic activite (Stage 4) and inflamatory response (Stage 4) were statistically significant high in Chitosan group according to normal salin group. However There were no statistically significant results for fibrosis scores (Stage 3, 4) between two groups.

As a result; we determined positive effects of Chitosan Acetate on rats, that have bone defects, by histopathologic evaluations.

Key words: Chitosan Acetate, bone healing, trauma

KAYNAKLAR

1. Turan A. Akut Lomber Medulla Spinalis Yaralanmasının Kırık İyileşmesi Üzerindeki Etkisi (tez). İzmir: İzmir Eğitim Araştırma Hastanesi; 2009.
2. Aydınöğlu A. Heparinize Ratlarda Oluşturulan Deneysel Femoral Arter Kanama Modelinde Lokal ‘Microporous Polysaccharide Hemosphere (traumadex®)’ Toz Uygulamasının Hemostaz Süresine Etkisi (tez). İzmir: Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakóltesi; 2007.
3. Çolak H. Kemik Kırık İyileşmesinde *Dolichousnea Longissima Articus (Ach.)* Liken Türünden Elde Edilen Usnik Asidin Etkilerinin İncelenmesi (tez). Erzurum: Atatürk Üniversitesi Tıp Fakóltesi; 2009.
4. Güzel N. *Ginkgo Biloba (EGB 761)*’nın Sıçanlarda Kırık İyileşmesi Üzerine Etkisi (tez). Trabzon: Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakóltesi; 2011.
5. Dökmeci Ö. İbandronat’ın Rat Tibia Modelinde Kırık İyileşmesi Üzerine Etkisi (tez). Kahramanmaraş: Sütçü İmam Üniversitesi Tıp Fakóltesi; 2011.
6. Çolak M. Mizoprostolün Kırık İyileşmesine Etkisi (tez). Mersin: Mersin Üniversitesi Tıp Fakóltesi; 2004.
7. Holcomb JB. Methods for improved hemorrhage control. *Critical Care* 2004;8:57-60.
8. Alam HB, Uy GB, Miller D, Hancock T, Anderson D, Inocencio R et al. Comparative analysis of hemostatic agents in a swine model of lethal groin injury. *J Trauma* 2003;54:1077-82.
9. Akça KM. Sıçan Segmenter Kemik Defekti Modelinde Trombositten Zenginleştirilmiş Plazmanın Kırık İyileşmesi Üzerine Etkisi (tez). Zonguldak: Bülent Ecevit Üniversitesi; 2012.

10. Oktaş B. Extrakorporeal Şok Dalgası Tedavisinin Normal ve Deperioste Rat Femurlarında Kırık İyileşmesi Üzerine Etkilerinin Karşılaştırılması (tez). Düzce: Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi; 2008.
11. Bostan K, Aldemir T, Aydın A. Kitosan ve antimikrobiyal aktivitesi. Türk Mikrobiyol Cem Derg 2007;37(2):118-27.
12. Montazer M, Afjeh G. Simultaneous x-linking and antimicrobial finishing of cotton fabric. J Appl Polym Sci 2007;103:178-85.
13. Junquiera LC, Carneiro J. Kemik. Aytekin Y, Solakoğlu S (Editörler). Temel histoloji'de. İstanbul: Nobel Tıp Kitap Evleri; 2006:141-52.
14. Naftel JP, Daley WP, Lynch CJ, Haines ED, Yang G, Fratkin JD. Cartilage and bone. In: Cui D (Eds.). Atlas of histology with functional and clinical correlations. 1th ed. Philadelphia: Lippincott Williams; 2011:79-98.
15. Eroschenko VP. Cartilage And Bone. In: Di Fiore's atlas of histology with functional correlations. 11th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2008:79-91.
16. Ross MH, Wojciech P. Bone. In: Histology a test and atlas, with correlated cell and molecular biology. 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2011:218-52.
17. Kumar A, Mitchell F. The musculoskeletal system. In: Kumar V, Abbas AK, Fausto N (Eds.). Robbins basic pathology. 8th ed. Philadelphia: Elsevier; 2007:787-95.
18. Burkitt HG, Young B. Wheater's funtional histology a test colour atlas. 3rd ed. Philadelphia: Churchill Livingstone; 1994:173-86.
19. Anglen JO. Fractures and multitrauma in adults. In: Green W (Eds.). Netter's orthopaedics. Saunders; 2005:194-214.
20. Levison DA, Reid R, Burt AD, Harrison DJ, Fleming S. The locomotor system. In: Muir's testbook of pathology. 14th ed. London: Bookpower; 2008:330-3.
21. Parvizi J. Bone. In: Pepper D, Hetherington P (Eds.). High yield orthopaedics. 1st ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2010:61-3.
22. Hoch B, Klein M, Schiller A. Bones and joints. In: Rubin's pathology: clinicopathologic foundations of medicine. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2008:1086-9.
23. Kılıçoğlu SS. Mikroskopik düzeyde kırık iyileşmesi. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası 2002;55(2):143-50.
24. Yörükoğlu AÇ. Sıçan Modelinde Oluşturulan Kemik Defektlerinde Hücre Kültürü Ortamında Mezenkimal Kök Hücrelerden Elde Edilen Membranının Kırık Kaynaması Üzerine Etkisinin İncelenmesi (tez). Denizli: Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi; 2012.

25. Canter Hİ. Kalvaryal Kemik Defekti Modelinde Bone Morphogenic Protein-2 ve Transforming Growth Factor-B Kullanılmasının Allogreft Yaşamına Etkisi (tez). Ankara: Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi; 2003.
26. Palma D. The management of fractures and dislocations. 2nd ed. London: W. B. Saunders Co, 1970:10-2.
27. Cruess RL. Healing of bone, tendon and ligament. In: Fractures. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott Co; 1984:147-67.
28. Miller MD. Review of orthopaedics. 2nd ed. W. B. Saunders Co, 1996:1-22.
29. Anwar R, Tuson KW, Khan SA. Classification and diagnosis in orthopaedic trauma. New York: Cambridge University Press, 2008:20-2.
30. Rüedi TP, Murphy WU. Femur kırıkları (çeviri: M. Kapıcıoğlu). Ağuş H (Editör) Kırık tedavisinde AO kuralları'nda. İstanbul: Nobel Kitabevi; 2007:457-67.
31. Buckwalter JA, Marsh JL. Bone and fracture healing. In: Rockwood CA, Bucholz RW, Brown CMC, Heckman JD, Tornetta P (Eds.). Rockwood and Green's Fractures in adults. Philadelphia: Lippincott-Williams-Wilkins; 2001:97-105.
32. Khan SN. Bone growth factors. Orthop Clin North Am 2000;31(3):375-88.
33. Gemalmaz CH. Kaviter Kemik Defektlerinin İyileşmesinde Otojen Periost ve Seramik Kompozit Greftinin Etkisi (tez). Ankara: Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi; 2007.
34. Songür M. Kaviter Kemik Defektlerinin Tedavisinde Xeno-osteoidüktif Kemik Protein Ekstraktının Kullanımı (tez). Ankara: Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi; 2007.
35. Buckwalter JA, Marsh JL. Bone and fracture healing. In: Rockwood CA, Bucholz RW, Brown CMC, Heckman JD, Tornetta P (Eds.). Rockwood and Green's Fractures in adults. Philadelphia: Lippincott-Williams-Wilkins; 2001:245-69.
36. Alam HB, Burris D, DaCorta JA, Rhee P. Hemorrhage control in the battlefield: role of new hemostatic agents. Milit Med 2005;170:63-8.
37. Kozen BG, Kircher SJ, Henao J, Godinez FS, Johnson AS. An alternative hemostatic dressing: comparison of CELOX, HemCon, and QuikClot. Acad Emerg Med 2008;15(1):74-81.
38. Göker H, Haznedaroğlu IC, Erçetin S, Kirazlı S, Akman U, Öztürk Y, et al. Haemostatic actions of the folkloric medicinal plant extract ankaferd blood stopper. J int Med Res 2008;36(1):163-70.
39. Oungbho K, Müller BW. Chitosan sponges as sustained release drug carriers. Int J Pharm 1997;156(2):229-37.
40. Duman SS, Şenel S. Kitosan ve veteriner alandaki uygulamaları. Veteriner Cerrahi Dergisi 2004;10(3-4):62-72.

41. Sandford PA. Chitosan: commercial uses and potential applications. In: Skjak-Brack G, T. Anthonsen, P. Sandford (Eds.). Chitin and chitosan sources, chemistry, biochemistry, physical properties and applications. England: Elsevier Science Publishers Ltd; 1989:51-69.
42. Berger J, Reist M, Mayer JM, Fel O, Peppas NA, Gurny R. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. *Eur J Pharm Biopharm* 2004;57:19-34.
43. Mucha M, Michalak I, Balcerzak J, Tylman M. Chitosan scaffolds, films and microgranules for medical application-preparation and drug release studies. *Polimery* 2012;57(10):714-21.
44. Bansal V, Sharma PS, Sharma N, Pal OP, Malviya R. Applications of chitosan and chitosan derivatives in drug delivery. *Advan Biol Res* 2011;5(1):28-37.
45. Hai L, Diep TB, Nagasawa N, Yoshii F, Kume T. Radiation depolymerization of chitosan to prepare oligomers. *Nucl Instr and Meth in Phys Res B* 2003;208:466-70.
46. No HK, Park NY, Lee SH, Meyers PS. Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. *Int J Food Microbiol* 2002;74(1-2):65-72.
47. Sarrag AD, Yassen AD. The effect of chitosan on osteogenesis, histological study in rabbits. *Bas J Surg* 2008;14:60-5.
48. Klokkevold PR, Vandemark L, Kenney EB, Bernard GW. Osteogenesis enhanced by chitosan (poly-Nacetyl glucosaminoglycan) in vitro. *J Periodontol* 1996;67(11):1170-5.
49. Lee JY, Nam SH, Im SY, Park YJ, Lee YM, Seol YJ, et al. Enhanced bone formation by controlled growth factor delivery from chitosan-based biomaterials. *J Control Release* 2002;78:187-97.
50. Greene AH, Bumgardner JD, Yang Y, Moseley J, Haggard WO. Chitosan-coated stainless steel screws for fixation in contaminated fractures. *Clin Orthop Relat Res* 2008;466(7):1699-704.
51. Jeon YJ, Park PJ, Kim SK. Antimicrobial effect of chitooligosaccharides produced by bioreactor. *Carbohydr Polym* 2001;44(11):71-6.
52. Tsai GJ, Su WH, Chen HC, Pan CL. Antimicrobial activity of shrimp chitin and chitosan from different treatments and applications of fish preservation. *Fisheries Sci* 2002;68:170-7.
53. Gerasimenko DV, Avdienko ID, Bannikova GE, Zueva OY, Varlamov VP. Antibacterial effects of water-soluble low-molecular-weight chitosans on different microorganisms. *Appl Biochem Microb* 2004;40:253-7.
54. Cuero RG, Osuji G, Washington A. N-Carboxymethyl chitosan inhibition of aflatoxin production: role of zinc. *Biotechnol Letters* 1991;13:441-4.

55. Rao SB, Sharma CP. Use of chitosan as a biomaterial: studies on its safety and hemostatic potential. *J Biomed Mater Res* 1997;34(1):21-8.
56. Ravi Kumar MNV. A review of chitin and chitosan applications. *React Funct Polym* 2000;46:1-27.
57. Arbel J, Rozenbaum E, Reges O, Neuman Y, Levi A, Erel J, et al. Usage of chitosan for femoral (USF) haemostasis after percutaneous procedures: a comparative open label study. *EuroIntervention* 2011;6(9):1104-9.
58. Belman A, Daya M, Steve M, Worley J. From the battlefield to the street-experience of a suburban fire/ems agency with chitosan dressing. *Emergency Medicine & Critical Care Review* 2006.
59. Ueno H, Mori T, Fujinaga T. Topical formulations and wound healing applications of chitosan. *Adv Drug Deliv Rev* 2001;52(2):105-15.
60. Ueno H, Murakami M, Okumura M, Kadosawa T, Uede T, Fujinaga T. Chitosan accelerates the production of osteopontin from polymorphonuclear leukocytes. *Biomaterial*. 2001;22(12):1667-73.
61. Boucard N, Viton C, Agay D, Mari E, Roger T, Chancerelle Y, et al. The use of physical hydrogels of chitosan for skin regeneration following third-degree burns. *Biomaterials* 2007;28(24):3478-88.
62. Çakmak A, Çırpanlı Y, Bilensoy E, Yorgancı K, Çalış S, Sarıbaş Z, et al. Antibacterial activity of triclosan chitosan coated graft on hernia graft infection model. *Int J Pharm* 2009;381(2):214-9.
63. Burkatovskaya M, Tegos GP, Swietlik E, Demidova TN, Castano AP, Hamblin MR. Use of chitosan bandage to prevent fatal infections developing from highly contaminated wounds in mice. *Biomaterials* 2006;27(22):4157-64.
64. Dai T, Tegos GP, Burkatovskaya M, Castano AP, Hamblin MR. Chitosan acetate bandage as a topical antimicrobial dressing for infected burns. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53(2):393-400.
65. Minami S, Okamoto Y, Tanioka S, Sashiwa H, Saimoto H, Matsubishi A, et al. Effects of chitosan on wound healing. In: Yalpani M. (Eds.). *Frontiers in biomedicine and biotechnology vol 1*. Mount Prospect, ATL Press; 1993:141-52.
66. Rall JM, Cox JM, Songer AG, Cestero RF, Ross JD. Comparison of novel hemostatic dressings with QuikClot combat gauze in a standardized swine model of uncontrolled hemorrhage. *J Trauma Acute Care Surg* 2013;75(2):150-6.
67. Laboratuar hayvanlarının bakım ve kullanım kılavuzu NIH Publication 1985;85(23).

68. Dinç MH. Sıçanlarda formaline maruz bırakılmış kemikte kırık sonrası mezenkimal kök hücre tedavisi ile kırık kaynamasının ve kemiğin yeniden oluşumunun değerlendirilmesi (tez). İzmir: İzmir Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi; 2009.
69. Brond AR, Rubin TC. Fracture healing. In: Surgery of the musculoskeletal system. New York: Churchill Livingstone; 1990:93-114.
70. Ardakani FE, Navabazam A, Fatehi F, Ardakani MD, Khadem S, Rouhi G. Histologic evaluation of chitosan as an accelerator of bone regeneration in microdrilled rat tibias. Dent Res J 2012;9(6):694-9.
71. Spin-Neto R, Coletti FL, Freitas RM, Pavone C, Campana-Filho SP, Marcantonio RAC. Chitosan-based biomaterials used in critical-size bone defects: radiographic study in rat's calvaria. Rev Odontol UNESP 2012;41(5):312-7.
72. Spin-Neto R, Freitas RM, Pavone C, Cardoso MB, Campana-Filho SP, Marcantonio RA, et al. Histological evaluation of chitosan-based biomaterials used for the correction of critical size defects in rat's calvaria. J Biomed Mater Res A 2010;93:107-4.
73. Usui Y, Aoki K, Narita N, Murakami N, Nakamura I, Nakamura K, et al. Carbon nanotubes with high bone-tissue compatibility and bone-formation acceleration effects. Small 2008;4:240.
74. Demir A, Seventekin N. Kitin, kitosan ve genel kullanım alanları. TTED 2009;3(2):92-103.
75. Shin SY, Park HN, Kim KH, Lee MH, Choi YS, Park YJ, et al. Biological evaluation of chitosan nanofiber membrane for guided bone regeneration. J Periodontol 2005;76:1778-84.
76. Li H, Ge Y, Zhang P, Wu L, Chen S. The effect of layer-by-layer chitosan-hyaluronic acid coating on graft-to-bone healing of a poly (ethylene terephthalate) artificial ligament. J Biomater Sci Polym Ed 2012;23:425-38.
77. Usami Y, Okamoto Y, Takayama T, Shigemasa Y, Minami, S. Chitin and chitosan stimulate canine polymorphonuclear cells to release leukotriene B4 and prostaglandin E2. J Biomed Mat Res 1998;42:517-22.
78. Mori T, Okumura M, Matsuura M, Ueno K, Tokura S, Okamoto Y, et al. Effects of chitin and its derivatives on the proliferation and cytokine production of fibroblasts in vitro. Biomaterials 1997;18:947-51.
79. Asikainen AJ, Hagström J, Sorsa T, Noponen J, Kellomaki M, Juuti H. Soft tissue reactions to bioactive glass 13-93 combined with chitosan. J Biomed Mater Res A 2007;83(2):530-7.
80. Kosaka T, Kaneko Y, Nakada Y, Matsuura M, Tanaka S. Effect of chitosan implantation on activation of canine macrophages and polymorphonuclear cells after surgical stress. J Vet Med Sci 1996;58(10):963-7.

EKLER

Ek 1

T.C.

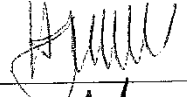
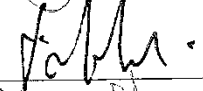
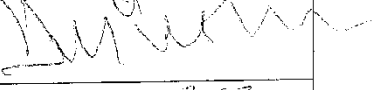

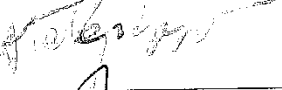
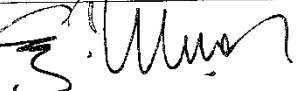

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARLARI

EDİRNE

Oturum Sayısı: 09
KARAR NO: 2012.09.01

Karar Tarihi: 07.12.2012

Yürütücülüğünü Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Mustafa Burak Sayhan'ın yaptığı Araş. Gör. Dr. Ebru Güler'in Tıpta Uzmanlık tezi olarak planlanan TÜHDYEK-2012/83 protokol nolu "Kemik Defekti Oluşturulan Ratlarda Chitosan Acetate'in Erken Kemik İyileşmesi Üzerine Etkisi" başlıklı çalışma hakkında görüşüldü; araştırmanın amaç, yaklaşım, gereç ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmesi sonucunda; Hayvan Hakları Evrensel Bildirgesi ve etik kurallara uygun olarak hazırlandığına ve çalışmanın yapılabileceğine mevcudun oy birliği ile karar verilmiştir.

Ünvanı/Adı/Soyadı	Araştırma ile İlişki	Toplantı Katılımı	İmza
Doç.Dr. Burhan AKSU Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi	<input type="checkbox"/> var <input type="checkbox"/> yok	<input type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Yrd.Doç. Dr. Hayati ARDA Fen-Edebiyat Fakültesi Öğretim Üyesi	<input type="checkbox"/> var <input checked="" type="checkbox"/> yok	<input checked="" type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Vet.Hek. Ziya ÇUKUR Veteriner Hekim	<input type="checkbox"/> var <input type="checkbox"/> yok	<input type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Hüseyin KOÇ Sivil Toplum Örgütü Üyesi Sivil Üye	<input type="checkbox"/> var <input type="checkbox"/> yok	<input type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Yrd.Doç.Dr. Beytullah ÖZKAN Fen-Edebiyat Fakültesi Öğretim Üyesi	<input type="checkbox"/> var <input checked="" type="checkbox"/> yok	<input checked="" type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Doç.Dr. Y. Atakan SEZER Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi	<input type="checkbox"/> var <input type="checkbox"/> yok	<input type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Doç. Dr. Enis ULUÇAM Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi	<input type="checkbox"/> var <input checked="" type="checkbox"/> yok	<input checked="" type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Yrd.Doç.Dr.Hakan GÜRKAN Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi	<input type="checkbox"/> var <input checked="" type="checkbox"/> yok	<input checked="" type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Osman GÜLTEKİN Sivil Üye	<input type="checkbox"/> var <input type="checkbox"/> yok	<input type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	