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

ORAL VE MAKSİLLOFASİYAL BÖLGEDE KULLANILMA POTANSİYELİ OLAN nHA/MÜSİLAJ TEMELLİ BİYOLOJİK İSKELELERİN ÜRETİLMESİ VE İ*N VİTRO* DEĞERLENDİRİLMESİ

Proje No: **TSA-2019-2933**

Bağımsız Araştırma

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:

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

Projedeki Araştırmacılar
Dr.Öğr.Üyesi Yavuz Emre ARSLAN[1]
Arş.Gör. Hilal Deniz YILMAZ[1]
Doç.Dr. Fadime KIRAN[2]

1- ÇOMÜ Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Bölümü
2- Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji ve Genetik ABD

Şubat 2021

ÇANAKKALE

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimince Desteklenmiştir. Proje Numarası: TSA-2019-2933

Dr. Öğr. Üyesi Çiğdem ÇETİN GENÇ

Proje Yürütücüsü

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖZET……. 9

ABSTRACT…… 11

1. GİRİŞ……..... 13

2. GENEL BİLGİLER…… 13

3. GEREÇ ve YÖNTEM……. 17

3.1 Gereç……..... 17

3.2 Yöntem……..... 18

3.2.1 Ayva Çekirdeği Müsilajı Üretimi ve Liyofilizasyon İşlemi…… 18

3.2.2 QSM/nHAp Temelli 3B İskelelerin Üretimi…… 19

3.2.3. QSM/nHAp Temelli 3B İskelelerin Çapraz Bağlaması……. 22

3.2.4. QSM/nHAp İskelelerin Termal Karakterizasyonu: Termogravimetrik Analiz(TGA)…… 24

3.2.5. QSM/nHAp İskelelerin Mekanik Dayanımlarının Ölçülmesi…….. 24

3.2.6. QSM/nHAp İskelelerin Porozitelerinin Belirlenmesi……..…. 24

3.2.7. QSM/nHAp İskelelerin Şişme Testi……. 24

3.2.8. QSM/nHAp İskelelerin Yüzey Islanabilirlik Özelliklerinin Belirlenmesi (Temas Açısı Belirleme Analizi)……. ……..... ……25

3.2.9. QSM/nHAp İskelelerin Brunauer-Emmett-Teller (BET) ve Barrett-Joyner-Halenda (BJH) Analizleri……... 25

3.2.10. QSM/nHAp İskelelerin Biyobozunurluk Testi……. 25

3.2.11. Hücre Kültürü Uygulaması ve QSM/nHAp İskelelerin *in vitro* Canlılık Testi…. 26

3.2.12. Hücrelendirilmiş QSM/nHAp iskelelerin Morfolojik Gözlem ve Analizi (FE-SEM, FE-SEM EDS Haritalama) ……...……. 29

3.2.13. İmmünohistokimyasal ve Histokimyasal Analizler……. 29

3.2.14. Osteojenik Farklılaşmanın RT-qPCR Analizi ile İncelenmesi…… 30

3.2.15. İstatistiksel Analiz……..... 33

4. BULGULAR…… 34

4.1. Farklı oranlardaki QSM/nHAp iskelelerin Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ve

Enerji Yayılımlı X-Işını Analizi (EDX) Değerlendirmesi……..... 34
4.2. QSM/nHAp İskelelerin Termal Karakterizasyonu: Termogravimetrik Analiz (TGA) ……..…. 36
4.3. QSM/nHAp İskelelerin Mekanik Dayanımlarının Ölçülmesi…….…… 37
4.4. QSM/nHAp İskelelerin Porozitelerinin Belirlenmesi…….…… 37
4.5. QSM/nHAp İskelelerin Şişme Testi…….……..... 39
4.6. QSM/nHAp İskelelerin Yüzey Islanabilirlik Özelliklerinin Belirlenmesi (Temas Açısı Belirleme Analizi) …….…… 40
4.7. QSM/nHAp İskelelerin Brunauer-Emmett-Teller (BET) ve Barrett-Joyner-Halenda (BJH) Analizleri…….…… 41
4.8. QSM/nHAp İskelelerin Biyobozunurluk Testi…….…… 41
4.9. Hücre Kültürü Uygulaması ve QSM/nHAp İskelelerin *in vitro* Canlılık Testi…….. 43
4.10. Hücrelendirilmiş QSM/nHAp İskelelerin Morfolojik Gözlem ve Analizi (FE-SEM, FE-SEM EDS Haritalama) …….…… 43
4.11. İmmünohistokimyasal ve Histokimyasal Analizler…….……..…… 43
4.12. Osteojenik Farklılaşmanın RT-qPCR Analizi ile İncelenmesi…….…. 46
5. TARTIŞMA ve SONUÇ…… 47
6. KAYNAKLAR…… 50

RESİMLER DİZİNİ

Sayfa No

Resim 1. Ayva meyvesi (*Cydonia Oblonga* Mill) ve jel üretilmek üzere ayıklanan ayva çekirdekleri …….. 18

Resim 2. Ayva çekirdeklerinden müsilaj ekstraksiyonu ve liyofilizasyon işlemi……..... 19

Resim 3. Ependorf Tüplerinin içindeki homojen biyomalzeme (A), Teflon kalıplara dökülmüş biyomalzeme (B)…….. 20

Resim 4. Liyofilizasyon işlemi……...….. 21

Resim 5. Teflon kalıp içindeki liyofilize edilmiş iskele (A), 3 farklı oranda oluşturulan iskeleler (B, C)…… **…….**…….. 21

Resim 6. 1:1 oranında nHA/QSM Stereo mikroskop (Zeiss-stemi 305) A- 1X büyütme, B-X büyütme, C-3X büyütme, D-4X büyütme…… ….21

Resim 7. 1:3 oranında nHA/QSM Stereo mikroskop (Zeiss-stemi 305) A- 1X büyütme, B-2X büyütme, C-3X büyütme, D-4X büyütme……... 21

Resim 8. 1:5 oranında nHA/QSM Stereo mikroskop (Zeiss-stemi 305) A- 1X büyütme, B-2X büyütme, C-3X büyütme, D-4X büyütme……. 22

Resim 9. Çapraz bağlama yapılmış iskelelerin çalkalayıcıdaki görüntüleri……. 23

Resim 10. Liyofilize edilmiş iskelelerin görüntüleri…… 23

Resim 11. A- 7 Gün lizozim enzimi ile biodgradasyonu yapılan QSM/nHAp iskeleler B- 14 Gün lizozim enzimi ile biodgradasyonu yapılan QSM/nHAp iskeleler…… 26

Resim 12. A-15'lik falcon tüpün santrifüj sonrası alt kısmında toplanan hADSCs, B- T75 flasklara Kök hücrelerin ekilmesi C- İnvert Faz-Kontrast Mikroskop (Primovert, Zeiss, Almanya)…… ……..…… 27

Resim 13. Hücre kültürü mikroskobik görüntüler A-4X, B-10X…… 27

Resim 14. A- Laminar akışlı kabin içerisinde UV ışık (254 nm) altında 1 saat boyunca sterilizasyon işlemi, **B, C -** Biyoiskelere hADSCs hücrelerinin ekilmesi ve besi yeri eklenmesi, **D-** Santrifüj edilmesi ile falcon tüpün altında toplanan hücreler, **E-**48 kuyucuklu hücre kültürü plastiğindeki biyoiskelellerin inkübatöre yerleştirilmesi (Panasonic, Japan)...…… 28

Resim 15. 1:1 oranında QSM/nHAp SEM (FE-SEM JFM 7100F EDS, JEOL, Japan), A-100X büyütme, B-250X büyütme, C-1500X büyütme, D-2500X büyütme, E-5000X büyütme, F-Enerji Yayılımlı X-Işını Analizi (EDX) sonucu……34

Resim 16. 1:3 oranında QSM/nHAp SEM (FE-SEM JFM 7100F EDS, JEOL, Japan), A-100X büyütme, B-250X büyütme, C-1500X büyütme, D-2500X büyütme…… 34
Resim 17. 1:5 oranında QSM/nHAp SEM (FE-SEM JFM 7100F EDS, JEOL, Japan), A-100X büyütme, B-250X büyütme, C-1500X büyütme, D-2500X büyütme…… 35
Resim 18. A- QSM ve nHAp ayrı ayrı görüntüleri, B-QSM/nHAp Karışımın hazırlanması, C-Kalıplanması, D-Liyofilizasyonu…… 35
Resim 19. QSM/nHAp İskelelerin FE-SEM 100X büyütmedeki kesit görünümleri ve por çapları (Ölçek çubuğu por çaplarının gösterildiği resimde 100 μm'yi; 2500X büyütmenin olduğu resimde 10 μm'yi belirtmektedir.)…….. ……..… 39
Resim 20. Temas açısı cihazı ölçüm görüntüleri……... 40

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1. İskelelerin meydana getirilme süreçleri ……..… 23
Şekil 2. Numunelerden RNA izolasyonunu özetleyen iş akış şeması özeti……..……... 32
Şekil 3. TGA analizi grafiği……..… 36
Şekil 4. QSM/nHAp İskelelerin 7. ve 14. günlerdeki enzim biyobozunurluk grafiği……. 42
Şekil 5. AÇM/nHAp iskelelerin 7., 14. ve 21. günlük hücre kültürü işleminin sonunda yapılan hücre canlılığı (MTT) testi sonuçları. (*: $p<0,05$; ♀: $p>0,05$) …… 43
Şekil 6. QSM/nHAp iskelelerinde osteojenik farklılaşmanın HK ve İHK boyamalar ile incelenmesi (Ölçek çubukları 50 μm'yi göstermektedir) ……...…. 45

TABLOLAR DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 1. Proje kapsamında kullanılan primerler……..… 30
Tablo 2. cDNA sentez kiti bileşenleri……..… 33
Tablo 3. Mekanik Basma Testi……..... 37
Tablo 4. QSM/nHAp İskelelerin gözeneklilik ve ıslanabilirlik özellikleri……..……38
Tablo 5. İskelelerin sıvı tutma kapasitesi ve taşıyabildiği sıvı hacmi (pbs uptake) değerleri. 39
Tablo 6. BET-BJH analiz sonuçları……..… 41
Tablo 7. RNA saflık ve miktar tayinleri……..… 46
Tablo 8. cDNA miktar tayinleri……...…… 46
Tablo 9. Hedef genlerin $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri (ifade kat değişimi)……..…46

ÖZET

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.

Bu çalışmada kemik doku mühendisliği uygulaması kapsamında; Ayva çekirdeği müsilajına nanohidroksiapatit kemik (nHA) emdirilerek yeni bir iskele oluşturuldu. Kemiğin doğal mikromimarisini ve ortamını taklit etmek için ayva çekirdeği müsilajı içerisinde 3 farklı oranda nanohidroksiapatit (nHAp) kullanılarak 3boyutlu biyoiskeleler üretildi. Yapılan SEM görüntüleme ve EDX analizi sonucu 3 farklı orandaki AÇM/nHAp iskelelerinden en iyi yüzey morfolojisi ve gözenek boyutlarının 1:1 oranıyla sağlandığı sonucuna ulaşılmıştır. İskeleler hazırlandıktan sonra fizikokimyasal, mekanik ve biyolojik olarak test edilmiştir. Malzemenin karakterizasyonu için TGA, mekanik basma testi, porozite ve sıvı tutma testleri, BET-BJH analizi, temas açısı analizi, biyobozunurluk testleri yapılmıştır. TGA analizinin sonuçları incelendiğinde yapılarının 330 °C ve üzerinde bozunmaya başladığı saptandı. İskelelerin mekanik değerlerinde 108,11 ± 9,3 kPa maksimum basınç dayanımı değerine ve %76,02 ± 4,6 maksimum basma gerinimi değerine dayanabildiği görülmüştür. İskelelerin ortalama gözenek çapıları 99,77±28,96 µm, Sıvı yer değiştirme analizi ile AÇM/nHAp gözenekliliği %72.04 ± 1.12 olarak saptandı. AÇM/nHAp'in şişme oranı 6522,77 ± 190,57% ve iskelenin taşıyabildiği sıvı hacmi 221,56 ± 7,92µL elde edildi. Temas açısı analizinde 35.71 µL/sn sonucu elde edilmiştir. Yapılan BET-BJH analizi sonucu iskelelerin yüzey alanı 6.255 m^2/g gözenek hacmi 0.028 (mL/g), por çapı 8.7758nm olarak saptandı. Biyobozunurluk testi sonunda 7. günde % 3.22 ± 0.10, 14. günde % 3.56 ± 0.43 biyodegradasyon değeri elde edilmiştir. İskelelerin yüzey morfolojisi ve yapısal analizlerinde sonra; mezenkimal kök hücreler (human adipose derived mesenchymal stem cells-hAMSCs) iskeleler üzerine ekildi, 7., 14. ve 21. günlerde kültür takip edildi ve MTT testi yapıldı. Hücre kültürü periyodu boyunca yüksek derecede hücre canlılığı gözlenmiş, 7.,14. ve 21. günlerde günler arasında hücre canlılığı açısından istatistik olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır (Φ $p>0,05$).

Histolojik değerlendirme için; Hematoksilen-Eozin, Masson's trikrom ve *von* Kossa boyama tekniği kullanıldı. İmmünohistokimyasal analizler Osteonektin, Osteopontin, Osteokalsin ve Kemik sialoprotein ile gerçekleştirildi. İlaveten, immunokimyasal analizlerde kullanılan Osteonektin, Osteopontin, Osteokalsin ve Kemik sialoprotein gibi biyolojik belirteçler, gen ekspresyonu seviyesinde RT-PZR (Real Time Polymerase Chain Reaction; Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu) analizleri gerçekleştirildi. Histokimyasal / immünohistokimyasal (IH / C) boyamalar ve qRT-PCR sonuçlarına göre QSM-nHAp biyoiskelelerde osteogenez ile ilgili biyobelirteçlerin ifadesi zamana göre artış gösterdiği saptanmıştır.

Sonuç olarak geliştirilen AÇM / nHAp iskelelerinin çene-yüz bölgesinde kemik doku onarımında kullanılma potansiyeline sahip olduğunu ve ileri çalışmalar yapılması gerektiğini düşünüyoruz.

Anahtar Kelimeler: Nanohidroksiapatit, Ayva (Cydonia *oblonga Miller*) Çekirdeği Müsilajı, Kemik Doku Mühendisliği, Mezenkimal Kök Hücreler, Osteojenik Farklılaşma

ABSTRACT

Congenital and developmental defects in the oral and maxillofacial region, pathological formations such as cysts, tumors, and trauma may cause defects in bone and soft tissue that cannot heal spontaneously. Therefore, some biocompatible materials are needed to recover hard and soft tissue. Biomaterials used for the regeneration of lost tissues and organs have an important role in tissue engineering and regenerative medicine. Biological scaffolds produced from natural and synthetic polymers can support tissue or organ formation *in vivo* and *in vitro* conditions.

In this study, within the scope of bone tissue engineering application; A new scaffold was formed by impregnating quince seed mucilage with nanohydroxyapatite bone (nHA). In order to imitate the natural microarchitecture and environment of the bone, 3D bioscales were produced using 3 different proportions of nanohydroxyapatite (nHAp) in quince seed mucilage. As a result of SEM imaging and EDX analysis, it was concluded that the best surface morphology and pore sizes were obtained with 1: 1 ratio of QSM/ nHAp scaffolds in 3 different ratios. After the biological scaffolds were prepared, they were tested physicochemical, mechanically, and biologically. TGA, mechanical compression test, porosity and liquid retention tests, BET-BJH analysis, contact angle analysis, biodegradability tests were performed for the characterization of the material. When the results of the TGA analysis were examined, it was found that their structures began to degrade at 330 ° C and above. It has been observed that the scaffolds can withstand 108.11 ± 9.3 kPa maximum compressive strength value and 76.02 ± 4.6% maximum compression stress value in their mechanical values. The average pore diameter of the scaffolds was 99.77 ± 28.96 µm, and the porosity of QSM/ nHAp was determined as 72.04 ± 1.12% by liquid displacement analysis. The swelling rate of QSM/ nHAp was 6522.77 ± 190.57% and the volume of liquid the scaffold can carry was 221.56 ± 7.92µL. In the contact angle analysis 35.71 µL / sec was obtained. As a result of BET-BJH analysis, the surface area of the scaffolds was determined as 6.255 m^2 / g, pore volume 0.028 (mL / g) and pore diameter as 8.7758 nm. At the end of the biodegradability test, the biodegradation value was 3.22 ± 0.10% on the 7th day and 3.56 ± 0.43% on the 14th day. After the surface morphology and structural analysis of the scaffolds; mesenchymal stem cells (human adipose derived mesenchymal stem cells-hAMSCs) were planted on scaffolds, culture was followed on 7th, 14th and 21st days and MTT test was performed. A high degree of cell viability was observed during the cell culture period, 7., 14. There was no statistically

significant difference in cell viability between days and 21 days (Φ $p>0.05$).

For histological evaluation; Hematoxylin-Eosin, Masson's trichrome, and von Kossa staining were used. Immunohistochemical analyzes were performed with Osteonectin, Osteopontin, Osteocalcin, and Bone sialoprotein. Besides, biological markers such as Osteonectin, Osteopontin, Osteocalcin, and Bone sialoprotein used in immunochemical analyzes, RT-PCR (Real-Time Polymerase Chain Reaction) analyzes were performed at the gene expression level. According to histochemical / immunohistochemical (IH / C) staining and qRT-PCR results, the expression of osteogenesis-related biomarkers in QSM-nHAp was found to increase over time.

As a result, we think that the developed QSM / nHAp scaffolds have the potential to be used in bone tissue repair in the maxillofacial region and further studies are needed.

Keywords: Nanohydroxyapatite, Quince (Cydonia oblonga Miller) Seed Mucilage, Bone Tissue Engineering, Mesenchymal Stem Cells, Osteogenic Differentiation

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 oluşturulması planlanmıştır.

Bu kapsamda; Çanakkale yöresinden toplanan ayva çekirdeklerinin doğal salgısı olan müsilajın ekstrakte edilip, elde edilen materyale nanohidroksiapatit partikülleri emdirilerek kalıplanıp biyolojik iskele formuna getirilip, biyolojik iskelenin mikro mimarisini korumak için çapraz bağlayıcı ajanlarla işlenmesi sonrası yeni bir iskele oluşturulmuştur. Rapor içerisinde yeni oluşturduğumuz biyoiskelelerden QSM/nHAp veya AÇM/nHAp olarak bahsedilecektir.

2. GENEL BİLGİLER

Enfeksiyon, patolojiler, travma, gelişimsel ve konjenital deformiteler nedeniyle oluşabilen çene ve yüz bölgesi defektlerinin tedavisi ile ilgili birçok araştırma yapılmış olup, konu üzerinde çalışmalar halen devam etmektedir. Refah seviyesinin artmasıyla birlikte gelişen biyoteknoloji ve biyomühendislik alanındaki gelişmeler, kemik rejenerasyonu için yeni ve ileri

biyomedikal teknolojik yaklaşımı zorunlu kılmıştır.[3–5]

Kemik grefti; yeni kemik oluşumu için bir iskele sağlayarak geniş kemik defektlerinin tamirinde kritik rol oynar. Osteositler denilen canlı hücrelerden oluşan kemik, sürekli bozulma ve yeniden inşa olma durumundadır. Osteoklastlar denilen hücreler kemikten kana kalsiyum minerallerini taşıyarak kemik yıkımında, osteoblastlar ise tersini yaparak kemik yenilenmesinde rol alırlar. Kemik kendi kendini tamir etme sistemine sahip olduğundan, insan vücudu kolayca küçük kemik yaralanmalarını tamir edebilir. Daha ciddi kemik yaralanmaları ise ilgili bölgede kemik kaybına neden olur. Ancak bu kendini onarma döngüsünü hızlandırmak için genellikle kemik iskele gereklidir[6].

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 uygulama sınırlamalarından dolayı, 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.[7–9]

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 osteokondüksiyonu desteklemelidir. Bu ana özellikler hücre göçünü stimüle eder ve osteogenez ile yeni kemik oluşumunu sağlar.[10]

Biyoiskeleler hücre büyümesi, proliferasyonu, besinlerin ve metabolik atıkların taşınması için birbirine bağlı gözenekli ve özel yüzey kimyasına sahip gözenekli bir matris sağlamalıdır. Biyomateryal kontrollü osteojenik aktivite ile öngörülebilir bir şekilde resorbe olmalı, hücre farklılaşmasını yönlendirmek ve doku rejenerasyonunu desteklemek için sinyal oluşturabilmeli; biyomateryal resorpsiyon süreci boyunca devam eden güçlü, stabil mekanik özellikler barındırmalı; yabancı cisim reaksiyonu oluşturmamalı ve implante edilen sahaya adapte olabilmelidir[11]. Ayrıca biyo-rezorbe olan iskeleleri için mekanik tasarım gereksinimleri, yerini aldığı kemiğin fonksiyonel gereksinimlerine bağlı olarak büyük ölçüde değişmektedir[11].

Nanoteknolojinin tıp alanında kullanılması, kemik yerine geçen substratların onarım bölgesine taşınmasına yardımcı biyomalzemelerin geliştirilmesine katkı vermiştir. Nanomalzemelerin başında nano-hidroksiapatit (nHAp) gelmektedir. $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$

moleküler formüle sahiptir. Biyouyumlu olması ve osteoindüktif etkisi sebebiyle kemik defektlerinin iyileştirilmesinde geniş çaplı kullanılan bir biyoseramiktir. nHAp; ıslak kimyasal sentez, kuru kimyasal sentez, yüksek sıcaklıkta reaksiyon ve biyolojik kaynaklardan olmak üzere 4 farklı şekilde elde edilir. 3-2000 μm arasındaki boyutlarda olmak üzere üretilebilir.[12] nHAp ve insan mineralize kemik doku arasındaki kimyasal benzerlik sebebiyle sentetik nHAp'in sert dokuya güçlü afinite gösterir.[13]

nHAp'ın doku ile temas eden yüzey alanının geniş olması ve mikron boyutundaki eşdeğerlerine göre düşük doku yanıtı oluşturma özelliği bulunmaktadır. Ancak sinterlenmiş HA, 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[14] ve osteomiyeliti önlemek amacıyla kontrollü vankomisin salınımında kullanılmıştır. Yakın geçmişte tamamlanan bir çalışmada[15], nHAp'ların özellikle nano-küre formunda olanlarının kemik defekti onarımında daha etkili olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle, kemik yerine geçen substratların taşınmasında nHAp'ın sferik formlarının tercih edilmesi önerilmektedir.[3] nHAp kullanımı kollojen-kompozit bazlı iskeleleri sadece mekanik olarak desteklemez ayrıca osteoblast adezyonunu, proliferasyonunu ve diferensiasyonunu destekler. [16] Literatürde nHAp materyalleri ile geliştirilen bir çok biyokompozit materyal rapor edilmiştir[17].

Doku mühendisliği, biyolojik fonksiyonları iyileştirmek veya değiştirmek için hücre, mühendislik ve malzeme kombinasyonunu ve 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. Üç-boyutlu iskeleler, transplante edilen hücrelerin yapışabileceği bir yüzey ve yeni doku veya organ oluşumuna rehberlik eden fiziksel bir destek olarak görev yaptığından gereklidir. Polimerik iskeleler istenilen biyolojik fonksiyona uygun olarak çeşitli boyutlarda, 1B (fiberler, tüpler vb.), 2B (filmler, diskler vb.) ve 3B (müsilajler, mikro küreler, gözenekli iskeleler, vb.), işlenebilir. Bu işlenebilme özelliği ile polimerik biyomalzemeler hücreleri veya dokuları sararak onlara geçici veya kalıcı destek sağlarlar. Polimerik biyomalzemeler doğal veya sentetik olabilir. 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. Agaroz, kollajen, müsilajatin, kitosan ve ipek geniş kullanıma sahip başlıca doğal polimerik biyomalzemelerdendir. Doğal polimerler, hücre tutunmasını, göçünü ve doku iyileşmesini tetikleyerek vücutta biyolojik aktiviteleri arttırır. Doku mühendisliğinde kullanma amacıyla doğal polimerlerden işlenerek iskeleye dönüştürülen üç farklı tipte polimerik iskeleler, hidromüsilajler, lifsi iskeleler ve polimer filmleridir. Bu iskele yapılarının hepsi de hücre dışı matriksi, yani hücrelerin mikro-çevresini taklit eder.[18]

Mezenkimal kök hücreler ilk olarak 1968'de kemik iliğinden izole edilmişlerdir ve yapışkan, fibroblast gibi klonojenik hücreler olarak tanımlanmışlardır. Vücutta yağ dokusu, akciğerler ve göbek bağı gibi çeşitli bölgelerden de izole edilebilirler. Uluslararası Hücresel Tedavi Derneği (ISCT) mezenkimal kök hücreleri tanımlamak için üç kriter belirlemiştir; (i) standart kültür koşulları altında plastiğe yapışmalı; (ii) CD105, CD90 ve CD73 için pozitif ve CD14, CD34, CD45 ve CD31 için negatif olmalı; (iii) *in vitro* koşullarda mutlaka adipojenik, osteojenik ve kondrojenik olarak farklılaşmalıdırlar. Mezenkimal kök hücreler kolay ulaşılabilir, multipotansiyel farklılaşma yeteneği ve immün düzenleyici rolüne sahip olmalarından dolayı çeşitli hastalıkları tedavi etmede kullanılırlar.[19]

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 ve saç düzeltme losyonlarında emülsiyonlama maddesi olarak kullanılmıştır.[20] Ayva çekirdeği müsilajının eczacılık, tıp, kozmetik, gıda paketleme, gıda katkı maddesi gibi alanlarda kullanıldığı bilinmektedir.[21] 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.[2]

Literatürde sağlık alanında yapılan çalışmalar incelendiğinde, ayva çekirdeği müsilajı çeşitli şekillerde kullanılmıştır. Ayva çekirdekleri ve AÇM (QSM) ile yapılan bir çalışmada, çekirdek salgısının dermatit bakterilerine karşı (*Pseudomonas aeruginosa, Staphylococus*

aureus ve *Staphylococcus epidermis*) antibakteriyal etkileri olduğu gözlemlenmiştir[22] . 2019 yılında yapılan bir çalışmaya göre, ayva müsilajinin titanyum dioksit (TiO2) ve silisyum oksit (SiO2) 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. [23]

Literatürü araştırdığımızda doku mühendisliği veya rejeneratif tıpta, ayva çekirdeği müsilajı ile ilgili Şimşek ve ark. 2020 yılında yayımladığı bir çalışmada ise ayva çekirdeğinden elde edilen müsilaj ile 3boyutlu doku iskeleleri oluşturmuşlar, elde edilen yapıların sıvı tutma kapasiteleri ve gözenekliliği ölçülmüş ve 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.[24]

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 belirlenmiştir. Ayrıca gerçekleştirilen *in vitro* deneylerin sonuçlarına göre, Si-AÇM kriyojellerinde osteogenez ile ilintili genlerin AÇJM 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[25].

Literatürü araştırdığımızda doku mühendisliği veya rejeneratif tıpta, ayva çekirdeği müsilaji ve nHAp ile oluşturulmuş bir biyomalzeme kullanımına dair herhangi bir çalışmaya **rastlanılmamıştır.**

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

İskelesini oluşturmayı planladığımız malzemenin içerik ve oranlarını daha önceki yapılmış çalışmalar göz önünde bulundurarak ve geliştirilen biyomalzemelere uyumlandırarak optimize etmek amacıyla 3 farklı oranda nanohidroksiapatit kemik (nHAp) ve ayva çekirdeği müsilajı (AÇM-Quince Seed Musilage-QSM) kullandık.

Biyoiskele yapımında sırasıyla aşağıdaki işlemler uygulanmıştır;

1.1. 5-15-25 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, 1:3, 1:5 olacak şekilde 3 farklı oranda 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 300 mikrolitre olacak şekilde 3'er adet döküldü **(Resim 3).**

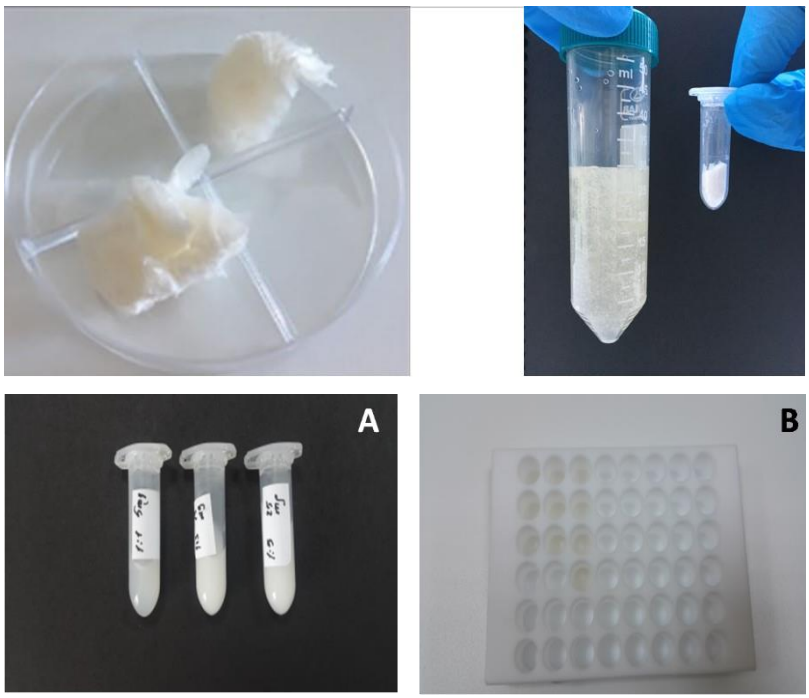
1.9. Teflon kalıbın içerisindeki malzemeler bir gece boyunca -26 derecede dondurulduğu.

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

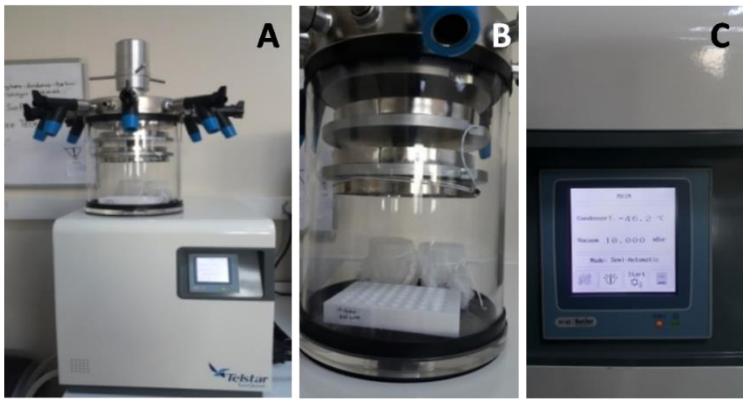
1.11. Liyofilizasyon işlemi sonunda QSM/ nHAp üç boyutlu gözenekli biyoiskele formunu aldı (**Resim 5)**.

1.12. Liyofilizasyon sonrası iskelelerin stereo mikroskoptaki (Zeiss-stemi 305) görüntüleri aşağıda gösterilmiştir (**Resim 6,7,8).**

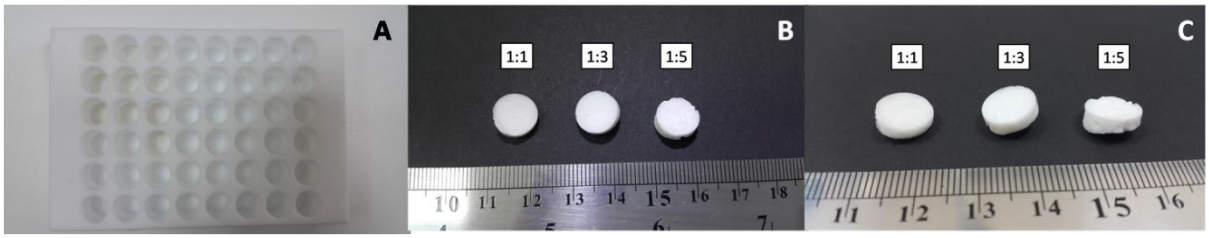
1.13. Liyofilize QSM/ nHAp +4 ºC' da saklandı.



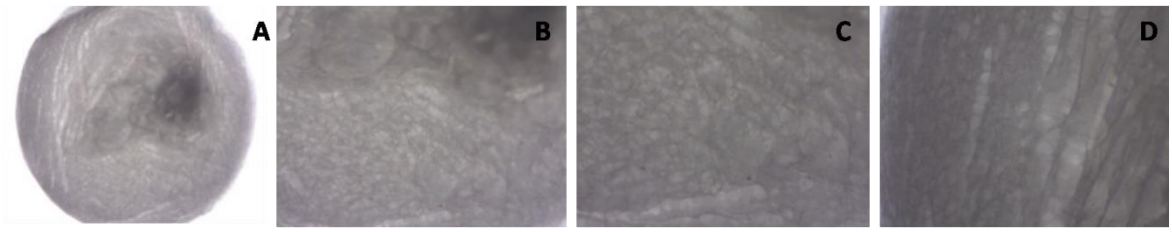
Resim 3: Ependorf Tüplerinin içindeki homojen biyomalzeme (A), Teflon kalıplara dökülmüş biyomalzeme (B)



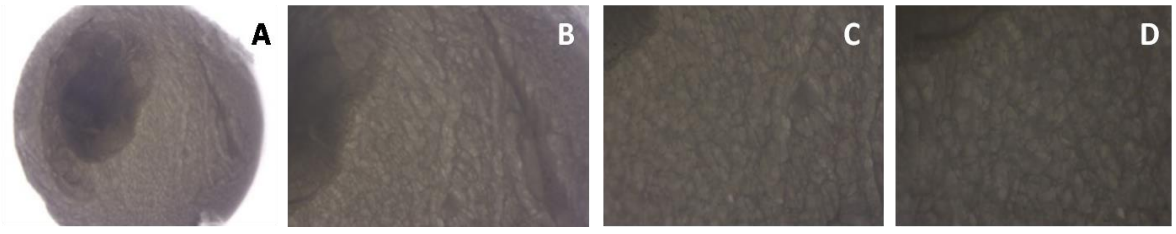
Resim 4: Liyofilizasyon işlemi



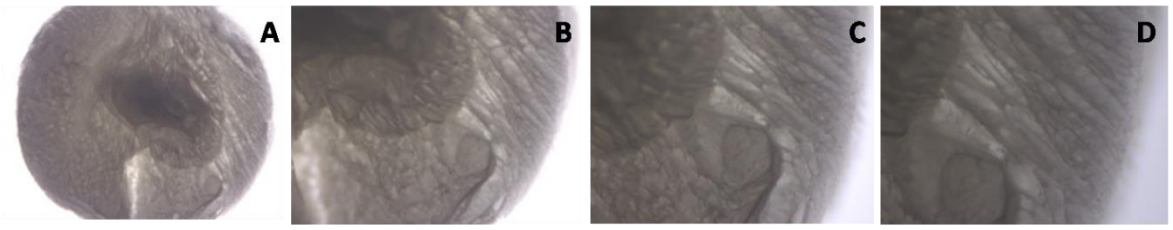
Resim 5: Teflon kalıp içindeki liyofilize edilmiş iskele (A), 3 farklı oranda oluşturulan iskeleler (B, C)



Resim 6: 1:1 oranında nHA/QSM Stereo mikroskop (Zeiss-stemi 305) A- 1X büyütme, B-2X büyütme, C-3X büyütme, D-4X büyütme



Resim 7: 1:3 oranında nHA/QSM Stereo mikroskop (Zeiss-stemi 305) A- 1X büyütme, B-2X büyütme, C-3X büyütme, D-4X büyütme

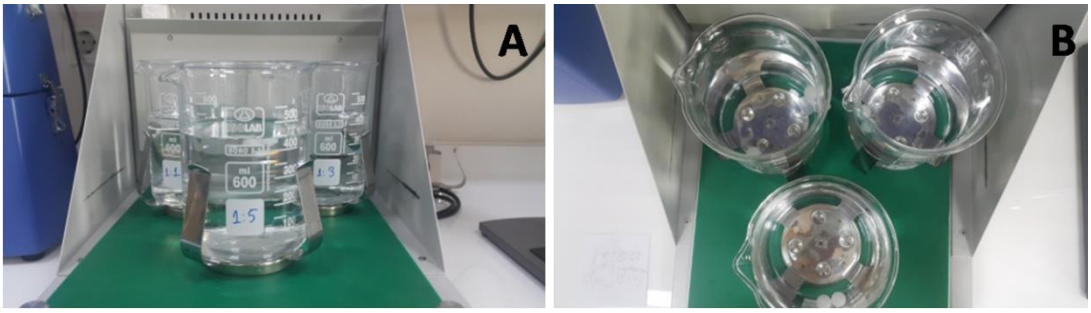


Resim 8: 1:5 oranında nHA/QSM Stereo mikroskop (Zeiss-stemi 305) A- 1X büyütme, B-2X büyütme, C-3X büyütme, D-4X büyütme

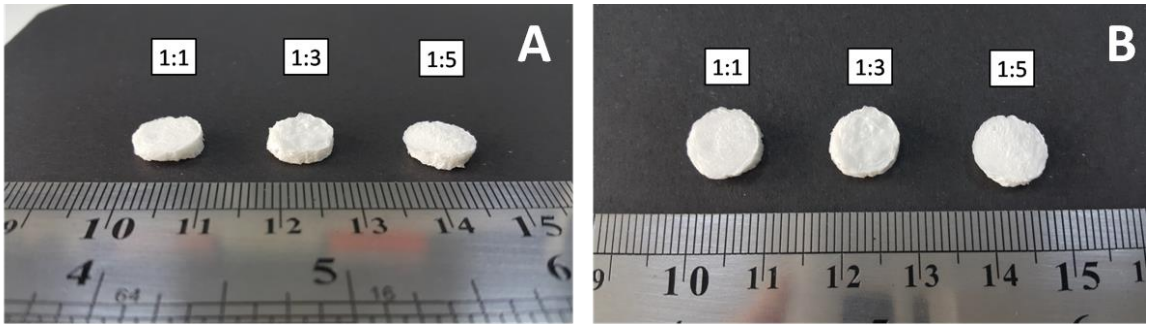
3.2.3. QSM/nHAp Temelli 3B İskelelerin Çapraz Bağlaması

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 içinde bekletildi.
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 9)**.
5- Çapraz bağlamadan sonra iskeleler dinamik olarak her yarım saatte bir saf su yenilenecek şekilde 2 saat yıkandı.
6- Suya doygun çapraz bağlı iskeleler -26 ºC' da donduruldu.
7- Liyofilizatörde LyoQuest -55, Telstar, İspanya) gece boyu liyofilize edildi ve teflon kalıplardan çıkarıldı (**Resim 10**).



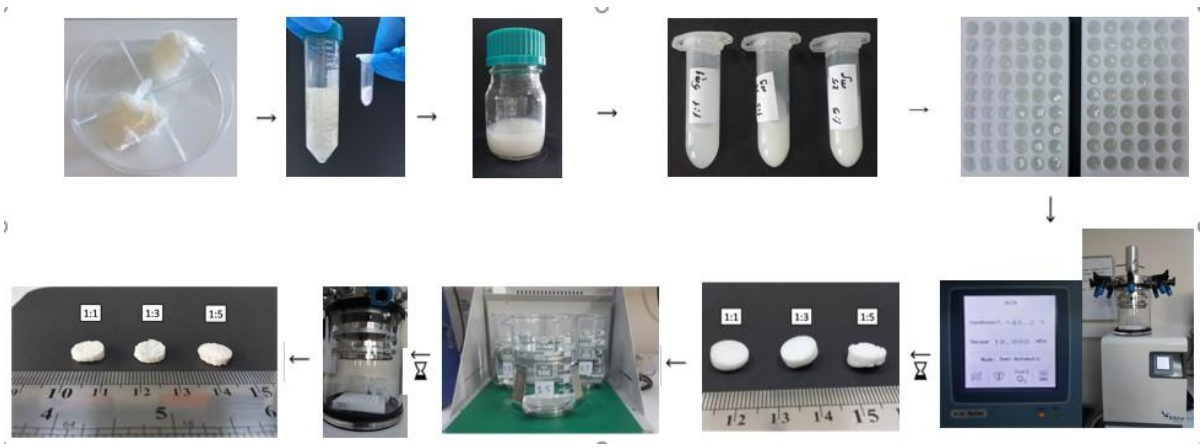
Resim 9: Çapraz bağlama yapılmış iskelelerin çalkalayıcıdaki görüntüleri



Resim 10: Liyofilize edilmiş iskelelerin görüntüleri

İskelesini oluşturduğumuz malzemenin içerik ve oranlarını daha önceki yapılmış çalışmalar göz önünde bulundurarak ve geliştirilen biyomalzemelere uyumlandırarak optimize etmek amacıyla 3 farklı oranda nanohidroksiapatit kemik (nHAp) ve Ayva çekirdeği müsilajı (QSM) ile üretilmesini planladık. 1:1, 1:3 ve 1:5 oranlarında QSM/nHAp iskeleleri oluşturduk. İskelelerin mikro-mimarilerinin korunması için çapraz bağlama işlemi uygulandı. Şekil 1' de işlem basamakları genel hatları ile gösterilmiştir.

Şekil 1: İskelelerin meydana getirilme süreçleri



3.2.4. QSM/nHAp İskelelerin Termal Karakterizasyonu: Termogravimetrik Analiz (TGA)

QSM/nHAp iskelelerin termal özelliklerinin incelenmesi ve yapıya katılan nHAp'in müsilajın ısısal davranışına etkisinin incelenmesi için termogravimetrik analiz (TGA) analizleri yapılmıştır. TGA analizi için TGA 8000 (Perkin Elmer, ABD) cihazı kullanılmıştır. Tarama işlemi; inert azot gazı altında (20 ml azot/dakika), 30-800 C° sıcaklık aralığında, dakikada 10 C° sıcaklık artışı şeklinde gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar Pyris™ yazılımı (Perkin Elmer, ABD) aracılığı ile kaydedilmiştir.

3.2.5. QSM/nHAp İskelelerin Mekanik Dayanımlarının Ölçülmesi

QSM/nHAp iskelelerin basma dayanımlarının belirlenebilmesi için iskeleler (n=3) Instron-5569 cihazında (Instron, Massachusetts, ABD)100N'luk yük yardımı ile 0,1N/dk basma oranında test edilmiştir. Testin sonunda iskelelerin maksimum gerinim ve gerilim değerleri altındaki değerleri ve taşıyabildiği maksimum kuvvet değeri bulunmuştur.

3.2.6. QSM/nHAp İskelelerin Porozitelerinin Belirlenmesi

QSM/nHAp iskelelerin porozitelerinin belirlenmesi için sıvı-yer değiştirme tekniği uygulanmıştır. Bunun için sıvı *n*-hekzan (≥ %99, Millipore-Sigma, MA, ABD) çözeltisi kullanılmıştır. 10 mL'lik ince bir dereceli silindir içine 4 mL hekzan konulmuştur (V1). Tek bir iskele cam mezür içine atılarak hekzan ile ıslanması sağlanmıştır. QSM/nHAp iskelelere hekzanın tamamen nüfus edebilmesi için cam mezür 1 dk. boyunca ultrasonik su banyosunda sonikasyona tabi tutulmuş böylelikle gözeneklerinde bulunan havanın çıkarılması sağlanmıştır.Yer değiştiren sıvıyla birlikte değişen son hacim not edilmiştir (V2). Bu işlem sonrasında iskele cam mezür içinden dikkatli bir şekilde çıkarılıp kalan hekzan sıvısının son hacmi kaydedilmiştir (V3). QSM/nHAp iskelelerin poroziteleri yapılan bu uygulamalar sonucunda not edilen değerlerle aşağıdaki denklemde yerlerine konularak hesaplanmıştır.

$$\text{Porozite (\%)} = [(V1 - V3)/(V2 - V3)] \times 100$$

3.2.7. QSM/nHAp İskelelerin Şişme Testi

QSM/nHAp iskelelerin sıvı tutma ve şişme kapasiteleri fosfat tamponlu tuzlu su (PBS) alım testi metodu ile belirlenmiştir. İskelelerin kuru kütleleri (mkuru) hassas terazide tartılarak ilk kütle olarak not edilmiştir. Ardından iskeler ayrı ayrı 10'ar mL PBS (pH 7,4) içeren kaplar içerisine bırakılarak 37 °C'de, 24 saat boyunca etüvde (Memmert UN30 Etüv, Almanya) inkübe

edilmiştir. İnkübasyon sürecinin sonunda ıslanan iskelelerin kütlesi (mıslak) olarak kaydedilmiştir. Aşağıda verilen formüle göre her bir iskelenin % şişme oranı hesaplanmıştır.
Şişme Oranı (%) (mg/mg) = [[(mıslak−mkuru)] / (mkuru)] x 100

3.2.8. QSM/nHAp İskelelerin Yüzey Islanabilirlik Özelliklerinin Belirlenmesi (Temas Açısı Belirleme Analizi)

QSM/nHAp iskelelerin yüzey gerilimini ve sıvılara karşı hidrofilik özelliğinin belirlenmesi yani ıslanabilirlik özellikleri Attension Theta Optik Tensiyometre cihazı ile (Biolin Scientific, Gothenburg, İsveç) belirlenmiştir. Analiz sırasında iskele üzerine motorize şırınga yardımıyla 5 µL ultra saf su damlatılmıştır, cihazın kamerasından anlık olarak su damlacığının iskele yüzeyinden emilimi incelenmiştir. Su damlacığının iskele üzerindeki saniyedeki emilim hız değerleri anlık görüntüler üzerinden hesaplanmış ve temas açısı ölçümü yapılmıştır. Analiz 30 saniye boyunca ve saniyelik görüntü sayısı 12 olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

3.2.9. QSM/nHAp İskelelerin Brunauer-Emmett-Teller (BET) ve Barrett-Joyner-Halenda (BJH) Analizleri

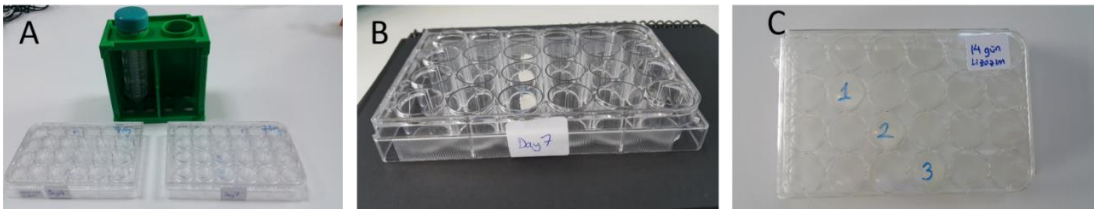
QSM/nHAp iskelelerin gözenek hacmini belirlemek ve toplam yüzey alanlarının hesaplanması için Quadsord SI cihazı (Quantachrome Instruments, Anton-Paar GmbH, Avusturya) ile BET analizleri yapılmıştır. Analiz öncesi QSM/nHAp iskelelerin gözeneklerini tam açamak ve böylece tam bir adsorbsiyonun gerçekleşmesi için numuneler 6- 8 parçaya bölünerek 100 °C'de 1 saat degas işlemi uygulanmıştır. Ardından 77 K° sıcaklıkta nitrojen gaz atmosferi altında ve 0,01 ile 0,99 P/P0 basınç aralığında gaz adsopsiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Gözenek hacmi ise Barrett-Joyner-Halenda (BJH) metodu uygulanarak tayin edilmiştir.

3.2.10. QSM/nHAp İskelelerin Biyobozunurluk Testi

QSM/nHAp iskelelerin fizyolojik sıvılarla etkileşiminin ve biyobozunurluğunun test edilmesi için enzim bozulma testi yapılmıştır. Test edilecek iskelelerin her biri hassas terazide tartılmış her bir iskelenin kuru ağırlığı yani ilk kütleleri $\mathbf{m_{ilk}}$ olarak not edildi. Daha sonra %0,01 sodyum azid (≥99.5%, NaN3) içeren PBS (pH 7,4) solüsyonu hazırlanmıştır, ardından 1,5 µg/mL konsantrasyonda lizozim enzimi (≥98%, ≥40,000 U/mg, Millipore-Sigma, ABD) solüsyonda çözdürülmüştür.

Tartımları yapılan iskeleler steril 24 bölmeli well-plate içerisine alınmıştır. Her bir iskelenin hazırlanan enzim solüsyonu 1'er mL olacak şekilde ile teması sağlanmıştır. QSM/nHAp iskeleleri 37 °C'de etüvde inkübe edildi. İki günde bir enzim solüsyonları aynı prosedür izlenerek tazelenip değiştirilerek 7 ve 14 gün boyunca takipleri yapıldı. **(Resim 11)** İnkübasyon periyodu sonucunda her bir iskele enzim solüsyonundan çıkartılarak su ile yıkandı ve -26 °C'de dondurulduu. Donan örnekler daha sonra liyofilize edildi ve enzim bozunma testi sonrasında kalan kütleleri hassas terazide tartılıp $\mathbf{m_{son}}$ olarak not edildi. Toplam kütle değişimi aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır:

Toplam Kütle Kaybı (%)=$[(m_{ilk})-(m_{son})/(m_{ilk})]$ x 100



Resim 11: A- 7 Gün lizozim enzimi ile biodgradasyonu yapılan QSM/nHAp iskeleler B- 14 Gün lizozim enzimi ile biodgradasyonu yapılan QSM/nHAp iskeleler

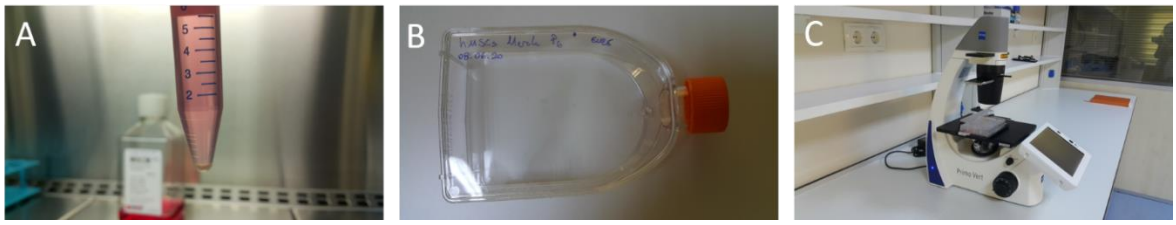
3.2.11. Hücre Kültürü Uygulaması ve QSM/nHAp İskelelerin *in vitro* Canlılık Testi

QSM/nHAp iskelelerin hücre canlılığı, morfolojisi ve ostojenik diferensiasyonun incelenmesi için, 7, 14 ve 21 günlük setler halinde adipoz kaynaklı mezenkimal kök hücreler Merck-Millipore (Cat. no. SCC038) (human adipose derived mesenchymal stem cells – hADSCs-p6) ile statik hücre kültürü ortamında etkileştirilmiştir. Pasaj numarası 7 olan -80 °C'de dondurulmuş hADSCs- hücreleri, hücre açma prosedürüne göre biyogüvenlik seviyesi II olan laminar akışlı kabinde (Bio II Advance, Telstar, İspanya) steril T75 flask içine açılarak 1 hafta boyunca iki boyutlu (2B) hücre kültürü plastiği yüzeyinde konflüens olana kadar çoğaltıldı.

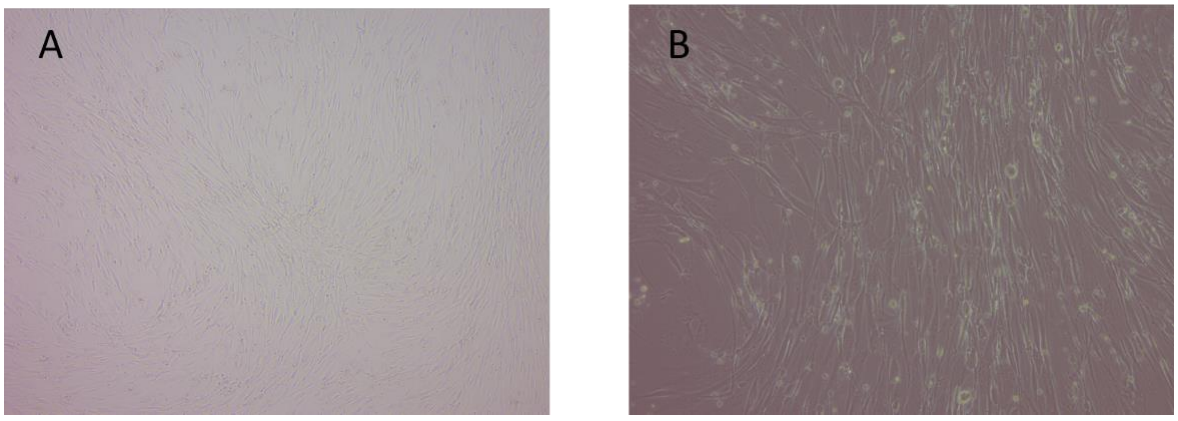
Daha önce satın alınan ve -80 °C dondurucuda (Panasonic, Japonya) kriyovial tüpün içinde bulunan hücreler (Merck-Millipore (Cat. no. SCC038) (human adipose derived mesenchymal stem cells – hADSCs-p6), tamamen çözündükten sonra pipetlenerek 15'lik falcon tüp içinde bulunan 10 ml'lik mezenşimal kök hücre besi yeri içerisine alındı. Böylece hücrelerin donma sıvısında bulunan ve +4 °C'den sonra sitotoksik özellik gösteren dimetil sülfoksit (DMSO) ile etkileşimi en az seviyeye indirilmiştir. DMSO'nun ortamdan

uzaklaştırılması için falcon tüp300 G'de 5dk santrifüj (NÜVE, Türkiye) edildi. Falcon tüpün altında toplanan hücrelerin yerinde kalmasını sağlayarak üstünde bulunan süpernatant ortamdan uzaklaştırıldı. Üzerine 2 ml besi yeri konularak pipetlendi ve T75 flasklara ekildi.

Kök hücreye özgü çoğaltma vasatı (Mesenchymal stem cell medium, Cat. no. #7501, ScienCell, United States) içerisinde 37°C, %80-90 bağıl nem ve %5 CO2 sağlayan bir inkübatörde (Panasonic, Japonya) kültüre edildi. Besi ortamı içeriği mezenkimal kök hücre vasatı (ScienceCell, MSCM, Kat.no. 7501), mezenkimal kök hücre büyüme serumu (ScienceCell, MSCGS, Kat.no. 7552), fetal sığır serumu (ScienceCell, FBS, Kat.no. 0025) ve penisilin/streptomisin solüsyonundan (ScienceCell, P/S, Kat.no.0503) oluşmaktadır. Besi yerleri belirli aralıklarda değiştirildi ve %80-90 doluluk oranına ulaştığında hücreler iskelelere ekilecek hale geldi Hücrelerinin belirli günlerde hücre kültürü plastiğine tutunmalarının, çoğalmalarının ve morfolojilerinin takibi invert faz-kontrast mikroskop (Primovert, Zeiss, Almanya) ile yapılmıştır. **(Resim 12-13)**.



Resim 12: A-15'lik falcon tüpün santrifüj sonrası alt kısmında toplanan hADSCs
B- T75 flasklara Kök hücrelerin ekilmesi
C- İnvert Faz-Kontrast Mikroskop (Primovert, Zeiss, Almanya)



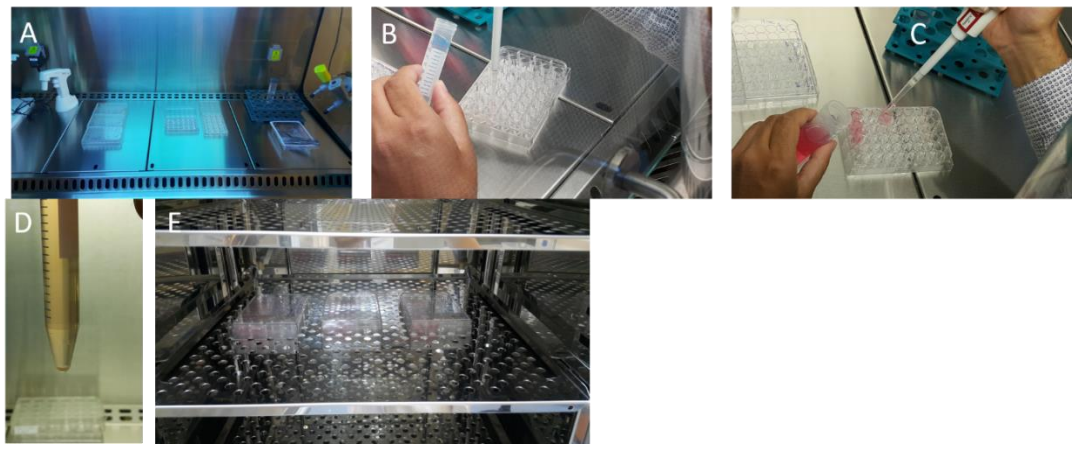
Şekil 13: Hücre kültürü mikroskobik görüntüler A-4X, B-10X

Hücreler, T75 hücre kültürü plastiği içerisinde çoğalana kadar gün aşırı besi yeri değiştirilerek kültüre devam edilmiştir. Yeterli hücre sayısına ulaşıldığında, ilk olarak

biyoiskelelere, laminar akışlı kabin (Bio II Advance, Telstar, Spain) içerisinde UV ışık (254 nm) altında 1 saat boyunca sterilizasyon işlemi uygulandı. Daha sonra biyoiskeleler 48 kuyucuklu hücre kültürü plastiğine alındı.

Hücreler tüm flask yüzeyini kapladığından, flaska tutunmuş hücreler 10 ml PBS ile yıkanıp, 2ml Tripsin/EDTA (0.25% / 0.53 mM) enziminde 3-5 dk bekletilerek plastik yüzeyine yapışan hücrelerin kaldırılması sağlandı. Bu işlemden sonra flaskın içindeki tripsin ile kaldırılmış hücreler, daha önceden flaskın içinde bulunan ve 15'lik falcon tüpe ayrılmış olan CO_2' e doymuş besiyeri içerisine alındı ve 300 G'de 5dk santrifüj edildi. Falcon tüpün altında toplanan hücrelerin yerinde kalmasını sağlayarak üstünde bulunan süpernatant ortamdan uzaklaştırıldı. Falcon tüpün içerisine 3ml mezenşimal kök hücre besi yeri eklenerek hücrelerin homojen dağılması için pipetlendi. Ardından, pasaj sayısı 6-8 olan hADSCs hücreleri $12.5x10^4$ hücre/iskele yoğunluğunda biyoiskelelere ekildi. Her bir biyoiskele üzerine 950 μL tam besi yeri eklenmiş ve hADSCs hücrelerinin ekili olduğu biyoiskeleler %5 CO_2 ve %90 bağıl nem ve 37 ºC koşullarında inkübasyona (Panasonic, Japan) bırakılmıştır. Kök hücreye özgü çoğaltma vasatında 24 saat kaldıktan sonra osteojenik farklılaşma kiti ile (Osteogenesis Differentiation Kit, Gibco, StemPro®, USA) ile üretici firmanın talimatlarına bağlı kalınarak kültüre edildi ve gün aşırı medium değiştirildi. (**Resim 14)**

Mezenkimal kök hücreler (hADSCs) iskele üzerine ekildikten ve osteojenik farklılaşma mediumu ile kültüre edilmeye başladıktan sonraki 7. gün, 14. gün ve 21. günlerde hücre canlılık testleri yapıldı.



Resim 14:A- Laminar akışlı kabin içerisinde UV ışık (254 nm) altında 1 saat boyunca sterilizasyon işlemi, **B,C -** Biyoiskelere hADSCs hücrelerinin ekilmesi ve besi yeri eklenmesi, **D-** Santrifüj edilmesi ile falcon tüpün altında toplanan hücreler, **E-**48 kuyucuklu hücre kültürü plastiğindeki biyoiskelellerin inkübatöre yerleştirilmesi (Panasonic, Japan)

MTT Testi

Hücre canlılığı testi satın alınan 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolyum bromür (MTT) kiti (Cell Growth Determination Kit, MTT based, CGD1, Milliope-Sigma, ABD) ile belirlenen zaman dilimlerinde mitokondriyal dehidrogenaz aktivitesini belirlemek için kullanıldı. Kit protokolüne göre her iskele için %10'u MTT reaktifi, %90'ı serumsuz DMEM (Dulbecco'nun Modifiye Eagle Ortamı) içeren 300 µL MTT solüsyonu hazırlandı. Hazırlanan MTT solüsyonu her bir iskelenin üzerine 300 µL döküldü ve inkübatörde 4 saat boyunca karanlık ortamda bekletildi. Sürenin sonunda iskeleler well-plate içerisinden alınıp mikrofüj tüplerin içine alındı. Mikrofüj tüp içerisindeki iskele yapıları parçalanarak üzerlerine 300 µL MTT solvent konuldu ve mini-spin cihazında (ISOLAB, Türkiye) 15 dk. boyunca döndürüldü ve sonrasında santrifüj edildi. Bu aktivite sonucu oluşan mor renkli formazan kristalleri santrifüj işlemi sonrası toplanarak 96 bölmeli well-plate içine alındı. Plate Multiskan™ µdrop™ mikro plaka okuyucu (Thermo Fisher-Scientific, ABD) ile 570 nm'de (690 nm arka plan için kullanılacak) spektrofotometrik ölçümler alınarak kantitatif (%-canlılık) tayin yapıldı.

3.2.12. Hücrelendirilmiş QSM/nHAp iskelelerin Morfolojik Gözlem ve Analizi (FE-SEM, FE-SEM EDS Haritalama)

Proje önerisinde yapılması planlanan bu analiz daha önce sunulan gerekçeler ile tamamlanamamıştır. BAP Proje komisyonuna sunulan gerekçelerimiz haklı bulunarak projeden çıkarılmıştır.

3.2.13. İmmünohistokimyasal ve Histokimyasal Analizler

Hücre kültürü periyodunun 7.,14. ve 21. günlerinde besi ortamından alınan hücre ekilmiş QSM/nHAp iskeleleri %10'luk formalin çözeltisinde fikse edildi ve daha sonra yıkanarak Et-OH serilerinden geçirildi. 24 saat boyunca oda sıcaklığında bekletilen ve kuruyan iskeleler parafine gömüldü. Parafin bloklar içindeki iskeleler 3-5 µm kalınlığında kesitler halinde Poly-L-lizin mikroskop lamelleri (Thermo Scientific, Braunschweig, Almanya) üzerine yerleştirildi ve oda sıcaklığında saklandı. Daha sonra yapıdan parafinin ayrılması için de-parafinizasyon işlemi yapıldı ve kesitler rehidrate edilerek HK ve İHK boyamalara hazır hale getirildi.

İHK boyamalar için numuneler 30 dk. %0,3'lük hidrojen peroksit (H_2O_2) solüsyonunda bekletildi. Hücreli numunelerdeki antijenik yapılara zarar vermemesi için ısı ile indüklenmiş antijen geri kazanım tekniği (HIER) uygulandı. Daha sonra numuneler gruplandırılarak üzerlerine anti-osteopontin (OP), (1:500, Merck, Darmstadt, Almanya), anti-osteonektin (ON),

(1:750, Merck, Darmstadt, Almanya), anti-osteokalsin (OC), (1:400, Biorbyt, Cambridge, İngiltere) primer antikorları uygulanarak gece boyunca inkübe edildi. İHK boyamasının ileriki aşamaları Histostain-Plus İHK kiti (HRP, geniş-spektrum, Invitrogen, MA, ABD) ile gerçekleştirildi. Tüm görüntüler Leica DFC450 model dijital ışık mikroskobu (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Almanya) aracılığı ile elde edildi.

Hücreli iskelelerin histomorfolojisi ve iskele matriksi üzerindeki mineralleşme histokimyasal boyamalar ile incelendi. Histokimyasal analizler Masson's trikrom, Von Kossa, Hematoksilen ve Eozin (H&E) boyamalar ile yapıldı.

3.2.14. Osteojenik Farklılaşmanın RT-qPCR Analizi ile İncelenmesi

Osteojenik farklılaşmanın gen seviyesinde analizi amacıyla; osteopontin (OPN), osteonektin (ON), osteokalsin (OK), Runt ile ilgili transkripsiyon faktörü 2 (RUNX2), kemik morfojenik protein 2 (BMP2), kollojen tip1 α1 (COL1A1) ve alkalen fosfataz (ALP) genleri incelenmiştir. Kontrol gen grubu olarak (housekeeping geni) glikoliz aşamalarını katalizleyen gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH) enzimi kodlayan gen kullanılmıştır. İfade yanıtlarını görebilmek adına kullanılan tüm primerler ise Tablo 1'de sunulmuştur[26–28].
Bu aşamada kullanılan tüm kitler, Bio-Rad firmasından temin edilmiştir.

Tablo 1. Proje kapsamında kullanılan primerler

Hedef Gen	Kısaltma	Oligonükleotit Sekansı	
		İleri 5'/3'	Geri 5'/3'
Osteopontin	OPN	TTCCAAGTAAGTCCAACGAAAG	GTGACCAGTTCATCAGATTCAT
Osteonektin	ON	GCTCAAGAACGTCCTGGTCA	TTCTCATGGATCTTCTTCAC
Osteokalsin	OK	GCAAAGGTGCAGCCTTTGTG	GGCTCCCAGCCATTGATACAG
Runx transkripsiyon faktör 2	RUNX2	GCCTTCAAGGTGGTAGCCC	CGTTACCCGCCATGACAGTA
Kollajen tip I α1	COL1A1	CAAGACAGTGATTGAATACAAAACCA	ACGTCGAAGCCGAATTCCT
Alkalen Fosfataz	ALP	ATGTCATCATGTTCCTGGGAGAT	TGGAGCTGACCCTTGAGGAT
Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz	GAPDH	CCAGGTGGTCTCCTCTGACTTC	GTGGTCGTTGAGGGCAATG

RNA İzolasyonu

QSM/nHAp temelli biyolojik iskeleler ve kültüre edilen mezenkimal kök hücreler (pozitif kontrol) 1mL pureZOL™ RNA izolasyon solüsyonu (fenol ve guanidinyumtiyosiyanatın mono-fazik çözeltisi) içerisine alınmıştır. İskeleler sıvı nitrojen yardımı ile havanda mekanik olarak homojenize edilmiştir. Hücreler ise pipetajlama işlemini takiben ikinci aşamaya dahil edilmiştir.

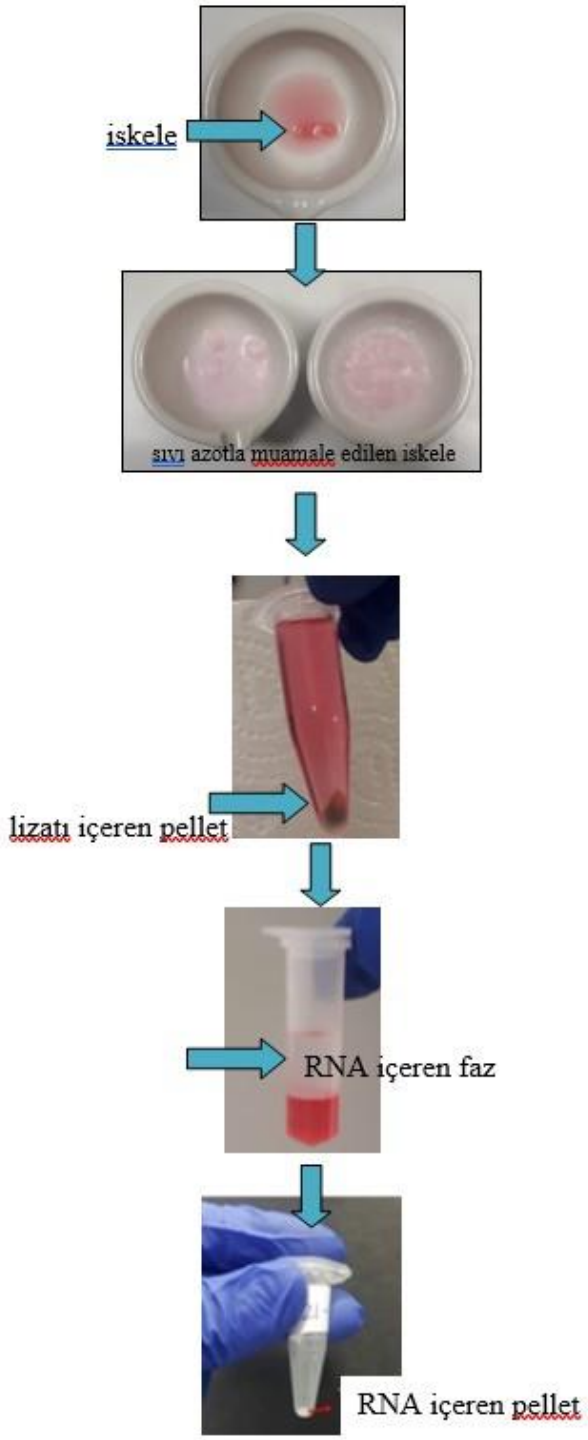
İkinci aşamada, 12.000 g'de 15 dakika (4ºC) santrifüj işlemini takiben lizat kalıntıları uzaklaştırılmış ve süpernatanta 0,2 mL kloroform ilave edilmiştir. Yaklaşık 20 sn boyunca hafifçe karıştırılan numunler 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyonu takiben 12.000 g'de 15 dakika (4ºC) santrifüj işlemi gerçekleştirilmiş ve neticesinde en dipte koyu renkli birinci faz (organik çökelti), ortada beyaz renkli ikinci faz (DNA fazı) ve en üstte berrak renkli bir üçüncü faz (RNA fazı) elde edilmiştir. En üstteki şeffaf faz pipet yardımıyla dikkatli bir şekilde çekilerek RNAaz içermeyen steril bir tüpe aktarılmıştır.

Son aşamada numuneler üzerine 0,5 mL izopropil alkol eklenmiş ve hafifçe karıştırılarak oda sıcaklığında 5 dakika inkübasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Ardından 12.000 g'de 10 dakika (4ºC) santrifüj işlemini takiben elde edilen pellet, RNA kaynağı olarak kullanılmak üzere %75'lik etanolde 1 kez yıkanmıştır. 7.500 g'de 5 dakika (4ºC) santrifüjün ardından 50 µL ultra saf su ile çözünen RNA'ların saflık ve miktar tayinleri Nanodrop (ThermoFisher Scientific, MA, ABD) cihazında gerçekleştirilen analizler neticesinde belirlenmiştir. Numunelerden RNA izolasyonunu özetleyen iş akış şeması **Şekil 2**'de özetlenmiştir.

cDNA İzolasyonu

Yeterli saflıkta ve miktarda izole edilen RNA numuneleri kullanılarak komplementer/tamamlayıcı DNA (cDNA) elde edilmiştir. Ters transkriptaz enzimini içeren iScript™ cDNA Sentez kiti (BIORAD kat. No #1708890) kullanılarak gerçekleştirilen reaksiyon içeriği **Tablo 2**'de özetlenmiştir. Reaksiyon ise 25ºC'de 5 dakika; 46ºC'de 20 dakika ve 95ºC'de 1 dakika olmak üzere Termal Döngü cihazı kullanılarak (Applied Biosystem, ABD) gerçekleştirilmiştir. Elde edilen cDNA örneklerinin miktar tayinleri Nanodrop (ThermoFisher Scientific, MA, ABD) cihazında gerçekleştirilen analizler neticesinde belirlenmiştir.

Şekil 2: Numunelerden RNA izolasyonunu özetleyen iş akış şeması özeti



Tablo 2. cDNA sentez kiti bileşenleri

Bileşenler	Reaksiyon başına kullanılan hacim (µL)
5x iScript Reaksiyon Karışımı	4
iScript Ters Transkriptaz	1
Nükleaz içermeyen saf su	Değişken
RNA	300 ng
Toplam hacim	20

RT-PCR

Osteojenik farklılaşmanın gen seviyesinde belirlenebilmesi amacıyla; Bio-Rad firmasından temin edilen SYBR Green RT-qPCR kiti kullanılarak (1 µL cDNA için 3 µL SYBR Green reaktifi, 5 µL nükleaz içermeyen saf su ve 0,5 µL ileri ve geri primerler) CFX-96 Termal Döngü (Bio-Rad, ABD) cihazında RT-PCR analizi gerçekleştirilmiştir. Amplifikasyon işleminde kullanılan GAPDH, ALP, RUNX ve OK primerleri için bağlanma sıcaklığı 59ºC diğer primerler için ise 57ºC olarak belirlenmiştir. Amplifikasyon neticesinde eşik döngü sayısı C_t olarak ifade edilmiş ve GAPDH geninin ekspresyon değerine göre diğer genlerin ifade seviyeleri normalize edilmiştir. Farklaştırılmamış mezenkimal kök hücrelerden elde edilen sonuçlar ifade seviyelerin belirlenebilmesi amacıya kontrol olarak kullanılmıştır. Hedeflenen gen ifadelerindeki değişim housekeeping geni ile kıyaslanarak belirlenmiş ve normalizasyonu $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ formülü kullanılarak "ifade kat değişimi" olarak değerlendirilmiştir[29]. Analizler üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

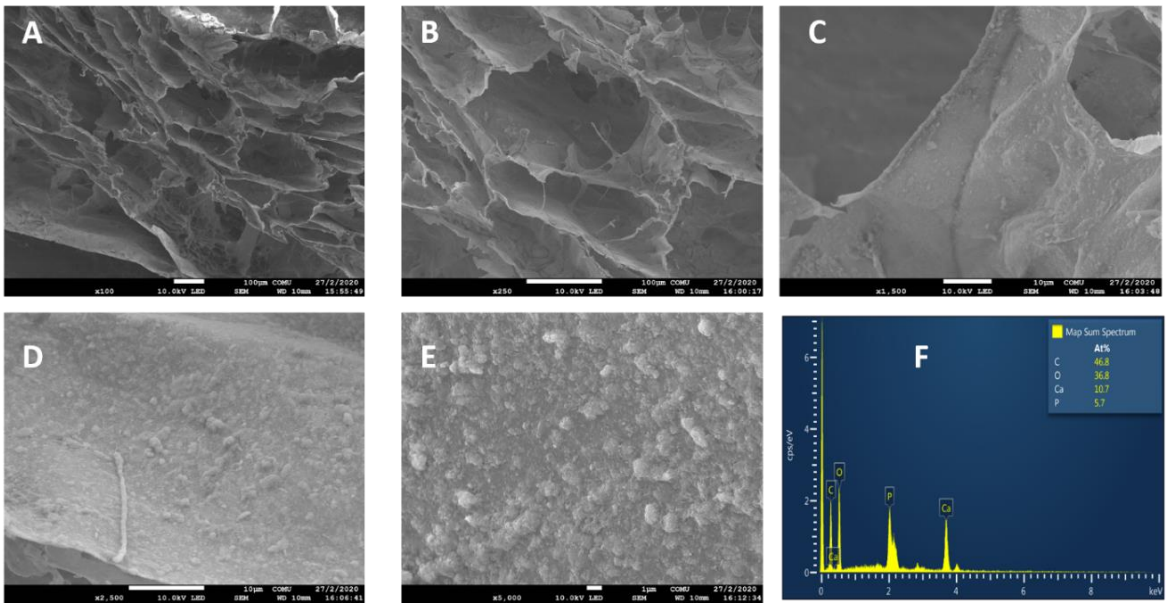
3.2.15. İstatistiksel Analiz

Deneysel veriler en az 3 tekrar sonucunda elde edildi. Standart sapma değerleri (±) simgesiyle gösterilip MS Office Professional Plus 2016 Excel programında hesaplatıldı. Bir deney grubu içindeki istatistiksel anlamlılık Tukey testinin tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile Origin Pro 8SR0 (v8.0724, Origin Lab Corporation, MA, ABD) programında hesaplatılmıştır. Deney grupları arasındaki farklılık *p değeri <0,05 için anlamlı kabul edilirken p değeri> 0,05 istatistiksel olarak anlamlı değil kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Farklı oranlardaki QSM/nHAp iskelelerin Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ve Enerji Yayılımlı X-Işını Analizi (EDX) Değerlendirmesi

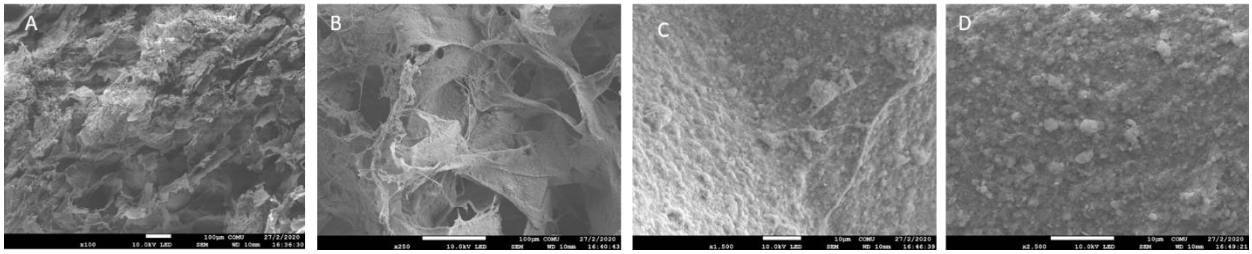
Çalışmamızda 5-15-25mg (1:1, 1:3 ve 1:5) oranlarında nanohidroksiapatit kemik (nHAp) ve 1ml Ayva çekirdeği müsilajı (QSM) çapraz bağlandıktan sonra, yeni oluşturduğumuz biyoiskelenin SEM (FE-SEM JFM 7100F EDS, JEOL, Japan) görüntüleri alınarak yüzey morfolojisi ve varolan gözeneklerinin boyutları hakkında bilgi edinmemizi sağlayacak incelemeler yapıldı **(Resim-15-16-17).**



Resim 15: 1:1 oranında QSM/nHAp SEM (FE-SEM JFM 7100F EDS, JEOL, Japan), A-100X büyütme, B-250X büyütme, C-1500X büyütme, D-2500X büyütme, E-5000X büyütme, F-Enerji Yayılımlı X-Işını Analizi (EDX) sonucu.



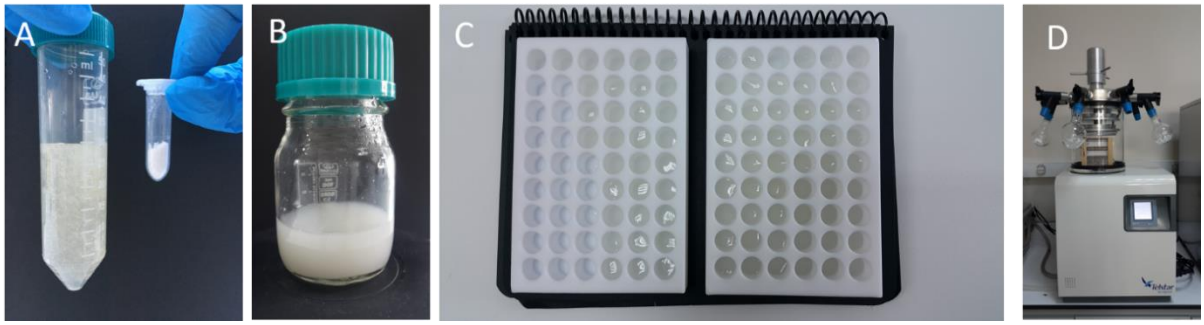
Resim 16: 1:3 oranında QSM/nHAp SEM (FE-SEM JFM 7100F EDS, JEOL, Japan), A-100X büyütme, B-250X büyütme, C-1500X büyütme, D-2500X büyütme.



Resim 17: 1:5 oranında QSM/nHAp SEM (FE-SEM JFM 7100F EDS, JEOL, Japan), A-100X büyütme, B-250X büyütme, C-1500X büyütme, D-2500X büyütme.

Yapılan SEM incelemeleri sonucu 3 farklı orandaki QSM/nHAp iskelelerinden en iyi yüzey morfolojisi ve gözenek boyutlarının 1:1 oranıyla sağlandığı sonucuna ulaşıldı. EDX analizi sonuçlarında, QSM/nHAp iskelelerimizde inorganik bileşenlerin çoğunu oluşturan Ca, P, C ve O elementlerinin atomik kütlece yüzdeleri sırasıyla, %10.7, %5.7, %46.8, %36.8 olarak tespit edilmiş, başarılı homojen dağılımlı bir iskele oluşturulduğu saptanmıştır. **(Resim 15)**

Bu sonuçtan yola çıkarak çalışmamızda kulanacağımız iskelelerin 1:1 oranında çoğaltılmasına, karakterizasyonun ve hücre kültürünün yapılmasına karar verildi. **(Resim 18)**



Resim 18: A- QSM ve nHAp ayrı ayrı görüntüleri, B-QSM/nHAp Karışımın hazırlanması, C-Kalıplanması, D-Liyofilizasyonu

Yapılan çalışmalar, yüksek nHAp konsantrasyonunun hücre adezyonu, proliferasyonu ve farklılaşması üzerinde olumsuz etkileri olduğunu bildirmiş ve iskelelerde kullanılan nHAp konsantrasyonunun yararlı etkisinin bir üst sınırı olabileceğine işaret etmiştir[16]. İskelenin enine kesitinin SEM görüntüsü, iskelede birbirine bağlı gözenekli bir ağı ortaya koymaktadır. EDX analizlerine göre homojen yapıda bir iskelenin en iyi 1:1 oranı ile elde edildiği saptanmıştır. Analizi sonuçlarında, sentezlenen malzemelerin saf olduğu ve Ca, Fosfor , C (karbon (AÇM) ve Oksijen (hidroksiapatit) ‘den oluştuğunu doğrulanmaktadır. İnorganik bileşenlerin çoğunu

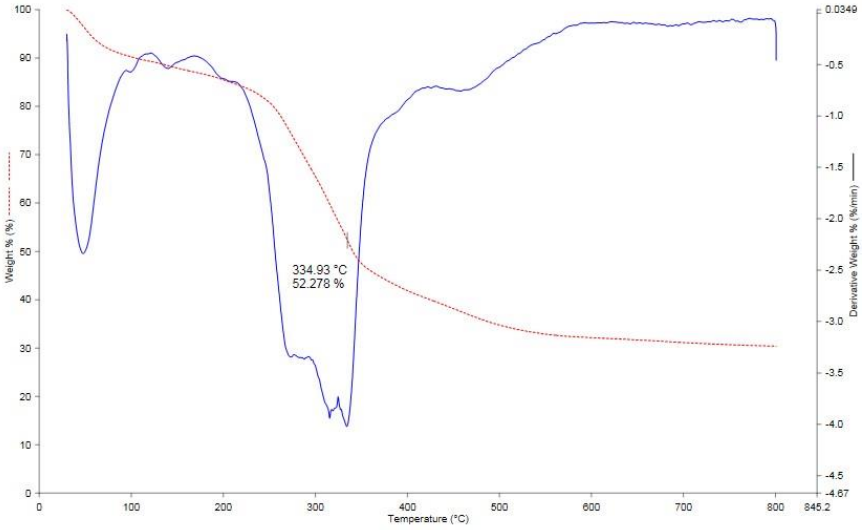
oluşturan Ca, P, C ve O Resim 15'de gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre homojen dağılımlı bir iskele oluştuğu saptanmıştır.

4.2. QSM/nHAp İskelelerin Termal Karakterizasyonu: Termogravimetrik Analiz (TGA)

Sıcaklık değişimine karşılık kütlede meydana gelen bozunmaları belirlemek amacıyla QSM/nHAp İskeleler için termogravimetrik analiz yapılmıştır. **Şekil 3** de QSM/nHAp iskelelerin TGA ve birinci derece türevi alınmış (DTG) termogramları gösterilmektedir.

Literatüre göre polisakkaritlerin bozunması yaklaşık olarak 175 ile 320 °C arasında gerçekleşmektedir[30]. TGA analizinin sonuçları incelendiğinde AÇM yapılarının literatürdeki bilgilere benzer şekilde 330 °C ve üzerinde bozunmaya başladığı görülmektedir (Şekil 3).

Termogramlar incelendiğinde, iskeleye ait termogram için; 20-100 ºC aralığındaki bozunma yapıda mevcut olan nemin uzaklaşmasına, ikinci bozunma basamağında ise 240-330 ºC aralığında polisakkarit ayrışmasına yani yapının depolimerize olduğuna karşılık gelen sonuçlar, literatürde benzer çalışmalara paralel olarak elde edilmiştir.[31]



Şekil 3: TGA analizi grafiği

Yılmaz ve ark yaptığı çalışmada, TGA analizinin sonuçları incelendiğinde, AÇJ yapısı 58 °C'de, Si-AÇJ ise 52 °C'de yapılarında bulunan nemin buharlaşarak uzaklaştığı ve 320 °C üzerinde bozunmaya başladığı rapor edilmiştir[25]. Bu sonuçlara göre çalışmamızdaki bulgular literatür ile uyumluluk içermektedir.

4.3. QSM/nHAp İskelelerin Mekanik Dayanımlarının Ölçülmesi

QSM/nHAp İskelelerin EDC/NHS ajanları ile çapraz bağlanarak mekanik dayanımlarının arttırılması sağlanmıştır. Üretilen 3B gözenekli QSM/nHAp iskelelerin mekanik özelliklerinin belirlenebilmesi için mekanik basma testi gerçekleştirilmiştir. İskelelerin basma dayanımlarının belirlenebilmesi için iskeleler (n=3) Instron-5569 cihazında 100N'luk yük yardımı ile 0,1N/dk basma oranında test edilmiştir. Testin sonunda iskelelerin maksimum gerinim ve gerilim değerleri altındaki değerleri ve taşıyabildiği maksimum kuvvet değeri bulunmuştur. Buna göre iskele ortalama 9± 3 N kuvvet altında 108,11 ± 9,3 kPa maksimum basınç dayanımı değerine ve % 76,02 ± 4,6 maksimum basma gerinimi değerine dayanabildiği görülmüştür. **Tablo 3**' de mekanik basma testinin sonuçları özetlenmiştir.

Tablo 3: Mekanik Basma Testi Değerleri

	Maksimum Basınç Dayanımı	Maksimum Basma Gerinimi	Lineer Basma Modülü
	(kPa)	(%)	(kPa)
QSM/nHAp	108,11	76,02	8

Yılmaz ve ark yaptıkları çalışmada, Si-AÇJ kriyojel yapılarında maksimum basınç dayanımının AÇJ yapılarına göre 1,5 kat, lineer basma modülüsünün 33 kat artarken, maksimum gerinim değerinin Si-AÇJ de nispeten azaldığı rapor edilmiştir[25]. Literatürde AÇM ile oluşturulmuş 3 boyutu yapılar incelendiğinde mekanik dayanım değerlerinin kitosan polimeri ile benzerlik gösterdiği anlaşılmaktadır. nHAP emdirilmiş müsilaj iskeleler yaklaşık 1,3 daha yüksek basma gerinim ve 1,15 kat daha yüksek yük kuvveti değerine dayanmıştır. Konuyla ilgili yapılan literatür incelemesine göre iskelelerin mekanik dayanımları çapraz bağlayıcı miktarı, süresi ve kullanılan materyal/polimer oranlarına göre değişebileceği sonucuna varılmıştır.

4.4. QSM/nHAp İskelelerin Porozitelerinin Belirlenmesi

QSM/nHAp İskelelerin % gözenekliliği yapılan sıvı değiştirme metodu ile belirlenmiştir. Gözenek boyutu FE-SEM analizi sırasında malzemenin iç kesitindeki por çapları ölçülerek elde edilmiştir. Malzemenin ıslanabilir özellikleri sıvı tutma testi ve temas açısı tensiyometre cihazı ile ölçülerek incelenmiştir. Tablo 4' de ölçümlerden elde edilen sonuçlar özetlenmiştir.

Tablo 4: QSM/nHAp İskelelerin gözeneklilik ve ıslanabilirlik özellikleri

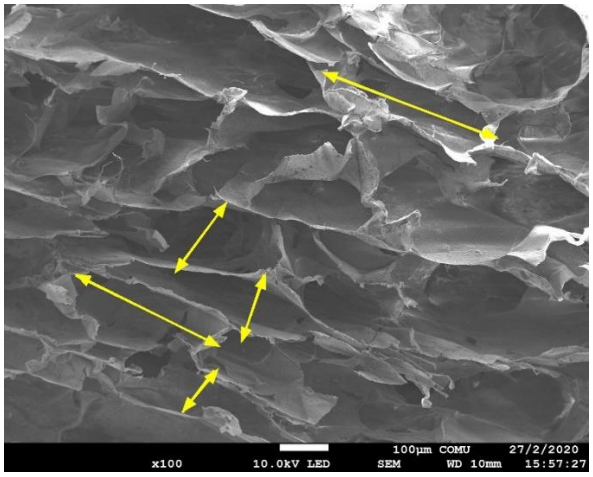
	Gözeneklilik	Por Çapı	Sıvı Tutma Kapasitesi
	(%)	(μm)	(w/w)
QSM/nHAp	72.04±1.12	99,77±28,96	6522,77±190,57

Gözenek boyutu FE-SEM analizi sırasında malzemenin iç kesitindeki por çapları ölçülerek elde edilmiştir. İskelelerin ortalama gözenek çapılarının 99,77±28,96 μm olduğu saptanmıştır. 85 ila 190 μm arasında değişen gözenek boyutu çapı, hücre bağlanması ve göçünün sağlanması için kritik olduğu rapor edilmiştir[16]. Sonuç olarak geliştirdiğimiz QSM/nHAp temelli iskelelerin hücre bağlanması ve göçü için ideal ideal gözenekliliğe ve homojen dağılıma sahip olduğunu saptanmıştır. Bu özelliği besinlerin ve oksijenin iskelelerin iç bölgelerine geçmesine yardımcı olmaktadır. Gözeneklilik, doku mühendisliği uygulamalarında ideal bir iskele için hayati bir faktördür. Böylece hücreler gözeneklerden geçebilir ve çoğalma için yapı iskelesine bağlanabilir[32].

Sıvı yer değiştirme analizi ile AÇM/nHAp gözenekliliği %72.04 ± 1.12 olarak saptandı. Daha önce yapılan çalışmalar incelendiğinde, Yılmaz ve ark yaptıkları çalışmada AÇM'nin gözenklilik ve por çapı, ortalama değerleri sırasıyla; %83,4 ve 233 μm olarak rapor edilmiştir. AÇM/nHAp temelli iskelelerin AÇM iskelelerine göre daha az poroziteye sahip olduğu, AÇM/nHAp temelli iskelelerin gözenekliliğinin, nHAp'in AÇM iskele matrisi üzerinde birikmesine bağlı olarak azaldığı sonucuna varılmıştır[25]. Süngerimsi kemiğin gözenekliliğine benzer şekilde, AÇM/nHAp temelli iskelelerin gözenekliliğinin %72, gözenek boyutlarının ise 99.77 ± 28.96 μm olarak bulunması ile kemik ile benzer ideal sınırlar içinde olduğu sonucuna varılmıştır.

Yılmaz ve ark yaptığı aynı çalışmada Si-AÇM'nin gözeneklilik değerleri AÇM/nHAp iskelelerin değerlerine yakın çıkarken AÇM/nHAp por çapının daha fazla oluşunun Si-AÇM iskelelerin sol-jel oluşturarak meydana gelmesine bağlanmıştır.

Yapılan çalışmalar, gözenek boyutu 100 μm 'den büyük olan iskeletlerinin kemik büyümesini desteklediğini ve hücre-hücre etkileşimlerini destekleyebileceğini bildirmiştir[33]. Sonuç olarak AÇM/nHAp temelli iskelelerin yeterli gözenekliliğe sahip olduğu ve bu nedenle besinlerin ve oksijenin kompozit iskelelerin iç bölgelerine geçişine yardımcı olabileceği sonucuna ulaşılmıştır. Resim 19'da QSM/nHAp iskelelerin FE-SEM ile elde edilmiş görüntüleri ve ölçülen gözenek çapları verilmiştir.



Resim 19: QSM/nHAp İskelelerin FE-SEM 100X büyütmedeki kesit görünümleri ve por çapları (Ölçek çubuğu por çaplarının gösterildiği resimde 100 µm'yi; 2500X büyütmenin olduğu resimde 10 µm'yi belirtmektedir.)

4.5. QSM/nHAp İskelelerin Şişme Testi

Şişme oranı, sıvı emme kabiliyetini ve hidromüsilaj veya hidromüsilaj bazlı yapı iskeletlerinin ağırlığındaki fraksiyonel artışı tanımlar. AÇM/nHAp in şişme oranı 6522,77 ± 190,57% (n = 3) ve iskelenin Taşıyabildiği Sıvı Hacmi 221,56 ± 7,92µL bulundu. Ekin ve ark.[24] AÇM ile yaptıkları çalışma ile karşılaştırıldığında AÇM/nHAp bazlı iskelelerin daha az şişme oranına sahip olduğunu, ancak sıvı alım seviyelerinin hemen hemen aynı olduğunu göstermektedir. Bizim çalışmamızda iskelenin sıvı tutma kapasitesinin daha düşük olması nHAp kristal yapısıyla ilgilidir. Sonuç olarak AÇM/nHAp temelli iskelelerin test boyunca tahrip olmadan şiştiği ve genel yapısını koruduğu saptanmış. Taşıyabildiği sıvı hacminin ise önceki çalışmalarla uyumlu olduğu saptanmıştır. İskelelerin sıvı tutma kapasitesi ve taşıyabildiği sıvı hacmi (pbs uptake) verileri Tablo 5'de verilmiştir.

Tablo 5: İskelelerin sıvı tutma kapasitesi ve taşıyabildiği sıvı hacmi (pbs uptake) değerleri

İskeleler	Sıvı Tutma Kapasitesi (w/w)	Taşıyabildiği Sıvı Hacmi (pbs Uptake) (µL)
AÇM/nHAp	6522,77±190,57	221,56±7,92

Yılmaz ve ark yaptığı çalışmada iskelelerin sıvı tutma kapasiteleri incelendiğinde AÇM polimerinin tek başına daha çok su tutabildiği gözlemlenmiştir. Şimşek ve ark. AÇM polimeri ile yaptığı sıvı tutma testi değerleri ile yakın sonuçlar veren AÇM iskeleleri silika ile modifiye edildiğinde sıvı tutma kapasitelerinde bir düşme gözlemlenmiştir[25].

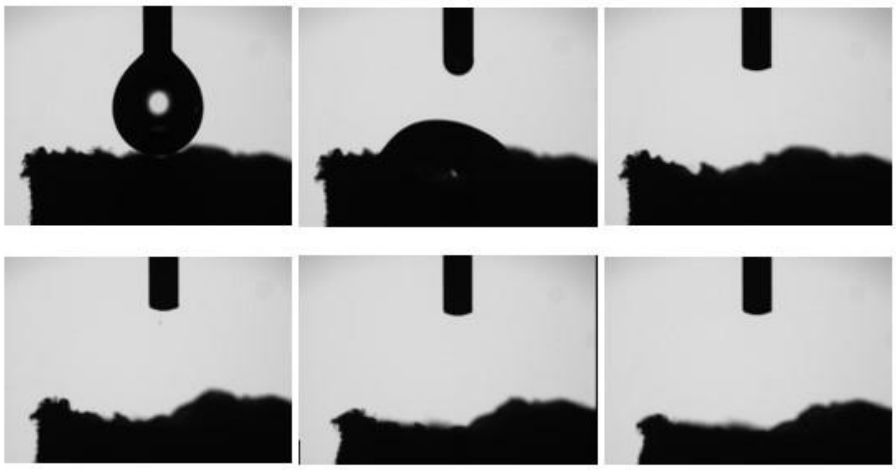
Sıvı tutma ve şişme bir biyomalzemenin biyolojik konaklarında ikame edebilmesi için hayati önem taşımaktadır. Doku mühendisliği uygulamalarında sıvı mobilizasyonunun önemi başta hücrelere büyüme faktörleri sağlaması açısından önem arz ederken, biyouyumluluk için de bir faktör olarak değerlendirilebilmektedir. Malzemenin sıvı alımı ve salımı gözeneklilik çerçevesinde fikir verebilmekte, gözenekli yapının da hücrelere niş oluşturması adına önemli bir rolü bulunmaktadır[34,35] .

Ekin ve ark. AÇM ile yaptıkları çalışma ile karşılaştırıldığında AÇM/nHAp bazlı iskelelerin daha az şişme oranına sahip olduğu, ancak sıvı alım seviyelerinin hemen hemen aynı olduğunu sonucuna ulaşılmıştır. Yapılan çalışmalar, iskelelerinin hidrasyon davranışının, gözenek hiyerarşisine, hidromüsilajin doğasına, pH, seramik içeriği, partikül boyutu ve çapraz bağlanma boyutuna bağlı olduğunu bildirmiştir[21,36,37].

4.6. QSM/nHAp İskelelerin Yüzey Islanabilirlik Özelliklerinin Belirlenmesi (Temas Açısı Belirleme Analizi)

Bir yüzeyin biyolojik ortamda kesin bir etkileşim mekanizmasının tahmininde, hidrofobikliklerine veya hidrofilikliklerine göre ıslanabilirlik, bir biyomateryalin biyolojik tepkisini etkilemede önemli bir role sahiptir. Yüzey ıslanabilirliği, bir malzemenin belirli uygulamalarda kullanımının belirlenmesi için önemli özelliklerden biridir. Islanabilirliğin belirlenmesi, malzeme yüzey temas açısının ölçülmesine dayanır [38].

Bizim çalışmamızda AÇM/nHAp temelli iskelelerin 5 uL saf suyu 35.71 µL/sn.de tamamen emdiği saptanmıştır. Yılmaz ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada AÇM iskelelerin ortalama 20 µL/sn Si-AÇM iskelelerin ise 56 µL/sn sıvı emiş hızına sahip olduklarını rapor etmişlerdir[25]. Bu durum AÇM/nHAp iskelelerin hidrofilik bir yapıya sahip olduğunu göstermektedir. Resim 20'de temas açısı cihazından elde edilen görüntüler verilmiştir.



Resim 20: Temas açısı cihazı ölçüm görüntüleri

4.7. QSM/nHAp İskelelerin Brunauer-Emmett-Teller (BET) ve Barrett-Joyner-Halenda (BJH) Analizleri

QSM/nHAp iskelelerin yüzey alanı ölçümü BET ve BJH analizi ile gerçekleştirilmiştir. Yüzey alanı ve gözeneklilik, iskeledeki hücrelerin beslenmesi ve büyümesi için geniş yüzey alanı sağlaması sebebiyle önemli bir özelliktir[39]. Yapılan analiz sonucu üretilen iskelelerin yüzey alanı 6.255 m^2/g gözenek hacmi 0.028 (mL/g) olarak saptandı. Yılmaz ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, Si-AÇM ve AÇM den ürettikleri iskelelerin yüzey alanı sırasıyla 249,833(m^2/g) ve 0 (m^2/g) gözenek hacmi sırasıyla; 0,047 ve 0,071 (mL/g) olarak rapor edilmiştir[25]. Analiz sonuçları Tablo 6'da sunulmuştur.

Tablo 6: BET-BJH analiz sonuçları

		BJH (Barrett-Joyner-Halenda Metodu)		
	BET Yüzey Alanı	Yüzey Alanı	Por Hacmi	Por Çapı
	(m^2/g)	(m^2/g)	(mL/g)	(nm)
QSM/nHAp	6.255	6.098	0.028	8.7758

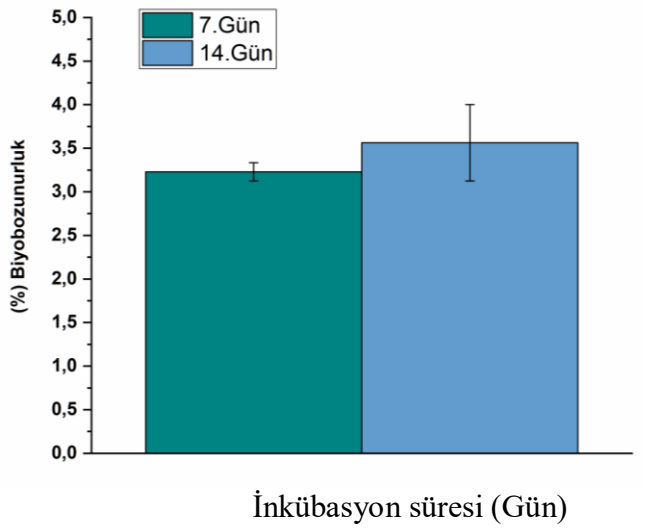
Yapılan diğer çalışmalarla karşılaştırıldığında AÇM/nHAp iskelelerin yüzeye alanının ayva çekirdeği müsilajı ile ilgili yapılan biyo iskelelere oranla ortalama 25 kat daha fazla yüzey alanına sahip olduğu sonucuna ulaşılmıştır. nHAp partikülleri ayva çekirdeği yüzeyini homojen bir şekilde kaplayarak yüzey alanının artmasını sağlamıştır. Bu özellik *in vitro* uygulamalarda hücrelerin malzemeye tutunmasını arttıracağını ve pürüzlü yüzeyin gerçek dokuları taklit edebilecek bir özellik sağlayacağını düşündürmektedir. IUPAC sınıflandırmasına QSM/nHAp iskelelerin mezoporoz yapılar olarak görülmektedir[40,41].

4.8. QSM/nHAp İskelelerin Biyobozunurluk Testi

Biyobozunur iskeleler genellikle doğal dokuların mühendisliği için vazgeçilmez unsurlar olarak kabul edilir. Biyolojik olarak fonksiyonel dokunun veya doğal hücre dış matriksin rejenerasyonundan önce hücre yapışmasını, göçünü, çoğalmasını ve farklılaşmasını modüle ederler. Elde edilen HDM'nin hücreler tarafından yeniden düzenlenebilmesi ve doku rejenerasyonuna katkı sağlaması biyobozunurluluk ile ilişkilidir. Fiziksel stabilite ve biyobozunurluk kemik dokusu rejenerasyonunda kritik öneme sahiptir. 3B iskelenin bozunma kinetiği kontrol edilebilir olmalı ve sonunda yapı içinde yeni kemik oluşumu için bir alan

açmalıdır[42]

In vitro enzim bozunma testleri, biyomalzemelerin *in vivo* davranışını tahmin edebilir. Bunun yanısıra, biyolojik ortamının karmaşıklığından dolayı vücudun *in vitro* simülasyonu oldukça zordur. Vücut sıvılarında ve kanda lizozim enzimi bulunmaktadır[43]. Bu çalışmada *in vitro* lizozim biyobozunurluk testi gerçekleştirilmiştir. Test sonunda 7. günde % 3.22 ± 0.10, 14. günde % 3.56 ± 0.43 biyodegradasyon değeri elde edilmiştir. Yılmaz ve ark. yaptıkları çalışmada biyobozunurluk testinin 7. gün sonuçlarına göre toplam kütle kabı AÇM iskelelerinde %9,8 ± 2,2 (n=3) iken, Si-AÇM yapıları %19,4 ± 1,4'lük (n=3) bir kütle kaybına uğramıştır. Benzer durum 14. gün sonuçları içinde gözlemlenmiş olup AÇM %12,1 ± 4,3 iken Si-AÇM %28,7 ± 2,3 olarak hesaplanmıştır. Genel olarak Si-AÇM AÇM iskelelerine göre yaklaşık olarak 1,3 kat daha hızlı biyobozunurluk sergilerken, AÇM iskelelerinin AÇM/nHAp iskelelerin göre daha ortalama 4 kat daha hızlı bozunduğu, Si-AÇM iskelelerin ise 7 kat daha hızlı bozunduğu sonucuna ulaşılmıştır. QSM/nHAp iskelelerin 7 ve14 gün boyunca gerçekleştirilmiş biyobozunurluk testi sonuçları Şekil 4'de gösterilmiştir.

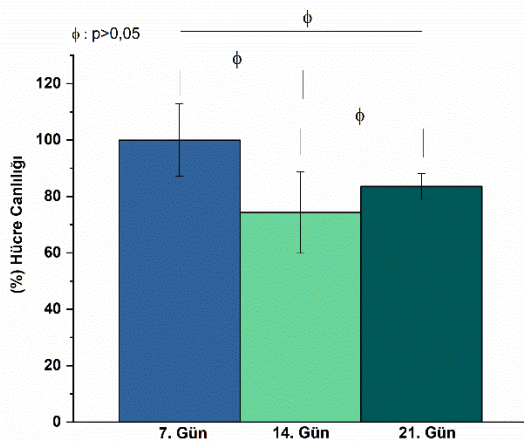


Şekil 4: QSM/nHAp İskelelerin 7. ve 14. günlerdeki enzim biyobozunurluk grafiği

Kemiğin iyileşme süreci defektin vücuttaki yeri, boyutu, hastanın yaşı ve sistemik durumuna göre değişmektedir. Bu nedenle, iskelenin bozunma kinetiği hedef dokunun rejenerasyon kapasitesine uygun olması gerekir[44]. Geliştirilen iskelenin bozunma kinetikleri, 14 günlük simüle edilmiş fizyolojik koşullarda incelenmiş ve biyobozunurluk değerleri kemik dokusu rejenerasyonu için uygun bulunmuştur.

4.9. Hücre Kültürü Uygulaması ve QSM/nHAp İskelelerin *in vitro* Canlılık Testi

Doku mühendisliği ve rejeneratif tıp uygulamalarında üretilen biyomalzemelerin biyolojik olarak uyumlu olması ve toksik olmaması beklenmektedir. Bu amaçla, hazırlanan iskelelerde hücre sağ kalımını belirlemek için rutin olarak MTT testleri yapılır. AÇM/nHAp temelli iskelelerin üzerindeki hücrelerin canlılıkları 7.,14. ve 21. gün sonunda MTT testleri ile belirlenmiştir. Elde edilen sonuçları Şekil 5'te sunulmuştur. Hücre kültürü periyodu boyunca yüksek derecede hücre canlılığı gözlenmiş, 7.,14. ve 21. günlerde günler arasında hücre canlılığı açısından istatistik olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır (Φ p>0,05). Bu bilgiler ışığında AÇM/nHAp temelli iskelelerin hücre dostu bir yapıya sahip olduğu, sitotoksik etkilerden arınmış ve hücre proliferasyonunu destekleyen faktörleri içerdiği düşünülmektedir.



Şekil 5: AÇM/nHAp iskelelerin 7., 14. ve 21. günlük hücre kültürü işleminin sonunda yapılan hücre canlılığı (MTT) testi sonuçları. (*: p<0,05; ♀: p>0,05)

4.10. Hücrelendirilmiş QSM/nHAp İskelelerin Morfolojik Gözlem ve Analizi (FE-SEM, FE-SEM EDS Haritalama)

Proje önerisinde yapılması planlanan bu analiz daha önce sunulan gerekçeler ile tamamlanamamıştır. BAP Proje komisyonuna sunulan gerekçelerimiz haklı bulunarak projeden çıkarılmıştır.

4.11. İmmünohistokimyasal ve Histokimyasal Analizler

Hücrelerin osteojenik farklılaşmanın morfolojik olarak tespit edilmesi amacıyla HK ve İHK boyamalar yapılmıştır. QSM/nHAp iskelelerinde bulunan hücrelere 7.,14. Ve 21. gün

sonunda yapılan Masson's trikrom, Von Kossa, H&E, osteopontin, osteonektin, osteokalsin ve ALP boyamaları Şekil 6'da verilmiştir.

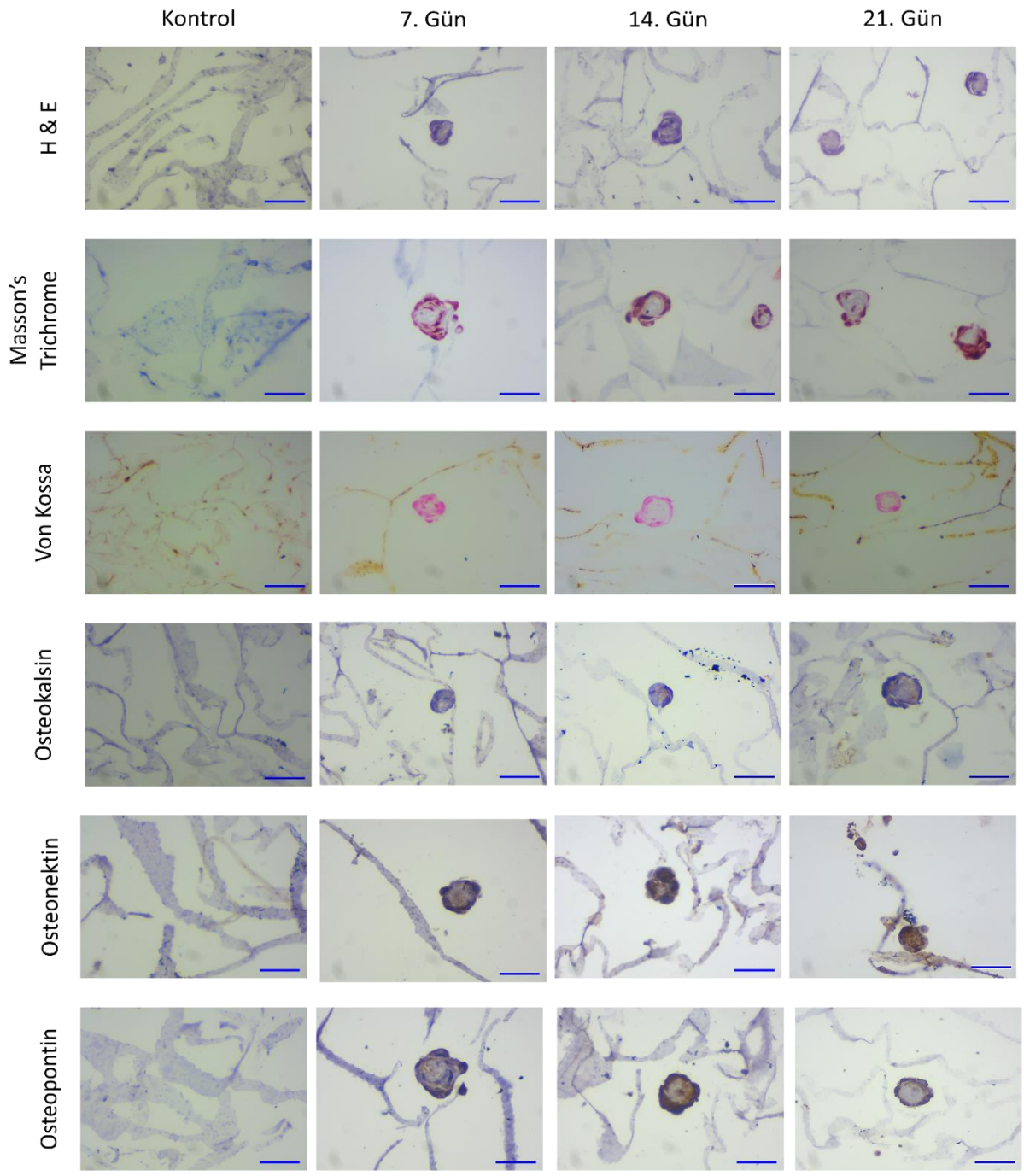
Bu çalışmada histokimyasal değerlendirme için H&E boyaması iskeleler boyanmıştır. Hücrelerin iskeleler üzerinde genel olarak homojen bir dağılım gösterdiği ve Ca birikintileri oluşturduğu (koyu lekeler) gösterilmiştir.

Masson's trikrom boyamasında, Osteoid doku parlak kırmızı ve uygulanan fibril boyasına göre mavi veya yeşil kemik matriksi boyanmaktadır. İskelelerin renk şiddeti 7. günden 21. güne doğru artış göstermiştir.

Masson's trikrom boyasına ek olarak *von Kossa* boyaması mineralleşmiş matriks üzerindeki fosfat gruplarının belirlenmesinde kullanılmaktadır. Fotokimyasal bozunma sonucunda Ag3PO4 bileşiği gümüş birikintileri oluşturarak fosfat varlığı ispatlanmış olur[45]. Von Kossa boyamasında kalsiyum tuzlarının koyu kahve-siyah rengi boyanırken, hücre çekirdeği ve sitozol mavi renkte görülür. Masson's trikrom boyamasının sonuçlarına paralel şekilde *von Kossa* renk şiddeti de 7. günden 21. güne doğru artış göstermiştir. Yılmaz ve ark yaptıkları çalışmada Si-AÇM kriyojellerinde mineralizasyon aşamasına AÇM kriyojellerine göre daha önce geçildiği ve nispeten daha yoğun olduğu rapor edilmiştir.

Osteonektin ve osteokalsin geç dönem osteoblastik farklılaşma proteinleri olarak bilinmektedir[46,47] OCN, in vitro osteoblast farklılaşmasının geç aşamasında ifade edilir[48]. OCN kemik döngüsünün ve mineralizasyonunda etkili bir proteindir[49]. İHK boyama sonuçlarına göre osteonektin ve osteokalsin boyaması incelendiğinde ise 7. günden sonraki haftalarda hücrelerde de yoğun bir şekilde boyanmanın gerçekleştiği görülecektir.

Osteopontin hücrelerin matrikse tutunmalarını ve kemik benzeri morfolojileri almaları için gerekli olan ekstrasellüler matriks proteinidir[50]. Yapılan İHK osteopontin boyamasında ilk hafta düşük seviyede boyanma gözlemlense de 14. günde maksimum seviyede ifade edildiği görülecektir. Yılmaz ve ark. yaptığı çalışmanın İHK bulguları çalışmamızla paralellik içermektedir.



Şekil 6: QSM/nHAp iskelelerinde osteojenik farklılaşmanın HK ve İHK boyamalar ile incelenmesi (Ölçek çubukları 50 µm'yi göstermektedir).

4.12. Osteojenik Farklılaşmanın RT-qPCR Analizi ile İncelenmesi

Trizol kullanılarak izole edilen RNA'ların saflık ve miktar tayinleri Tablo 7'de sunulmuştur.

Tablo 7. RNA saflık ve miktar tayinleri

	Miktar (ng/µL)	A260/A280
MKH	348,2	1,97
7. gün	112,5	2,04
14. gün	125	2,12
21. gün	226,1	2,14

cDNA sentez kiti kullanılarak elde edilen cDNA'ların miktarı ise Tablo 8'de sunulmuştur. Elde edilen veriler, miktarsal olarak eşit seviyede cDNA elde edildiğini göstermektedir.

Tablo 8. cDNA miktar tayinleri

	Miktar (ng/µL)
MKH	1123,2
7. gün	1089,3
14. gün	1181,3
21. gün	1130,1

Osteojenez ilişkili genlerin ifadesi, elde edilen cDNA'nın kalıp olarak kullanıldığı RT-qPCR analizi ile belirlenmiştir. Tablo 9'da osteojenik farklılaşmayı belirlemek amacıyla seçilen genlerin farklaşmamış MKH'lerdeki gen seviyelerine ve GAPDH seviyelerine göre normalize edilmiş ifade değerleri sunulmuştur.

Tablo 9. Hedef genlerin $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri (ifade kat değişimi)

	7. gün	14. gün	21. gün
ALP	0,64	9,40	0,48
RUNX2	0,21	0,30	6,51
OK	0,95	6,60	32,04
ON	0,02	0,24	0,40
COL1A1	0,0005	0,007	0,017

Elde edilen verilere göre, ALP hariç tüm genlerin ifadesi zamana göre artış göstermektedir. En yüksek ifade artışı ise RUN2X ve OK genlerinde 14. gün ve 21. günlerde tespit edilmiştir. OPN geni için kullanılan primerler ile sonuç elde edilememiştir.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Kemik doku mühendisliği yaklaşımları maxillofasiyal bölgede travmatik yaralanmalarada, 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[51]. Kemik, dünya çapında her yıl gerçekleştirilen 2,2 milyon kemik grefti ile en sık nakledilen dokulardan biridir[52]. Kemik doku rekonstrüksiyonunda, anatomik bölgelerin çeşitliliğini, defektin boyutları, mekanik stresleri ve mevcut yumuşak doku varlığı çok çeşitli klinik zorluklarıda beraberinde getirmektedir. Otolog kemik grefti, iskelet defektlerinin rekonstrüksiyonunda altın standart olmaya devam etmektedir. 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[11]. Bu sınırlılıkların bir sonucu olarak, defekt alanının rejenerasyonu için sentetik biyomateryallerin kullanımı katlanarak artmaktadır. Bununla birlikte, bazen mevcut sentetik biyomateryaller konakçı doku ile iyi entegre olmayıp, olası enfeksiyon, yabancı cisim reaksiyonları ve implante edilen greft materyalinin önce ekspoze olması ve sonra da kaybıyla sonuçlanır.

Otolog kemik greftleri başarılarını, greft ve çevreleyen mikro ortamdaki sinyallere yanıt verebilen endojen biyoaktif moleküllerin ve hücrelerin varlığına borçludur. Başarılı bir kemik doku mühendisliği kemik yenilenmesi sürecini taklit etmeli ve ideal olarak hızlandırmalıdır; bu, ancak kemik iyileşmesinin karmaşık sürecini anladığımızda ve kritik adımları belirlediğimizde mümkün olacaktır. Birçok farklı çalışma grupları, kemiğin doğal nanokompozit mimarisini taklit etmek için nanoyapıların tasarımı (örneğin, nanopartiküllerin veya nanofiber takviyelerin dahil edilmesi) yoluyla iskelelerin mekanik özelliklerini (örneğin sertlik, güç ve tokluk) değiştirmek için çalışmaya devam etmektedir[11].

Allojenik ve otologdaki kemik greftlerinin transplantasyonundaki sınırlılıklar nedeniyle, alternatif tedavi yaklaşımları zorunluluk halini almaya başlamıştır. Kemik doku mühendisliği

osteojenik progenitör hücreler, osteokondüktif iskeleler ve osteoindüktif faktörleri içerisinde barındırması sebebiyle umut verici bir yöntem olarak kabul edilmektedir[53].

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 fibroin, jelatin ve kitosan içinde dağılmış HA tozu bazlı kompozit iskeleler araştırmacılar tarafından yıllar içerisinde kullanılmaya devam etmektedir[54].

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[17]. 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. AÇM'nın kolay ve ucuz yöntemlerle temin edilmesi, biyolojik olarak insan hücrelerinde immün reaksiyon oluşturmaması ve hücresel yenilenmede uyarıcı etkilere sahip olması biyomedikal malzemelerin olarak geliştirilmesi için önemli bir alternatif olarak düşünülebilir.

Bu projede kemiğin doğal mikromimarisini ve ortamını taklit etmek için ayva çekirdeği müsilajı içerisinde 3 farklı oranda nanohidroksiapatit (nHAp) kullanılarak 3boyutlu biyoiskeleler üretilmiştir. Yapılan SEM incelemeleri sonucu 3 farklı orandaki AÇM/nHAp iskelelerinden en iyi yüzey morfolojisi ve gözenek boyutlarının 1:1 oranıyla sağlandığı sonucuna ulaşılmıştır.

Üretilen iskeleler fizikokimyasal, mekanik ve biyolojik olarak test edilmiştir. 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, HK ve İHK boyamaları ve gen ifade analizleri gerçekleştirilmiştir. AÇM/nHAp 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 etmektedir.

AÇM/nHAp biyoiskelelerin *in vivo* deneylerinin yapılması, oluşturulan iskelelerin kemik dokusundaki rejenerasyon potansiyelinin izlenmesi, kemik doku yanıtlarının anlaşılması için bir fikir oluşturması ve klinik kullanımının önünün açılabilmesi için önemli bir adım olacaktır.

Sonuç olarak, geliştirilen AÇM/nHAp biyoiskelelerin maksillofasiyal bölgede kemik doku onarımında kullanılma potansiyelinin olduğu, malzemenin geliştirilmeye açık olduğu ve ileri çalışmaların yapılması gerektiğini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. A., B. *Ueber histologische befunde nach knochenimlantationen. Arch Klein Chir* (1893).

2. Ashraf, M. U., Muhammad, G., Hussain, M. A. & Bukhari, S. N. A. Cydonia oblonga M ., A Medicinal Plant Rich in Phytonutrients for Pharmaceuticals. **7**, 1–20 (2016).

3. Sağlam, N. & Korkusuz, P. Kemik grefti yerine geçen substratlar ve etki mekanizmaları. *TOTBİD Derg.* **16**, 485–492 (2017).

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.* 1–8 (2018). doi:10.1111/edt.12435

5. Lei, B., Guo, B., Rambhia, K. J. & Ma, P. X. Hybrid polymer biomaterials for bone tissue regeneration. *Front. Med.* 1–13 (2018). doi:10.1007/s11684-018-0664-6

6. Altunkaynak, B. Z. & Kabak, Y. B. The Use of Sequential VEGF- and BMP2-Releasing Biodegradable Scaffolds in Rabbit Mandibular Defects. *J Oral Maxillofac Surg* **75**, 1–14 (2017).

7. Zhang, W. *et al.* Effect of calcium citrate on bone integration in a rabbit femur defect model. *Asian Pac. J. Trop. Med.* **5**, 310–314 (2012).

8. Yu, H. *et al.* PEEK - biphasic bioceramic composites promote mandibular defect repair and upregulate BMP - 2 expression in rabbits. *Mol. Med. Rep.* **17**, 8221–8227 (2017).

9. Lopez, C. D. *et al.* Three dimensionally printed bioactive ceramic scaffold osseoconduction across critical-sized mandibular defects. *J. Surg. Res.* **223**, 115–122 (2018).

10. Mahmood, S. K. *et al.* In vivo evaluation of a novel nanocomposite porous 3D scaffold in a rabbit model: Histological analysis. *Int. J. Nanomedicine* **12**, 8587–8598 (2017).

11. Saiz, E. *et al.* Perspectives on the role of nanotechnology in bone tissue engineering. *Dent. Mater.* **29**, 103–115 (2012).

12. Köse, S. *et al.* Novel Biomaterials for Regenerative Medicine. **1077**, (2018).

13. Zhou, H. & Lee, J. Nanoscale hydroxyapatite particles for bone tissue engineering. *Acta Biomaterialia* **7**, 2769–2781 (2011).

14. 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.* **631**, 373–378 (2014).

15. Zhao, Y. *et al.* Magnetic bioinspired micro/nanostructured composite scaffold for bone regeneration. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **174**, 70–79 (2019).

16. 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* **8**, 23477–23488 (2016).

17. Gusi, N., Ivkovi, A. & Vafaye, J. Nanobiotechnology and bone regeneration : a mini-review. 1877–1884 (2014). doi:10.1007/s00264-014-2412-0

18. Zou, Y. *et al.* "Click" chemistry in polymeric scaffolds: Bioactive materials for tissue engineering. *J. Control. Release* **273**, 160–179 (2018).

19. Mortada, I. & Mortada, R. Epigenetic changes in mesenchymal stem cells differentiation. *Eur. J. Med. Genet.* **61**, 114–118 (2018).

20. 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.* **50**, 4130–4135 (2012).

21. Hussain, M. A., Muhammad, G., Haseeb, M. T. & Tahir, M. N. Quince Seed Mucilage: A Stimuli-Responsive/Smart Biopolymer. 127–148 (2019). doi:10.1007/978-3-319-95990-0_19

22. 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.* **3**, 303–309 (2013).

23. Shahbazi, Y. & Moosavy, M. H. Quince seed mucilage supplemented with titanium dioxide and Silicon dioxide nanoparticles. *Nanomedicine Res. J.* **4**, 157–163 (2019).

24. 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.* **35**, 240–253 (2020).

25. Hilal D. Yilmaz, Ugur Cengiz, Yavuz E. Arslan, Fadime Kiran, A. C. From a plant secretion to the promising bone grafts: Cryogels of silicon-integrated quince seed mucilage by microwave-assisted solegel reaction. *J. Biosci. Bioeng.* (2020). doi:10.1016/j.jbiosc.2020.11.008

26. Kang, K. S. *et al.* Regulation of osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells by controlling electromagnetic field conditions. *Exp. Mol. Med.* **45**, (2013).

27. Knippenberg, M., Helder, M. N., De Blieck-Hogervorst, J. M. A., Wuisman, P. I. J. M. & Klein-Nulend, J. Prostaglandins differentially affect osteogenic differentiation of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Tissue Eng.* **13**, 2495–2503 (2007).

28. Yanai, R. *et al.* Extracellular calcium stimulates osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells by enhancing bone morphogenetic protein-2 expression. *Cell Calcium* **83**, 102058 (2019).

29. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-ΔΔCT method. *Methods* **25**, 402–408 (2001).

30. de Alvarenga Pinto Cotrim, M., Mottin, A. C. & Ayres, E. Preparation and Characterization of Okra Mucilage (Abelmoschus esculentus) Edible Films. *Macromol.*

Symp. **367**, 90–100 (2016).

31. Singh, S. & Bothara, S. B. Physico-chemical and structural characterization of mucilage isolated from seeds of Diospyros melonoxylon Roxb. *Brazilian J. Pharm. Sci.* **50**, 713–726 (2014).

32. Murphy, C. M., Haugh, M. G. & Brien, F. J. O. Biomaterials The effect of mean pore size on cell attachment , proliferation and migration in collagen – glycosaminoglycan scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* **31**, 461–466 (2010).

33. Ren, D., Yi, H., Wang, W. & Ma, X. The enzymatic degradation and swelling properties of chitosan matrices with different degrees of N-acetylation. *Carbohydr. Res.* **340**, 2403–2410 (2005).

34. Chung, E. J., Ju, H. W., Park, H. J. & Park, C. H. Three-layered scaffolds for artificial esophagus using poly(caprolactone) nanofibers and silk fibroin: An experimental study in a rat model. *J. Biomed. Mater. Res. - Part A* **103**, 2057–2065 (2015).

35. Shimauchi, H., Nemoto, E., Ishihata, H. & Shimomura, M. Possible functional scaffolds for periodontal regeneration. *Jpn. Dent. Sci. Rev.* **49**, 118–130 (2013).

36. Romn, J., Cabãas, M. V., Pẽa, J. & Vallet-Regí, M. Control of the pore architecture in three-dimensional hydroxyapatite- reinforced hydrogel scaffolds. *Sci. Technol. Adv. Mater.* **12**, (2011).

37. Guo, J. *et al.* Restoration of Critical-Size Defects in the Rabbit Mandible Using Porous Nanohydroxyapatite-Polyamide Scaffolds. *Tissue Eng. Part A* **18**, 1239–1252 (2012).

38. Slepickova Kasalkova, N., Slepicka, P., Kolska, Z. & Svorcik, V. Wettability and Other Surface Properties of Modified Polymers. *Wetting and Wettability* (2015). doi:10.5772/60824

39. Loh, Q. L. & Choong, C. Three-dimensional scaffolds for tissue engineering applications: Role of porosity and pore size. *Tissue Eng. - Part B Rev.* **19**, 485–502 (2013).

40. Alothman, Z. A. A review: Fundamental aspects of silicate mesoporous materials. *Materials (Basel).* **5**, 2874–2902 (2012).

41. Brunauer, S., Emmett, P. H. & Teller, E. Adsorption of Gases in Multimolecular Layers. *J. Am. Chem. Soc.* **60**, 309–319 (1938).

42. Bose, S., Roy, M. & Bandyopadhyay, A. Recent advances in bone tissue engineering scaffolds. *Trends Biotechnol.* **30**, 546–554 (2012).

43. Ashraf, M. U., Hussain, M. A., Bashir, S., Haseeb, M. T. & Hussain, Z. Quince seed hydrogel (glucuronoxylan): Evaluation of stimuli responsive sustained release oral drug delivery system and biomedical properties. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **45**, 455–465 (2018).

44. Kumar, K., Gill, R. S. & Batra, U. Challenges and opportunities for biodegradable magnesium alloy implants. *Mater. Technol.* **33**, 153–172 (2018).

45. Shi, S. *et al.* Bone formation by human postnatal bone marrow stromal stem cells is enhanced by telomerase expression. *Nat. Biotechnol.* **20**, 587–591 (2002).

46. Calabrese, G. *et al.* Bone augmentation after ectopic implantation of a cell-free collagen-hydroxyapatite scaffold in the mouse. *Sci. Rep.* **6**, 1–10 (2016).

47. Reddi, S., Shanmugam, V. P., Tanedjeu, K. S., Kapila, S. & Kapila, R. Effect of buffalo casein-derived novel bioactive peptides on osteoblast differentiation. *Eur. J. Nutr.* **57**, 593–605 (2018).

48. Lian, J. B. & Stein, G. S. Concepts of Osteoblast Growth and Differentiation : Basis for Modulation of Bone Cell Development and Tissue Formation. **3**, 269–305 (1992).

49. Jundt, G., Bergh, K., Termine, J. D. & Schulz, A. I. Osteonectin a differentiation marker of bone cells. *Cell Tissue Res.* **248**, 409–415 (1987).

50. Singh, M., Foster, C. R., Dalal, S. & Singh, K. Osteopontin: Role in extracellular matrix deposition and myocardial remodeling post-MI. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **48**, 538–543 (2010).

51. 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).

52. Giannoudis, P. V, Dinopoulos, H. & Tsiridis, E. Bone substitutes : An update. 20–27 (2005). doi:10.1016/j.injury.2005.07.029

53. JUN JI, a, b XIN TONG, a XIAOFENG HUANG, a JUNFENG ZHANG, c HAIYAN QIN, a, b Q. H. Patient-Derived Human Induced Pluripotent Stem Cells From Gingival Fibroblasts Composited With Defined Nanohydroxyapatite/Chitosan/Gelatin Porous Scaffolds as Potential Bone Graft Substitutes. 106–116 (2016). doi:10.5966/sctm.2015-0166

54. Gritsch, L. *et al.* Chitosan/hydroxyapatite composite bone tissue engineering scaffolds with dual and decoupled therapeutic ion delivery: Copper and strontium. *J. Mater. Chem. B* **7**, 6109–6124 (2019).