

Kemik Defekti Oluşturulan Ratlarda Chitosan Acetate'ın Erken Kemik İyileşmesi Üzerine Etkisi

Effects of Chitosan Acetate on Early Bone Healing in The Rats That Create Bone Defect

Ebru Güler¹, Mustafa Burak Sayhan², Ömer Salt², Mert Çiftdemir³, Nuray Can⁴

¹Aksaray Devlet Hastanesi Acil Servis, Türkiye

²Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Acil Tıp Anabilim Dalı Edirne, Türkiye

³Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı Edirne, Türkiye

⁴Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı Edirne, Türkiye

Öz.

Amaç: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. Çalışmamızda kemik defekti oluşturulan ratlarda Chitosan Acetate Bandage'nin kemik iyileşmesi üzerine etkisini inceledik.

Materyal ve Metod: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, inflammatuar yanıt ve fibrozis skorları yönünden histopatolojik olarak değerlendirildi. İstatiksel analizler için ki kare testi kullanıldı. Tüm istatistikler için anlamlılık sınırı $p<0.05$ kabul edildi.

Bulgular:Yedinci gün değerlendirilen osteoblastik aktivite (Evre 4), inflammatuar 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: 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

ABSTRACT

Aim: 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, we aimed to investigate the effects of Chitosan Acetate Bandage on bone healing.

Materials and Methods: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 physiologic 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, inflammatory response and fibrosis scores. Ki kare test was employed to statistically analysis of the data and the significance line accepted as $p<0.05$.

Results: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.

Conclusion:We determined positive effects of Chitosan Acetate on rats, that have bone defects by histopathologic evaluations.

Key words: Chitosan Acetate, Bone healing, Trauma

SORUMLU YAZAR /
CORRESPONDING
AUTHOR

Dr. Mustafa Burak Sayhan.

Trakya Üniversitesi Tıp
Fakültesi

Acil Tıp Anabilim Dalı

Balkan Yerleşkesi 22300
Edirne, Türkiye

Tel: +90 532 7000095

Fax: +90 284 2234203

E mail:
mustafaburak@yahoo.com

Geliş tarihi / Received:
12/01/2018

Kabul tarihi / Accepted:
20/03/2018

GİRİŞ

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 Dünya'nın pek çok yerinde toplumsal bir sağlık sorunu haline gelmiştir (1,2). Bu travmaların büyük çoğunluğunda kemik kırıkları oluşmaktadır. Bu kırıklara en kısa zamanda ve en etkin yolla müdahale edilmesi gerekmektedir.

Kırık iyileşmesi yumuşak doku iyileşmesine oranla daha yavaş ilerler. Bu da tedavi sırasında oluşabilecek sorunları beraberinde getirmektedir. Kaynama gecikmesi veya kaynamamanın neden olduğu kronik, fonksiyonel ve fizyolojik bozukluk, artan hasta morbiditesi ve stres gibi sorunların yanında, yol açtığı ekonomik zararlar, araştırmacıları yeni tedavi yöntemleri geliştirmeye yöneltmiştir (2). Kırık iyileşmesini hızlandırmada etkili, düşük maliyetli ve güvenilir tedavi yöntemleri geliştirilmesi hem hastanın günlük yaşantısına daha erken dönmesini sağlayacak, hem de tedavi maliyetlerinde azalmaya neden olacaktır (3). Kırık iyileşmesini etkileyen faktörler ve tedavi şekilleri ile ilgili birçok çalışma yapılmış, bunların bir kısmı da klinik pratikte kullanılmaktadır (4,5).

Chitin; yengeç, karides gibi kabuklu deniz canlılarının dış iskeletlerinde, kelebek kanatlarında, bazı bakteri ve mantarların hücre duvarlarında yer alan ve doğada selülozdan sonra ikinci sıklıkta bulunan polimer yapılı biyolojik bir materyaldir (6). Chitin'in deasetilasyonu ile elde edilen, reaktif fonksiyonel amino grupları sayesinde çeşitli fonksiyonlar kazanan chitosan'ın çeşitli tıp ve eczacılık alanlarında kullanımı araştırılmaktadır (7,8,9).

Son yıllarda, Chitosan içeren bandajların insan vücuduna toksik etkileri olmadığı yapılan çalışmalarla gösterilmiş ve dokular üzerine

hemostatik ve antimikrobiyal etkileri göz önünde bulundurularak klinik kullanıma girmiştir (7,10-13).

Literatürde Chitosan'ın doku rejenerasyonunda etkili olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur ancak kemik iyileşmesi üzerinde etkisini gösteren kısıtlı sayıda çalışma tespit edilmiştir. Bu çalışmada; deneysel olarak kemik defekti oluşturulan ratlarda Chitosan Acetate Bandage'in (CAB) (HemCon®, HemCon Medical Technologies Inc. (Portland,Oregon,USA) erken kemik iyileşmesi üzerine etkisi incelendi.

MATERYAL VE METOD

Bu çalışma Ulusal Sağlık Enstitüsünün yayınladığı, "Laboratuar Hayvanlarının Bakım Ve Kullanım Kılavuzu" na uygun şekilde planlanmış ve yürütülmüştür. Etik Kurul 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.

Çalışma grupları

Grup NaCl (n= 10): Kemik defekti oluşturulması sonrasında defektin serum fizyolojik ile irrije edilmesi 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 kemik segmenti alınan grup.

Deneklere uygulanan anestezi protokolü Deneklerin, 50 mg/kg dozda ketamine hydrochloride (Ketalar®; Pfizer İlaçları Ltd.Sti, İstanbul, Türkiye) ve 10 mg/kg xylazine hydrochloride (Rompun®; Bayer, Türk Kimya San. Ltd. Sti. İstanbul, Türkiye) intramuskuler enjeksiyonu ile anestezisi sağlandı.

Defekt oluşturma

Lokal saha temizliği Polividon İyot (Batticon® Antiseptik Solüsyon, Adeka İlaç Sanayi ve Ticaret A.Ş., İstanbul, Türkiye) ile yapıldı. Tibia distalinde, anterior cilt üzerinde 5 mm uzunluğunda longitudinal cilt insizyonu yapıldı. 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, genişliği 1 mm, derinliği 1 mm olacak şekilde kemik defekti elektrikli matkap kullanılarak oluşturuldu. Kemik defektinin uygunluğunun sağlanması için matkap ucuna defekt boyutuna karşılık gelen boyutlara sahip 1 mm uzunlukta işaretlenmiş 1 mm çapında paslanmaz çelik stent yerleştirildi. Oluşturulan defekt sonrasında grup NaCl'de defekt sadece serum fizyolojik ile irrije edildi ve herhangi bir ilaç uygulanmadı. Grup CAB'de defekte uygun boyutta CAB kesilerek defekt yüzeyi kapatıldı.

Her iki grupta da 5/0 polypropylene (Prolene®; Ethicon, USA) sütür materyali 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 gelişmedi. 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. Denekler 7 gün boyunca herhangi bir diyet kısıtlaması yapılmadan standart rat yemi ve çeşme suyu ile beslendi.

Deneyin 7. gününde kemik defekti oluşturulmasında kullanılan anestezi yöntemiyle ratların anestezisi sağlandıktan sonra, 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. Diz eklemine stabilize eden anterior kapsül,

çapraz bağlar ve posterior kapsül anteriordan posteriora doğru ayrıldı.

Tibianın anteromedial yüzünden tibialis anterior kasının diseksiyonu gerçekleştirildi. Peroneal kaslar tibianın posterolateral yüzünden diseke edildi ekstansör ve fleksör kaslar anterior ve posterior tibiadan proksimalden distale diseke edilerek ayak bileğine ulaşıldı. Aşıl tendonu ve ayak bileği eklem kapsülü kesilerek bacak segmenti yumuşak dokudan arındırıldı. Denekler diz ve ayak bileği dezartikülasyonu uygulanmak suretiyle tibiaları alındıktan sonra, servikal dislokasyon yöntemi ile sakrifiye edildi.

Doku hazırlanması ve histopatolojik inceleme Histopatolojik inceleme için alınan her bir kemik segmentinin % 10'luk formaldehid solüsyonu içerisinde bir gece +40 C de fikse edilmesini takiben, bu segmentler saline ile yıkandı ve yeterli dekalsifikasyon sağlanana kadar formik asitte bekletildi. Fiksasyon sonrasında parafine gömülen segmentler ince kesitler elde edilecek şekilde mikrotom ile kesildi. Doku kesitleri Hematoksilin-Eozin ve Mason-Trikrom boyası ile boyanarak çalışma hakkında bilgisi olmayan bir patoloji uzmanı tarafından kör olarak ışık mikroskopunda kantitatif olarak değerlendirildi.

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 (14).

İstatistiksel analiz

İstatistiksel değerlendirme, SPSS 20 istatistik programı kullanılarak yapıldı. Grup içi karşılaştırmalarda gruplar normal dağılım göstermediği için Kruskal Wallis tek yönlü varyans analizi ve çoklu karşılaştırma yöntemi olarak Mann-Whitney U testi kullanıldı. Grupların kendi aralarındaki karşılaştırmalarda $p < 0.01$, diğer karşılaştırmalarda ise $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

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

Grupların inflamatuvar yanıt skoru evrelerine göre dağılımı Tablo 1'de ayrıntılı olarak verilmiştir.

Tablo 1. Grupların inflamatuvar yanıt skoru evrelerine göre dağılımı

İnflamatuvar Yanıt Skoru	Grup NaCl (n=10)	Grup CAB (n=10)	p*
Evre I	4	0	0.143
Evre II	4	0	0.143
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 Evre 4 inflamatuvar yanıt skorlarının değerlendirildiği histopatolojik görüntü örnekleri Şekil 1'de verilmiştir.

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

Grupların osteoblastik aktivite skoru evrelerine göre dağılımı Tablo 2'de ayrıntılı olarak verilmiştir.

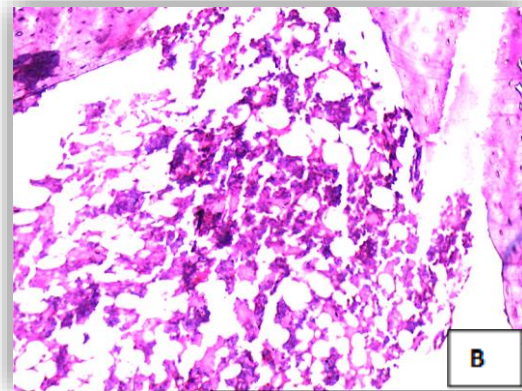
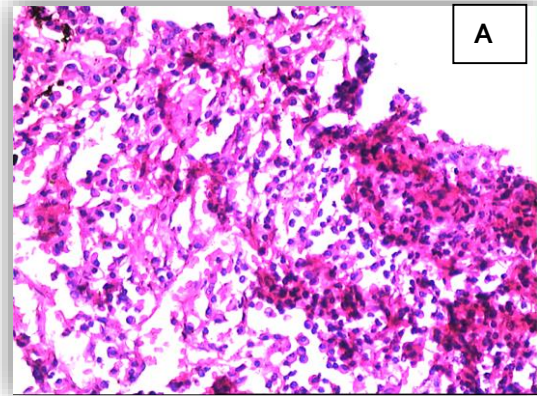
Tablo 2. Grupların osteoblastik aktivite skoru evrelerine göre dağılımı

Osteoblastik Aktivite Skoru	Grup NaCl (n=10)	Grup CAB (n=10)	p*
Evre I	4	0	0.143
Evre II	5	0	0.116
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 Evre 4 osteoblastik aktivite skorlarının değerlendirildiği histopatolojik görüntü örnekleri Şekil 2'de verilmiştir.



Şekil 1. Evre 4 inflamatuvar yanıt skorunun histopatolojik değerlendirilmesi:

A-NaCl grubu, B-CAB grubu (H&EX100)

Histopatolojik değerlendirmede kemik defekti oluşturulmasının 7. gününde gruplar arası fibrozis skorları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilmedi. Grupların fibrozis skoru evrelerine göre dağılımı Tablo 3'te ayrıntılı olarak verilmiştir.

TARTIŞMA

Kırık; iç veya dış kuvvetler sonrası kemiğin anatomik bütünlüğünün tam veya kısmen bozulması olarak tanımlanabilir (15). Kırık iyileşmesi, oldukça karmaşık patofizyolojik olayları içermesi ve sağaltımında multidisipliner yaklaşımlara gerek duyulması nedeniyle üzerinde araştırmacıların pek çok çalışma yürüttükleri bir alandır. Kırık iyileşmesini olumlu etkileyen ajanların bir kısmı kendine klinikte kullanım alanı bulmuştur (4,5,11,16,18).

göstererek yara iyileşmesini hızlandırması doku mühendisliği alanında yeni ufuklar açmaktadır (7,9,11,13).

Shin ve ark. (19) tibia hasarında deri altı bağ dokusuna nanofiber Chitosan membranlarını implante ederek yaptıkları çalışmada, Chitosan'ın kemik iyileşmesi üzerine olumlu etkilerinin olduğunu rapor etmişlerdir. Ardakani ve ark. (11) ise rat tibiasında oluşturdukları defekte Chitosan'ı toz halinde uygulamışlar ve yeni kemik oluşumunun anlamlı derecede arttırdığını 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 absorsiyonu artırmayı amaçladık.

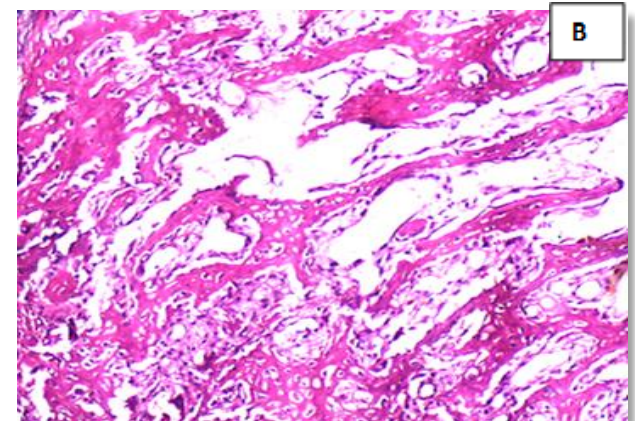
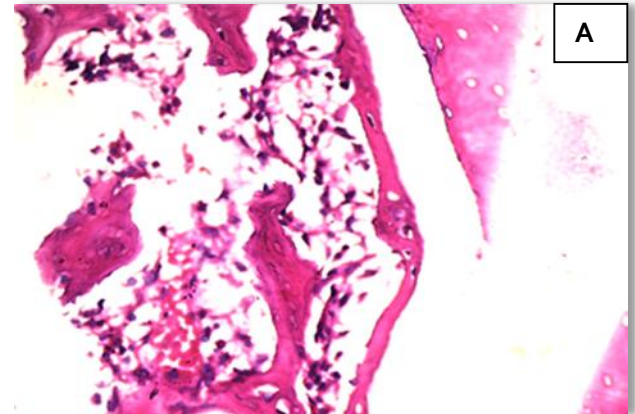
Tablo 3. Grupların fibrozis skoru evrelerine göre dağılımı

Fibrozis Skoru	Grup NaCl (n=10)	Grup CAB (n=10)	p*
Evre I	4	0	0.143
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.

Kemik iyileşmesinde kullanılan ideal materyal; kemik onarımı üzerine etkili ve kolay uygulanabilir nitelikte olmalıdır. 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 (8,11,12,13). Chitosan'ın toz, jel, sulandırılmış formu ve bandaj şeklinde kullanım türleri bulunmaktadır. Chitosan antimikrobiyal ajan olarak, kemik dokusunun yerini alarak ve hemostatik aktivite



Şekil 2. Evre 4 osteoblastik aktivite skorunun histopatolojik değerlendirilmesi: A-NaCl grubu, B-CAB grubu (H&EX100)

Li ve ark. (20) tavşanlarda eklem dışı tendon-kemik iyileşme modelini kullanarak yaptıkları çalışmada greftin kemiğe tutunduğu yüzeyde Chitosan'ın mikroskobik olarak osteogenezi arttırdığını rapor etmişlerdir. Bununla birlikte Spin Neto ve ark. (12) 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 (11-13). Bu durumun uygulanan teknik, seçilen denek ve farklı kemik yapılarından kaynaklanabileceğini düşünmekteyiz.

Kemik defektindeki iyileşmenin daha iyi değerlendirilebilmesi amacıyla akut dönemde inflamasyonun göstergeleri olan inflamatuvar hücrelerin ve sinyal proteinlerinin durumunu inceleyen çalışmalar mevcuttur (6,11,19,20).

Usami ve ark. (21) Chitosan'ın inflamatuvar hücrelerin hasarlı bölgeye göçünü ve iyileşmeyi aktive eden sinyal proteinlerinin salgılanmasını arttırdığı 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 (6,12,21,22). Bizim çalışmamızda da kemik iyileşmesinin erken döneminde Chitosan'ın inflamasyonu arttırdığı tespit edildi. Burada Chitosan'ın inflamatuvar mediatör salınımını artırmasının etkili olduğunu düşünmekteyiz.

Asikainen ve ark. (23) yaptıkları bir çalışmada, 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 artan fibroblast aktivitesinin uzun süre devam

etmesi kemik iyileşmesini olumsuz yönde etkilemektedir. Yine benzer bir bakış açısıyla değerlendirdiğimizde; Ardakani ve ark. (11) 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.

Kısıtlılıklar

Çalışmamızda CAB uygulanması sonrası yedinci gün incelenen örneklerde; değişen derecelerde fibrozis görülürken, geç dönemlere ait fibrozis skorlarının çalışmamızın iyileşmenin geç dönemi hakkında net bir kanıya ulaşmamıza engel teşkil etmektedir. Bu durum çalışmamız için bir kısıtlayıcı faktör olarak kabul edilebilir. Çalışmamızda tek başına histopatolojik değerlendirmeler göz önüne alınmış olup, gelecekte birlikte yapılacak olan histopatolojik ve biyokimyasal değerlendirmelerle daha kapsamlı sonuçlara ulaşılabilir.

Sonuç

Kemik defekti oluşturulan ratlarda kullandığımız Chitosan Acetate Bandage'nin kemik iyileşmesi üzerine etkisinin, histopatolojik değerlendirmeler göz önüne alındığında olumlu olabileceğini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Keskinoglu P, İnan F. Analysis of Trauma Cases Admitted To A State Hospital Emergency Department. Gazi Medical Journal 2014; 25: 1-4.
2. Pekdemir M, Cete Y, Eray O, Atilla R, Cevik A.A, Topuzoglu A. Determination of the epidemiological characteristics of the trauma patients. Ulusal Travma Dergisi 2000;64:250-4.
3. Oryan A, Alidadi S, Moshiri A, Maffulli N. Bone regenerative medicine: classic options, novel strategies, and future directions. J Orthop Surg Res 2014; 9(1):18.
4. Toğral G, Arıkan M, Korkusuz P, Hesar R.H, Ekşioğlu M.F. Positive effect of tadalafil, a phosphodiesterase-5 inhibitor, on fracture healing in rat femur. Joint Diseases and Related Surgery 2015;26(3):137-44.
5. Histing T, Marciniak K, Scheuer C, Garcia P, Holstein J.H, Klein M, Matthys R, Pohlemann T, Menger M.D.

- Sildenafil accelerates fracture healing in mice. *J Orthop Res* 2011;29:867-73.
6. Kumar M.N.V.R. A review of chitin and chitosan applications. *React Funct Polym* 2000;46:1-27.
7. 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.
8. No H.K, Park N.Y, Lee S.H, Meyers P.S. Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. *Int J Food Microbiol* 2002;74(1-2):65-72.
9. Gerasimenko D.V, Avdienko I.D, Bannikova G.E, Zueva O.Y, Varlamov V.P. Antibacterial effects of water-soluble low-molecular-weight chitosans on different microorganisms. *Appl Biochem Microb* 2004;40:253-7.
10. Dai T, Tegos G.P, Burkatovskaya M, Castano A.P, Hamblin M.R. Chitosan acetate bandage as a topical antimicrobial dressing for infected burns. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53(2):393-400.
11. Ardakani F.E, Navabzani A, Fatehi F, Ardakani M.D, 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.
12. Spin-Neto R, de Freitas R.M, Pavone C, Cardoso M.B, Campana-Filho S.P, Marcantonio R.A, Marcantonio E. Histological evaluation of chitosan based biomaterials used for the correction of critical size defects in rat's calvaria. *J Biomed Mater Res A* 2010;93:1074.
13. Bostan K, Aldemir T, Aydın A. Kitosan ve antimikrobiyal aktivitesi. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 2007;37(2):118-27.
14. 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.
15. Marsell R, Einhorn T.A. The biology of fracture healing. *Injury* 2011;42(6):551-5.
16. Mountziaris P.M, Mikos A.G. Modulation of the inflammatory response for enhanced bone tissue regeneration. *Tissue Engineering Part B-Reviews* 2008; 14(2):179-86.
17. Gerstenfeld L.C, Cullinane D.M, Barnes G.L, Graves D.T, Einhorn T.A. Fracture healing as a post-natal developmental process: molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. *Journal of Cellular Biochemistry* 2003; 88(5):873-84.
18. Sevimli R, Üzel M. Rat tibia diyafiz kırıklarında deksketoprofen trometamolün kırık iyileşmesi üzerine etkisi. *M. Acta Orthop Traumatol Turc* 2013;47(6):423-9.
19. Shin S.Y, Park H.N, Kim K.H, Lee M.H, Choi Y.S, Park Y.J, Lee Y.M, Ku Y, Rhyu I.C, Han S.B, Lee S.J, Chung C.P. Biological evaluation of chitosan nanofiber membrane for guided bone regeneration. *J Periodontol* 2005;76:1778-84.
20. 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.
21. 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.