T.C.
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ

AYVA ÇEKİRDEĞİ MÜSİLAJI/NANOHİDROKSİAPATİT (AÇM/nHAp) TEMELLİ BİYOİSKELELERİN TAVŞAN ÇENE KEMİĞİNDE (MANDİBULA) OLUŞTURULAN DEFEK ALANININ İYİLEŞMESİNE OLAN ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Proje No: TSA-2022-4022

Bağımsız Araştırma

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:

Dr.Öğr.Üyesi ÇİĞDEM ÇETİN GENÇ
Diş Hekimliği Fakültesi
Ağız Diş Çene Cerrahisi Anabilim Dalı

Projedeki Araştırmacılar

Doç.Dr. Yavuz Emre ARSLAN[1]
Doç.Dr. Burak DERKUŞ[2]
Doç.Dr. Yeşim DENİZ[3]
Dr.Öğr.Üyesi Alpin DEĞİRMENCİ[4]
Arş.Gör. Hilal Deniz YILMAZ[5]

1- ÇOMÜ Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Anabilim Dalı, Rejeneratif Biyomalzemeler Laboratuvarı, Çanakkale
2- Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi, Kimya Anabilim Dalı, Ankara
3- ÇOMÜ Diş Hekimliği Fakültesi Ağız Diş Çene Radyolojisi Anabilim Dalı
4- ÇOMÜ Diş Hekimliği Fakültesi Ağız Diş Çene Cerrahisi Anabilim Dalı, Çanakkale
5- İzmirYüksek Teknoloji Enstitüsü, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, İzmir,

Mart 2024

ÇANAKKALE

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimince Desteklenmiştir. Proje Numarası: TSA-2022-4022

Dr. Öğr. Üyesi Çiğdem ÇETİN GENÇ

Proje Yürütücüsü

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖZET…… 7

ABSTRACT…….. 8

1. GİRİŞ……...9

2. GENEL BİLGİLER……...9

3. GEREÇ ve YÖNTEM……. 15

3.1 Gereç……15

3.2 Yöntem…… 15

3.2.1 Ayva Çekirdeği Müsilajı Üretimi ve Liyofilizasyon İşlemi……..15

3.2.2 QSM/nHAp Temelli 3B İskelelerin Üretimi……..16

3.2.3. QSM/nHAp Temelli 3B İskelelerin Çapraz Bağlaması……...18

3.2.4. Hayvan Deneyi Aşamaları……..19

3.2.5. Real-time PCR Analizi……22

3.2.6. Taramalı Elekron Mikroskopu (SEM) Görüntüleme……..24

3.2.7. Histolojik Analiz……..24

3.2.8. İstatistiksel Analizler……...24

4. BULGULAR…… ……24

4.1. Makroskopik değerlendirme……..24

4.2. Taramalı Elekron mikroskopu (SEM) analizi ……25

4.3. Real-Time PCR……27

4.4. Histolojik Değerlendirme……28

5. TARTIŞMA……31

6. SONUÇ……33

7. KAYNAKLAR……34

RESİMLER DİZİNİ

Sayfa No

Resim 1. Ayva meyvesi (*Cydonia Oblonga* Mill) ve jel üretilmek üzere ayıklanan ayva çekirdekleri ……...…….....**15**

Resim2. Ayva çekirdeklerinden müsilaj ekstraksiyonu ve liyofilizasyon işlemi……..... **16**

Resim 3. Ependorf Tüplerinin içindeki homojen biyomalzeme (A), Teflon kalıplara dökülmüş biyomalzeme (B)…….……..**17**

Resim 4. Liyofilizasyon işlemi …….. .**18**

Resim 5. Teflon kalıp içindeki liyofilize edilmiş iskele ……**18**

Resim 6. Çapraz bağlama yapılmış iskelelerin çalkalayıcıdaki görüntüleri … …….....**19**

Resim 7. Liyofilize edilmiş iskelelerin görüntüleri ……**19**

Resim 8. Deneyin operasyon aşamaları ……...**21**

Resim 9. Deneyin greftleme ve sutürasyon aşamaları…….....**22**

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1. Eksize edilen doku örneklerinin makroskobik görüntüleri……**25**

Şekil 2: QSM/nHAp ve kontrol grubu örneklerinin SEM görüntülerini farklı büyütmelerde (750, 1500 ve 5000X) ve zaman noktalarında görüntüleri (ölçek çubukları 750 ve 1500X için 10 μm'yi ve 5000X büyütme için 1 μm'yi temsil eder)……**26**

Şekil 3: Tavşan diş dokusunun yapısal illüstrasyonu (BioRender'da oluşturulmuştur) ve dentin oluşumunu ortaya çıkaran QSM/nHAp örneklerinden SEM görüntüleri (ölçek çubukları: 10 ve 1 μm)……**26**

Şekil 4. 10., 21., 45. ve 90. gününü takiben eksplante edilen dokular ile gerçekleştirilen gen ekspresyon çalışması sonuçları…….**27**

Şekil 5 : Kemik rejenerasyonunu takiben QSM/nHAp ve kontrol gruplarından alınan kesitlerin 10, 21, 45 ve 90. günlerde HC boyaması yapıldı. (Hematoksilin Eozin (H&E), Alizarin Kırmızısının (AR) histoloji fotoğrafları; 10X; ölçek çubuğu: 200 μm). Kısaltmalar: S, İskele; V, Damar; A, Yağ dokusu; F, Kolajen lifleri; TB-Trabeküler Kemik; O, Osteoblast; CB, Kompakt Kemik; NB, Yeni kemik)……..**30**

Şekil 6: QSM/nHAp'tan HC boyaması ve 10, 21, 45 ve 90. günlerde diş rejenerasyonunu gösteren kontrol bölümleri. (Hematoksilin Eozin (H&E), Alizarin Kırmızısının (AR); 10X; ölçek çubuğu: 200 μm). Kısaltmalar: S, İskele; V, Damar; A, Yağ dokusu; F, Kolajen lifleri; T, Diş tomurcuğu; E, Mine; D, Dentin; od, osteodentin; P, Pulpa; TB-Trabeküler Kemik; O, Osteoblast; CB, Kompakt Kemik; NB, Yeni kemik; MC, Mandibular kanal; Siyah üçgen dişin morfogenezinin başlangıcı)……...**30**

TABLOLAR DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 1. qRT PCR için kullanılan primer dizileri.……..……**23**

Tablo 2: QSM/nHAp ve Deney grubu skorlamalarının örneklerinin puanlama sonuçların istatistiksel analizi……**29**

ÖZET

Kaybedilmiş doku ve organların rejenerasyonu amacıyla kullanılan biyomalzemeler doku mühendisliği ve rejeneratif tıpta önemli bir role sahiptir. Doğal ve sentetik polimerlerden üretilen biyolojik iskeleler *in vivo* ve *in vitro* koşullarda doku veya organ oluşumuna destek olabilirler. Bu çalışmada kemik doku mühendisliği uygulaması kapsamında; Ayva çekirdeği müsilajı (QSM) ve nanohidroksiapatit (nHA)'ten oluşturulan biyoiskelelerin tavşan mandibulalarında oluşturulan kritik boyuttaki defektlerde etkinliği değerlendirildi. Çalışmaya 36 erkek tavşan dahil edildi. Deneklerde 10 mm çapında ve 4 mm derinliğinde bilateral mandibular defektler hazırlandı. QSM/nHAp tabanlı iskeleler sol mandibular corpus bölgesine yerleştirildi ve sağ taraf boş bırakıldı.

Çalışmada sakrifiye sonrası deneklerden alınan spesmenler belirlenen 4 ayrı zaman aralığında (10., 21., 45. ve 90. günler) histolojik olarak Hemotoksilen-Eozin boyamaları ve Alizarin kırmızısı boyama tekniği ile değerlendirildi. Real-Time PCR ve Taramalı elektron mikroskop ile analizleri yapıldı.

Deney grubunda 10. günde greft materyali gözlendi. 21. günde, greft kavitenin tabanında kısmen rezorpsiyona uğradığı ve yerine yeni kemik dokusu oluştuğu gözlendi. Histolojik değerlendirmede defekt alanında yeni kemik oluşumunun, deney grubunda kontrol grubuna göre daha iyi olduğunu gözlendi. Çarpıcı bir şekilde, 21. günden sonra tüm QSM/nHAp gruplarında diş ve kemik rejenerasyonunun birlikte gelişimi gözlemlendi. Buna karşılık, 90. günde kontrol grubundan yalnızca iki örnekte diş oluşumu gözlendi. Ayrıca, QSM/nHAp yapı iskeleleri, greftlenmiş alanda kemik ve dişle ilgili gen ve protein ekspresyonunu (>2 kat) indükledi.

Sonuç olarak bitki bazlı QSM-nHAp biyoiskelelerin biyouyumlu, hidrofilik, esnek, gözenekli ve dayanıklı yapısı, QSM-nHAp kompozitleri, özellikle kraniyomaksillofasiyal bölgede kemik ve diş dokusunun rejenerasyonunda kullanılması aşamasında gelecekte insanlarda klinik kullanım için umut vadetmektedir.

Anahtar Kelimeler: Nanohidroksiapatit, Ayva (Cydonia *oblonga Miller*) Çekirdeği Müsilajı, Tavşan Mandibulası, Kemik Rejenerasyonu

ABSTRACT

Biomaterials used to regenerate lost tissues and organs are essential in tissue engineering and regenerative medicine. Biological scaffolds from natural and synthetic polymers can support tissue or organ formation in vivo and in vitro. This study evaluated the effectiveness of quince seed mucilage (QSM) and nanohydroxyapatite (nHA) bioscaffolds on critical size defects created in rabbit mandibles within the scope of bone tissue engineering.

Thirty-six male rabbits were included in the study. Bilateral mandibular defects (10 mm in diameter and 4 mm in depth) were created. QSM/nHAp-based scaffolds were placed in the left mandibular corpus region, and the right side was left empty. In the study, the specimens taken from the subjects after sacrifice were evaluated histologically with Hematoxylin-Eosin staining and the Alizarin red staining technique at four different time intervals (10th, 21st, 45th, and 90th days) and analyzed with Real-Time PCR and a Scanning electron microscope.

Graft material was observed in the experimental group on the 10th day. On the 21st day, it was observed that the graft partially resorbed at the bottom of the cavity, and new bone tissue formed in its place. In histological evaluation, it was observed that new bone formation in the defect area was better in the experimental group than in the control group. Strikingly, concomitant development of tooth and bone regeneration was observed in all QSM/nHAp groups after day 21. In contrast, tooth formation was observed in only two samples from the control group on day 90. Furthermore, QSM/nHAp scaffolds induced bone and tooth-related gene and protein expression (>2-fold) in the grafted area.

As a result, the biocompatible, hydrophilic, flexible, porous, and durable structure of plant-based QSM-nHAp bioscaffolds makes QSM-nHAp composites promising for clinical use in humans in the future, mainly when used in the regeneration of bone and dental tissue in the craniomaxillofacial region.

Key Words: Nano Hydroxyapatite, Quince (Cydonia oblonga Miller) Seed Mucilage, Rabbit Mandible, Bone Regeneration

1.GİRİŞ

Kemik greftleme gerek kraniofasiyal bölgede, gerekse ekstremitelerdeki travma, patolojik defektlerin onarımı ve iskelet rekonstrüksiyonunda çene cerrahisinde çok sık ihtiyaç duyulan ve kullanılan tedavi aşamalarından biridir. Günümüzde, çene kemiklerinin rekonstrüksiyonunda otojen, doğal ve sentetik yollardan elde edilen kemik greftleri kullanılmaktadır.

Doku mühendisliği, organ yenilenmesi veya hasar görmüş organların tamiri için yeni tedavi alternatifleri sunabilen rejeneratif tıbbın başlıca yaklaşımlarından biridir. Doku mühendisliğinin ana yaklaşımlarından biri, fonksiyonel doku oluşturularak transplantasyon/implantasyon için üzerinde hücrelerin kültürlenebileceği biyomalzeme iskelesidir oluşturmaktır. İskele terimi, 1893'te ilk kez Barth tarafından hücrelerin içine girmesine izin vererek hücrelerin bölgesel dokuyu tamir edebileceği gözenekli matriks veya implant olarak kullanılmıştır[1]. İskele için doğal ve sentetik substrat, nano kompozit malzemeler ve hücrelerinden arındırılmış hücre dışı matriks kullanılır.

Gülgiller ailesinden bir ağaç olan ayva (Cydonia oblonga Miller) Anadolu ve İran'da yerel bir bitkidir. Orta Doğu, Avrupa ve Güney Afrika'da medikal ve besin bitkisi olarak yetiştirilir. İran ve Anadolu'da pek çok hastalığın tedavisi için geleneksel ilaçlar olarak kullanılmıştır[2]. Bu projede, kemik doku mühendisliği uygulaması kapsamında; Ayva çekirdeği müsilajına (AÇM-Quince Seed Musilage-QSM) nanohidroksiapatit kemik (nHAp) grefti emdirilerek yeni bir iskele oluşturulmuştur.

Proje kapsamında biyomühendisliği yapılmış biyobozunur ve biyouyumlu greft materyalinin kritik boyuttaki tavşan kemik defektlerindeki etkinlik ve biyoyararlılığını karşılaştırmalı olarak göstermek amaçlanmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

Enfeksiyon, patolojiler, travma, gelişimsel deformiteler, konjenital anomaller, metabolik hastalıklar ve bazı ilaçların kullanımı nedeniyle oluşabilen çene ve yüz bölgesindeki kemik defektlerinin tedavisi ile ilgili birçok araştırma yapılmış olup, konu üzerinde çalışmalar halen devam etmektedir[1,2].

Bunun yanında toplumun refah seviyesinin artmasına parelel olarak, biyoteknoloji ve biyomühendislik alanındaki gelişmeler, kemik rejenerasyonu için yeni ve ileri biyomedikal teknolojik yaklaşımı zorunlu kılmıştır.[3–5] Geçmişten günümüze kadar bu bölgedeki defektlerin rekonstrüksiyonu için greftleme, flep teknikleri ve distraksiyon gibi birçok yöntem kullanılmış

ve bu alanda birçok çalışma yürütülmüştür[6]. Ancak bu yaklaşımlar doku donörlerinin eksikliği, ekstra invazyonlu çok sayıda invaziv ameliyatlar ve yüksek maliyetlerle ilgili sosyoekonomik zorlukları da beraberinde getirmektedir.[7]

Kemik doku mühendisliği yaklaşımları maksillofasiyal bölgede travmatik yaralanmalarda, rekonstrüktif cerrahide, alveoler kemik ve sinüs augmentasyonunda, kronik periodontal tedavilerde, peri-implantitis gibi klinik prosedürlerde kullanılmaktadır. Kritik boyuttaki kemik defektlerinin tedavisi, sınırlı iyileşme kapasiteleri sebebiyle rekonstrüktif cerrahi için hala bir zorluk olmaya devam etmektedir[8].

Dünya çapında her yıl iki milyondan fazla kemik grefti prosedürü gerçekleştirilmektedir ve kan transfüzyonundan hemen sonra ikinci en sık nakledilen dokulardan biridir[9,10]. Kemik doku rekonstrüksiyonunda, anatomik bölgelerin çeşitliliğini, defektin boyutları, mekanik stresleri ve mevcut yumuşak doku varlığı çok çeşitli klinik zorluklarıda beraberinde getirmektedir[11]. Klinik olarak kullanılan mevcut greftler arasında otojen kemik, osteokondüksiyon, osteoindüksiyon ve osteogenez açısından kemik rejenerasyonunda gerekli tüm özellikler birleştirilmiş olması sebebiyle iskelet defektlerinin rekonstrüksiyonunda altın standart olmaya devam etmektedir[9]. Otolog kemik greftleri başarılarını, greft ve çevreleyen mikro ortamdaki sinyallere yanıt verebilen endojen biyoaktif moleküllerin ve hücrelerin varlığına borçludur. Bununla birlikte, bu teknikte donör sahanın kısıtlılığı, alınan greft materyalinin sınırlılığı, operasyon sonrası kemik grefti kaybı / rezorpsiyonu, geniş defektlerde kısa dönemde stabilizasyon problemleri, ikinci bir cerrahi bölge oluşturulması, defekt alanı ve donör sahada komplikasyonlar gibi bazı dezavantajları vardır[12]. Bu sınırlılıkların bir sonucu olarak, defekt alanının rejenerasyonu için alternatif tedavi yaklaşımları zorunluluk halini almaya başlamış, allojenik, xenojenik ve alloplastik greft tipleri birbirinden farklı özellikleri sebebiyle tercih edilir hale gelmiştir[13]. Ancak mevcut sentetik biyomalzemelerin konakçı doku ile iyi entegre olmayıp, olası enfeksiyon, yabancı cisim reaksiyonları ve implante edilen greft materyalinin önce ekspoze olması ve kaybıyla sonuçlanması karşılaşılabilen dezavantajları arasında sıralanmaktadır[4,13,14].

Kemik doku mühendisliği osteojenik progenitör hücreler, osteokondüktif iskeleler ve osteoindüktif faktörleri içerisinde barındırması sebebiyle umut verici bir yöntem olarak kabul edilmektedir[15]. Kemik grefti; yeni kemik oluşumu için bir iskele sağlayarak geniş kemik defektlerinin tamirinde kritik rol oynar. Kemik kendi kendini tamir etme sistemine sahip olduğu için, insan vücudu kolayca küçük kemik yaralanmalarını tamir edebilir. Kritik boyuttaki kemik yaralanmalarında ilgili bölgede kemik kaybı olur. Bu aşamada defekt alanının kendini onarma

döngüsünü hızlandırmak için genellikle doku iskelesi gereklidir[16]. Araştırmacılar uzun yıllar, büyük çaplı kemik defektlerinde rekonstrüksiyon amacıyla kullanılabilecek maddelerin daha hızlı ve daha az komplikasyonla kemikle bütünleşmesine yardımcı olacak yöntemler üzerinde çalışmışlardır. Otogreft ve allogreftlerin uygulanma sınırlılıkları sebebiyle, onarılması güç olan kemik dokusu kaybında, bazen tek başına veya klinik alanda kombinasyon halinde sentetik greftler veya biyomühendisliği yapılmış greftler kullanılır. Bu greftler ya da substratlar, osteointegrasyon, osteokondüktif veya osteoindüktiflik özelliklerinden en az birine sahip olmalıdır. Mekanik dayanımın istenilen düzeyde olması ve bölgenin damarlanması kemik rejenerasyonunda oldukça önemli kriterlerdir.[17–19]

Doku mühendisliği, biyolojik fonksiyonları iyileştirmek veya değiştirmek için hücre, mühendislik ve malzeme kombinasyonunu, uygun biyokimyasal ve fizikokimyasal faktörleri kullanmaktır. Doku mühendisliğinin ana yaklaşımlarından biri olan biyomalzeme, bir biyolojik sistem ile malzeme arasındaki ara yüz olarak tanımlanabilir. Biyomalzemeler, herhangi bir dokuyu, organı veya fonksiyonu, tedavi etmek, arttırmak veya değiştirmek için kullanılırlar[20]. 3-boyutlu iskeleler, transplante edilen hücrelerin yapışabileceği bir yüzey ve yeni doku veya organ oluşumuna rehberlik eden fiziksel bir destek olarak görev yaptığından gereklidir. Kemik doku mühendisliği kapsamında iskelelerin; biyolojik gereksinimler yapısal özellikler, ham madde ve içerikleri, üretim teknikleri gibi sahip olduğu bazı özellikler ve bu özelliklere göre geliştirdiği hücresel yanıtlar vardır. Biyomühendisliği yapılmış kemik dokusu yeni dokuların yaşamasına imkan sağlamalı ve osteokondüktivite desteklemelidir. Bu ana özellikler hücre göçünü stimüle eder ve osteogenez ile yeni kemik oluşumunu sağlar.[21] Biyoiskeleler hücre büyümesi, proliferasyonu, besinlerin ve metabolik atıkların taşınması için birbirine bağlı gözenekli ve özel yüzey kimyasına sahip gözenekli bir matris sağlamalıdır. Biyomalzeme kontrollü osteojenik aktivite ile öngörülebilir bir şekilde resorbe olmalı, hücre farklılaşmasını yönlendirmek ve doku rejenerasyonunu desteklemek için sinyal oluşturabilmeli; biyomalzeme resorpsiyon süreci boyunca devam eden güçlü, stabil mekanik özellikler barındırmalı; yabancı cisim reaksiyonu oluşturmamalı ve implante edilen sahaya adapte olabilmelidir[12]. Ayrıca biyo-rezorbe olan iskeleleri için mekanik tasarım gereksinimleri, yerini aldığı kemiğin fonksiyonel gereksinimlerine bağlı olarak büyük ölçüde değişmektedir[12].

Doğal polimerik biyomalzemeler binlerce yıldır biyomedikal alanında ve sağlıkla ilişkili diğer alanlarda kullanılmaktadır. Doğal biyopolimerler, biyoiskele oluşturulmasında tek başına kullanılabileceği gibi kendi aralarında, sentetik polimerler ile birlikte veya inorganik katkı materyalleri ile beraber hibrit materyaller oluşturularak daha fonksiyonel hale getirilebilir.

Literatürde, kolajen, jelatin, hyaluronik asit, ipek fibroin, kitosan gibi biyolojik olarak rezorbe olabilen polimerler ve bu doğal polimerlerin kombinasyonu, biyolojik olarak aktif ve uyumlu özellikleri nedeniyle kemik yeniden modelleme uygulamaları için geniş ölçüde değerlendirilmiştir.[22,23] Bununla birlikte bitki polimerlerinden immünojenik yanıt ve hastalık bulaşma riski olmaması, biyomedikal ürünler üretmek için kolay erişim ve düşük maliyetli hammaddeler olması sebebiyle günümüzde öne çıkmaya başlamıştır.[24]

Gülgiller ailesinden bir ağaç olan (Ayva meyvesinin-*Cydonia oblonga Miller*) sağlığa faydalı özellikleri eski zamanlardan beri bilinmektedir. Bilinen bu özellikleri antioksidan, hipoglisemik, antimikrobiyal, anti-alerjik, anti-inflamatuar ve antikarsinojenik olmasıdır. Çeşitli kullanımlara sahip ayvanın, meyvesi dizanteri tedavisi için, yaprağı sakinleştirici olarak ve çekirdeği farinjiyal yatıştırıcı kullanılmıştır.[25] Ayva çekirdeği müsilajının eczacılık, tıp, kozmetik, gıda paketleme, gıda katkı maddesi gibi alanlarda kullanıldığı bilinmektedir.[26] Geleneksel tıp uygulamalarında ayva meyvesi antiseptik, anti-enflamatuar olarak; ishal, dizanteri, karaciğer bozuklukları, uterus kanamaları ve yaraların tedavisinde, tohumları ise kabızlık, dizanteri, öksürük, boğaz ağrısı, bronşit ve bağırsak koliklerinin tedavisinde kullanılmıştır. Geleneksel tıp uygulamalarında ayva çekirdeğinden elde edilen bu müsilajin yaralarda kanamayı durdurucu, deriyi nemlendirici, açık yaraların tedavisinde, sindirim sistemini etkileyen rahatsızlıklarda (ishal, dizanteri, kabızlık), boğaz ağrısı bronşit gibi rahatsızların tedavisinde kullanıldığı bilinmektedir.[27]

Literatürde sağlık alanında yapılan çalışmalar incelendiğinde, Ayva çekirdeği müsilajı (AÇM/QSM) ile yapılan bir çalışmada, çekirdek salgısının dermatit bakterilerine karşı (*Pseudomonas aeruginosa, Staphylococus aureus* ve *Staphylococcus epidermis*) antibakteriyal etkileri olduğu gözlemlenmiştir[28] . 2019 yılında yapılan bir çalışmaya göre, ayva müsilajinin titanyum dioksit (TiO_2) ve silisyum oksit (SiO_2) nanopartikülleriyle oluşturulan hibrit filmlerin, gıda zehirlenmelerine sebep olan *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus, Listeria monocytogenes*, *Salmonella tyhimurium* ve *Escherichia coli* O157:H7 mikroorganizmaları üzerinde antibakteriyel etkiler gösterdiği belirtilmiştir. [29]

Literatürü incelendiğinde doku mühendisliği veya rejeneratif tıpta, ayva çekirdeği müsilajı ile ilgili Şimşek ve ark.'nın 2020 yılında yayımladığı bir çalışmada, ayva çekirdeğinden elde edilen müsilaj ile 3-boyutlu doku iskeleleri oluşturdukları, elde edilen yapıların sıvı tutma kapasiteleri ve gözeneklilik ölçümü ile malzemenin oldukça yüksek değerlerde poroziteye ve sıvı tutma kapasitesine sahip olduğunu bildirmişlerdir. Bu iskelelerin iAMKH'ler ile etkileştirerek *in vitro* koşullarda malzemenin biyouyumluluğunu ve

biyobozunurluluğunu test etmişlerdir. Yaptıkları çalışmanın sonuçlarına göre ayva çekirdeği müsilajının doku rejenerasyonu için kullanılabilir degradasyon kinetiğine sahip, biyouyumlu ve hücre proliferasyonunu arttıran bir biyomalzeme olduğunu rapor etmişlerdir.[30]

Yılmaz ve ark. yaptığı çalışmada ayva çekirdeği müsilajı (AÇM), silika ile modifiye edilerek (Si-AÇM) kemik doku mühendisliği (KDM) uygulamaları için 3B gözenekli yapılar inşa edilmiştir. Yapılan analizlerin sonuçlarına göre genel olarak Si-AÇM kriyojellerinin AÇM ile oluşturulan kriyojellerden daha yüksek yüzey alanına sahip olduğu, mekanik ve termal dayanımının daha yüksek olduğu, ve gerçekleştirilen *in vitro* deneylerin sonuçlarına göre, Si-AÇM kriyojellerinde osteogenez ile ilintili genlerin AÇM kriyojellerine göre daha erken dönemde ve daha fazla ifade edildiği anlaşılmıştır. Tüm bu sonuçlara dayanarak, Si-AÇM kriyojellerinin kemik doku uygulamaları için yeni ve önemli bir hibrit malzeme olduğu rapor edilmiştir[31].

Pek çok belirgin faydası olmasına rağmen, kemik doku mühendisliği uygulamalarında bitki müsilajları ile ilgili çalışmalar oldukça sınırlıdır[24,32]. Bununla birlikte, diğer birçok doğal polimer gibi, AÇM'nin mekanik özellikleri sınırlıdır ve kemik rekonstrüksiyon çalışmaları için güçlendirilmesi gerekir.

Nanoteknolojinin tıp alanında kullanılması, kemik yerine geçen substratların onarım bölgesine taşınmasına yardımcı biyomalzemelerin geliştirilmesine katkı vermiştir. Nanomalzemelerin başında nano-hidroksiapatit (nHAp) gelmektedir. $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)$ moleküler formüle sahiptir. Biyouyumlu olması ve osteoindüktif etkisi sebebiyle kemik defektlerinin iyileştirilmesinde geniş çaplı kullanılan bir biyoseramiktir.[33] nHAp ve insan mineralize kemik doku arasındaki kimyasal benzerlik sebebiyle sentetik nHAp'in sert dokuya güçlü afinite gösterir.[34] nHAp'ın doku ile temas eden yüzey alanının geniş olması ve mikron boyutundaki eşdeğerlerine göre düşük doku yanıtı oluşturma özelliği bulunmaktadır. Ancak sinterlenmiş HA(hidroksiapatit), mekanik gücü zayıf olduğu için tek başına kemik doku tamir materyali olarak kullanılamaz. Literatür incelendiğinde organik/inorganik hibrit materyallerin üretilmesi için en sık HA kristallerinin kullanıldığı görülecektir. nHAp yakın geçmişte, kök hücrelerin yaralı bölgeye taşınmasında, strontium veya boron gibi eser elementlerin kemik hücrelerini uyarıcı etkilerinin incelenmesinde[35] ve osteomiyeliti önlemek amacıyla kontrollü vankomisin salınımında kullanılmıştır[36]. nHAp kullanımı kollojen-kompozit bazlı iskeleleri sadece mekanik olarak desteklemez ayrıca osteoblast adezyonunu, proliferasyonunu ve diferensiyasyonunu destekler. [37] Literatürde nHAp materyalleri ile geliştirilen bir çok biyokompozit materyal rapor edilmiştir[38].

İnorganik HA iskeleler, optimal morfoloji ve gözenekliliğe sahiptir, ancak genellikle yetersiz mekanik özelliklere sahiptir. Doğal polimerler ile HA tozlarının kombinasyonunu hedefleyen kompozit yaklaşımların iskele yapıları üzerinde başarılı gelişmeler sağlaması ile daha çok tercih edilmeye başlanmıştır. Kolajen, ipek fibrin, jelatin ve kitosan içinde dağılmış HA tozu bazlı kompozit iskeleler araştırmacılar tarafından yıllar içerisinde kullanılmaya devam etmektedir[39].

Nanobiyoteknoloji, kemik onarımı ve rejenerasyonu için yeni yöntemleri ve yaklaşımları teşvik etme konusunda büyük bir potansiyele sahiptir. Doğal biyominerallerin karmaşık hiyerarşik yapısını yeniden oluşturmak zor veya hatta imkansız olsa da, bu biyomimetik yaklaşımı kemik dokusu mühendisliği için yeni malzemelerin geliştirilmesinde uygulamak son derece önemlidir[38]. Hibrit malzemelerin kemik doku mühendisliği uygulamalarında kullanımı önem taşımaktadır. Doğal polimerlerin sunduğu esneklik ve kolay işlenebilir özelliklerinin ve inorganik materyalinin sağladığı yüksek mekanik ve termal dayanım özellikleri geliştirilen biyoiskelelere önemli avantajlar sağlamaktadır.

Oral ve maksillofasiyal bölgede meydana gelen konjenital ve gelişimsel defektler, kist, tümör gibi patolojik oluşumlar ve travmaya bağlı olarak kemik ve yumuşak dokuda kendi kendine iyileşemeyecek boyutlarda defektler meydana gelebilmektedir. Bu noktada sert ve yumuşak dokunun geri kazanılması için bazı biyouyumlu materyallere ihtiyaç duyulmaktadır. Kaybedilmiş doku ve organların rejenerasyonu amacıyla kullanılan biyomalzemeler doku mühendisliği ve rejeneratif tıpta önemli bir role sahiptir. Doğal ve sentetik polimerlerden üretilen biyolojik iskeleler *in vivo* ve *in vitro* koşullarda doku veya organ oluşumuna destek olabilirler.

Proje ekibi olarak Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi BAP projesi kapsamında "Oral ve maksillofasiyal bölgede kullanılma potansiyeli olan nHA/müsilaj temelli biyolojik iskelelerin üretilmesi ve *in vitro* değerlendirilmesi" (proje no: TSA-2019-2933) isimli bir proje yürütülmüştür. BAP projesi sonucunda elde edilen veriler Q1 SCI dergi olan International Journal of Biological Macromolecules' de "Nano-hydroxyapatite incorporated quince seed mucilage bioscaffolds for osteogenic differentiation of human adipose-derived mesenchymal stem cells." isimli makale olarak yayınlanmıştır. (https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0141813021026775?via%3Dihub)

Bu proje kapsamında kemiğin doğal mikromimarisini ve ortamını taklit etmek için ayva çekirdeği müsilajı (AÇM) içerisinde 3 farklı oranda nanohidroksiapatit (nHAp) kullanılarak 3-boyutlu doku iskeleleri üretildi. Yapılan taramalı elektron mikroskobu (TEM) incelemeleri

sonucu 3 farklı orandaki ayva çekirdeği müsilajı/nanohidroksiapatit (AÇM/nHAp) iskelelerinden en iyi yüzey morfolojisi ve gözenek boyutlarının 1:1 oranıyla sağlandığı sonucuna ulaşıldı. Üretilen AÇM/nHAp temelli iskeleler fizikokimyasal, mekanik ve biyolojik olarak test edildi. Malzemenin karakterizasyonu için TGA, mekanik basma testi, porozite ve sıvı tutma testleri, FE-SEM görüntüleme ve EDX analizi, BET-BJH analizi, temas açısı analizi, biyobozunurluk testi, hücre kültürü ve hücre canlılığı testi, histokimyasal ve immunohistokimyasal boyamaları ve gen ifade analizleri gerçekleştirildi. Geliştirilen AÇM/nHAp temelli biyoiskelelerin yüksek mekanik dayanımı, uygun hidrofilik davranıştaki gözenekli yapısı, spesifik geniş yüzey alanı, kemik dokuya uyumlu biodegradasyon kinetiği ve üzerine ekilen hücrelerin tutunma, çoğalma ve osteojenik farklılaşma oranları sayesinde kemik doku mühendisliği kapsamında önem arz ettiği sonucuna ulaşıldı.

Yapılan çalışmanın devamı niteliğinde olan proje ile biyomühendisliği yapılmış biyobozunur ve biyouyumlu greft materyalinin kritik boyuttaki kemik defektlerindeki etkinlik ve biyoyararlılığı karşılaştırmalı olarak deneysel olarak gösterildi.

3.GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Gereç

Çalışmada 3B gözenekli doku iskelelerin üretimi için ayva çekirdeği müsilajı (AÇM polimeri- QSM- quince seed musilage) kullanılmıştır. AÇM, yerel meyve-sebze pazarlarındaki olgun ayvalardan elde edilmiştir. Taze ve olgun ayva meyvelerindeki çekirdekler ayıklanarak yapısında morfolojik bir bozukluk, çürüme veya küf belirtisi göstermeyen sağlam çekirdekler, müsilaj üretimi için +4 °C buzdolabında (Siemens KG57NPW24N, Almanya) stoklanmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Ayva Çekirdeği Müsilajı Üretimi ve Liyofilizasyon İşlemi

Ayva meyvesinden çıkarılan çekirdekler morfolojik olarak incelendikten sonra müsilaj üretiminde kullanılacak çekirdekler ayıklanmıştır. Ayva içerisinden çıkarılan çekirdeklerin sağlıklı olanları (küf içermeyen ve şekilsel olarak düzgün olan çekirdekler) ayrılmıştır ve çekirdekler yıkama vb. gibi hiçbir işleme tabi tutulmadan numune kaplarında +4 C°'de muhafaza edilmiştir. (Resim 1).



Resim 1: Ayva meyvesi (*Cydonia Oblonga* Mill) ve jel üretilmek üzere ayıklanan ayva çekirdekleri

Ayva Çekirdeği Müsilajı ekstraksiyonu döner buharlaştırıcı cihazında (Rotavapor R-200, Buchi, İsviçre) gerçekleştirilmiştir. Bu işlem için 4 g ayva çekirdeği tartılarak (ATX224, Shimadzu, Japonya); 75 ml ultra saf su (Milli Direct-Q 3UV, Merck-Millipore, Almanya) içerisine konmuştur ve 30 C°'de döner buharlaştırıcının 6. hız seviyesinde bir gece boyunca ekstrakte edilerek çekirdek müsilajinin saf suya geçmesi sağlanmıştır. 24 saatlik ekstraksiyon işleminin sonunda cam balon içerisinde viskoz ve şeffaf ayva çekirdeği müsilaji elde edilmiştir. Müsilaj içerisinde bulunan çekirdeklerden, kalıntı ve partiküllerden ayrışması için vakumlu pompa düzeneği (Vacuum Pump V-700, Buchi, İsviçre) ve 5 katlı steril bez kullanılmıştır. Vakumlu pompa düzeneğine bağlı süzme hunisinin üzeri steril bez ile kaplanıp, ekstrakte edilen çekirdek müsilaji daha sonra vakum yardımıyla bez arasından süzülmüştür. Elde edilen süzülmüş müsilaj cam balonlara dökülmüştür ve bir gece boyunca -26 C°'de dondurulmuştur (Siemens KG57NPW24N, Almanya). Cam balonlar içerisindeki donmuş müsilaj gece boyunca liyofilize edilmiştir (LyoQuest -55, Telstar, İspanya) (Şekil 8). İşlem sonunda elde edilen liyofilize müsilaj numune kaplarına alınarak +4 C°'de muhafaza edilmiştir. (Resim 2)



Resim 2: Ayva çekirdeklerinden müsilaj ekstraksiyonu ve liyofilizasyon işlemi

3.2.2. QSM/nHAp Temelli 3B İskelelerin Üretimi

Biyoiskele yapımında sırasıyla aşağıdaki işlemler uygulanmıştır;

1.1. 5 mg nanohidroksiapatit kemik (nHAp) hassas terazide tartıldı.

1.2. Liyofilize AÇM lifleri 5mg/mL konsantrasyonda saf suda homojenizatör yardımı ile çözülmüştür.

1.3. İskeleri içerik ve oranlarını daha önceki yapılmış çalışmalar göz önünde

bulundurularak optimize etmek amacıyla 1:1, nanohidroksiapatit (nHAp-**60nm**) ve Ayva çekirdeği müsilajı (AÇM)kullanıldı.

1.4. 2 mililitrelik ependorf tüplerinin içerisine önce nHAp, sonra 1 ml Ayva çekirdeği müsilajı (QSM) konuldu ve 1 dakika pipetlenerek partiküllerin içerisinde dağılması sağlandı.

1.5. Pipetleme sonrası küçük manyetik balıklar ependorf tüpünün içine atıldı ve manyetik karıştırıcıda her bir ependorf tüpü 15 dakika maksimum hızda karıştırıldı.

1.6. Sonrasında 5 dakika vortekslendi ve tekrar pipetlendi

1.7. İçindeki manyetik balık çıkarılıp 5 dakika daha vortekslendi.

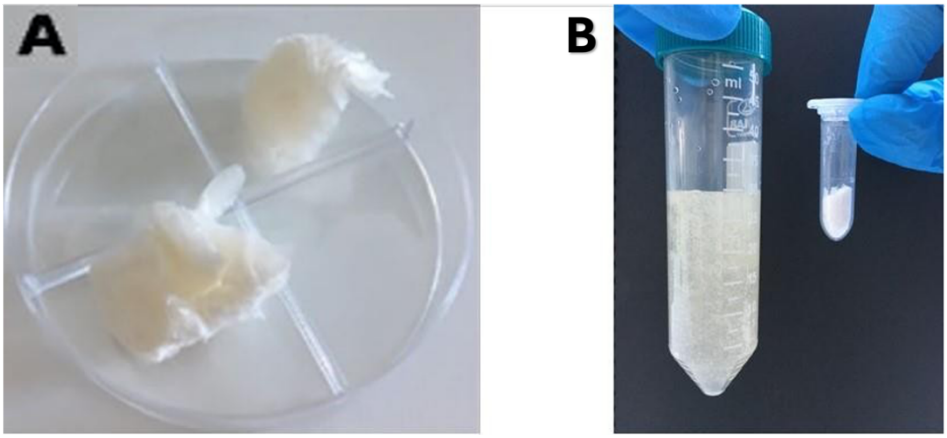
1.8. Işık altında ependorf tüplerinin içerisinde bulunan malzemenin homojenliği görüldü ve teflon kalıplara döküldü **(Resim 3).**

Teflon kalıbın içerisindeki malzemeler bir gece boyunca -26 derecede donduruldu.

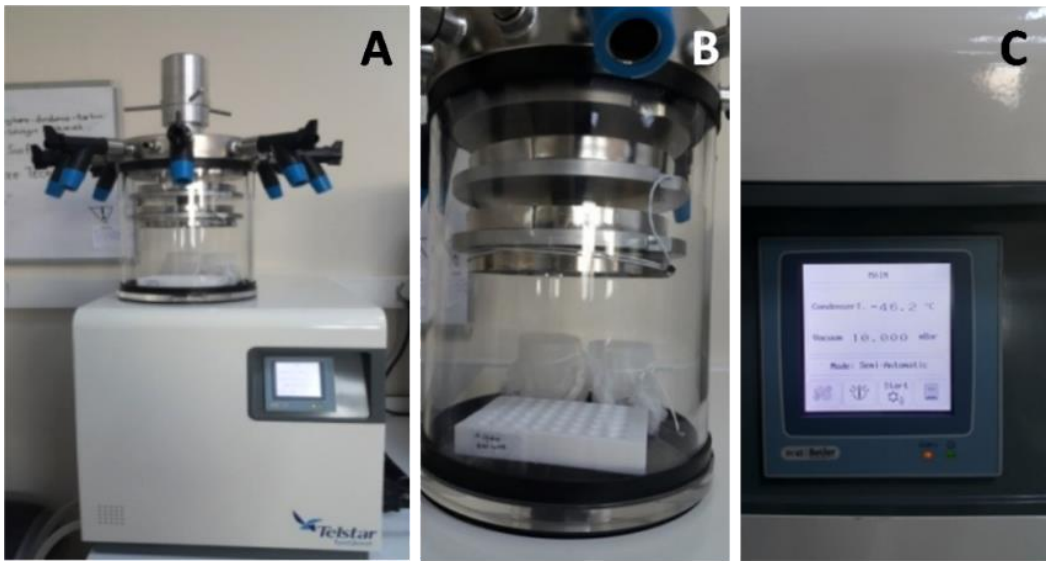
1.8. Kalıplanan ve donan QSM/ nHAp, iskele formunu alması için liyofilizatörde (LyoQuest - 55, Telstar, İspanya) gece boyu liyofilize edildi **(Resim 4).**

1.9. Liyofilizasyon işlemi sonunda QSM/ nHAp üç boyutlu gözenekli biyoiskele formunu aldı (**Resim 5)**.

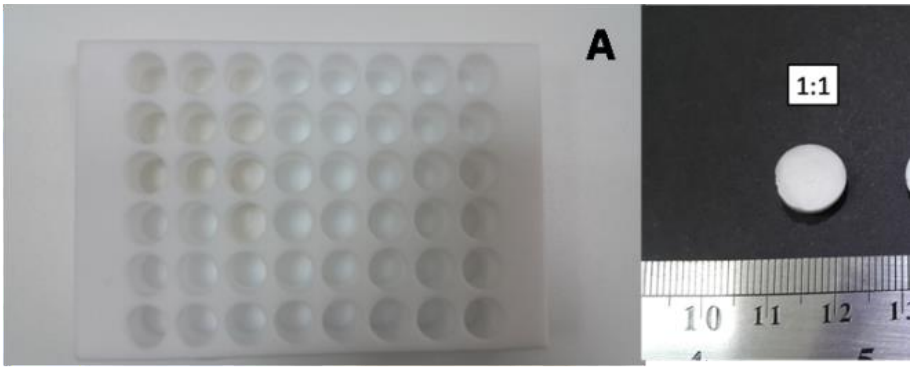
1.10. Liyofilize QSM/ nHAp +4 ºC' da saklandı.



Resim 3: Ependorf Tüplerinin içindeki homojen biyomalzeme (A), Teflon kalıplara dökülmüş biyomalzeme (B)



Resim 4: Liyofilizasyon işlemi



Resim 5: Teflon kalıp içindeki liyofilize edilmiş iskele

3.2.3. QSM/nHAp Temelli 3B İskelelerin Çapraz Bağlaması

Elde edilen iskeleler su ile etkileştiğinde iskeleler dağılmaktadır. İskelelerin mikro-mimarilerinin, yapısal bütünlüğünün korunması ve mekanik dayanımın arttırılması amacıyla N-etilkarbodiimid hidroklorür (EDC) ve N-Hidroksisüksinimid (NHS) ajanları kullanılarak çapraz bağlama işlemi yapılmıştır. Çapraz bağlama yöntemi aşağıda belirtildiği şekilde uygulanmıştır;

1- Çapraz bağlama işlemi uygulanacak her bir iskele işlemden önce 30 dakika saf etanol içindebekletildi.

2- %70'lik etanol (EtOH) içinde 0.05 M, pH'ı 5.5 olan 2-(N-morfolino) etansülfonik asit (MES)çözeltisi hazırlandı.

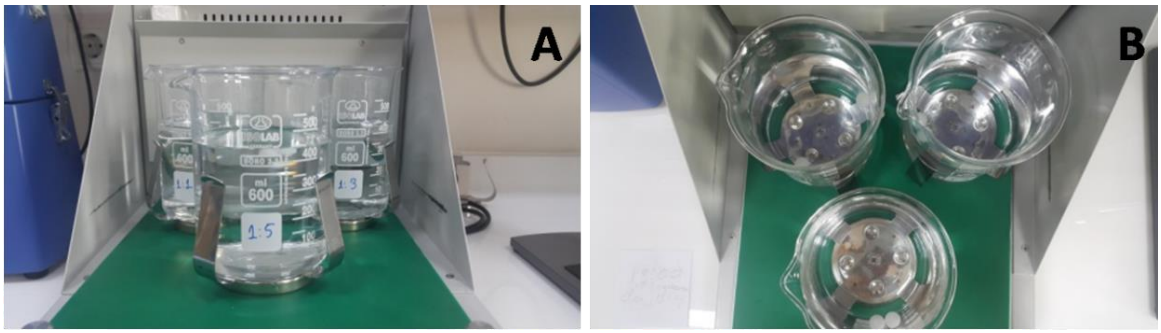
3- Bir iskele için 1 ml MES in EtOH içinde 6,72 mg N-hidroksi süksinimit (NHS) ve 13,8 mg N-(3-Dimetilaminopropilin)-N'-etilkarbodiimit (EDC) çözdürüldü.

4- İskelelere çapraz bağlama işlemi çalkalayıcıda 2 saat (Incu-Shaker Mini, Benchmark, Sayreville, New Jersey, ABD) uygulandı **(Resim 6)**.

5- Çapraz bağlamadan sonra iskeleler dinamik olarak her yarım saatte bir saf su yenilenecekşekilde 2 saat yıkandı.

6- Suya doygun çapraz bağlı iskeleler -26 ºC' da dondurulduu.

7- Liyofilizatörde LyoQuest -55, Telstar, İspanya) gece boyu liyofilize edildi ve teflon kalıplardançıkarıldı (**Resim 7**).



Resim 6: Çapraz bağlama yapılmış iskelelerin çalkalayıcıdaki görüntüleri



Resim 7: Liyofilize edilmiş iskelelerin görüntüleri

3.2.4. Hayvan Deneyi Aşamaları

Çalışma için gerekli etik kurul onayı, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulundan alınmıştır (2021/05 toplantı sayısı ve 2021/05-03 karar numaralı). Çalışmamız Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Deneysel Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi (ÇOMÜDAM) amaliyathanesinde yürütülmüştür. Çalışma planlanırken ARRIVE kılavuzu kontrol listesine göre planlanmıştır.[40] G * Power yazılımı (G

* Power 3.1 yazılımı; Heinrich Heine Üniversitesi, Düsseldorf, Almanya), t test ailesi kullanılarak ve daha önce gerçekleştirilen bir çalışmanın[41] verileri referans olarak alınarak gerekli minimum örneklem sayısı hesaplanmıştır. 0,05 alfa-tip hata ve 0,85 güç değerlerinde, etki büyüklüğü (d); 0,7318588 olarak girildiğinde toplam örnek sayısı 69 çıkmıştır. (Tablo 1) Ancak deneğin bilateral mandibulası kullanılacağı için sayı ikiye bölünmüştür. Grup başına toplamda en az 35 deneğin dahil edilmesi gerektiği belirlenmiştir. Aynı denek üzerinde 4 ayrı zamanda kontrol ve deney grupları oluşturulacağından ve eşit denek sayısına sahip olmak için 1 adet tavşan daha eklenmesiyle toplam denek sayısı 36 olarak hesaplanmıştır. Veteriner kontrolü ile sağlıklı olduğu belirlenen (5 aylık ve ağırlığı 3.5 kg olan), 36 adet erkek, beyaz Yeni Zelanda tavşanı çalışmaya alınmıştır. Deneklerin sağ ve sol mandibuları kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan deneklerden belirlenen 4 ayrı zaman aralığında (10., 21., 45. Ve 90. Günler) histolojik değerlendirme ve immünohistokimyasal analiz için 6'şar adet toplamda 24 adet, elektron mikroskop ile değerlendirme için 1'er adet toplamda 4 adet , Real-Time PZR için 2'şer adet toplamda 8 adet kullanılmıştır.

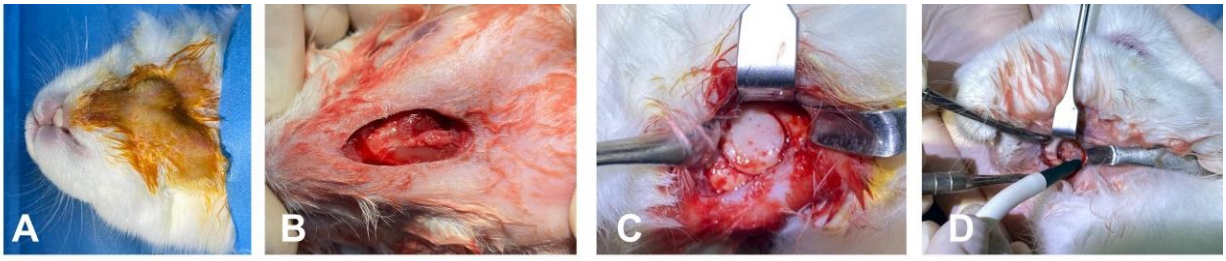
Veteriner kontrolü ile sağlıklı olduğu belirlenen (5 aylık ve ağırlığı 3.5 kg olan), 36 adet erkek, beyaz Yeni Zelanda tavşanı çalışmaya alınmıştır. Deneklerin sağ ve sol mandibulaları kullanılmıştır.

Tavşanların laboratuvar ortamına uyum sağlayabilmeleri için, deneyden bir hafta önce kafeslerine yerleştirilip, sağlıkları yönünden gözlemlenmiştir. Tavşanların her biri 65 x 65 x 45 cm ebatlarındaki paslanmaz çelik kafeslerde, ortalama olarak 21±2 C^{o}'lik oda ısısında ve %45-65'lik nem koşullarındaki kontrollü odada barındırılmıştır. Odanın aydınlatması 12 saat gündüz 12 saat gece olacak şekilde ayarlanacak, odanın temizliği günlük, kafeslerin temizliği hafta bir yapılmaktadır. Tavşanlara normal şehir suyu ve pelet yem istenildiği kadar tüketilecek şekilde (ad libitum) verilmiştir. Operasyondan bir hafta önce operasyon bölgesini travmatize etmemesi için yeme alışkanlığını değiştirme amaçlı normal şehir suyu ile yumuşatılmış ve protein içeren hazır özel pelet yem ile beslenmişlerdir. Operasyondan bir hafta sonra standart diyetlerine geri dönmüşlerdir. Çalışmada kullanılan tüm tavşanlar nem ve ısı kontrolü olan hayvan bakım odalarında, her tavşan bir kafeste olacak şekilde barındırılmıştır. Günlük kontrollerle tavşanların genel sağlık durumları, beslenmeleri ve tavşanların barındığı odalarla ilgili koşullar kontrol edilmiştir.

Araştırmada kullanılan deneklere 25mg/kg ketamin HCI (Ketalar®, Pfizer) ve 5 mg/kg Xylazin HCI (Rompun®, Bayer) kas içi verilerek anestezi sağlanmıştır. Gerekli asepsi-

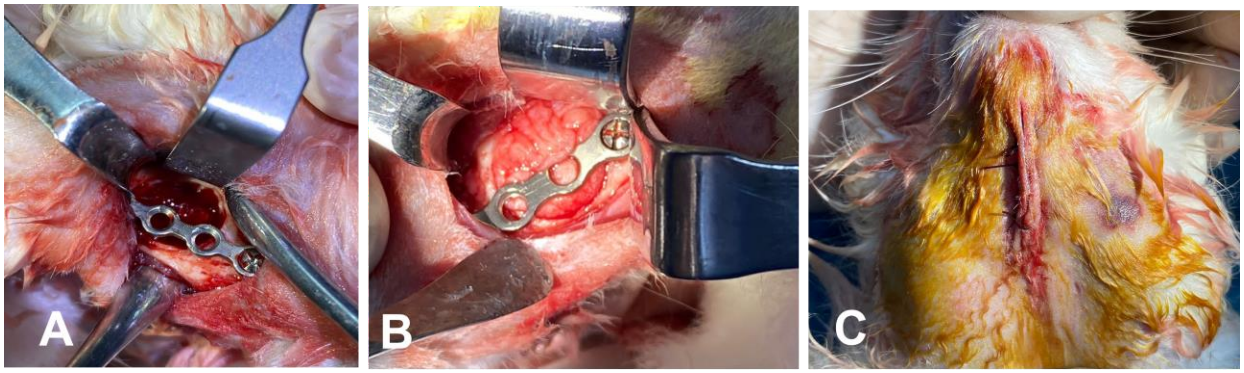
antisepsi kurallarına bağlı kalınarak steril ortam hazırlanmıştır. Cerrahi işleme başlamadan önce tavşanın bilateral mandibula alt sınırı polivinilpirolidon iyot ile dezenfekte edilip traş edilmiştir (Resim 8A). Cerrahi alan dezenfeksiyonu sonrasında, deney hayvanı, operasyon bölgesi açıkta kalacak şekilde steril örtü ile örtülmüştür. Lokal anestezi amacıyla her hayvan için 0.2ml adrenalin içeren lidokain (Jetocaine, Adeka, TÜRKİYE) operasyon alanına uygulanmıştır.

Deneklerde mandibuler tabanının alt sınırı boyunca 15 nolu bistüri ile bilateral 3-4 cm'lik bir cilt insizyonu yapılmış, sonrasında mandibulanın bazisi, kesici dişler ve premolar arasındaki bölgeye ulaşım için deri, deri altı dokular ve mandibular fasiyanın künt diseksiyonu yapılmıştır (Resim 8B). Sonrasında nervus mentalis'in korunmasına özen gösterilerek mukoperiostal flep kaldırılarak serum fizyolojik irrigasyonu altında, tur motoru yardımıyla trephan frez kullanılarak kritik boyutlarda (10mm x 4mm- çap x derinlik) bilateral silindirik kemik kavitesi monokortikal olarak çıkarılmıştır (Resim 8C, 8D).[42]



Resim 8: Deneyin operasyon aşamaları

Geliştirdiğimiz biyomühendisliği yapılmış AÇM/nHAp temelli iskeleleri deneğin kendi kanı ile ıslatılıp sol çenedeki defekt alanına yerleştirilirken (deney grubu) (Resim 9B), mandibulanın sağ tarafındaki defekt alanı boş bırakılmıştır (kontrol grubu) (Resim 9A) Oluşturulan defekte bağlı patolojik fraktür oluşumunu engellemek için deneklerin mandibulasına mini plak fiksasyonu uygulanmıştır. Bölgede hemostaz sağlandıktan sonra periost, cilt altı dokular ve cilt sıkı bir şekilde 4.0 rezorbe olabilen 4/0, 19mm, 3/8 ters keskin iğneli rezorbe olabilen sutur materyali kullanılarak kapatılmıştır **(Resim 9C)**. Yara yüzeyi antiseptik solüsyonla temizlendikten sonra hayvanlar uyanmaya bırakılmıştır. Operasyon sonrası deneklerin bakımı ve enfeksiyondan korunmaları amacıyla tüm deneklere beş gün boyunca günde 1 kez enrofloksasin (Baytril-K® 2,5 mg/kg IM) ve meloksikam (Maxicam® 0.2 mg/kg IM) enjeksiyonu yapılmıştır.



Resim 9: Deneyin greftleme ve sutürasyon aşamaları

Operasyon sonrasında tavşanların her biri 65 x 65 x 45 cm ebatlarındaki paslanmaz çelik kafeslerde tek başına olacak şekilde, ortalama olarak 21±2 Cº'lik oda ısısında ve % 45-65'lik nem koşullarındaki kontrollü odada barındırılmıştır. Odanın aydınlatması 12 saat gündüz 12 saat gece olacak şekilde ayarlanmış, odanın temizliği günlük, kafeslerin temizliği hafta bir yapılmıştır. Tavşanlara normal şehir suyu ve pelet yem istenildiği kadar tüketilecek şekilde (ad libitum) verilmiştir. Operasyondan bir hafta önce operasyon bölgesini travmatize etmemesi için yeme alışkanlığını değiştirme amaçlı normal şehir suyu ile yumuşatılmış ve protein içeren hazır özel pelet yem ile beslenmişlerdir. Operasyondan bir hafta sonra standart diyetlerine geri dönmüşlerdir. Çalışmada kullanılan tüm tavşanlar nem ve ısı kontrolü olan hayvan bakım odalarında, her tavşan bir kafeste olacak şekilde barındırılmışlardır. Günlük kontrollerle tavşanların genel sağlık durumları, beslenmeleri ve tavşanların barındığı odalarla ilgili koşullar kontrol edilmiştir.

Denekler yara yeri iyileşmesi, osteogenezis ve anjiogenezisin oluşumu, yabancı doku reaksiyonu, erken dönem, 1.ara dönem, 2. Ara dönem ve geç dönem sonuçlarının değerlendirilmesi amacıyla 4 ayrı zamanda (10., 21.,45. ve 90) yüksek dozda (200 mg/kg i.v.)Sodyum Pentotal enjeksiyonu (Petothal, Ekipental, Tümekip İlaç Sanayi , İstanbul, Türkiye) ile sakrifiye edilmiştir. Sonrasında deneklerin defekt olusturulan bölgedeki mandibular kemikleri rezeke edilerek çevre yumuşak dokular temizlendikten sonra, steril biyopsi kapları ile içerisindeki %10'luk formalin ile fikse edilip spesmenlerin histolojik değerlendirmesi yapılmaya başlanmıştır.

3.2.5. Real-time PCR Analizi

qRT-PCR analizi için deney setindeki her bir örnekten trizol reaktifi ve ticari RNA izolasyon spin kolonları kullanılarak total RNA izolasyonu yapılmıştır. Dokuları ilk olarak ince

parçalara öğütülmüş, ardından Bio-Rad RNA izolasyon kiti kullanılarak RNA izolasyonu yapılmıştır. RNA'nın µg/µL değeri 260 nm dalga boyunda nanodrop spektrofotometre cihazı ile ölçülerek İzole edilen RNA molekülünden 1 µg kullanılarak ticari bir kit ile cDNA sentezlenmiştir. cDNA izolasyonu sırasında uygulanan aşamalar kısaca şöyledir:

RNA sekonder yapısının açılması primer ile 70°C'da inkübe edilecek ve hızlıca buz içerisine konularak primer bağlanması sağlanmıştır. (2) Ters transkripsiyonun başlaması için dNTP, RNaz inhibitörü, ters transkriptaz ve tampon çözelti buz içerisindeki tüplere eklenmiştir. (3) Ters transkripsiyon reaksiyonu için 1 saat inkübasyon sağlanmıştır. (4) Süre sonunda sıcaklık 70°C'a yükseltilerek ters transkriptaz enzimi inhibe edilmiştir. (5) RNAaz H ile kalıp RNA molekülü yıkılmıştır. cDNA'ların çoğaltılması için real time PCR reaksiyonu, son hacim 10 µl olacak şekilde cDNA, her bir hedef gen ifadesi için mRNA'ya özgü primer, enzim ile reaksiyon ortamını sağlayacak master mix ve bidistile su (ddH2O) ile yapılmıştır. PCR reaksiyonu 1 döngü 15 dakika 95°C'da template ayrılma ve enzim aktivasyonu aşaması ile başlatılmıştır. Primer bağlanması ve uzama aşaması 40 döngü tekrarlı olarak 15 saniye 95°C'da denatürasyon, 15 saniye (hedef gen bölgesine özgü sıcaklıkta) 60°C de primer bağlanması ve 20 saniye 72 °C'de zincir uzama reaksiyonu şeklinde gerçekleştirilmiştir. PCR reaksiyonu 10 dakika 72°C'da son primer uzaması ile gerçekleştirilmiştir. Öncelikle referans gen (GAPDH) ve hedef genler (Runx2, ALP, Osteopontin, Osteoprotegrin) seri dilüsyonları yapılmış test örneklerinin kullanımı ile çoğaltılarak PCR etkinliğinin hem hedef genler hem de referans gen için benzer olduğu doğrulanmıştır. Daha sonra referans gen ve her bir hedef gen için spesifik primerler kullanılarak qPCR üç tekrarlı olarak uygulanmıştır (Tablo 1).

Tablo 1. qRT PCR için kullanılan primer dizileri.

Hedef Gen	İleri 5'/3'	Geri 5'/3'
RunX2	GCCTTCAAGGTGGTAGCCC	CGTTACCCGCCATGACAGTA
ALP	ATGTCATCATGTTCCTGGGAGAT	TGGAGCTGACCCTTGAGGAT
OPN	TTCCAAGTAAGTCCAACGAAAG	GTGACCAGTTCATCAGATTCAT
OPG	GGTCTCCTGCTAACTCAGAAAGG	CAGCAAACCTGAAGAATGCCTCC

3.2.6. Taramalı Elekron Mikroskopu (SEM) Görüntüleme

Numunelerin yüzey morfolojisi taramalı elektron mikroskobu (SEM) (JEOL JSM-7100F, Japonya) aracılığıyla analiz edildi. Toplanan örnekler %2,5 glutaraldehit çözeltisi (PBS içinde) ile sabitlendi, 90 saniye boyunca Au/Pt (80:20) ile kaplandı ve 10 kV prob akımı altında farklı büyütmelerle görüntülendi.

3.2.7. Histolojik Analiz

Toplanan örnekler histolojik değerlendirmeler için %10'luk nötr formalin solüsyonunda fikse edildi, dehidre edildi ve dekalsifiye edildi. Daha sonra parafine gömüldü ve üç mikronluk dilimler halinde kesildi. Hematoksilen-eozin (H&E) ve Alizarin Red S boyama standart prosedürü uygulandı[23,24]. Örneklerdeki mineralizasyon aşamaları ve osteojenik gelişim, dijital ışık mikroskobu (Zeiss, Primostar, Axiocam 105 renkli kamera ile entegre, Almanya) aracılığıyla görüntülendi ve iyileşmenin histolojik değerlendirmesi puanlandı.[43]

3.2.8. İstatistiksel Analizler

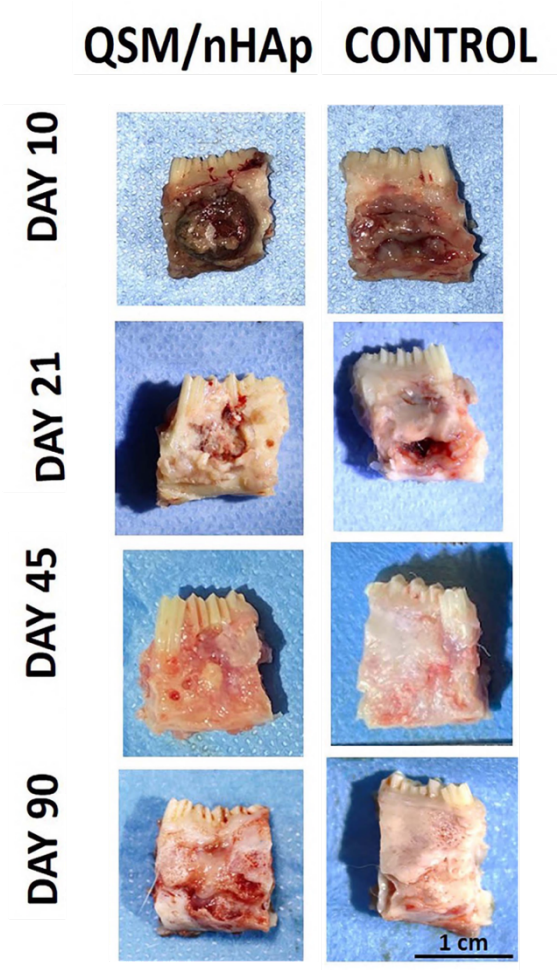
Histolojik incelemelere yönelik istatistiksel analizler, IBM SPSS for Windows, sürüm 25.0 (SPSS Inc. Chicago, IL, ABD) kullanılarak yapıldı. Tanımlayıcı istatistiksel değer medyan (max-min) olarak verilmiştir. Normallik Shapiro-Wilk testi ile test edildi ($P<0.05$). Grup karşılaştırmaları Wilcoxon testi ile, gruplar arası karşılaştırmalar Kruskal-Wallis testi ile, ikili karşılaştırmalar ise Dunn-Bonferroni testi ile yapıldı. qRT-PCR istatistiksel analizleri en az üç tekrarlı olarak yapıldı ve sonuçlar standart ortalama sapma (±) olarak rapor edildi. Deneysel veriler için, tek yönlü ANOVA analizleri ve ardından Tukey'in posthoc testleri, Origin Pro yazılımı (Origin Lab Corporation, ABD) kullanılarak gerçekleştirildi. Tüm testlerde istatistiksel anlamlılık $P<0.05$ olarak belirlendi.

4.BULGULAR

4.1.Makroskopik değerlendirme

Makroskobik olarak operasyondan on gün sonra QSM/nHAp iskelelerinin konak kanıyla şiştiği ve defekt boşluğunu doldurduğu görüldü (Şekil1). Kontrol grubunda makroskopik olarak bakıldığında 10. günde defekt bölgesinde fibröz bağ dokusu iyileşmesi gözlendi. Deney grubunda ise malzemenin hidrofilik yapısı nedeniyle defekt alanında biyomateryalde bir miktar şişme gözlendi. 21., 45. ve 90. günlerde kontrol gruplarında defekt yüzeyinin ince kemik dokusuyla kaplandığı gözlendi. Trephan frezle numune alınmaya çalışıldığında, iyileşme

sürecinde yüzeysel ince kemik dokusu tabakasının altında fibrotik ve adipoz dokudan zengin defekt alanı olduğu makroskopik olarak izlendi. Deney grubunda ise 21. Günde defekt yüzeyi daha düzensiz iken 45 ve 90. Günlerde benzer makroskobik görünüme sahipti.

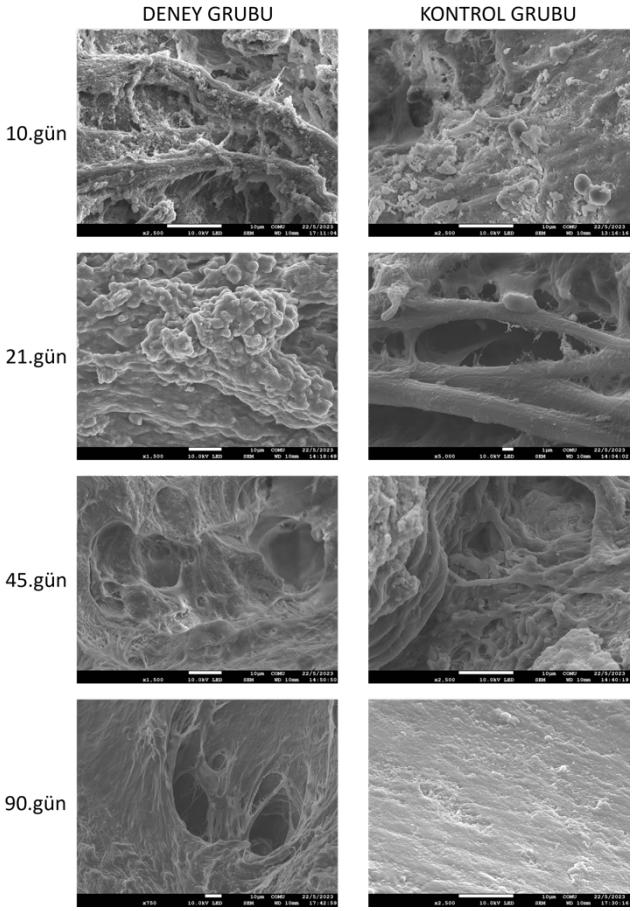


Şekil 1. Eksize edilen doku örneklerinin makroskobik görüntüleri.

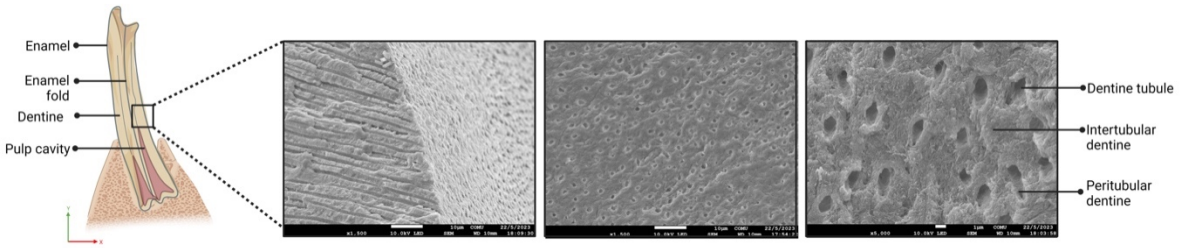
4.2.Taramalı Elekron mikroskopu (SEM) analizi

Şekil 2'de QSM/nHAp ve kontrol grubu örneklerinin SEM görüntüleri gösterilmektedir. Fotoğrafları çekilen örneklerde görüldüğü gibi, 10. günde her iki grupta da çevre dokulardan hücre infiltrasyonunun olduğu gözlendi. Kritik boyuttaki defektlerin, belirlenmiş zaman noktalarında ektraseluler matriks ve hücresel yapılarla dolu olduğu gözlendi. Kontrol grubunda fibrotik yapılar görünürken, QSM/nHAp uygulanan deney grubunda 21. ve 45. günlerde nispeten daha kompakt bir yapı gözlendi. Genel olarak, her iki grup da kritik boyutlardaki defekt yeni oluşan kemik dokusuyla dolduğu gözlendi. QSM/nHAp örneklerinde kemik

rejenerasyonu ile eş zamanlı olarak diş rejenerasyonu gözlendi. Dentin tübüllerinin varlığı SEM görüntülerinden de gözlendi (Şekil 3).



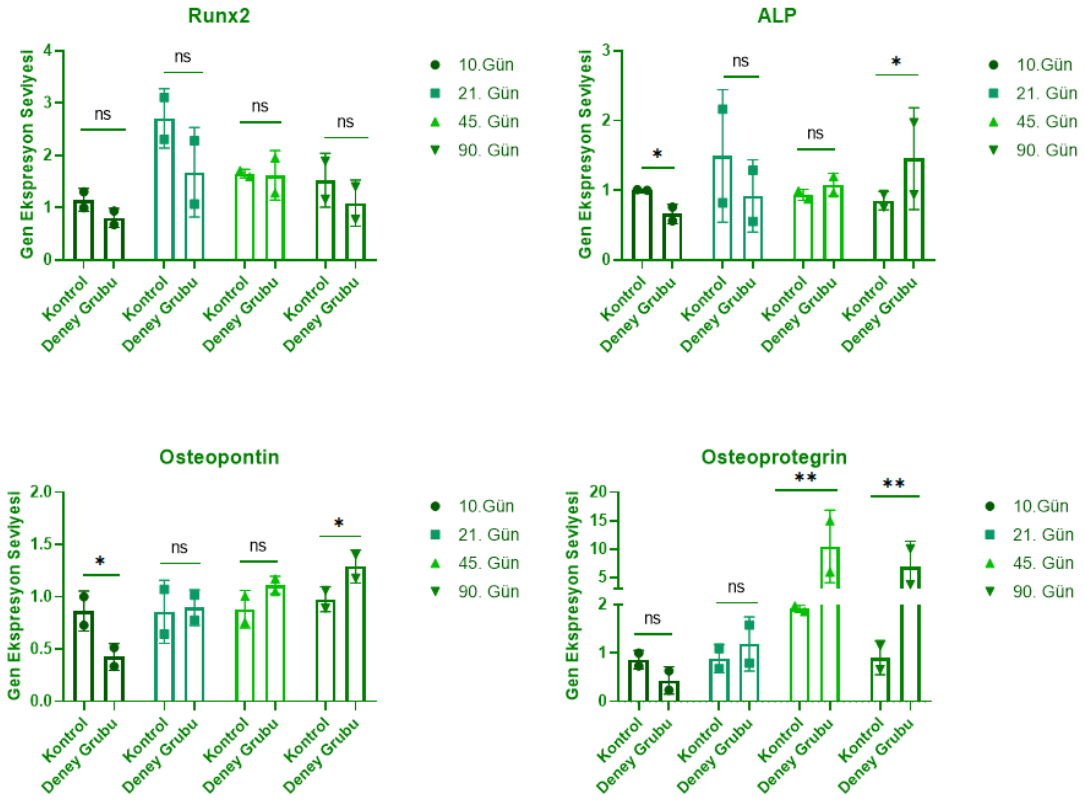
Şekil 2: QSM/nHAp ve kontrol grubu örneklerinin SEM görüntülerini farklı büyütmelerde (750, 1500 ve 5000X) ve zaman noktalarında görüntüleri (ölçek çubukları 750 ve 1500X için 10 µm'yi ve 5000X büyütme için 1 µm'yi temsil eder).



Şekil 3: Tavşan diş dokusunun yapısal illüstrasyonu (BioRender'da oluşturulmuştur) ve dentin oluşumunu ortaya çıkaran QSM/nHAp örneklerinden SEM görüntüleri (ölçek çubukları: 10 ve 1 µm).

4.3. Real-Time PCR

İmplantasyonunun 10., 21., 45. ve 90. gününü takiben eksplante edilen dokular ile gerçekleştirilen gen ekspresyon çalışması sonuçları Şekil 4' de sunulmuştur. Sonuçların değerlendirilmesinde ve grupların karşılaştırılmasında tek-yönlü ANOVA ve Tukey's posthoc testleri kullanılmıştır. Erken osteojenik farklılaşma belirteci olan RUNX2 ifadelenmesi incelendiğinde implantasyonun 21. gününde 10. güne oranla deney grubunda yaklaşık 2 katlık bir gen ifadesi artışı görülmüştür.



Şekil 4: 10., 21., 45. ve 90. gününü takiben eksplante edilen dokular ile gerçekleştirilen gen ekspresyon çalışması sonuçları

RUNX2 ifadesindeki bu artış ilerleyen zamanlarda stabil kalmıştır ve bu durum bu genin erken osteojenik farklılaşma ile ilgili olması bakımından rasyoneldir. Bununla birlikte hiçbir zaman noktasında kontrol ve deney grupları arasında anlamlı fark bulunmamıştır. Bu durum kontrol grubunda sınırlı yeni doku oluşumu ya da spiküllerden sınırlı yeni doku oluşumundan kaynaklanıyor olabilir. Olgunlaşmış kemik doku oluşumu hakkında bilgi veren ALP

ifadelenmesi incelendiğinde bu genin ifadelenmesi 45. güne kadar stabilken 90. günde 10. güne oranla yaklaşık 3-katlık bir artış görülmüştür ve ayrıca kontrol grubuyla deney grubu arasında 90. günde istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) bir fark vardır. Bir başka osteojenik belirteç olan osteopontin ifadelenmesi incelendiğinde ise deney grubunda post-implantasyon süresince bir artış görülmüştür. Bu artış deney grubunda 90. Günde 10. güne oranla yaklaşık 3-kat fazla bulunmuş ve ayrıca 90. günde istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) bir fark vardır. Son olarak bir başka olgunlaşmış kemik doku belirteci olan osteoprotegrin ifadelenmesi incelendiğinde ise post-implantasyon süresince gen ifadelenmesinde bir artış görülmüştür. Bu artış deney grubunda 90. günde 10. güne oranla yaklaşık 10-kat fazla bulunmuş ve ayrıca 45. ve 90. günde istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.01$) bir fark vardır. Sonuçlar, implantasyonun erken safhalarında erken ostejenik farklılaşma belirteci olan RUNX2'nun; implantasyonun ileri safhalarında ise olgunlaşmış kemik doku belirteçleri olan ALP, osteopontin ve osteoprotegrin ifadelerinin ileri yönde düzenlendiğini ve istatistiksel olarak anlamlı farklılıkların bulunduğu göstermektedir. Bu sonuçlar kemik-diş doku gelişimsel süreçleri ile uyum içerisindedir.

4.4. Histolojik Değerlendirme

QSM/nHAp iskeleleri üzerinden doku tepkisini değerlendirmek ve kritik olarak kusurlu alan içindeki doku rejenerasyonu ile kemik-iskele arayüzünü analiz etmek için histokimyasal (HC) boyama yapıldı. Tavşan çenelerinden toplanan numuneler (n=6) üzerinde 10, 21, 45 ve 90. günlerde H&E, ve AR boyaması (Şekil 5-6) kullanılarak HC boyama yapıldı.

Deneklerin sakrifikasyon günlerinde spesmenler elde edildi. 10. Günde defekt alanındaki enflamatuar yanıt değerlendirildi. 21.günde çalışma grubunda iyileşme ve yeni kemik oluşumu incelenirken deney grubunda biyomateryalin yeni kemik oluşumu üzerine etkisi değerlendirildi. 45. ve gün. 90. Günlerde greft materyallerinin yeni oluşan kemik dokusu üzerindeki etkilerinin yanısıra tüm zaman aralıklarında biyomateryalin rezorpsiyon süreci de değerlendirildi. Histolojik değerlendirmelerde 10. Ve 21. günlerde greft materyali defekt alanında izlenirken 45 ve 90. Günlerde rezorbe olduğu gözlendi.

10. günde Deney grubunda defekt alanında İnflamatuar yanıt olmasına rağmen yabancı cisim reaksiyonu ve rezorpsiyon gözlenmedi, kontrol grubunda ise defekt alanının fibrotik bağ dokusu varlığı gözlendi.

21. günde deney grubunda biyomateryalin 21. günde fibrotik doku migrasyonunu önlediği ve kademeli olarak defekt tabanında rezorpsiyona uğradığı ve bunun yerine yeni kemik dokusunun ve diş jermlerinin oluşmaya başladığı izlendi. Kontrol grubunda ise defekt tabanında yeni

kemik oluşumu başlamış ancak kavitenin yoğunluklu olarak bağ dokusu ile kaplı olduğu histolojik olarak gözlendi. Defekt alanında herhangi bir diş jermi varlığı veya odontogenez başlangıcı gözlenmedi.

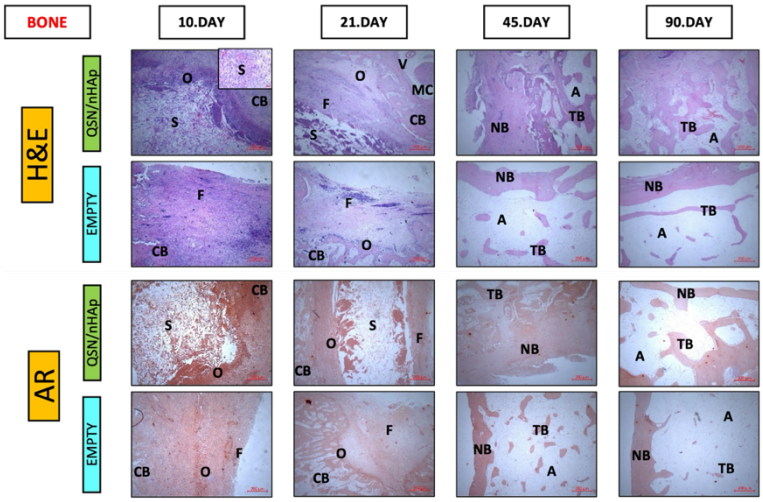
45. günlerde deney grubunda biyomateryalin tamamen rezorbe olduğu ve defekt alanının yoğunluklu yeni kemik oluştuğu, kontrol grubunda ise yeni kemik oluşumunun yanında adipoz dokuların varlığının deney grubuna göre daha fazla olduğu gözlendi. Bunun yanında deney grubunda yeni diş jermlerinin varlığı izlenmesine rağmen kontrol grubunda defekt alanında sadece trabeküler kemik ve adipoz doku varlığı saptandı.

90. günde Deney ve Kontrol grubunda defektteki bağ dokusunun kemik ve yağ dokusuna farklılaştığı görüldü. Histolojik veriler makroskobik bulguları destekler nitelikteydi. Kemik doku değerlendirildiğinde 45.günde 90.güne göre istatistiksel olarak daha iyi oluştuğu gözlendi. Deney gruplarında 21., 45. ve 90. günlerde defekt bölgesinde yeni diş jermleri varlığı tüm deneklerde gözlenirken, Kontrol grubunda 90. günde sadece iki denekte yeni diş jermi gözlendi. Sakrifikasyon günlerine göre kontrol ve deney gruplarının grup içi karşılaştırmalarında anlamlı bir farklılık gözlendi ($p<0.001$). Gruplar arası karşılaştırmalarda 10 ve 90. Günlerde kontrol ve deney grupları arasında anlamlı bir farklılık gözlenmezken ($p=1.00$) 21 ve 45. Günlerde deney grubunda meydana gelen iyileşmeninin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak daha anlamlı olduğu sonucu elde edildi ($p=0.046$; $p=0.025$).(Tablo 2)

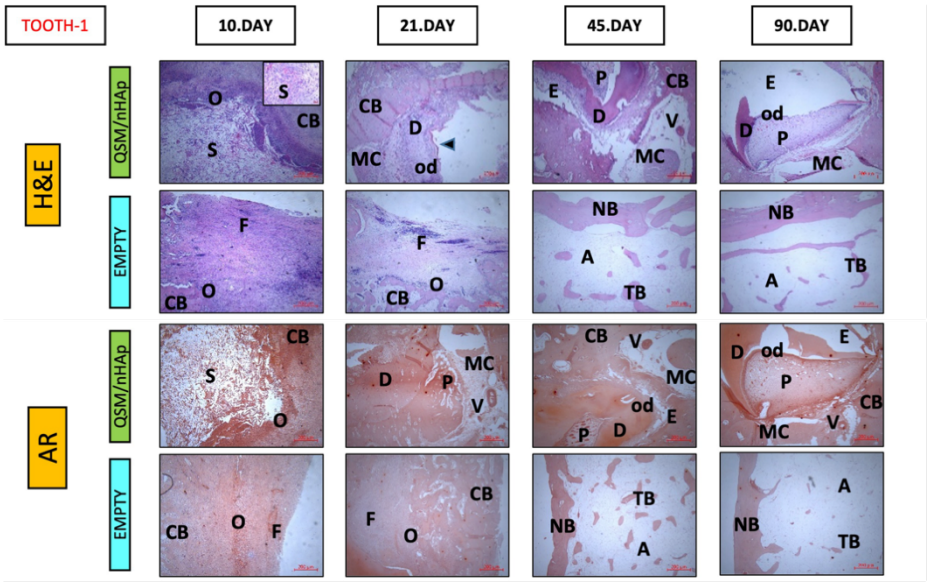
Tablo 2: QSM/nHAp ve Deney grubu skorlamalarının örneklerinin puanlama sonuçların istatistiksel analizi.

	10th day	**21st day**	**45th day**	**90th day**	
	Median (Min-Max)	Median (Min-Max)	Median (Min-Max)	Median (Min-Max)	
Control Group	2 (1-2)^{A}	2 (2-3)^{AB}	3 (3-4)^{BC}	5 (4-5)^{C}	**p<0.001**
QSM/nHAp Group	2(1-2)^{A}	3 (2-4)^{A}	4 (4)^{AB}	5(4-5)^{B}	**p<0.001**
	p=1.000	**p=0.046**	**p=0.025**	p=1.000	

Farklı üst simge harfler (^{A,B,C}), satırdaki istatistiksel olarak anlamlı farklılıkları göstermektedir.



Şekil 5 : Kemik rejenerasyonunu takiben QSM/nHAp ve kontrol gruplarından alınan kesitlerin 10, 21, 45 ve 90. günlerde HC boyaması yapıldı. (Hematoksilin Eozin (H&E), Alizarin Kırmızısının (AR) histoloji fotoğrafları; 10X; ölçek çubuğu: 200 µm). Kısaltmalar: S, İskele; V, Damar; A, Yağ dokusu; F, Kolajen lifleri; TB-Trabeküler Kemik; O, Osteoblast; CB, Kompakt Kemik; NB, Yeni kemik).



Şekil 6: QSM/nHAp'tan HC boyaması ve 10, 21, 45 ve 90. günlerde diş rejenerasyonunu gösteren kontrol bölümleri. (Hematoksilin Eozin (H&E), Alizarin Kırmızısının (AR); 10X; ölçek çubuğu: 200 µm). Kısaltmalar: S, İskele; V, Damar; A, Yağ dokusu; F, Kolajen lifleri; T, Diş tomurcuğu; E, Mine; D, Dentin; od, osteodentin; P, Pulpa; TB-Trabeküler Kemik; O, Osteoblast; CB, Kompakt Kemik; NB, Yeni kemik; MC, Mandibular kanal; Siyah üçgen dişin morfogenezinin başlangıcı).

5.TARTIŞMA

Geliştirilen biyomateryallerin *in vitro* çalışmalar klinik ortamı ve insan çalışmalarını yeterince kopyalayamaz. Araştırma ile klinik kullanıma/ticarileştirmeye dönüştürülmesi arasındaki bu boşluğu doldurmak için biyomateryalleri değerlendirmeye yönelik "ideal" klinik öncesi modellere büyük ölçüde ihtiyaç duyulmaktadır. Klinik kullanımı öncesi *in vivo* hayvan deneyleri ile desteklenmesi gerekmektedir.[44]

Bildiğimiz kadarıyla, osteojenik potansiyeli artıran QSM polimerinin nHAp ile kombinasyonu literatürde ilk kez in vivo kemik rejenerasyonu için iskele olarak kullanılmıştır. Çalışmada QSM/nHAp iskelelerinin rejeneratif potansiyeli, uygun kemik rejenerasyonunu tetiklemek amacıyla tavşanlarda kritik boyuttaki mandibular defekt için değerlendirilmiştir.

Geliştirilen QSM/nHAp temelli biyomateryalin defekt alanında uzun dönemde kemik doku yapımına pozitif etkisi olduğu gözlenmiştir. Şaşırtıcı bir şekilde, 45. güne kıyasla 90. günde kemik onarımının miktarının kontrol grubunda biraz daha düşük olduğu gözlenmiştir. Bunun nedenin, yeni kemiğin greftlenmemiş defekt boşluğunda 45 günde hızla gelişmesi ve 90 günde rezorbe olduğunu düşündürmüştür. Campillo ve ark. yaptıkları çalışmada da benzer sonuçlar elde etmişlerdir. [44]

Mevcut literatürde bu biyopolimerin iskele tabanlı uygulamaları incelenirken, memeli hücrelerinde tutarlı bir model ortaya çıkmıştır: gelişmiş canlılık ile birlikte sferoide benzeyen bir yapı oluşumu sergilemişlerdir. QSM ve nanokompozitleri, bu tekrarlayan sferoid oluşturma sonuçlarına dayanarak in vivo çalışmalarda spontan sferoid oluşumu için uygun bir niş oluşturmuştur.[30-32,45,46]

Literatürde tavşan in vivo mandibular rejenerasyonu için çeşitli çalışmalar bulunmaktadır.[38,47-50,52-55]

Hidroksiapatit ve poliamid[48,49], vasküler endotel hücreleri ve (EC'ler) ve mezenkimal kök hücrelerin (MSC'ler) bir kültür plakası üzerinde veya bir polilaktit glikolik asit (PLGA) iskelesi üzerinde kombinasyonun uygulanması[56], polikaprolakton trikalsiyum fosfat içeren[50] veya polikaprolakton/hidroksiapatit/beta kalsiyum fosfat[51], gibi iskeleler kemik defekti rejenerasyonu için kullanılmışlardır.

Çalışmadaki ilgi çekici konulardan bir tanesi de kontrol grubu ile karşılaştırıldığında deney grubunda defekt alanında yeni diş jermlerinin oluşmasıdır. Ayrıntılı literatür taraması yaptığımız çalışmamızda birçok araştırmacı tavşan mandibulasında biyomateryal çalışmaları yapmıştır.[48,52-60] Ancak elde ettikleri sonuçlar değerlendirildiğinde kemik rejenerasyonuna yönelik başarılı sonuçlar bildirilmiş olmasına rağmen hiçbiri diş ve kemik rejenerasyonunun

birlikte geliştiğini göstermemiştir. Bu nedenle, QSM/nHAp ile yürütülen çalışma, kemik ve diş rejenerasyonu için uygun bir niş görevi görme konusunda üstün bir yeteneğe sahip olan bitki bazlı doğal ve biyouyumlu formülasyonu nedeniyle değerli ve yeni olduğu düşünülmektedir.

Biyomateryal uygulanmış olan defektlerde boş bırakılan defektlere göre dikkate değer ölçüde diş jermi varlığı oluşması, boş bırakılan defektlerde hiç jerm oluşmaması veya en erken 90. Günde oluşmaya başlaması, biyomateryalin hidrofilik olması ve 3D biyoiskele içerisinde hücrelerin spherik form alarak defekt alanındaki kök hücrelerin farklılaşmasına destek olmasına ve belki de organogenezise izin vermesine sebep olduğu fikrini oluşturmuştur.

Geliştirilen biyomateryalin yeni diş germleri oluşturduğunu iddia etmek oldukça iddialı bir yaklaşım olacaktır. Ancak, QSM/nHAp'ın defekt bölgesine uygulanmasının, kontrol grubunun tersine, diş germi gelişmesiyle sonuçlandığı bir gerçektir. Çalışmanın süresi ve denek sayısına bakıldığında, geliştirilen biyomateryalin defekt alanında kontrol grubuna göre nispeten daha etkili farklılaşma ve organogenezi kolaylaştırdığı düşüncesine yol açmıştır.

Grubumuzun daha önce yaptığı bir in vitro çalışma, kök hücrelerin QSM/nHAp iskelesi içerisinde küresel yapılar oluşturmaya eğilimli olduğunu ve daha sonra yüksek konsantrasyon nedeniyle kemikle ilgili hücrelere farklılaştığını kanıtlanmıştır.[32]

Tavşanların diş kökleri açık olduğu için normal şartlarda diş yenilenme süreci oldukça hızlıdır ve köklerin apikal kısımlarında çok sayıda kök hücrenin olduğu varsayılmaktadır. Ancak tüm tavşan dişleri hipsodontdur, yani dişin gerçek kökü yoktur, uzun taç yapısına sahiptir.[38] Öte yandan, diş gelişimi fenomeni, diş progenitör hücrelerinin hidrofilik iskele materyali içinde birikmesi benzer davranış kinetiği bu in vivo çalışma için geçerli olabilir. Histolojik boyama, qRT-PCR ve SEM analizlerine göre, şişmiş QSM/nHAp iskelesi içerisinde hafif yağ dokusu birikimi ile oluşan doğal fibrilasyon sürecinin, diş progenitör hücrelerinin agregasyonu için uygun bir ortam yaratabileceği ve diş jermlerini tetikleyebileceği düşünülmektedir.

Yılmaz ve arkadaşları da yaptıkları çalışmada genel olarak, QSM bazlı nanokompozitlerin düşük maliyeti, kolay kullanımı ve in vitro biyouyumlu doğası ile içsel hidrasyon tabakası oluşturma kapasitesi nedeniyle 3D hücre kültüründe kullanılabilecek iyi bir alternatif materyal olabileceğini bildirmişlerdir.[46]

Kullanılan biyomalzemenin hibrit yapısı iskelenin esnek olmasını sağlamaktadır. Bu özelliği ile klinik kullanımda kemik greftlerinde karşılaştığımız kırılma ve iskele yapısını kaybetme problemini ortadan kaldırması, mevcut gözeneklilik ve iskele yapısını koruyarak

defekt alanını şeklini alması, hidrofilik özelliklerine bağlı olarak hücrelerin spherik formda kalabilmesi ile alanda kullanılan greftler arasında yenilik ve farklılık oluşturmaktadır.

6.SONUÇ

AÇM/nHAp biyoiskelelerin kolay ve ucuz yöntemlerle temin edilmesi, biyolojik olarak insan hücrelerinde immün reaksiyon oluşturmaması ve hücresel yenilenmede uyarıcı etkilere sahip olması biyomedikal malzeme olarak geliştirilmesi için önemli bir alternatif olarak düşünülebilir. Bu yönüyle bitkisel kökenli polisakkarit yapıda bir malzemenin *in vivo* çalışmasının yapılmasının literatüre bilimsel anlamda yenilik ve farklılık katmıştır. Sonuç olarak, QSM-nHAp biyoiskelelerinin hidrofilik, esnek ve dayanıklı özellikleri nedeniyle özellikle kraniyomaksillofasiyal bölgede tercih edilebilir bir biyomateryal olduğu düşünülmektedir.

KAYNAKLAR.

1. Zahedi, E., Ansari, S., Wu, B. M., Bencharit, S. & Moshaverinia, A. Hydrogels in craniofacial tissue engineering. Biomaterials for Oral and Dental Tissue Engineering, Elsevier Ltd, 2017,47-64.
2. Almela, T., Brook, I. & Moharamzadeh, K. Bone tissue engineering in maxillofacial region. Biomaterials for Oral and Dental Tissue Engineering (Elsevier Ltd, 2017). doi:10.1016/B978-0-08-100961-1.00023-2
3. Sağlam, N. & Korkusuz, P. Kemik grefti yerine geçen substratlar ve etki mekanizmaları. TOTBİD Derg.,2017, 16, 485–492.
4. Mehrabani, D., Khodakaram-Tafti, A., Shaterzadeh-Yazdi, H., Zamiri, B. & Omidi, M. Comparison of the regenerative effect of adipose-derived stem cells, fibrin glue scaffold and autologus bone graft in experimental mandibular defect in rabbit. Dent. Traumatol.2018, 34(6):413-420.
5. Lei, B., Guo, B., Rambhia, K.J. et al. Hybrid polymer biomaterials for bone tissue regeneration. Front. Med.,2019, 13, 189–201.
6. Şener, B. C. & Ruzgar, N. M. Clinical Applications of Tissue Engineering with Stem Cells in Oral and Maxillofacial Surgery: A Review of Literature. Turkish Clin. J. Oral Maxillofac. Surg. Spec. Top.,2016, 2, 61–72.
7. Kim, H. D. et al. Biomimetic materials and fabrication approaches for bone tissue engineering. Adv. Healthc. Mater.2017, 6, 1–18.
8. Maji, S., Agarwal, T., Das, J. & Maiti, T. K. Development of gelatin/carboxymethyl chitosan/nano-hydroxyapatite composite 3D macroporous scaffold for bone tissue engineering applications. Carbohydrate Polymers 189, (Elsevier Ltd., 2018).
9. Wang, W. & Yeung, K. W. K. Bioactive Materials Bone grafts and biomaterials substitutes for bone defect repair : A review. Bioact. Mater.,2017, 2, 224–247.
10. Giannoudis, P. V, Dinopoulos, H. & Tsiridis, E. Bone substitutes : An update. 20–27 (2005).
11. Crawford, A. & Bardsley, K. Regeneration concerns in craniofacial cartilage and bone defects. Biomaterials for Oral and Dental Tissue Engineering, Elsevier Ltd, 2017, 405-428.
12. Saiz, E. et al. Perspectives on the role of nanotechnology in bone tissue engineering. Dent. Mater., 2012, 29, 103–115.

13. Moussa, N. T. & Dym, H. Maxillofacial Bone Grafting Materials. Dent. Clin. North Am.,2020, 64, 473–490.
14. Chen, L. et al. Drug-Loadable Calcium Alginate Hydrogel System for Use in Oral Bone Tissue Repair. Int. J. Mol. Sci.,2017, 18, 9–17.
15. Ji J., Tong X., Huang X, Zhang J, Qin H., Patient-Derived Human Induced Pluripotent Stem Cells From Gingival Fibroblasts Composited With Defined Nanohydroxyapatite/Chitosan/Gelatin Porous Scaffolds as Potential Bone Graft Substitutes. Translational Medicine, 2016, 5 (1), 95–105.
16. Altunkaynak, B. Z. & Kabak, Y. B. The Use of Sequential VEGF- and BMP2-Releasing Biodegradable Scaffolds in Rabbit Mandibular Defects. J Oral Maxillofac Surg., 2017, 75, 1–14 .
17. Zhang, W. et al. Effect of calcium citrate on bone integration in a rabbit femur defect model. Asian Pac. J. Trop. Med.,2012, 5, 310–314.
18. Yu, H. et al. PEEK - biphasic bioceramic composites promote mandibular defect repair and upregulate BMP - 2 expression in rabbits. Mol. Med. Rep.,2017, 17, 8221–8227.
19. Lopez, C. D. et al. Three dimensionally printed bioactive ceramic scaffold osseoconduction across critical-sized mandibular defects. J. Surg. Res.,2018, 223, 115–122.
20. Bhat, S. & Kumar, A. Biomaterials and bioengineering tomorrow's healthcare. Biomatter, 2013, 3(3): 24717 .
21. Mahmood, S. K. et al. In vivo evaluation of a novel nanocomposite porous 3D scaffold in a rabbit model: Histological analysis. Int. J. Nanomedicine, 2017, 12: 8587–8598.
22. Pereira, H. F., Cengiz, I. F., Silva, F. S., Reis, R. L. & Oliveira, J. M. Scaffolds and coatings for bone regeneration. J Mater Sci Mater Med. 2020 Mar 2;31(3):27.
23. El-Meliegy, E., Abu-Elsaad, N. I., El-Kady, A. M. & Ibrahim, M. A. Improvement of physico-chemical properties of dextran-chitosan composite scaffolds by addition of nano-hydroxyapatite. Sci. Rep.,2018, 8, 1–10.
24. Ashrafizadeh, M., Han, S. S., Khang, G. & Roveimiab, Z. Recent Advances in Natural Gum - Based Biomaterials for Tissue Engineering and Regenerative Medicine :A Review., Polymers (Basel). 2020 9;12(1):176.
25. Pacifico, S. et al. Antioxidant properties and cytotoxic effects on human cancer cell lines of aqueous fermented and lipophilic quince (Cydonia oblonga Mill.) preparations. Food Chem. Toxicol.,2012, 50, 4130–4135.

26. Hussain, M. A., Muhammad, G., Haseeb, M. T. & Tahir, M. N. Quince Seed Mucilage: A Stimuli-Responsive/Smart Biopolymer.,2019, 127–148 (2019).
27. Ashraf, M. U., Muhammad, G., Hussain, M. A. & Bukhari, S. N. A. Cydonia oblonga M ., A Medicinal Plant Rich in Phytonutrients for Pharmaceuticals.,2016, 7, 1–20.
28. Alizadeh, H., Rahnema, M., Semnani, S. N. & Hajizadeh, N. Detection of Compounds and Antibacterial Effect of Quince (Cydonia oblonga Miller) Extracts in vitro and in vivo. J. Biol. Act. Prod. from Nat.,2013, 3, 303–309.
29. Shahbazi, Y. & Moosavy, M. H. Quince seed mucilage supplemented with titanium dioxide and Silicon dioxide nanoparticles. Nanomedicine Res. J.,2019, 4, 157–163.
30. Şimşek, E., Karaca, B. & Arslan, Y. E. Bioengineered three-dimensional physical constructs from quince seed mucilage for human adipose-derived mesenchymal stem cells. J. Bioact. Compat. Polym.,2020, 35, 240–253.
31. Hilal D. Yilmaz, Ugur Cengiz, Yavuz E. Arslan, Fadime Kiran, From a plant secretion to the promising bone grafts: Cryogels of silicon-integrated quince seed mucilage by microwave-assisted solegel reaction. J Biosci Bioeng. 2021 Apr;131(4):420-433.
32. Cetin Genc C, Yilmaz HD, Karaca B, Kiran F, Arslan YE. Nano-hydroxyapatite incorporated quince seed mucilage bioscaffolds for osteogenic differentiation of human adipose-derived mesenchymal stem cells. Int J Biol Macromol.,2022, 15;195:492-505.
33. Sevil Kose et al., Advances in Experimental Medicine and Biology. Book Title: Novel Biomaterials for Regenerative Medicine. Editors: Heung Jae Chun et al., Volume: 1077, Springer Singapore
34. Zhou, H. & Lee, J. Nanoscale hydroxyapatite particles for bone tissue engineering. Acta Biomaterialia, 2011, 7, 2769–2781.
35. Köse, S., Korkusuz, F., Korkusuz, P., Timuçin, M. & Ciftci, E. Boron Containing Nano Hydroxyapatites (B-n-HAp) Stimulate Mesenchymal Stem Cell Adhesion, Proliferation and Differentiation. Key Eng. Mater.,2014, 631:373–378.
36. Kankilic, B., Bilgic, E., Korkusuz, P. & Korkusuz, F. Vancomycin containing PLLA/β-TCP controls experimental osteomyelitis in vivo. J. Orthop. Surg. Res.,2014, 9: 114 (2014).
37. Cunniffe, G. M., Curtin, C. M., Thompson, E. M., Dickson, G. R. & O'Brien, F. J. Content-Dependent Osteogenic Response of Nanohydroxyapatite: An in Vitro and in Vivo Assessment within Collagen-Based Scaffolds. ACS Appl. Mater. Interfaces, 2016, 8, 23477–23488.

38. Gusi, N., Ivkovi, A. & Vafaye, J. Nanobiotechnology and bone regeneration : a mini-review., Int Orthop. 2014;38(9):1877-84.
39. Gritsch, L. et al. Chitosan/hydroxyapatite composite bone tissue engineering scaffolds with dual and decoupled therapeutic ion delivery: Copper and strontium. J. Mater. Chem.,2019, B 7, 6109–6124.
40. Arrive Guidelines. Arrive Guidelines. Available at: https://arriveguidelines.org/arrive-guidelines.
41. Festing, M. F. W. & Altman, D. G. Guidelines for the design and statistical analysis of experiments using laboratory animals. ILAR J.,2002, 43, 244–257.
42. Shah, S. R. et al. A composite critical-size rabbit mandibular defect for evaluation of craniofacial tissue regeneration. Nat. Protoc.,2016, 11, 1989–2009.
43. Huo, M. H., Troiano, N. W., Pelker, R. R., Gundberg, C. M. & Friedlaender, G. E. The influence of ibuprofen on fracture repair: Biomechanical, biochemical, histologic, and histomorphometric parameters in rats. J. Orthop. Res.,1991, 9, 383–390.
44. Campillo VE, Langonnet S, Pierrefeu A, Chaux-Bodard AG. Anatomic and histological study of the rabbit mandible as an experimental model for wound healing and surgical therapies. Lab Anim. 2014; 48(4):273-7.
45. Guzelgulgen, D. Ozkendir-Inanc, U. H. Yildiz and A. Arslan-Yildiz, Glucuronoxylan-Based Quince Seed Hydrogel: A Promising Scaffold for Tissue Engineering Applications, Int. J. Biol. Macromol., 2021, 180, 729–738.
46. Yilmaz HD, Cengiz U, Derkus B, Arslan YE. Development of plant-based biopolymer coatings for 3D cell culture: boron-silica-enriched quince seed mucilage nanocomposites. Biomater Sci. 2023 Jul 25;11(15):5320-5336.
47 .Dalfino S, Savadori P, Piazzoni M, et al. Regeneration of Critical-Sized Mandibular Defects Using 3D-Printed Composite Scaffolds: A Quantitative Evaluation of New Bone Formation in In Vivo Studies. *Adv Healthc Mater*. 2023;12(21):1-20. doi:10.1002/adhm.202300128
48. Guo J, Meng Z, Chen G, et al. Restoration of Critical-Size Defects in the Rabbit Mandible Using Porous Nanohydroxyapatite-Polyamide Scaffolds. *Tissue Eng Part A*. 2012;18(11-12):1239-1252. doi:10.1089/ten.tea.2011.0503
49. Zhang JC, Lu HY, Lv GY, Mo AC, Yan YG, Huang C. The repair of critical-size defects with porous hydroxyapatite/polyamide nanocomposite: an experimental study in rabbit

mandibles. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2010;39(5):469-477. doi:10.1016/j.ijom.2010.01.013

50. Morsczeck C, Schmalz G. Transcriptomes and Proteomes of Dental Follicle Cells. *J Dent Res*. 2010;89(5):445-456. doi:10.1177/0022034510366899
51. Ali ZH, Mubarak R. Histomorphological study of dentine pulp complex of continuously growing teeth in the rabbits. *Life Sci J*. 2012;9(3):1554-1564. https://www.lifesciencesite.com/lsj/life0903/226_10287life0903_1554_1564.pdf
52. Kim C, Yang HJ, Cho TH, Lee BS, Gwon TM, Shin S, Kim IS, Kim SJ, Hwang SJ. Implantable electrical stimulation bioreactor with liquid crystal polymer-based electrodes for enhanced bone regeneration at mandibular large defects in rabbit. Med Biol Eng Comput. 2020 Feb;58(2):383-399.
53. Kotagudda Ranganath S, Schlund M, Delattre J, Ferri J, Chai F. Bilateral double site (calvarial and mandibular) critical-size bone defect model in rabbits for evaluation of a craniofacial tissue engineering constructs. Mater Today Bio. 2022 Apr 20;14:100267.
54. Xu F, Ren H, Zheng M, Shao X, Dai T, Wu Y, Tian L, Liu Y, Liu B, Gunster J, Liu Y, Liu Y. Development of biodegradable bioactive glass ceramics by DLP printed containing EPCs/BMSCs for bone tissue engineering of rabbit mandible defects. J Mech Behav Biomed Mater. 2020 Mar;103:103532.
55. Zhang B, Yin X, Zhang F, Hong Y, Qiu Y, Yang X, Li Y, Zhong C, Yang H, Gou Z. Customized bioceramic scaffolds and metal meshes for challenging large-size mandibular bone defect regeneration and repair. Regen Biomater. 2023 Jun 7;10:rbad057.
56. Liu J, Liu C, Sun B, Shi C, Qiao C, Ke X, Liu S, Liu X, Sun H. Differentiation of rabbit bone mesenchymal stem cells into endothelial cells in vitro and promotion of defective bone regeneration in vivo. Cell Biochem Biophys. 2014 Apr;68(3):479-87.
57. Soares MQS, Van Dessel J, Jacobs R, Yaedú RYF, Sant'Ana E, da Silva Corrêa D, Madeira MFC, Duarte MAH, Rubira-Bullen IRF. Morphometric evaluation of bone regeneration in segmental mandibular bone defects filled with bovine bone xenografts in a split-mouth rabbit model. Int J Implant Dent. 2019 Sep 10;5(1):32.
58. Kim J, Yang HJ, Cho TH, Lee SE, Park YD, Kim HM, Kim IS, Seo YK, Hwang SJ, Kim SJ. Enhanced regeneration of rabbit mandibular defects through a combined treatment of electrical stimulation and rhBMP-2 application. Med Biol Eng Comput. 2013 Dec;51(12):1339-48.

59. Nuntanaranont T, Promboot T, Sutapreyasri S. Effect of expanded bone marrow-derived osteoprogenitor cells seeded into polycaprolactone/tricalcium phosphate scaffolds in new bone regeneration of rabbit mandibular defects. J Mater Sci Mater Med. 2018 Feb 9;29(3):24.v
60. Schlund M, Depeyre A, Kotagudda Ranganath S, Marchandise P, Ferri J, Chai F. Rabbit calvarial and mandibular critical-sized bone defects as an experimental model for the evaluation of craniofacial bone tissue regeneration. J Stomatol Oral Maxillofac Surg. 2022 Nov;123(6):601-609.
61. Rottgers SA, Cray JJ Jr, Smith DM, Mooney MP, Losee JE, Cooper GM. Bone morphogenetic protein 2–mediated mandible reconstruction successfully heals bony defects but inhibits concurrent inferior alveolar nerve grafting: a rabbit experimental model. J Craniofac Surg. 2014 Nov;25(6):2241-5.