



Ratlarda Oluşturulan Kritik Boyutlu Kalvaryal Defektlerde Bakteriyel Selüloz Temelli Hidroksiapatit (BS-HAp) Nanokompozitinin Kemik Oluşumu Üzerine Etkisi

The Effect of Bacterial Cellulose Based Hydroxyapatite (BC-HAp) Nanocomposite on Bone Formation in Critical Sized Calvarial Defects in Rats

Aysan Lektemür Alpan^{1*} , Nazime Mercan Doğan² , Tuğba Hilal Denizli² , Özlem Özmen³

¹Pamukkale Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi, Periodontoloji Anabilim Dalı, Kınıklı Kampüsü, Pamukkale, Denizli, Türkiye

²Pamukkale Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Kınıklı Kampüsü, Denizli, Türkiye

³Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Veterinerlik Bölümü, Patoloji Anabilim Dalı, İstiklal Yerleşkesi, Burdur, Türkiye

Öz

Bu çalışmada, sıçanlarda kritik boyuttaki kalvaryal defektlerde bakteriyel selüloz-hidroksiapatit (BS-HAp) kompozitinin kemik rejenerasyonundaki potansiyelinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. *Komagataibacter xylinus* S4 izolatından elde edilen BS-HAp taramalı elektron mikroskopunda (SEM) incelenerek içeriğindeki Ca ve P iyonlarının yoğunluğu tespit edilmiştir. Ratlarda oluşturulan kalvaryal defektlere elde edilen BS-HAp dondurulup kurutulularak uygulanmıştır. 4. ve 8. haftanın sonunda alınan örnekler histopatolojik olarak incelenmiştir. SEM sonuçlarına göre BS lifleri, ince demetler halinde olup fibril çapı 42,11 nm olarak tespit edilmiştir. HAp, BS pelikülüne dahil olarak içeriğinde yüksek oranda Ca ve P elementleri saptanmıştır. Yapılan in-vivo deneylerin sonunda 4. haftada herhangi bir kemik oluşumuna rastlanmamıştır. BS-HAp grubunda düzgün bağ doku oluşumu gözlenmiştir. 8. haftanın sonunda BS-HAp grubunda biyomateryal komşuluğunda yeni kemik alanları izlenmiştir. *Komagataibacter xylinus* S4 izolatından elde edilen BS-HAp biyomateryal olarak kullanıldığında 8. haftada yeni kemik oluşumunu indüklemiştir.

Anahtar Kelimeler: Bakteriyel selüloz, Biyomateryal, Hidroksiapatit, Kemik rejenerasyonu, Rat

Abstract

This study, it was aimed to evaluate the potential bone regeneration effect of bacterial cellulose-hydroxyapatite (BC-HAp) composite in calvarial defects of critical size in rats. BC-HAp obtained from *Komagataibacter xylinus* S4 isolate was examined under a scanning electron microscope (SEM), and the concentration of Ca and P ions in its content was determined. BC-HAp was freeze-dried and applied to calvarial defects. Samples taken at the end of the 4th and 8th weeks were examined histopathologically. According to SEM results, BC fibers were in thin bundles and the fibril diameter was determined as 42.11 nm. As HAp is included in the BC pellicle, high levels of Ca and P elements were detected in its content. At the end of the in-vivo experiments, no bone formation was found in the 4th week. Uniform connective tissue formation was observed in the BC-HAp group. At the end of the 8th week, new bone areas were observed in the BC-HAp group adjacent to the biomaterial. When BC-HAp obtained from *Komagataibacter xylinus* S4 isolate was used as a biomaterial, it induced new bone formation at 8 weeks.

Keywords: Bacterial cellulose, Biomaterial, Hydroxyapatite, Bone regeneration, Rat

*Sorumlu yazarın e-posta adresi: ysnlpn@gmail.com

Aysan Lektemür Alpan orcid.org/0000-0002-5939-4783

Nazime Mercan Doğan orcid.org/0000-0001-8590-8381

Tuğba Hilal Denizli orcid.org/0000-0003-0200-4948

Özlem Özmen orcid.org/0000-0002-1835-1082



1. Giriş

Diş kaybı, sinüs pnömatizasyonu, periodontal hastalık, fa-siyal ve dentoalveoler travma, odontojenik ve odontojenik olmayan kistler ve tümörler, oral patolojik lezyonlar ve daha birçok durumda alveoler kemik defektleri oluşmaktadır (Tolsunov vd. 2019). Normal anatomik çerçeveyi korumak, boş alanı ortadan kaldırmak, estetik restorasyon ve dental implant yerleştirmek adına, oluşan bu defektlerin rekons-trüksiyonu gerekir. Defektin içini doldurup fiziki bir yapı sağlayan kemik ve kemik yerine geçen materyaller kullanılmaktadır. Bu materyallerin genel ismi “kemik grefti” olarak geçmektedir. Kemik greftleri; osteogenezisi, osteoindüksiyonu ve osteokondüksiyonu aktive etmek için kullanılmaktadır (Nandi vd. 2010). Günümüzde kalsiyum fosfat (trikal-siyum fosfat ve hidroksiapatit), kalsiyum sülfat ve biyoaktif cam gibi seramik bazlı malzemeler, yeni mineralize doku ve greft materyali arasında yakın bağ oluşturması nedeniyle sıklıkla kullanılmaktadır (Boccaccini ve Blaker 2005, La-urencin vd. 2006). Özellikle hidroksiapatit (HAp) kemiğe benzer yapısı ve kompozisyonu dolayısıyla kemik rejeneras-yonu uygulamalarında yaygın kullanımı (Wang vd. 2007) onun osteojenik olmayan osteokondüksiyon özelliğinden kaynaklanmaktadır. Sentetik HAp, osteointegrasyon oranı-nı arttırmak için implant çevresinde başarıyla kullanılmıştır (Moore vd. 2001).

Günümüzde farklı nanokompozit türlerinin (organik-inor-ganik, inorganik - inorganik ve biyo-organik nano malze-meler), ilaç iletimi, kanser tedavisi, tıbbi görüntüleme ve kimyasal algılama gibi biyomedikal alanlarda kullanımlarına izin verilmiştir (Bramhill vd. 2017). Nanokompozit geliştirmede yoğun olarak araştırılan bir polimer olan bakteriyel selüloz (BS), su tutma kapasitesi yüksek olduğu için yaraya nemli bir ortam sağlar ve yaranın iyileşmesini destekler. Yü-zeyindeki hidroksil gruplarının fazlalığı nedeniyle, üretim sırasında ya da üretildikten sonra kolaylıkla modifiye edilebilmekte ve özellikle yaralarda mikroorganizma gelişimini engellenmek amacıyla antimikrobiyal özellikler kazandırıl-maktadır (Czaja vd. 2006, Oliveira vd. 2016). BS lifleri ke-mik kollajenine benzer bir yapıya sahiptir bu yüzden kemik rejenerasyonu için kullanımı alanının da yapılan araştırmalar son yıllarda artmıştır (Vadaye vd. 2018). BS’den elde edilen membranlar, kritik ve kritik olmayan kemik defektlerinin rekonstrüksiyonu için bariyer membran olarak kullanılmış-tır (Lee vd. 2015). BS’nin üretim miktarı, kompozisyonu ve buna bağlı olarak biyolojik özellikleri de türe spesifiktir ve bu hem teknolojik hem de bilimsel amaçlar için dikkate alınması gereken önemli bir değişkendir. Modifiye edilme-

miş selülozun antibakteriyel ve antibiyofilm etkisi ilk kez ye-rel izolatımız olan *Komagataibacter xylinus* S4 (*K. xylinus*) ile yapılan çalışmamızda gösterilmiştir (Top vd. 2021). BS’lerin özellikleri ve HAp’ın etkili osteojenik yeteneği ve gücü göz önüne alındığında, bunları kemik rejenerasyonu için hem biyo hem de mekanik özelliklere sahip hibrit yapı iskelele-rine entegre etmek umut verici bir strateji olarak görülmek-tedir (Liu vd. 2021).

Piyasada kullanılan çok sayıda greft materyallerin pahalı ol-ması ya da kolaylıkla ulaşılamaması gibi dezavantajlarından dolayı BS kaynaklı yeni tıbbi malzemelerin üretimi ve selü-lozun alternatif biyo-materyal potansiyeline ilgiyi çekmiştir. Literatürde *K. xylinus* S4 suşundan elde edilen BS-HAp’ın kemik rejenerasyonuna etkisini değerlendiren bir çalış-ma bulunmamaktadır. Bu bağlamda sunulan makale, BS-HAp’tan elde edilen materyalin kemik rejenerasyonuna olan etkisinin değerlendirildiği ilk çalışmadır. BS’ nin fizikokim-yasal özelliklerine ve HA’nın kemik rejenerasyonuna önemli katılımına dayanarak, bu çalışmanın amacı, ratlarda oluşt-urulan kritik boyutlu kalvaryal defekt modelinde *K. xylinus* S4 suşundan elde edilen BS-HAp nanokompozitinin kemik rejenerasyonu potansiyelini değerlendirmektir.

2. Gereç ve Yöntemler

2.1. Bakteriyel Selüloz Üretimi

Çalışmada, selüloz ürettiği bilinen *Komagataibacter xylinus* S4 yerel izolat kullanılmıştır (Top vd. 2021). Bakteri, Pa-mukkale Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Bakteriyoloji Laboratuvarı kültür stoklarından temin edilmiştir. BS üre-timi için M1A05P5 besiyeri (glukoz 10 gr/l, yeast extract 10 gr/l, pepton 7 gr/l, asetik asit 1.5 gr/l ve 10 ml/l etanol) kullanılmıştır (Cakar vd. 2014). Kültür 30°C’de 3 ile 4 gün inkübe edilmiş ve yüzeyde oluşan selüloz pelikülü nazıkçe alınmış ve distile su ile ön yıkama işlemi yapılmıştır. Daha sonra besiyerinden gelebilecek tüm kalıntıların uzaklaştırıl-ması için selüloz pelikülü 0,5 M NaOH içerisinde 90°C’de 30dk bekletilmiştir. Bu işlem iki kez tekrarlandıktan sonra BS, NaOH ile muamele edilmiştir. Son olarak, nötr pH’ya ulaşana dek distile su ile yıkanan BS, analiz için buzdolabın-da saklanmıştır.

2.2. Hidroksiapatit Sentezi

Hidroksi apatit (HAp) sentezi, Fosfat ve Ca öncülleri olarak $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ve $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ çözeltileri kullanılarak in vitro kimyasal çökeltim metodu ile gerçekleştirilmiştir. Bunun için öncelikli olarak 0,6 M $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ve 1,0 M $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ çözeltilerinin pH’ları, konsantre NH_4OH

ile 10,2'ye ayarlanmıştır. Fosfat içeren çözelti, kalsiyum içeren çözeltiye 70 °C'de damlatılarak ilave edilmiş ve 48 saat boyunca oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Oluşan çökelti (HAp partikülleri) toplanmış ve 4 kere distile su ile yıkanmıştır. 60°C'de 24 saat kurutulan HAp partikülleri öğütülerek toz haline getirilmiştir (Grande vd. 2009).

2.3. Bakteriyel Selüloz-Hidroksiapatit kompozit (BS-HAp) Sentezi

Homojen biyomimik mineralizasyon reaksiyonunun gerçekleştirilmesi için bakteriyel selüloz 0,1 M CaCl_2 çözeltisinde 37°C'de 3 gün inkübe edilerek aktifleştirildi. Daha sonra HAp mineralizasyonunu başlatmak için BS, 1,5xSBF'de 37°C'de 7 ile 14 gün inkübe edildi. Elde edilen BS-HAp kompoziti liyofilize edildi (Hong vd. 2006). Oluşturulan kafa defektine yerleştirilmek üzere dondurulup kurutuldu.

Sentetik Vücut Sıvısı (SBF); NaCl (99.5%), NaHCO_3 (99.5%), KCl (99.0%), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (99.5%), $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (99.0%), Na_2SO_4 , $(\text{CH}_2\text{OH})_3\text{CNH}_2$ (99.5%), $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (99.0%) ve HCl gibi kimyasallardan oluşmaktadır. 960 mL distile su içerisine sırası ile 6,5456 gr NaCl; 2,2682 gr NaHCO_3 ; 0,373 gr KCl; 0,1419 gr $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ eklendikten sonra sıcaklık 37°C'ye çıkarıldı. 0,3049 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 9 mL 1M HCl; 0,3675 gr $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 0,071 gr Na_2SO_4 ; 6,057 gr $(\text{CH}_2\text{OH})_3\text{CNH}_2$ eklendikten sonra 30 mL 1M HCl kullanılarak pH 7,4'e ayarlandı. Her bir kimyasal distile su içerisine eklendiğinde üçer dakika karıştırıldı. Hazırlanan SBF, BS-HAp sentezinde kullanılmak üzere +4 C°'de muhafaza edildi (Tas 2000).

2.4. Taramalı Elektron Mikroskobu Görüntüleri (SEM görüntüleme)

BS-HAp materyalinin morfolojik yapısı, Pamukkale Üniversitesi İleri Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde (Denizli) Taramalı Elektron Mikroskop (SEM) analizi ile incelenmiştir.

2.5. Hayvan Deneyi

Bu araştırma, Pamukkale Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (PAUHDEK-2018/19). Çalışmamızda altı adet erkek 320-400 gr Wistar rat (2-3 aylık) kullanılmıştır. Tüm hayvanlar 22 ± 1 °C'de 12 saatlik aydınlık/karanlık döngüsünde kafeslerde tutulmuştur. Ratlar, ötenaziye kadar yeteri kadar kemirgen yemi ve su almıştır. Deneyler Pamukkale Üniversitesi Deneysel Cerrahi Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde gerçekleştirilmiştir.

2.5.1 Cerrahi İşlemler

Çalışmada tüm işlemler steril ortamda gerçekleştirilmiş olup hayvanların anestezisi intramüsküler enjeksiyon yöntemi ile 10 mg/kg ksilazin hidroklorür (Rompun 2%, Bayer, İstanbul, Turkey) ve 50 mg/kg ketamin hidroklorür (Ketalar, Eczacıbaşı-Warner Lambert, İstanbul, Turkey) kullanılarak yapılmıştır. Genel anesteziyi takiben ratların kafa bölgesi tıraş edilip povidone iyot ile kafa derisi dezenfekte edilmiştir. Rat kafa derisinde kalvaryal kemiğin bitimine kadar bir kesi atılarak kafa derisi ve periost, kalvaryadan ayrılmıştır. Bunu takiben ratların kalvaryalarında parietal kemiğin sağında ve solunda 5mm'lik defektler trepan frez ve steril salin soğutması ile açılmıştır (Alpan vd. 2016). Sol defekt bölgesine, BS-HAp'tan oluşturulan greft materyali defektin çapı kadar hazırlanıp yerleştirilmiştir. Sağ defekt ise boş bırakılmıştır (Şekil 1). Daha sonra periost greft stabilizasyonu ve defekt beslenmesini sağlamak için 5-0 poliglaktin 910 (Vikril Jonson&Johnson/ethicon) ile sütüre edilmiştir. Kafa derisi ise 4-0 ipek sütür ile suture edilmiştir. Postoperatif olarak ratlara 50 mg/kg Seftriakson (Cephaxon-Toprak) *i.m.* ve 4 mg/kg Carprofen (Rimadyl- Pfizer) 20 cc flakon 3 gün süre ile subkütanöz olarak verilmiştir. Ratlar, 4 ve 8 haftalık iyileşme periyodundan sonra 200 mg/kg *i.p.* sodyum pentotal enjeksiyonu (Petotal, Abbott, ABD) kullanılarak sakrifiye edilmiştir.

2.5.2. Histolojik Analizler

Histopatolojik incelemeler için defekt alanlarından alınan örnekler %10 nötr formalin ile sabitlendi. 2 günlük fiksasyondan sonra numuneler EDTA (etilendiamintetraasetik asit) (0,1 M) solüsyonunda 1 hafta süreyle dekalsifiye edildi.



Şekil 1. Rat kalvaryasındaki çalışma gruplarının görüntüsü. Sol defekt bölgesinde BS-HAp, sağ defekt bölgesi boş bırakılmıştır.

Ardından doku örnekleri otomatik doku işleme ekipmanı (Leica ASP300S, Leica Microsystem, Nussloch, Almanya) tarafından rutin olarak işlendi. Parafin bloklarına gömülmüş örneklerden 5 mikron kalınlığında seri kesitler, tam otomatik döner mikrotom (Leica 2155, Leica Microsystem, Nussloch, Almanya) ile alındı. Daha sonra histopatolojik incelemeler için Hematoxylin-Eosin (HE) ile boyanan kesitler ışık mikroskopunda incelendi. Defekt alanındaki kemik iyileşme bölgesi aşağıdaki gibi puanlandı. Histomorfometrik parametreler ve hesaplamalarda;

Toplam iyileşme alanı (THA; mm²), defekt kapanma oranı (DCR;%), yeni oluşan kemik alanı (NFB; mm²) ve artık materyal alanı (RMA; mm²) hesaplandı (Jung vd. 2015). Lezyon bölgesindeki osteoblast ve osteoklastların sayısı 1,23 mm² alanda (400 X büyütme) sayıldı (Araujo vd. 2015). Morfometrik analizler ImageJ (Ulusal Sağlık Enstitüleri, Bethesda MD) kullanılarak yapıldı.

2.6. İstatistiksel Analiz

Çalışmanın verileri SPSS ver 21 ile değerlendirilmiştir. Grupların karşılaştırılması Mann-Whitney U testi ile gerçekleştirilmiştir. 4. Hafta ve 8. Hafta verileri ise Wilcoxon testi ile değerlendirilmiştir. Anlamlılık düzeyi 0.05 olarak alınmıştır.

3. Bulgular ve Tartışma

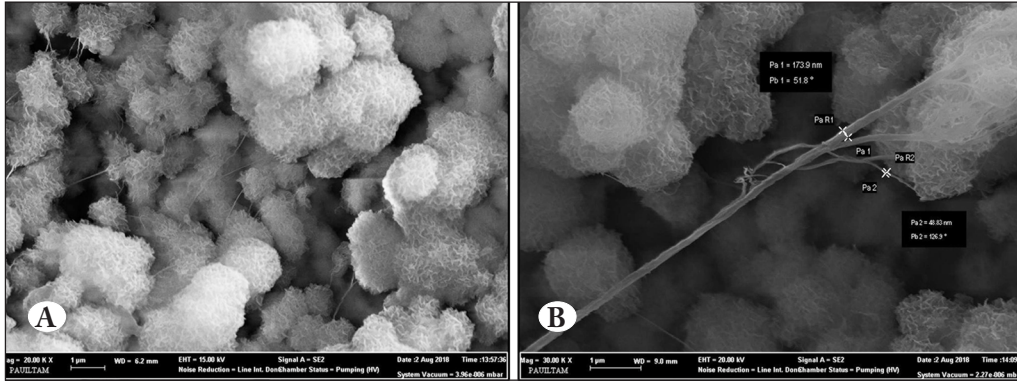
Bu çalışmada, yerel bir izolat olan *K. Xylinus S4* ile üretilen BS-HAp nanokompozitinin, ratlarda oluşturulan kalvaryal defektler üzerine olan kemik rejenerasyon potansiyeli değerlendirilmiştir. Farklı analizlerde gözlemlenen sonuçlar, BS-HAp nanokompozitinin, ratlarda oluşturulan kritik boyutlu defektlerde 8. haftada kemik rejenerasyonunu desteklediği sonucuna varılmıştır. BS; *Azotobacter*, *Pseudomonas*, *Salmonella* and *Sarcina ventriculi*, *Pseudomonas*, *Salmonella* ve *Sarcina ventriculi* gibi belirli bakteri türleri tarafından hücre dışı olarak sentezlenen bir materyaldir. Bunlar arasında en etkili ve dolayısıyla selüloz üretimi için en çok kullanılan bakteriler *Gluconacetobacter xylinum*, *Gluconacetobacter hansenii* ve *Gluconacetobacter pasteurianus*'tur (Torres vd. 2019). *Komagataeibacter* cinsinin selüloz üretme kabiliyeti ile dikkat çekici olduğu bulunmuştur (Wang vd. 2018).

Hem saflığı hem de yüksek derecede biyoyoumluluk özelliği ile bakteriyel selüloz, kemik doku mühendisliği için potansiyel bir iskele görevi görmektedir. Özellikle toksik olmaması ve yüksek şişme yeteneğinden dolayı BS, biyomedikal uygulamalarda doğal ve sentetik polimerler arasında ön plana çıkmıştır (Svensson vd. 2005). Kollajen ve

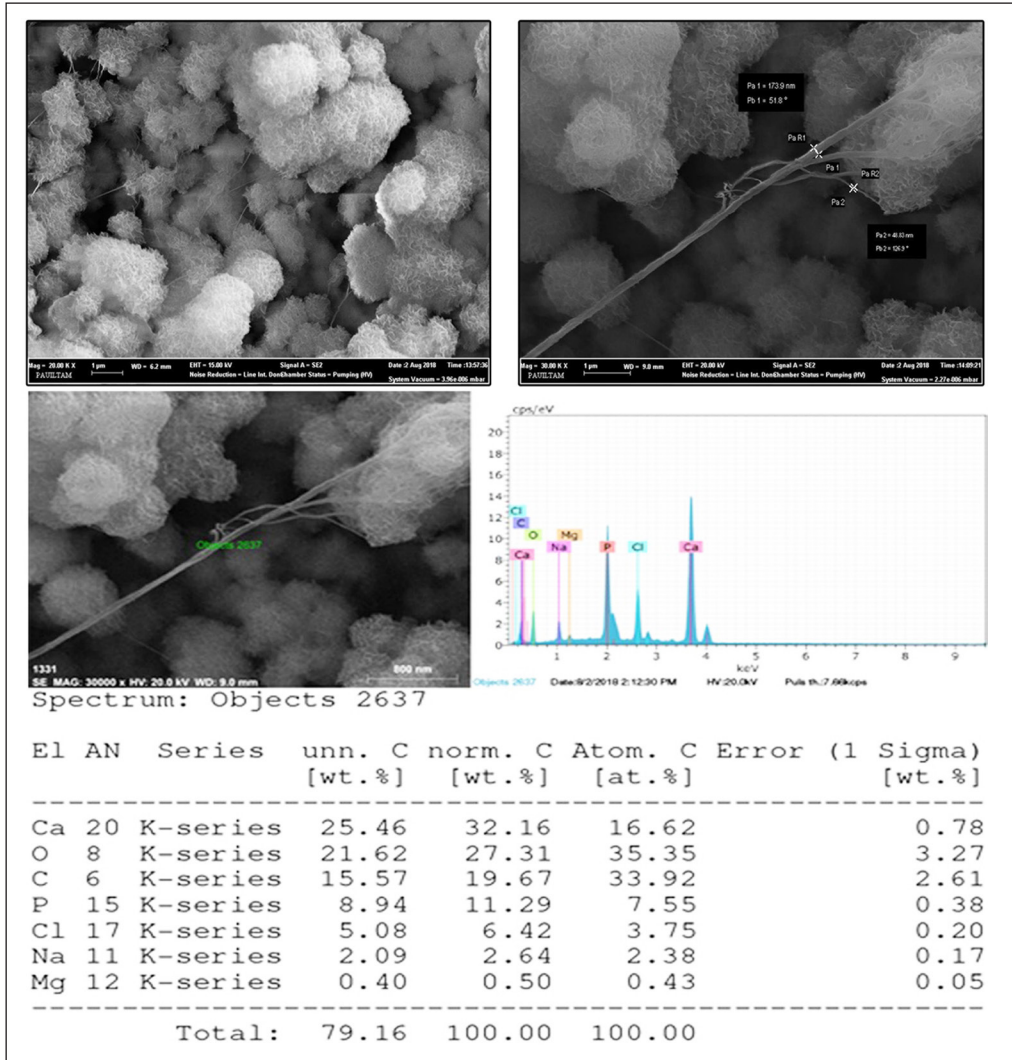
jelatin ile kıyaslandığında, BS hayvansal kaynaklı olmadığı için alerjik de değildir (Fontana vd. 1990). BS, ağısı ultra ince fiber yapısı nedeniyle önemli mekanik özellikler gösterir. BS'nin mekanik özellikleri, bitki selülozundan daha güçlüdür (Wahid vd. 2021). Yapay HAp, kemiğin doğal HAp'ı ile aynı kimyasal ve kristal yapıya sahiptir ve kemik rekonstrüksiyonu için kullanılmaktadır. Bu bağlamda, çeşitli çalışmalar, herhangi bir toksisite olmaksızın osteoblast hücrelerinin çoğalmasını arttırarak kemik onarımı için BS ile HAp'i araştırmıştır (Favi vd. 2016, Grande vd. 2009).

BS ve BS-HAp'in morfolojik görünümü SEM ile incelenmiş ve mikrograflar Şekil 2'de verilmiştir. BS lifleri, ince demetler halinde olup fibril çapı 42,11 nm'dir. Farklı ortamlardan elde edilen BS'nin morfolojik görünümü ve fibriller yapısı farklılık gösterir. Örneğin Jung ve arkadaşlarına (Jung vd. 2010)'na göre BS, ultra ince selüloz fibrillerinden oluşan retiküler yapıdadır ve bu fibrillerin çapı gliserollü ortamda yaklaşık 65-80 nm iken, glukozlu ortamda 75-90 nm'dir. Gliserol ve melas içeren ortamdan elde edilen selülozun fibril çapı ise 35-70 nm'dir (Vazquez vd. 2013). *Acetobacter xylinum* selülozik fibrilleri ise 128-207 nm arasında değişmektedir (Gayathry ve Gopalaswamy 2014). Çalışmamızın SEM görüntülerine göre HAp, küresel globüler yapıdadır (Şekil 3). BS-HAp kompozitinde ise, BS liflerinin HAp küresel globüllerin üzerine homojen olarak kapladığı ve bu küresel globüllerin kümeler halinde olduğu görülmüştür. İnce selüloz fibrillerin daha kalın demetler (173 nm) halinde olması BS ve HAp arasında güçlü bağlanmayı göstermektedir. Ayrıca BS-HAp kompozitinin SEM-EDS analizi, HAp'nin kimyasal yapısında bulunan P ve Ca elementlerin yoğunluğu dikkati çekmiştir. Bu elementlerin varlığı, HAp'in BS pelikülüne dahil olduğunu doğrulamıştır (Şekil 3).

Çalışmamızda BS ile HAp entegre edilerek, kemik rejenerasyonunda kullanılmak üzere potansiyel bir biyomateryal elde edilmeye çalışılmıştır. Araştırmalar, BS bazlı hidrojel yapı iskelelerinin doku rejenerasyonu uygulaması için potansiyel bir biyomateryal haline gelebileceğini göstermiştir (Jiang vd. 2018). BS biyoyoumlu bir biyopolimerdir ve yüksek kristallik, ultra ince ağ yapısı ve yüksek su emme kabiliyetine sahiptir. BS'nin bu önemli yapısal ve fonksiyonel özellikleri, kas-iskelet/doku mühendisliği/kemik biyomühendisliği uygulamalarında önemini artırmaktadır (Basu vd. 2018). Betatrikalsiyum fosfat (β -TCP), okta-kalsiyum fosfat (OCP) ve HAp gibi biyoaktif kalsiyum fosfat dolgu maddeleri, biyomateryalin osteoiletim ve osteoindüksiyon özelliklerini iyileştirir (Muthukumar vd. 2016) ayrıca HAp



Şekil 2. Bakteriyel sellüloz (A) ve Hidroksiapatitin (B) SEM görünümü.



Şekil 3. BS-HAp kompozitinin SEM ve SEM-EDS analizi.

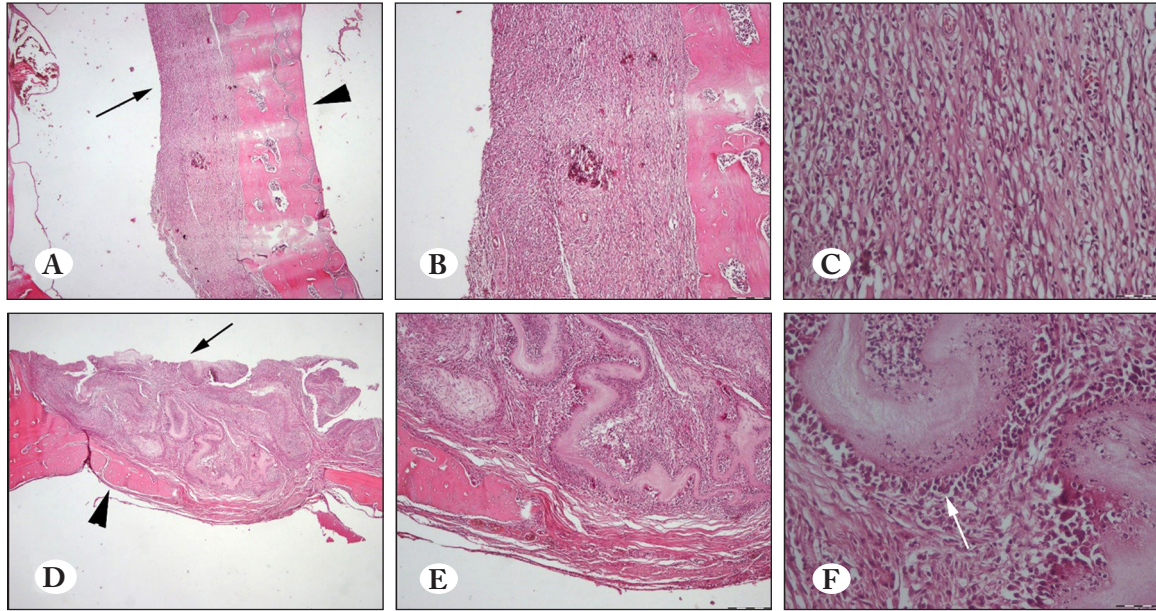
kemiğin ana bileşenlerinden biri olduğundan çalışmamızda HAp kullanımı tercih edilmiştir.

Çalışmamızda 4 haftanın sonunda dekalsifikasyon sonrası ilk 3 ratın kafatasının temporal bölgesinde oluşan lezyonlardan kesitler alındı. BS-HAp uygulanan bölgede düzgün

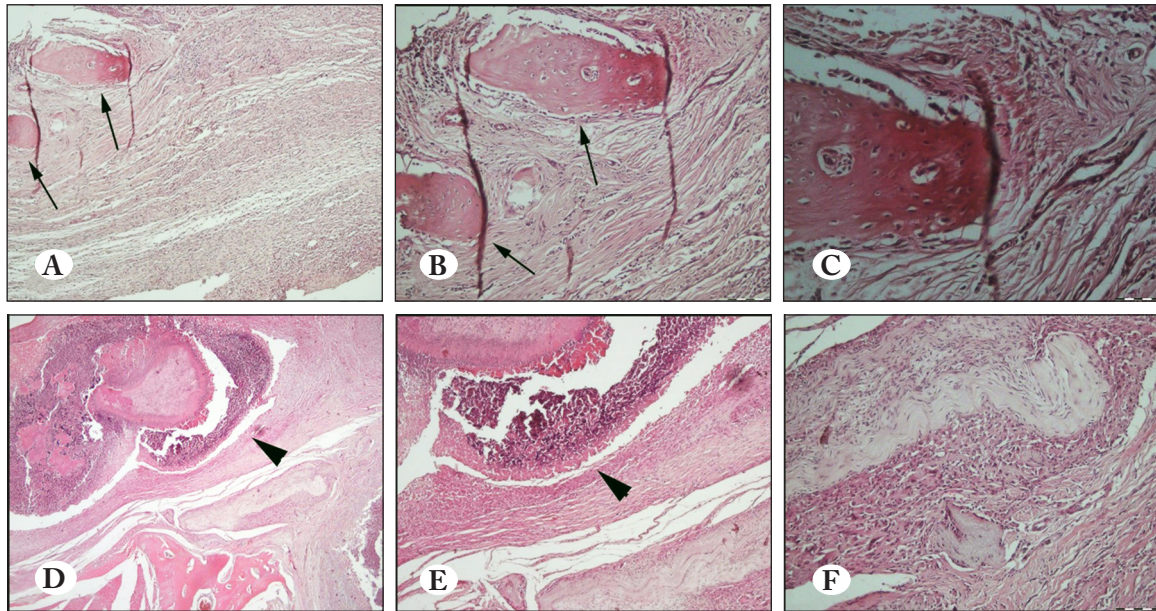
bir bağ dokusu oluşumu görülürken, boş defekt bölgesinde aşırı enflamasyon izlendi (Şekil 4). Boş defekt grubuna göre BS-HAp grubunda artmış osteoblast sayısı ve azalmış osteoklast sayısı saptandı (Çizelge 1). Bu aşamada her iki grupta da kemikleşme saptanmadı. 8 haftalık örneklerde ise BS-HAp grubunda yeni oluşan kemik adacıkları görülür-

ken, boş defekt bölgesinde, belirgin bir iltihabi reaksiyon görüldü. BS-HAp uygulanan defekt alanlarının çevresinden kemik oluşumu ve çok sayıda kemikli adacık izlendi. Boş defekt bölgesinde defekt sınır alanından, defekt merkezine

doğru minimal kemik oluşumu görüldü (Şekil 5). 8. haftada BS-HAp grubunda 4. haftaya göre anlamlı şekilde artmış osteoblast sayısı saptandı (Çizelge 1).



Şekil 4. 4. hafta histopatolojik kesit görüntüleri HE boyama. BS-HAp grubunda (A, B, C) defektli kısmının altındaki normal kemik alanının (ok başı) üzerindeki defekt yerinde yeni oluşan bağ dokusu alanı (ok). Boş defekt grubunda (D, E, F) belirgin enflamatuvar reaksiyon (ok), defekt altında normal kemik dokusu (ok başı), enflamatuvar reaksiyon (beyaz ok), HE, Ölçek çubukları= 200,100, 40µm (sırasıyla üstten alt sıraya).



Şekil 5. 8. hafta histopatolojik kesit görüntüleri HE boyama. BS-HAp grubunda bağ dokusunda yeni oluşan kemik dokusu (A, B, C) (oklar), Boş defekt grubunda (D, E, F) çok şiddetli enflamatuvar reaksiyon (ok başları), HE, Scale çubukları= 200,100, 40µm (dan sırasıyla üstten alt sıraya).

Çizelge 1. Gruplar arasında histomorfometrik sonuçların karşılaştırılması.

Toplam iyileşme alanı (mm ²)	BS-HAp 4. hafta	8.73±0.47 ^a
	Boş defekt 4. hafta	6.01±0.42 ^b
	BS-HAp 8. hafta	18.99±1.92 ^c
	Boş defekt 8. hafta	11.70±1.18 ^d
Defekt kapanma oranı (%)	BS-HAp 4. hafta	72.26±1.05 ^a
	Boş defekt 4. hafta	63.56±2.25 ^b
	BS-HAp 8. hafta	84.90±1.63 ^c
	Boş defekt 8. hafta	74.89±2.45 ^b
Yeni oluşmuş kemik alanı (mm ²)	BS-HAp 4. hafta	6.76±0.38 ^a
	Boş defekt 4. hafta	3.99±0.79 ^b
	BS-HAp 8. hafta	24.88±1.53 ^c
	Boş defekt 8. hafta	10.81±1.21 ^d
Osteoklast sayısı	BS-HAp 4. hafta	8.66±0.57 ^a
	Boş defekt 4. hafta	11.33±0.57 ^b
	BS-HAp 8. hafta	11.66±1.57 ^b
	Boş defekt 8. hafta	14.33±0.57 ^c
Osteoblast sayısı	BS-HAp 4. hafta	10.66±0.57 ^a
	Boş defekt 4. hafta	6.00±1.00 ^b
	BS-HAp 8. hafta	23.00±1.00 ^c
	Boş defekt 8. hafta	9.00±2.00 ^b

*: Aynı kolonda aynı parametreye ait gruplardaki farklı harfler ortalamalar arasındaki istatistiksel farkı belirtir. p<0,05

**: Değerler ortalama ± standart sapma olarak ifade edilmiştir

Yapılan bir çalışmada BS, pelikülleri simüle edilmiş vücut sıvısına daldırılarak HAp ile kaplanmıştır. BS zarının yüzeyinde HAp küreleri oluşturulmuş ve daha sonra sıçanlarda 4-8 hafta boyunca kalvaryal defektte kemik oluşumu için kullanılmıştır (Ahn vd. 2015). 4. hafta sonunda BS ve BS-HAp gruplarında defekt alanında fibröz bağ dokusu tespit edilmiştir. İki grupta da yeni kemik oluşumu ve bu alanlarda osteoblast aktivitesi gözlenmiştir. Aktif osteoblastlar BS-HAp grubunda BS grubundan daha fazla gözlenmiştir. 8. haftada ise defekt marjinde yeni kemik oluşumu 4. haftaya göre artmış ve BS-HAp grubunda BS grubuna göre yeni kemik oluşumu daha fazla gözlenmiştir. İki grupta da enflamatuvar reaksiyon gözlenmemiştir. Bizim çalışmamızda BS-HAp etkinliği boş defekt grubuyla karşılaştırılmıştır. Yukarıdaki çalışmadan farklı olarak çalışmamızda 4. haftanın sonunda iki grupta da kemikleşme saptanmamıştır ve enflamatuvar reaksiyon saptanmıştır. 8. haftanın sonunda ise BS-HAp grubunda defekt çevresinde kemik oluşumu izlenmiştir (Çizelge 1). Atila ve arkadaşları (Atila vd. 2019), kemik dokusu mühendisliği için ATCC 10245 *Gluconacetobacter xylinum* ile üretilen BC/jelatin/bor katkılı HAp kompozit materyali *in-vitro* olarak değerlendirmişler. Oluşturulan materyal yaklaşık %68-80 oranında iyi gözeneklilik göstermiştir ve kemik dokusunun desteklenmesi ve yenilenmesi için uygun olan SaOs-2 hücre hattında uygulandığında ALP aktivitesinin istatistiksel olarak arttırmıştır. Pigossi ve diğerleri (Pigossi vd. 2015), osteojen büyüme peptidi (OGP) içeren ve içermeyen bir BS-HAp kompozitini farelerde oluşturulan kalvaryal defekt modelinde membran olarak uygulamışlar ve kemik onarım potansiyelini ALPL, RUNX2, TNFRSF11B, SPP1, BGLAP ve VEGF genlerinin ekspresyonu yoluyla araştırmışlardır. Araştırmacılar çalışmamızla uyumlu olarak 4. haftada defekt kenarlarında tüm gruplarda fibröz bağ dokusu oluşumu gözlemişler. Ayrıca orta derecede bir enflamatuvar reaksiyon tüm gruplarda gözlenmiştir. 60. ve 90. günde ise hiçbir grupta enflamatuvar reaksiyon gözlenmemiştir. Bizim çalışmamızda 4. haftada BS-HAp grubunda düzgün bir bağ doku oluşumu tespit edilmişken boş defekt grubunda yaygın enflamasyon gözlenmiştir. Boş defekt grubunda 8. haftada hala enflamatu-

cetobacter xylinum ile üretilen BC/jelatin/bor katkılı HAp kompozit materyali *in-vitro* olarak değerlendirmişler. Oluşturulan materyal yaklaşık %68-80 oranında iyi gözeneklilik göstermiştir ve kemik dokusunun desteklenmesi ve yenilenmesi için uygun olan SaOs-2 hücre hattında uygulandığında ALP aktivitesinin istatistiksel olarak arttırmıştır. Pigossi ve diğerleri (Pigossi vd. 2015), osteojen büyüme peptidi (OGP) içeren ve içermeyen bir BS-HAp kompozitini farelerde oluşturulan kalvaryal defekt modelinde membran olarak uygulamışlar ve kemik onarım potansiyelini ALPL, RUNX2, TNFRSF11B, SPP1, BGLAP ve VEGF genlerinin ekspresyonu yoluyla araştırmışlardır. Araştırmacılar çalışmamızla uyumlu olarak 4. haftada defekt kenarlarında tüm gruplarda fibröz bağ dokusu oluşumu gözlemişler. Ayrıca orta derecede bir enflamatuvar reaksiyon tüm gruplarda gözlenmiştir. 60. ve 90. günde ise hiçbir grupta enflamatuvar reaksiyon gözlenmemiştir. Bizim çalışmamızda 4. haftada BS-HAp grubunda düzgün bir bağ doku oluşumu tespit edilmişken boş defekt grubunda yaygın enflamasyon gözlenmiştir. Boş defekt grubunda 8. haftada hala enflamatu-

var reaksiyon gözlenirken BS-HAp grubunda enflamasyon gözlenmemiştir. Çalışmamızdan farklı olarak yukarıdaki çalışmada 4. haftada yeni kemik oluşumu gözlenmişken, bizim çalışmamızda 8. haftada BS-HAp grubunda yeni kemik oluşumu gözlemledik. Bunun nedeni farklı bakterilerden üretilen BS'lerin farklı mekanik özelliklerinden kaynaklanıyor olabilir. Ayrıca çalışılan deney hayvanlarının farklılığı ve rejenerasyon kapasitelerinin değişikliğinden kaynaklanabilir.

4. Sonuçlar ve Öneriler

Sonuç olarak, kemik rejenerasyonu düşünüldüğünde, BS-HAp'tan elde ettiğimiz biyomateryal kritik boyuttaki kemik defektlerinde kemik rejenerasyonu için 8. haftada etkili bulundu. Çalışmamızın ön çalışma niteliğinde olmasından dolayı yapılan analizler sınırlı kalmıştır. *K. Xylinus S4* ile üretilen BS-HAp nanokompozitinin kemik rejenerasyonu üzerine etkilerinin daha kapsamlı araştırılabilmesi için daha fazla sayıda deney hayvanı ile farklı zaman periyotlarında çalışılması, sonuçların immünohistokimyasal ve mikro-BT analizleri ile desteklenmesi gerekmektedir.

Çıkar Çatışması Beyanı: Yazarlar, bu makale ile ilgili olarak başka kişiler ve/veya kurumlar arasında çıkar çatışması olmadığını beyan etmektedir.

Teşekkür: Yazarlar bu çalışmaya katkısı olan Burak TOP'a teşekkür etmektedir.

Yazarların Katkısı: A.L.A.: Dizayn, hayvan deneyleri, metodoloji, veri analizi, orijinal taslak, yazım; N.M.D.: Dizayn, in-vitro üretim, metodoloji, son değerlendirme; T.H.D.: Hayvan deneyleri, laboratuvar çalışması; Ö.Ö.: Histopatolojik incelemeler, veri analizi

Araştırma ve Yayın Etiği Beyanı

Yapılan çalışmada araştırma ve yayın etiğine uyulmuştur.

5. Kaynaklar

Ahn, S. J., Shin, Y. M., Kim, S. E., Jeong, S. I., Jeong, J. O., Park, J. S., Gwon, H. J., Seo, D. E., Nho, Y. C., Kang, S. S., Kim, C. Y., Huh, J. B., and Lim, Y. M. 2015. Characterization of hydroxyapatite-coated bacterial cellulose scaffold for bone tissue engineering. *Biotechnol. Bioprocess Eng* 20(5): 948-955. DOI:10.1007/s12257-015-0176-z

Alpan, A. L., Toker, H., and Ozer, H. 2016. Ozone Therapy Enhances Osseous Healing in Rats With Diabetes With Calvarial Defects: A Morphometric and Immunohistochemical Study. *J Periodontol*, 87(8): 982-989. DOI:10.1902/jop.2016.160009

Araujo, A. S., Fernandes, A. B., Maciel, J. V., Netto Jde, N., and Bolognese, A. M. 2015. New methodology for evaluating osteoclastic activity induced by orthodontic load. *J Appl Oral Sci*, 23(1): 19-25. DOI:10.1590/1678-775720140351

Atila, D., Karatas, A., Evcin, A., Keskin, D., and Tezcaner, A. 2019. Bacterial cellulose-reinforced boron-doped hydroxyapatite/gelatin scaffolds for bone tissue engineering. *Cellulose*, 26(18): 9765-9785. DOI:10.1007/s10570-019-02741-1

Basu, P., Saha, N., Alexandrova, R., Andonova-Lilova, B., Georgieva, M., Miloshev, G., and Saha, P. 2018. Biocompatibility and Biological Efficiency of Inorganic Calcium Filled Bacterial Cellulose Based Hydrogel Scaffolds for Bone Bioengineering. *Int J Mol Sci*, 19(12). DOI:10.3390/ijms19123980

Boccaccini, A. R., and Blaker, J. J. 2005. Bioactive composite materials for tissue engineering scaffolds. *Expert Rev Med Devices*, 2(3): 303-317. DOI:10.1586/17434440.2.3.303

Bramhill, J., Ross, S., and Ross, G. 2017. Bioactive Nanocomposites for Tissue Repair and Regeneration: A Review. *Int J Environ Res Public Health*, 14(1). DOI:10.3390/ijerph14010066

Cakar, F., Kati, A., Ozer, I., Demirbag, D. D., Sahin, F., and Aytekin, A. O. 2014. Newly developed medium and strategy for bacterial cellulose production. *Biochem. Eng. J.*, 92: 35-40. DOI:10.1016/j.bej.2014.07.002

Czaja, W., Krystynowicz, A., Bielecki, S., and Brown, R. M., Jr. 2006. Microbial cellulose--the natural power to heal wounds. *Biomaterials*, 27(2): 145-151. DOI:10.1016/j.biomaterials.2005.07.035

de Oliveira Barud, H. G., da Silva, R. R., da Silva Barud, H., Tercjak, A., Gutierrez, J., Lustri, W. R., de Oliveira, O. B. J., and Ribeiro, S. J. L. 2016. A multipurpose natural and renewable polymer in medical applications: Bacterial cellulose. *Carbohydr Polym*, 153: 406-420. DOI:10.1016/j.carbpol.2016.07.059

Favi, P. M., Ospina, S. P., Kachole, M., Gao, M., Atehortua, L., and Webster, T. J. 2016. Preparation and characterization of biodegradable nano hydroxyapatite-bacterial cellulose composites with well-defined honeycomb pore arrays for bone tissue engineering applications. *Cellulose*, 23(2): 1263-1282. DOI:10.1007/s10570-016-0867-4

Fontana, J. D., Desouza, A. M., Fontana, C. K., Torriani, I. L., Moreschi, J. C., Gallotti, B. J., Desouza, S. J., Narcisco, G. P., Bichara, J. A., and Farah, L. F. X. 1990. Acetobacter Cellulose Pellicle as a Temporary Skin Substitute. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 24(5): 253-264. DOI:10.1007/Bf02920250

Gayathry, G., and Gopalaswamy, G. 2014. Production and characterisation of microbial cellulosic fibre from *Acetobacter xylinum*. *IJFTR*, 39(1):93-96.

- Grande, C. J., Torres, F. G., Gomez, C. M., and Bano, M. C. 2009. Nanocomposites of bacterial cellulose/hydroxyapatite for biomedical applications. *Acta Biomater.*, 5(5):1605-1615. DOI:10.1016/j.actbio.2009.01.022
- Hong L., W. Y. L., Jia S.R., Huang Y., Gao C., Wan Y.Z. 2006. Hydroxyapatite/bacterial cellulose composites synthesized via a biomimetic route. *Mater. Lett.*, 60(13-14):1710-1713. DOI:10.1016/j.matlet.2005.12.004
- Jiang, P., Ran, J., Yan, P., Zheng, L., Shen, X., and Tong, H. 2018. Rational design of a high-strength bone scaffold platform based on in situ hybridization of bacterial cellulose/nano-hydroxyapatite framework and silk fibroin reinforcing phase. *J Biomater Sci Polym Ed*, 29(2): 107-124. DOI:10.1080/09205063.2017.1403149
- Jung, H. I., Lee, O. M., Jeong, J. H., Jeon, Y. D., Park, K. H., Kim, H. S., An, W. G., and Son, H. J. 2010. Production and Characterization of Cellulose by *Acetobacter* sp V6 Using a Cost-Effective Molasses-Corn Steep Liquor Medium. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 162(2): 486-497. DOI:10.1007/s12010-009-8759-9
- Jung, I. H., Lim, H. C., Lee, E. U., Lee, J. S., Jung, U. W., & Choi, S. H. 2015. Comparative analysis of carrier systems for delivering bone morphogenetic proteins. *J Periodontal Implant Sci*, 45(4):136-144. DOI:10.5051/jpis.2015.45.4.136
- Laurencin, C., Khan, Y., and El-Amin, S. F. 2006. Bone graft substitutes. *Expert Rev Med Devices*, 3(1): 49-57. DOI:10.1586/17434440.3.1.49
- Lee, S. H., Lim, Y. M., Jeong, S. I., An, S. J., Kang, S. S., Jeong, C. M., and Huh, J. B. 2015. The effect of bacterial cellulose membrane compared with collagen membrane on guided bone regeneration. *J Adv Prosthodont*, 7(6): 484-495. DOI:10.4047/jap.2015.7.6.484
- Liu, F., Wei, B., Xu, X., Ma, B., Zhang, S., Duan, J., Kong, Y., Yang, H., Sang, Y., Wang, S., Tang, W., Liu, C., and Liu, H. 2021. Nanocellulose-Reinforced Hydroxyapatite Nanobelt Membrane as a Stem Cell Multi-Lineage Differentiation Platform for Biomimetic Construction of Bioactive 3D Osteoid Tissue In Vitro. *Adv Healthc Mater*, 10(8), e2001851. DOI:10.1002/adhm.202001851
- Moore, W. R., Graves, S. E., and Bain, G. I. 2001. Synthetic bone graft substitutes. *ANZ J Surg*, 71(6): 354-361.
- Muthukumar, T., Aravinthan, A., Sharmila, J., Kim, N. S., and Kim, J. H. 2016. Collagen/chitosan porous bone tissue engineering composite scaffold incorporated with Ginseng compound K. *Carbohydr Polym*, 152: 566-574. DOI:10.1016/j.carbpol.2016.07.003
- Nandi, S. K., Roy, S., Mukherjee, P., Kundu, B., De, D. K., and Basu, D. 2010. Orthopaedic applications of bone graft and graft substitutes: a review. *Indian J Med Res*, 132: 15-30.
- Pigossi, S. C., de Oliveira, G. J. P. L., Finoti, L. S., Nepomuceno, R., Spolidorio, L. C., Rossa, C., Ribeiro, S. J. L., Saska, S., and Scarel-Caminaga, R. M. 2015. Bacterial cellulose-hydroxyapatite composites with osteogenic growth peptide (OGP) or pentapeptide OGP on bone regeneration in critical-size calvarial defect model. *J Biomed Mater Res A*, 103(10): 3397-3406. DOI:10.1002/jbm.a.35472
- Svensson, A., Nicklasson, E., Harrah, T., Panilaitis, B., Kaplan, D. L., Brittberg, M., and Gatenholm, P. 2005. Bacterial cellulose as a potential scaffold for tissue engineering of cartilage. *Biomaterials*, 26(4): 419-431. DOI:10.1016/j.biomaterials.2004.02.049
- Tas, A. C. 2000. Synthesis of biomimetic Ca-hydroxyapatite powders at 37 degrees C in synthetic body fluids. *Biomaterials*, 21(14): 1429-1438.
- Tolstunov, L., Hamrick, J. F. E., Broumand, V., Shilo, D., and Rachmiel, A. 2019. Bone Augmentation Techniques for Horizontal and Vertical Alveolar Ridge Deficiency in Oral Implantology. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am*, 31(2): 163-191. DOI:10.1016/j.coms.2019.01.005
- Top, B., Uguzdogan, E., Dogan, N. M., Arslan, S., Bozbeyoglu, N. N., Kabalay, B. 2021. Production and Characterization of Bacterial Cellulose from *Komagataeibacter xylinus* Isolated from Home-made Turkish Wine Vinegar. *Cellulose Chem Technol*, 2: 13-17.
- Torres, F. G., Arroyo, J. J., and Troncoso, O. P. 2019. Bacterial cellulose nanocomposites: An all-nano type of material. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 98: 1277-1293. DOI:10.1016/j.msec.2019.01.064
- Vadaye Kheiry, E., Parivar, K., Baharara, J., Fazly Bazzaz, B. S., and Iranbakhsh, A. 2018. The osteogenesis of bacterial cellulose scaffold loaded with fisetin. *Iran J Basic Med Sci*, 21(9): 965-971. DOI:10.22038/IJBMS.2018.25465.6296
- Vazquez, A., Foresti, M. L., Cerrutti, P., and Galvagno, M. 2013. Bacterial Cellulose from Simple and Low Cost Production Media by *Gluconacetobacter xylinus*. *J. Polym. Environ.*, 21(2): 545-554. DOI:10.1007/s10924-012-0541-3
- Wahid, F., Huang, L. H., Zhao, X. Q., Li, W. C., Wang, Y. Y., Jia, S. R., and Zhong, C. 2021. Bacterial cellulose and its potential for biomedical applications. *Biotechnol Adv*, 53, 107856. DOI:10.1016/j.biotechadv.2021.107856
- Wang, H., Li, Y., Zuo, Y., Li, J., Ma, S., and Cheng, L. 2007. Biocompatibility and osteogenesis of biomimetic nano-hydroxyapatite/polyamide composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 28(22): 3338-3348. DOI:10.1016/j.biomaterials.2007.04.014
- Wang, S. S., Han, Y. H., Chen, J. L., Zhang, D. C., Shi, X. X., Ye, Y. X., Chen, D. L., and Li, M. 2018. Insights into Bacterial Cellulose Biosynthesis from Different Carbon Sources and the Associated Biochemical Transformation Pathways in *Komagataeibacter* sp. W1. *Polymers (Basel)*, 10(9). DOI:10.3390/polym10090963