



T.C.

**ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

**KONTROLLÜ MELATONİN SALIMI YAPAN NANOLİF YAPIDA
BİYOMATERYAL UYGULAMASININ OTOGREFT TAMİRİ
YAPILAN KRİTİK KALVARYAL KEMİK DEFEKTLERİNİN
İYİLEŞMESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

DAMLA AYKORA

TEZ DANIŞMANI

PROF. DR. METEHAN UZUN

ÇANAKKALE – 2025



T.C.

ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

**KONTROLLÜ MELATONİN SALIMI YAPAN NANOLİF YAPIDA
BİYOMATERYAL UYGULAMASININ OTOGREFT TAMİRİ YAPILAN
KRİTİK KALVARYAL KEMİK DEFEKTLERİNİN İYİLEŞMESİ ÜZERİNE
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

DAMLA AYKORA

TEZ DANIŞMANI

PROF. DR. METEHAN UZUN

Bu çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir.

Proje No: TDK-2024-4689

ÇANAKKALE – 2025



T.C.
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ



Damla AYKORA tarafından Prof. Dr. Metehan UZUN yönetiminde hazırlanan ve **16/01/2025** tarihinde aşağıdaki jüri karşısında sunulan **“Kontrollü Melatonin Salımı Yapan Nanolif Yapıda Biyomateryal Uygulamasının Otogreft Tamiri Yapılan Kritik Kalvaryal Kemik Defektlerinin İyileşmesi Üzerine Etkilerinin Araştırılması”** başlıklı çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü **Fizyoloji Anabilim Dalı**’nda **DOKTORA TEZİ** olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Prof. Dr. Metehan UZUN

(Danışman)

Prof. Dr. Cahit BAĞCI

Prof. Dr. Şerif DEMİR

Prof. Dr. Ayhan ORAL

Doç. Dr. Hüseyin Avni EROĞLU

.....

.....

.....

.....

.....

Tez No : 10613995

Tez Savunma Tarihi : 16/01/2025

.....

Doç. Dr. Melis ULU DOĞRU

Enstitü Müdürü

....../....../20

ETİK BEYAN

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Tez Yazım Kuralları'na uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada; tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi, kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı, bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu, bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi taahhüt ve beyan ederim.

Damla AYKORA

16/01/2025

TEŞEKKÜR

“Eğer ki diğerlerinden ötesini görebildiysem; bu, devlerin omuzlarında yükseldiğim içindir” Robert Hooke.

Bu tezin gerçekleştirilmesinde ve akademisyen olmamın kilometre taşlarını titizlikle işlenmesinde, büyük bir özveriyle doktora eğitimim ve çalışmam boyunca benden bir an olsun yardımlarını esirgemeyen, bana her zaman güvenen, asla emekli olmasını istemediğim saygı değer danışman hocam Prof. Dr. Metehan UZUN’a sonsuz teşekkür ve şükranlarımı arz ediyorum.

Doktora eğitimim boyunca bilgi birikimleri ve kıymetli katkıları ile bana ışık olan Fizyoloji Ana Bilim Dalı başkanımız çok kıymetli Sayın Prof. Dr. Mustafa Edremitlioğlu’na teşekkür ediyorum.

Akademik yolculuğa başlamamı sağlayan, öğrenci velim olarak beni önce yüksek lisansa sonra doktora kaydettiren, çalışabilmem için her ortamı ve zamanı uygun hale getiren, özellikle akademik etiğiyle bana ışık olan sevgili eşim Emrah’a asla yetmeyecek teşekkürlerimi sunuyorum.

Çocuklarım, lisansüstü eğitimim boyunca hiç anlamadığınız kadar çok çalıştım ve bunun için çokca zaman uzak kaldık. Ama siz çok güçlüydünüz, ve bilmeden daha bana güç kaynağı oldunuz. Büyüdüğünüzde bunu okuyup gurur duyduğunuzu görmeyi çok isterim.

Akademik bu uzun yolculuğunun duraklarından birinde tanışmaktan ve ekiplerinde yer almaktan onur duyduğum sayın hoca abim Prof. Dr. Hüseyin Avni Eroğlu’na ve Arş. Gör. Dr. Cemre AYDEĞER’e içten teşekkürlerimi sunuyorum.

Doktora tez çalışmamda sonsuz yardımlarını esirgemeyen Sayın Doç. Dr. Ali Akar, Doç. Dr. Ümit Ali Malçok, Dr. Öğr. Üyesi Özden Yülek ve Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Akif Ovalı’ya içten teşekkürlerimi sunuyorum.

Damla AYKORA
Çanakkale, Ocak 2025

ÖZET

KONTROLLÜ MELATONİN SALIMI YAPAN NANOLİF YAPIDA BİYOMATERYAL UYGULAMASININ OTOGREFT TAMİRİ YAPILAN KRİTİK KALVARYAL KEMİK DEFEKTLERİNİN İYİLEŞMESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Damla AYKORA

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Fizyoloji Anabilim Dalı Doktora Tezi

Danışman: Prof. Dr. Metehan UZUN

16/01/2025, 188

Kemik kayıplarının hızlı onarımını ve hızlı kaynamasını sağlayacak osteoindüktif, osteokondüktif, biyouyumlu ve biyobozunur kompozit bir biyomateryal geliştirilmesi son yıllarda önemi artan bir konudur. Bu amaçla çalışmamızda biyouyumlu ve biyobozunur özellikleri bilinen PLGA yapısında in vivo ortamda yaklaşık olarak 28 günde biyobozunumunu tamamlayacak şekilde nanolifler üretilerek karakterizasyonu yapılmıştır. Nanolif yapısındaki bu biyomateryal içerisine osteoindüktif etkileri bilinen melatonin yerleştirilerek in vitro ortamda biyomateryalin 28 günlük ilaç salım profili ortaya konulmuştur. Üretilen, karakterizasyonu yapılan ve melatonin salım profili ortaya konulan bu biyomateryal daha sonra kritik kalvaryal kemik defekti oluşturularak otogreft ile tamir edilen sıçanlarda otogreftin ana kemik ile kaynaşması üzerine etkileri değerlendirilmiştir. Bu amaçla sıçanlardan 7, 14 ve 28. günlerde alınan kalvaryal kemik doku örneklerinde Hematoksilen-Eozin boyama ile yeni kemik oluşumu, Masson Trikrom boyama ile kolajen birikimi, Periyodik Asit Schiff boyama ile anjiyogenez ve Von Kossa boyama ile mineralizasyon düzeyleri belirlendi. İmmünohistokimyasal olarak Alkalen fosfataz, tartarat rezistans asit fosfataz, runt ilişkili transkripsiyon faktörü 2, kemik morfojenik protein 2 ve vasküler endotelial büyüme faktörü immünoreaktiviteleri ölçüldü. Serum örneklerinden ise biyokimyasal analizler ile ALP düzeyleri belirlendi.

Çalışmamız PLGA/MEL nanoliflerinin otogreft ile tamir edilen kritik boyutlu kalvaryal defektlerinin erken dönemde kaynaması üzerine etkilerini inceleyen ilk çalışmadır. Çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçlar ürettiğimiz PLGA/MEL nanoliflerinin otogreft uygulanan kemik kırıklarında, otogreftin ana kemik ile erken kaynamasını sağlamak üzere umut vadeci olduğunu göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Kemik kaynaması, otogreft, nanolif, polimer, melatonin



ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE IMPROVEMENT EFFECTS OF SUSTAINED RELEASE OF MELATONIN LOADED NANOFIBERS ON AUTOGRAFTED CRITICAL CALVARIAL DEFECTS

Damla AYKORA

Çanakkale Onsekiz Mart University

School of Graduate Studies

Doctoral Dissertation in Physiology

Supervisor: Prof. Dr. Metehan UZUN

16/01/2025, 188

The development of an osteoinductive, osteoconductive, biocompatible, and biodegradable composite biomaterial that will provide rapid repair and rapid union of bone loss is a subject of increasing importance in recent years. For this purpose, in our study, a biomaterial in the structure of poly-lactic-co-glycolic acid (PLGA), which has known biocompatible and biodegradable properties, was produced and characterized in a nanofiber structure to complete its biodegradation in approximately 28 days in vivo environment. Melatonin, which is known to have osteoinductive effects, was placed into this nanofiber biomaterial, and the 28-day melatonin release profile of the biomaterial was revealed in vitro. This biomaterial, which was produced, characterized and melatonin release profile were then evaluated for its possible effects on fusion in rats with critical calvarial bone defects treated with autograft. The efficacy of the biomaterial produced for this purpose was evaluated histopathological, immunohistochemically and biochemically in calvarial bone tissue samples taken from rats on the 7th, 14th and 28th days. New bone formation (NBF) was determined by Hematoxylin-Eosin (H-E) staining, collagen deposition by Masson Trichrome (MT) staining, angiogenesis by Periodic Acid Schiff (PAS) staining and mineralization levels by Von Kossa staining. Immunohistochemically Alkaline phosphatase (ALP), tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP1), runt-related transcription factor 2 (Runx2), bone morphogenic protein 2 (BMP2) and vascular endothelial growth factor (VEGF) immunoreactivities were measured. ALP levels were determined in serum samples.

Our study is the first to investigate the effects of PLGA/MEL biomaterial on early union and bone regeneration of critical calvarial defects repaired with autograft. The results of our study show that our PLGA/MEL material is promising for early union of bone fracture repair with autograft.

Keywords: Autograft, bone union, melatonin, nanofiber, polymer.



İÇİNDEKİLER

Sayfa No

JÜRİ ONAY SAYFASI.....	i
ETİK BEYAN.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR.....	xii
TABLolar DİZİNİ.....	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiv

BİRİNCİ BÖLÜM

GİRİŞ

	1
1.1. Kemik Yapısı ve Organizasyonu.....	4
1.1.1. Kompakt Kemik.....	6
1.1.2. Süngerimsi Kemik.....	6
1.2. Kemik Doku ve Hücreleri.....	7
1.2.1. Osteoprogenitör Hücreler.....	8
1.2.2. Osteoblast Hücreleri.....	9
1.2.3. Osteosit Hücreleri.....	10
1.2.4. Osteoklast Hücreleri.....	11
1.2.5. Kemik Matriksi.....	13
Organik Kemik Matriksi.....	13
İnorganik Kemik Matriksi.....	14
1.3. Kemik Kırıkları ve İyileşmesi.....	15
1.3.1. Primer Kemik İyileşmesi.....	16
1.3.2. Sekonder Kemik İyileşmesi.....	16
1.3.3. Kemik İyileşmesinde Belirteçler.....	18
Kemik İyileşmesi ve Yeni Kemik Oluşumu.....	18
Kemik İyileşmesi ve Kolajen Birikimi.....	20
Kemik İyileşmesi ve Anjiyogenez.....	21

	Kemik İyileşmesi ve Mineralizasyon.....	23
	Kemik İyileşmesi ve ALP.....	24
	Kemik İyileşmesi ve TRAP.....	25
	Kemik İyileşmesi ve BMP2.....	26
	Kemik İyileşmesi ve Runx2.....	28
	Kemik İyileşmesi ve VEGF.....	29
1.3.4.	Kemik İyileşmesinde Güncel Klinik Uygulamalar.....	30
1.4.	Kemik Greftleri.....	31
1.5.	Kırıklarda Kaynamama.....	33
1.6.	Doku Mühendisliği.....	34
1.6.1.	Kemik Doku Mühendisliği.....	35
1.6.2.	PLGA.....	37
1.6.3.	Elektroegirme Yöntemi ve Nanolif Üretimi.....	39
1.6.4.	Nanoliflerin Morfolojik Karakterizasyonu.....	40
1.6.5.	Kemik Doku Mühendisliğinde Kemik İyileşmesi.....	41
1.7.	Melatonin Hormonu.....	44
1.7.1.	Melatoninin Biyokimyasal Yapısı ve Sentezi.....	44
1.7.2.	Melatoninin Fizyolojik Etkileri.....	45
1.7.3.	Melatoninin Kemik Doku Üzerine Etkileri.....	46
1.8.	Kemik Doku Mühendisliği Çalışmalarında Kullanılan Kaynama Modelleri.....	48
1.8.1.	Kritik Boyutlu Kalvaryal Defektler.....	49
İKİNCİ BÖLÜM		
KURAMSAL ÇERÇEVE		52
2.1.	Melatoninin Kemik İyileşmesi Üzerine Etkileri.....	52
2.1.1.	Melatonin, Kemik İyileşmesi ve ALP.....	52
2.1.2.	Melatonin, Kemik İyileşmesi ve TRAP.....	54
2.1.3.	Melatonin, Kemik İyileşmesi ve Runx2.....	55
2.1.4.	Melatonin, Kemik İyileşmesi ve BMP2.....	56
2.1.5.	Melatonin, Kemik İyileşmesi ve VEGF.....	57
2.1.6.	Melatonin, Kemik İyileşmesi ve Kolajen Formasyonu.....	59
2.2.	Kemik İyileşmesinde Kemik Doku Mühendisliğinin Etkileri.....	61
2.2.1.	Kemik Doku Mühendisliğinde PLGA İçeren Biyomateryallerin Kullanımı ve Etkinliği.....	63

2.2.2.	Kemik Doku Mühendisliği Alanında Melatonin İçeren Biyomateryal Çalışmaları.....	64
--------	---	----

ÜÇÜNCÜ BÖLÜM

MATERYAL YÖNTEM

66

3.1.	Nanoliflerin Üretimi ve Karakterizasyonu.....	66
3.1.1.	PLGA-PEG6000 Solüsyonunun Hazırlanması.....	66
3.1.2.	Melatonin İçeren PLGA-PEG6000 Solüsyonunun Hazırlanması.....	66
3.1.3.	Biyomateryalin Salım Profiline Belirlenmesi.....	67
3.1.4.	Nanolif Yapıda Üretilen Biyomateryalin SEM ile Karakterizasyonu...	68
3.1.5.	Nanolif Yapıda Üretilen Biyomateryalin FTIR ile Karakterizasyonu...	68
3.1.6.	Üretilen Nanolif Yapıda Biyomateryalin UV Sterilizasyonu ve Saklanması.....	69
3.2	Hayvan Deneyleri.....	69
3.2.1	Hayvan Materyali.....	70
3.2.2.	Çalışma Grupları.....	70
3.2.3.	Kritik Kalvaryal Kemik Defekti Modeli Oluşturulması.....	71
3.2.4.	Ötenazi, Kan ve Doku Örneklerinin Alınması.....	72
3.3.	Histopatolojik Analizler.....	74
3.3.1.	Hematoksilen-Eozin Boyamanın Yapılması.....	75
3.3.2.	Masson Trikrom Boyamanın Yapılması.....	75
3.3.3.	Von-Kossa Boyamanın Yapılması.....	75
3.3.4.	Periyodik Asit Schiff Boyamanın Yapılması.....	76
3.4.	İmmünohistokimyasal Analizler.. ..	76
3.5.	Biyokimyasal Analizler.....	77
3.6.	İstatistiksel Analizler.....	78

DÖRDÜNCÜ BÖLÜM

ARAŞTIRMA BULGULARI

79

4.1.	PLGA/MEL Nanoliflerinin Üretimi ve Karakterizasyonu.....	79
4.1.1.	Nanoliflerin Biyobozunum Profili.....	79
4.1.2.	PLGA/MEL Nanoliflerinin İlaç Salım Profili.....	80
4.1.3.	SEM Analizi Sonuçları.....	81
4.1.4.	FTIR Analizi Bulguları.....	81

4.2.	In vivo Bulgular.....	82
4.2.1.	Histopatolojik Boyama Bulguları.....	83
	H-E Boyama Bulguları.....	83
	MT Boyama Bulguları.....	87
	PAS Boyama Bulguları.....	91
	Von Kossa Boyama Bulguları.....	94
4.2.2.	İmmünohistokimya Analizi Bulguları.....	97
	ALP İmmünohistokimya Boyama Bulguları.....	97
	TRAP İmmünohistokimya Boyama Bulguları.....	100
	BMP2 İmmünohistokimya Boyama Bulguları.....	103
	VEGF İmmünohistokimya Boyama Bulguları.....	106
	Runx2 İmmünohistokimya Boyama Bulguları.....	109
4.2.3.	Biyokimyasal Analizler.....	112
BEŞİNCİ BÖLÜM		
	TARTIŞMA, SONUÇ ve ÖNERİLER	114
5.1.	Tartışma.....	114
5.2.	Sonuç ve Öneriler.....	143
	KAYNAKÇA	145
	EKLER	I
	EK 1. ETİK KURUL KARARI	I

SİMGELER VE KISALTMALAR

µg	Mikrogram
µM	Mikromolar
ALP	Alkalen Fosfataz
BMP2	Kemik morfojenik proteini 2
BMSC	Kemik kaynaklı mezenkimal kök hücre
ECM	Ekstraselüler matriks
FGF-23	Fibroblast büyüme faktörü-23
FTIR	Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopi
H-E	Hematoksilen-Eozin
M	Molar
MMP 9	Matriks metalloproteinaz 9
MSC	Mezenkimal kök hücre
MT	Masson Trikrom
OPG	Osteoprotegerin
PAS	Periyodik asit Schiff
PCL	Polikaprolakton
PDGF	Trombosit kaynaklı büyüme faktörü
PLA	Polilaktik asit
PLGA	Polilaktik-ko-glikolik asit
RANK	Nükleer kappa B reseptör aktivatör
RANKL	Nükleer kappa B reseptör aktivatör ligandı
Runx2	Runt ilişkili transkripsiyon faktörü 2
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
TGF-β	Dönüştürücü büyüme faktörü β
TRAP	Tartarat dirençli asit fosfataz
VEGF	Vasküler endotelyal büyüme faktörü
XRD	X ışını kırınımı
YKO	Yeni kemik oluşumu

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo No	Tablo Adı	Sayfa No
Tablo 1	MT boyama skorlaması	75



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Şekil Adı	Sayfa No
Şekil 1	Kemiğin lamellar yapısı ve organizasyonu	5
Şekil 2	Süngerimsi ve kompakt kemik yapılarının şematik görünümü	7
Şekil 3	Kemik doku hücreleri ve kemikte lokalize olduğu alanlar	8
Şekil 4	Osteoprogenitör hücrelerin Runx2 aracılığı ile diferansiyasyon mekanizması	9
Şekil 5	Osteoklast hücrelerinin şematik gösterimi	12
Şekil 6	Kemik iyileşme dönemlerinin şematik gösterimi	17
Şekil 7	PLGA'nın kemik doku mühendisliğinde kullanım stratejileri	38
Şekil 8	Elektroeğirme yöntemi ile çeşitli bileşenlerden nanolif üretimi	39
Şekil 9	Melatoninin kimyasal yapısı ve sentezi	44
Şekil 10	Beyin-kemik aksında melatonin etkileri	48
Şekil 11	(A) Biyomateryal çalışmalarında kullanılan kritik kalvaryal defekt modelleri ve (B) Sıçanlarda 6 mm çapında kritik kalvaryal defekt modelinin oluşturulması	51
Şekil 12	Melatoninin ALP üretimi üzerine moleküler etki mekanizmasının şematik gösterimi	53
Şekil 13	Melatonin osteoklastogenezi dolaylı inhibe edici etkisinin mekanizmalarının gösterimi	55
Şekil 14	Melatonin'in MAPK-ERK1/2 sinyal yolağı üzerinden Runx2 ekspresyonu uyarıcı etkilerinin şematik gösterimi	56
Şekil 15	Melatoninin VEGF uyarıcı etkilerinin şematik gösterimi	58
Şekil 16	Melatoninin kolajen üretimini üzerine etkilerinin moleküler mekanizması	60
Şekil 17	(A) Nanoliflerin üretilmesinde kullanılan elektroeğirme cihazı, (B) Elektroeğirme yöntemi ile nanolif üretilmesi	67
Şekil 18	Nanoliflerin yapısındaki moleküler bağların ve organik bileşiklerin incelendiği FTIR cihazının gösterimi	68
Şekil 19	Melatonin içeren nanoliflerin kırmızı ışık altında hazırlanması	69

Şekil 20	(A) Sıçanlarda 6 mm çapında kritik boyutta kalvaryal defekt oluşturulması, (B) Kalvaryal defekt oluşturulduktan sonra dura mater görüntüsü, (C) Sıçanlara otogreft uygulamasının yapılması ve (D) Otogreft yapılan alanlara biyomateryal uygulamasının yapılması.	72
Şekil 21	Doku alımı sırasında 28. günde otogreft uygulaması yapılan ve biyomateryal uygulanan (A) kalvaryal alanın temsili bir görüntüsü ve (B) elde edilen total kalvaryal doku gösterimi.	73
Şekil 22	Nanoliflerin biyobozunum profili.	79
Şekil 23	UV sterilizasyon öncesi ve (B) UV sterilizasyon sonrası PLGA/MEL nanoliflerinin ilaç salım profili.	80
Şekil 24	Üretilen nanoliflerin SEM görüntüleri	81
Şekil 25	PLGA, PLGA/MEL ve melatoninin FTIR spektrumu	82
Şekil 26	(A) Otogreft, (B) PLGA, (C) PLGA/MEL ait 7. gün H-E boyama görüntüleri x10 ve (D) Yeni kemik oluşumu (%) oranlarına göre yapılan değerlendirme sonuçlarının karşılaştırılması	84
Şekil 27	(A) Otogreft, (B) PLGA, (C) PLGA/MEL gruplarına ait 14. gün H-E boyama görüntüleri x10 ve (D) Yeni kemik oluşumu (%) oranlarına göre yapılan değerlendirme sonuçlarının grafiksel gösterimi	85
Şekil 28	(A) Otogreft, (B) PLGA, (C) PLGA/MEL ait 28. gün H-E boyama görüntüleri x10 ve (D) Yeni kemik oluşumu (%) oranlarına göre yapılan değerlendirme sonuçlarının karşılaştırılması	86
Şekil 29	Yeni kemik oluşumu ile kolajen birikimi, yeni damar oluşumu, BMP2 pozitif hücre yoğunluğu, ALP pozitif hücre yoğunluğu ve TRAP pozitif hücre yoğunluğu arasında anlamlı düzeyde pozitif korelasyon bulgularının grafiksel gösterimi	87
Şekil 30	(A) Otogreft, (B) PLGA, (C) PLGA/MEL gruplarına ait 7. gün MT boyama görüntüleri x20 ve (D) MT histopatolojik skor bulgularına göre yapılan değerlendirme sonuçlarının grafiksel gösterimi	88
Şekil 31	(A) Otogreft, (B) PLGA, (C) PLGA/MEL ait 14. gün MT boyama görüntüleri x20 ve (D) MT histopatolojik skor bulgularına göre yapılan değerlendirme sonuçlarının karşılaştırılması	89

Şekil 32	(A) Ototogreft, (B) PLGA, (C) PLGA/MEL ait 28. gün MT boyama görüntüleri x20 ve (D) MT histopatolojik skor bulgularına göre yapılan değerlendirme sonuçlarının karşılaştırılması	90
Şekil 33	Kolajen birikimi ile mineralizasyon, ALP pozitif hücre yoğunluğu, BMP2 pozitif hücre yoğunluğu ve Runx2 pozitif hücre yoğunluğu arasında anlamlı düzeyde pozitif korelasyon bulgularının grafiksel gösterimi	91
Şekil 34	(A) Ototogreft, (B) PLGA, (C) PLGA/MEL ait 7. gün PAS boyama görüntüleri x20 ve (D) PAS boyalı histolojik kesitlerde yeni damar oluşumuna (%) göre yapılan değerlendirme sonuçlarının karşılaştırılması	92
Şekil 35	(A) Ototogreft, (B) PLGA, (C) PLGA/MEL ait 14. gün PAS boyama görüntüleri x20 ve (D) PAS boyalı histolojik kesitlerde yeni damar oluşumuna (%) göre yapılan değerlendirme sonuçlarının karşılaştırılması	93
Şekil 36	(A) Ototogreft, (B) PLGA, (C) PLGA/MEL ait 28. gün PAS boyama görüntüleri x20 ve (D) PAS boyalı histolojik kesitlerde yeni damar oluşumuna (%) göre yapılan değerlendirme sonuçlarının karşılaştırılması	94
Şekil 37	(A) Ototogreft, (B) PLGA, (C) PLGA/MEL ait 7. gün Von Kossa boyama görüntüleri x20 ve (D) Von Kossa boyalı histolojik kesitlerde mineralizasyon (%) göre yapılan değerlendirme sonuçlarının karşılaştırılması	95
Şekil 38	(A) Ototogreft, (B) PLGA, (C) PLGA/MEL ait 14. gün Von Kossa boyama görüntüleri x20 ve (D) Von Kossa boyalı histolojik kesitlerde mineralizasyon (%) göre yapılan değerlendirme sonuçlarının karşılaştırılması	96
Şekil 39	(A) Ototogreft, (B) PLGA, (C) PLGA/MEL ait 28. gün Von Kossa boyama görüntüleri x20 ve (D) Von Kossa boyalı histolojik kesitlerde mineralizasyon (%) göre yapılan değerlendirme sonuçlarının karşılaştırılması	97
Şekil 40	(A) Ototogreft, (B) PLGA, (C) PLGA/MEL ait 7. gün ALP immünohistokimya boyama görüntüleri x20 ve (D) Gruplara ait 7. gün ALP pozitif hücre sayısının karşılaştırılması	98
Şekil 41	(A) Ototogreft, (B) PLGA, (C) PLGA/MEL ait 14. gün ALP immünohistokimya boyama görüntüleri x20 (D) Gruplara ait 14. gün ALP pozitif hücre sayısının karşılaştırılması	99

Şekil 42	(A) Otogreft, (B) PLGA, (C) PLGA/MEL ait 28. gün ALP immünohistokimya boyama görüntüleri x20 ve (D) Gruplara ait 28. gün ALP pozitif hücre sayısının karşılaştırılması	100
Şekil 43	(A) Otogreft, (B) PLGA, (C) PLGA/MEL ait 7. gün TRAP1 immünohistokimya boyama görüntüleri x20 ve (D) Gruplara ait TRAP pozitif hücre sayılarının karşılaştırılması	101
Şekil 44	(A) Otogreft, (B) PLGA, (C) PLGA/MEL ait 14. gün TRAP1 immünohistokimya boyama görüntüleri x20 ve (D) Gruplara ait TRAP pozitif hücre sayılarının karşılaştırılması	102
Şekil 45	(A) Otogreft, (B) PLGA, (C) PLGA/MEL ait 28. gün TRAP1 immünohistokimya boyama görüntüleri x20 ve (D) Gruplara ait TRAP pozitif hücre sayılarının karşılaştırılması	103
Şekil 46	(A) Otogreft, (B) PLGA, (C) PLGA/MEL ait 7. gün BMP2 immünohistokimya boyama görüntüleri x20 ve (D) Gruplara ait BMP2 pozitif hücre sayılarının karşılaştırılması	104
Şekil 47	(A) Otogreft, (B) PLGA, (C) PLGA/MEL ait 14. gün BMP2 immünohistokimya boyama görüntüleri x20 ve (D) Gruplara ait BMP2 pozitif hücre sayılarının karşılaştırılması	105
Şekil 48	(A) Otogreft, (B) PLGA, (C) PLGA/MEL ait 28. gün BMP2 immünohistokimya boyama görüntüleri x20 ve (D) Gruplara ait BMP2 pozitif hücre sayılarının karşılaştırılması	106
Şekil 49	(A) Otogreft, (B) PLGA, (C) PLGA/MEL ait 7. gün VEGF immünohistokimya boyama görüntüleri x20 ve (D) Gruplara ait VEGF pozitif hücre sayılarının karşılaştırılması	107
Şekil 50	(A) Otogreft, (B) PLGA, (C) PLGA/MEL ait 14. gün VEGF immünohistokimya boyama görüntüleri x20 ve (D) Gruplara ait VEGF pozitif hücre sayılarının karşılaştırılması	108
Şekil 51	(A) Otogreft, (B) PLGA, (C) PLGA/MEL ait 28. gün VEGF immünohistokimya boyama görüntüleri x20 ve (D) Gruplara ait VEGF pozitif hücre sayılarının karşılaştırılması	109
Şekil 52	(A) Otogreft, (B) PLGA, (C) PLGA/MEL ait 7. gün Runx2 immünohistokimya boyama görüntüleri x20 (D) Gruplara ait VEGF pozitif hücre sayılarının karşılaştırılması	110
Şekil 53	(A) Otogreft, (B) PLGA, (C) PLGA/MEL ait 14. gün Runx2 immünohistokimya boyama görüntüleri x20 ve (D) Gruplara ait VEGF pozitif hücre sayılarının karşılaştırılması	111

Şekil 54	(A) Otogreft, (B) PLGA, (C) PLGA/MEL ait 14. gün Runx2 immünohistokimya boyama görüntüleri x20 ve (D) Gruplara ait VEGF pozitif hücre sayılarının karşılaştırılması	112
Şekil 55	Gruplara ait 7., 14. ve 28. günlerde elde edilen serum örneklerinde, ALP ELISA verilerinin karşılaştırılması	113



BİRİNCİ BÖLÜM

GİRİŞ

Kemik kırıkları; travma, iş kazaları, cerrahiler, osteomiyelit, kemik tümörleri ve osteoporoz gibi birçok farklı nedene bağlı olarak meydana gelmektedir. İlerleyen teknikler ve geliştirilen tedavi yöntemlerine rağmen kemik kırıklarının onarımında halen çeşitli komplikasyonlar gelişebilmekte ve her zaman tam bir iyileşme sağlanamamaktadır (Ghiasi vd., 2017). Kırık küçük bir alanda meydana gelmişse, iki kırık uç arasındaki kırık alanı çok geniş değilse veya kırık fragmanları karşılıklı olarak birbirinden ayrılmamışsa kemik kırıkları çoğu zaman kendiliğinden iyileşebilir ve karşılıklı kaynama meydana gelebilir. Kendiliğinden iyileşmeyecek düzeyde oluşan kemik kırıklarında ise tek çözüm cerrahi müdahaledir (Kammerer vd., 2024). Cerrahi müdahalede ilk seçenek internal veya eksternal fiksasyon uygulamasıdır. Ancak bazı durumlarda kırık bölgesi veya defekt alanı internal veya eksternal fiksasyona izin vermeyecek düzeyde geniştir. Kritik defekt olarak adlandırılan bu tip kemik kırık veya kayıplarında ise greft uygulaması kaçınılmaz hale gelir (Roberts ve Rosenbaum, 2012).

Amerika Birleşik Devletleri'nde bir hastada oluşan kemik defekti tedavisinin, bakım ve iyileşme dönemi dahil yıllık ortalama 100 bin dolara kadar çıkabilen bir maddi yüke neden olduğu hesaplanmıştır. Bununla beraber kemik kırığı şikâyeti ile acil servise başvuran bireylerin en az % 25'inde cerrahi müdahaleye ihtiyaç duyulduğu ve bunun maliyetinin ise yıllık 25 milyar dolara ulaştığı belirtilmektedir (Cauley, 2021). Yapılan çalışmalar tüm dünyada kırıkların en az % 5-10'unun kaynamadığını ve tam iyileşme oluşmadığını göstermektedir (Wildemann vd., 2021). Oluşan bu hasarlar genellikle cerrahi yöntemlerle tedavi edilmektedir. Cerrahi müdahaleye rağmen post-operatif dönemde ise kaynamama oranının en az % 1,9 olduğu bildirilmiştir (Flores vd., 2024). Ayrıca, cerrahi müdahalede yaygın olarak kullanılan eksternal ve internal fiksasyon yöntemlerinin tüm vakaların % 5'inde enfeksiyona neden olduğu da bildirilmektedir (Alt vd., 2024). Sonuç olarak özellikle iyileşmeyen kemik kırıkları hasta konforunu ve yaşam kalitesini azaltmakta ve ekonomiye önemli bir yük oluşturmaktadır.

Kemik kırıklarının tamirinde kullanılan greft uygulaması, kendiliğinden iyileşemeyecek kadar geniş kemik kayıpları olduğu durumlarda, yeni kemik oluşumunu, kemik kaynamasını ve hızlı iyileşmesini sağlamak amacıyla yapılmaktadır (Shah ve Kamal, 2024). Güncel veriler dünyada kemik kırıklarının onarımında yıllık 2,2 milyon adet kemik grefti uygulaması yapıldığını göstermektedir. Graft olarak otograft, allograft, ksenograft ve sentetik greftler kullanılabilir. Graft uygulamalarının kırık onarımındaki başarı oranları altın standart metot olarak bilinen otograft ve allograft kullanımını işaret etmektedir. Bunlardan ksenograft uygulamasının ise osteoindüktif etkilerinin olmaması nedeniyle en az uygulanan yöntem olduğu bildirilmiştir (Miron, 2024). Bununla birlikte otograft veya allograft uygulaması sonrasında greftin kaynamaması, inflamatuvar ve oksidatif komplikasyonların ortaya çıkması ve hasar alanın genişliğinden dolayı greft yetersizliği iyileşme döneminin uzun sürmesi veya beklenen iyileşmenin olmaması ile sonuçlanmaktadır (Migliorini vd., 2021).

Uygulanan greft ana kemikle yeterince kaynaşmamışsa (non-union), doku reddi ortaya çıkmışsa veya iki ucu sabitlenmiş kemikler istenilen düzeyde kaynaşmamışsa sonuç başarısızlık olarak kabul edilir. Başarısız kırık onarımında veya greftlerde tedavi yönetimi kaynamama türüne, kemik ve yumuşak doku bütünlüğünün olup olmasına, enfeksiyon varlığına, bireyin yaşam tarzına, beslenme ve obezite gibi durumlara göre yeniden gözden geçirilir (Gómez-Barrena ve Ehrnthaller, 2024). Kemik kırıkları sonrası meydana gelen kaynamama kronik bir tıbbi problem haline gelir. Yanı sıra, bireylerin psikososyal ve ekonomik olarak da olumsuz etkilenmesi de söz konusudur. İlave olarak, kemik defektleri gerek tedavi masrafları gerekse bu süreçlerde kişilerin sosyal ve iş hayatından uzaklaşmasına bağlı olarak ülkemizde ve dünyada ciddi bir ekonomik yük de oluşturmaktadır. Tüm bu bilgiler kemik defektlerinin hızlı, ekonomik ve kolay uygulanabilir yöntem veya araçlarla tedavi edilmesi gerektiğini göstermektedir.

Kemik kırıklarına ister fiksasyon isterse greft uygulaması yapılsın başarı oranı her zaman % 100 değildir. Başarı oranını etkileyen birçok faktör bulunmaktadır. Bunlar arasında yetersiz immobilizasyon, başarısız cerrahi girişim, yetersiz biyolojik yanıt veya enfeksiyonların varlığı gösterilebilir. Otograft uygulamalarındaki başarısızlığın nedenleri arasında donörden yanlış teknik ile greft elde edilmesi ve bu nedenle otograftın zarar görerek

yeterli iyileşme sağlayamaması, elde edilen greftin yanlış implantasyonu, hastanın genel durumu ve greft yapılacak kemik defekti alanının kırık şiddetine bağlı doku canlılığını yitirmiş olması sayılabilir (Dreyer vd., 2020). Sebep ne olursa olsun kaynamayan bir kırık veya ana kemiğe tutunmayan bir otogreft uygulaması yeniden bir operasyonu gerektirebilir, yaşam konforunu azaltır veya ciddi ekonomik kayıplara yol açar (Nashi ve Kagda, 2023). Otogreft uygulamalarındaki başarısızlıklar aynı zamanda ilave başka riskler de taşımaktadır. Bazı durumlarda hastadan yeniden greft alınması gerekmekte ve bu durum gereksiz kemik doku kayıplarına yol açmaktadır. Bazen ise greft yapılacak alanın büyüklüğüne bağlı olarak ikinci bir otogreft alınacak bölge bulunamamakta, hasta ya allogreft tedavisine mecbur kalmakta ya da kritik defektle hayatını sürdürmek zorunda kalmaktadır. Allogreft uygulamalarında ise doku reddi veya immün reaksiyon gelişmesi gibi riskler kemik kaynaması ve iyileşmesinin önünde bulunan ciddi engellerdendir (Schmidt, 2021).

Tüm bu veriler kemik kırıklarının yeniden onarımının hızlı sağlanabilmesi ve greftlerin hızla ana kemiğe kaynaşmasını sağlayacak yeni yöntemlerin geliştirilmesini konu alan çalışmalara ihtiyaç olduğunu göstermektedir. Elde edilecek veriler ve ürüne dönüştürülecek araştırma bulguları kemik kırıklarına bağlı sağlık giderlerinin azaltılmasına ve hastaların yaşam konforunun artırılmasına katkı sağlayacaktır (Ganse, 2024). Bu nedenle kırık iyileşmesine yönelik araştırmalar günümüzde oldukça yoğun bir şekilde devam etmektedir (Ganse, 2024).

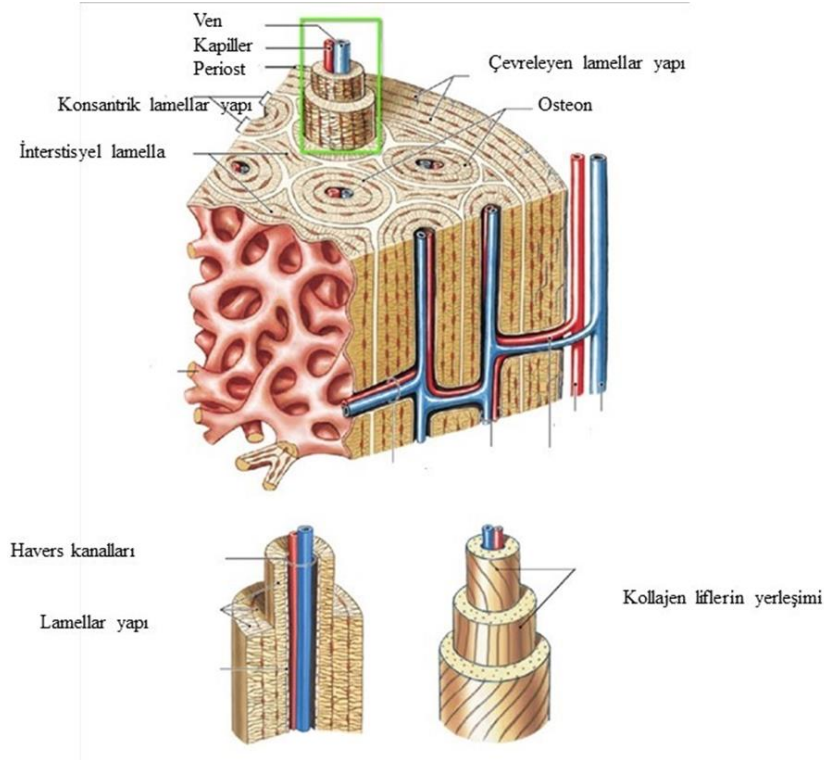
Kırık iyileşmesine yönelik yenilikçi çalışmaların önemli bir kısmının doku mühendisliği alanında olduğu görülmektedir. Çünkü, doku mühendisliği, kemik defekti tedavilerinin de dahil olduğu birçok hastalık için umut vadeden bir araştırma alanıdır. Kemik doku mühendisliği alanında kemik defektlerinin hızlı ve etkili rejenerasyonunun sağlanması için doğal veya sentetik kaynaklı birçok greft materyali üretilmiş ve deneysel olarak etkileri ortaya konulmuştur. Bununla birlikte bu çalışmalar kemik grefti olarak üretilen bu türden biyomateryallerin kemik rejenerasyonuna katkısının otogreftin etkilerini henüz yakalayamadığını göstermektedir (Garimella vd., 2024). Bu tezin konusu da otogreft uygulaması ile doldurulan geniş defektli deneysel bir çalışmada, kemik kayıplarının hızlı onarımını ve hızlı kaynamasını sağlayacak osteoindüktif, osteokondüktif, biyouyumlu ve biyobozunur kompozit bir biyomateryal geliştirilmesidir.

Bu amaçla çalışmamızda biyouyumlu ve biyobozunur özellikleri bilinen Poli-laktik-ko-glikolik asit (PLGA) yapısında in vivo ortamda yaklaşık olarak 28 günde biyobozunumunu tamamlayacak şekilde nanolif yapısında bir biyomateryal üretilmiş ve karakterizasyonu yapılmıştır. Nanolif yapısındaki bu biyomateryal içerisine osteoindüktif etkileri bilinen melatonin yerleştirilmiş (PLGA/MEL) ve in vitro ortamda biyomateryalin 28 günlük melatonin salım profili ortaya konulmuştur. Üretilen, karakterizasyonu yapılan ve melatonin salım profili ortaya konulan bu biyomateryalin daha sonra kritik kalvaryal kemik defekti oluşturulan otogreft ile tedavi edilen sıçanlarda kaynaşma üzerine olası etkileri değerlendirilmiştir. Bu amaçla üretilen biyomateryalin etkinliği sıçanlardan 7., 14. ve 28. günlerde alınan kalvaryal kemik doku örneklerinde histopatolojik, immünohistokimyasal ve biyokimyasal analizlerle belirlenmiştir. Hematoksilen-Eozin (H-E) boyama ile yeni kemik oluşumu (YKO), Masson Trikrom (MT) boyama ile kolajen birikimi, Periyodik Asit Schiff (PAS) boyama ile anjiyogenez ve Von Kossa boyama ile mineralizasyon düzeyleri gözlenmiştir. İmmünohistokimyasal olarak Alkalen fosfataz (ALP), Tartarat rezistans asit fosfataz (TRAP1), Runt ilişkili transkripsiyon faktörü 2 (Runx2), Kemik morfojenik protein 2 (BMP2) ve Vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) immünoreaktiviteleri ölçülmüştür. Serum örneklerinden ise ALP düzeyleri belirlenmiştir.

Çalışmamız PLGA/MEL biyomateryalinin otogreft ile tamir edilen kritik boyutlu kalvaryal defektlerin erken dönemde kaynaması ve kemik rejenerasyonu üzerine etkilerini inceleyen ilk çalışmadır. Elde ettiğimiz sonuçlar ürettiğimiz PLGA/MEL materyalinin otogreft uygulanan kemik kırıkları tamirinin erken kaynamasını sağlamak üzere umut vadeci olduğunu göstermektedir.

1.1. Kemik Yapısı ve Organizasyonu

Kemik, bileşimi ve yapısı itibarı ile karmaşık, ancak hiyerarşik (anatomik ve histolojik) olarak iyi organize olmuş bir dokudur. Kemik dokusu, hidroksiapatit kristallerini, proteinli hücre dışı matriksi ve çeşitli kemik doku hücrelerini barındıran kompozit bir yapıdır (Şekil 1).



Şekil 1. Kemiğin lamellar yapısı ve organizasyonu (Cinici vd., 2024).

Kemikler oluşum özelliklerine göre iki grupta incelenir;

1. Primer kemik; embriyonik gelişim döneminde ve kırık onarımında ilk oluşan yumuşak (woven) kemik türüdür. Mineralize olmamış osteoid adı verilen ekstrasellüler matriks (ECM) ve düzensiz dağılım gösteren kolajen liflerden oluşur. Geçici bir kemik yapıdır ve ilerleyen dönemlerde matür lamellar kemik ile yer değiştirir (Tatlı ve Belge, 2016).

2. Sekonder kemik; yetişkin iskelet kemikleri lamellar yani sekonder kemik türündedir. Sekonder kemik primer kemiğe göre çok fazla mineralize osteoid içeren organize bir yapıya sahiptir. Bu organize yapı sekonder kemiğin daha dayanıklı olmasını sağlar (Elhawary vd., 2021).

Her iki kemik türünde de dış katman periosteum adı verilen bir bağ doku tabakası ile çevrelenmiştir. Endosteum adı verilen benzer bir katman ise kemik dokunun iç kavitesini

sarar. Endosteum kemiğin medüller kanallarını, Volkmann kanalını ve kemiğin gözenekli yapısını adeta bir örtü şekline kaplar (Clarke, 2008).

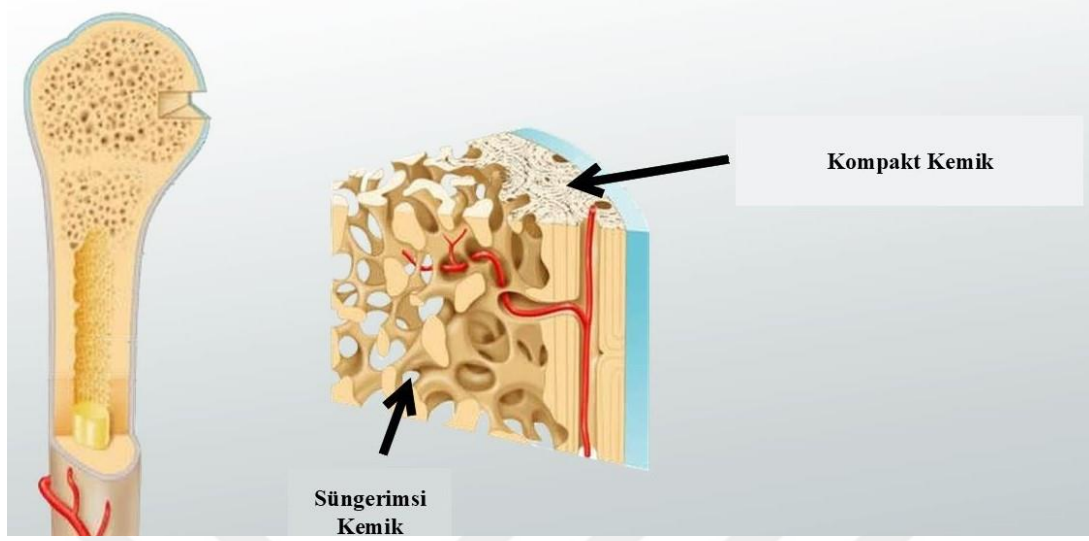
Kemik tiplerinden sekonder yani lamellar kemik iki ayrı alt grupta incelenir. Bunlar, sert ve yoğun bir yapıda olan kompakt kemik ile kemiğin iç katmanlarını oluşturan ve gözenekli bir yapıda olan süngerimsi kemiktir (Şekil 2).

1.1.1 Kompakt Kemik

Kemiğin dış katmanını oluşturan yapı kompakt kemiktir. Kompakt kemik iç içe geçen lamella adı verilen halkalardan oluşur ve etrafı vertikal olarak Haversian kanallarınca sarılıdır. Haversian kanalları nörovasküler ve lenfatik damarların geçişini sağlayan yapılardır. Lamellar katmanlar, vasküler, nöral ve lenfatik yapılardan oluşan bu total yapıya aynı zamanda kemiğin en küçük fonksiyonel birimi de olan osteon adı verilir. Haversian kanalları horizontal olarak Volkmann kanalları ile bağlantılıdır. Bu kavşak küçük Haversian kanalları içerisindeki küçük damarların arterlerle bağlantı yaptığı yerdir. Volkmann kanalları ayrıca kan damarlarını periosteuma ileten bir bağlantı sağlar (Clarke, 2008).

1.1.2. Süngerimsi Kemik

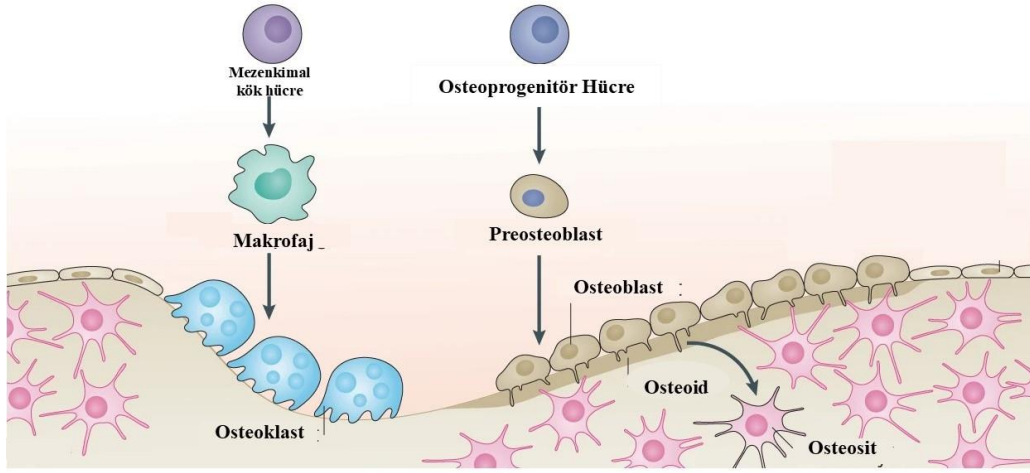
Süngerimsi kemik birçok kemiğin iç dokusunu şekillendirir ve kompakt kemiğin derinliklerinde yerleşimlidir. Süngerimsi yapı kemiğe arı kovanı şeklini verir geniş bir yüzey alanı sağlar. Süngerimsi yapı kemiğe esneklik ve yük kaldırma özelliği kazandırarak hareket kabiliyetini artırır. Süngerimsi kemik dokuda Volkmann veya Haversian kanalları bulunur (Clarke, 2008).



Şekil 2. Süngerimsi ve kompakt kemik yapılarının şematik görünümü (Amirazad vd., 2022).

1.2. Kemik Doku ve Hücreleri

Kemik, organik ve inorganik elementlerin birleşmesinden oluşur ve ağırlıkça yaklaşık % 20'si sudan oluşan bir dokudur. Kemiğin osteoid adı verilen organik bölümü Tip I kolajen (% 90), glikoproteinler, proteoglikanlar, peptitler, karbonhidratlar ve lipitlerden oluşur. İnorganik kısmı ise kalsiyum fosfat kristalleri (% 65-70) ve az miktarda magnezyum, florür ve sodyumdan oluşur (Florencio-Silva vd., 2015). Şekil 1'de görüldüğü üzere kolajen lifler matür kemikte tabakadan tabakaya dönüşümlü olarak karakteristik lameller yapı sağlarlar. Osteoidin inorganik mineral tuzlar ile mineralizasyonu kemiğe sağlamlık ve sertlik kazandırır. Kemik hücreleri toplam kemik dokusunun %10'unu oluşturur (Clarke, 2008). Şekil 3'te kemik dokuda bulunan spesifik hücreler ve kemik dokunun bileşenleri gösterilmektedir.



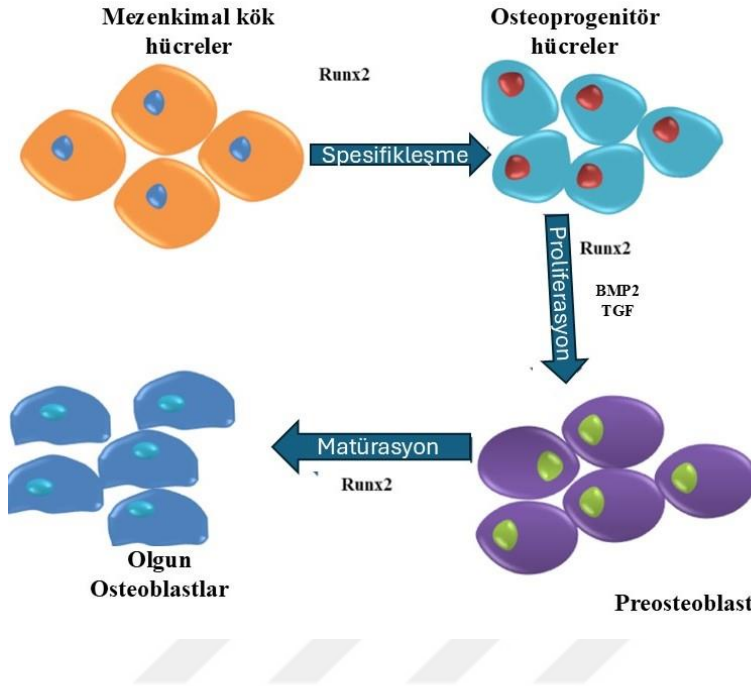
Şekil 3. Kemik doku hücreleri ve kemikte lokalize olduğu alanlar (Salhotra vd., 2020).

1.2.1. Osteoprogenitör Hücreler

Osteoprogenitör kök hücreler preosteoblastlar olarak bilinen ve osteoblastlara diferansiye olan hücrelerdir (Şekil 4). Bu hücreler kemik kanaliküllerinde, endosteumda, periosteumda ve kemik iliğinde bulunurlar. Osteoprogenitör kök hücreler embriyonik olarak mezenşim kökenlidir ve postnatal yaşam boyunca kemik dokuda varlığını sürdürürler. Aktif kemik formasyonu veya remodeling gerekmediği durumlarda osteoprogenitör hücreler genellikle ipliksi uzantıları ile kemik yüzeyine tutunur ve inaktif olarak bulunurlar. Kemik olgunlaşması gerektiği durumlarda uzantıları ile kemik yüzeyine tutunur ve diferansiye olurlar. Bu nedenle gelişen ve yenilenen kemik dokuda osteoprogenitör hücre sayıları oldukça fazladır (Ottewell, 2016).

Kemik remodelingi veya rejenerasyonu gerektiği durumlarda BMP, Runx2 ve dönüştürücü büyüme faktörü β (TGF- β) gibi öncül moleküller osteoprogenitör hücreleri aktive eder (Ottewell, 2016). Bunlar arasında özellikle preosteoblastlar oluşmaya başladıkça Runx2 ekspresyonunda kayda değer bir artış olur. Runx2 aktivitesi olgunlaşmamış osteoblastlar ortaya çıktığında zirveye ulaşır ve hücreler osteoblastlara olgunlaştıkça yavaş yavaş daha düşük değerler alır. Osteoblast progenitörlerinin çoğalma sürecinin Runx2 ile

kolaylaştırıldığı gösterilmiştir (Giuliani vd., 2009). Runx2 ile osteoprogenitör hücrelerin diferansiyasyonu olgun osteoblastların oluşmasını sağlar ve osteoblastların yeni kemik oluşumu için aktivasyonu başlatılmış olur (Zhu vd., 2024).



Şekil 4. Osteoprogenitör hücrelerin Runx2 aracılığı ile diferansiyasyon mekanizması (Gao vd., 2021).

1.2.2.Osteoblast Hücreleri

Osteoblastlar kemiğin esas hücreleridir ve osteoprogenitör hücrelerden köken alırlar (Kim vd., 2020). Bu hücreler tüm kemik hücrelerinin % 4-6'sını oluştururlar ve kemik matriksinin organik protein bileşimi olan osteodin sentezlenmesinden sorumludurlar. Dolayısı ile kemiğin yapımdan ve osteogenezisten sorumlu esas hücreler olarak bilinirler. Tip 1 kolajenleri ve kemik matriksini sentezleyerek non-kalsifiye osteoid dokuyu oluştururlar (Komori vd., 2006).

Osteoblastlar, osteoid dokuyu oluşturduktan sonra osteoid içine yerleşerek osteosit adını alırlar. Endoplazmik retikulum ve golgi aygıtı organellerine de sahip olan osteoblastlar kalsiyum bağlayan osteonektin, osteokalsin, glikozaminoglikanlar ve ALP salgırlar.

Osteoblastlardan sentezlenen ALP, osteoblastik aktivitenin belirlenmesinde bir belirteç olarak kullanılır. Osteoblastlar aynı zamanda osteoklastların fonksiyonlarını da düzenlerler. Kemik yeniden şekillenmesinin, hücre bağlantılarının kurulmasının, parakrin iletişim ve hücre-kemik matriks interaksiyonunun da primer sağlayıcısıdırlar (Yao vd., 2024).

Kemik kırıklarında osteoblastlar kemik iyileşmesi ve yeniden şekillenmesi sırasında esas olarak kemik hücre dışı matrisinin üretilmesinden sorumludurlar ve birincil kemik oluşturan hücreler olarak görev yaparlar. Osteoblastların hücre dışı kemik matriksi içinde çoğalması, farklılaşması ve mineralizasyonu kemik iyileşmesinin uyarılması için gereklidir. Osteoblastların olgunlaşması Runx2'nin varlığına bağlıdır, bu da onun bu süreçte çok önemli bir rol oynadığını gösterir (Yao vd., 2024).

1.2.3.Osteosit Hücreleri

Osteositler, osteoblastların farklılaşması ile oluşan ve kemiğin lagunalarında bulunan kalsifiye matrikste yerleşmiş hücrelerdir. Osteositler kemik metabolizmasının ana düzenleyicisi olarak görev yaparlar. Osteositlerin endokrin hücreler gibi davrandığını ve mekanik strese yanıt olarak nitrik oksit ve glutamat taşıyıcıları ve insülin benzeri büyüme faktörleri gibi çeşitli sinyal moleküllerinin ekspresyonu yoluyla diğer hücrelerle iletişim kurarak kemiği ani kuvvet değişimlerine karşı korudukları belirtilmektedir. Osteositlerin bir diğer fonksiyonu ise mineral homeostazisini sağlamasıdır. Osteositler bu fonksiyonunu osteositik osteolizis olarak bilinen hızlı bir şekilde kalsiyum ve fosfor salınması ile gerçekleştirirler (Choy vd., 2019).

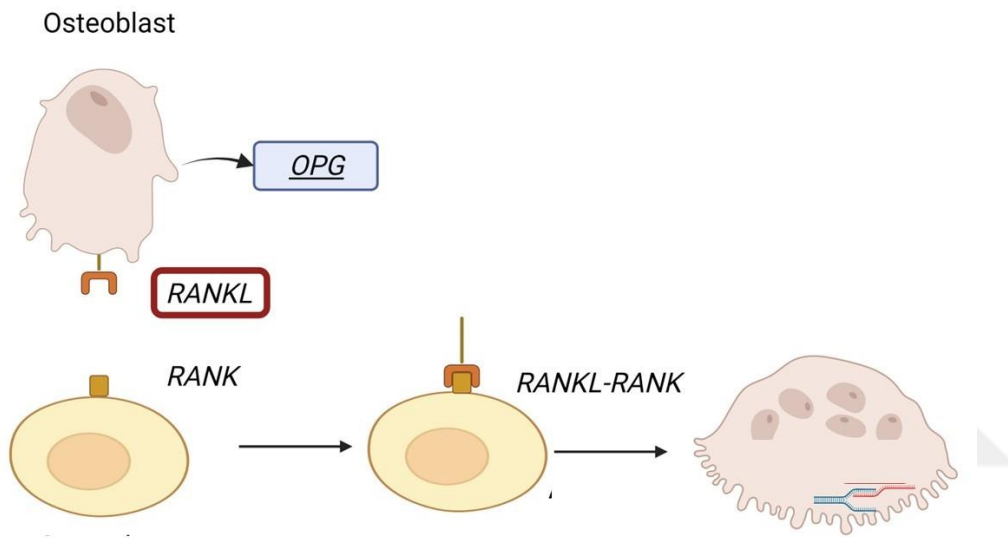
Kemik kırıklarının iyileşmesi için birçok hücre tipinin etkinliği, çeşitli büyüme faktörlerinin ve sinyal moleküllerinin lokal ekspresyonu gerekir. Osteositler de kemik kırıklarının iyileşmesinde anahtar bir rol oynarlar. Kemik rejenerasyonunda ve remodeling fazında osteositlerden salınan çeşitli faktörlerin kırık onarımında önemli fonksiyona sahip olduğu görülmektedir. Osteositler kemik hasarlarında aktive olarak fibroblast büyüme faktörü-23 (FGF-23), sklerostin, Tip 1 kolajen, osteokalsin ve osteopontin salgılayarak kemik onarımı sağlarlar (Tresguerres vd., 2020). Buna ek olarak kırık alanına mezenkimal kök hücrelerin göçünü hızlandırarak rejenerasyona katkıda bulunurlar. Yapılan çalışmalar osteositlerin Nükleer kapp B reseptör aktivatör ligandı (RANKL) sentezinin de ana kaynağı olarak görev aldığını belirterek, kemik remodelingi için osteoklastik aktiviteyi de stimüle ettiğini göstermiştir (Choi vd., 2022).

1.2.4. Osteoklast Hücreleri

Osteoklastlar, hematopoietik kökenlidir, mononükleer osteoklast progenitör hücrelerin füzyonu ile meydana gelen geniş çaplı, çok çekirdekli hücrelerdir. Osteoklast progenitör hücreler primer olarak kemik iliğinde bulunurlar, ancak kemik yüzeyinde füzyon gerçekleştirirler (Wei vd., 2011). Osteoklastların progenitör hücrelerden matürasyonu ve aktivasyonu çeşitli interlökinler (IL-1, IL-3, IL-6 ve IL-11), tümör nekroz faktör (TNF), granülosit makrofaj koloni stimüle edici faktör (GM-CSF) ve makrofaj koloni stimüle edici faktör (M-CSF) gibi çeşitli sitokinler tarafından uyarılır. Bu sitokinler etkilerini osteoklast progenitör hücreleri stimüle ederek veya parakrin etki ile diğer kemik hücrelerini uyararak gerçekleştirirler. Bu etkileşimin mediyatörleri ise nükleer kapp B reseptör aktivatör (RANK), RANKL ve osteoprotegerindir (OPG). Hedefi ise RANK/RANKL sinyal yolağıdır. Osteoklastların üretimi, diferansiyasyonu, aktivasyonu ve yaşam süreleri bu sinyal yolağı tarafından belirlenir. (Boyle vd., 2003). RANK, osteoblastlar tarafından sentezlenen bir moleküldür, osteoklastların membranındaki RANKL'a tutunur ve osteoklastların aktive olmasını sağlar (Şekil 5). Bu etkileşim osteoblastların ve stromal hücrelerin osteoklast aktivasyonunu kontrol etmesini sağlar. Böylelikle sürekli devam eden kemik formasyonu ve rezorpsiyonu sayesinde fizyolojik şartlarda sağlıklı iskeletin oluşumuna katkıda bulunur. OPG ise yine osteoblastlar tarafından sentezlenen ve RANK inhibisyonu sağlayan bir moleküldür (Liu vd., 2011).

Osteoklastlar kemik metabolizmasında önemli bir role sahiptir. Özellikle kemiğin rezorpsiyonundan sorumlu olan osteoklastların kemik üzerine etkileri iki temel başlık altında toplanabilir;

- (a) normal plazma kalsiyum seviyesini sağlamak
- (b) güçlü ve sağlıklı kemik dokunun devamlılığına katkıda bulunmak (Boyce vd., 2009).



Şekil 5. Osteoklast hücrelerinin şematik gösterimi.

Osteoklastlar, bu işlevlerini osteoblastlar ile sürekli denge halinde sürdürmektedir. Plazma kalsiyum seviyesinde değişimlere göre aktivasyon/inaktivasyon döngüsünde etki gösterirler. Öte yandan yeni kemik oluşumu veya kemik rejenerasyonu gereken durumlarda ise kompakt kemik oluşumuna destek olmak üzere kallus rezorpsiyonu sağlarlar (Bruzaniti ve Baron, 2006). Osteoklastlar kırık iyileşmesinin sağlanmasında orta ve uzun vadede önemli bir role sahiptirler. Osteoklastlar bu evrelerde yumuşak kallusun sert kallusa dönüşmesinde, kompakt kemik oluşumunda, rezorpsiyon ve remodeling süreçlerinde görev alırlar. Osteoklastların kompakt kemik gelişimine katkısı özellikle yumuşak kallusun rezorpsiyonudur. Bu işlevi TRAP enzimi, katepsin K ve matriks metalloproteinaz 9 (MMP9)

salgılayarak gerçekleştirirler. Bunlar arasında osteoklastlardan, makrofajlardan ve dentritik hücrelerden salınan bir enzim olan TRAP osteoklastik aktivitenin önemli bir histokimyasal belirteçidir. Kemik remodelingi fazında kemik rezorpsiyonu sağlayan asıl enzim olan TRAP enzimi aktivitesi artar ve kompakt kemik oluşumu sağlamak üzere yumuşak kallusu rezorbe eder (Hayman, 2008). Katepsin K ve MMP9 osteoklastlardan kemik rezorpsiyonu sırasında salgılanan diğer iki önemli faktördür. Tüm bu faktörlerin etkisi ile kırık bölgesinde aktive olan osteoklastlar öncelikle kartilajenöz kallusu daha sonra da kemik kallusu rezorbe ederler. Bu süreç kemik rejenerasyonunu sağlarken matür kemiğin oluşumuna da katkıda bulunur (Molitoris vd., 2024).

1.2.5. Kemik Matriksi

Kemik ECM'si kemik hücrelerinin arasındaki bulunan ve kemik hücrelerini destekleyen kompleks bir yapıdır. Kemik hücrelerinden yoksun olan bu üç boyutlu yapı, osteoblastlardan ekstraselüler boşluğa salınan spesifik protein ve polisakkaritlerden oluşur (Zoch vd., 2015). Kemik ECM'si kemik dokuya bütünlük ve elastikiyet sağlayan dinamik bir yapıdır. Kemik ECM'si kemik doku mikroçevresinden, homeostazis ve pH değişikliklerinden etkilenir ve sürekli olarak yeniden düzenlenir (Carvalho vd., 2021). Bu yapı osteoblastlar ve osteoklastlar ile sıkı ilişki içindedir, yeni kemik oluşumu ve kemik gelişimine katkıda bulunur (Lin vd., 2020).

Kemik matriksinin kompleks yapısı organik (% 40) ve inorganik (% 60) bileşenlerden oluşur. Organik kompartman Tip 1 kolajen (% 90) ve non-kolajen proteinleri (% 10) içerir. Kemik matriksinin inorganik komponenti non-kalsifiye apatit kristalleri ve eser elementlerden meydana gelir. (Kernen vd., 2005).

Organik Kemik Matriksi

Kemiğin organik matriksi kemik dokunun gelişimi, büyümesi ve remodelingini sağlayan kısımdır. Kemik ECM'sinin önemli bir kısmını oluşturan organik matriks zengin

bir içeriğe sahip olması açısından diğer tüm dokulardan farklıdır. Kemik dokunun organik kısmı % 90 oranında Tip I kolajen ve % 10 oranında osteokalsin, osteonektin ve osteopontin gibi non-kolajen proteinlerden oluşur. Bunlar arasından organik matrikste yüksek oranda bulunan Tip I kolajen kemik dokuya sertlik kazandıran ve kemik dokuda en yaygın bulunan kolajen tipidir. Tip I kolajen aynı zamanda kemik dokuya mekanik stabilizasyon sağlanmasından da sorumludur (Jones vd., 2008). Bununla birlikte az miktarda Tip II, III ve IV kolajen türleri de bulunmaktadır (Viguet-Carrin vd., 2006).

Kemik kırıklarında kemik dokunun diğer komponentleri gibi kolajen yapı da zarar görür. Kemik kırıklarının onarım sürecinde osteoblastlardan Tip I kolajen sentezinin ve yapımının uyarılması için yüksek miktarda ilgili gen ekspresyonu gereklidir (Bruce ve Dziewiatkowski, 1987). Sentezi ve yapımı uyarılan Tip I kolajen birikimi kemiğin kırık öncesi mekanik yüklenme özelliğini kazanması ve bütünlüğünün korunması için en önemli faktördür (Amirrah vd., 2022).

Organik matrikste bulunan ve non-kolajen yapıda olan diğer proteinler osteoblastlardan sentezlenir. Bunlardan osteokalsin, kemik mineralizasyonunu sağlamak üzere kemik dokuya kalsiyum bağlanmasından sorumludur. Diğer bir non-kolajen protein ise osteonektindir. Osteonektin glikoprotein yapıda bir matriks proteindir ve kemik ECM'sinde kolajen birikimini sağlar. Osteopontin ise multifonksiyonel bir proteindir, remodeling evresinde osteoblastların kemiğe tutunmasını sağlar (Marelli vd., 2013).

İnorganik Kemik Matriksi

Kemik ECM'sinin diğer bileşeni inorganik matrikstir. İnorganik matriks kemiğe sertlik kazandırır ve kemik kuru ağırlığının % 65'ini oluşturur. İnorganik matriksin % 95'lik kısmını hidroksiapatit kristalleri ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) şeklinde bulunan kalsiyum ve fosfor iyonları oluşturur. Hidroksiapatit kristalleri kolajen yapıya bağlanarak kemik dokunun sertlik kazanmasını sağlar.

İnorganik matrikste bir kayıp oluşması durumunda kemik esnek bir yapıya dönüşür ve sertliğini kaybeder. İnorganik matriks içeriğinin zenginleştirilmesi kemik dokuda ALP sentezi ve aktivitesi ile sağlanır. ALP osteoblastlardan sentezlenerek, inorganik matriks içeriğindeki hidroksiapatit kristalleri oranını artırır ve mineralizasyonu kolaylaştırır. Aynı zamanda mineral oluşumunun inhibitörü olan pirofosfat miktarlarını da azaltarak inorganik matriks birikiminin artmasını sağlar (Vimalraj, 2020). Bunun dışında inorganik matriks ayrıca magnezyum, potasyum, sodyum ve flor iyonlarını da içerir. Bu bileşenler de inorganik matriksin kemik dokuya sertlik kazandırmasına ayrıca katkı sağlarlar.

1.3. Kemik Kırıkları ve İyileşmesi

Kemik kırıkları kemik bütünlüğünün travma, darbe, osteoporoz veya osteosarkoma gibi nedenlerle bozulmasıdır. Kemik kırıkları tüm yaşam boyunca her yaş gurubundan insanları olumsuz etkileyen bir durumdur. Tüm dünyada özellikle 55 yaş üstü insanların % 44'ü ve genç yetişkinlerin en az % 20'si farklı sebeplerden dolayı kemik kırıklarıyla karşılaşmaktadır.

Kemik kırıklarının iyileşmesi aylar veya yıllar süren bir süreç olduğundan, etkilenen bireyler ekonomik ve sosyal hayattan uzak kalmaktadırlar. Kemik dokunun kompleks matriks ve hücre bileşenleri, ile vasküler ve nöral yapısı kemik kırıklarının iyileşmesini hızlıca regüle edebilme yeteneğine sahiptir. Bu nedenlerle kemik doku vücuttaki diğer dokuların iyileşmesi ile karşılaştırıldığında, doku hasarı öncesi durumuna dönmesi bakımından eşsizdir. Kemik iyileşmesi fizyolojik olarak kompleks ve birçok farklı hücre işlevini gerektiren, biyolojik bir süreçtir (Calmar ve Vinci, 2002). Kemik kırıklarının oluşma şekline göre iyileşme süreçleri de farklılık gösterir. Kırığın şiddetine, kırık uçlarının pozisyonuna ve kırık sonucu kemik doku kaybının durumuna göre kemik kırıklarının iyileşme tipleri primer ve sekonder iyileşme olarak iki farklı şekilde incelenir.

Bunlardan primer iyileşme kırık hattında kallus formasyonu oluşmaksızın doğrudan kırık uçlarının birbiri ile kaynamasıdır. Sekonder iyileşme ise kırık fragmanlarının uç uca

kaynayamadığı ve geniş kemik kayıplarının görüldüğü durumlarda eksternal kallus gelişimi ve yeni kemik oluşumu ile karakterize bir iyileşme şeklidir.

1.3.1. Primer İyileşme

Primer iyileşme, kırık fragmanlarının arasında geniş boşlukların olmadığı, rijit, implant veya eksternal fiksasyon gerektirmeyen stres kırığı gibi hasarlar sonrasında görülen kemik iyileşmesi sürecidir. Doğal iyileşme sürecinde primer iyileşme az rastlanan iyileşme türüdür. Bu türden iyileşmede kırık fragmanları arasında geniş boşluklar bulunmaz ve hareket yoktur (Elhawary vd., 2021). İki kemik ucu arasında boşluk oluşmadığından bu iyileşme türünde kallus formasyonu görülmez. Kırık fragmanları arasındaki mesafe genellikle 0,01 mm'den daha azdır. Bu türden kırıklar internal veya eksternal fiksasyonla redükte edilir. Her iki şekilde de anatomik olarak düzgün ve biyomekanik olarak dayanıklı lamellar kemik oluşur.

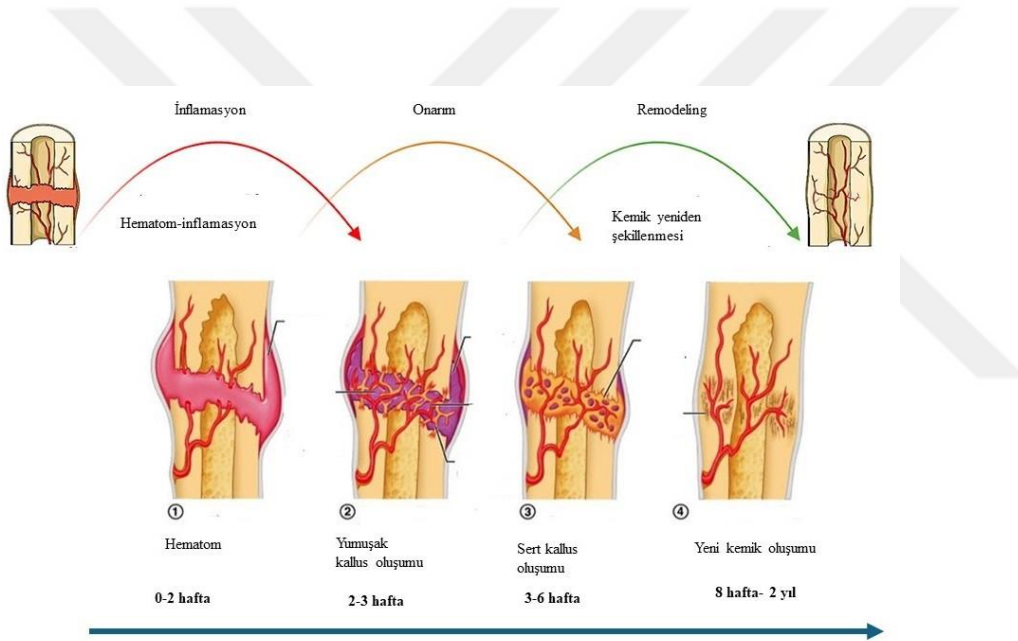
1.3.2. Sekonder İyileşme

Sekonder iyileşme kırık fragmanları arasında geniş boşlukların olduğu eksternal veya internal fiksasyon gerektiren ve iç içe gelişen dört fizyolojik faz ile karakterize olan bir iyileşme tipidir. Bunlar;

- a) Hematom,
- b) İnflamasyon,
- c) Onarım
- d) Remodeling fazlarıdır.

Bu iyileşme fazları kemik kırıklarının iyileşme sürecinde birbirinden kesin olarak ayrılamamakla birlikte, her faz mutlaka bir diğerinin aktivasyonunu gerektirir (Şekil 6).

Kemik kırıklarının iyileşme sürecinde, kırık oluşumunu takiben ilk olarak hasarlı alanda hematoma meydana gelir. Sonrasında saatler içerisinde hematoma absorpsiyonu başlar. Bu dönem 1-5 günlük bir süreyi kapsar. Bu süreçte hematoma ile inflammatuar hücreler kırık hattına girerler, böylelikle büyüme faktörlerinin, sitokinlerin ve pıhtılaşma faktörlerinin kemotaksisini sağlayan inflammatuar dönemi başlatırlar (Buza ve Einhorn, 2016). Hematom oluşması ile kırık hattına gelen bir diğer önemli hücre grubu trombositlerdir. Kırık hattına gelerek degranüle olan trombositler TGF- β ve trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) salgılayarak anjiogenezi, kemotaksisi ve mezenkimal kök hücre diferansiyasyonunu uyarırlar (Kalfas, 2001). Bu dönemde fraktür alanında fibroblast büyüme faktörü (FGF), VEGF ve anjiopietin gibi proanjiyojenik faktörler görülmeye başlar.



Şekil 6. Kemik iyileşme dönemlerinin dört fazının şematik gösterimi (Adamopoulos, 2018).

Kemik iyileşmesinin sekonder iyileşme tipi endokondral iyileşme şeklinde devam eder. Endokondral süreçte mezenkimal kök hücre (MSC) diferansiyasyonu ile kırık hattına fibroblast ve kondroblast göçü gerçekleşir ve bu hücreler yumuşak kallus oluşumunu sağlarlar. Yumuşak kallus oluşumu kırık sonrası 5. ile 11. günlerde gerçekleşir. Oluşan yumuşak kallus daha sonraları osteoklastlar tarafından rezorbe edilir. Yumuşak kallus osteoklastlar tarafından rezorbe edilirken bir yandan da osteoblastik aktivite ile yeni kemik oluşumu başlar. Yeni kemik doku oluşumu başlangıcı ile kartilaj doku mineralize olmaya

başlar ve kondroblastlar apoptoziye uğrar (Schell vd., 2017). Periosteumun kırık alanını örtmesinin ardından kemik iliğinden osteoblastlar diferansiye olarak kırık hattına göç etmeye başlar. Bu sırada bir taraftan osteoklastlar yumuşak kallusu rezorbe etmeye devam ederken, bir taraftan da osteoblastlar matriks sentezleyerek sert kallus oluşumunu başlatırlar. Böylelikle hasar sonrası yaklaşık 11. ile 18. günlerde sert kallus görülür.

Sert kallus oluşumunu kemiğin yeniden şekillenme basamağı olan remodeling takip eder. Kemik iyileşme sürecinin yeniden şekillenme basamağı, hasarı takiben 18. günde başlar ve aylar/yıllar sürecektir olan bu süreç ile iyileşme basamakları tamamlanmış olur. Kemik remodelingi kemiğin yeniden yük taşıyabilmesi ve işlevlerini yerine getirebilmesi için gereklidir (Adamopoulos, 2018). Remodeling fazında birçok farklı hücre tipi, mekanizma, hormon ve molekülün birbirleriyle iletişim ve etkileşim içinde olması kemiğin başarılı bir şekilde tam iyileşme sağlaması için oldukça önemlidir.

Tüm bu süreçler kemik iyileşmesinin tamamlanması ve kırık uçlarının kaynamasının sağlanması, ayrıca kemiğin hasar öncesi yük taşıma kapasitesine kavuşabilmesi için gereklidir. Bununla birlikte oluşan kemik hasarının geniş veya kritik boyutlu olması bu sürecin uzun sürmesine, geç iyileşmeye, iyileşmemeye, kaynamamaya veya yanlış kaynamaya neden olduğu bilinmektedir.

1.3.3. Kemik İyileşmesinde Belirteçler

Kemik İyileşmesi ve Yeni Kemik Oluşumu

Fragmanlar arasında geniş kemik kayıplarının olduğu kemik kırıklarının onarımı kırık hattında birçok hücre ve faktörün etkileşimi ile gerçekleşir. Bu aktivite ile kırık hattındaki boşluk onarım ve remodeling fazları ile yeniden mineralize edilerek yeni kemik oluşumu sağlanır. Bunun için özellikle remodeling döneminde kırık hattına yoğun olarak osteoblast ve osteoklast migrasyonu gerçekleşir. Kırık hattına göç eden osteoblastlar ve osteoklastlar bir denge halinde fonksiyon görerek yeni kemik oluşumunu sağlarlar. Osteoblastlar ve osteoklastlar arasındaki bu denge, oluşan yumuşak kallusun rezorpsiyonu

sonrasında yeni kemik oluşumunu sağlayan temel unsurdur. Buna ek olarak, osteoblast ve osteoklast aktivitesiyle şekillenen yeni kemik, mekanik yüklenme ile güçlenerek rejenerasyonunu tamamlar (Adamopoulos, 2018).

Yeni kemik oluşumunun belirlenmesi kırık iyileşmesinin en önemli verisidir. Uygulama ne olursa olsun (greft veya fiksasyon) kırık hattında kaynamanın gözlenmesi ve uygulanan metodun etkinliği yeni kemik oluşumu düzeyi ile belirlenir. Bu amaçla yapılan deneysel çalışmalarda elde edilen kemik doku örneklerinden histopatolojik boyamalar ile yeni kemik oluşumu ve kırık kaynama hattındaki osteoblastik aktivite değerlendirilir (Kasuya vd., 2018; Thambyah ve Broom, 2009).

Kemik kırıklarının iyileşmesi üzerine yapılan deneysel çalışmalarda yeni kemik oluşumunun belirlenmesi için en yaygın olarak kullanılan yöntem histolojik boyama yöntemleridir. Bunlardan H-E boyama yöntemi osteoblastların ve yeni kemik oluşumunun belirlenmesinde çok yaygın olarak kullanılır. H-E boyama yöntemi, biyomateryal uygulaması sonrası yeni kemik oluşumunun değerlendirildiği çalışmalarda da sıklıkla kullanılmaktadır. H-E yöntemi yeni kemik oluşumunun belirlenmesini sağlarken aynı zamanda biyobozunur biyomateryallerin in vivo bozunum profilinin de ortaya koyulmasına imkân sağlar.

Yapılan bir çalışmada sıçanlarda oluşturulan deneysel tibia kırığı modelinde kalsiyum-silika içeren sement greftinin kemik iyileşmesi üzerine etkileri araştırılmış, çalışmanın 7. ve 30. günlerde alınan kemik dokularından yapılan H-E boyama sonuçlarına göre 30. günde yeni kemik oluşumunun gözlemlendiği ve biyomateryalin tamamen bozulduğu belirlenmiştir (Bilge vd., 2024). Başka bir çalışmada ise polikaprolakton ve biyoaktif cam ile geliştirilen biyomateryalin sıçanlarda oluşturulan kritik kalvaryal defekt modelinde yeni kemik oluşumu üzerine etkileri incelenmiştir. Biyomateryalin 4 haftalık uygulama sonrası etkinliğinin araştırıldığı bu çalışmada yeni kemik oluşumu H-E boyama yöntemi ile belirlenmiştir. H-E boyama sonuçlarına göre 4. haftada biyomateryalin biyobozunuma uğramadığı ve düşük düzeyde yeni kemik oluştuğu belirtilmiştir (Janmohammadi vd., 2024). Fazeli vd.'nin (2023) yaptığı bir çalışmada ise 3 boyutlu üretilen hidroksiapatit-biyoaktif

cam içeren bir skafoldun yeni kemik oluşumu üzerine etkinliği araştırılmış ve 30 günlük uygulama süresi sonunda elde edilen dokulardan H-E boyama ile yeni kemik oluşumu değerlendirilmiştir. H-E boyama ile 30. günde elde edilen verilere göre yoğun osteoblastik aktivite, yeni kemik oluşumu ve düşük düzeyde bozunmamış biyomateryal varlığı gözlenmiştir (Fazeli vd., 2023).

Kemik İyileşmesi ve Kolajen Birikimi

Kemik kırıklarının etkin bir şekilde iyileşmesi, yapısında bulunan ve kırık sonrası yoğunluğu azalan kolajenin miktarının artırılmasına ve birikimine bağlıdır. Kemik ECM'sinin organik matriksinde yüksek oranda bulunan Tip I kolajen kemik iyileşmesini sağlayan en önemli bileşendir. Kemik kırıklarında kolajen miktarında önemli bir azalma ve kolajen yapısında bozulma gözlenir (Buckwalter ve Hunziker, 1996).

Kemik kırıklarının remodeling sürecinde kırık uçlarına göç eden osteoblastlardan yüksek miktarda Tip I kolajen sentezlenir. Kolajen sentezinden sorumlu birincil molekül ALP'dir. ALP aktivasyonu ile Tip I kolajen yapımı ve birikimi stimüle edilir. Böylelikle kırık hattına Tip I kolajen biriktirilerek kemik dokunun bütünlüğü sağlanır (Linder vd., 2014).

Kırık hattında kolajen miktarının belirlenmesi kemik kırıklarının iyileşmesinin araştırıldığı deneysel çalışmalarda önemli bir kriterdir. Kemik kırıklarının rejenerasyonunda Tip 1 kolajenin miktarı osteoblastik aktiviteyi ve rejenerasyon yeteneğini gösteren önemli bir göstergedir (Selvaraj vd., 2024). Kolajen birikimi aynı zamanda kırık kaynama hattında kallus formasyonu sonrası kompakt kemik oluşumunu da gösterir (Bujda ve Klíma, 2024).

Kolajen birikimi histopatolojik MT boyaması ile rahatlıkla gösterilebilir (Montarele vd., 2022; Tu vd., 2020; Wu vd., 2020). Sıçanlarda oluşturulan deneysel kritik kalvaryal kemik defektinin rejenerasyonu üzerine hidroksiapatit ve biyoaktif cam içeren polikaprolakton kompozit biyomateryalinin etkilerinin incelendiği bir çalışmada, implantasyondan 30 gün sonra elde edilen kalvaryal kemik dokularında MT boyama yöntemi

ile kolajen formasyonunun düzeyleri değerlendirilmiştir. Bu çalışmada elde edilen MT boyama sonuçlarına göre hidroksiapatit ve biyoaktif cam içeren polikaprolakton kompozit biyomateryalinin kontrol grubu ile karşılaştırıldığında kolajen formasyonunu artırdığı belirlenmiştir (Fazeli vd., 2023). Başka bir çalışmada sıçanlarda oluşturulan deneysel kalvaryal kemik defektlerinin rejenerasyonu üzerine hidroksiapatit kristalleri içeren jelatin iskelelerinin etkinliği araştırılmıştır. Defektlerin hidroksiapatit kristalleri içeren jelatin iskeleleri ile onarımından 6 hafta sonra kalvaryal kemik dokuları alınarak MT boyama yöntemi ile kolajen formasyonu incelenmiştir.

MT boyama sonuçları, hidroksiapatit kristalleri içeren jelatin iskelelerinin kolajen formasyonunu artırarak hızlı ve etkili bir kemik iyileşmesi sağladığını ortaya koymuştur (Jaiswal vd., 2013). Shilajit reçinesi yüklenen aljinat kompozit iskelelerinin sıçanlarda oluşturulan deneysel tibia defektlerinin rejenerasyonu üzerine etkilerinin belirlenmesi için 2. ve 4. haftalarda tibia doku örnekleri alınarak MT analizi ile kolajen formasyonu incelenmiştir. Çalışma sonuçları uygulanan materyalin 2. ve 4. haftada Shilajit içeren aljinat kompozit iskelelerinin kolajen formasyonunu artırarak yeni kemik oluşumunu sağladığı tespit edilmiştir (Kangari vd., 2024).

Kemik İyileşmesi ve Anjiyogenez

Kemik kırıklarında hasara bağlı olarak damarların zarar görmesi ile doku kan akımı bozulur. Kan akımının bozulması ile kırık alanına oksijen, besin ve remodeling sağlayan moleküller taşınmaz. Kanlanmanın bozulması ise gecikmiş iyileşme/iyileşmeme veya kaynamama ile sonuçlanır. Bu nedenle kemik iyileşmesi sürecinde kırık alanında anjiyogenezin uyarılması ve yeni damar oluşum sürecinin gözlenmesi önemlidir (Hankenson vd., 2011).

Anjiyogenez fizyolojik bir süreçtir ve damarlardan tomurcuklanmalar ile yeni damar oluşumu anlamına gelir. Anjiyogenez ile kırık hattında yeni damarların oluşumu oksijen ve

besin taşınımını sağlayarak kemik remodelingi için gereklidir (Jang ve Yoon, 2024). Kemik kırıklarının iyileşme sürecinde anjiyogenezisin değerlendirilmesi hasarlı alanda doku canlılığının sürdürülmesi ile ilgili önemli bilgiler elde edilmesini sağlar.

Deneysel çalışmalarda kemik kırıklarının iyileşmesi değerlendirilirken yeni damar oluşumu hem histopatolojik hem de genetik analizler ile belirlenebilir. Yeni damar oluşumunun histopatolojik değerlendirilmesinde PAS boyaması yaygın olarak kullanılır. Bu yöntem ile damarların lamina propriasındaki mukopolisakkarit yapılar boyanarak yeni damar oluşumu değerlendirilir.

Biyoaktif cam ve hidroksiapatit kristalleri içeren kompozit iskele ile onarılan kritik kalvaryal defekt modelinde, bu biyomateryalin anjiyogenezis üzerine etkileri 12. haftada yapılan PAS boyama verilerine göre belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre biyomateryalin yeni damar oluşumunu artırdığı belirlenmiştir (Bi vd., 2012).

Hidroksiapatit ve β -Trikalsiyum fosfat ile geliştirilen ksenogreftin kemik rejenerasyonu üzerine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada ise, 8. haftada yapılan PAS boyamada, ksenogreftin yeni damar oluşumunu sağladığı görülmüştür (Brum vd., 2020).

Anjiyogenezisin genetik ve moleküler olarak değerlendirildiği deneysel çalışmalarda ise genellikle VEGF ekspresyon düzeyleri incelenmiştir. Bu çalışmalardan bir tanesinde femur fraktürü oluşturulan sıçanlarda, eksozomlara yüklenmiş kemik iliği kök hücrelerinin kemik kaynaması üzerine etkileri incelenmiştir. Genetik analiz sonuçlarına göre 20. haftada femur dokularında VEGF-A ekspresyon düzeylerinin anlamlı bir şekilde arttığı gözlenmiştir (Zhang vd., 2020). Kolajen içeren ksenogreftlerin anjiyogenezis üzerine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, tavşanlarda oluşturulan 8 mm'lik kalvaryum defektlerine uygulanan bu materyalin 7. günde VEGF ekspresyonunu artırdığı belirlenmiştir (An vd., 2024). Başka bir çalışmada ise titanyum sülfat içeren biyoseramik iskelelerinin farelerde oluşturulan kalvaryum defektlerinin rejenerasyonu üzerine etkileri incelenmiş ve 8. haftada

yapılan genetik analizlerde VEGF-A ekspresyon seviyelerinin arttığı belirlenmiştir (Won Suh vd., 2024).

Kemik İyileşmesi ve Mineralizasyon

Kemik kırıklarının iyileşmesinde kırık uçlarının kaynaması için kırık hattında hidroksiapatit kristallerinin birikimi yani kaynama bölgesinin mineralizasyonu gerekir. Kemik mineralizasyonu, yeni oluşan kemik matriksinde kalsiyum, fosfor ve diğer inorganik maddelerin birikimidir. Kemik mineralizasyonunun olmaması ise kemik matriksinin ve osteoidin yetersizliğini gösterir.

Bu durumda yeni kemik formasyonu görülmez. Bu nedenle kemik kırıklarının rejenerasyonu değerlendirilirken kırık kaynama hattının mineralizasyonu oldukça değerli bilgiler sunmaktadır (Bourne vd., 2021).

Kemik kırıklarında rejenerasyonun değerlendirilmesinde mineralizasyon miktarı hidroksiapatit kristallerinin kırık kaynama hattındaki yoğunluğu ile belirlenir. Bu amaçla en sık kullanılan yöntemlerden biri histolojik boyamalardır. Histolojik boyama yöntemlerinden mineralizasyonun belirlenmesi için genellikle Von Kossa boyama tekniği kullanılır (Sá vd., 2016; Schneider, 2021). Theranakron'un femur kırıklarında kemik rejenerasyonu ve kırık kaynama alanındaki mineralizasyon düzeyi üzerine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, 6. haftada alınan femur dokularında yapılan Von Kossa boyama ile kırık kaynama hattında yoğun bir şekilde mineralizasyon geliştiği belirlenmiştir (Güven vd., 2022). Sıçanlarda oluşturulan kritik tibia defektlerinin iyileşmesi üzerine yapılan bir başka çalışmada ise kuersetin içeren biyomateryal uygulamasının etkileri araştırılarak 4. ve 8. haftada mineralizasyon düzeyleri belirlenmiştir. Bu çalışmadan elde edilen verilere göre 8. haftada mineralizasyon düzeyinin 4. haftadaki mineralizasyon düzeyinin kuersetin içeren biyomateryal uygulanan grupta anlamlı şekilde arttığını göstermiştir (Ren vd., 2022). Deneysel osteotomi yapılan femur kırıkları modelinde, eksternal fiksatör uygulamasının kaynama üzerine etkileri araştırılmış ve çalışmanın 3. haftasında mineralizasyon miktarının travma gurubuna göre anlamlı şekilde yüksek olduğu gözlenmiştir (Zhang vd., 2024).

Kemik İyileşmesi ve ALP

Kemik kırıklarının etkili bir şekilde iyileşmesi için kırık hattında mineralizasyon birikimi ile birlikte kolajen birikimi de gerekmektedir. Kemik dokuda kolajen birikimi ve mineralizasyonun esas modülatörü osteoblastlardan salınan bir enzim olan ALP'dir (Chen vd., 2021).

ALP kemik rejenerasyonunda özellikle mineralizasyondan sorumludur. ALP mineralize doku hücrelerinden yüksek miktarda salgılanır, inorganik fosfat seviyesini artırarak mineralizasyonu kolaylaştırır, fosfat içerikli bileşikler hidrolize eder ve kemikte kalsiyum çökmesini sağlar. Buna ek olarak ALP'nin Tip I kolajene afinitesinin yüksekliği, kemik dokuda kolajen birikimini de sağlar. Yapılan çalışmalar serum ALP seviyelerinin kemik onarımı ve yeni kemik oluşumu ile korele olarak artış gösterdiğini ortaya koymuştur (Rasoulzian vd., 2024; Vimalraj, 2020; Yao vd., 2024). ALP ekspresyonlarının düzeyi ve serum ALP düzeyi analizleri deneysel kemik kırıkları çalışmalarında kemik rejenerasyonunun belirlenmesi için sıklıkla kullanılmaktadır.

Kemik kırıklarını takiben osteoblastlarda ALP'nin mRNA ekspresyonu artmaya başlar. ALP artışı defekt alanında mineral birikimini sağlar. Yapılan deneysel çalışmalar ALP mRNA seviyelerinin kemik kırıklarının iyileşme sürecinde in vitro 5. ve 14. günlerinde; in vivo ise 14. gününde arttığını göstermektedir. Serum ALP seviyeleri ise ancak 15. günden itibaren ölçülebilir bir düzeye ulaşır (Komnenou vd., 2005; Ponzano vd., 2023). Antihipertansif bir ilaç olan Amplodipin ve trombosit zengin plazmanın (PRP) kemik kırıklarının iyileşmesi üzerine etkilerinin araştırıldığı deneysel kemik defekti çalışmasında, Amplodipin/PRP uygulamasının kemik mineralizasyonunu ve ALP ekspresyonlarını 21. günde anlamlı düzeyde artırdığı belirlenmiştir (Atalay vd., 2015). Allojenik osteoblastlar kullanılarak yapılan bir diğer çalışmada ise, sıçanlarda oluşturulan kalvaryal defekt alanına lokal olarak osteoblast uygulaması gerçekleştirilmiş ve 4. haftada doku örnekleri alınarak kemik rejenerasyonu düzeyi belirlenmiştir. Buna göre 4. haftada ALP gen ekspresyonlarının allojenik osteoblast uygulanan grupta anlamlı olarak arttığı saptanmıştır (Souza vd., 2018).

Bitkisel özlerden oluşan bir karışımın lokal uygulamasının yapıldığı bir kritik kalvaryal defekt modelinde, sıçanların 4. ve 6. haftalarda mineralizasyon ve kolajen seviyelerinin anlamlı bir şekilde arttığı belirlenmiştir (Lee vd., 2018). Sıçanlarda oluşturulan kalvaryal kemik defekti modelinde ALP seviyelerinin araştırıldığı bir başka çalışmada ise, lokal paratiroid hormon uygulamasının, ALP ekspresyonunu 15. günde anlamlı düzeyde artırdığı bildirilmiştir (Auersvald vd., 2017).

Beta-trikalsiyum fosfat ve beta-kalsiyum silikatın kombine lokal uygulamasının sıçanlarda oluşturulan kalvaryal kemik defekti modelinde, materyalin 6. haftada ALP ekspresyon seviyelerini artırarak kemik mineralizasyonunu ve bunun yanı sıra kolajen birikimini hızlandırdığı belirlenmiştir (Xu vd., 2018).

Deve diken bitkisi ekstraktının 15 günlük uygulamasının kemik defektlerinin iyileşmesinde ALP seviyelerini 21. günde anlamlı düzeyde artırdığı görülmüştür (Kim vd., 2012). Yapılan çalışmalardan elde edilen veriler kırık sonrası erken dönemde ALP artışının kemik remodelingi ve rejenerasyonu için kritik olduğunu göstermektedir.

Kemik İyileşmesi ve TRAP

Kemik kırıklarının iyileşme sürecindeki önemli basamaklardan biri onarım fazında oluşan yumuşak kallusun, kompakt kemik oluşabilmesi için remodeling evresinde rezorbe edilmesidir. Remodeling evresinde bu rezorpsiyon osteoklast aktivitesiyle gerçekleşir. Osteoklastlar rezorpsiyonu salgıladıkları TRAP enzimi ile gerçekleştirir. TRAP lizozomal kaynaklı bir enzimdir, osteoklastik aktivitenin ve kemik rezorpsiyonun en önemli göstergesidir (Ballanti vd., 1997).

Rezorpsiyon ve TRAP aktivitesi yeni kemik oluşumunu ve yeni kemiğin mekanik yüklenme yeteneğini yeniden kazanması için önemlidir. TRAP enzimi yoğunluğu, kemiğin

remodeling etkinliğinin belirlenmesi ve mekanik rejenerasyon düzeyinin ölçülmesinde kullanılır (Yılmaz vd., 2024). Kemik remodelingi başladığında dokuda TRAP seviyeleri artmaya başlar ve osteoklastların diferansiyasyonu gerçekleşir (Blumer vd., 2012). Böylelikle yeni kemik oluşumu osteoblast aktivitesini de içeren dengeli bir süreç halinde devam eder.

Osteoklastik aktivitenin önemli bir belirteci olan TRAP enzim aktivitesi deneysel çalışmalarda sıklıkla kullanılmaktadır. Sıçanlarda oluşturulan deneysel tibia fraktürlerinin iyileşmesinde, Psoralen'in etkileri araştırılmış ve çalışmanın 3. ve 7. günlerinde elde edilen tibia dokularında TRAP pozitif hücrelerin sayısının arttığı belirlenmiştir. Bu çalışmada Psoralen'in osteoklast aktivitesini artırıcı etki gösterdiği belirtilmiştir (Zhang vd., 2019). Elektromanyetik rezonans uygulamasının kemik rejenerasyonu üzerine etkilerinin araştırıldığı farelerde tibia fraktürü modelinde, 14. ve 28. günde elde edilen dokularda TRAP pozitif hücrelerin yoğunluğu araştırılmıştır. Buna göre elektromanyetik rezonans uygulamasının 28. günde TRAP pozitif hücre sayısını anlamlı düzeyde azalttığı belirlenmiştir. Bu çalışmada elektromanyetik rezonans uygulamasının TRAP enzimi seviyelerini azaltarak, yeni kemik oluşumunu hızlandırdığı belirtilmiştir (Wang vd., 2023). Hidroksiapatit kristalleri ve fosfotidil serin içeren lipozomların kalvaryal defekt modelinde 4. ve 8. haftalarda TRAP enzim aktivitesi üzerine etkileri araştırılmış, 4. haftada TRAP enzim aktivitesinin arttığını ve 8. haftada ise azaldığı görülmüştür (Hatakeyama vd., 2019). Rekombinant Tip I kolajen tedavisi yapılan kritik kalvaryal defekt modeli iyileşmesinde, TRAP pozitif hücre sayısının 4. ve 8. haftalarda arttığı ve 12. haftada ise anlamlı olarak azaldığı gözlenmiştir. Bu durum 12. haftada yeni kemik oluşumunun tamamlanmış olduğunu düşündürmektedir (Chimedtseren vd., 2023).

Kemik İyileşmesi ve BMP2

Kemik kırıklarını takiben hızlıca intramembranöz veya endokondral kemikleşme süreçleri başlar. Bu süreçlerde birçok molekülün (ALP, OPG, COL1 ve BMP2/4) ekspresyonunda artış gerçekleşir. Bunlardan birisi olan BMP2, 1-2 gün içinde periosteumda

ekspresyonu artan bir moleküldür. Bu artış BMSC'lerin hızlıca osteoblastlara diferansiyasyonunu kolaylaştırarak, kırık onarımı ve yeni kemik oluşumunu başlatır (Dumic-Cule vd., 2018). TGF- β ailesinin bir üyesi olan BMP2, kemik dokuda kök hücre diferansiyasyonunu indükleyen önemli bir proteindir ve 2002 yılında Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından kemik kırıklarının tedavisinde terapötik ajan olarak kullanımı onaylanmıştır (Fuchs vd., 2021).

Kemik kırıklarının rejenerasyonunun araştırıldığı deneysel çalışmalarda BMP2 hem tedavi edici ajan olarak kullanılmış hem de kullanılan biyomateryallerin osteoindüktif etkileri dokudaki BMP2 seviyeleri ölçülerek incelenmiştir. Sıçanlarda mandibula defekti sonrası ergosteroid ve risedronat'ın kombine uygulamasının 2. ve 4. haftalarda BMP2 ekspresyonlarında artışa sebep olduğu belirlenmiştir (Xu vd., 2021).

Başka bir çalışmada ise, şeftali çekirdeği özünün sıçanlarda oluşturulan femur fraktürlerinin iyileşmesi üzerine olan etkileri araştırılmış ve 4. haftada alınan doku örneklerinde BMP2 ekspresyon seviyesinin arttığı ve kırık kaynamasının olduğu saptanmıştır. BMP2'nin bu etkilerini kemik hücresi membranındaki reseptörüne bağlanarak nükleus Runx2 ekspresyonunu artırarak gerçekleştirdiği ileri sürülmüştür (Jun vd., 2023).

Kritik kalvaryal defekt modelinde magnezyumla zenginleştirilmiş ksenograft uygulamasında, 21. günde kalvaryal kemik örneklerinde immünohistokimyasal analizler yapılmış ve ksenograft uygulanan gruplarda BMP2 pozitif hücre sayısının anlamlı düzeyde arttığı, greftin yeni kemik oluşumunu hızlandığı belirlenmiştir (Čandrlić vd., 2024). Periodontal ligament kök hücrelerinden elde edilen eksozomların kritik kalvaryal defekt modelinde osteoindüktif etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada ise 6 haftalık tedavi sonrasında kalvaryal kemikte BMP2 ekspresyon seviyelerinin arttığı bildirilmiştir (Albougha vd., 2024). Resveratrol'den elde edilen karbon dotların kemik iyileşmesi üzerine etkilerinin araştırıldığı kritik kalvaryal defekt modelinde, 21. günde elde edilen kalvaryal kemik örneklerinde BMP2 seviyelerinin arttığı, kritik defektin kontrol grubuna göre daha iyi bir

iyileşme gösterdiği belirlenmiştir (Somasundaram vd., 2024). Tüm bu veriler kemik iyileşmesinde BMP2'nin hem iyi bir rejenerasyon belirteci olduğunu hem de kemik defektlerini tedavi edici bir ajan olarak kullanılabileceğine işaret etmektedir.

Kemik İyileşmesi ve Runx2

Kemik kırıklarının rejenerasyonu için osteoprogenitör hücrelerin osteoblastlara proliferasyonu ve kırık hattına migrasyonu, yeni kemik oluşumunun sağlanmasındaki en kritik basamaklardan bir tanesidir. Bu evrede osteoprogenitör hücrelerin diferansiye olması kemik dokudan salgılanan bazı faktörlere bağlıdır (Liu vd., 2011). Bunlardan bir tanesi olan ve multipotent kök hücrelerinde, osteoblastlarda ve kondrositlerde sentezlenen Runx2 iskelet gelişimi için önemli bir transkripsiyon faktörüdür. Runx2 ekspresyonunun artışı BMSC'deki Tip 1 kolajen, ALP ve osteokalsin gibi osteoblastik belirteçlerin ekspresyonunu indükler (Carbonare vd., 2012). Runx2 kondrositlerin osteoprogenitör hücrelere ve osteoblastlara diferansiyasyonunu stimüle eder ve böylelikle trabeküler kemik gelişimine katkıda bulunur (McGee-Lawrence vd., 2014).

Runx2 kemik kırıklarının remodeling evresinde yeni kemik oluşumu için gerekli olan proteinlerin sentezini uyarıcı etki gösterdiğinden yeni kemik oluşumu ve rezorbsiyonu arasındaki dengenin belirlenmesinde önemlidir (Kim vd., 2020). Umbilikal kord kök hücre tedavisinin, kritik kalvaryal defekt modelinde iyileştirici etkilerinin 4. haftada görüldüğü ve elde edilen dokularda Runx2 seviyelerinin arttığı belirlenmiştir. Ek olarak tedavi gruplarında gerçekleştirilen mikro bilgisayarlı tomografi görüntülemesinde onarılmış kritik defekt alanının kontrol grubuna göre daha büyük olduğu gözlenmiştir (Stanton vd., 2024). Kemik kırıklarında tedavi edici ajan olarak BMP2 kullanımının kritik kalvaryal defekt modeli oluşturulan sıçanlarda 6. haftada Runx2 ekspresyon seviyelerini artırdığı belirlenmiştir. BMP2 bu etkisini kemik hücrelerinde Runx2 ekspresyonlarının artışıyla stimüle ederek göstermiştir (He vd., 2024). Umbilikal korddan elde edilen Wharton jölesinin sıçanlarda oluşturulan kalvaryal defektlerin iyileşmesi üzerine etkileri ve Runx2 ekspresyon seviyeleri

incelenmiş ve Wharton jölesinin lokal uygulamasından sonraki 21. günde yapılan immünohistokimya analizi ile Runx2 pozitif hücrelerin sayısını arttırdığı belirtilmiştir (Fu vd., 2024). Yapılan çalışmalar değerlendirildiğinde Runx2'nin kemik rejenerasyonu düzeyini gösteren önemli bir belirteç olduğu görülmektedir.

Kemik İyileşmesi ve VEGF

Kemik kırıklarında hasarlı alanın yeniden kanlanması, oksijen ve besin taşınması rejenerasyon süreci için önemlidir. Anjiyogenez kemik iyileşmesinin inflamatuvar fazında başlar ve remodeling sürecine kadar devam eder. Anjiyogenezis birçok büyüme faktörü tarafından aktive edilse de en önemli stimulan faktör VEGF'dir (Komori, 2022). VEGF yeni damar oluşumunu sağlamak üzere inflamatuvar ve stromal hücrelerden sentezlenir, fakat VEGF'in asıl kaynağı osteoblastlardır.

VEGF seviyesi kemik remodelinginin etkinliğinin önemli bir bulgusudur. VEGF ayrıca osteoklast üzerindeki VEGF reseptörüne (VEGFR1) de bağlanarak, osteoklastik diferansiyasyonu ve aktivitesini de düzenler (Hu ve Olsen, 2016).

Mir26a'nın osteoindüktif etkilerini araştırmak üzere kritik kalvaryal defekt modeli oluşturulan sıçanlarda, 4 ve 8 hafta süre ile mir26a içeren biyomateryal uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlar 4. ve 8. haftada kalvaryum dokularında VEGF ekspresyonlarının ve yeni damar oluşumunun 4. haftada daha fazla olmak üzere her iki haftadaki ölçümlerde anlamlı olarak yüksek olduğunu göstermiştir (Sadowska vd., 2023). Hiperbarik oksijen tedavisinin kalvaryal defekt rejenerasyonunda VEGF ekspresyon seviyelerini 6. haftada anlamlı olarak arttırdığı ve normobarik oksijen uygulamasına oranla kemik rejenerasyonunda daha etkili olduğu gösterilmiştir (Fok vd., 2008). Antiinflamatuvar bir ajan olan Resolvin D-1'in kritik kalvaryal defektlerin iyileşmesi üzerine etkileri 4 haftalık uygulama ile araştırılmış, 8. haftada elde edilen kalvaryal kemik dokularında VEGF seviyelerinin kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde arttığı belirlenmiştir (Jiang vd., 2022). Overektomize sıçanlarda oluşturulan

kritik kalvaryal defekt modelinde, Catalpol'un STAT3 yolağı inhibisyonu ile kemik rejenerasyonu sağlayarak, 8. haftada VEGF ekspresyonlarını anlamlı düzeyde artış sağladığı gösterilmiş ve STAT3 inhibiyonunun osteoporotik kırıklarda etkili bir yolak olduğunu belirlenmiştir (Chen vd., 2021). VEGF düzeyinin belirlenmesi kemik kırıklarının rejenerasyonunun belirlenmesi açısından oldukça kritiktir. VEGF ile indüklenen yeni damar oluşumu ile kırık alanına yeniden oksijen ve besin taşınmasının sağlanması kemik remodelingi için önemlidir.

1.3.4.Kemik İyileşmesinde Güncel Klinik Uygulamalar

Kemik rejenerasyonu moleküler, hücre, biyomekanik faktörler, immün hücreler ve büyüme faktörlerinin entegrasyonunu içeren kompleks patofizyolojik bir süreçtir. Bu süreçler kapsamında kemik kırıklarının iyileşmesi haftalardan aylara hatta yıllara varan uzun bir süre gerektirir. Bu süre boyunca hastalar immobilize olurlar, sosyal ve iş hayatından izole olmak zorunda kalırlar. İmmobilizasyonun süresinin negatif sosyo-ekonomik etkilerinden dolayı, kemik kırıklarının kaynaşmasını ve iyileşmesini hızlandıracak yöntemlerin geliştirilmesi oldukça önemli hale gelmiştir.

Kemik kırıklarının eksternal uygulamalarla onarımının tarihi M.Ö 2500-3000 yıllarına dayanmaktadır. Bilinen en eski kırık stabilizasyon uygulaması Mısırlıların kullandığı ağaç lifleri ve sopalarla yapılan atel uygulamasıdır. Geniş çaplı kemik defektlerinin onarımı için ise ilk otogreft 1821 yılında bir Alman ortopedist olan Philipp Franz von Walther tarafından kranyum kemiği tamirinde kullanılmıştır (Donati vd., 2007). Günümüzde ise kemik defektlerinin veya kırıklarının tedavisinde genellikle defekt alanı küçük ve kırık fragmanları birbirinden çok ayrılmamışsa, anatomik dizilimin tekrar sağlanması için cerrahi fiksasyon yapılmakta, fakat defekt alanı geniş ise greftleme yöntemleri (otogreft, allogreft, ksenogreft veya sentetik greftler) uygulanmaktadır.

Güncel greft uygulamaları arasında birçok yöntem bulunmasına rağmen, otogreft yöntemi altın standart bir metot olarak geniş kemik defektlerinin tamirinde kullanılmaktadır.

Bununla birlikte, greft materyalinin yetersizliği veya uygulandıktan sonra otogreftin ana kemiğe kaynamama riskine bağlı komplikasyonların varlığı bu yöntemin optimize edilmesi gerekliliğini işaret etmektedir.

1.4. Kemik Greftleri

Kendiliğinden iyileşemeyen kritik boyutlu kemik defektlerin tedavisinde hasarlı alana implant veya greft uygulaması yapılır. Greft olarak uygulamalarında allogreft, kesnogreft gibi doğal greftler veya sentetik greftler kullanılır. Bunlar arasında otogreft uygulaması “altın standart” uygulama olarak tanımlanır. (Baldwin vd., 2019).

Bir insandan diğerine bir kemik parçasının nakledilmesi veya bir uzvun nakledilmesi binlerce yıldır uygulanan bir yöntemdir. İlk otolog greft uygulaması 1820 yılında trepanasyondan sonra kafatasının bir parçasını değiştiren cerrah Philips Von Walter tarafından Almanya'da gerçekleştirilmiştir. Günümüze kadar otolog greft uygulaması tüm diğer greft uygulamalarından (allogreft, ksenogreft, sentetik greftler) her zaman daha iyi sonuçlar vermiştir ve halen yaygın olarak kullanılmaktadır (Donati vd., 2007). Otogreft olarak kansellöz, vaskülerize olmayan kortikal veya vaskülerize kortikal kemikler kullanılabileceği gibi kemik iliğinin kendisi de kullanılabilir. Otogreftin osteojenik, osteokondüktif ve osteoindüktif etkileri kullanılan otogreft çeşidine bağlı olarak değişir.

Kansellöz kemik otogreftlerinin osteoindüktif etkilerinin iyi bilinmesine rağmen, proteinlerin ve sitokinlerin otolog kansellöz greftte aktif olup olmadığı bilinmemektedir. Kortikal kemik greftleri ise mekanik olarak dayanıklılık gösterme ve büyük kemik kayıplarının greftlenmesinde miktar olarak yeterli olma gibi avantajlara sahiptirler. Bu nedenlerle insanlarda otolog kemik grefti 5-6 cm ve üzeri kemik kayıplarında tercih edilmektedir. Bununla birlikte 12 cm ve üzeri genişlikte kemik kaybı olduğu durumlarda, damarlı olmayan greftler % 25-50 oranında başarısız olmaktadır (Wang ve Yeung, 2017). Bu türden kritik kemik kayıplarında damarsız greftler yeni kemik oluşumunu sağlamada yetersiz kalır. Bu sebeple kritik boyutlu kemik defektlerinin tamirinde damarlı greftlerin

kullanılması önerilirken, greft transplantasyonu sırasında damarlı greftlerin vasküler yapıya zarar verilmeden alınması neredeyse imkansızdır.

Otogreft uygulaması için greft alınan vücut bölgeleri genellikle uzun kemikler ve iliak kanattır, fakat en sık tercih edilen vaskülerize fibula greftidir. Graft alınan bölgelerde donör saha problemleri ortak bir sorundur. Buna ek olarak donörde uzun süreli ağrı, operasyon sırasında kan kaybı, greft alınan bölgede ağrı ve yetersiz greft materyali elde edilmesi gibi komplikasyonlarla yaygın olarak karşılaşılır (Jakoi vd., 2015).

Klinik uygulamada kullanılan otogreftler 2 tiptedir. Bunlar;

1. Kanselöz otogreftler, otolog kemik grefti yöntemleri arasında en yaygın olarak kullanılan greft türüdür. Bu greft türünde az miktarda osteoblast ve osteosit elde edilirken bol miktarda MSC elde edilir. Bu sayede yeni kemik oluşumu için gereken osteojenik potansiyel ve osteoindüktif etki oranı artar. Graft uygulamasını takiben kemik iyileşme süreçlerinden hematoma ve inflamasyon fazları başlar. Bu süreçte greft, makrofajlar tarafından elimine edilir ve neovaskülarizasyon görülür. Otogreftin de etkisiyle osteoblastlardan osteoid üretilir. Yeni kemik doku ile greft doku zamanla yer değiştirir ve 6-12 aylık bir süre zarfında kemiğe yeni şekli verilir (Schmidt, 2021).

2. Kortikal otogreftler düşük miktarda osteoprogenitör hücreler içermesine rağmen üstün dayanıklılık ve mekanik destek sağlarlar. Kanselöz greftin aksine, kortikal greftlerin sert yapısı nedeni ile remodeling ve revaskülarizasyon evreleri şekillenmez ve yeni kemik oluşumu özellikle osteoklastların aktivasyonu ile hematoma ve inflamasyon evrelerini takiben başlatılır. Kortikal otogreftleme yönteminde greftin büyüklüğü ve hasar alanının genişliğine bağlı olarak yeni kemik oluşumu yıllar sürebilmektedir (Roberts ve Rosenbaum, 2012).

Otogreft dışında kullanılan greft materyallerinden allogreftler, insan kadavralarından elde edilen ve sterilize edilerek alıcıya uygulanan bir greft türüdür. Allogreftler donörden alıcıya ulaştırılma sürecinde osteoindüktif etkilerini kaybedebilmektedir. Donör kaynaklı

patojen taşıma riski ve uygulanma koşullarının zorluğu nedeniyle klinik kullanımı kısıtlıdır (Bray vd., 2017).

Ksenogreft, genetik olarak farklı bir türden doku transferidir. Ksenogreftler aşırı bağ doku gelişimine ve gecikmiş vaskülarizasyona neden olabilmektedir (Flanagan vd., 1994). Allogreftler ve ksenogreftler donör bulma açısından kolaylık sağlasa da osteojenik, immün reaksiyon ve patojen taşıma risklerinden dolayı greft uygulamalarında otogreftler kadar tercih edilmemektedir.

Sentetik greftler ise non-osseöz materyallerden hazırlanan kemik greftleridir. Sentetik greftler bir patojen veya hastalık taşıma riski göstermemelerinin yanı sıra greft uygulanacak alan için istenilen şekilde üretilebilme gibi avantajlara da sahiptirler. Fakat sentetik greftlerin osteoindüktif veya osteokondüktif etki oluşturma kapasitesi oldukça sınırlıdır. Bu nedenle sentetik greftlerin osteointegratif içeriklerle kombine edilmeleri gerekir (Cook ve Cook, 2009).

1.5. Kırıklarda Kaynamama

Kemik kırıklarında kaynamama durumu için literatürde birçok tanımlama bulunmaktadır. FDA'nın tanımına göre kaynamama, kırığın gerçekleşmesinden 9 ay geçmesine rağmen art arda 3 ay boyunca iyileşme ile ilgili radyolojik veya biyolojik hiçbir kanıt olmaması durumudur.

Farklı kaynaklarca kaynamama, ileri bir girişim yapılmaksızın kesinlikle iyileşmeyecek kırık olarak tanımlanmıştır (Bray vd., 2017). Bununla birlikte kaynamama durumu ileri müdahalelere rağmen de görülebilmektedir. Örneğin geniş kemik defektlerinin onarımında altın standart metot olarak kullanılan otogreft uygulamalarının en önemli komplikasyonlarından biri de yine kaynamama sorunudur. Greft uygulanan bölgede defekt alanında kaynama olmadığının belirlenmesi için bir tanım henüz bulunmamaktadır. Greft uygulaması üzerinden yirmi üç ay geçmiş olmasına rağmen klinikte ağrı semptomunun devam etmesi ve radyolojik incelemede iyileşme görülmemesi kaynamama olarak

tanımlanmaktadır (Gómez-Barrena ve Ehrnthaller, 2024). Kaynamama komplikasyonları uzamış farmakoterapi ve immobilizasyona, morbiditeye ve sosyo-ekonomik hayattan uzak kalmaya neden olmaktadır.

Greft uygulamalarından sonra ortaya çıkan kaynamama riskinin en önemli sebeplerinden biri yetersiz greft materyalinden dolayı greftin ana kemik ile yetersiz temas sağlamasıdır. Bu durum tekrar cerrahi prosedürler gerektiğinden hastanın yaşam kalitesini oldukça olumsuz etkiler. Özellikle geniş çaplı defektler için gerçekleştirilen otogreft uygulamalarında, yetersiz greft materyalinden dolayı ana kemikten gelişmesi beklenen osteoindüktivite, osteokondüktivite ve anjiyogenezisin yetersizliği kaynamama ve rejenere olamama ile sonuçlanmaktadır (Jain vd., 2015).

Bir greftin kaynama sağladığını gösteren klinik bulgular greftlenmiş defekt alanına ağrısız mekanik yüklenmedir. Radyolojik olarak ise kırık hattında kallus görüntülenmesi kaynamanın gerçekleştiğini gösterir (Davulcu vd., 2024). Greft uygulamasında başarılı sonuçlar alabilmek için kaynama bölgesinde anjiyogenezisin ve osteoblast migrasyonunun sağlanması gerekir. Bunu sağlamak için greft uygulanırken avasküler kısımların uzaklaştırılması gerekir. Mekanik dayanıklılığın sağlanması için ek bir doku hasarına neden olmayan uygun bir cerrahi teknik kullanılması oldukça değerlidir. Mekanik sağlamlığı sağlayabilecek gelişmiş cerrahi teknikler, vasküleriteyi sağlayabilecek otolog kansellöz greftler olsa da greftlerde halen osteoindüktivite oranları düşüktür ve yeterince greft materyali bulunamama gibi dezavantajlar bulunmaktadır (Sheikh vd., 2015). Tüm bu nedenlerle kemik doku mühendisliği alanında bu sorunlara çözüm getirecek yenilikçi ürünlere yönelik çalışmalar günümüzde halen devam etmektedir.

1.6. Doku Mühendisliği

Doku mühendisliği mühendislik metot ve prensiplerinin tıp ve fizyoloji uygulamalarına uyarlanarak, insan vücudundaki dokulara benzer yapılar üretilmesine veya

hasarlı dokunun rejenerasyonuna olanak sağlayacak materyallerin geliştirilmesine odaklanmış bir biyomedikal mühendislik alanıdır (Olson vd., 2011).

Doku mühendisliği uygulamaları son yirmi yılda hızlı bir gelişme göstermiştir. Bu alanda yapılan çalışmalarda farklı doku ve organlar için çeşitli yapı ve içeriklerde biyomateryaller üretilmiş ve etkinliği değerlendirilmiştir (Catalano vd., 2013). Doku mühendisliği alanında kullanılan materyaller insan, hayvan veya insan/hayvan doku kombinasyonu içerecek şekilde olabileceği gibi tamamen sentetik materyalleri içerek şekilde de hazırlanabilir. Bununla birlikte sentetik materyallere molekül, ilaç veya kök hücre yüklenerek insan veya hayvandan elde edilen yapılara oranla daha yüksek verim ve olumlu sonuç elde edilebilen materyaller de üretilebilmektedir (He ve Olsen, 2016). Doku mühendisliği alanı bu türden çeşitli materyallerin üretimini sağlayarak organ kaybı, doku hasarı veya farklı klinik patolojilerde hastalara umut vadetmektedir (Olson vd., 2011).

Doku mühendisliği yapay doku mühendisliği, tendon doku mühendisliği, deri doku mühendisliği, oküler doku mühendisliği gibi çok geniş bir yelpazede klinik uygulamaya hitap etmektedir. Son yıllarda önemi hızla artan alanlardan bir tanesi Kemik Doku Mühendisliğidir.

1.6.1. Kemik Doku Mühendisliği

Kemik doku mühendisliği, doku mühendisliği yöntemleri ile yapay kemik oluşturma ve kemik rejenerasyonunu sağlamak amacı ile hücre veya osteoindüktif bir molekül taşıyabilen ve doku desteği sağlayan materyallerin üretimini ve etkinliğini inceleyen bir doku mühendisliği dalıdır (Aykora ve Uzun, 2024). Bu alanda geliştirilen biyomateryaller kemik rejenerasyonunu hızlandırarak, kemik kırıklarında veya kayıplarında hastaların uzun yatış süresini veya medikal tedavi alma sürelerini kısaltarak hızlı iyileşme sağlayabilecek materyallerdir.

Kemik doku eşsiz bir iyileşme yeteneğine sahiptir. Fakat iyileşme sürelerinin aylar veya yıllar sürmektedir. Ayrıca geniş çaplı kemik kayıplarında ise yeniden kemik oluşumunu sağlayabilecek bir greft materyaline ihtiyaç duyulmaktadır. Bu nedenlerle greftlerin ana kemikle kaynaşmasını hızlandıracak ve yeni kemik oluşumunu uyaracak tedavi yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Kemik doku mühendisliği bu alanda yeni ürünler geliştirilmesine yönelik çalışmalar yapmaktadır. Bu alanda geliştirilecek ürünlerin taşınması gereken temel özellikler aşağıda verilmiştir.

- (a) Kullanılan biyomateryal biyouyumlu ve kemik ECM'sine benzer yapıda olmalıdır
- (b) Uygulanan greft materyali doğal kemik doku oluşumundaki süreçlerde olduğu gibi rezorbe edilebilmeli ve yeni kemik oluşumuna izin vermelidir (biyobozunurluk)
- (c) Osteojenik hücrelerin yerleşebileceği bir iskele karakteristiğine sahip olmalıdır (osteokonduktivite),
- (d) Osteojenik hücrelerin proliferasyonunu ve diferansiyasyonunu sağlama yeteneği göstermelidir (osteoindüktivite),
- (e) Vaskülarizasyonu sağlayacak özellikler taşınmalıdır (Amini vd., 2012).

Yukarıda belirtilen özellikler kemik doku mühendisliği alanında üretilecek bir biyomateryalin kemik rejenerasyonunu sağlayabilmesi için taşınması gereken optimal özelliklerdir. Bununla birlikte kullanılacak olan greft materyalinin çeşitli hücre veya moleküller ile zenginleştirilerek osteointegratif katkısı artırılabilir (Qu vd., 2019). Bu amaçla üretilen ve kayba uğramış bir organ ve dokunun yerini alabilecek veya hasarlı dokunun rejenerasyonunu sağlayabilecek doğal veya sentetik temelli, bir veya birden fazla maddeden oluşan yapılar biyomateryaller olarak tanımlanırlar. İlgili organ veya doku hasarına/kaybına uygun, tüm ideal özellikleri içeren bir materyal mevcut olmadığından kullanılan biyomateryallerin olumlu özellikleri birleştirilerek çeşitli biyomateryaller üretilebilmektedir.

Kemik doku mühendisliği alanında geliştirilen biyomateryaller yukarıda belirtilen özellikler çerçevesinde hem bir iskele özelliği taşıyabilen hem de rejeneratif etki gösteren

kombinasyonlardan seçilir. Bu amaçla üretilecek olan biyomateryalin öncelikle hücrelerin tutunabileceği ve kemik ECM'sine benzer nitelikte olması gerekir. Bu sayede kemik doku mikroçevresine uygun ve dokunun primer ihtiyacına yönelik bir uygulama seçilerek doku rejenerasyonu hızlı bir şekilde sağlanabilir (Lee vd., 2014).

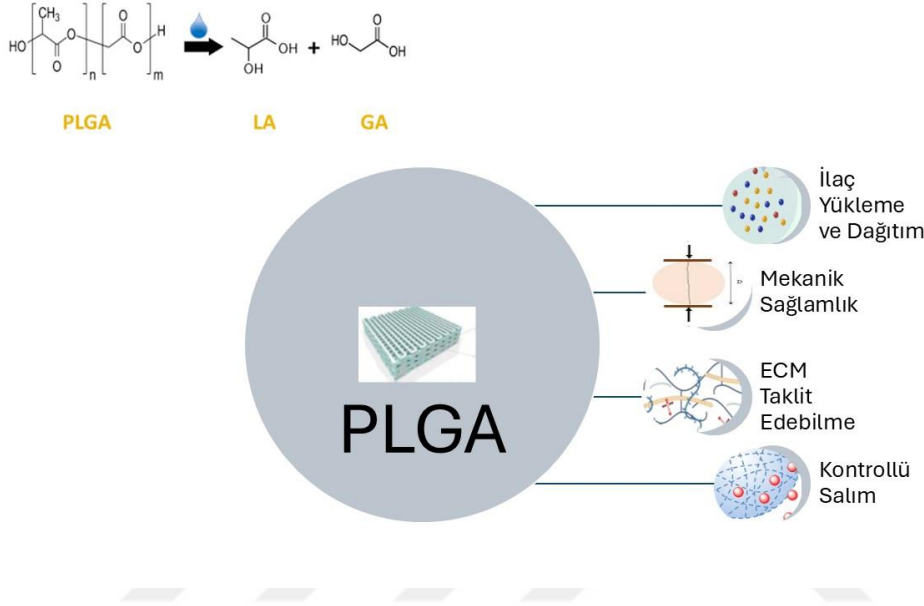
Kemik doku mühendisliği alanında iskele olarak kullanılabilme veya biyobozunum özelliği sayesinde kontrollü ilaç salımına imkân verebilen hidrojel, kitosan ve aljinat gibi doğal polimerik materyaller ile PLGA, poli-kaprolaktone (PCL), polilaktik asit (PLA), PMMA ve PVA gibi sentetik polimerik materyaller olmak üzere birçok farklı malzeme kullanılmaktadır (Trucillo, 2024). PLGA bunlar arasında en yaygın kullanılanlardan bir tanesidir.

1.6.2. PLGA

PLGA alifatik polyester polimer yapısında bir polimer olarak çok yönlü kimyasal taşıyıcılar şeklinde kullanılmaktadır. PLGA matriksinin biyouyumluluk, biyobozunurluk ve mükemmel fizikokimyasal ve mekanik özellikleri ile ilaç uygulaması ve doku mühendisliğinde kullanımı öne çıkmaktadır (Martins vd., 2017; Mirza-Aghazadeh-Attari vd., 2022). PLGA matriksinin biyobozunurluluğunun ve biyoemilirliliğinin süre bazında ihtiyaca bağlı olarak tasarlanarak üretilebilmesi ise bu matriksin önemli bir başka özelliğidir (Şekil 7). Bu açıdan PLGA çok yönlü kullanımı ve işlenebilirliği ile farmasötik teknolojide kendine önemli bir yer bulmuştur (Vlachou vd., 2022).

Son yıllarda yapılan çalışmalar ile PLGA matriksinin çeşitli kimyasal varyasyonlarla kombine olarak kullanımı ile hedef dokuda çözünme süresinin ayarlanabileceğini göstermiştir. Kontrollü biyoemilim ve biyosalıma izin veren bu özelliği PLGA'nın doku mühendisliği alanında kullanımını yaygınlaştırmıştır (Lee vd., 2023). Bu özelliklerinden faydalanılarak kemik doku mühendisliği alanında hücre infiltrasyonunu sağlayıcı PLGA yapıda matriks üretimleri gerçekleştirilmiştir (Jin vd., 2021). Kombine kullanılan kimyasallar arasında çeşitli ilaçlar, biyoseramikler, hidrojeller ve biyoaktif cam yer almaktadır. Kemik

hasarlarının onarımında PLGA matriksinin çeşitli ilaçlar ile kombine kullanımının kemik hasarları tedavisinin etkinliğini artırdığı belirlenmiştir. Yapılan in vitro çalışmalar PLGA ve melatonin bileşiminin kemik fraktürlerinin onarımında umut vadeci olduğunu ortaya koymuştur (Dziadek vd., 2023).

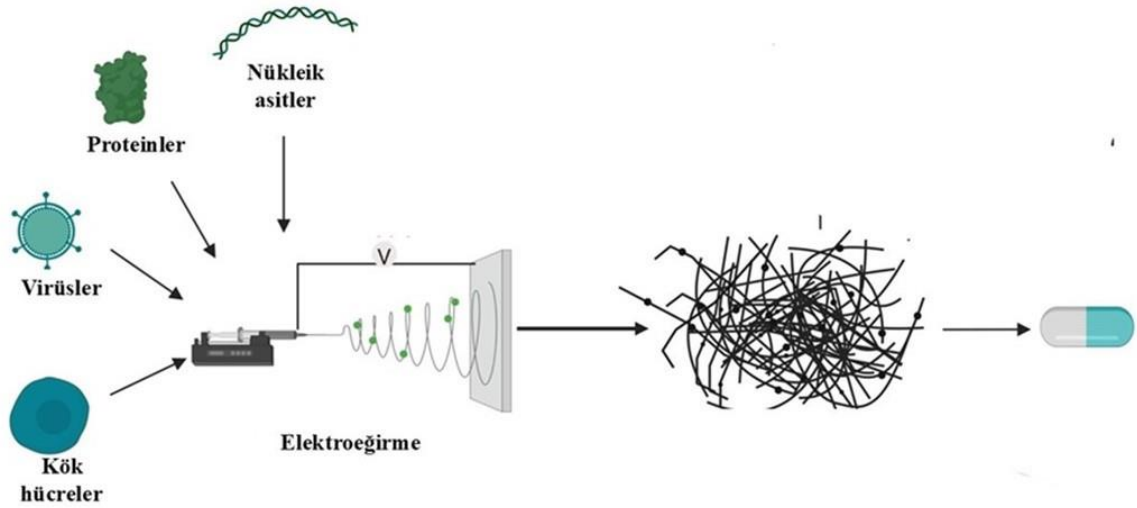


Şekil 7. PLGA'nın kemik doku mühendisliğinde kullanım alanları.

PLGA vb. polimerlerden üretilen biyomateryaller nanolif matriksler olarak da bilinirler ve hedeflenen aralıkta lif dağılımı, yüksek gözeneklilik, etkili mekanik dayanım ve spesifik biyokimyasal özelliklere sahiptirler. Gözenekli yapılarına bağlı olarak nanoliflerde ortaya çıkan geniş yüzey alanı/hacim oranı, hücre yapışmasını, çoğalmasını, göçünü ve farklılaşmasını destekler. Tüm bunlar doku mühendisliği çalışmaları için istenen özelliklerdir. Gözeneklerin birbirine bağlanabilirliğinin, in vitro ve in vivo kemik birikme hızını ve infiltrasyon derinliğini olumlu yönde etkilediği görülmüştür (Venugopal vd., 2008).

1.6.3. Elektroeğirme Yöntemi ve Nanolif Üretimi

Elektroeğirme yöntemi bir elektrik kaynağından polimer eriyiğine veya çözeltisine yüksek voltajlı akım uygulanarak, kimyasalın belli bir polariteye sahip karşıt elektrota doğru hızlandırılması esasına dayanan bir yöntemdir. Sıvıda bulunan benzer yüklerin birbirlerini itmesi ile zıt yüklü çözelti ve toplayıcı plaka arasındaki elektrostatik çekim artarak, çözeltinin ucundaki menisküs Taylor Konisi halini alır. Elektrik alanının gücü çözeltinin yüzey geriliminin üstüne çıktığı andan itibaren ise lif jeti Taylor Koni'sinden hızla toplayıcı plakaya doğru hareket eder. Bu sırada çözeltideki çözücü hızla buharlaşarak çözeltideki polimer toplayıcı plakada birikir. Elektroeğirme ile çapları mikrometre ile nanometre arasında değişen lifler üretilir (Kailasa vd., 2021).



Şekil 8. Elektroeğirme yöntemi ile çeşitli bileşenlerden nanolif üretimi (Stojanov ve Berlec, 2020).

Elektroeğirme mikro ve nanolifli yapıların üretimi için biyomalzemeler ve doku mühendisliği dahil birçok alanda aktif kullanılan ve sürekli gelişim gösteren bir tekniktir (Şekil 8; Stojanov ve Berlec, 2020). Bu yöntem ile geliştirilen biyomalzemeler doku mühendisliği alanında sıklıkla tercih edilmektedir. Kemik doku mühendisliği alanında ise

elektroegirme yöntemi hücre proliferasyonu ve adezyonunu sağlayan kompozit iskelelerin üretilmesi için kullanılır. Bu alanda elektroegirme ile üretilen liflerin kemik doku ECM'sini taklit edebilme yeteneği, kemik doku mühendisliği alanında elektroegirme yönteminin özellikle tercih edilme sebebi olduğu söylenebilir. Ayrıca, elektroegirme yöntemi ile üretilen nanolifler, kemik dokunun biyolojik özelliklerini taklit etmesini sağlamak için eş zamanlı olarak biyo-makromolekülleri kapsülleyebilir (Afsharian vd., 2023; Maji ve Pramanik, 2022).

Hangi yöntemle üretilirse üretilsin tüm biyomateryallerin kullanım amacına uygun üretilip üretilmediğinin belirlenmesi gerekir. Nanoliflerin morfolojik karakterizasyonu olarak bilinen bu ölçümler materyalin in vitro veya in vivo test uygulamasından önce yapılır.

1.6.4. Nanoliflerin Morfolojik Karakterizasyonu

Nanomateriyaller farklı boyut ve yüzey özelliklerine sahip bileşenlerden oluşurlar. Bu nedenle farklı karakteristik özellikler gösterirler. Doku mühendisliğinde nanomateriyaller tercih edilirken fiziksel ve kimyasal özelliklerinin iyi analiz edilmesi, son ürünün etkin kullanımının belirlenmesinde önemli bir yer tutmaktadır (Kaliva ve Vamvakaki, 2020). Analizi yapılacak fiziksel ve kimyasal özellikler olarak materyalin gözenekliliği, yüzey reaktivitesi, partikül boyutu ve çözünürlük gibi özellikleri sayılabilir. Kemik doku mühendisliği alanında üretilen polimerik materyaller genel olarak yüksek biyobozunurluk ve çözünürlük, kullanım amacına uygun gözeneklilik ile lif dağılımı gibi özellikleri yönü ile değerlendirilirler (Carbajal-De la Torre vd., 2022).

Materyallerin bu özelliklerinin karakterize edilmesi en yaygın olarak taramalı elektron mikroskobu (SEM), geçirimli elektron mikroskobu (TEM), X-ışını kırınımı (XRD) ve fourier kızılötesi spektrometresi (FTIR) yöntemleri kullanılır. Bu tekniklerden XRD ve FTIR, materyalin kimyasal yapısı hakkında bilgi verirken, SEM ve TEM ise morfolojik karakterizasyonu hakkında bilgi sağlar (Jayawardena vd., 2021).

XRD, malzemelerdeki kristal yapının karakterizasyonunun belirlenmesi için kullanılır. Malzemelerin yapıları, tane boyutları, kristalinitesi, gerinim gibi özellikleri bu teknik ile incelenir. Polimerik nanokompozitlerin yapısının belirlenmesinde ve proses kinetiği uygulamalarında XRD'den faydalanılır (Skakle, 2005).

FTIR, polimerik materyallerin karakterizasyonu için uygulanır. FTIR analizi ile biyomalzemenin, farklı dalga boylarındaki ışığı absorbe etme yeteneği ölçülür (Kowalczyk ve Pitucha, 2019).

SEM, nanomalzemelerin yapılarının morfolojisinin ve kimyasal karakterizasyonlarının analizi için kullanılan yöntemlerin başında gelir. SEM analizi ilk olarak 1960 yılında ticari amaçlı malzeme ve ilaçların üretiminde kullanılırken, sonraları ve günümüzde yüksek çözünürlük özelliği ve nano boyutlu materyallerin yüzey karakterizasyonu ve işlevlerinin tanımlanması uygulamalarında da kullanılmaya başlamıştır. SEM analizinde elektronların materyal içeriğindeki atomlarla etkileşime girmesi sonucunda numuneyi oluşturan bileşenler ile ilgili her türlü bilgi elde edilir (Valdrè vd., 1995).

1.6.5. Kemik Doku Mühendisliği ve Kemik İyileşmesi

Kemik doku mühendisliği alanında bugüne kadar kemik rejenerasyonunu sağlamak üzere birçok farklı yapısal özellikte ve içerikte biyomateryal üretilmiştir. Bu biyomateryallerin öncelikle osteokondüktif ve osteoindüktif özellikleri taşıması beklenir. Bu özellikleri sağlamak üzere kullanılan materyaller arasında taşıyıcı ve iskele olarak üretilen biyoseramikler, sentetik veya doğal polimerler gösterilebilir (Koons vd., 2020).

Biyoseramikler, inorganik biyomateryaller grubunda bulunur ve kemik doku mühendisliği alanında geniş bir kullanım alanına sahiptirler. Bu materyaller seramik, amorf cam ve cam seramikler olarak sınıflandırılmaktadır ve kemik doku mühendisliğinde özellikle iskele oluşturma özellikleri ile dikkat çekmektedir. Biyoseramik materyallerin bazı

türleri biyobozunurluk özelliğine de sahiptir. Yapılan çalışmalar bu tür biyomateryallerin kemik dokunun inorganik matriksine uygun iyonlar salımlamasına rağmen, osteogenezis ve anjiyogenez üzerine etkilerinin sınırlı olduğu, biyobozunurluğunun hızlı ve mekanik destek yeteneğinin ise yetersiz olduğunu göstermiştir (Gathani ve Raghavendra, 2016).

Polimerler kovalent bağlar ile birbirine bağlanan uzun atom zincirlerinden oluşan organik materyallerdir (Fraile-Martínez vd., 2021). Polimerler sentetik ve doğal polimerler olarak iki grupta incelenir. Her iki polimer türü de kemik doku mühendisliğinde sıklıkla tercih edilen polimerlerdir.

Doğal polimerler kitosan, aljinat, hidrojel, ipek, jelatin veya fibrinojen yapısında nanolif proteinlerdir. Doku mühendisliğinde kullanılacak olan malzemelerin biyoyoumlu olması gerekliliğinden dolayı, doğal polimerler sentetik polimerlere oranla daha yüksek avantajına sahiptir. Ek olarak hücre proliferasyonunu ve adezyonunu kolaylaştırabilmektedirler. Fakat doğal polimerler kaynaklarının az olması ve yüksek maliyet oranları nedeniyle doku mühendisliği alanında kullanımları kısıtlıdır. Ayrıca doku iskelesi olarak zayıf mekanik özellikler göstermeleri kemik doku mühendisliği alanında tercih edilmelerini azaltan bir diğer faktördür. Diğer taraftan doğal polimerlerden biyomateryal üretilmesi aşamalarında birden fazla kimyasala maruz kalması etkinliklerinde bir zayıflamaya neden olur (Guo vd., 2021). Tüm bu dezavantajlar nedeni ile son yıllarda doğal polimerler yerine sentetik polimer kullanım oranının arttığı görülmektedir.

Sentetik polimerler biyoyoumlu alifatik polyesterlerdir. Sentetik polimerler çok çeşitli bileşimler ile hazırlanabilme ve geniş bir yelpazede kullanıma uygun hale getirilme seçeneği sunarlar. Genellikle biyolojik olarak inert özellik taşıdıklarından kimyasal modifikasyonlara uyum sağlarlar. Bu avantajlarının yanı sıra sentetik polimerler kimyasal ve morfolojik olarak istenilen özellikte üretilebilir olma yeteneğine sahip olduklarından doğal polimerlere göre daha çok tercih edilirler (Yu vd., 2023).

Doku mühendisliğinde iskele olarak en sık kullanılan sentetik polimerler glikolid, laktid ve kaprolakton monomerlerinden türetilir. Sentetik polimerler biyoyumlu ve biyobozunur özellikler içerir. Sentetik polimerler vücut sıvısında içerisindeki ester bağlarının hidrolize olması sonucu bozulduğundan son ürünleri vücut için toksik değildir (Gunatillake vd., 2003). Dahası sentetik polimerler hidrofobik ve hidrofilik özellikleri ile osteoindüktif ve osteokondüktif etkilerini kolay bir şekilde gösterebilirler. Hidrofobik özellikleri sayesinde immünojenik özellik göstermedikleri için biyoyumlulukları yüksektir. Her ne kadar mekanik özellikleri doğal polimerlere oranla daha fazla olsa da sentetik polimerlerin kemik doku rejenerasyonunda biyolojik fonksiyonlarının potansiyelize edilmesi gerekliliği bulunmaktadır. Bu amaçla sentetik polimerlerle yapılmış ve polimerin ilaç, büyüme faktörü veya çeşitli hücreler için taşıyıcı olarak kullanıldığı birçok araştırma yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar sentetik polimerlerin farklı bir molekül veya hücre için ideal bir taşıyıcı olduğunu göstermektedir.

Kemik doku mühendisliği alanında en çok kullanılan sentetik polimerler PLA, PCL ve PLGA'dır (Yu vd., 2023). Bu polimerler in vivo non-enzimatik hidroliz ile bozundukları için son ürünleri toksik değildir. Sentetik polimerler materyallerin kemik doku mühendisliği çalışmalarında tercih edilmelerinin önemli avantajlarından biri de kimyasal yapılarının, kristalinitesinin, moleküler ağırlığının ve lif dağılımının istenilen ölçülerde üretilebilme yeteneğine sahip olmalarıdır. Bu polimerlerden PLA biyoyumlu, termal stabilite ve toksik son ürün oluşturmaması açısından kemik doku rejenerasyonuna katkıda bulunma gibi avantajlara sahiptir. Ancak, hücre adezyonu özelliğinin yetersiz olması, yavaş biyobozunurluk göstermesi ve biyobozunum sonrası yapısındaki asit bileşiminden dolayı ortamın pH'ını değiştirerek inflamasyona neden olması gibi özellikleri yönü ile dezavantajlara sahiptir (Castañeda-Rodríguez vd., 2023).

PCL, FDA tarafından onaylı bir sentetik polimerdir, hidrofobik ve mekanik desteğinin yüksek olması dolayısıyla kemik doku mühendisliğinde tercih edilmektedir. Fakat PCL'nin hidrofobik özelliği hücrelerin afinitesini azaltmaktadır. Hücre ve greft interaksiyonun düşük olması dolaylı olarak hücrelerin migrasyonunu, proliferasyon ve adezyonunu sınırlandırarak optimal iyileşmeye izin vermemektedir (Phutane vd., 2023).

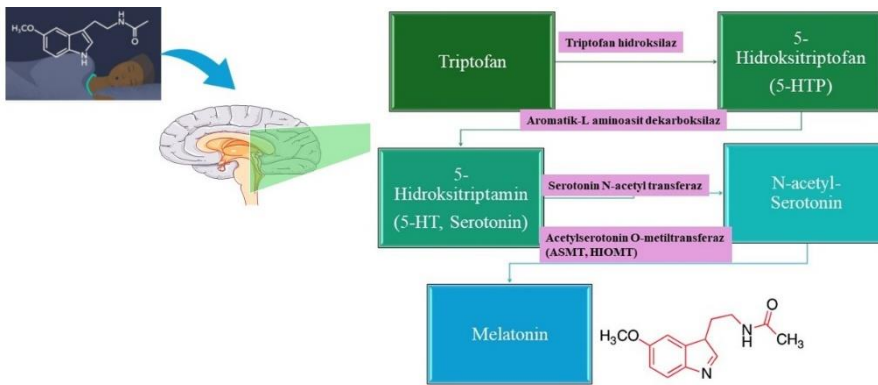
Sentetik polimerler arasında kemik dokunun mikroçevresine en uygun özellikte ECM simülasyonu sağlayan, hücre adezyon ve proliferasyonunu destekleyen bir polimer matriks olarak PLGA, kemik doku mühendisliği alanında öne çıkmaktadır (Yu vd., 2023).

1.7. Melatonin Hormonu

1.7.1. Melatoninin Biyokimyasal Yapısı ve Sentezi

Melatonin (N-asetil-5-metoksitriptamin) omurgalılarda ve memelilerin çoğunluğunda birçok doku tarafından sentezlenmesinin yanında esas olarak pineal bezde sentezlenir ve kana salınır. Pineal bez, epitalamik nöroendokrin bir bez özelliği gösterir ve üçüncü ventrikülden köken alır. Pineal bez melatonin üreten pinealositleri içerir.

Melatonin vücudun önemli bir homeostaz mekanizması olan sirkadiyen ritmin ana düzenleyicisidir. Bir indolamin olan melatonin, amfifilik yapısından dolayı organizmaların her kompartmanına kolayca difüze olabilmektedir ve hücrede etkilerini G protein ilişkili transmembran reseptörler aracılığı ile gerçekleştirir. MT1 ve MT2 reseptörleri organizmada neredeyse bütün hücre membranlarında eksprese edilmektedir ve melatonin bu iki reseptör aracılığı ile hücrede etkilerini göstermektedir (Uzun, 2017).



Şekil 9. Melatoninin kimyasal yapısı ve sentezi.

Melatonin sentezi hipotalamik paraventriküler çekirdekten alınan ışık bilgisinin pregangliyonik sempatik nöronlara doğrudan veya indirekt olarak iletilmesi ile başlar. Superior servikal gangliyonların bir dalı olan postgangliyonik sempatik nöronun projeksiyonu ile konik sinirleri oluşturan sinir lifleri pineal beze ulaşır. Bu aşamadan sonra norepinefrin salgılanarak pinealosit membranındaki α ve β adrenerjik reseptörleriyle bağlanarak ve hücre içinde cAMP-PKA-CREB ve PLC-Ca⁺⁺-PKC sinyal yolağını uyarak melatonin sentezini başlatır (Amaral ve Cipolla-Neto, 2018).

Melatonin sentezi, öncü maddesi olan triptofanın pineal bez tarafından pinealositlere alınarak, triptofan hidroksilaz ile hidroksillenmesi ile başlar. Hidroksillenen triptofan 5-hidroksitriptofanı oluşturur. 5-hidroksitriptofandır kan-beyin bariyerini kolayca geçebilen bir ara metabolittir. 5-hidroksitriptofan, 5-hidroksitriptofan dekarboksilaz enzimi ile karboksil grubunu koparılır ve serotonine dönüştürülür. Serotonin daha sonra NAT (N-asetiltransferaz) enzimi ile asetillenir ve N-asetilserotonine dönüşür. N-asetilserotonin ise Hidroksiindol-o-Metiltransferaz (HIOMT) ile melatonine dönüşür ve kana salınır. Melatonin sentezlendikten sonra doğrudan kana salınır ve albumine bağlanır. İnsanlarda melatoninin yarılanma ömrü 40 dakikadır ve esas olarak karaciğerde CYP1A2 enzim sistemi tarafından 6-hidroksimelatonin'e dönüştürülür ve 6-sulfatoksimelatonine konjuge edilerek üriner atılımı sağlanır (Claustrat ve Leston, 2015).

1.7.2. Melatoninin Fizyolojik Etkileri

Melatonin sirkadiyen ritmin ana düzenleyicisi olmasının yanında, biyokimyasal yapısı sayesinde canlı organizmadaki her hücre kompartmanını kolaylıkla geçerek hücre içinde etkilerini gösterir (Uzun vd., 2017). Sadece karanlıkta salgılanmasından dolayı melatonin “Hormonların Drakulası” olarak bilinmektedir ve retinadan aldığı aydınlık/karanlık bilgisi ile uyku/uyanıklık döngüsünü sağlamaktadır (Masters vd., 2014). Birçok üstün özelliklere sahip olan melatonin, immün sistem fonksiyonlarını modüle etmek ve yaşlanma karşıtı etkileri ile benzersizdir. Melatonin çok güçlü antioksidan ve antiinflamatuvar etkileri olan bir hormon olarak tanımlanır. Serbest radikallere karşı hem

antioksidan enzim sistemlerini aktive etme hem de pro-oksidan enzim aktivitesini baskılama yoluyla hücreyi reaktif oksijen türlerine karşı korur (Reiter vd., 2016). Melatonin mitokondriyal dinamikler olan füzyon, fizyon ve mitofaji aktivitelerini düzenler. Gün içinde mitokondrinin ihtiyacı olan enerji, besin ve hücre remodelingini destekler (Lei vd., 2023). Üreme sistemi için de önemli katkıları bulunan melatonin, oosit matürasyonu, fertilizasyon ve embriyonik gelişimde de önemli rol almaktadır. Melatonin bu etkilerini hipofiz bezindeki ve overlerdeki reseptörleri ile gösterir (Yong vd., 2021). Melatonin aynı zamanda anti-karsinojenik özellikleri olan bir hormondur. Yapılan in vitro ve in vivo kanser çalışmalarında melatoninin tümör gelişimini, invazyonunu ve hücre proliferasyonunu baskıladığı belirlenmiştir (Di Bella vd., 2013). Melatonin bu bilinen etkileri ile birçok deneysel araştırmaya konu olmuştur.

1.7.3. Melatoninin Kemik Doku Üzerine Etkileri

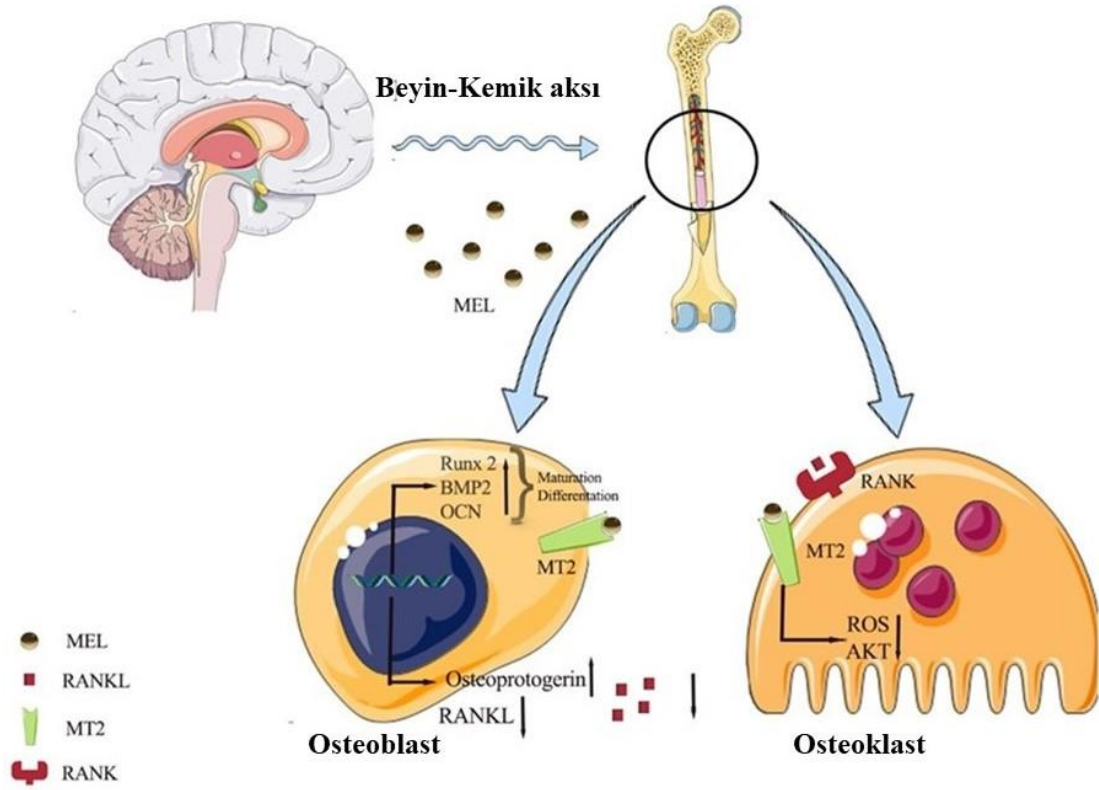
Melatoninin rejeneratif etkiler gösterdiği dokulardan biri de kemik dokudur. Bunun kanıtı olarak beyin kemik aksında melatoninin etkili bir hormon olduğunu belirten literatür bilgileri öne sürülebilir (Tang vd., 2024). Beyin ve kemik doku görünüşte birbiriyle bağlantısı olmayan iki yapı olarak görülse de klinik ve deneysel çalışmalar aslında bu iki organın bilateral olarak birbirine bağlılığını kanıtlamıştır (Otto vd., 2020). Beyin tüm vücut homeostazının esas yöneticisidir. Organ aktiviteleri ve organların çapraz iletişimini sağlamaktadır. Kemik doku ise mekanik destek sağlamanın yanı sıra hematopoetik, endokrin, metabolik ve depolama fonksiyonları olan bir yapıdır. Beyin-kemik aksını konu alan bir çalışmada kemik oluşumunun ve yıkımının da sirkadyen bir ritim sergilediği belirlenmiştir (Mei vd., 2024). Sirkadiyen ritim bozukluklarına neden olan vardiyalı çalışma sisteminin veya gece saatlerinde ışığa maruziyetin aynı zamanda kemik kaybına neden olduğu ve kemik hasarları riskini artırdığı ortaya koyulmuştur (Munmun ve Witt-Enderby, 2021). Bu sonuçlar sadece melatonin ilavesinin değil aynı zamanda melatonin yoksunluğunun da kemik metabolizmasını etkilediğini göstermektedir.

Melatonin kemik doku üzerinde etkilerini osteoblastlardan çeşitli büyüme faktörleri ve osteoprogenitör hücrelerin diferansiyasyonunu kontrol eden moleküllerin salınmasını

uyararak, mineralizasyon ve kolajen yapımını indükleyen genlerin ekspresyonlarının stimülasyonunu sağlayarak gösterir. Buna ek olarak melatonin osteoklast aktivitesine de dolaylı olarak etki ederek, osteoklastogenezis inhibisyonuna neden olur (Aykora vd., 2024; Gu vd., 2024; Jia vd., 2025; Paulini vd., 2024; Wu vd., 2024).

Melatonin kemik dokuda, mezenkimal kök hücrelerin ve preosteoblastların membranındaki G protein ilişkili MT2 reseptörüne bağlanır. MEK ve ERK1/2 fosforilasyonunu sağlayan sinyal yolağı kaskatının aktivitesini başlatır. Ayrıca hücre proliferasyonunu ve Wnt/ β -katenin yolağı aktivitesini sağlayarak hücre diferansiyasyonunu indükler. Yapılan çalışmalar prekürsör hücre hattına melatonin uygulamasının BMP 2/4, Runx2 ve OCN gibi faktörlerin ekspresyonlarını artırdığını ve kemik oluşumu, osteoblast ve osteosit diferansiyasyonuna pozitif anabolik etkiler gösterdiğini saptamıştır (Genah vd., 2021). Melatoninin osteoprogenitör hücrelerin diferansiyasyonunu stimüle ettiği ve matriks mineralizasyonunu sağlamak için osteoblast proliferasyonunu ve ALP, OCN ve kemik sialoproteininin ekspresyonlarını artırdığı gösterilmiştir (Aykora vd., 2024). Buna ek olarak yapılan başka bir çalışmada melatoninin NF- κ B ve RANKL downregülasyonu yaparak osteoklast diferansiyasyonunu inhibe ettiği ve RANK inhibitörü olan OPG upregülasyonunu sağladığı belirtilmiştir. Bu gözlemler melatoninin kemik oluşumuna pozitif katkılarının olduğunu ve kemik rezorpsiyonunu baskıladığını kanıtlamaktadır (Kobayashi-Sun vd., 2020).

Melatoninin kemik üzerine iyileştirici etkileri gerek deneysel ve gerekse insan çalışmalarında oral veya parenteral uygulamalar yapılarak araştırılmıştır. Oysa melatonin ağız yolu ile alındığında karaciğerden daha ilk geçişte % 80'in üzerinde metabolize olur. İster oral isterse parenteral uygulansın yarılanma ömrü ortalama 40 dakika civarındadır (Gooneratne vd., 2012). Ayrıca sistemik uygulanan bir ilaç tüm vücuda dağılmaktadır. Diğer taraftan kemik iyileşmesi oldukça uzun bir süreçtir ve ortalama 6-8 haftayı bulmaktadır. Bir insana veya deney hayvanına bu kadar uzun süre enjektabl bir ilaç uygulamak hem teknik zorluklar hem de sağlık riski taşımaktadır (Dalgic vd., 2023).



Şekil 10. Beyin-kemik aksında melatonin etkileri (Aykora vd., 2024).

Bu nedenlerle kontrollü melatonin salım çalışmaları son yıllarda popüler hale gelmiştir. Çalışmamız ile PLGA içerisine melatonin eklenerek kontrollü salım yapılması, oral veya paranteral uygulamalar ile ortaya çıkabilecek tüm dezavantajların ortadan kaldırılması hedeflenmiştir. İlave olarak bu şekilde kontrollü bir salınım yöntemi ile melatoninin hasarlı bölgede istenilen düzeyde ve sürekli olarak bulunması sağlanması kemik rejenerasyonunu potansiyelize etmesi görülmüştür.

1.8. Kemik Doku Mühendisliği Çalışmalarında Kullanılan Kaynama Modelleri

Son yıllarda yapılan deneysel çalışmalar ile kemik rejenerasyonunun moleküler mekanizmaları hakkında önemli bir bilgi birikimi elde edilmesine rağmen, kemik kırıklarının iyileşmesi, gecikmiş iyileşme ve kaynamama hala klinikte önemli bir problem

olmaya devam etmektedir. Kaynamama ve gecikmiş iyileşme üzerine birçok tedavi stratejisi geliştirilmiş olsa da altın standart bir yöntem halen bulunmamaktadır. Otolog kemik greftinin altın standart metot olması, hala % 60'lık iyileştirme sınırını geçememektedir (Garcia vd., 2013). Bununla birlikte kaynamayan kemik defektlerinin iyileşmesi için kullanılan farmakolojik ajanlar (BMP2 ve BMP4) ise bu alanda klinisyenleri tatmin edecek bir sonuç sağlamamıştır (Halloran vd., 2020). Bu nedenle, kemik kırıklarının rejenerasyonunda olduğu gibi, kaynamama durumu için de hala yeni teknikler ve materyaller geliştirilmesi için yapılacak çalışmalara ihtiyaç devam etmektedir. Bu amaçla, deneysel olarak sıklıkla kullanılan rodent ve tavşan ile gerçekleştirilen kritik boyutlu kemik defektleri modelleri hala en yaygın modeller olarak karşımıza çıkmaktadır.

Kemik rejenerasyonu üzerine yapılan deneysel çalışmalarda sıklıkla rodentler tercih edilmekte ve bu amaçla çoğunlukla kalvaryumda kemik defekti oluşturulan modeller seçilmektedir. Uzun kemiklerin kullanıldığı deneysel çalışmalarda ise özellikle stabilizasyon güçlüğü nedeniyle hayvan refahı tam olarak korunamamaktadır. Buna ek olarak özellikle kullanılan materyalin veya terapötik ajanın etkinliğinin kısa dönemde etkilerinin belirlenebilmesi için intramembranöz iyileşme gösteren bir kemik tipi seçilmesinin önemi vurgulanmaktadır (Samsonraj vd., 2017). Kemik rejenerasyonunun ve kaynama düzeyinin belirlenmesi için yapılan analizler için kalvaryum dokularının kullanılması ise görüntüleme analizleri için diğer kemik dokularından daha uygundur (Inoue vd., 2020). Bu nedenle çalışmamızda sıçanlarda kritik boyutta (6 mm) kalvaryal defekt modeli uygulanmıştır.

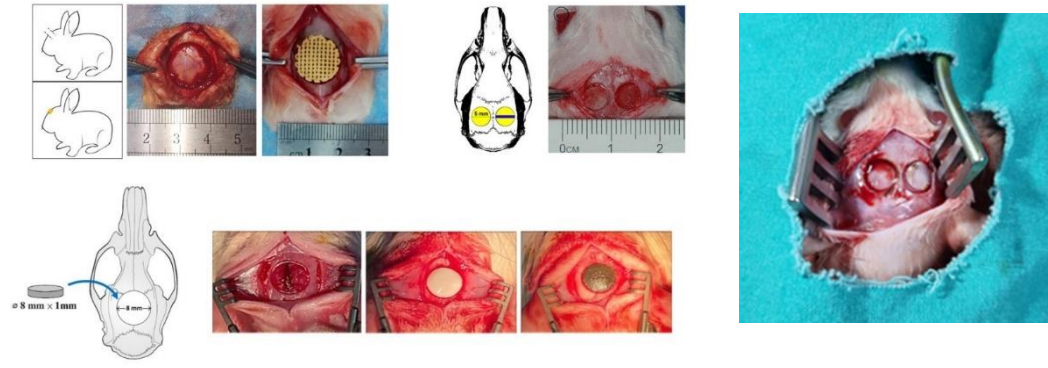
1.8.1. Kritik Boyutlu Kalvaryal Defektler

Kritik boyutlu kemik defektleri maruz kalan bir hastanın yaşamı boyunca kendiliğinden iyileşemeyen kemik kayıpları olarak tanımlanmaktadır. Yapılan çalışmalar kritik boyutlu defektlerin spontan olarak iyileşme oranını % 10 olarak belirlemiştir (Cooper vd., 2010). İnsanlarda 12 cm ve üstü kemik kayıpları kritik boyutlu kemik defekti olarak kabul edilir. Bu türden kırıklar cerrahi rekonstrüksiyon, implant veya greft uygulaması olmadan tam olarak iyileşememektedir.

Kalvaryum, kranyumun, frontal, pariyetal ve oksipital kemiklerin üst kısımlarından oluşan kubbe şeklindeki santral sinir sistemini ve organlarını (ağız ve burun boşluğu, kulak ve gözler) koruyan bölümdür. Çok çeşitli, çift ve simetrik kemiklerden oluşur (Lane vd., 2023). Prenatal ve postnatal 2-3 yaşlarına kadar kıkırdak yapıda olan kalvaryal kemiklerinin sertleşerek son halini alması 3-4 yaşlarında % 80 iken 7-8 yaşlarında % 100' e ulaşır. Daha sonraki yıllarda sadece kalınlığında artış meydana gelir (Ferguson ve Atit, 2019). Kalvaryum kemiklerini çok farklı özellikler taşıdığı bilinmektedir. Kalvaryal kemik biyolojisi zayıf bir kanlanmaya ve az miktarda kemik iliğine sahiptir. Kalvaryum kemikleri membranözdür ve epifiz alanları yoktur. Kalvaryum kemik iyileşmesi intramembranöz olup mezenkim dokusunun doğrudan kemik dokuya dönüşmesi ile gerçekleşir. İntramembranöz iyileşmede hasar alanında mezenşim hücreleri yoğunlaşarak osteoblastlara dönüşür. Osteoblastların kemik matriksini sentezlemesi ve takiben kalsifikasyon ile kalvaryal kemik doku rejenerasyonu gerçekleşir.

Kalvaryal defekt modeli genellikle kalvaryumda standart defektlerin oluşturulabilmesinin kolaylığı ile kalvaryum dokularından histolojik, radyografik analizlerin kolay yapılabilmesinden dolayı tercih edilir. Cerrahi işlem için ulaşabilecek anatomik alanın kolay bulunması, eksternal ve internal fiksasyon gerekmemesi, greftlenen alanın kontrol gruplarıyla karşılaştırılabilmesinin kolay olması kalvaryal defekt modellerinin kullanımını yaygın hale getirmiştir (McGovern vd., 2018).

Rodentlerde ve tavşanlarda sıklıkla tercih edilen kalvaryal defekt modelleri çeşitli şekillerde dizayn edilebilmektedir. Özellikle uygulanacak materyalin şekline, kimyasal yapısına ve kimyasal yapısına bağlı olarak farklı defekt modelleri kullanılmaktadır. Bunlardan bazıları Şekil 11A'de gösterilmektedir. Çalışmamızda sıçanlarda oluşturulan 6 mm boyutunda bilateral kritik kalvaryal defekt modeli tercih edildi ve Şekil 11B'de gösterildiği gibi oluşturuldu.



Şekil 11. (A) Biyomateryal çalışmalarında kullanılan kritik kalvaryal defekt modelleri (Lu vd., 2024; Luo vd., 2018; Wenjie Zhang vd., 2014) ve (B) Sıçanlarda 6 mm çapında kritik kalvaryal defekt modelinin oluşturulması.

İKİNCİ BÖLÜM

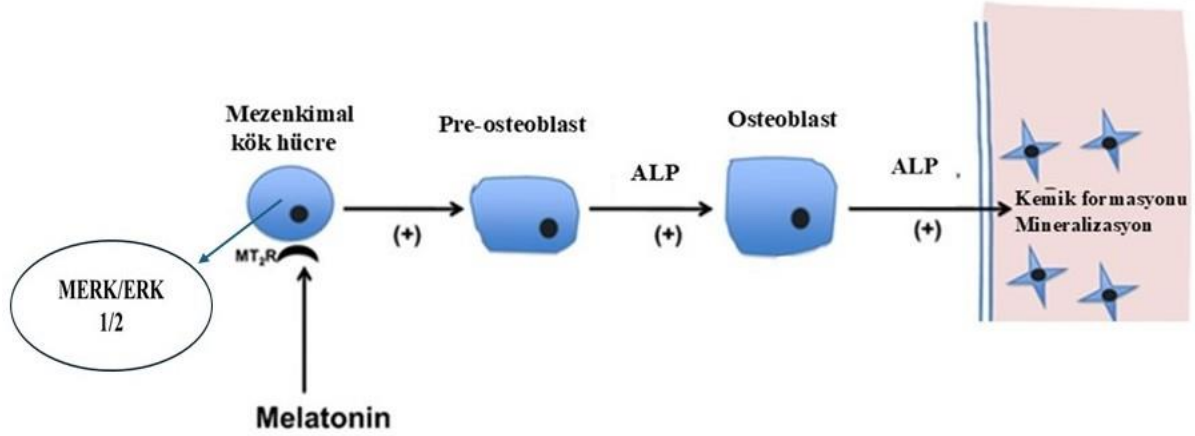
KURAMSAL ÇERÇEVE

Melatonin antioksidan, anti-inflamatuar, yaşlanma önleyici, antikarsinojenik ve immunomodulator etkileri çok iyi bilinen bir hormondur. Bu özellikleri sayesinde melatonin birçok araştırmanın konusu olmanın yanı sıra FDA tarafından da bazı hastalıkların tedavisinde kullanılacak bir ilaç olarak da tanımlanmıştır. Melatoninin kemik iyileşmesi üzerine uyarıcı etkilerinin ortaya çıkması kemik doku çalışmaları alanında da melatoninden faydalanılmasına imkân sağlamıştır. Melatonin kemik ilişkisini konu alan çalışmaların; kemik kırıkları, kemik defektlerinin onarımı ve osteoporozda melatoninin iyileştirici etkileri olmak üzere üç ana hedefe odaklandığı görülmektedir. Her üç alanda da oldukça fazla sayıda insan ve deney hayvanı çalışması bulunmaktadır. Kemik kırıklarında melatoninin iyileştirici etkisini konu alan literatür bildirimlerinde, melatonin kullanımının osteogenezisi hızlandırdığı, osteoklastogenezisi inhibe ettiği, anjiyogenezisin stimüle ettiği ve tedavide kullanılan greftlerin etrafındaki inflamasyonu azalttığı gösterilmiştir (Huang vd., 2022; Lu vd., 2021).

2.1. Melatoninin Kemik İyileşmesi Üzerine Etkileri

2.1.1. Melatonin, Kemik İyileşmesi ve ALP

ALP mineralize doku hücrelerinde yüksek miktarda eksprese edilen ve sert dokuların oluşumunda önemli görevleri olan bir enzimdir. Bu nedenle ALP seviyelerinin periyodik olarak takip edilmesi kemik doku rejenerasyonu hakkında önemli veriler sağlar. ALP kemik iyileştirici etkilerini inorganik fosfat seviyelerini artırarak ve bu sayede mineralizasyonu kolaylaştırarak gerçekleştirir (Vimalraj, 2020). Bu nedenle kemik iyileşmesi üzerine etkileri araştırılan birçok ilaç veya aday molekülün işlevlerini araştırarak çalışmalarda ALP seviyelerindeki değişimler de belirlenmiştir. Bunlardan kuarsetin, fisetin, kurkumin gibi maddelerin ve parathormon, büyüme faktörlerinin de dahil olduğu moleküllerin uygulanarak kemik iyileşmesinin gözlemlendiği çalışmalarda ALP düzeylerinin de arttığı belirlenmiştir (Fu vd., 2008; Gentile vd., 2015; Kheiry vd., 2018; Li ve Zhang, 2018; Sohrabi vd., 2024). Bu aday moleküllerden bir tanesi de melatonindir.



Şekil 12. Melatoninin ALP üretimi üzerine moleküler etki mekanizmasının şematik gösterimi (Maria ve Witt-Enderby, 2014).

Melatoninin kemik rejenerasyonunu hızlandırıcı etki gösterdiği, bu etkiyi MSC'lerde bulunan MT₂ reseptörü üzerinden MERK/ERK (1/2) sinyal yolağını uyararak sağladığı bilinmektedir. Melatonin MERK/ERK yolağını aktive ederek ALP üretimini artırır (Şekil 12). Melatonin hem düşük hem de normal dozlarda ALP ekspresyonunu artırabilir (Chan vd., 2022; Radio vd., 2006). Bu konuda yapılan in vitro çalışmalarda melatonin yüklü PLGA nanopartiküllerinin ALP ekspresyonunu artırdığı gözlenmiştir (Çetin Altındal ve Gümüşderelioğlu, 2019; Jarrar vd., 2021; Zhang vd., 2013). Diyabetik kemik hasarında melatonin içeren PLGA-PEG biyomateryalinin in vivo etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada ise 7. ve 21. günde ALP gen ekspresyonlarının arttığı belirlenmiştir (Chen vd., 2024). Sıçanlar üzerinde yürütülen bu çalışmada melatonin içeren bir skafoldun hasarlı kemik bölgesindeki iyileştirici etkileri araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar melatonin bu etkilerini NF-E2 ilişkili faktör 2/hem oksijenaz1 (Nrf2/HO-1) sinyal yolağını aktive ederek gerçekleştirdiğini ortaya koymuştur. Melatoninin bu yolağı aktive ederek oksidatif strese bağlı damar endotel hücre hasarını azalttığı ve anjiogenezis-osteogenezis ilişkisini düzenleyerek kemik iyileşmesini hızlandırdığı ileri sürülmüştür.

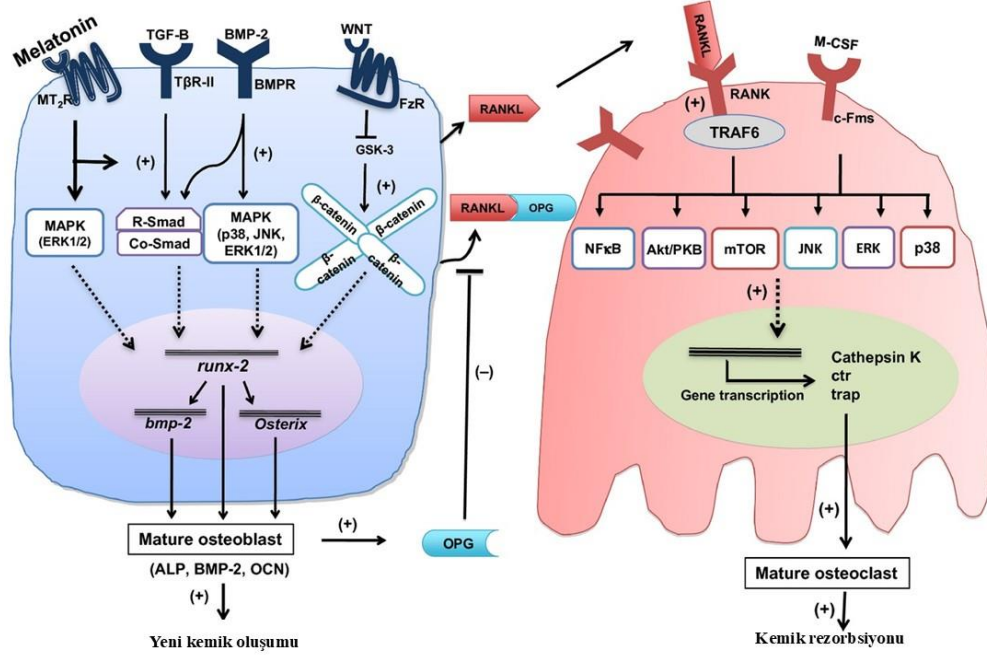
Chen vd. (2024)'nin yürüttüğü bu çalışma melatonin bir biyomateryal içerisine yerleştirilip kemik iyileşmesi üzerine etkilerinin incelendiği ilk çalışmadır.

2.1.2. Melatonin, Kemik İyileşmesi ve TRAP

TRAP lizozomal kaynaklı kemik yıkımından sorumlu bir enzimdir. Bu nedenle osteoklastların aktivasyonu ile TRAP aktivasyonu arasında yakın bir ilişki vardır. Osteoklastların aktivasyonunun baskılanması TRAP enzim aktivitesinin de baskılanmasına yol açar. Böylelikle kemik yapımı artarken kemik rezorpsiyonu azalır. Bu nedenle kemik yıkımını azaltmak ve kemik yapımını hızlandırmak amaçlı çalışmalarda hedeflenen enzimlerden bir tanesi de TRAP'dır. Kemik iyileştirici etkinliği araştırılan birçok molekülün TRAP aktivitesini de değiştirdiği, özellikle osteoporoz çalışmalarında TRAP aktivitesinin yoğunlukla değerlendirildiği görülmektedir (Rathod vd., 2024).

Melatoninin kemik rejenerasyonu üzerine etkilerinden bir tanesi de osteoklastogenezin inhibisyonudur. Melatoninin bu etkisini osteoblastlardan osteoproteogerin ekspresyonunu artırarak gerçekleştirdiği belirtilmiştir (Histing vd., 2012; Kikyo, 2024). Bununla birlikte osteoblastlar üzerinde MT2 reseptörü bulunan melatoninin, osteoklastlar üzerine herhangi bir reseptörü bulunmadığı görülmektedir. Bu nedenle melatoninin osteoklastlar üzerine dolaylı yoldan etki gösterdiği söylenebilir. Melatonin osteoblastlardan RANKL inhibitörü olan osteoproteogerin sentezi ve salımını stimüle ederek osteoklast aktivitesini baskılar (Şekil 13). Osteoporotik kırıkların iyileşmesi üzerine yapılan bir çalışmada melatonin yüklü PLGA nanopartiküllerinin TRAP seviyelerini azaltarak, osteoklastogenezisi baskıladığı ve osteogenezisi artırdığı gösterilmiştir (Zheng vd., 2023).

Erken dönemde kemik rejenerasyonunun incelendiği bir çalışmada ise 28. günde melatonin yüklü PLGA nanopartiküllerinin TRAP pozitif osteoklastların sayısını azalttığı belirlenmiştir (Huang vd., 2024). Titanyum nanopartiküllerine yüklenen melatoninin kemik rejenerasyonu üzerine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada ise melatoninin 5. günde TRAP immun pozitif osteoklast sayısını azalttığı ortaya konulmuştur (Ping vd., 2017).

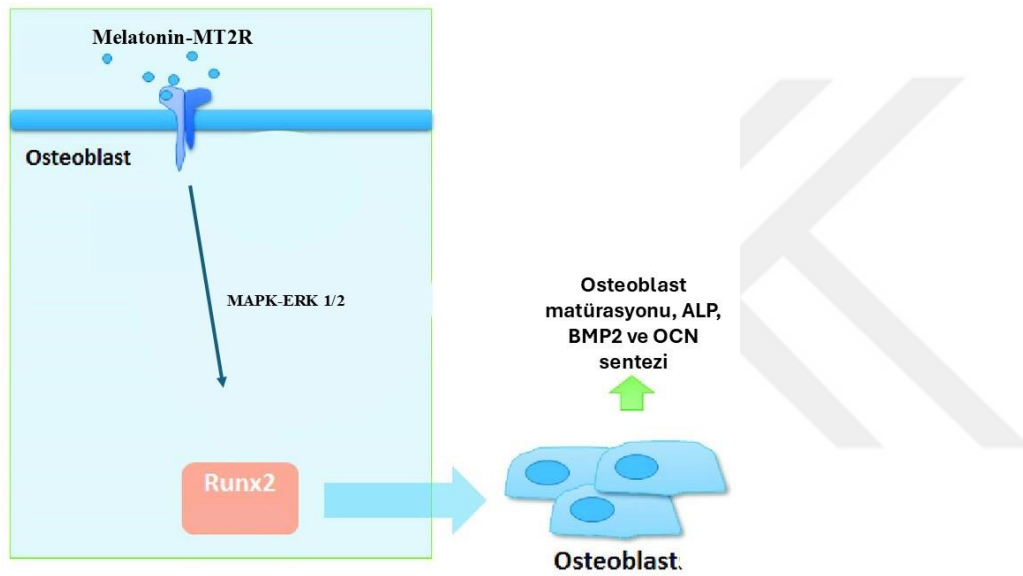


Şekil 13. Melatonin osteoklastogenezini dolaylı inhibe edici etkisinin mekanizmalarının gösterimi (Maria ve Witt-Enderby, 2014).

2.1.3. Melatonin, Kemik İyileşmesi ve Runx2

Kemik rejenerasyonunda birden çok yolak için farklı transkripsiyon faktörünün aktivitesi gerekir (Şekil 14). Özellikle mezenkimal kök hücrelerin diferansiyasyonunun sağlanması yeni kemik oluşumunun ilk aşaması olarak kabul edilir. Mezenkimal kök hücre diferansiyasyonunun sağlanması için önemli transkripsiyon faktörlerinden bir tanesi olan Runx2 aktivasyonu çok önemlidir (Carbonare vd., 2012). Çünkü, Runx2 bir taraftan osteoprogenitör hücrelerin diferansiyasyonunu sağlarken bir taraftan da osteoblastlardan kemik rejenerasyonunu sağlayan BMP2, COL1A1 ve OPG'nin de dahil olduğu genlerin sentezini uyarır (Huang vd., 2023). Melatonin osteoprogenitör etkisini başlatabilmek için ilk olarak osteoblast üzerindeki MT2 reseptörüne bağlanır ve böylelikle MAPK-ERK1/2 sinyal yolağını aktive ederek Runx2 transkripsiyonunu artırır. Sentezlenen Runx2'ler mezenkimal kök hücrelerin osteoprogenitör hücrelere farklılaşmasını uyarır (Luchetti vd., 2014).

Melatoninin Runx2 aktive edici etkisinin ortaya çıkması melatonin içeren nanopartiküllerin kemik iyileşmesindeki rollerinin araştırılmasını teşvik edici olmuştur. Bu amaçla yapılan bir çalışmada, melatonin yüklü kitosan nanopartiküllerinin in vitro pre-osteoblastlar üzerine etkileri araştırılmış ve melatoninin 7. ve 11. günlerde Runx2 ekspresyonunu artırdığı belirlenmiştir (Huang vd., 2020). Melatonin yüklü titanyum nanopartiküllerinin osteoindüktif etkilerinin araştırıldığı bir başka in vitro çalışmada ise melatoninin 1., 3. ve 7. günlerde Runx2 ekspresyonunu artırarak osteoblast matürasyonunu sağladığı gösterilmiştir (Cerqueira vd., 2020).



Şekil 14. Melatonin'in MAPK-ERK1/2 sinyal yolağı üzerinden Runx2 ekspresyonu uyarıcı etkilerinin şematik gösterimi (Chen vd., 2019).

2.1.4. Melatonin, Kemik İyileşmesi ve BMP2

Kemik rejenerasyonuna katkıda bulunan faktörler arasında büyüme faktörleri önemli bir yer tutar. Bunlardan BMP mezenkimal kök hücrelerde, osteoprogenitör hücrelerde, osteoblast ve kondrositlerde üretilir. BMP ailesinden BMP2 osteoblastik diferansiyasyonunu ve yeni kemik oluşumunu sağlar. BMP2'nin stimüle ettiği diğer sinyal yolları Runx2/merkez bağlı faktör a1 (Cbfa1) yolağı ve Wnt/ β -katenin sistemidir (Park vd., 2011).

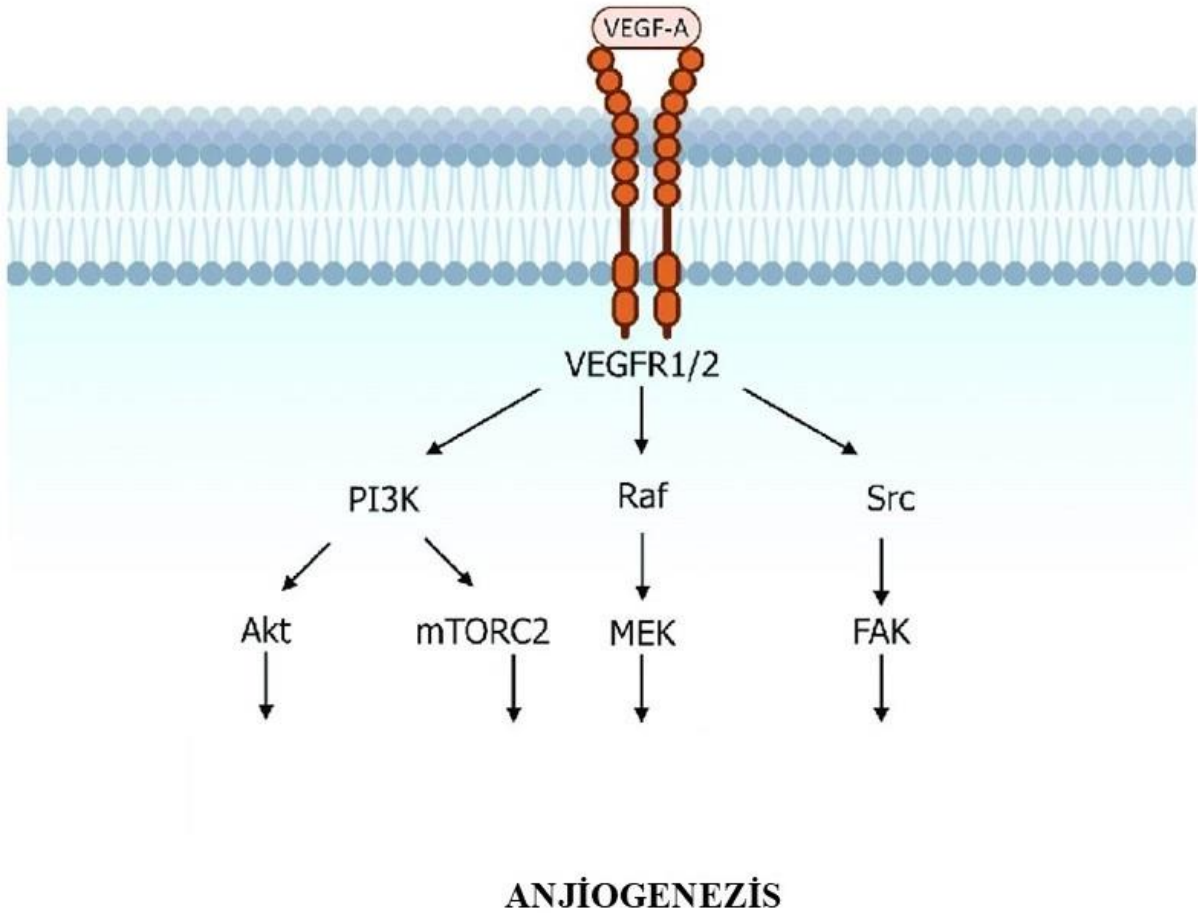
BMP2 bu iki yolak üzerinden ECM modülasyonunu, MSC proliferasyonun ve diferansiyasyonunu sağlar ve osteoblastların apoptozunu önler. Kemik rejenerasyonu evrelerinde BMP2 sentezi TGF- β ile uyarılır (Luchetti vd., 2014). BMP2'nin kemik iyileşmesi üzerine etkileri oldukça iyi bilinmektedir. Buna ek olarak BMP2, FDA tarafından kemik iyileşmesinde kullanımı onaylanan bir ajandır. Bu durum BMP2-kemik iyileşmesi ilişkisini inceleyen birçok araştırmanın yapılmasına yol açmıştır (Arosarena ve Collins, 2005; Osyczka vd., 2004; Tang vd., 2008). Hatta kontrollü BMP2 salımının kemik iyileşmesi üzerine etkilerini inceleyen çalışmalar da bulunmaktadır (Kudaiberger vd., 2024; Notodihardjo vd., 2012; Vallmajo-Martin vd., 2024).

Melatonin ve kemik iyileştirici etkilerinin incelendiği birçok çalışmada BMP2 düzeyleri veya aktivasyonu ortaya konulmuştur. Bu çalışmalardan bir tanesinde, sıçanlarda oluşturulan kritik kalvaryal kemik defekti alanına melatonin içeren ksenograft yerleştirilmiş ve BMP2 ve diğer kemik rejenerasyonu belirteçleri üzerine etkileri araştırılmıştır. Melatonin içeren ksenograftin uygulamadan 6 hafta sonra BMP2 seviyelerini önemli miktarda artırdığı belirlenmiştir (Costa vd., 2024). Başka bir çalışmada ise kalvaryal defekt oluşturulan sıçanlarda melatonin içeren kolajen-sponge iskelelerinin kemik rejenerasyonu üzerine etkileri histopatolojik ve immünohistokimyasal analizler yapılarak araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar melatoninin 2. haftada BMP2 pozitif hücre sayısını anlamlı düzeyde artırdığını göstermiştir (Montarele vd., 2022). Bir başka çalışmada ise melatoninli jel uygulamasının kritik kalvaryal defekt modeli oluşturulan sıçanlarda kemik rejenerasyonu üzerine etkilerinin incelenmiş ve 4. haftada melatonin uygulanan grupta BMP2 ekspresyon düzeylerinin arttığı belirlenmiştir (Golpasandhagh vd., 2023).

2.1.5. Melatonin, Kemik İyileşmesi ve VEGF

VEGF yeni damar oluşumunda etkili bir transkripsiyon faktörü olarak bilinir. Kemik rejenerasyonunun en önemli basamaklarından biri yeni damar oluşumu ve hasarlı bölgeye kan akımının sağlanmasıdır. Hasar alanına kan akımının sağlanması yeni damar oluşumu ile gerçekleşebilir. Bu nedenle kırık hattında VEGF seviyelerinin belirlenmesi önemlidir (Hu ve Olsen, 2016; Shibuya, 2011). Kemik kırıklarının rejenerasyon sürecinde, kemik dokuda

VEGF ekspresyonlarının artışı yeni damar oluşumunu stimüle ederek, kırık iyileşme ve kaynama hattına kanın gelmesini kolaylaştırır ve rejenerasyon hızlanır. VEGF bu fonksiyonunu osteoblastlar ve osteoprogenitör hücrelerin membranındaki VEGFR reseptörü aracılığı ile PI3K/Akt sinyal yolağını aktive ederek gerçekleştirir (Şekil 15).



Şekil 15. Melatoninin VEGF uyarıcı etkilerinin şematik gösterimi (Giannotti vd., 2023).

Melatoninin VEGF üzerine stimulan etki gösterdiği uzun yıllardan beri bilinmektedir (Acikan vd., 2018; Çokluk vd., 2021; González vd., 2021; Huang vd., 2021; Klettner vd., 2021; Li vd., 2020; Ma vd., 2019). Melatonin içeren biyomateryallerin kemik rejenerasyonunda VEGF üzerine etkileri sıklıkla çalışılmıştır. Melatonin yüklü nanoliflerin kemik rejenerasyonu üzerine etkilerinin in vivo ve in vitro araştırıldığı bir çalışmada sıçanlara

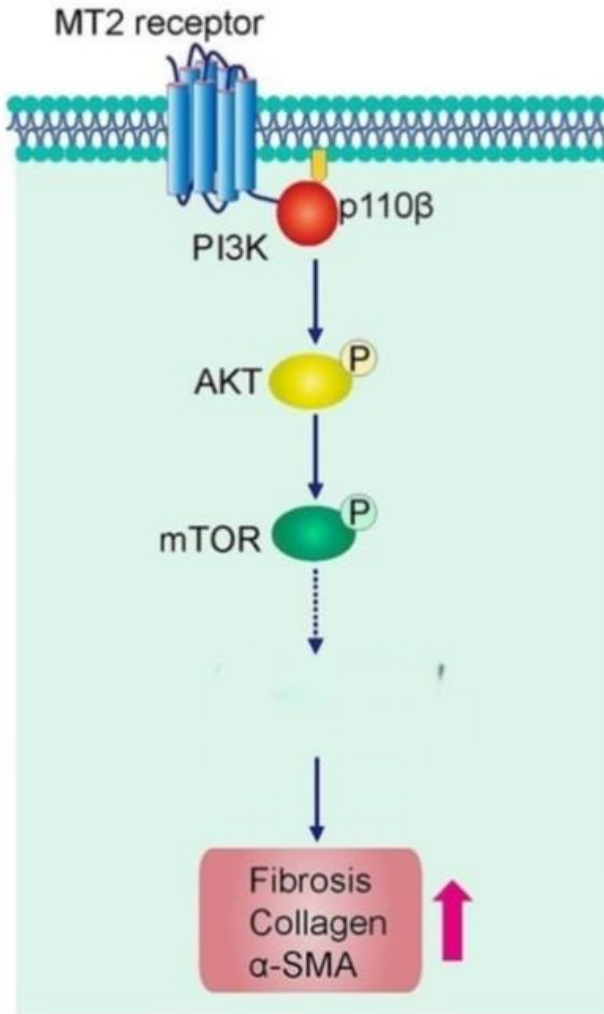
5 veya 50 mg melatonin içeren biyomateryal uygulanmış ve VEGFA düzeylerinin anlamlı bir şekilde arttığı (5. günde) ve 50 mg uygulanan grupta bu artışın daha fazla olduğu belirlenmiştir (Lv vd., 2024). Elektroegirme ile üretilen ve melatonin içeren (200 mg) ipek nanoliflerinin kemik onarımı ve anjiyogenezis üzerine etkilerinin araştırıldığı başka bir çalışmada (in vivo 5 mm boyutta kritik kalvaryal kemik defekti) ise 14. günde VEGF ekspresyonunda artış gözlenmiştir (Deng vd., 2024). Başka bir çalışmada ise melatonin (3 mg) yüklenen Aljinat-Kitosan /beta kalsiyum trifosfat temelli biyobozunur iskelenin kritik kemik defekti oluşturulan köpeklerde etkileri araştırılmıştır. Melatonin içeren kompozit iskelenin 4. haftada alınan kemik dokularında VEGF ekspresyonunu artırdığı belirlenmiştir (Abdelrasoul vd., 2023).

2.1.6. Melatonin, Kemik iyileşmesi ve Kolajen Formasyonu

Kemik dokunun organik matriksinin yaklaşık % 90'ını oluşturan Tip I kolajen aynı zamanda vücutta en yaygın bulunan kolajen türüdür. Tip I kolajen sertlik ve bütünlüğün sağlanması gereken hemen hemen bütün dokularda bulunur. Benzer işlevlerini kemik dokuda da yerine getirir. Tip I kolajen kemik dokuda, kemik dayanıklılığını artırır, kemik yapılarının desteklenmesini sağlar ve kırık riskini azaltır. Kemik hasarlarında Tip I kolajenin yapısı ve bütünlüğü bozulur. Aynı zamanda Tip I kolajen gen mutasyonlarında (COL1A1), osteogenezis imperfekta gibi genetik kemik hastalıkları ortaya çıkar (Selvaraj vd., 2024). Bu hastalıkların patogenezinde Tip I kolajen yerine Tip II ve Tip III kolajenlerin sentezlenerek kemik dokuda birikmesi söz konusudur. Tip II ve Tip III kolajen kemiğe mekanik güç veya sertlik kazandıramadığından kemik kırılğan bir yapı haline gelir (Gistelinck vd., 2016). Dolayısı ile kemik iyileşmesi veya kaynaşması çalışmalarında başta Tip I olmak üzere kollajen formasyonu yaygın olarak takip edilen değişkenlerden bir tanesidir.

Melatonin içeren biyomateryal uygulamalarının kemik rejenerasyonu çalışmalarında kolajen birikimini önemli ölçüde artırdığı bildirilmiştir (Şekil 16). Melatonin bu etkisini MT2 reseptörü üzerinden PI3K/AKT-mTOR sinyal yolağını aktive ederek gerçekleştirir (Dong vd., 2024).

Melatonin içeren kitosan nanopartiküllerinin kullanıldığı in vitro bir çalışmada, melatoninin kontrollü salımının preosteoblastik hücrelerde COL1 ekspresyonunu artırdığı belirlenmiştir (Huang vd., 2020). Başka bir çalışmada ise metanol içeren ipek materyal içerisine yüklenmiş melatoninin in vitro ortamda COL1 ekspresyonunu artırdığı ve mineralizasyon sağlayarak osteogenezisi uyardığı gözlenmiştir (Çetin Altındal vd., 2019).



Şekil 16. Melatoninin kolajen üretimini üzerine etkilerinin moleküler mekanizması (Dong vd., 2024).

2.2. Kemik İyileşmesi ve Kemik Doku Mühendisliği

Biyomateryal teknolojisinde son 20 yılda meydana gelen ilerlemeler doku mühendisliği alanında da çok önemli gelişmelerin kaydedilmesini sağlamıştır (Aykora ve Uzun, 2024). Kemik rejenerasyonunu sağlamak veya daha da hızlandırmak için yapılan doku mühendisliği çalışmalarında üretilen biyomateryallerin ana malzemesi olarak farklı bileşenlerin seçildiği görülmektedir. Bu bileşenler esas alınarak yapılacak bir sınıflandırmaya göre aşağıda verilen 4 farklı gruplandırma yapılabilir;

- a) Taşıyıcı olarak hidrojel (Yue vd., 2020), PLA (Narayanan vd., 2016), PLC (Prakobkarn vd., 2022) ve PLGA (Tang vd., 2023) içeren biyomateryaller. Bu bileşenleri içeren biyomateryaller sadece kemik gelişimi için uygun bir taşıyıcı sağlama amacı ile üretilirler.
- b) Osteokunduktivite sağlamak için biyoseramik (Namdar ve Salahinejad, 2023) veya biyoaktif cam (Ribeiro vd., 2023) içeren biyomateryaller. Kemik hücrelerinin migrasyonunu ve adezyonunu sağlamak için kullanılırlar.
- c) Parathormon (Sordi vd., 2023), MSC (Kangari vd., 2020), BMP-2 (Vater vd., 2023), veya fısetin (Granel vd., 2022) gibi organik ajan içeren biyomateyaller osteoindüktif etkileri için kullanılırlar.
- d) Magnezyum (Marek vd., 2022), stronsiyum (Anand vd., 2022), kobalt (Zhao vd., 2023), bakır (Li vd., 2023), çinko (Qian vd., 2023), baryum (Mabrouk vd., 2022), kalsiyum (Cheng vd., 2023), gümüş (Teimouri ve Lalehzar, 2023), selenyum (Xu vd., 2023) gibi inorganik iyonlardan herhangi birisini veya birkaçını içeren biyomateryaller mekanik dayanıklılığı sağlamak için kullanılırlar. Bu iyonlardan bazılarının osteoindüktif, antiseptik veya antibakteriyel etkileri de olduğu bilinmekte olup, yapılan biyomateryal çalışmaları bu amaçlar için de kullanılırlar.

Biyomateryallerin kemik iyileşmesini ve kaynaşmasını kolaylaştırıcı etkileri özellikle yetersiz greft materyali temin edilebilen vakalarda çok önemli hale gelmektedir. Bu nedenle osteoindüktif ve osteokondüktif etkileri olan, anjiyogenezisi hızlandırıcı özellikleri bulunan biyomateryal geliştirme çalışmaları son yıllarda hız kazanmıştır (Aykora vd., 2024; Marcotulli vd., 2024). Öte yandan kemik doku eşsiz iyileşme yeteneğine sahip olmasına rağmen, doku kaybının şekillendiği kemik hasarlarında iyileşme defektin kritik boyutta olup olmamasına bağlıdır (Gómez-Barrena ve Ehrnthaller, 2024). Segmental ve ağır hasarlı kırıklar kemiklerin kaynamasını, tam ve hızlı iyileşmesini geciktirir (Calori vd., 2017; Liu vd., 2024). Kritik boyuttaki kemik defektlerinin spontan olarak en fazla % 10 oranında iyileşme göstermesinden dolayı geliştirilecek tedavi ve onarım metodunun aynı zamanda iyileşmeyi de optimize edebilmesi beklenir (Cheng vd., 2023; Li vd., 2023). Kritik defekt alanları için uygulanan tedavi yöntemlerinden bir tanesi de greft uygulamasıdır. Ksenogreft ve allogreft gibi uygulamalar bulunmasına rağmen günümüzde en iyi seçenek otogreft uygulamasıdır. Bununla birlikte otogreftin ana kemiğe kaynama hızını ve kapasitesini artırıcı yöntemlere de ihtiyaç duyulmaktadır. Bu alanda biyomateryal teknolojisi ümit vadeden çözümler sunmaktadır.

Biyomateryal teknolojisi ile kemik doku mühendisliği alanında geliştirilen biyomateryallerde taşıyıcı iskele olarak çoğunlukla doğal veya sentetik polimerler kullanılır. Kitosan, ipek, aljinat ve hidrojel gibi doğal kaynaklı polimerler ile üretilen birçok biyomateryalin deneysel olarak etkinliği belirlenmiştir (Guo vd., 2021). Bununla birlikte doğal kaynaklı polimerler; immün reaksiyon oluşturma, üretim basamaklarında kimyasallara veya sıcaklığa karşı dayanıksız olma ve pahalı olmaları gibi dezavantajlara sahiptirler. Sentetik polimerler ise kolay elde edilebilir olmaları, ekonomik olarak uygun maliyetli ve biyouyumlu olmaları, biyobozunur özellik göstermeleri ve son ürünlerinin biyolojik ortamlarda istenmeyen reaksiyona neden olmamaları ile üretim süreçlerinde her uygulamaya uyum sağlayabilmeleri gibi sebeplerden dolayı kemik doku mühendisliği çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadırlar.

Kemik doku mühendisliği alanında yapılan çalışmalarda üretilen biyomateryallerin içeriğinde en fazla kullanılan sentetik polimerlerin PLA, PCL ve PLGA olduğu söylenebilir

(Farjaminejad vd., 2024). Bunlar arasında ise PLGA'nın kemik doku mühendisliği çalışmalarında daha fazla tercih edildiği görülmektedir. Bunu nedeni olarak PLGA'nın kemik ECM'sini edebilmesi, osteokondüktivite ve osteoindüktivite özellikleri açısından daha avantajlı olması söylenebilir. Bu nedenlerle çalışmamızda ürettiğimiz biyomateryalde taşıyıcı olarak PLGA nanolifleri tercih edilmiştir.

2.2.1. Kemik Doku Mühendisliğinde PLGA İçeren Biyomateryallerin Kullanımı ve Etkinliği

Kemik doku rejenerasyonu sağlamak için geliştirilen biyomateryaller arasında PLGA ile geliştirilen kompozit materyaller deneysel çalışmalarda yaygın olarak kullanılan matrikstir. PLGA in vivo olarak ilk defa 1987 yılında Hollinger ve Schmitz tarafından köpekler üzerinde deneysel mandibula kırıklarının kaynamasını hızlandırmak ve rejenerasyon sağlamak için kullanılmıştır. Bu çalışmada PLGA/Lipit bazlı materyal üretilmiş ve 40 hafta sonunda kallus oluşumu gözlenmiştir (Hollinger ve Schmitz, 1987).

Yüksek biyouyumluluk ve biyobozunurluk özelliklerine sahip olması, osteoblast migrasyonu ve adezyonu uyarıcı etkiler göstermesinden dolayı PLGA kullanımının diğer polimerlere göre daha avantajlı olduğu söylenebilir (Saptaji vd., 2024; Sun vd., 2022). PLGA'nın yalnız başına iyi bir osteokondüktivite göstermesi ile birlikte, içeriğine osteoindüktif ajanların eklenmesi de rejenerasyonu hızlandırmaktadır. Bu konuda yapılan çalışmalarda BMP eklenen PLGA kompozitlerinin in vitro ve in vivo ortamlarda osteoindüksiyon etki göstererek kemik iyileşmesini hızlandırdığı belirlenmiştir (Kim vd., 2015; Wang vd., 2015).

Kemik dokunun inorganik yapısını güçlendirmek üzere geliştirilen PLGA temelli biyomateryaller de oldukça fazladır. Özellikle hidroksiapatit kristalleri (kalsiyum, fosfat bileşikler) PLGA ile karışım haline getirilerek bir membran veya nanomolekül olarak kullanılmış ve kemik rejenerasyonu üzerine olumlu etkileri belirlenmiştir (Lu vd., 2024; Shi

vd., 2009). Bununla birlikte çeşitli metal alaşımlar da PLGA ile kullanılmış ve kemik doku rejenerasyonu üzerine etkileri incelenmiştir. Bu çalışmalarda baryum-magnezyum (Liu vd., 2021), magnezyum-çinko (Tang vd., 2023b), stronsiyum-magnezyum (Yu vd., 2022), stronsiyum-çinko (Hassan vd., 2022) gibi metalik alaşımlar PLGA'ya yüklenerek kemik iyileşmesi üzerine etkileri araştırılmıştır. PLGA'ya kemik rejenerasyonunu sağlamak üzere çeşitli hormonların yüklendiği deneysel kemik rejenerasyonu çalışmaları da bulunmaktadır. Parathormon yüklenen PLGA nanopartiküllerinin kemik iyileşmesi üzerine etkilerinin incelendiği bir in vivo çalışmada, biyomateryalin osteoblastlardan ALP sentezini artırdığı belirlenmiştir (Gentile vd., 2015). Östradiol ve PLGA ile oral bir form şeklinde üretilen nanopartiküllerin in vivo biyoyararlanımının yüksek olduğu ve kemik rejenerasyonu çalışmalarında kullanılabileceği bildirilmiştir (Mittal vd., 2007).

2.2.2. Kemik Doku Mühendisliği Alanında Melatonin İçeren Biyomateryal Çalışmaları

Melatonin kemik doku mühendisliği çalışmalarında biyomateryallerle birlikte sıklıkla kullanılmaktadır. Melatonin yüklenen biyomateryal çalışmaları sınırlı sayıda olup genellikle polimer temelli materyaller kullanılarak melatoninin etkinliği araştırılmıştır (Aykora vd., 2024). Yapılan in vitro ve in vivo çalışmaların kemik doku üzerine olumlu sonuçlar verdiği bildirilmiştir. İn vitro osteosarkoma hücrelerinde melatonin yüklenmiş PLGA nanopartikülleri ve kitosan hidroksiapatit partikülleri ile bifazik bozunma sağlayan matriksin etkileri incelenmiş ve MG63 kanser hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettiği bildirilmiştir (Çetin Altındal ve Gümüşderelioğlu, 2019). Jarrar vd. (2021)'nin melatonin ve BMP2 yüklenen PLGA mikropartiküllerinin in vitro MC3T3-E1 osteoblastik hücreleri üzerine etkilerinin araştırıldığı çalışmada, Runx2 ve ALP ekspresyonlarının buna ek olarak mineralizasyonun arttığı belirtilmiştir (Jarrar vd., 2021).

Yapılan başka bir çalışmada ise melatonin yüklenen PCL elektrospun membranların osteoblastik hücrelerde ve sıçanlarda kalvaryal defekt modelinde (3 mm bilateral defekt) kemik rejenerasyonu üzerine etkileri araştırılmıştır. PCL-melatonin membranının in vitro ve in vivo kemik rejenerasyonu üzerine uyarıcı etki gösterdiği belirlenmiştir (Gurler vd., 2019).

PLA ile melatonin bileşiminden enjektebl olarak hazırlanan CaP içerikli materyalin sıçanlarda femoral kondiler defekt modelinde osteogenezis üzerine etkileri incelenmiş ve kompozitin M2 makrofaj aktivitesini baskılayarak osteogenezisi artırdığı belirtilmiştir (Huang vd., 2024).

Melatonin yüklenen biyomateryaller kemik doku mühendisliği çalışmalarında sıklıkla tercih edilmektedir. Bununla birlikte yapılan çalışmalar genellikle greft materyali olarak tasarlanmış ve etkileri deneysel olarak araştırılmıştır (Chenhui vd., 2024; Tang vd., 2024; Zhang vd., 2024). Polimer bazlı biyomateryallerin biyouyumluluğunun yüksek olması ve biyobozunum sürelerinin kolaylıkla optimize edilmesi melatoninin kemik doku mühendisliği çalışmalarında polimer temelli biyomateryaller ile kullanılmasının daha iyi etkiler vereceğini işaret etmektedir (Ahmadpour vd., 2024). Buna dayanarak çalışmamızda melatonin yüklenmiş PLGA matriksinin otogreft uygulanan deneysel kritik kalvaryal defektler üzerine osteoindüktif ve osteokondüktif etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

ÜÇÜNCÜ BÖLÜM

MATERYAL YÖNTEM

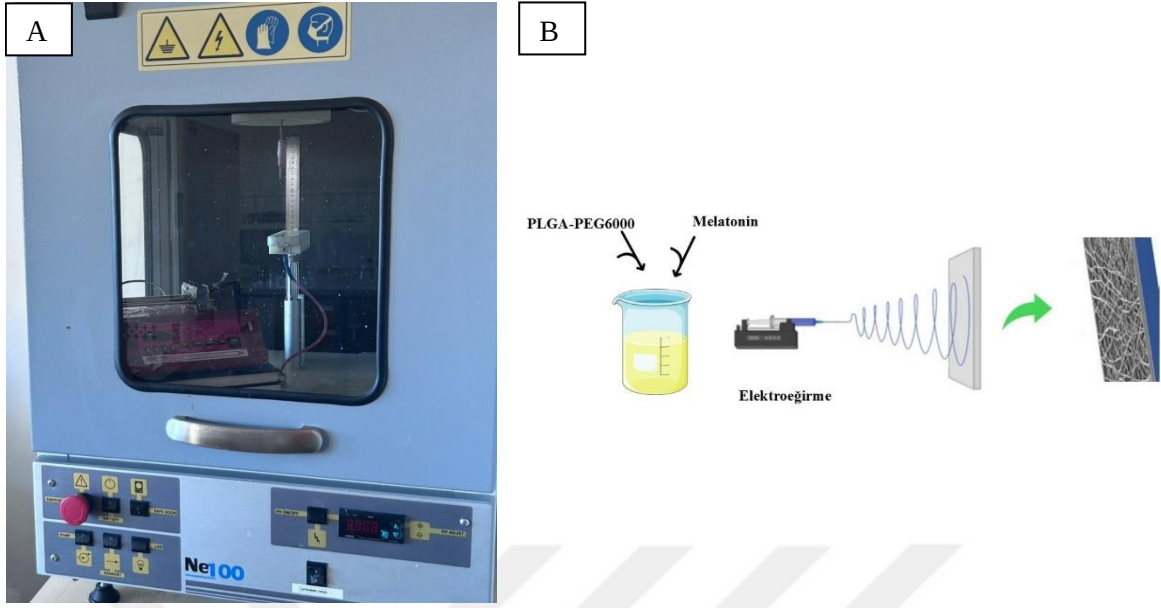
3.1. PLGA ve PLGA/MEL Nanoliflerinin Üretimi ve Karakterizasyonu

3.1.1. PLGA-PEG6000 Solüsyonunun Hazırlanması

Melatonin içeren nanolifler Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü Biyopolimer ve İleri Malzeme Araştırma Laboratuvarı'nda hazırlandı. Üretim basamakları ve şematik elektroğirme metodu Şekil 17' de gösterildi. Nanolif üretimi için öncelikle çözelti içinde toplam polimer oranı % 15 olacak şekilde polimer (PLGA-PEG6000, w/w=75:25) çözeltisi hazırlandı. Bunun için ilk olarak, PLGA (1,125 g) 5 ml DMF/DCM (w/w=70:30) çözelti sistemi içerisinde çözündürüldü ve daha sonra çözelti içerisine PEG6000 (0,375 g) eklendi. Çözelti homojen hale gelinceye kadar manyetik karıştırıcılı ısıtıcıda oda sıcaklığında 1 saat karıştırıldı (Gökçe vd. 2024).

3.1.2. Melatonin İçeren PLGA Çözeltisinin Hazırlanması

Bu amaçla, 28 günde biyobozunuma uğrayacak şekilde polimer çözeltisi içerisine Melatonin eklenerek karıştırıldı ve homojen olması sağlandı. Hazırlanan PLGA-PEG öncelikle dimetilformamid/diklorometan (w/w=70:30) içerisinde çözündürüldü. Melatonin (176 mg); (PLGA-PEG 1:1 %wt) PLGA-PEG ile karıştırıldı (Zhang vd., 2018). Karışım elektroğirme işleminden önce 60 dakika boyunca karıştırıldı. Elektroğirme ile nanolifler Inovenso, NE100 elektroğirme cihazı kullanılarak hazırlandı. Bu amaçla elektroğirme cihazı akış hızı 0.8 ml/h, mesafe 20 cm ve voltaj 20kV olacak şekilde ayarlandı. Melatonin dozu defekt alanına uygun şekilde $1 \times 1 \text{ cm}^2$ şeklindeki materyale, her bir matrikste 1 mg melatonin/matriks olarak yüklendi. Melatonin güneş veya elektrik ışığından etkilendiği için nanolife melatonin katılma aşamaları loş kırmızı ışık altında gerçekleştirildi. Bu işlemin yapıldığı tüm cihazlar bir alüminyum folyo ile sarıldı ve ışık almaması sağlandı.



Şekil 17. (A) Nanoliflerin üretilmesinde kullanılan elektroegirme cihazı, (B) Elektroegirme yöntemi ile nanolif üretilmesi.

3.1.3. Biyomateryalin Salım Profilinin Belirlenmesi

Biyomateryalin melatonin içeren nanoliflerden 3 tekrarlı olacak şekilde yaklaşık 20 mg tartılarak diyaliz membranının içine koyuldu. Daha sonra diyaliz membrana 1 ml fosfat tamponlu salin (PBS; pH 7.4 ve 20 ml'lik PBS; pH 7.4) içeren kaplara aktarıldı (Kim vd., 2020; Varila vd., 2012). Melatonin için UV spektrofotometre ile 300 nm ile 190 nm arasında tarama yapıldı, 220 nm ve 280 nm'lerde yüksek absorbans olup olmadığına bakıldı ve bu dalga boylarına göre belirlenmiş miktarlarda en az 6 standart metanolde hazırlanarak kalibrasyon eğrisi çizdirildi (Mirmajidi vd., 2021).

3.1.4. Nanolif Yapıda Üretilen Biyomateryalin SEM ile Karakterizasyonu

SEM görüntülemesi ile nanoliflerin homojenizasyonu, sürekliliği değerlendirildi. Biyomateryalin gözenekliliği ve yüzey şekli açısından değerlendirme yapıldı (Sui vd., 2021). Bu amaçla PLGA-PEG6000 nanolifleri ve melatoninli PLGA-PEG6000 nanolifleri 10 nm altınla kaplandı. Daha sonra SEM cihazı (JEOL JSM-7100-F) ile 15kV voltaj ile görüntüler elde edildi. Her iki materyal için her sahadan en az 10 görüntü elde edildi.

3.1.5. Nanolif Yapıda Üretilen Biyomateryalin FTIR ile Karakterizasyonu

FTIR kullanılarak, numunelerin yapılarında oluşan kimyasal bağlar belirlendi (Sui vd., 2021). Hazırlanan nanolifler FT-IR/ATR cihazı ile (Perkin Elmer, Spectrum Two, ABD) incelendi (Şekil 18). FTIR analizi ile melatonin içeren ve melatonin içermeyen nanoliflerin yapısındaki moleküler bağlar ve organik bileşikler incelendi. Bu amaçla materyallerden dalga boyu 400-4000 cm^{-1} seçilerek ölçümler alındı.



Şekil 18. Nanoliflerin yapısındaki moleküler bağların ve organik bileşiklerin incelendiği FTIR cihazının gösterimi.

3.1.6. Üretilen Nanolif Yapıda Biyomateryalin Sterilizasyonu ve Saklanması

Üretilen biyomateryaller hayvan deneylerinde kullanılmadan önce sterilize edildi. Bu amaçla üretilen biyomateryal öncelikle 1×1 cm şeklinde parçalar hazırlandı (Şekil 19). Hazırlanan biyomateryaller her iki tarafı 30’ar dakika olarak üzere ultraviyole (UV) ışınına maruz bırakıldı (Jarrar vd., 2021). Sterilize edilen biyomateyaller iki alüminyum folyo arasına yerleştirilerek plastik poşetler içerisinde vakumlandı ve kullanılıncaya kadar + 4 °C’de saklandı. Biyomateyaller hayvan deneyleri laboratuvarına soğuk zincir altında getirildi.



Şekil 19. Melatonin içeren nanoliflerin kırmızı ışık altında hazırlanması.

3.2. Hayvan Deneyleri

Üretilen biyomateryalin melatonin salım profili belirlendikten ve karakterizasyonu yapıldıktan sonra kemik iyileşmesi üzerine etkilerini belirlemek için in vivo hayvan deneyi aşamasına geçildi. Hayvan deneyleri, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi’nde (ÇOMÜDAM) yürütüldü.

3.2.1. Hayvan Materyali

Çalışmada ÇOMÜDAM'dan temin edilen 3-4 aylık 250-300 gram ağırlığında 54 adet erkek Wistar Albino cinsi sıçanlar kullanıldı. Sıçanlar çalışma süresince yaklaşık olarak 22 °C'lik oda sıcaklığında, 12 saat aydınlık-karanlık döngüsünde barındırıldı, yem ve su ulaşımına izin verildi.

3.2.2. Çalışma grupları

Canlı ağırlık ortalamaları dikkate alınarak sıçanların rastgele dağıtılması oluşturuldu. Çalışma öncesi yapılan güç analizine göre (G power; $\alpha=0,05$; $\beta=0,95$) her bir gruba her dönem için 6, toplamda ise 18 sıçan eklenmesi gerektiği anlaşıldı. Bu nedenle gruplar 18 sıçan içerecek şekilde oluşturuldu.

- **Grup 1 (Otogreft, n=18):** Bu grup kritik kalvaryal defekt modeli için kontrol grubu olarak kullanıldı. Bu amaçla gruptaki tüm sıçanların kafatasının her iki tarafında karşılıklı aynı noktalara gelecek şekilde frez aleti kullanılarak 2 adet 6 mm çapında kritik kalvaryal defekt oluşturuldu. Daha sonra bir defektten çıkarılan kemik parçası karşı taraftaki defekt alanına yerleştirilerek otogreft tamiri gerçekleştirildi. Çalışmanın 7., 14. ve 28. günlerinde gruptan rastgele 6 sıçan seçilerek ötenazi edildi, doku ve kan örnekleri alındı.
- **Grup 2 (PLGA, n=18):** Bu grup melatonin içermeyen PLGA yapısındaki biyomateryalin kritik kalvaryal kemik modelinde iyileştirici bir etki gösterip göstermediğinin belirlenmesi amacı ile oluşturuldu. Bu amaçla gruptaki tüm sıçanlarda Grup1'deki gibi kritik kalvaryal defekt modeli oluşturuldu, otogreft tamiri yapıldı ve greft olan alanın üzerine melatonin içermeyen PLGA yapısındaki biyomateryal (1×1 cm çapında) yerleştirildi. Biyomateryal otogreft tamiri yapılan

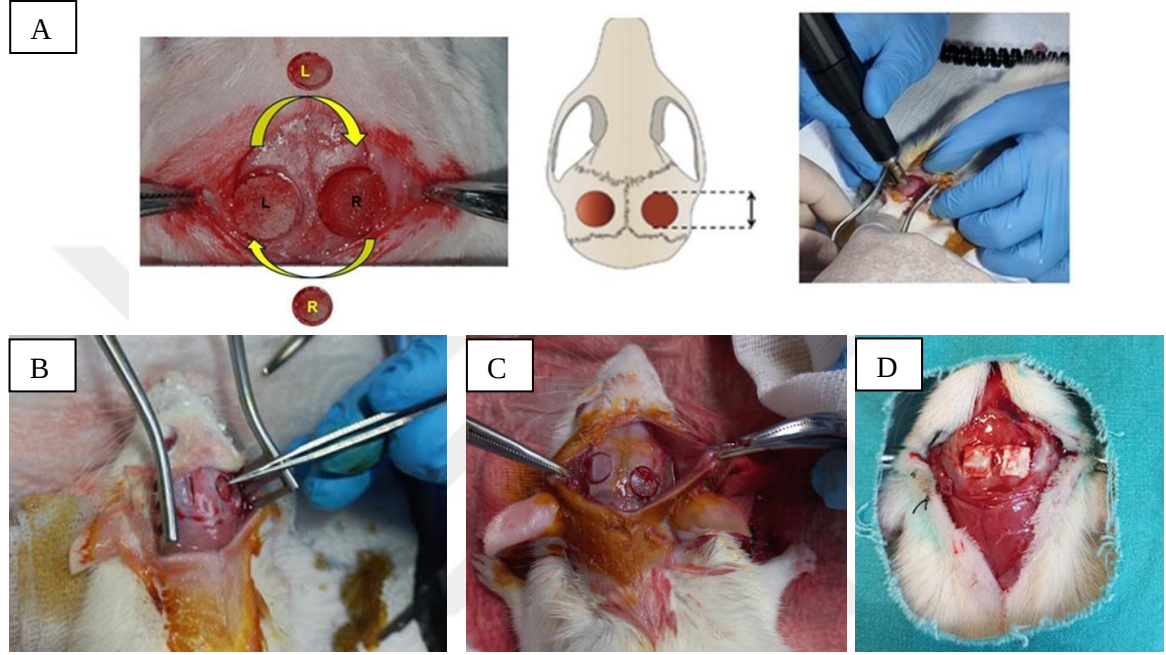
alanın tamamını kaplayacak şekilde uygulandı. Çalışmanın 7., 14. ve 28. günlerinde gruptan rastgele 6 sıçan seçilerek ötenazi edildi, doku ve kan örnekleri alındı.

- **Grup 3 (PLGA/MEL, n=18):** Bu grup melatonin içeren PLGA yapısındaki biyomateryalin kritik kalvaryal kemik modelinde iyileştirici bir etki gösterip göstermediğinin belirlenmesi amacı ile oluşturuldu. Bu amaçla gruptaki tüm sıçanlarda Grup 1'deki gibi kritik kalvaryal defekt modeli oluşturuldu, otogreft tamiri yapıldı ve greft olan alanın üzerine melatonin içeren PLGA yapısındaki biyomateryal (1×1 cm çapında) yerleştirildi. Biyomateryal otogreft tamiri yapılan alanın tamamını kaplayacak şekilde uygulandı. Çalışmanın 7. 14., ve 28. günlerinde gruptan rastgele 6 sıçan seçilerek ötenazi edildi, doku ve kan örnekleri alındı.

3.2.3. Kritik Kalvaryal Kemik Defekti Modeli Oluşturulması

Kritik karvalyal defekt modeli literatürde belirtilen ve yaygın olarak kullanılan yöntemle göre gerçekleştirildi (Wang vd., 2022). Bu amaçla ilk olarak sıçanlar intraperitoneal ketamin-ksilazin (70 mg/kg-7 mg/kg) ile genel anestezi altına alındı. Daha sonra sıçanların kafa bölgesi tıraş edilerek kafatası görünür hale getirildi. Operasyon yapılacak bölge antiseptik solüsyon ile dezenfekte edildi. Sıçanların frontal bölgesinde bir insizyon ile deri ve periost kalvaryadan iki yana doğru ayrıldı. Kalvaryumdaki sagittal süturun her iki yanına bilateral 6 mm çapında daire şeklinde trefin frez kullanılarak kritik boyutlu kalvaryal defekt oluşturuldu (Şekil 20A). Operasyon alanında frez kullanılırken dokuda oluşabilecek termal hasarın engellenmesi için buzlu 5-6 ml'lik serum fizyolojik sürekli irrigasyon uygulandı. Defekt bölgesindeki kemik, dura matere zarar verilmeden çıkarıldı (Şekil 20B). Kemik dokusu çıkarıldıktan sonra defektler steril serum fizyolojik ile yıkandı. Tüm gruplarda bregmanın bir tarafından çıkarılan kalvaryal kemik parçası karşı tarafa yerleştirildi. Böylelikle aynı sıçanda kendi dokusunun implante edildiği iki farklı otogreft bölgesi elde edildi (Şekil 20C). Otogreft grubunun dışındaki gruplarda otogreft tamiri yapıldıktan sonra

defekt alanına $1 \times 1 \text{ cm}^2$ şeklinde hazırlanan biyomateryaller yerleştirildi (Şekil 20D). Tüm gruplarda operasyonun sonunda insizyon bölgesi suture edilerek kapatıldı. Tüm sıçanlara profilaktik olarak Sefazol 20 mg i.m. uygulandı. Operasyon sonrası sıçanlar tekli kafeslerde barındırıldı.



Şekil 20. (A) Sıçanlarda 6 mm çapında kritik boyutta kalvaryal defekt oluşturulması, (B) Kalvaryal defekt oluşturulduktan sonra dura mater görüntüsü, (C) Sıçanlara otogreft uygulamasının yapılması ve (D) Otogreft yapılan alanlara biyomateryal uygulamasının yapılması.

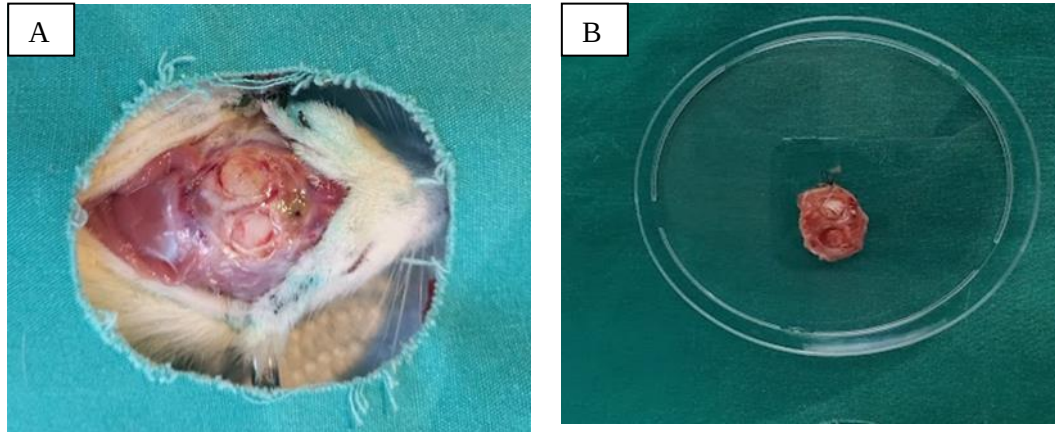
3.2.4. Ötenazi, Kan ve Doku Örneklerinin Alınması

Çalışmanın 7., 14. ve 28. günlerinde her gruptan rastgele 6 sıçan seçildi ve sıçanlar ötenazi edildi. Ötenazi işlemi için ketamin (70 mg/kg) - ksilazin (7 mg/kg) ile genel anestezi altında sıçanların kalbinden 5 ml kan örneği alındı ve ötenazi işlemi tamamlandı. Bu aşamadan sonra hızlıca doku alımına geçildi.

Sıçanlardan doku alımı yapılmadan önce cerrahi alan enfeksiyon açısından değerlendirildi. Daha sonra sıçanların kafa derisinde 11 no'lu bistüri ile insizyon kesisi yapıldı. Kaynama bölgesinin immobilizasyonuna dikkat edilerek kalvaryum epitel dokudan bistüri yardımıyla kazınarak ekarte edildi. İlk olarak greft bölgesi enfeksiyon, doku kaybı, biyomateyalin durumu açısından değerlendirildi.

Doku örnekleri tüm gruplarda kafatasında oluşturulan kalvaryal defekt bölgesinde otogreft uygulanan alan ile kaynama bölgesini kapsayan alanı içerecek şekilde alındı. Bregmanın her iki tarafında kalvaryal defekt oluşturulduğu için kalvaryumun tamamı kesici frez ile çıkarıldı (Şekil 21). Böylelikle defekt sınırı ile otogreft alanı arasındaki iyileşme alanları ve yeni kemik oluşum alanlarının tamamının elde edilmesi hedeflendi (Wang vd., 2015).

Doku örnekleri % 10'luk formaldehit içeren solüsyonların içerisine konularak histopatolojik analizlerin yapılacağı laboratuvara iletili. Kan örnekleri ise 15 000 rpm'de 15 dakika boyunca santrifüj edildikten sonra, serumları ependrof tüplere alınarak analiz edilinceye kadar -20 °C'de saklandı.



Şekil 21. Doku alımı sırasında 28. günde otogreft uygulaması yapılan ve biyomateriyal uygulanan (A) kalvaryal alanın temsili bir görüntüsü ve (B) elde edilen total kalvaryal doku gösterimi.

3.3. Histopatolojik Analizler

Laboratuvara gelen doku örnekleri öncelikle 2 gün boyunca % 10 formaldehit çözeltisi içerisinde bekletildi. Daha sonra dokular formik asit (% 50' lik) ve sodyum sitrat (% 20' lik) çözeltileri ile hazırlanan karışımda dekalsifiye edildi. Dekalsifiye örnekler rutin doku takibi için artan derecelerde etil alkol serisinden geçirilerek dehidratasyon yapıldı. Aseton ve ksilen serilerinden geçirildi. Dokular ksilen ile şeffaflandırıldı ve parafin içerisine gömüldü.

3.3.1. Hematoksilen-Eozin Boyama

Parafin dokudan 4 mikrometre kesitler alınarak 2 gün süre ile etüvde (37 °C) bekletildi. Bu süre bitiminde 2 saatlik sürede kesitler 20 dakika etüvde (60 °C), 20 dakika oda sıcaklığında ksilolde bekletildi. Ardından parafin kesitler alkol serilerinden (% 96'dan % 70'a kadar azalan) geçirildi. Dehidrate edilen kesitler distile suda yıkanarak 15 dk süre ile Hematoksilen solüsyonu içerisinde bekletildi ve sonrasında çeşme su altında 15 dakika yıkandı işlem sonrası süzölmeye bırakıldı. Ardından 1 dakika Eozin içinde bekletildi. Daha sonra 1'er dk boyunca % 70'den başlayarak artan etil alkolden geçirildi ve 20 dk (3 kez) ksilol ile muamele edilip entellan kullanılarak kapatıldı. Parafin bloklardan boyamalarda kullanılmak üzere 4 µm kesitler alındı. H-E ile boyanan doku örneklerinde otogreft ile ana kemiğin kaynakıldığı bölgedeki yeni kemik oluşumu yüzdesi hesaplandı. Bu amaçla, ilk olarak ana kemik alanı belirlendi. Daha sonra kaynama bölgesi ve otogreft kemik belirlendi. İlk olarak ana kemik ile otogreft arasında kalan bölge ölçüldü. Daha sonra bu bölgedeki yeni kemik oluşum alanları ölçümlendirildi. İncelenen kesitlerde tüm görüntü alanını kaplayan üçer saha esas alınarak 400 büyütme altında yeni kemik oluşum alanı total defekt alanına yüzdelik oranla ifade edildi (Abushahba vd., 2023).

3.3.2. Masson Trikrom Boyama

MT boyama işlemi için öncelikle kesitler 1 gece boyunca etüvde (60 °C) bekletilerek deparafinizasyon işlemi gerçekleştirildi. Daha sonra 20 dk süreler ile üç farklı ksilen serisinden geçirildi. Kesitler azalan alkol serilerinden geçirildi ve distile suda yıkandı. Bu aşamadan sonra distile sudan çıkarılan kesitler MT boyama kitiyle boyandı. A, B, C ve D reaktifleri içinde sırasıyla bekletilen dokular daha sonra distile suda yıkandı. Bu aşamalardan sonra kesitler 10 dakika E reaktifi içerisinde tutuldu. Ardından Masson anilin mavisi ile 5 dakika boyunca muamele edildi. Tekrar distile suda yıkanarak, % 95'lik alkol kullanılarak dehidrasyon sağlandı ve tekrar yıkandı. Kesitler ksilol ile şeffaflandırılarak entellan ile kapatıldı. Kaynama alanındaki yeni kolajen oluşumu MT boyama yöntemi ile incelendi ve Tablo 1'de verildiği şekilde skorlandı (Pretel vd. 2007).

Tablo 1. MT boyama skorlaması.

Değerlendirme	Skor
Kemik kaynaması yok, bağ doku oluşumu yok	1
Osteon oluşumu, osteoprogenitör ve osteojenik hücrelerin oluşturduğu bağ doku oluşumu	2
İzole immatür kemik spikülü oluşumu	3
Kompakt kemik oluşumu	4

3.3.3. Von-Kossa Boyama

Von Kossa boyama tekniği kaynama bölgesindeki hidroksiapatit kristallerinin oluşumunu incelemek amacı ile yapıldı. Bu amaçla örnekler % 5 gümüş nitrat ile boyandı ve 30 dk ışığa maruz bırakıldı. Fosfat nedeniyle örnekler % 5'lik sodyum tiyosülfat solüsyonu içinde tipik siyah renk aldığı gözlemlendi. Dokular tekrar eozin ile boyandı, dehidrate edildi ve

dereceli alkol ile muamele edildikten sonra Permout ile yüklenerek mikroskop altında incelendi. Mineralizasyon gerçekleşen alanların toplam kaynama alanına olan oranı yüzdelik olarak hesaplandı (Bi vd., 2012).

3.3.4. Periyodik Asit Schiff Boyama

PAS boyama tekniği kaynama alanındaki anjiyogenezi değerlendirmek için kullanıldı. Bu amaçla öncelikle kesitler 1 saat boyunca etüvde (60 °C) deparafinizasyon işlemi için bekletildi. Ardından tekrar 1 saat boyunca 60°C de etüvde, sonrasında 20 dakika oda sıcaklığında olmak üzere üç değişim şeklinde ksilol solüsyonunda bekletildi. Bu aşamadan sonra kesitler alkol serisinden geçirilip dehidrate edildi. Distile su ile yıkandıktan sonra periyodik asit solüsyonu ile 10 dakika muamele edilip, boyadan arındırmak için 2-3 dakika distile su ile yıkandı. Kesitlerin suyu süzöldükten sonra Schiff boya solüsyonu ile 20 dakika boyunca muamele edildi. Ardından tekrar distile su ile yıkandı. Kesitler potasyum metabisülfid solüsyonu ile muamele edildikten sonra fiksasyon solüsyonuna koyuldu. Kesitler ardından distile su ile yıkandı ve Mayers hematoksilen solüsyonu ile muamele edildi. Bundan sonra çeşme suyunda (5 dakika) yıkanan kesitler, buradan alınarak % 96'lık alkolde bekletildi, ksilol ile (3 kez) şeffaflandırma yapıldıktan sonra entellan ile kapatıldı. Bu aşamadan sonra kesitler 20x büyütme ile kan damarlarının ana hatlarının belirlendiği 6 bölüme ayrılarak incelendi. Altı bölgenin total alanı, defekt alanının yüzdesi olarak toplam kan damarı alanını belirlemek için kullanıldı (Bi vd., 2012). PAS boyaması ile bazal membran kalınlığındaki değişiklikler incelendi.

3.4. İmmünohistokimyasal Analizler

Çalışmamızda immünohistokimya analizi ile kalvaryal dokuda otogreft ve ana kemik doku arasındaki kaynama bölgesi örneklerinden biyomateryalin yeni kemik oluşumu üzerine etkilerini belirlemek üzere osteogenetik belirteçler olan ALP, VEGF, Runx2, BMP2 ve TRAP immünoaktiviteleri incelendi.

ALP aktivitesi mineralizasyon ve kollajen birikiminin belirlenmesi; Runx2 osteoblast matürasyonunun ve aktivitesinin belirlenmesi VEGF anjiogenezisin değerlendirilmesi; BMP2 osteoblastik aktivite ve kemik rejenerasyonunun düzeyinin belirlenmesi ve TRAP ise osteoklastik aktivitenin değerlendirmesinde kullanıldı.

Bu amaçla kesitlere ilk olarak indirekt immünohistokimya yöntemi ile formalinde fikse edilmiş örneklerde deparafinizasyon ve antijen kurtarma işlemi uygulandı. Daha sonra kesitler TBST (Twin Tampon Çözeltisi Tampon, pH 7.4) ile 15 dakika muamele edildikten sonra, 10 dakika boyunca % 3 hidrojen peroksit (Lab Vision, Thermo Scientific, Fremont, ABD)' e maruz bırakıldı. Kesitler bloklandıktan sonra primer antikorklar TRAP1 (orb136692), ALP (orb388143), BMP2 (orb677060), VEGF (orb256347) ve Runx2 (orb1412235; Biorbyt, UK) 1:50 oranında seyreltilerek doku kesitlerine eklendi. Kesitler bu şekilde gece boyunca primer antikor ile +4 °C'de bekletildi. Biotinlenmiş olan sekonder antikor (Lab Vision, Thermo Scientific) ile oda sıcaklığında kesitler 20 dk boyunca inkübe edildi. Takiben streptavidin peroksidaz enzimi ile (20 dakika) reaksiyona girmesi sağlandı (Lab Vision, Thermo Scientific). Bu aşamalardan sonra kesitler, TBST ile yıkandı ve kromojen substrat diaminobenzidin (DAB) içeren solüsyon ile inkübe edilerek renk reaksiyonu beklendi. Zıt boyama aşamasında Mayer hematoksilen kullanıldı. Kesitlere 5-10 dk süre ile zıt boyama yapıldı. İmmünoreaktivite izlenen görüntülerde h-skor kullanılarak yoğunluk değerlendirildi. Boyanma yoğunlukları sırasıyla 1=zayıf, 2=orta ve 3=güçlü olarak değerlendirildi. Her yoğunluk için üç farklı mikroskopik alanda hücreler sayıldı. İlgili puan daha sonra H-skoru = $\sum P_i$ (boyama yoğunluğu + 1) formülü kullanılarak hesaplandı. P_i , % 0 ile % 100 arasında değişen yoğunluk için işaretli hücrelerin yüzdesi olarak ifade edildi (Bali vd., 2020, Demirel vd., 2022, Karakol vd., 2023).

3.5. Biyokimyasal Analizler

Kan örneklerinden elde edilen serumlardan ALP seviyesinin ölçümü gerçekleştirildi. Bunun için ELISA yöntemi ile üretici firmanın belirlediği kit prosedürü (SUNREDBIO MARKA ELISA kit ALP: REF: DZE201110346 LOT: 202408) doğrultusunda değerlendirme gerçekleştirildi (Ponzano vd., 2023).

ALP standardı içinde stok standart solüsyonunu oluşturuldu. Ardından sırasıyla 120, 60, 30, 15, 7,5 ve 3,75 ng/ml olmak üzere ALP standartları hazırlandı. Uygun kuyucuklara 50 µl standart eklendi. Standart solüsyonu biyotinle işaretlenmiş antikor içeriyor olması nedeniyle standart kuyucuklarına antikor eklenmedi. Numune örnekleri kuyucuklara 40 µl hacimde eklendi. Numune kuyucuklarına 10 µl anti ALP antikor eklenmedi. Kuyucuklar (standart ve numune kuyucukları) 50 µl streptavidin-HRP eklenerek, kaplandı ve 1 saat süre ile 37 °C’de inkübe edildi. Daha sonra 350 µl yıkama solüsyonu ile ELISA yıkayıcısında 5 kez yıkandı. Kromojen A kuyucuklara 50 µl oranında eklendi. Sonraki aşamada kromojen B kuyucuklara eklenerek 37 °C’de 10 dk boyunca inkübe edildi. Son olarak kuyucuklara 50 µl stop solüsyonu eklendi. 15 dakika içerisinde mikropate okuyucu ile 50 nm dalga boyunda absorbanlar okundu.

3.6. İstatistiksel Analizler

Çalışmamızdan elde edilen histopatolojik, immünohistokimyasal ve biyokimyasal sonuçların ortalamaları arasındaki fark verilerin sayısal olup olmamasına, varyansların homojen olup olmamasına göre, independent t test, Mann Whitney U, ayrıca 2 grubun haricindeki çoklu karşılaştırmalarda tek-yönlü ANOVA, TUKEY HSD Test veya Tamhane’s, Dunnet’s testlerinden uygun olanı SPSS 20 yazılımı kullanılarak analiz edildi. Tüm verilerin korelasyon analizi Pearson korelasyon testi kullanılarak belirlendi. Analizlerin verilerinde p (önem seviyesi) $\leq 0,05$ anlamlı olarak kabul edildi.

DÖRDÜNCÜ BÖLÜM

ARAŞTIRMA BULGULARI

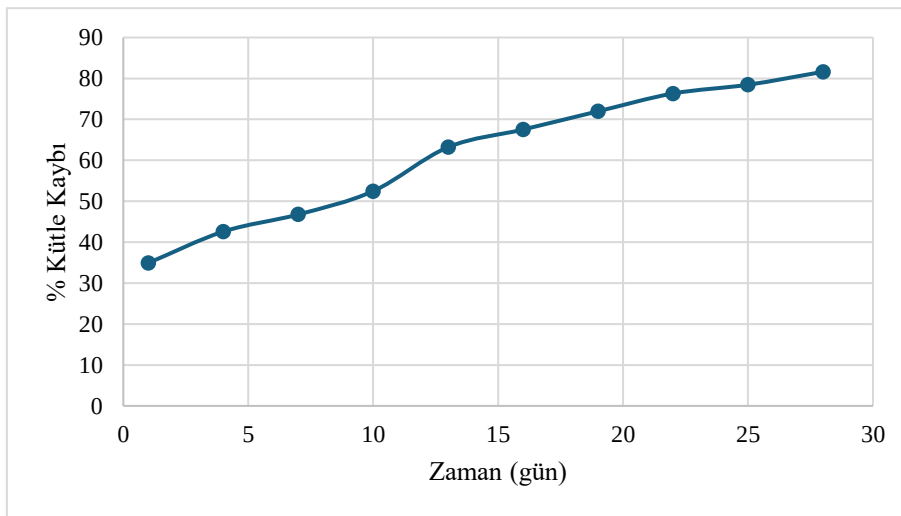
Bu çalışmanın bulguları nanoliflerin üretimi ve karakterizasyonu ile bu nanoliflerin in vivo hayvan deneylerinde etkinliğinin değerlendirilmesi verilerini içermektedir.

4.1. PLGA/MEL Nanoliflerinin Üretimi ve Karakterizasyonu

Çalışmamızda ilk olarak PLGA/MEL içeren nanolifler üretildi. Üretilen nanoliflerin biyobozunum ve ilaç salım profilleri belirlendi. İn vivo deneylerde kullanılmadan önce üretilen PLGA/MEL nanolifleri UV sterilizasyona maruz bırakıldı. PLGA/MEL içeriğindeki, melatoninin ışığa duyarlılığı nedeniyle, UV sterilizasyon sonrasında ilaç salım profili ölçümü tekrar gerçekleştirildi. PLGA/MEL nanoliflerinin morfolojik karakterizasyonu SEM analizi ile kimyasal bağlarının yapısı ise FTIR analizi ile belirlendi.

4.1.1. Nanoliflerin Biyobozunum Profili

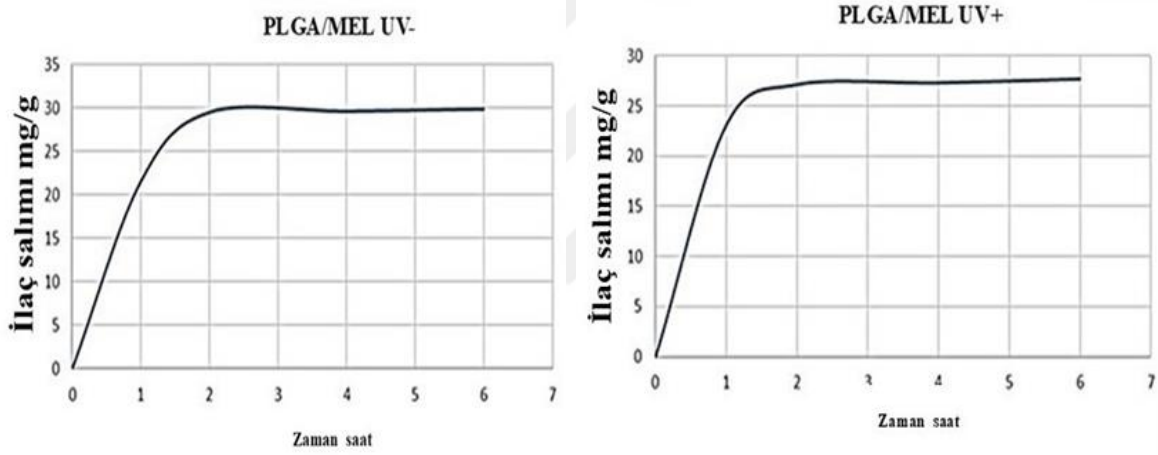
PLGA (LA:GA; 50:50) ve PEG6000 (75:25) formülasyonunun in vitro bozunumu 28 gün süre ile optimize edildi. Nanoliflerin bozunum grafiğine göre 28. günde % 85-90 oranında bir biyobozunum gözlemlendi (Şekil 22).



Şekil 22. Nanoliflerin biyobozunum profili.

4.1.2. PLGA/MEL Nanoliflerinin İlaç Salım Profili

Çalışmamızda 176 mg melatonin yüklenen PLGA (1,5 gr) nanolifinin melatonin salım profili PBS içerisinde 24 saat boyunca takip edildi. Bu amaçla 1 saat aralıklarla alınan çözelti örneklerinde UV spektrofotometre ile 300 nm ile 190 nm arasında tarama yapılarak açığa çıkan etken madde düzeyleri ölçüldü. Böylelikle çalışmamızda nanolife melatonin yüklendikten sonra ilaç salım profili belirlendi. En yüksek salım 1. saatte gerçekleşmiş olup 1gr malzemeden 25 gr (% 85) salım gerçekleşti. 2. saatin başında PLGA/MEL'in muamele edildiği PBS solüsyonu değiştirildi. Bu saatten sonra 3 saat süre plato düzeyinde kalan eğri çizdirildi ve salım durumu belirlendi (Şekil 23A).

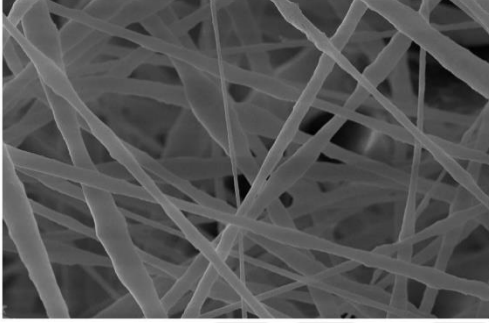


Şekil 23. (A) UV sterilizasyon öncesi ve (B) UV sterilizasyon sonrası PLGA/MEL nanoliflerinin ilaç salım profili.

In vivo deneylerde kullanılmadan önce nanolifler UV ışınları ile sterilize edildi. Melatonini ışığa duyarlılığı nedeniyle biyomateryal bileşiminde yüklenen melatonin dozunda bir değişim olup olmadığı UV ışınları ile sterilizasyon yapıldıktan sonra da gerçekleştirildi. Nanoliflerin salım grafiğine göre melatonin dozunda bir kayıp gözlenmedi (Şekil 23B).

4.1.3. SEM Analizi Sonuçları

Yapılan SEM analizine göre PLGA/MEL ve PLGA nanoliflerinin lif yapısı dağılımı belirlendi. Buna göre PLGA/MEL ve PLGA nanoliflerinin düzgün homojen lif dağılımına sahip olduğu belirlendi. Nanoliflerin süreklilik gösterdiği ilaç salımı sağlayabilecek bir membran özelliğinde olduğu görüldü (Şekil 24).

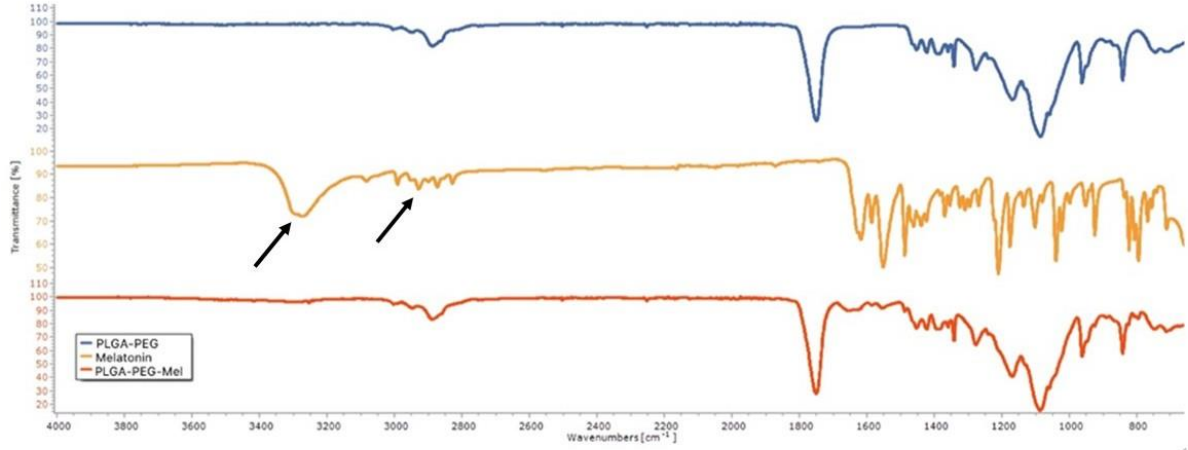


Şekil 24. Üretilen nanoliflerin SEM görüntüleri.

4.1.4. FTIR Analizi Bulguları

PLGA-PEG nanolifine ait FT-IR spektrumunda PLGA ve PEG yapılarına ait karakteristik pikler görülmektedir. PLGA yapısındaki karakteristik pik 1760 cm^{-1} 'de C=O gerilmesini göstermektedir. Spektrumdaki 2888 cm^{-1} 'deki karakteristik bant PEG yapısındaki CH, CH₂ ve CH₃ gruplarının gerilmesine aittir. Analizlerde 1130 cm^{-1} ve 1452 cm^{-1} 'deki karakteristik bantlar sırasıyla metil grubunun C-O-C grubuna ve C-H bağına aittir (Pereira vd. 2016). Melatonine ait karakteristik pikler ikinci spektrumda açıkça görülmektedir. 3300 cm^{-1} 'de görülen pik melatonin yapısındaki N-H gerilmesine aittir. -CN gerilme pikleri 2900 cm^{-1} civarında ve ikincil amidlerin gerilme titreşimlerine ait pikler yaklaşık 1650 cm^{-1} 'de görülmektedir (Lee vd, 2023; Altındal ve Gümüşderelioğlu, 2016). PLGA-PEG içerisine melatonin eklenmiş nanolife ait üçüncü spektrumda hem PLGA ve PEG polimerlerine hem de melatonine ait karakteristik pikler açıkça görülmektedir. Ancak yapıda melatonin yüzdesi

düşük olduğu için melatonine ait piklerin şiddetinin daha düşük olduğu görülmektedir (Şekil 25).



Şekil 25. PLGA, PLGA/MEL ve melatoninin FTIR spektrumu.

4.2. In vivo Bulgular

Çalışmamızın in vivo hayvan deneyleri kısmında, sıçanlardan Ototogreft, PLGA ve PLGA/MEL olmak üzere 3 grup oluşturuldu. Bu gruplardan çalışmanın 7., 14., ve 28. günlerinde analizlerde kullanılmak üzere kalvaryal doku elde edebilmek için, her grupta 6 hayvan olacak şekilde toplam 54 adet Wistar Albino erkek sıçan kullanıldı. Gruplar oluşturulurken gruplar arası parametrelerin farklılığını ortadan kaldırmak amacı ile canlı ağırlıkları birbirine yakın değerlere sahip gruplar oluşturulmaya özen gösterildi. Deneysel sürecin 7., 14. ve 28. günlerde kalvaryal kemik dokuları (otogreft-ana kemik kaynama bölgesi) alınarak, histopatolojik boyamalar (H-E, MT, PAS ve Von Kossa), immünohistokimyasal analizler (ALP, TRAP1, BMP2, Runx2, VEGF imünoreaktiviteleri) yapıldı. Kan örneklerinden elde edilen serumlardan ise biyokimyasal analizler (serum ALP seviyeleri) yapıldı. Tüm çalışma süresince 7. günde PLGA/MEL grubunda 1 sıçan operasyona bağlı nedenlerden dolayı öldü. Diğer tüm sıçanlar çalışmayı sağlıklı bir şekilde tamamladı ve araştırma sonucunu etkileyecek herhangi bir olumsuzlukla karşılaşmadı.

Analizlere ait bulgularımız aşağıda verilmiştir.

4.2.1. Histopatolojik Boyama Bulguları

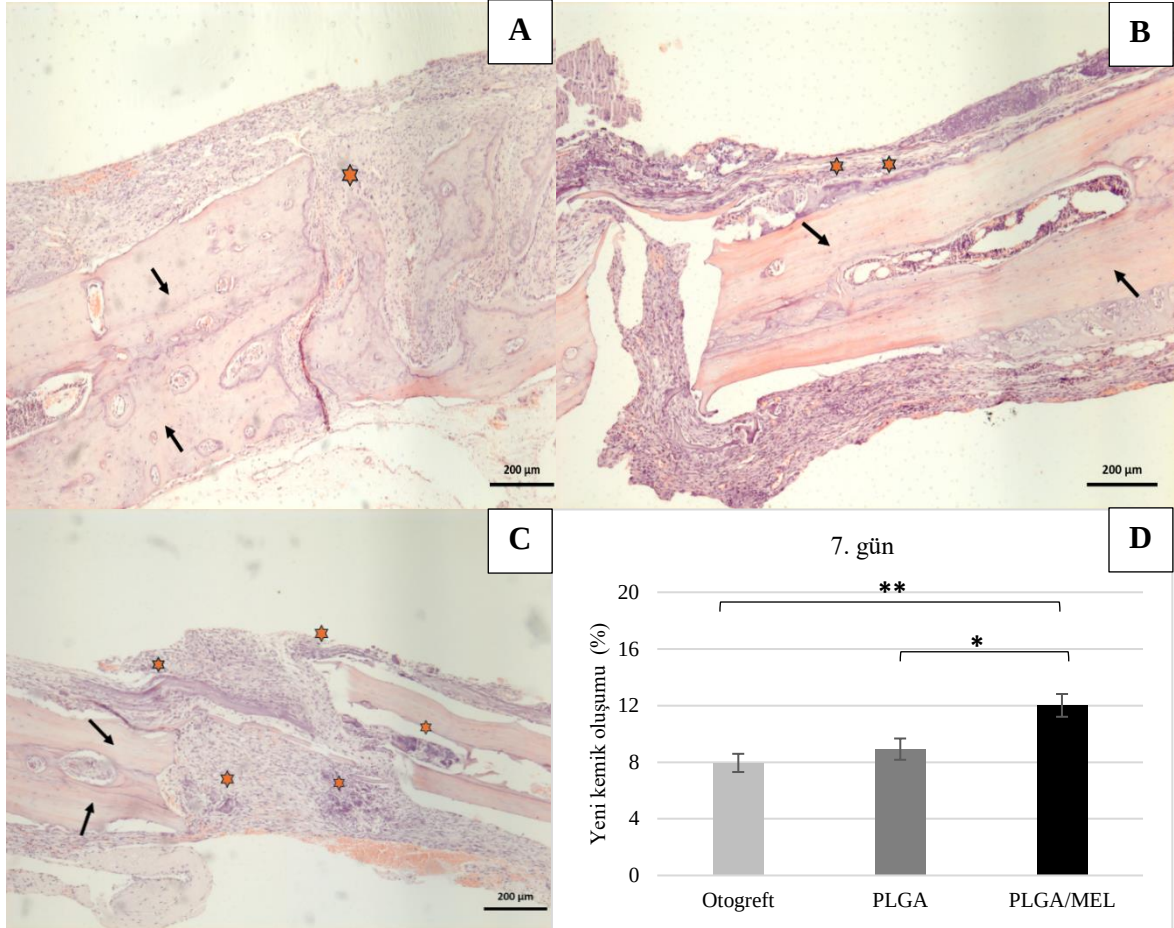
Histopatolojik değerlendirmede bilateral oluşturulan kalvaryal kemik defekti sonrası otogreft yapılan ve nanolif uygulanan grupların kaynama bölgesinde düzgün ve belirgin bir kemik iyileşmesi mevcut olup defekt alanında remodeling evresinin özellikleri görüldü. Hiçbir örnekte enfeksiyon gibi kemik iyileşmesini olumsuz etkileyecek bulguya rastlanmadı. Osteoid yapı ve osteoblastlar ile gelişen kemik oluşumu gözlendi. Her bir analiz için gruplara ait bulgular aşağıdaki bölümde gösterildiği gibidir.

H-E Boyama Bulguları

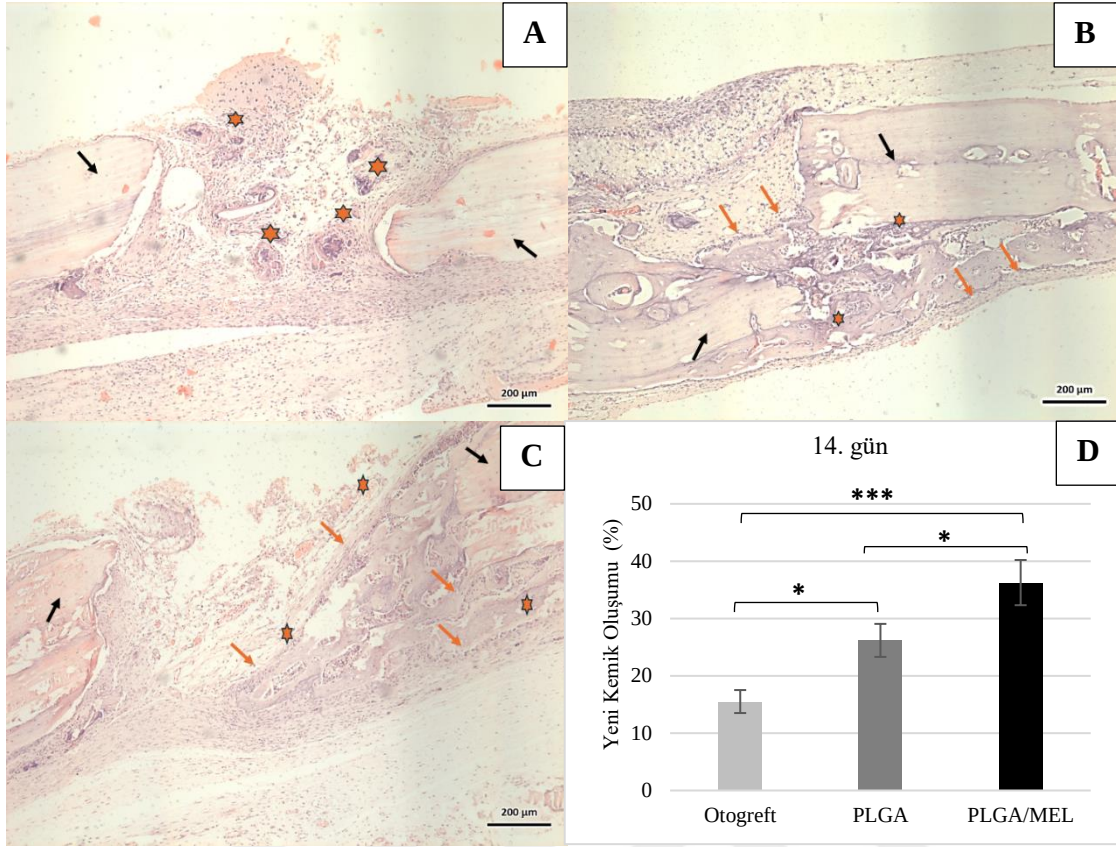
Yeni kemik oluşumu seviyelerinin belirlenmesi için ana kemik ile otogreftin kaynama bölgesinden alınan dokulara ait kesitlerde H-E boyaması yapılarak, gruplar arasında değerlendirme yapıldı. Otogreft gruplarında 7., 14. ve 28. günlerde elde edilen boyamalarda defekt duvarlarına yakın ve az miktarda yeni kemik oluşumu saptandı. PLGA/MEL grubunda kaynama bölgesinde mineralize kemik trabekülleri ve yeni kemik oluşumu gözlendi. PLGA ve PLGA/MEL gruplarında yüksek oranda hücresel aktivasyon izlendi. Greftin yerini yeni oluşan kemik dokunun aldığı belirlendi (Şekil 26, Şekil 27 ve Şekil 28).

PLGA/MEL grubunda yeni kemik oluşumunun 7., 14. ve 28. günlerde Otogreft grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığı tespit edildi (sırasıyla $p<0,01$; $p<0,001$, $p<0,05$). PLGA/MEL grubunda yeni kemik oluşumu miktarının PLGA grubuna göre 7. ve 14. günlerde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olduğu izlendi ($p<0,05$). PLGA/MEL ve PLGA grupları arasında 28. günde yeni kemik oluşumu açısından anlamlı bir fark tespit edilmedi. PLGA grubunda ise 14. ve 28. günlerde yeni kemik oluşumu düzeylerinin Otogreft grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olduğu belirlendi ($p<0,05$). Bununla birlikte 7. gün verilerinde PLGA grubundaki yeni kemik oluşum düzeyi ile Otogreft grubu arasında anlamlı bir fark saptanmadı (Şekil 27). Yapılan korelasyon analizine göre tüm günlerde yeni kemik oluşumu düzeyi ile yeni damar oluşumu, BMP2,

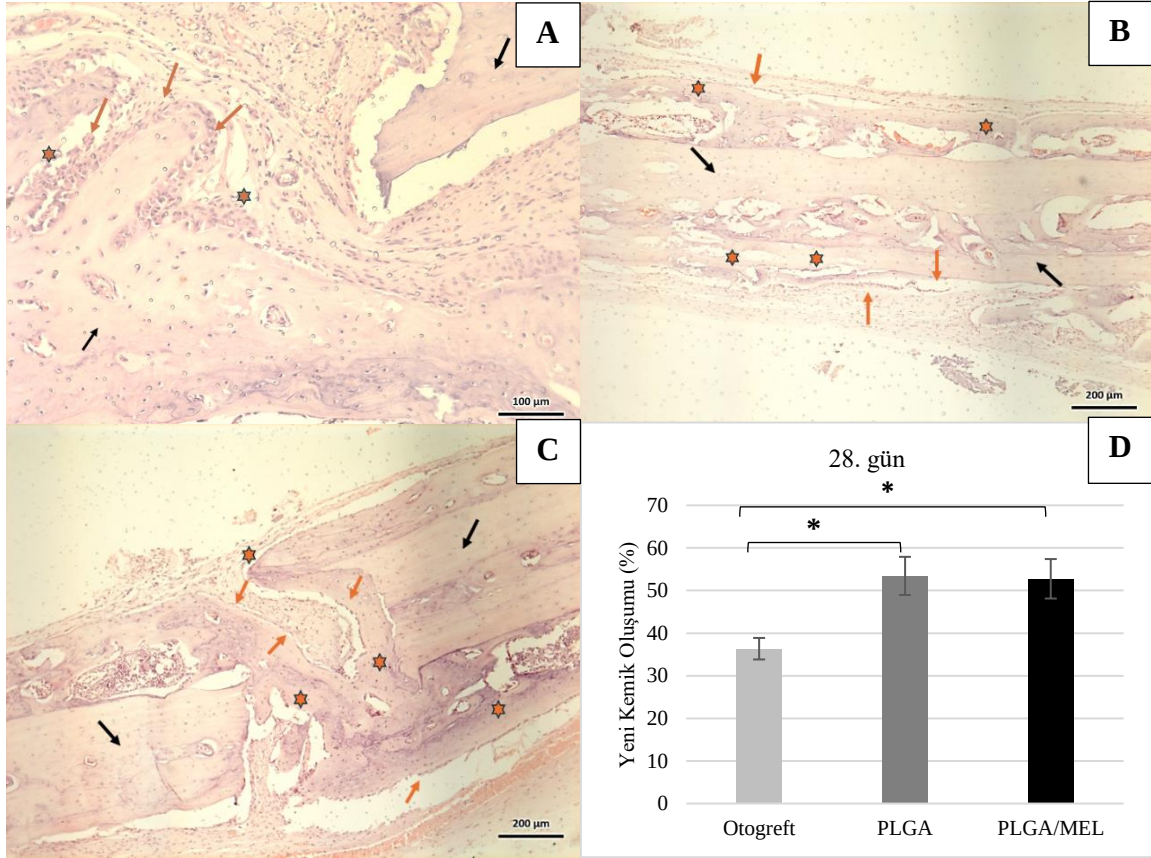
TRAP ve ALP pozitif hücre yoğunluğu parametreleri arasında anlamlı düzeyde pozitif korelasyon belirlendi ($p<0,05$).



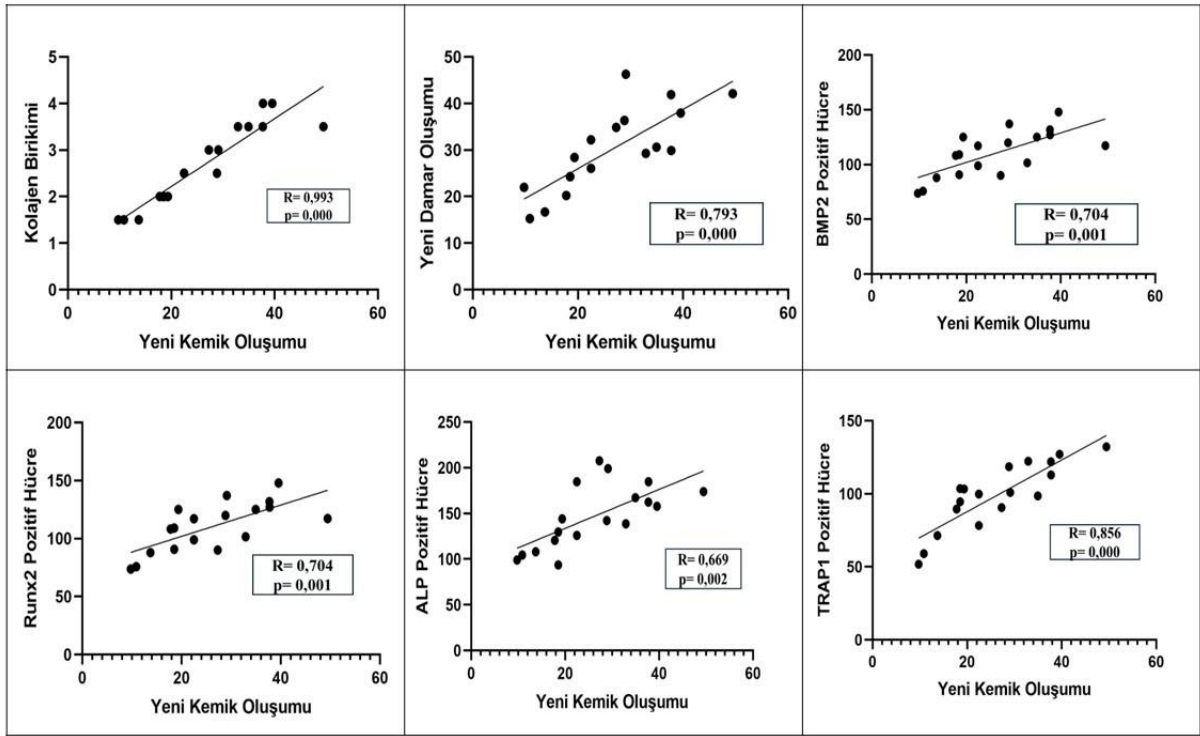
Şekil 26. (A) Otograft, (B) PLGA, (C) PLGA/MEL gruplarına ait 7. gün H-E boyama görüntüleri x10 ve (D) Yeni kemik oluşumu (%) oranlarına göre yapılan değerlendirme sonuçlarının grafiksel gösterimi (*; $p<0,05$, **; $p<0,01$; Siyah ok: ana kemik; Yıldız: yeni kemik formasyonu).



Şekil 27. (A) Otoplast, (B) PLGA, (C) PLGA/MEL gruplarına ait 14. gün H-E boyama görüntüleri x10 ve (D) Yeni kemik oluşumu (%) oranlarına göre yapılan değerlendirme sonuçlarının grafiksel gösterimi (*; $p < 0,05$, ***; $p < 0,001$; Siyah ok: ana kemik; Yıldız: yeni kemik formasyonu; Kırmızı ok: osteoblast).



Şekil 28. (A) Otogreft, (B) PLGA, (C) PLGA/MEL gruplarına ait 28. gün H-E boyama görüntüleri x10 ve (D) Yeni kemik oluşumu (%) oranlarına göre yapılan değerlendirme sonuçlarının grafiksel gösterimi (*; $p < 0,05$, Siyah ok: ana kemiği; Yıldız: yeni kemik formasyonu; Kırmızı ok: osteoblast).

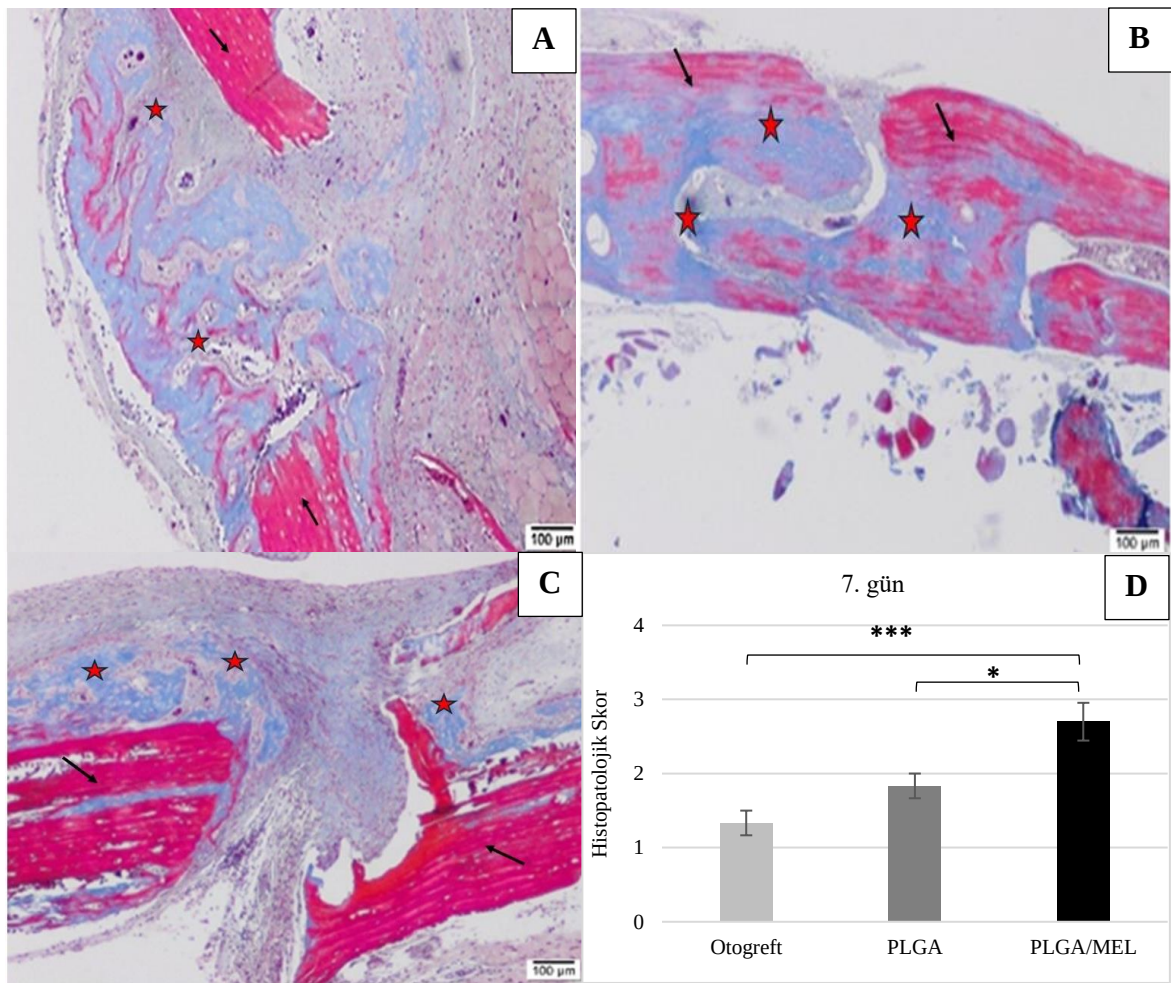


Şekil 29. Yeni kemik oluşumu ile kolajen birikimi, yeni damar oluşumu, BMP2 pozitif hücre yoğunluğu, ALP pozitif hücre yoğunluğu ve TRAP pozitif hücre yoğunluğu arasında anlamlı düzeyde pozitif korelasyon bulgularının grafiksel gösterimi ($p < 0,05$).

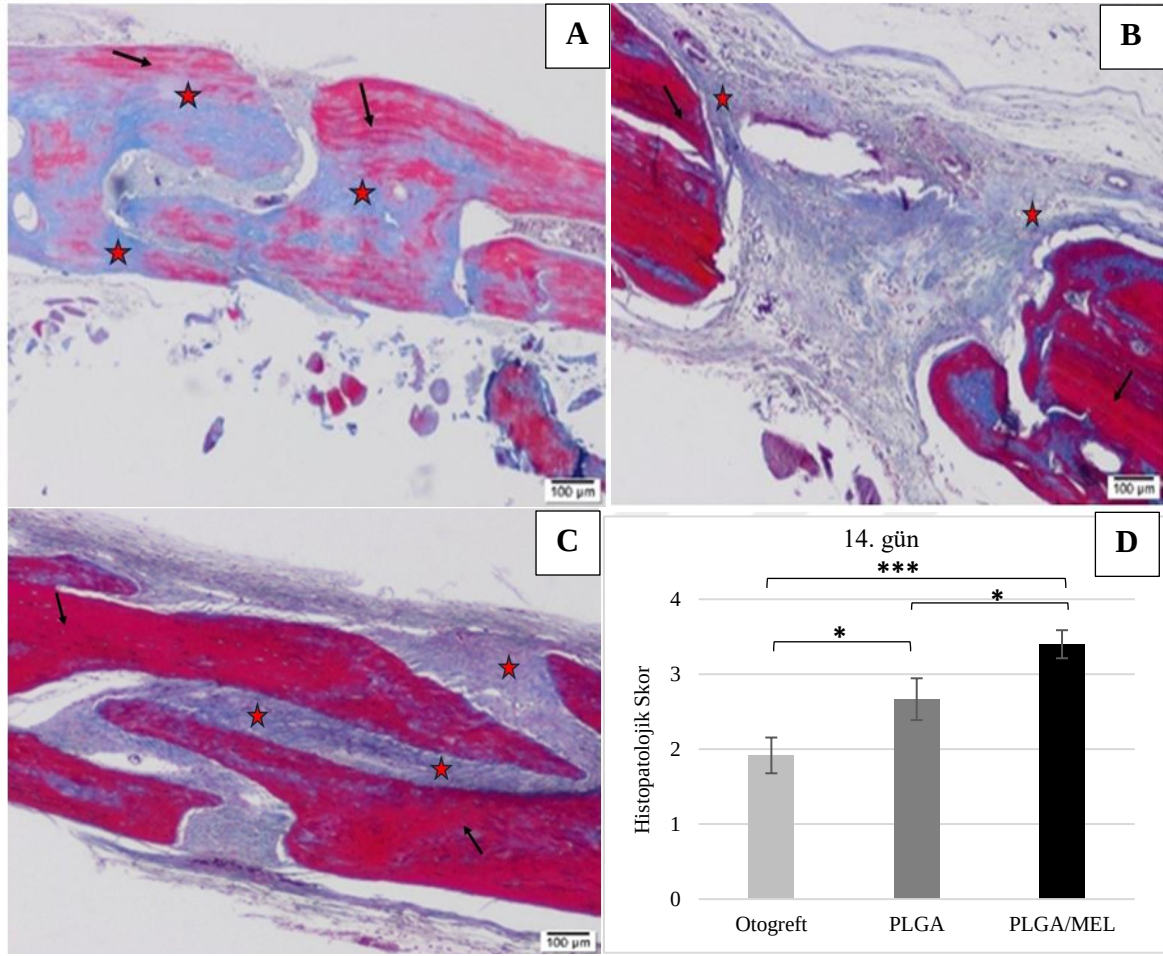
MT Boyama Bulguları

Otogreft ile ana kemik arasındaki kaynama bölgesinde kolajen birikiminin belirlenmesi için MT yöntemi ile kolajen boyaması yapıldı. Kaynama bölgesinden elde edilen kesitlerde MT boyama bulgularına göre 7., 14. ve 28. günlerde tüm gruplarda kemik trabekülleri, gevşek bağ dokusu oluşumu ve kolajen formasyonu izlendi. PLGA/MEL ve PLGA gruplarında Otogreft grubuna göre daha yoğun kolajen oluşumu gözlemlendi. Nanolif gruplarının kaynama bölgesinde biyomateryalin absorbe olarak otogreft ile ana kemik arasındaki boşlukların yeni kemik oluşumu ile doldurulduğu gözlemlendi. PLGA ve PLGA/MEL gruplarının lakünlerinde osteositler ve kemik trabeküllerinin çevresinde osteoblastlar daha belirgindi (Şekil 30, Şekil 31 ve Şekil 32).

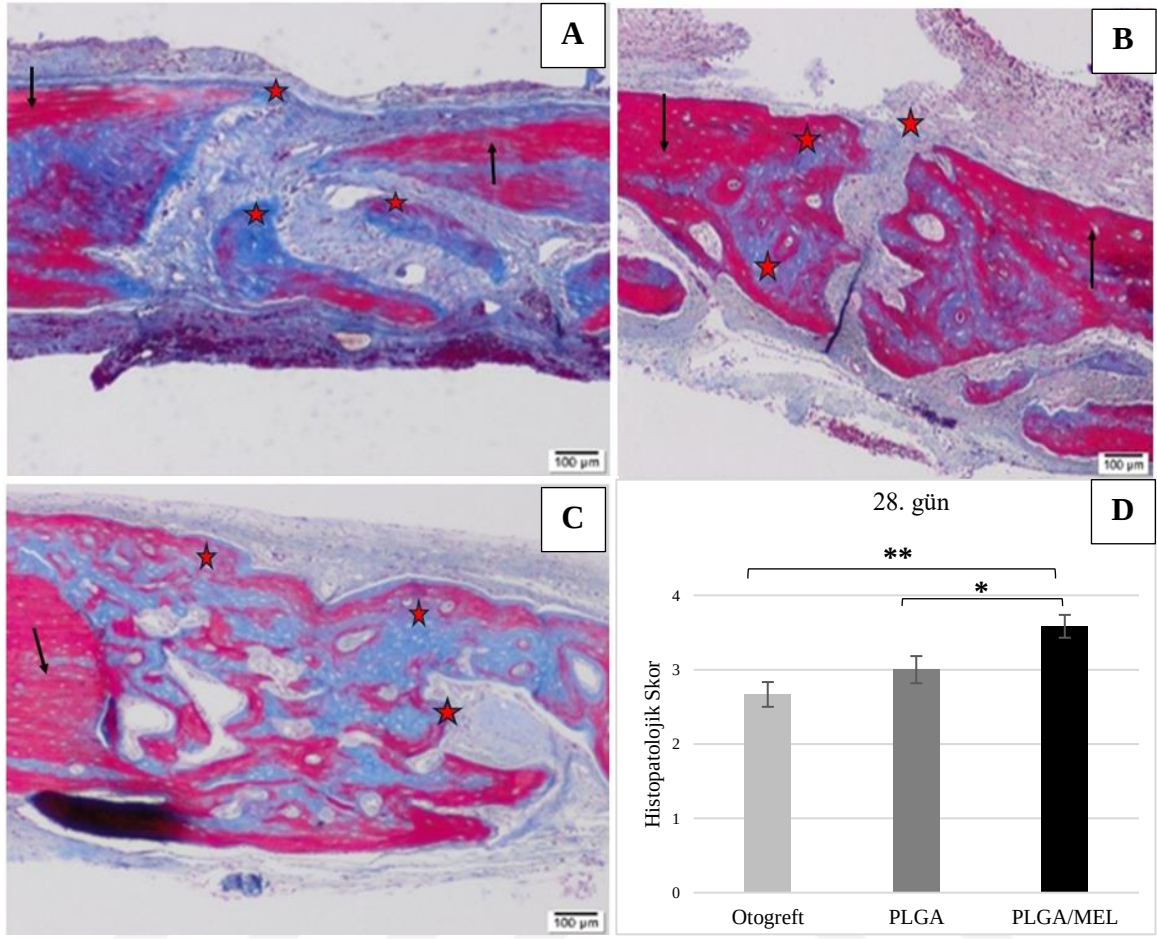
PLGA/MEL grubunun 7. 14. ve 28. günlerde kolajen birikimi düzeylerinin Ototogreft ve PLGA gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığı belirlendi ($p<0,05$; $p<0,01$; $p<0,001$). PLGA grubundaki 14. günde gözlenen kolajen birikiminin Ototogreft grubuna göre anlamlı düzeyde arttığı tespit edildi ($p<0,05$). Bununla birlikte 7. ve 28. gün kolajen birikimi bulguları açısından PLGA grubu ve Ototogreft grubu arasında anlamlı bir fark saptanmadı. Buna ek olarak yapılan korelasyon analizinde kolajen birikimi ve mineralizasyon düzeyi, ALP, BMP2 ve Runx2 pozitif hücre yoğunluğu arasında anlamlı düzeyde pozitif bir korelasyon belirlendi ($p<0,05$; Şekil 33).



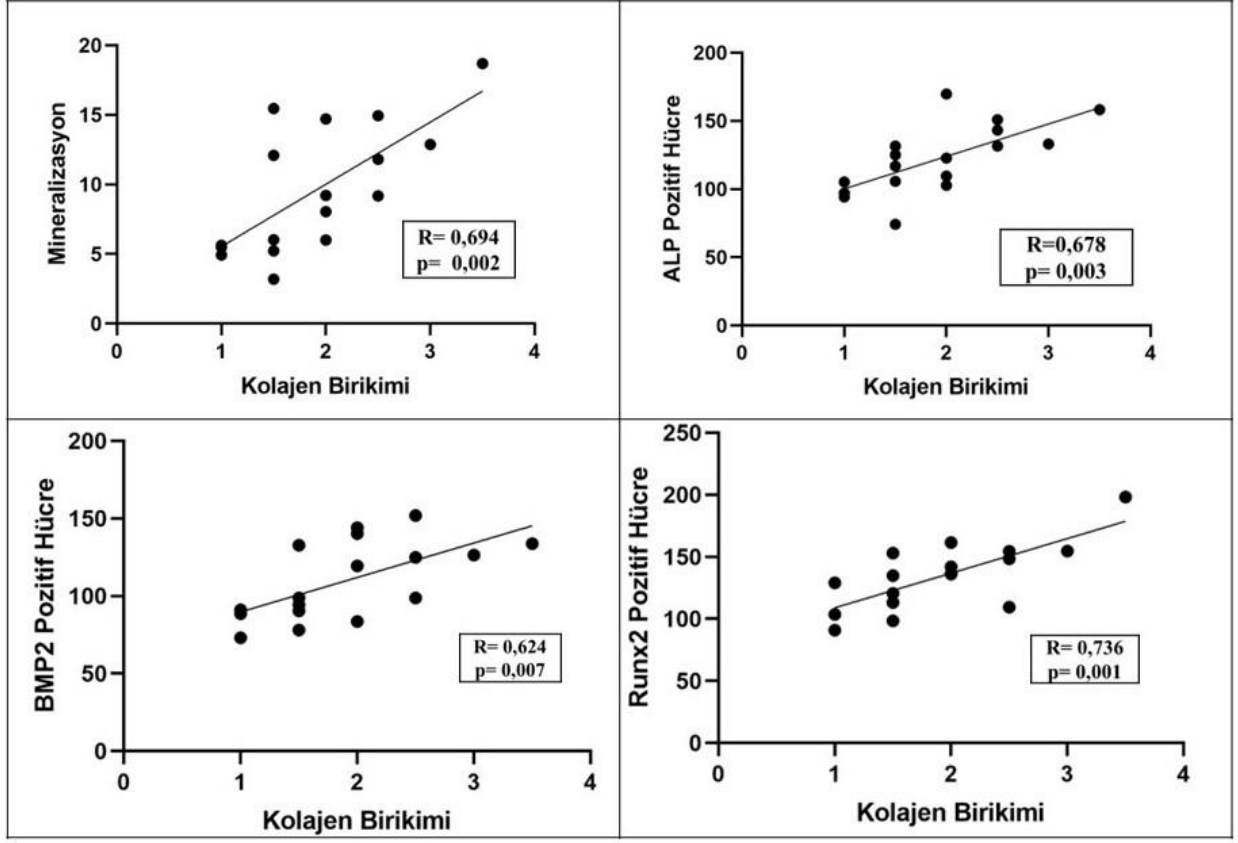
Şekil 30. (A) Ototogreft, (B) PLGA, (C) PLGA/MEL gruplarına ait 7. gün MT boyama görüntüleri x20 ve (D) MT histopatolojik skor bulgularına göre yapılan değerlendirme sonuçlarının grafiksel gösterimi (*; $p<0,05$, ***; $p<0,001$, Siyah ok: ana kemik; Yıldız: kolajen birikimi).



Şekil 31. (A) Otograft, (B) PLGA, (C) PLGA/MEL gruplarına ait 14. gün MT boyama görüntüleri x20 ve (D) MT histopatolojik skor bulgularına göre yapılan değerlendirme sonuçlarının grafiksel gösterimi (*; $p < 0,05$, ***; $p < 0,001$, Siyah ok: ana kemik; Yıldız: kolajen birikimi).



Şekil 32. (A) Ototograft, (B) PLGA, (C) PLGA/MEL gruplarına ait 28. gün MT boyama görüntüleri x20 ve (D) MT histopatolojik skor bulgularına göre yapılan değerlendirme sonuçlarının grafiksel gösterimi (*; $p < 0,05$, **; $p < 0,01$, Siyah ok: ana kemik; Yıldız: kolajen birikimi).

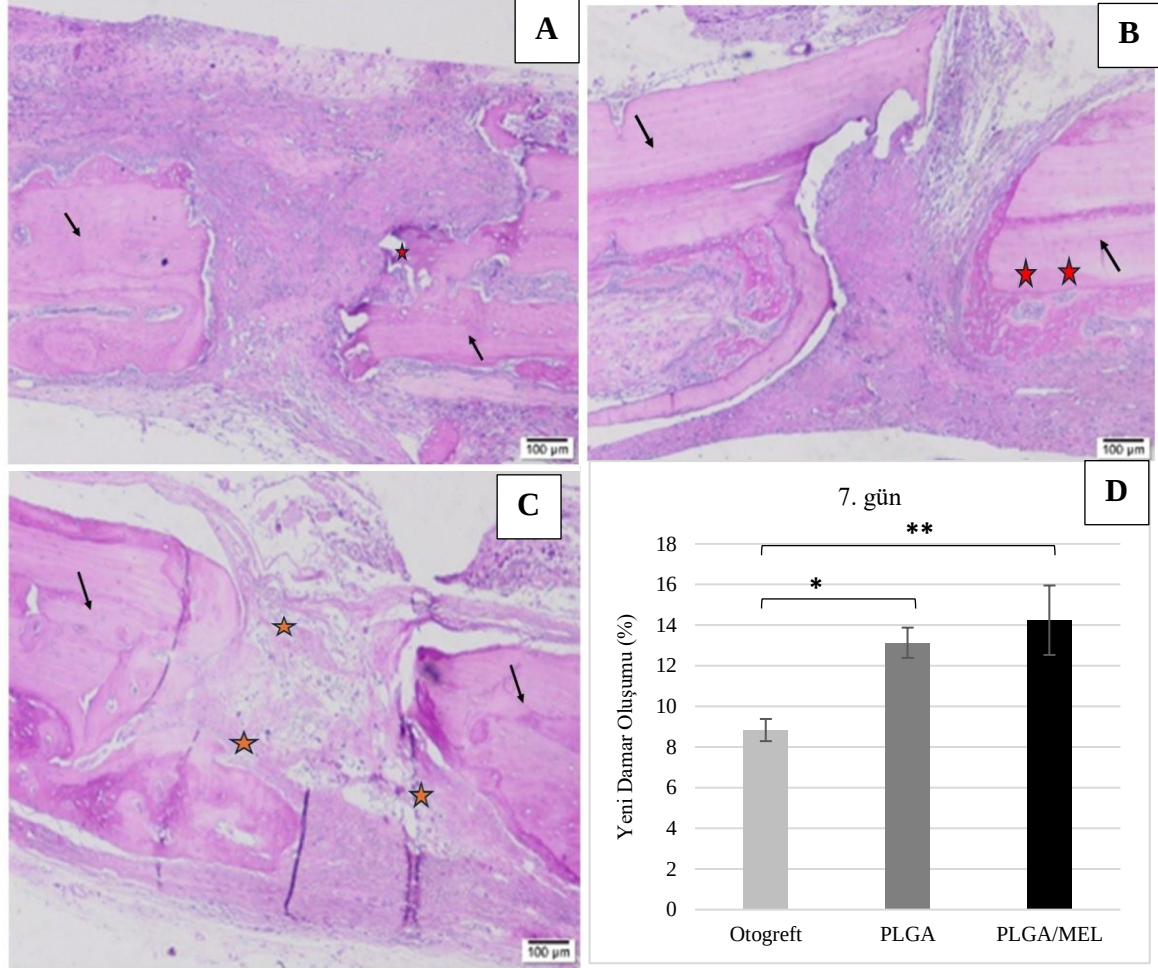


Şekil 33. Kolajen birikimi ile mineralizasyon, ALP pozitif hücre yoğunluğu, BMP2 pozitif hücre yoğunluğu ve Runx2 pozitif hücre yoğunluğu arasında anlamlı düzeyde pozitif korelasyon bulgularının grafiksel gösterimi ($p < 0,05$).

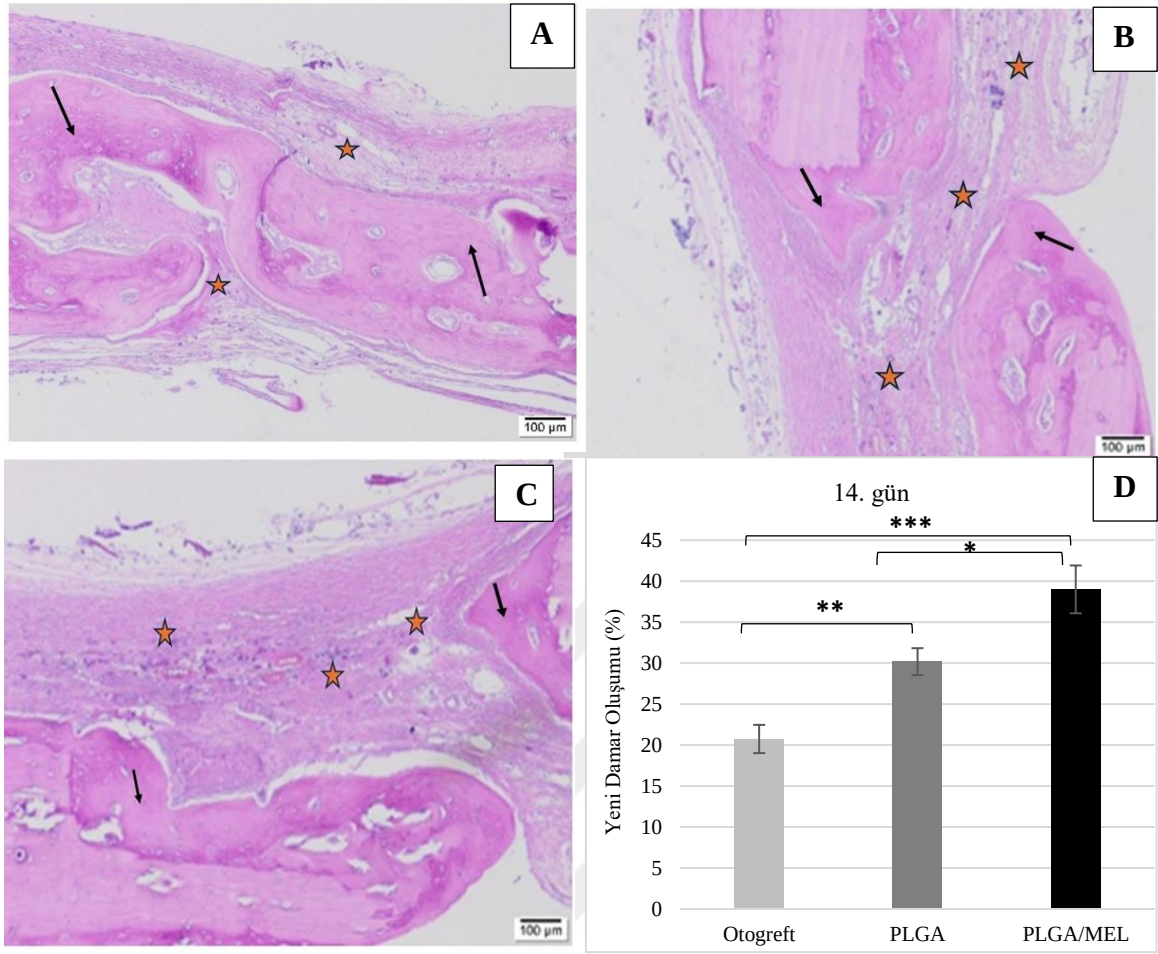
PAS Boyama Bulguları

PAS boyama bulgularına göre tüm gruplarda farklı oranlarda yeni damar oluşumu, kırmızı kan hücreleri içeren osteonlar ve Havers kanalları gözlemlendi. PLGA/MEL ve PLGA gruplarının lakünlerinde osteositler ve kemik trabeküllerinin çevresinde osteoblastlar belirgindi. Yeni damar oluşumunun (%) 7., 14. ve 28. günlerde PLGA/MEL grubunda Otogreft grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığı belirlendi (sırasıyla $p < 0,01$; $p < 0,001$). PLGA/MEL grubundaki yeni damar oluşumunun 14. günde PLGA grubuna göre anlamlı olarak artış gösterdiği tespit edildi ($p < 0,05$). Bununla birlikte PLGA/MEL grubunun yeni damar oluşumu ile PLGA grubu arasında 7. ve 28. günlerde istatistik olarak anlamlı bir

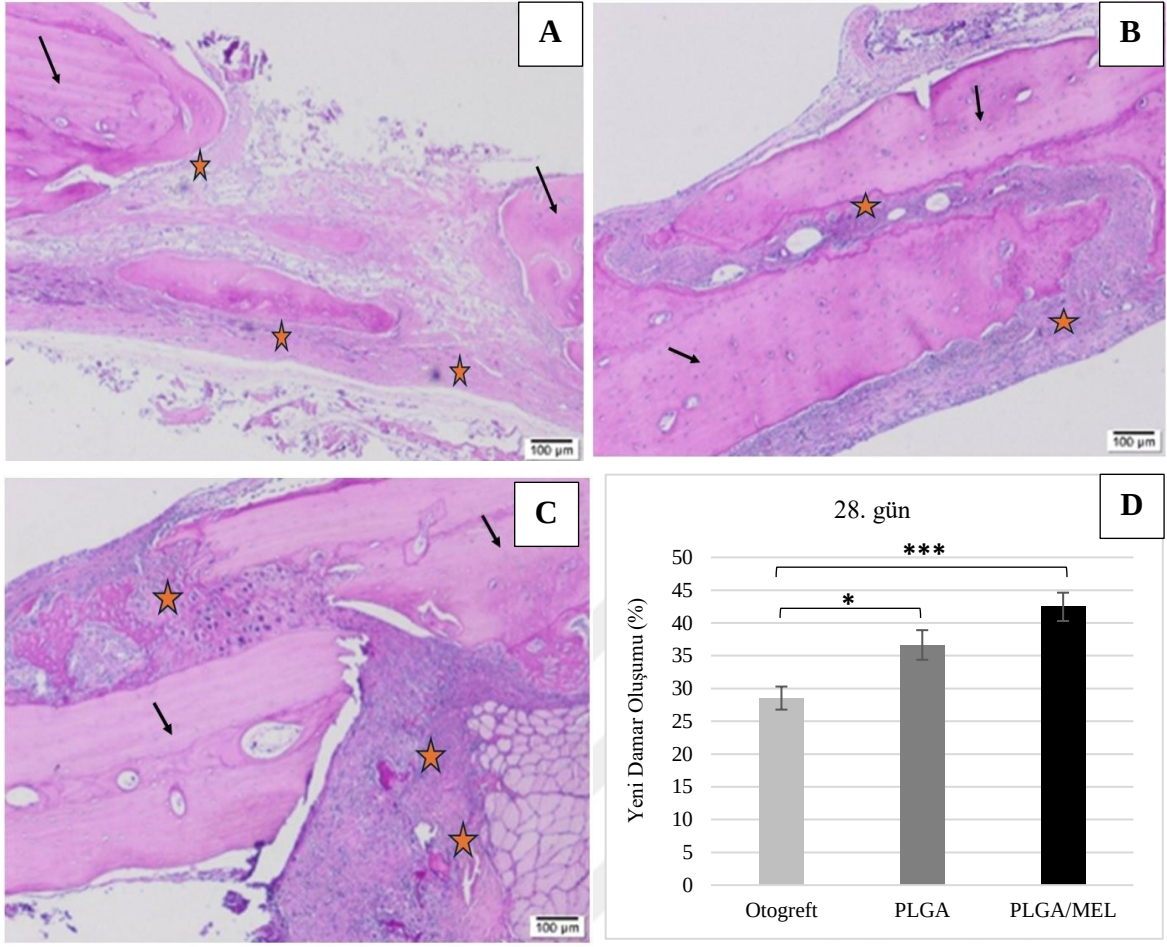
farklılık saptanmadı. PLGA grubunda yeni damar oluşumu düzeyinin 7., 14. ve 28. günde Ototogreft grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek olduğu görüldü (sırasıyla $p<0,05$, $p<0,001$; Şekil 34, Şekil 35, Şekil 36).



Şekil 34. (A) Ototogreft, (B) PLGA, (C) PLGA/MEL gruplarına ait 7. gün PAS boyama görüntüleri x20 ve (D) PAS boyalı histolojik kesitlerde yeni damar oluşumuna (%) göre yapılan değerlendirme sonuçlarının grafiksel gösterimi (*: $p<0,05$, **: $p<0,001$, Siyah oklar: ana kemik; yıldızlar: yeni damar oluşumu).



Şekil 35. (A) Otograft, (B) PLGA, (C) PLGA/MEL gruplarına ait 14. gün PAS boyama görüntüleri x20 ve (D) PAS boyalı histolojik kesitlerde yeni damar oluşumuna (%) göre yapılan değerlendirme sonuçlarının grafiksel gösterimi (*: $p<0,05$, **: $p<0,001$, ***: $p<0,0001$, Siyah ok: ana kemik; Yıldız: yeni damar oluşumu).

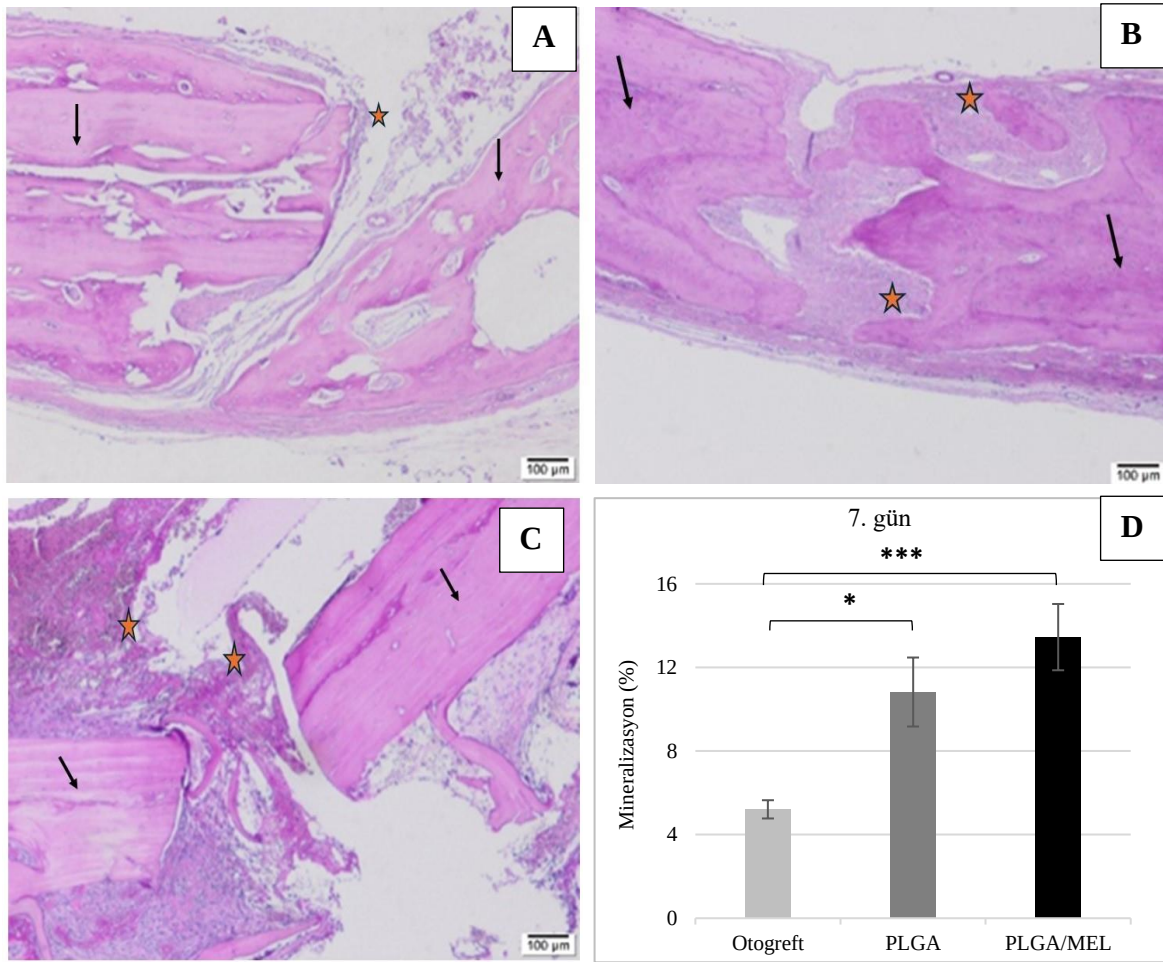


Şekil 36. (A) Otograft, (B) PLGA, (C) PLGA/MEL gruplarına ait 28. gün PAS boyama görüntüleri x20 ve (D) PAS boyalı histolojik kesitlerde yeni damar oluşumuna (%) göre yapılan değerlendirme sonuçlarının grafiksel gösterimi (*: $p < 0,05$, ***: $p < 0,0001$, Siyah ok: ana kemik; Yıldız: yeni damar oluşumu).

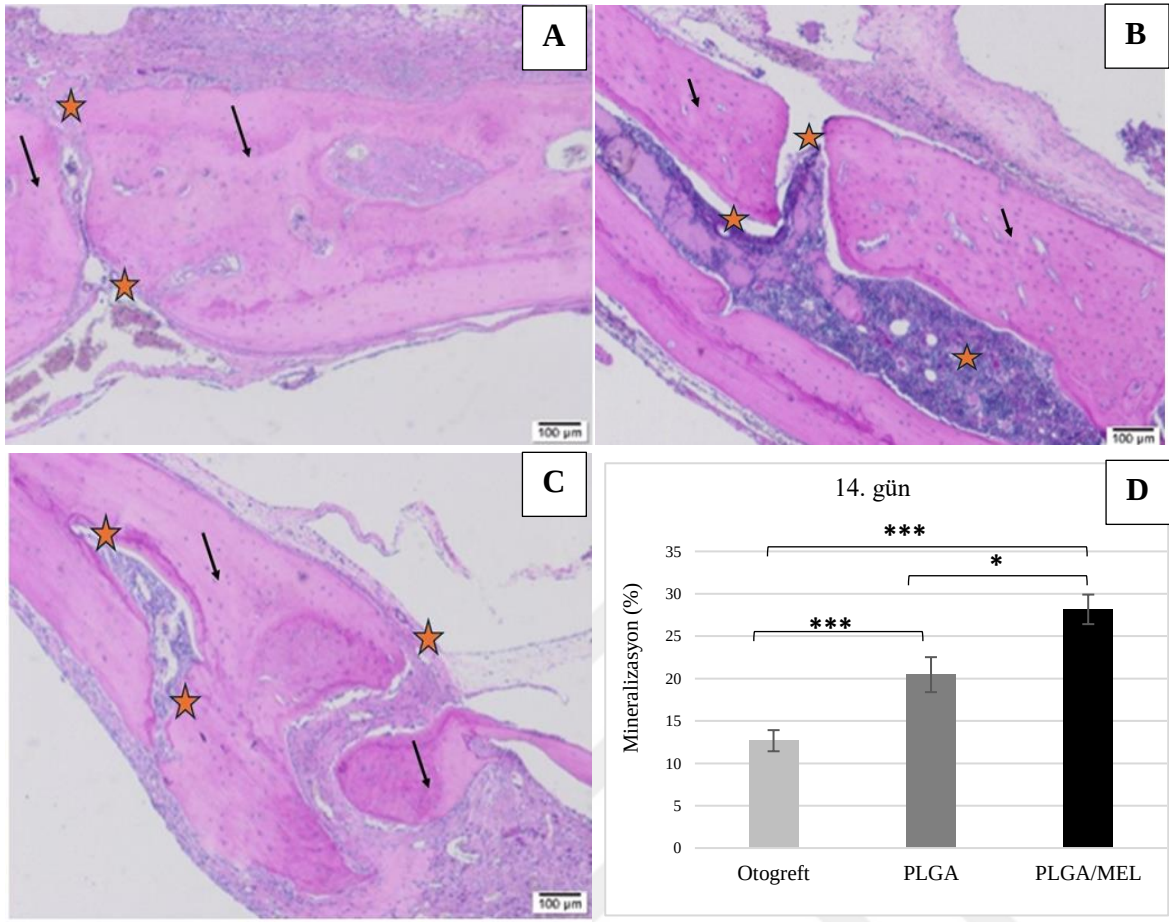
Von Kossa Boyama Bulguları

Von Kossa boyama yöntemi ile kaynama bölgesindeki mineralizasyon alanları değerlendirildi. Elde edilen Von Kossa boyama bulgularına göre 7., 14. ve 28. günlerde tüm gruplarda değişen oranlarda mineralizasyon yoğunluğu belirlendi. Mineralizasyon düzeylerinin PLGA/MEL ve PLGA gruplarında Otograft grubuna oranla daha yüksek olduğu gözlemlendi. Mineralizasyonun tüm gruplarda kaynama bölgesinde yoğunlaştığı izlendi.

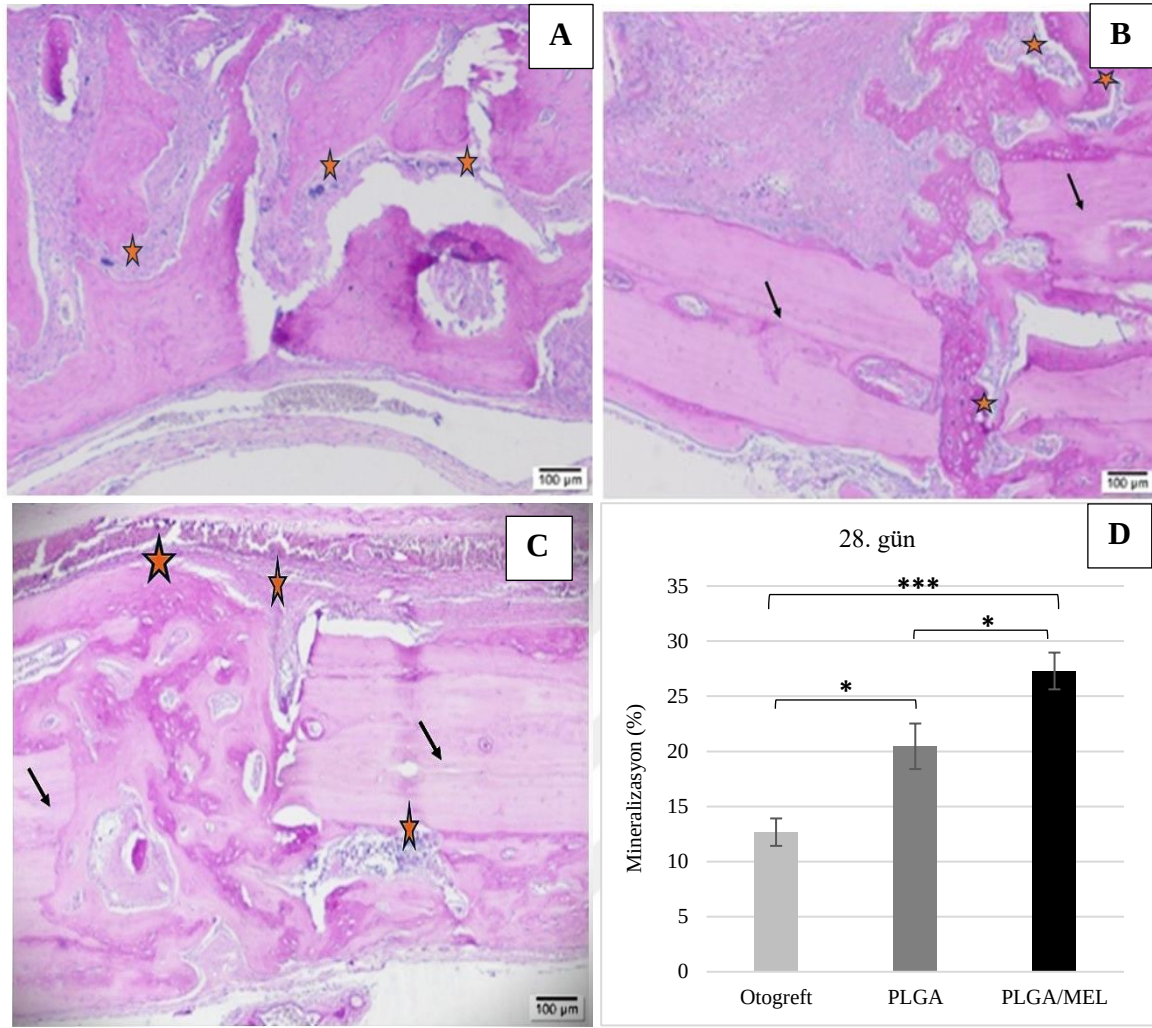
PLGA/MEL grubunda mineralizasyon düzeyinin Ototogreft grubuna göre 7., 14., ve 28. günlerde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığı gözlemlendi ($p<0,001$). PLGA/MEL grubunda PLGA grubuna göre 14. ve 28. günlerde mineralizasyon miktarı açısından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde bir artış belirlendi ($p<0,05$). PLGA ve PLGA/MEL grupları arasında 7. gündeki mineralizasyon aktivitesi karşılaştırılmasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark belirlenmedi. PLGA grubundaki mineralizasyon seviyesinin 7., 14. ve 28. günlerde Ototogreft grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı izlendi ($p<0,05$; $p<0,0001$; Şekil 37, Şekil 38, Şekil 39).



Şekil 37. (A) Ototogreft, (B) PLGA, (C) PLGA/MEL gruplarına ait 7. gün Von Kossa boyama görüntüleri x20 ve (D) Von Kossa boyalı histolojik kesitlerde mineralizasyon düzeylerine (%) göre yapılan değerlendirme sonuçlarının grafiksel gösterimi (*: $p<0,05$, ***: $p<0,0001$, Siyah oklar: ana kemik; Yıldız: mineralizasyon).



Şekil 38. (A) Otoplasty, (B) PLGA, (C) PLGA/MEL günlere ait 14. gün Von Kossa boyama görüntüleri x20 ve (D) Von Kossa boyalı histolojik kesitlerde mineralizasyon düzeylerine (%) göre yapılan değerlendirme sonuçlarının grafiksel gösterimi (*: $p < 0,05$, ***: $p < 0,0001$, Siyah ok: ana kemik; Yıldız: mineralizasyon).



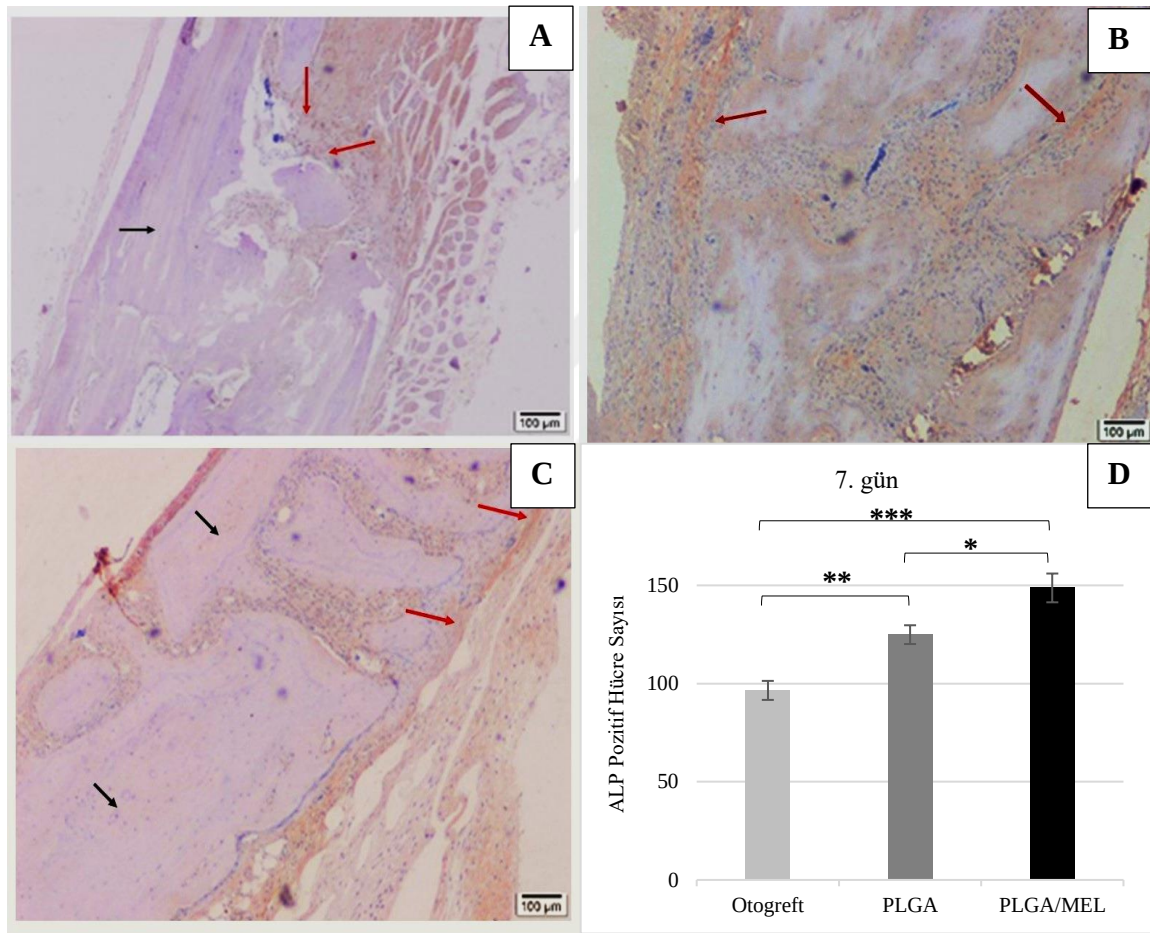
Şekil 39. (A) Otograft, (B) PLGA, (C) PLGA/MEL gruplarına ait 28. gün Von Kossa boyama görüntüleri x20 ve (D) Von Kossa boyalı histolojik kesitlerde mineralizasyon düzeylerine (%) göre yapılan değerlendirme sonuçlarının grafiksel gösterimi (*: $p < 0,05$, ***: $p < 0,0001$, Siyah ok: ana kemik; Yıldız: mineralizasyon).

4.2.2. İmmünohistokimya Analizi Bulguları

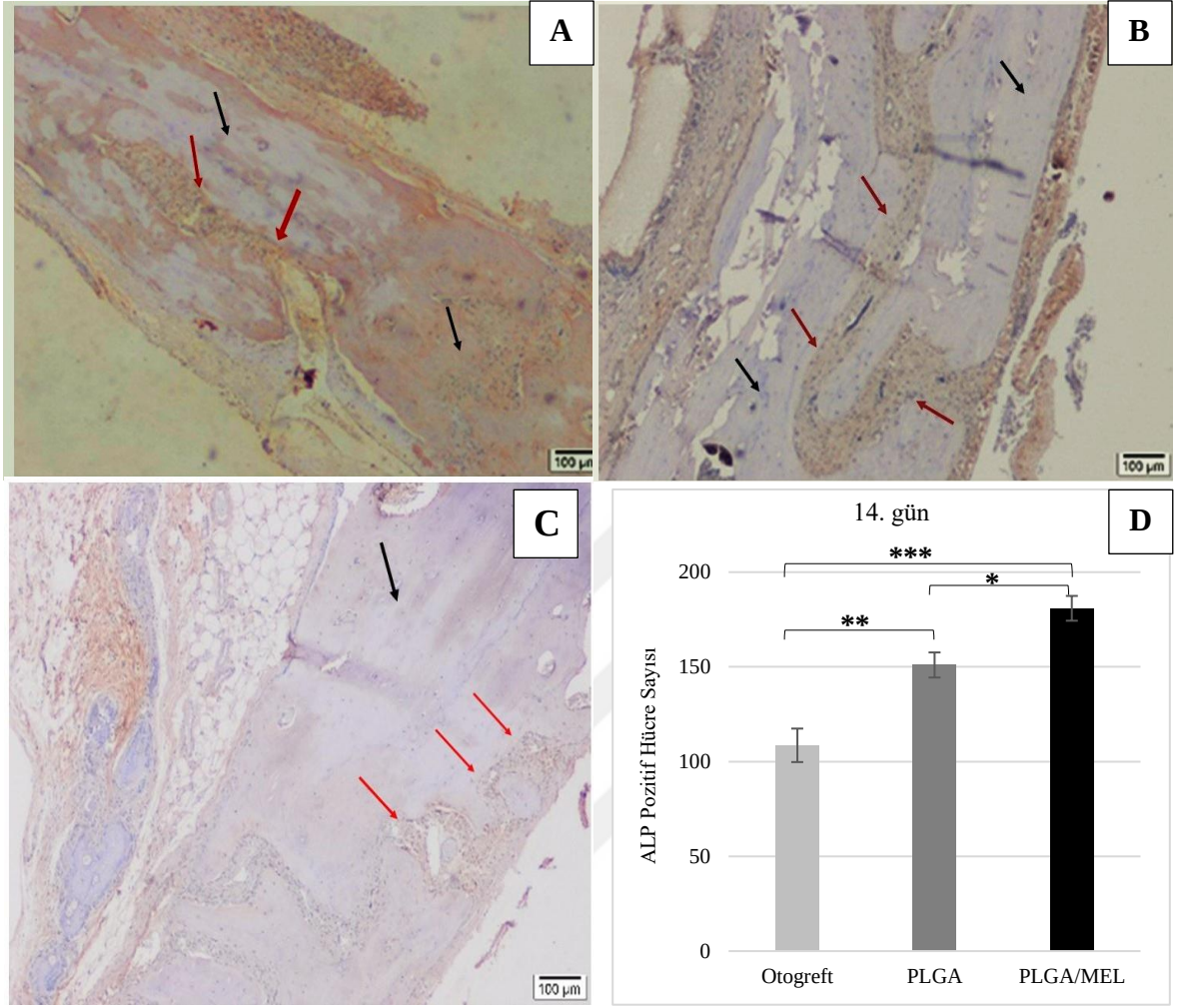
ALP İmmünohistokimya Boyama Bulguları

Otograft ile ana kemik arasında mineralizasyon aktivitesinin belirlenmesi için yapılan ALP immün işaretlemeleri ile ALP pozitif hücrelerin yoğunluğu belirlendi.

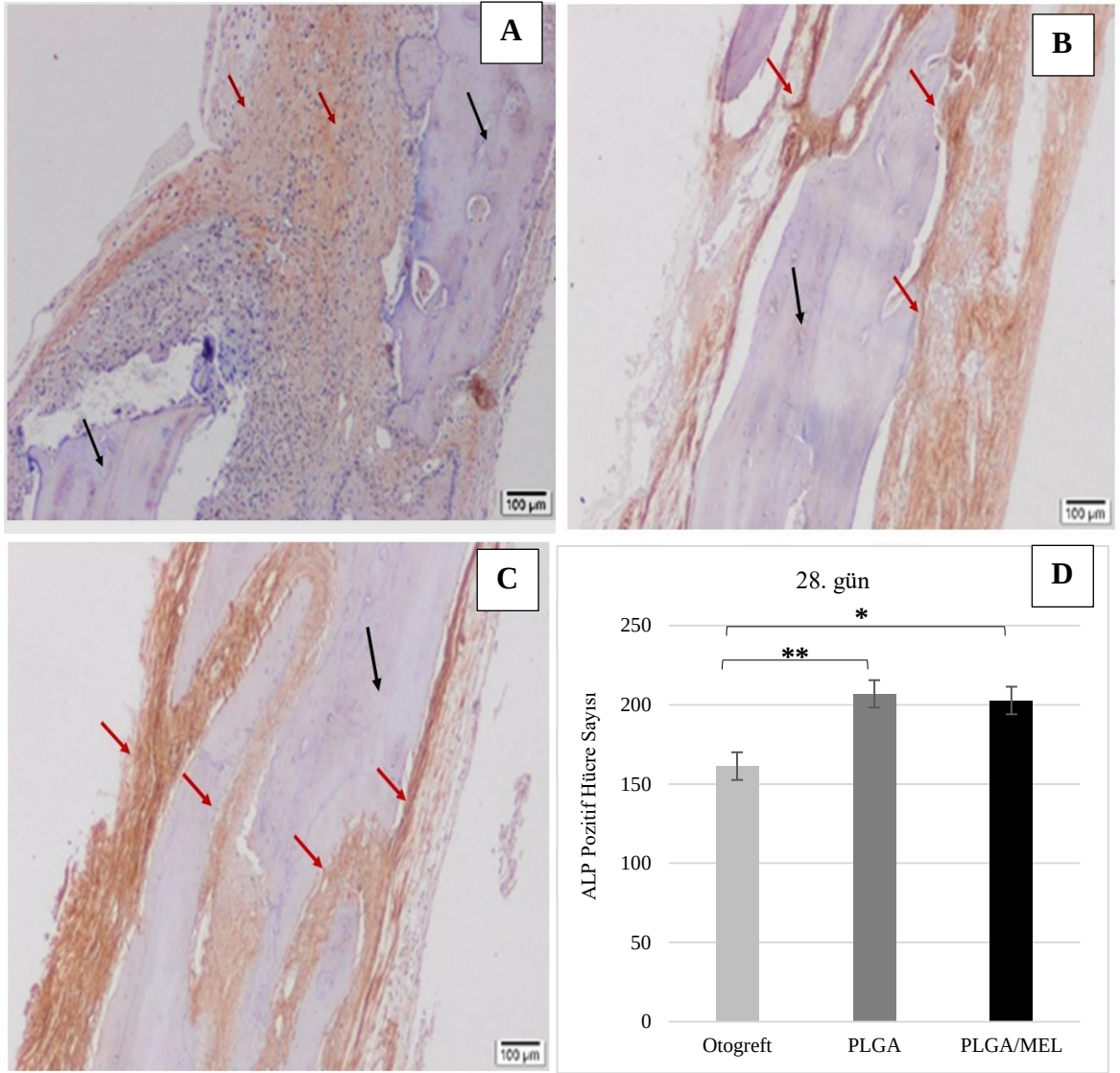
Bulgularımıza göre PLGA/MEL grubunda ALP pozitif hücre sayısı 7., 14. ve 28. günlerde Ototogreft grubuna göre anlamlı düzeyde yüksekti ($p<0,001$, $p<0,05$). PLGA/MEL grubunda 7. ve 14. günlerde belirlenen ALP pozitif hücrelerin sayısının ise PLGA grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı izlendi ($p<0,05$). Bununla birlikte 28. günde PLGA/MEL ile PLGA grubu arasında ALP pozitif hücrelerin sayısı açısından anlamlı bir farklılık izlenmedi. PLGA grubunda 7., 14. ve 28. günlerde ALP pozitif hücre sayısının Ototogreft grubuna göre anlamlı şekilde artış gösterdiği belirlendi ($p<0,001$; Şekil 40, Şekil 41, Şekil 42).



Şekil 40. (A) Ototogreft, (B) PLGA, (C) PLGA/MEL gruplarına ait 7. gün ALP immünohistokimya boyama görüntüleri x20 ve (D) Gruplara ait 7. gün ALP pozitif hücre sayılarına göre yapılan değerlendirme sonuçlarının grafiksel gösterimi (*: $p<0,05$, **: $p<0,001$, ***: $p<0,001$, Siyah ok: ana kemik; Kırmızı ok: ALP pozitif hücre).



Şekil 41. (A) Ototograft, (B) PLGA, (C) PLGA/MEL gruplarına ait 14. gün ALP immünohistokimya boyama görüntüleri x20 ve (D) Gruplara ait 14. gün ALP pozitif hücre sayılarına göre yapılan değerlendirme sonuçlarının grafiksel gösterimi (*: $p<0,05$, **: $p<0,001$, ***: $p<0,001$, Siyah oklar: ana kemik; Kırmızı ok: ALP pozitif hücre).

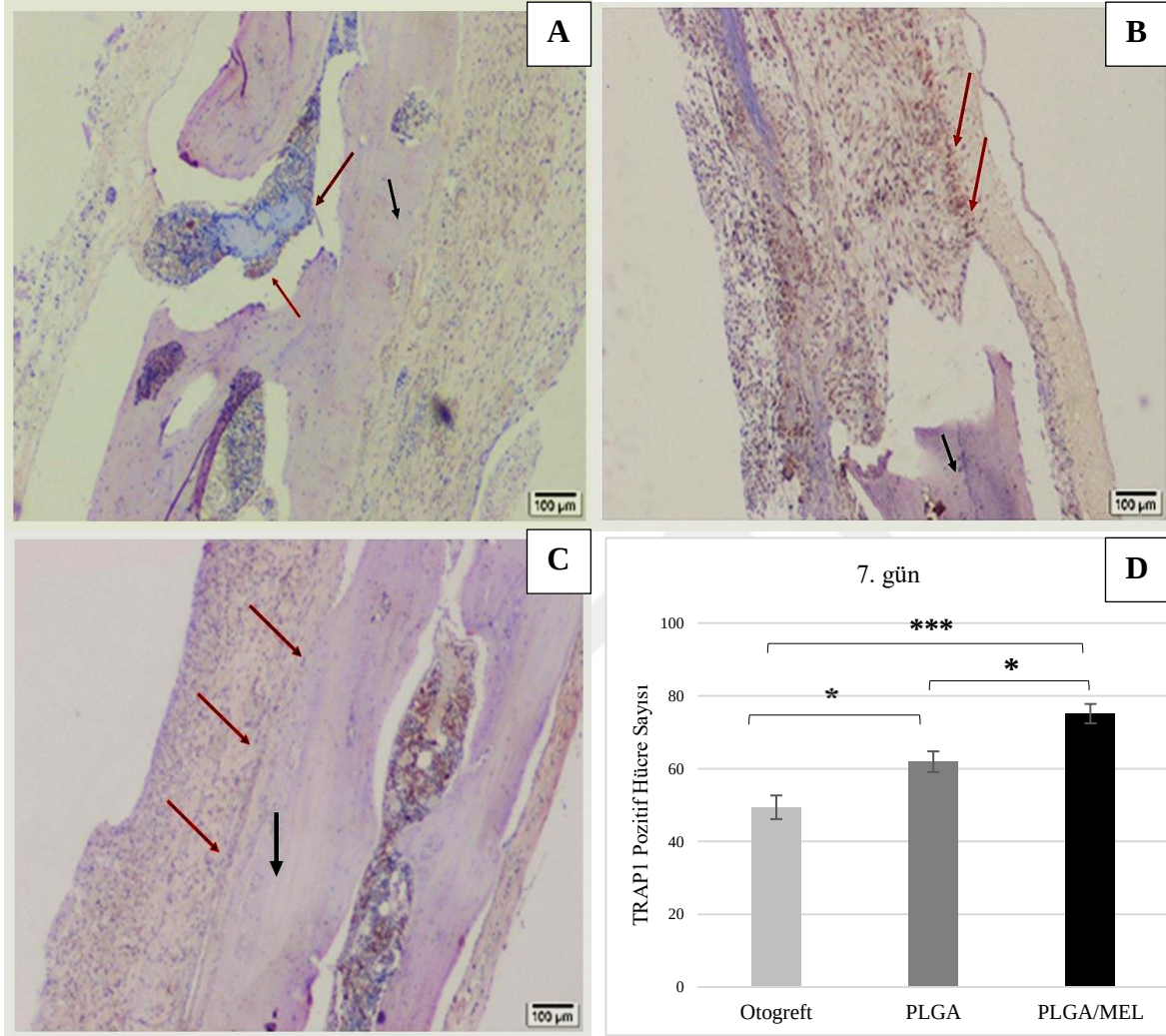


Şekil 42. (A) Otoplast, (B) PLGA, (C) PLGA/MEL PLGA/MEL gruplarına ait 14. gün ALP immünohistokimya boyama görüntüleri x20 ve (D) Gruplara ait 14. gün ALP pozitif hücre sayılarına göre yapılan değerlendirme sonuçlarının grafiksel gösterimi (*: $p<0,05$, **: $p<0,001$, Siyah ok: ana kemik; Kırmızı ok: ALP pozitif hücre).

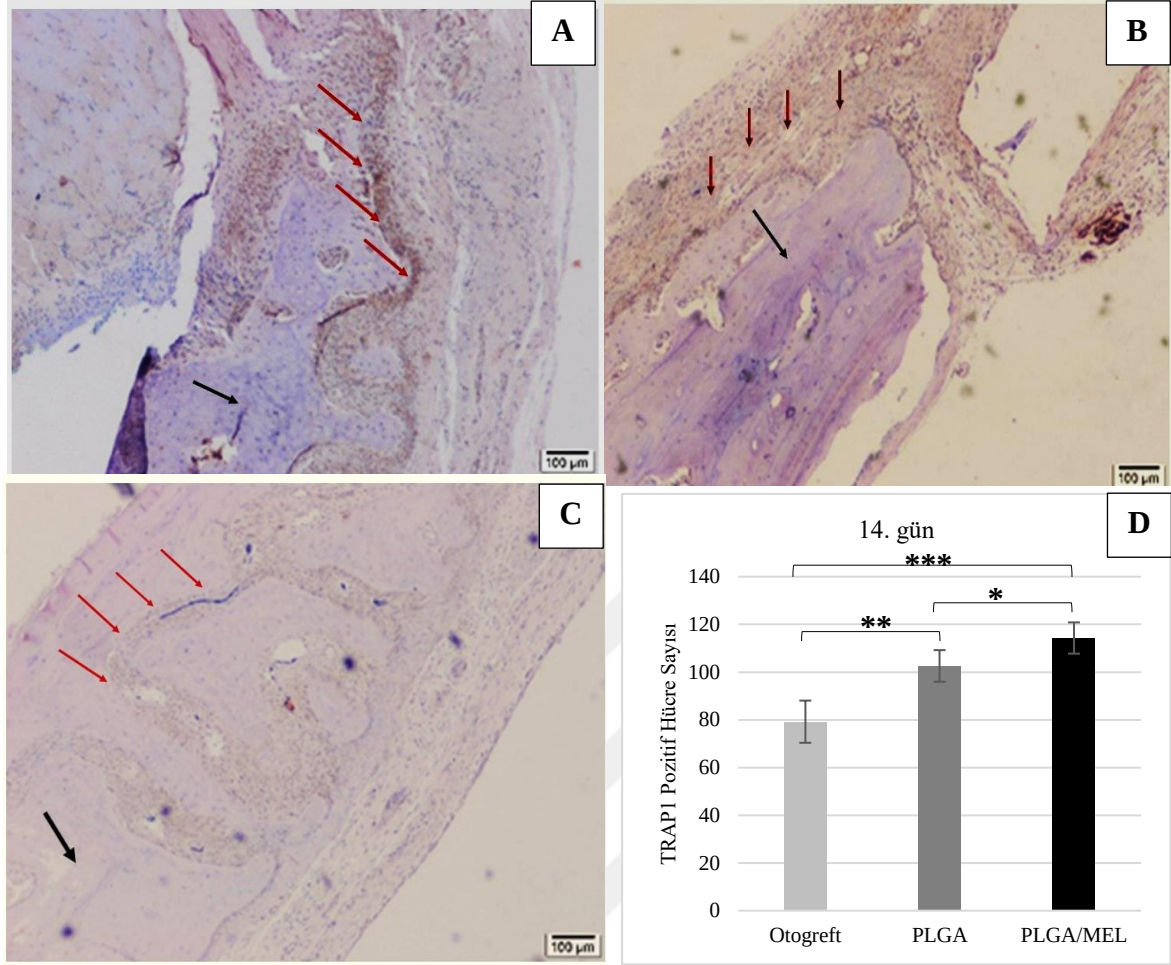
TRAP İmmünohistokimya Boyama Bulguları

Osteoklast ve rezorbsiyon aktivitesini belirlemek için yapılan TRAP1 immünohistokimya analizinin sonuçlarına göre TRAP1 pozitif hücre sayısının PLGA/MEL

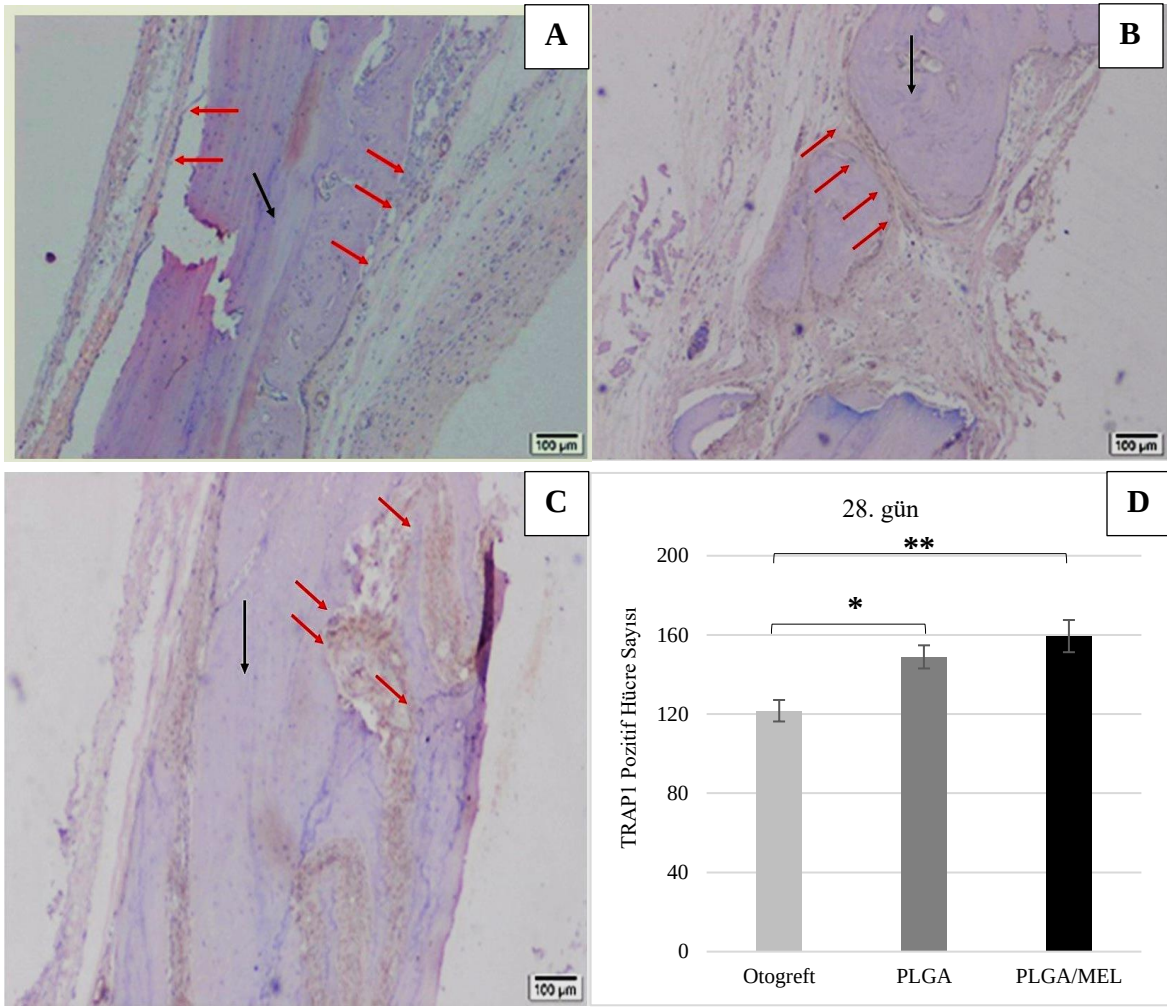
grubunda Ototreft grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksek olduğu belirlendi ($p<0,0001$; $p<0,001$). PLGA grubunda ise TRAP1 pozitif hücre sayısının Ototreft grubu ile karşılaştırıldığında 7., 14. ve 28. günlerde istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yoğun olduğu gözlemlendi ($p<0,05$; $p<0,001$; Şekil 43, Şekil 44, Şekil 45).



Şekil 43. (A) Ototreft, (B) PLGA, (C) PLGA/MEL gruplarına ait 7. gün TRAP1 immünohistokimya boyama görüntüleri x20 ve (D) Gruplara ait TRAP pozitif hücre sayılarına göre yapılan değerlendirme sonuçlarının grafiksel gösterimi (*: $p<0,05$; ***: $p<0,001$, Siyah ok: ana kemik; Kırmızı ok: TRAP1 pozitif hücre).



Şekil 44. (A) Otoplasty, (B) PLGA, (C) PLGA/MEL gruplarına ait 14. gün TRAP1 immünohistokimya boyama görüntüleri x20 ve (D) Gruplara ait TRAP pozitif hücre sayılarına göre yapılan değerlendirme sonuçlarının grafiksel gösterimi (*: $p<0,05$, **: $p<0,001$; ***: $p<0,001$, Siyah ok: ana kemik; Kırmızı ok: TRAP1 pozitif hücre).

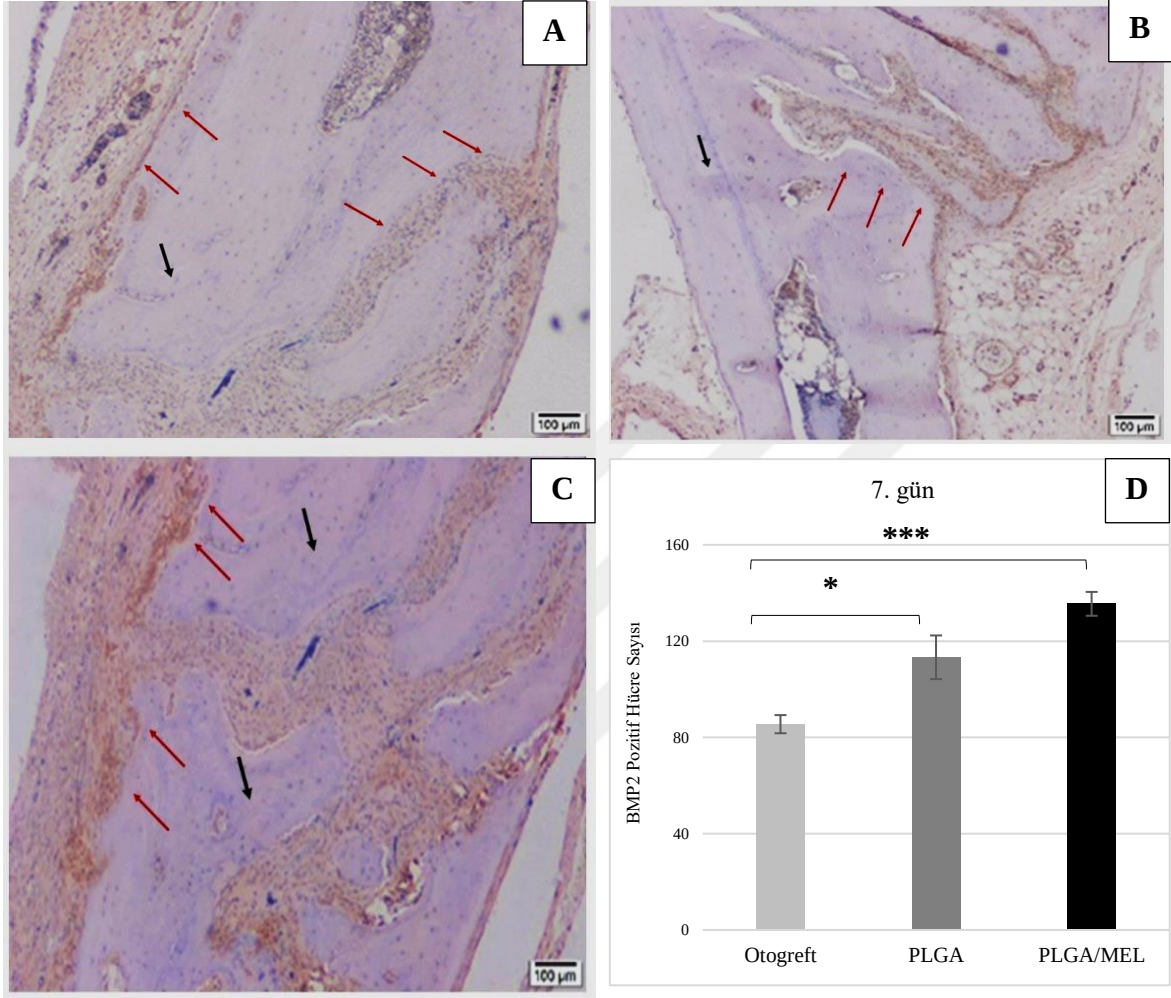


Şekil 45. (A) Otoplasty, (B) PLGA, (C) PLGA/MEL gruplarına ait 28. gün TRAP1 immünohistokimya boyama görüntüleri x20 ve (D) Gruplara ait TRAP pozitif hücre sayılarına göre yapılan değerlendirme sonuçlarının grafiksel gösterimi (*: $p<0,05$, **: $p<0,001$, Siyah ok: ana kemik; Kırmızı ok: TRAP1 pozitif hücre).

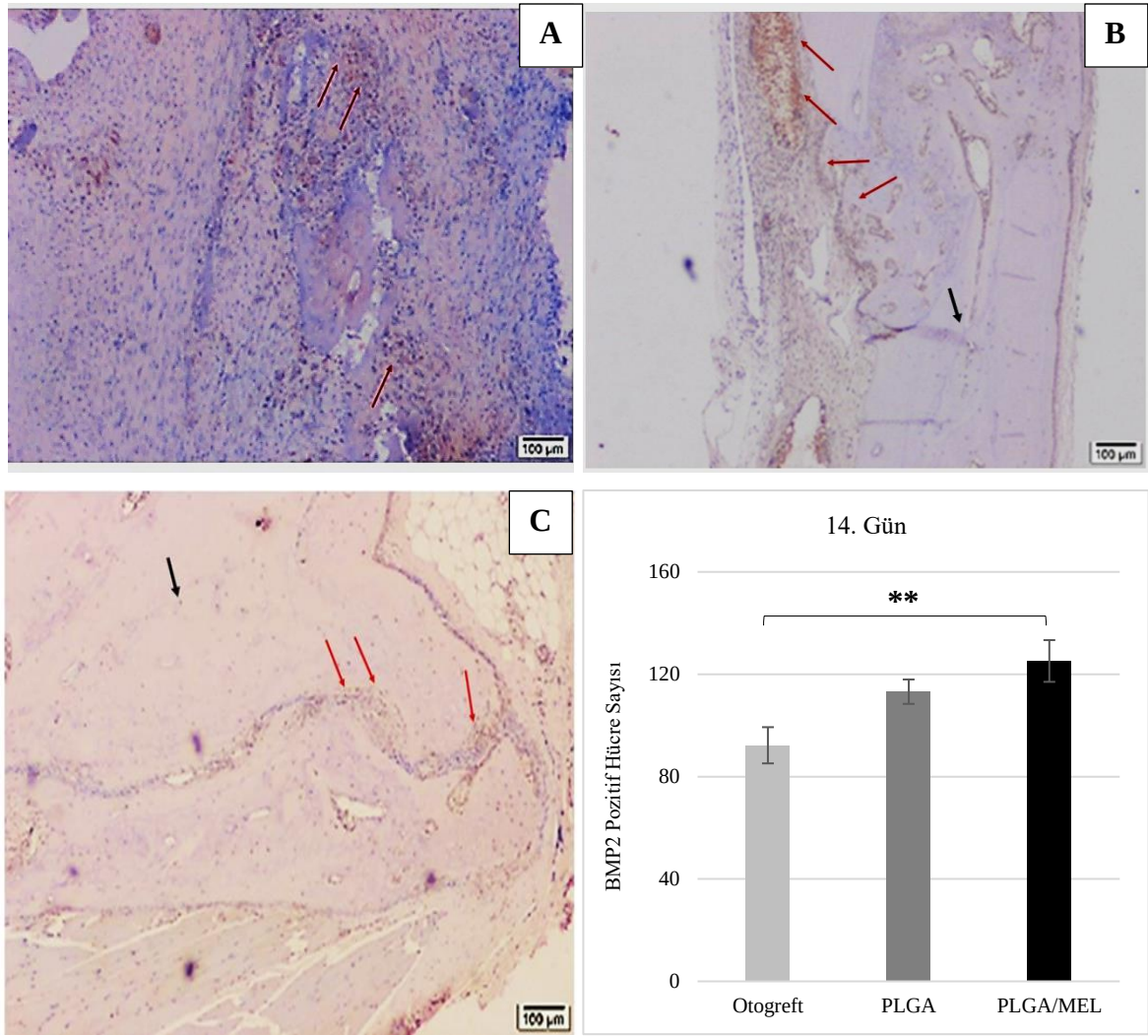
BMP2 İmmünohistokimya Boyama Bulguları

MSC aktivitesinin belirlenmesi için yapılan BMP2 immün boyaması sonuçlarına göre, PLGA/MEL grubundaki BMP2 pozitif hücrelerin yoğunluğunun 7., 14. ve 28. günlerde Otoplasty grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı izlendi ($p<0,001$; $p<0,01$). PLGA grubunda ise 7. ve 28. günlerde BMP2 pozitif hücre

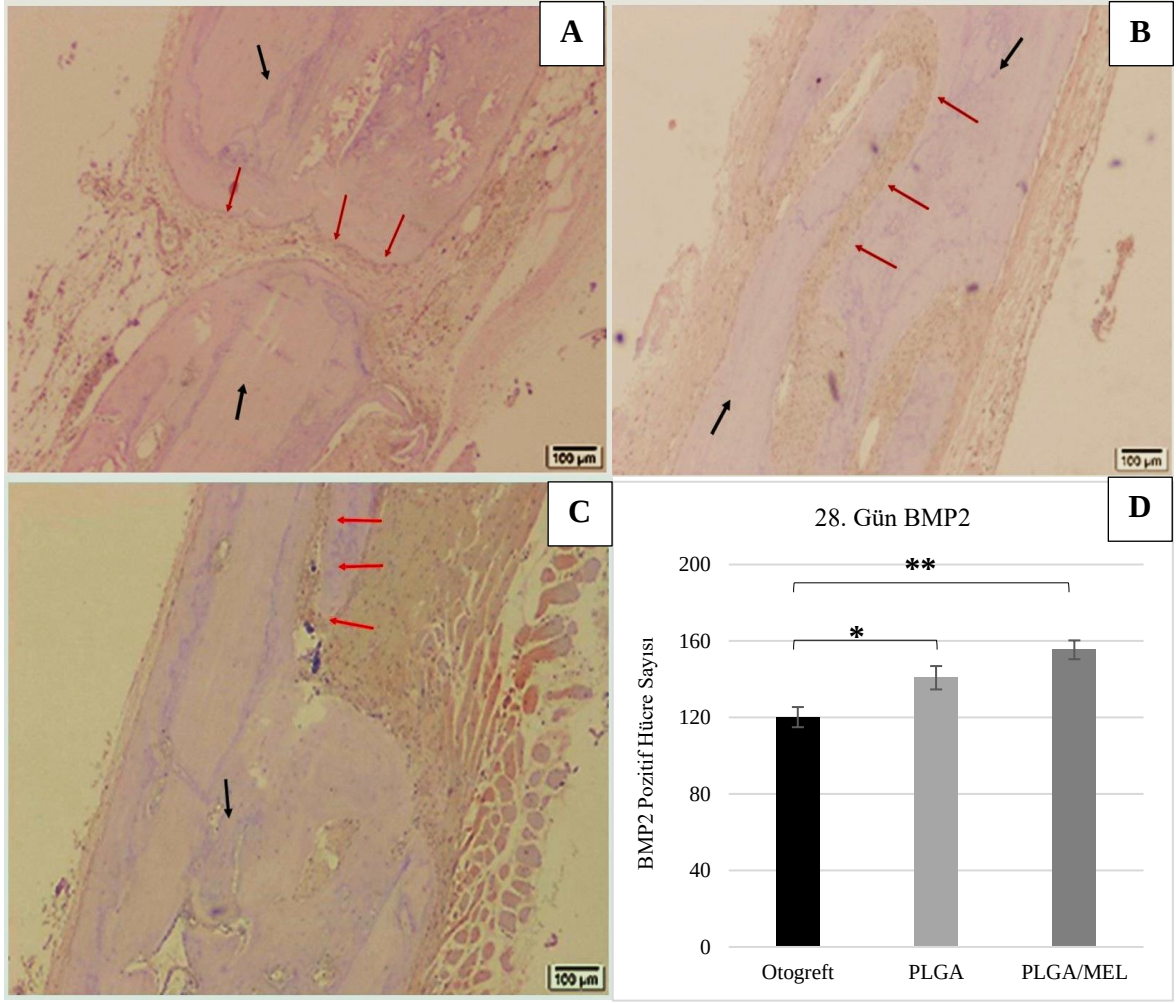
sayısının Otogreft grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı düzeyde daha yüksek görüldü ($p<0,05$; Şekil 46; Şekil 47; Şekil 48).



Şekil 46. (A) Otogreft, (B) PLGA, (C) PLGA/MEL gruplarına ait 7. gün BMP2 immünohistokimya boyama görüntüleri x20 ve (D) Gruplara ait BMP2 pozitif hücre sayılarına göre yapılan değerlendirme sonuçlarının grafiksel gösterimi (*: $p<0,05$, ***: $p<0,001$, Siyah ok: ana kemik; Kırmızı ok: BMP2 pozitif hücre).



Şekil 47. (A) Otoplasty, (B) PLGA, (C) PLGA/MEL gruplarına ait 14. gün BMP2 immünohistokimya boyama görüntüleri x20 ve (D) Gruplara ait BMP2 pozitif hücre sayılarına göre yapılan değerlendirme sonuçlarının grafiksel gösterimi (**; $p < 0,01$, Siyah ok: ana kemik; Kırmızı ok: BMP2 pozitif hücre).

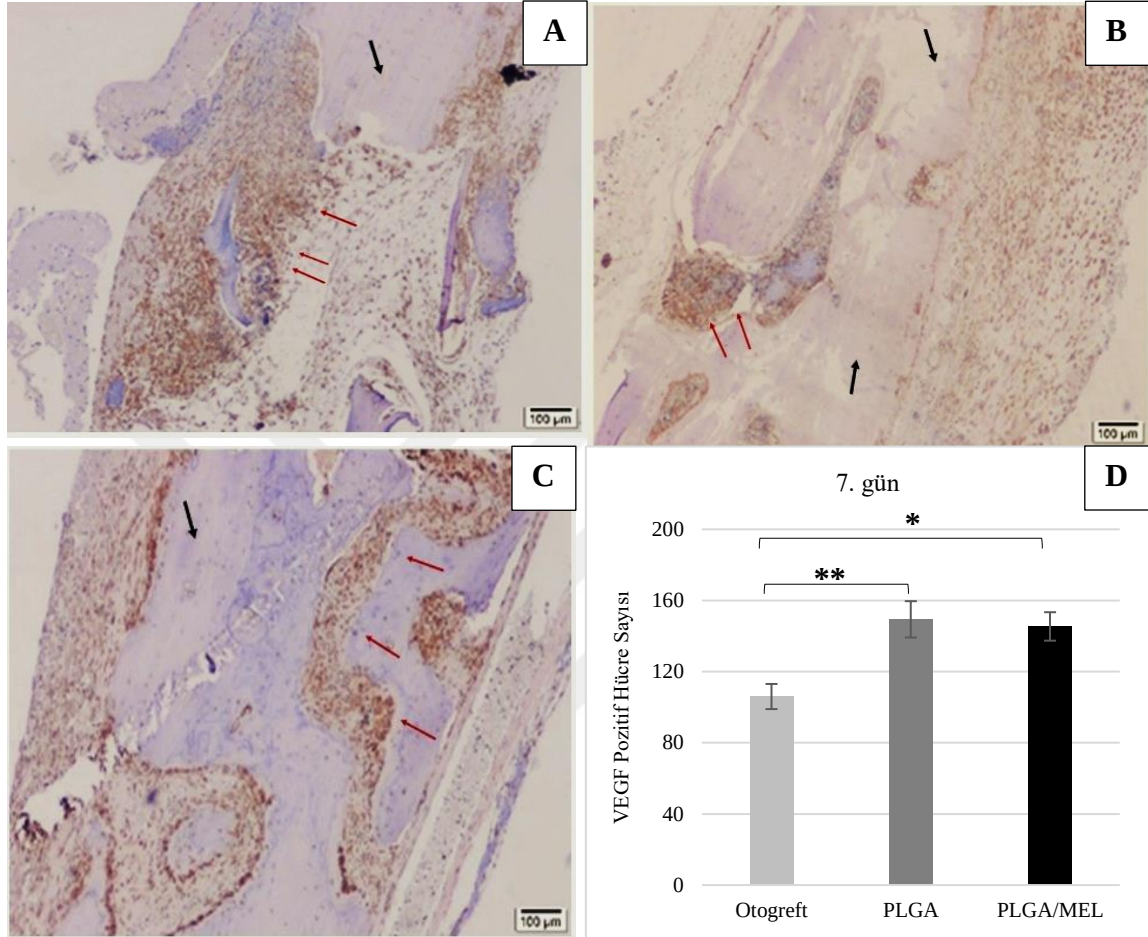


Şekil 48. (A) Otoplast, (B) PLGA, (C) PLGA/MEL gruplarına ait 28. gün BMP2 immünohistokimya boyama görüntüleri x20 ve (D) Gruplara ait BMP2 pozitif hücre sayılarına göre yapılan değerlendirme sonuçlarının grafiksel gösterimi (*: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, Siyah ok: ana kemik; Kırmızı ok: BMP2 pozitif hücre).

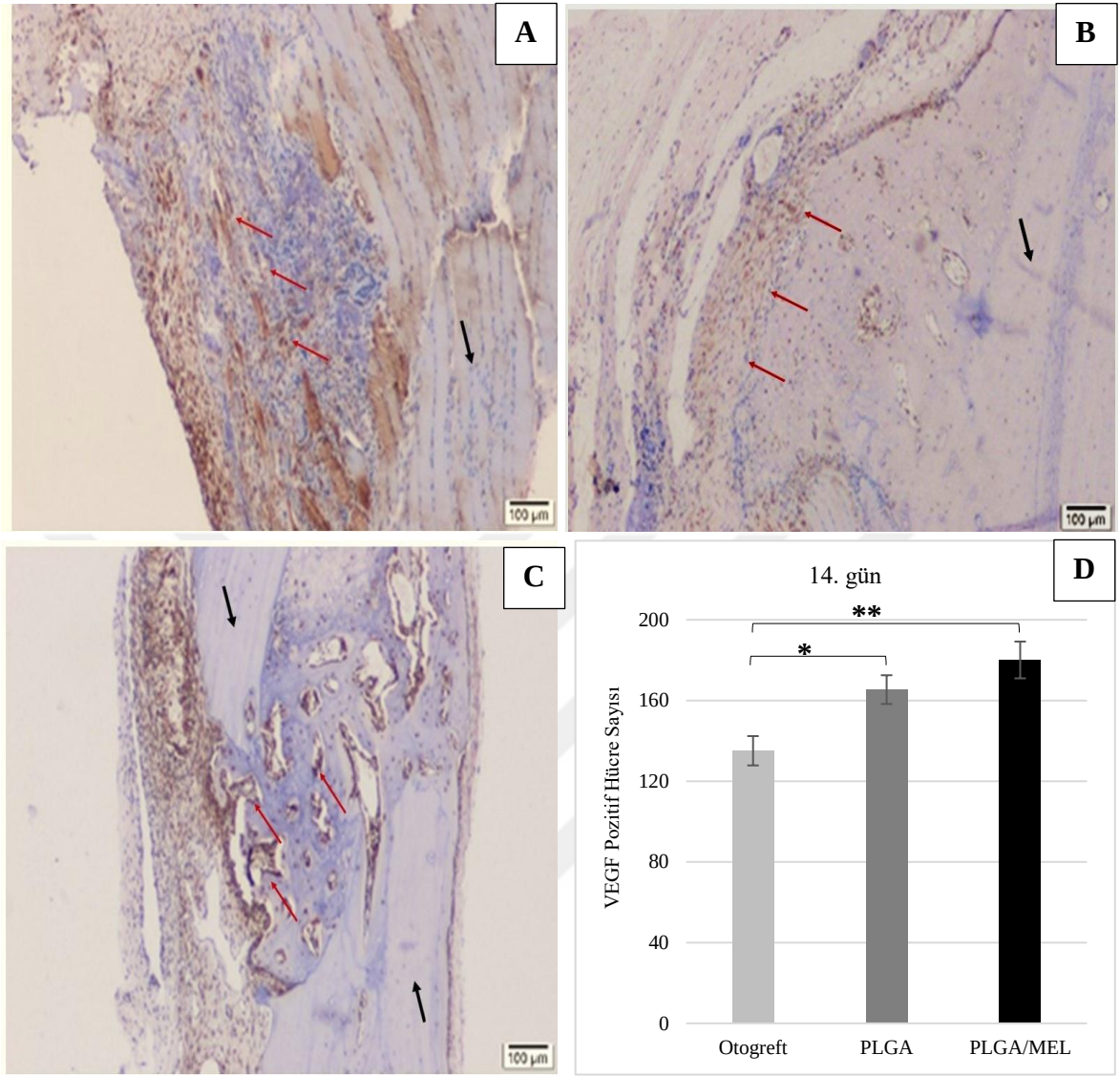
VEGF İmmünohistokimya Boyama Bulguları

Anjiyogenezis değerlendirmesi için yapılan VEGF immün boyaması bulgularına göre PLGA/MEL grubunda VEGF pozitif hücrelerinin yoğunluğunun 7. ve 14. günlerde Otoplast grubuna göre daha fazla olduğu görüldü (sırasıyla $p < 0,05$; $p < 0,001$). PLGA grubunda ise 7. ve 14. gün VEGF pozitif hücrelerinin yoğunluğunun Otoplast grubuna göre

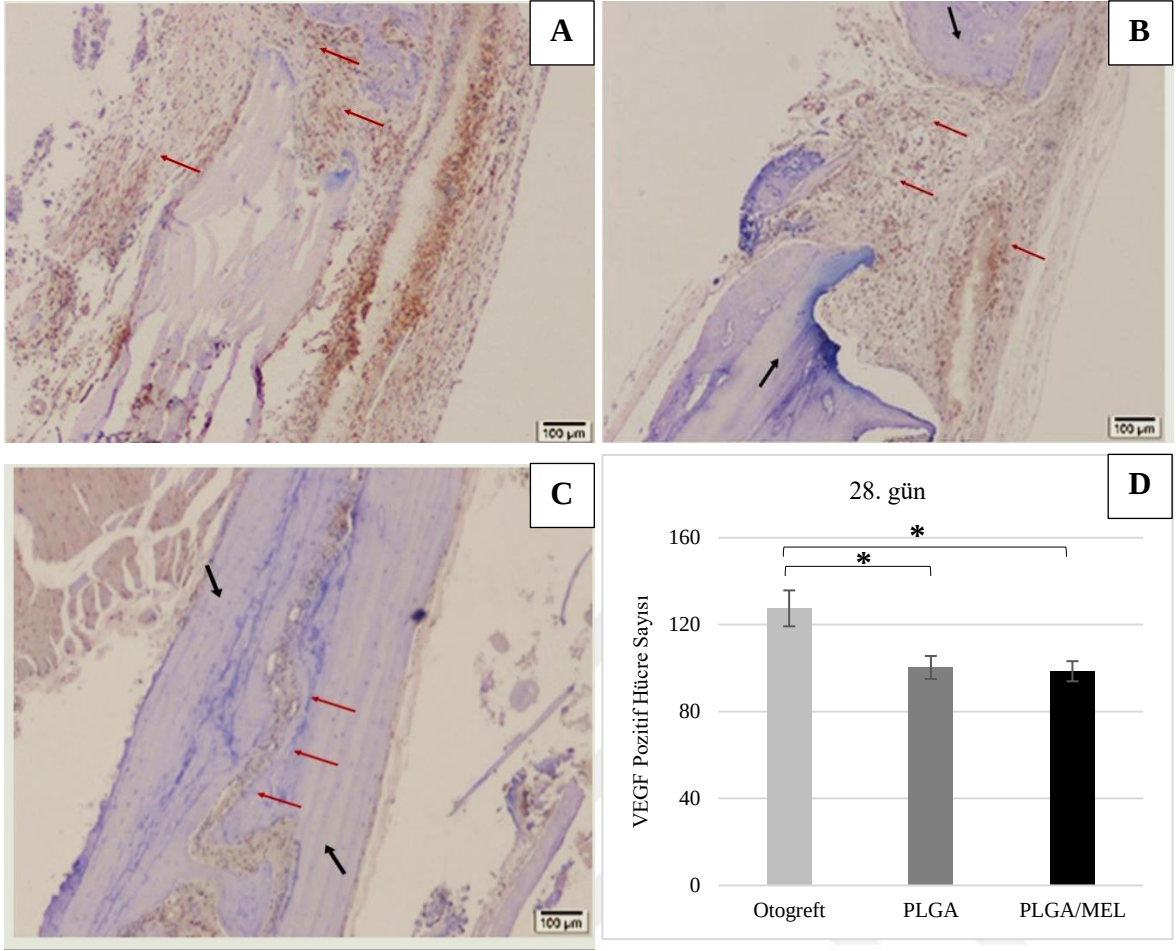
daha yüksek olduğu belirlendi (sırasıyla $p<0,001$; $p<0,05$). PLGA/MEL ve PLGA gruplarında 28. günde VEGF pozitif hücrelerin sayısının Ototogreft grubuna göre anlamlı düzeyde azaldığı gözlemlendi ($p<0,05$; Şekil 49, Şekil 50, Şekil 51).



Şekil 49. (A) Ototogreft, (B) PLGA, (C) PLGA/MEL gruplarına ait 7. gün VEGF immünohistokimya boyama görüntüleri x20 ve (D) Gruplara ait VEGF pozitif hücre sayılarına göre yapılan değerlendirme sonuçlarının grafiksel gösterimi (*: $p<0,05$, **: $p<0,001$, Siyah ok: ana kemik; Kırmızı ok: VEGF pozitif hücre).



Şekil 50. (A) Otoplasty, (B) PLGA, (C) PLGA/MEL gruplarına ait 14. gün VEGF immünohistokimya boyama görüntüleri x20 ve (D) Gruplara ait VEGF pozitif hücre sayılarına göre yapılan değerlendirme sonuçlarının grafiksel gösterimi (*: $p < 0,05$, **: $p < 0,001$, Siyah ok: ana kemik; Kırmızı ok: VEGF pozitif hücre).

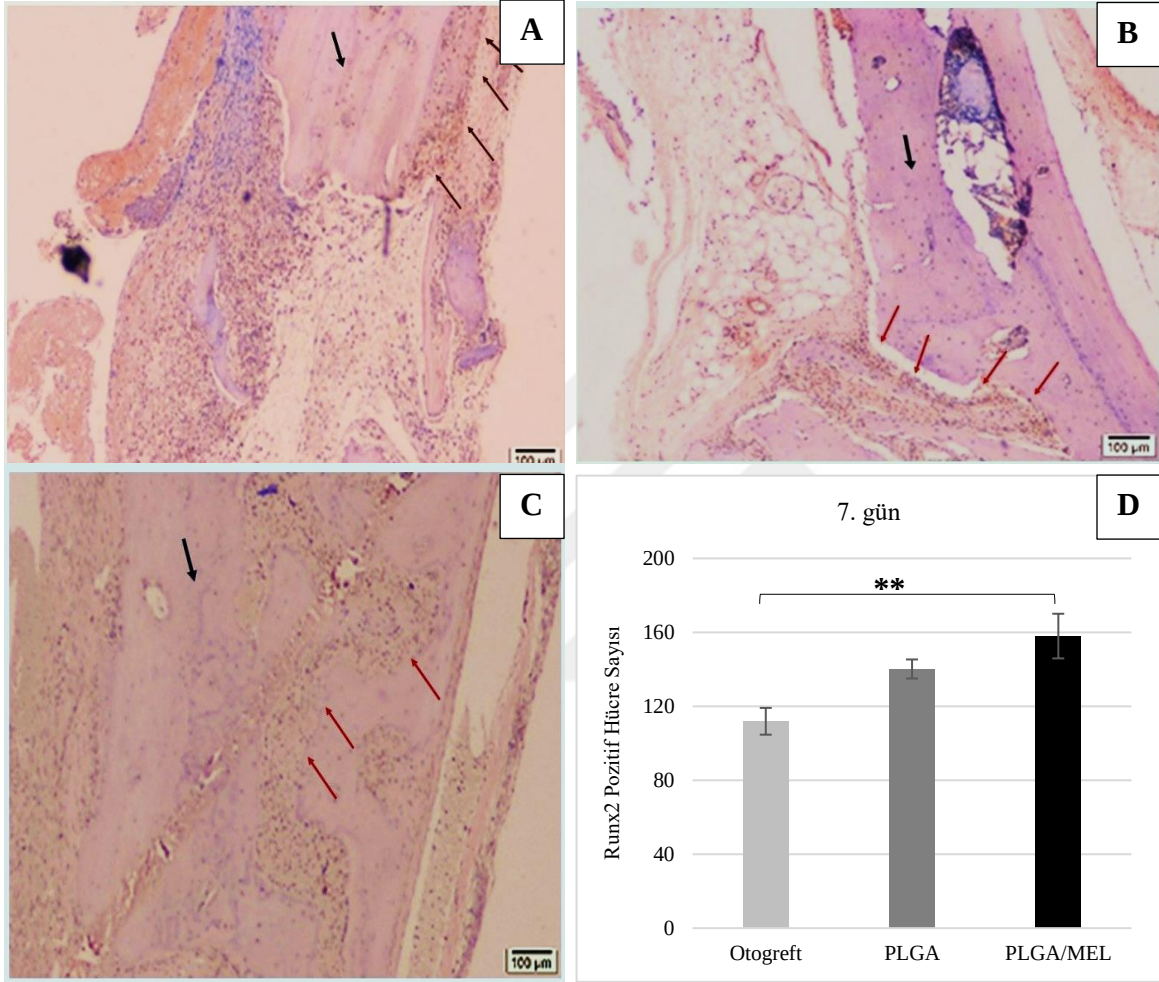


Şekil 51. (A) Otograft, (B) PLGA, (C) PLGA/MEL gruplarına ait 28. gün VEGF immünohistokimya boyama görüntüleri x20 ve (D) Gruplara ait VEGF pozitif hücre sayılarına göre yapılan değerlendirme sonuçlarının grafiksel gösterimi (*: $p < 0,05$, Siyah ok: ana kemik; Kırmızı ok: VEGF pozitif hücre).

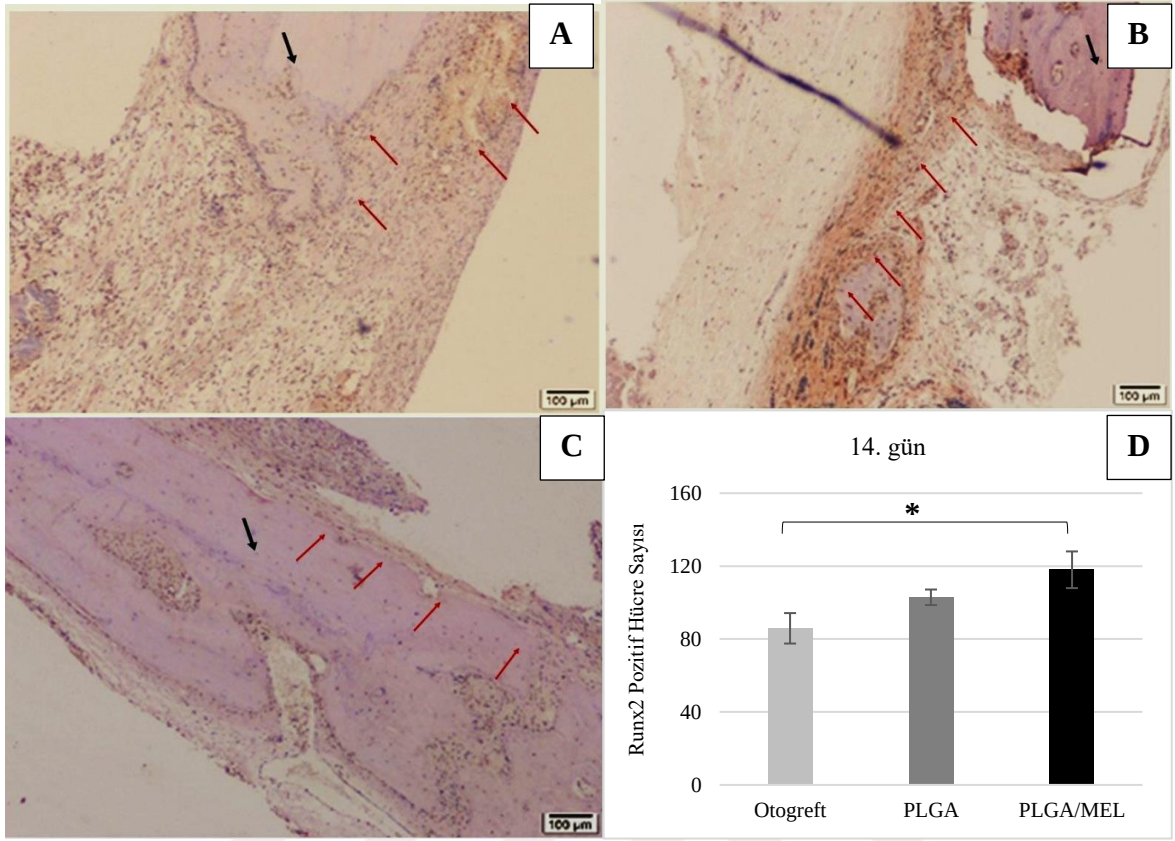
Runx2 İmmünohistokimya Boyama Bulguları

Osteoprogenitör hücrelerin diferansiyasyon düzeyinin belirlenmesi için gerçekleştirilen Runx2 immün boyaması sonuçlarına göre, PLGA/MEL grubunda Runx2 pozitif hücrelerin yoğunluğu 7., 14., ve 28. günlerde Otograft grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha fazla olduğu belirlendi ($p < 0,05$; $p < 0,001$). Tüm günlerde elde edilen verilere göre PLGA ve PLGA/MEL grupları arasında Runx2 pozitif hücrelerin

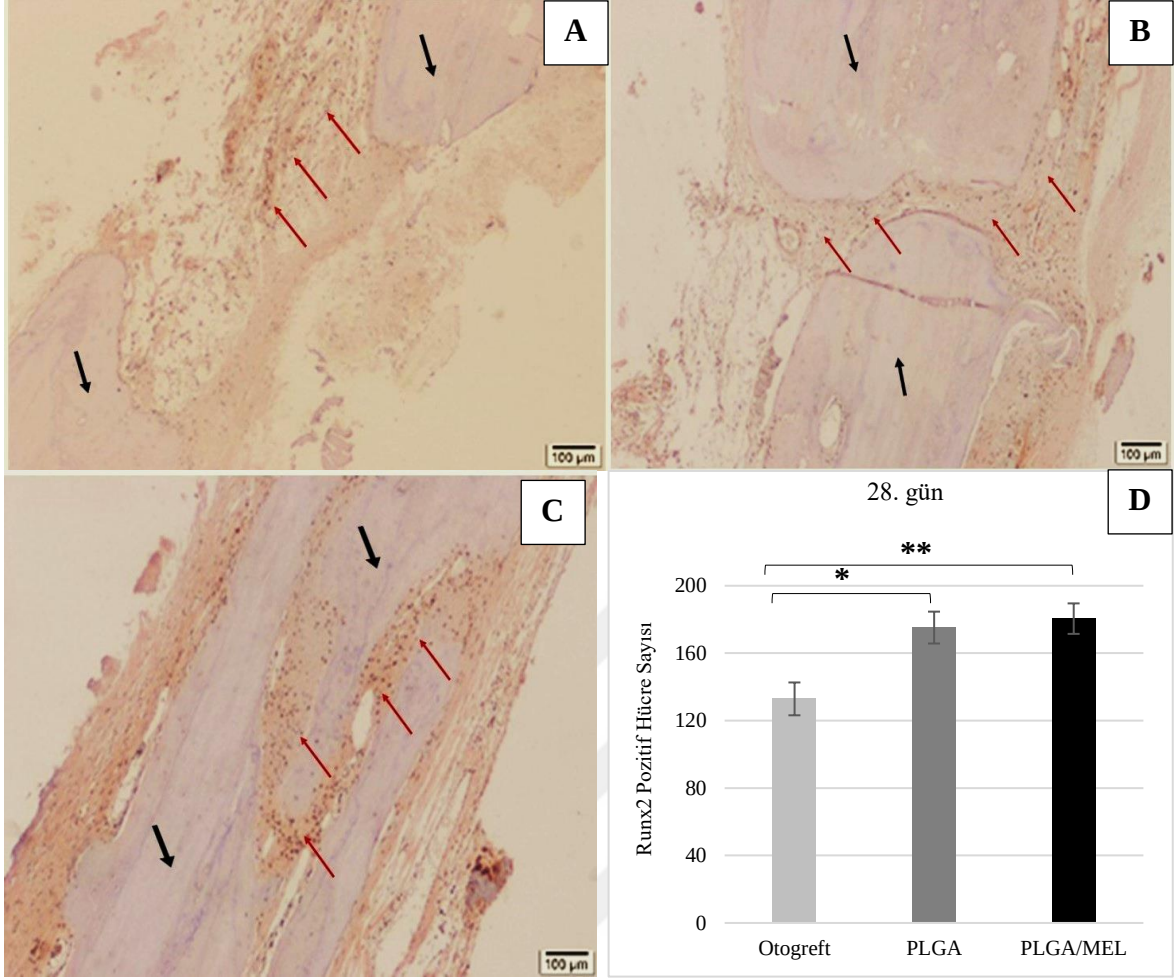
yoğunluğu açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı. PLGA grubunda ise sadece 28. günde Runx2 pozitif hücrelerinin sayısında Otogreft grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artış olduğu görüldü ($p<0,05$; Şekil 53, Şekil 54, Şekil 55).



Şekil 52. (A) Otogreft, (B) PLGA, (C) PLGA/MEL gruplarına ait 7. gün Runx2 immünohistokimya boyama görüntüleri x20 ve (D) Gruplara ait Runx2 hücre sayılarına göre yapılan değerlendirme sonuçlarının grafiksel gösterimi (**: $p<0,001$, Siyah ok: ana kemik; Kırmızı ok: Runx2 pozitif hücre).



Şekil 53. (A) Otograft, (B) PLGA, (C) PLGA/MEL gruplarına ait 14. gün Runx2 immünohistokimya boyama görüntüleri x20 ve (D) Gruplara ait Runx2 pozitif hücre sayılarına göre yapılan değerlendirme sonuçlarının grafiksel gösterimi (*:p<0,05, Siyah ok: ana kemik; Kırmızı ok: Runx2 pozitif hücre).

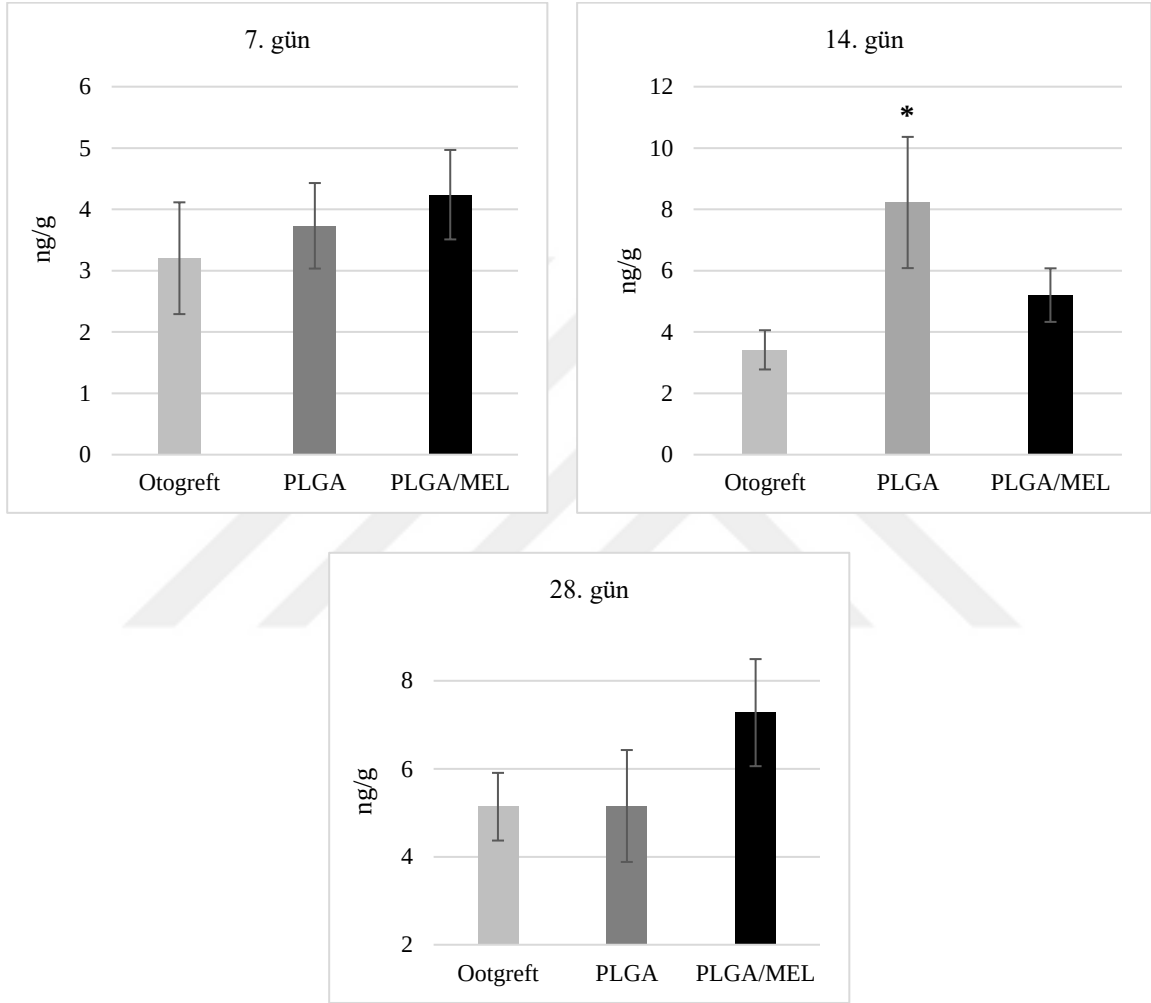


Şekil 54. (A) Otoplasty, (B) PLGA, (C) PLGA/MEL gruplarına ait 14. gün Runx2 immünohistokimya boyama görüntüleri x20 ve (D) Gruplara ait Runx2 pozitif hücre sayılarına göre yapılan değerlendirme sonuçlarının grafiksel gösterimi (*:p<0,05, **: p<0,001, Siyah ok: ana kemik; Kırmızı ok: Runx2 pozitif hücre).

4.2.3. Biyokimyasal Analizler

Tüm gruplardaki sıçanlardan 7., 14., ve 28. günlerde alınan kan örneklerinden elde edilen serumlardan ELISA ile Otoplasty, PLGA ve PLGA/MEL gruplarındaki sıçanların serum ALP seviyeleri belirlendi. Elde edilen sonuçlara göre 7. ve 28. günlerde gruplar

arasında serum ALP seviyeleri açısından anlamlı bir fark belirlenmedi. Bununla birlikte 14. gün verilerine göre PLGA grubunda serum ALP seviyelerinin Ototgreft ve PLGA/MEL grubunun serum ALP seviyeleri açısından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artış olduğu gözlemlendi (Şekil 56).



Şekil 55. Gruplara ait 7., 14. ve 28. günlerde elde edilen serum örneklerinde, ALP ELISA verilerine göre yapılan değerlendirme sonuçlarının grafiksel gösterimi (*: $p < 0,05$).

BEŞİNCİ BÖLÜM

TARTIŞMA, SONUÇ VE ÖNERİLER

5.1. Tartışma

Bu çalışmada sıçanlarda otogreft ile tamir edilen deneysel kritik kalvaryal kemik defekti üzerine melatonin içeren PLGA yapısındaki nanolif uygulamasının 7., 14. ve 28. günlerde kemik kaynaması üzerine etkileri araştırıldı. Bu amaçla öncelikle elektroëğirme yöntemi ile melatonin içeren PLGA nanolifler üretildi. Üretilen nanoliflerin biyobozunum ve ilaç salım profili belirlendikten sonra, morfolojik ve kimyasal karakterizasyonu yapıldı. In vivo sıçan deneylerinde tüm gruplarda otogreft tamiri yapıldıktan sonra PLGA ve PLGA/MEL gruplarına nanolifler yerleştirildi. Çalışmanın 7., 14. ve 28. günlerinde alınan kalvaryum dokularında yapılan histopatolojik ve immünohistokimyasal analizlerin sonuçları PLGA/MEL nanolif uygulamasının kemik örnekleri alınan tüm günlerde (7., 14. ve 28. günler) otogreft ile ana kemik arasında daha iyi ve daha hızlı bir kaynama sağladığını göstermiştir. Nanoliften kontrollü melatonin salımının kemik kaynamasını hızlandırıcı etkisini (a) yeni kemik oluşumunu (b) yeni damar oluşumunu (c) mineralizasyonu ve (d) kollajen birikimini arttırarak gösterdiği anlaşıldı. Melatoninin bu etkisini çalışmanın 7. ve 14. günlerinde ALP, VEGF, BMP2 ve Runx2 üretimini arttırarak gösterdiğini düşünmekteyiz.

Kemik doku mühendisliği çalışmalarında en sık kullanılan biyoyumlu matrikslerden bir tanesi PLGA'dan üretilen matrikslerdir. PLGA'nın yapısı itibarı ile kemik ECM'sini taklit edebilme özelliğine sahip olması tercih edilmesini sağlayan bir faktördür (Çetin Altındal ve Gümüşdereliolu, 2019; Li ve Zhang, 2018; Mittal vd., 2007). PLGA temelli biyomateryaller nanolif, mikro-nano partikül veya sferik yapıda üretilebilir. Özellikle nanolif yapıda üretilen PLGA biyomateryalleri, kemik hücre adezyonunu sağlayabilen bir köprü özelliği gösterdiğinden, kemik doku mühendisliği alanında yapılan deneysel çalışmalarda sıklıkla kullanılmaktadır (Hassan vd., 2022; Jin vd., 2021; Zhang vd., 2018).

Gerek kemik doku mühendisliği ve gerekse başka alanlarda olsun PLGA'dan üretilen nanoliflerin üretim aşamasında bir optimizasyon sürecinden geçmeleri gerekir (Bhuiyan vd., 2016; Ramchandani ve Robinson, 1998; Riggin vd., 2017). İn vitro ortamda ve daha çok kimyasal süreçler olan bu işlemlerde kullanım amacına göre nanolifin bileşimi ayarlanır (Guo vd., 2016). Bu amaçla yürütülen optimizasyon çalışmalarında nanolifin;

- (a) Biyobozunum süresinin,
- (b) Kontrollü salım yapılacak ilacı taşıma kapasitesinin,
- (c) Nanolif boyutlarının optimize edilmesi gerekir.

Çalışmamızda ürettiğimiz PLGA temelli nanolifin biyobozunum süresi çalışma hedeflerimizle uygun olarak oluşturuldu. Bu amaçla 28. günde biyobozunumunun % 85-90'ını tamamlayacak ve içerdiği melatonin salacak bir nanolif üretilene kadar optimizasyon çalışmasına devam edildi. PLGA'nın bileşimindeki laktid asit (LA) miktarının glikolid asit (GA) miktarına oranının biyobozunurluğu etkileyen en önemli faktör olduğu bilinmektedir (Sun vd., 2022). Bu nedenle PLGA temelli biyomateryallerin biyobozunum süreleri içeriğindeki PLGA (LA:GA) oranına göre ayarlanabilir. Daha erken sürelerde biyobozunum öngörüldüğünde PLGA içeriğindeki GA oranı azaltılır. Nanolifin daha geç bozunması istenirse GA içeriği daha yüksek bir bileşim hazırlanır. Bu oranlar ve biyobozunum süreleri nanolifin kullanılacağı deneysel yöntem ve uygulanacağı dokuya göre belirlenir. Örneğin kısa sürede biyobozunum hedeflenene PLGA temelli biyomateryaller PEG kullanılarak optimize edilir (Bose vd., 2018). Bu verilere dayanarak çalışmamızda 28 günlük biyobozunurluk elde etmek üzere PLGA ve PLGA/MEL nanoliflerinin formülasyonu LA:GA oranları değiştirilerek optimize edildi. Elde edilen sonuçlar LA:GA oranı 50:50 olan biyomateryalin in vitro ortamda 28. günde % 85-90 oranında (PLGA 50:50) biyobozunuma uğradığını gösterdi (Şekil 22). Çalışmanın bundan sonraki aşamalarında bu biyomateryal kullanıldı.

Literatür verilerine bakıldığında farklı bileşimler içeren PLGA temelli biyomateryallerin farklı biyobozunum sürelerine sahip olduğu görülmektedir. Bu amaçla yapılan bir çalışmada iki farklı oranda hazırlanan PLGA nanoliflerinin (50:50; 75:25) in vitro ortamda bozunum verilerine göre PLGA bileşimindeki (LA:GA) oranının 75:25 olduğu grupta bozunumun 4. haftaya kadar başlamadığı gözlenmiştir (Shin vd., 2006).

PLGA 50:50 grubunda ise nanoliflerin erken dönemde (2. haftada) biyobozunuma uğradığı görülmüştür. Bunun nedeni olarak PLGA yapısındaki yüksek miktarda hidrofilik glikolid asit varlığının ester bağlarının hızlı kopmasını sağlaması gösterilmiştir. Bu çalışmada ayrıca optimize edilen PLGA (LA:GA; 50:50) formülasyonunun in vitro osteoblast hücreleri ile yapılan analizlerde yeni kemik oluşumu da sağladığı bildirilmiştir (Shin vd., 2006). Başka bir çalışmada ise tavşan femur defekti modelinde uygulanan siprofluoksasin içeren PLGA nanoliflerinin (50:50) 5. ve 6. haftalarda in vivo ortamda tamamen bozunduğu gösterilmiştir (Ramchandani ve Robinson, 1998). Bu sonuçlara bakıldığında PLGA (50:50) bileşiminin erken kemik rejenerasyonu sağlamak üzere ideal bir oran olduğu söylenebilir. Literatür verilerinden hareketle ve elde etmiş olduğumuz in vitro biyobozunum sonuçları dikkate alınarak çalışmamızda kullandığımız nanolifin bileşimi PLGA (50:50) şeklinde üretilmiştir.

PLGA temelli nanoliflerin in vivo biyobozunum süresinin, in vivo biyobozunum süresinden daha hızlı olduğu belirtilmektedir (Lu vd., 2000; Torres-Lagares vd., 2017). Bunun nedeni olarak in vivo ortamın stabil olmayan pH düzeyi ve alkalilik düzeyi gösterilmiştir (Kaval vd., 2023).

Çalışmamızda in vitro biyobozunum ile in vivo biyobozunum süreleri arasında bir korelasyonun olup olmadığını belirlemeye yönelik biyokimyasal bir analiz yapılmadı. Bununla birlikte uyguladığımız biyomateryalin beyaz renkli ve gözle görülebilir olması nedeni ile makroskobik değerlendirmeler yapıldı. Çalışmanın 7. ve 14. günlerinde nanolif uygulanan PLGA ve PLGA/MEL gruplarındaki sıçanların tamamında otogreft tamiri yapılan bölgelerinde halen bir biyomateryalin bulunduğu gözlemlendi. Bu durum 14. günde biyomateryalin tamamen erimediğini ve halen melatonin salmaya devam ettiğini düşündürdü. Bununla birlikte çalışmanın 28. gününde PLGA grubundaki 1 sıçanın kalvaryal bölgesinde kısmen erimeyen biyomateryal gözlemlendi. Bunun dışında kalan tüm sıçanlarda otogreft alanında gözle görülebilir düzeyde bir nanolif yapısına rastlanmadı. Bu sonuçlara göre PLGA nanoliflerinin in vivo ortamda biyobozunum süresinin in vitro ortamda belirlenen biyobozunum süresi ile paralellik gösterdiğini düşündürdü.

Kemik dokunun iyileşme süresi diğer dokulara göre daha uzun bir zaman aldığından kemik doku çalışmalarında uzun sürede biyobozunuma uğrayacak nanolifler tercih edilir. Bu amaçla yapılan çalışmalarda 8. ve 12. haftalar veya 6 ayda biyobozunumunu tamamlayan nanolif çalışmaları bulunmaktadır (Gao vd., 2016; Reich vd., 2020; Yang vd., 2019). Bu çalışmalardan Gao vd., (2016)'nin 8. haftada tavşan kalvaryal defekt modelinde yeni kemik oluşumunu incelemek üzere yapılan histolojik boyama sonuçlarına göre vancomycin yüklü PLGA (85:15)'nin antibakteriyel etki ve osteoindüktif etki gösterdiği belirlenmiştir (Gao vd., 2016). Reich vd., (2010)'a göre ise sıçanlarda oluşturulan femur defektlerinin iyileşmesinde sodyum yüklü PLGA (80:20)'nin 12. haftada osteoindüktif etki göstererek yeni kemik oluşumu sağladığı bildirilmiştir (Reich vd., 2010). Buradan anlaşılabileceği üzere GA oranı PLGA'nın biyobozunum süresinin uzun olmasını sağlamaktadır. Yang vd., (2019)'nin çalışmasında ise PLGA (90:10) ve biyoaktif cam kompozit iskelesinin uygulandığı tavşanlarda oluşturulan kemik defektlerinin iyileşmesini 6. ayda sağladığını göstermektedir. Bununla birlikte biyobozunumu 8 hafta ve üzerinde olan biyomateryallerin kemik doku mühendisliği çalışmalarında kullanımına az rastlanmaktadır (Yang vd., 2019). Bunun nedeni olarak bu alanda yapılan deneysel çalışmaların kemik iyileşmesini erken dönemde sağlamayı hedeflemiş oldukları söylenebilir. Öte yandan uzun süreli biyobozunur biyomateryal çalışmalarının kemik kaynaşmasına değil daha çok kritik defekt alanına yerleştirilen skafoldun yeni kemik oluşturma kapasitesine odaklandığı görülmektedir (Hassan vd., 2022; Shi vd., 2009; Yan vd., 2015). Çalışmamızda hızlı biyobozunur özellikte bir PLGA formülasyonu (50:50) kullanıldı. Kullandığımız bu formülasyondaki PLGA'nın erken dönemde otogreftin kaynaşması üzerine etkilerini incelemeyi hedefleyerek 28 günlük bir biyobozunurluk sağlayan PLGA temelli bir biyomateryal elde ettik. Literatürde bu özellikte bir PLGA formülasyonunun otogreft kaynaşması üzerine etkilerinin incelendiği bir çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamız bu alanda bu model ile yapılan ilk çalışmadır.

Bununla birlikte kemik dokuda erken dönemde iyileşme veya kaynaşma çalışmalarında ise ortalama 4-8 haftada biyobozunuma uğrayan nanolifler tercih edilir (Lee vd., 2016). Çalışmamızda biyomateryalin otogreftin kaynaşması üzerine erken dönemdeki etkilerini incelemeyi hedeflediğimizden en geç 28. günde biyobozunumunun % 85-90'nını tamamlayacak bir biyomateryal kullanılmıştır. Literatür bildirimlerinde erken dönem kemik

iyileşmesi çalışmalarının 4., 6. ve 8. haftalarda biyobozunumu hedeflenen nanoliflerin kullanıldığı görülmektedir (Bose vd., 2018; Saito vd., 2013; Wang vd., 2024). Bu çalışmalardan Saito vd., (2013)'nin yaptığı çalışmada farelerde polilaktik asit ve PLGA (50:50)'nin 4. haftada yeni kemik oluşumunu sağladığı görülmüştür (Saito vd., 2013). Bu çalışmalardan Bose vd., (2018), sıçanlarda femur kırıklarının iyileşmesi üzerine PLGA (65:35) ve PEG bileşiminin etkilerini incelemiş ve 6. haftada defekt alanında yeni kemik oluşumu belirlenmiştir (Bose vd., 2018). Wang vd., (2024)'nin yaptıkları çalışmada ise tavşanlarda oluşturulan maksillofasiyal kemik defektleri üzerine kolajen ve hidroksiapatit içeren PLGA (75:25)'nin etkileri incelenmiştir. Bu çalışmanın 8. hafta verilerine bakıldığında PLGA uygulanan grupta kontrol grubuna göre anlamlı derece yüksek düzeyde kemik oluşumu gözlenmiştir (Wang vd., 2024). Çalışmamızda ise PLGA (50:50) formülü kullanılarak bir taşıyıcı biyomateryal elde edildi. Bununla birlikte bu formüle PLGA:PEG oranı 85:15 oranında PEG eklenerek biyobozunumu 28 günlük olacak şekilde optimize edildi.

PLGA yapılı nanolifler taşıyıcı özellikleri ile bir iskele görevi görmekle birlikte, aynı zamanda kontrollü ilaç salım çalışmalarına da imkân verirler. Bu nedenle kemik doku mühendisliğinde PLGA temelli biyomateryaller içerisine yüklenmiş birçok ajanın kemik iyileşmesi veya kaynaşması üzerine etkileri incelenmiştir. Bu amaçla çeşitli büyüme faktörleri (BMP2, VEGF) PLGA'ya yüklenerek yeni kemik oluşumu üzerine etkileri araştırılmıştır (Nie vd., 2009; Rosa vd., 2017). Nie vd., (2019)'nin yaptığı çalışmada BMP2 içeren PLGA ve hidroksiapatit kompozit iskelelerinin farelerde oluşturulan femur defektlerinde kemik iyileşmesi üzerine etkileri incelenmiştir. BMP2'nin farelerde oluşturulan segmental defekt alanında yeni kemik oluşumu sağladığı belirtilmiştir (Nie vd., 2019). Rosa vd., (2017)'nin yaptığı bir çalışmada ise kemik defektlerinin iyileşmesinde anjiyogenezisin stimülasyonunu sağlamak üzere VEGF içeren PLGA matriksinin in vitro ortamda etkinliği incelenmiştir. Bu çalışmanın verilerine göre VEGF içeren PLGA matriksinin hücre canlılığını koruduğu, hücre adezyonunu aktive ettiği ve kemik rejenerasyonu için potansiyel etkileri olduğu bildirilmiştir (Rosa vd., 2017). Bunların yanında FDA onaylı çeşitli ilaçlar da kontrollü salım sağlamak üzere PLGA'ya yüklenerek kemik doku mühendisliği çalışmalarında kullanılmıştır (Mendes vd., 2017).

Ramchandi vd., (1998)'nin yaptığı bir çalışmada siprofluoksasin içeren PLGA nanoliflerinin tavşanlarda oluşturulan osteomyelit modelinde femur defektlerinin iyileşmesi üzerine etkileri araştırılmış ve 5. haftada siprofluoksasin içeren PLGA'nın defekt alanında enfeksiyon gelişimini engelleyerek yeni kemik oluşumu sağladığı belirlenmiştir (Ramchandi vd., 1998). Reich vd., (2020)'nin yaptığı çalışmada ise diklofenak sodyum yüklenen PLGA nanoliflerinin kemik iyileşmesi üzerine etkileri sıçanlarda oluşturulan femur defektleri modelinde incelenmiştir. Bu çalışmanın bulgularına göre diklofenak sodyum içeren PLGA nanorodlarının 12. hafta etkili kemik iyileşmesi sağladığı bildirilmiştir (Reich vd., 2020).

Kök hücre tedavilerinin son yıllarda umut vaadedici etkilerinin olduğu birçok uygulama bulunmaktadır (Hoang vd., 2022). PLGA temelli biyomateryaller çeşitli kök hücrelerin de PLGA içerisine yüklenebilmesine olanak vermektedir. Bu amaçla genellikle MSC'ler kullanılmaktadır. Bunlardan sıçan kalvaryum defektlerinin iyileşmesi için uygulanan MSC/PLGA nanoliflerinin simvastatin ile birlikte uygulamasının 8. haftada etkili kemik rejenerasyonu sağladığı belirtilmiştir (Mendes vd., 2017).

Kemik rejenerasyonunda etkili hormonların kontrollü salımının PLGA ile yapıldığı çalışmalarda sık görülmektedir. Bunlardan paratiroid hormon içeren PLGA nanopartiküllerinin in vitro osteoblast hücre kültüründe etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, biyomateryalin hücre adezyonunu ve proliferasyonunu sağladığını ve ALP enzim seviyesinin arttığı gösterilmiştir (Gentile vd., 2015). Osteoporotik kırıkların iyileşmesi üzerine estradiol içeren PLGA nanopartiküllerinin incelendiği bir çalışmada ise paranteral uygulanan estradiol/PLGA nanopartiküllerinin yapılan mikro bilgisayarlı tomografi görüntülerinde yeni kemik oluşumu sağladığı gösterilmiştir (Takeuchi vd., 2016).

Çalışmamızda ise PLGA nanoliflerine osteoindüktif etkileri iyi bilinen endojen bir hormon olan melatonin yüklenerek defekt alanına primer olarak kontrollü salımı amaçlandı. Melatonin yüklü PLGA nanoliflerinin otogreftin ana kemiğe kaynaşması üzerine etkilerini ortaya koyan bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Diğer taraftan melatonin yukarıda verilen birçok farklı molekülün etkilerini yalnız başına sağlayabilen bir hormondur.

PLGA nanoliflerinin bir etken madde taşıyıcısı olarak kullanıldığı çalışmalarda nanolifin ilacı hangi hızda saldıgının bilinmesi oldukça önemlidir. Bu amaçla in vitro ortamda pH 7.4 PBS ile muamele edilen biyomateryalin biyobozunmasına müsaade edilir. Biyomateryalin bulunduğu sıvı ortamdan belli aralıklarla örnekler alınarak uygun ölçüm yöntemleri ile analizler yapılarak nanolifin ilacı ne kadar saldıgı hesaplanır. Çalışmamızda 176 mg melatonin yüklenen PLGA (1,5 gr) nanolifinin melatonin salım profili 24 saat boyunca takip edildi. Bu amaçla 1 saat aralıklarla alınan çözelti örneklerinde UV spektrofotometre ile 300 nm ile 190 nm arasında tarama yapılarak açığa çıkan etken madde düzeyleri ölçüldü.

Melatonin içeren PLGA (50:50) nanopartikülleri ve titanyumdan oluşan biyomateryalin 140 saatlik melatonin salımının takip edildiği çalışmada, melatoninin ilk 20 saatte hızlı bir salım gösterdiği (% 85) ve daha sonra salım gerçekleşmediği belirlenmiştir (Farid vd., 2023). Melatonin (2 mg) ve BMP2 içeren PLGA (50:50) nanoliflerinin in vitro salımının değerlendirmesine göre 3. saatte melatoninin % 62'sinin saldıgı gözlenmiştir. Bununla birlikte sadece melatonin içeren PLGA nanoliflerinin uygulandığı in vitro grupta osteojenik etkilerin 21. günde M3T3E1 osteoblastik hücrelerde kolajen sentezini ve mineralizasyonunu aktive ederek gösterdiği belirtilmiştir (Jarrar vd., 2021). PLGA (50:50) nanopartiküllerine yüklenen 10 mg melatoninin 24 saatlik in vitro ilaç salımının ilk 4 saatte en yüksek düzeye ulaştığı ve 24. saate platoya ulaşarak salımın tamamlandığı belirtilmiştir (Lee vd., 2023). Bu amaçla çalışmamızda 24 saat süre ile PBS içerisinde PLGA/MEL liflerinin salım profili takip edildi. En yüksek salım 1. saatte gerçekleşmiş olup 1gr malzemeden 25 gr (% 85) salım gerçekleşti. 2. saatin başında PLGA/MEL'in muamele edildiği PBS solüsyonu değiştirildi. Bu saatten sonra 3 saat süre plato düzeyinde kalan eğri çizdirildi ve salım olmadığı belirlendi. Çalışmamızın bulguları PLGA (50:50) formülasyonunun farklı dozlarda melatoninini erken dönemde osteojenik etkiler gösterebilecek düzeyde salındığını göstermektedir. PLGA'dan melatonin salım bulgularımız literatürde belirtilen PLGA (50:50) formülasyonu ile yapılan çalışmalardaki ilaç salım bulguları ile paraleldir. Bulgularımızda literatüre benzer şekilde ilk saatlerde en yüksek salım gerçekleşmiş olup sonraki saatlerde platoya ulaşan ve artık salımın gerçekleşmediği spesifik bir salım grafiği elde edilmiştir. Bu bulgular PLGA biyobozunumunun melatonin salımı ile aynı zaman aralığında gerçekleştiğini de ayrıca göstermektedir.

Doku mühendisliği alanında üretilen materyal üretim amacı ne olursa olsun bu materyal eğer in vitro hücre kültüründe veya in vivo deneylerde kullanılacaksa öncesinde mutlaka sterilize edilmesi gerekir. Bu amaçla en sık kullanılan sterilizasyon yöntemleri UV ışın uygulaması, buhar ısısı ile muamele, % 70 ethanol veya gama ışınları ile sterilizasyondur (Gökçe vd., 2023; Gurler vd., 2019). Çalışmamızda UV sterilizasyon yöntemi tercih edilmiştir. Literatüre bakıldığında UV sterilizasyonun melatoninli biyomateryal çalışmalarında yaygın olarak kullanıldığı görülmektedir (Çetin Altındal ve Gümüşderelioğlu, 2019; Jarrar vd., 2021). Bununla birlikte melatonin başta UV ışınlar olmak üzere ışıktaki kolay bozulabilen bir kimyasal yapıya sahiptir.

Çalışmamızda UV sterilizasyon uygulanan melatoninli nanoliflerde de ayrıca melatonin salım profili belirlenmiştir. Literatürde melatonin içeren biyomateryallerin UV sterilizasyon sonrası melatonin salım profiline yönelik bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bununla birlikte melatonin içeren biyomateryallerin UV ışınları ile güvenli bir şekilde sterilize edilebileceğine dair bildirimler bulunmaktadır (Gurler vd., 2019; Jarrar vd., 2021).

Bu amaçla PLGA/MEL nanolifleri UV sterilizasyon yöntemi ile sterilize edildi ve ilaç salım özellikleri üretim aşamasında uygulanan şekilde değerlendirildi. Böylelikle UV sterilizasyon öncesi ve sonrası ayrı ayrı melatonin salım profilleri elde edildi (Şekil 23). Şekil 23 'den de görüleceği üzere her iki salım profilinin birbirine oldukça benzer olduğu anlaşıldı. Bu verilere göre uygulanan UV sterilizasyonun melatonin için güvenli olduğu değerlendirilmiştir. Melatoninin etkilenmemesi nedeni olarak; (a) üretilen biyomateryalin iç bölgelerine yerleştirilmiş olması, (b) membranın UV ışınlarına geçirgen olmaması ve (c) UV ışınların sadece biyomateyalin yüzeyini etkilemesi gibi faktörler gösterilebilir.

Melatoninin kemik iyileşmesi üzerine etkilerini konu alan deneysel çalışmalarda paranteral yollarla da uygulandığı görülmektedir. Melatonin paranteral yolla uygulandığında karaciğerden ilk geçişte % 80'in üzerinde metabolize olur. İster oral isterse paranteral uygulansın yarılanma ömrü ortalama 40-60 dakika arasındadır (Poza vd., 2022). Kemiklerin

iyileşmesi oldukça uzun bir sürede gerçekleşir. Diğer taraftan hasarlı kemik bölgesinde bozulan kan damarı yapısı kanlanmanın da azalmasına yol açar. Kaldı ki paranteral uygulanan bir ilaç tüm vücuda dağılacığından hasarlı kemik bölgesine ulaşabilecek ilaç miktarı oldukça düşük düzeyde kalacaktır. Melatoninin kendi farmakokinetik özelliklerine bağlı dezavantajlarından dolayı kemik iyileşmesi veya kaynaşması çalışmalarında ilaçları lokal uygulamaya ve kontrollü salıma imkân veren nanoliflerin kullanımını teşvik etmektedir. Bu nedenle çalışmamızda biyobozunum süresini ve melatonin salım profilini in vitro ortamda belirlediğimiz nanolifin kemik kaynaşması üzerine etkileri in vivo 28. güne kadar incelenmiştir. Üretmiş olduğumuz bu biyomateriyal ile melatoninin hasarlı bölgede istenilen düzeyde ve sürekli olarak bulunması sağlamayı amaçladık.

Melatoninin kemik iyileşmesi ve kaynaşması üzerine olumlu etkiler gösterdiği bilinmektedir. Bir çalışmada intraperitoneal (i.p., 50 mg/kg) melatonin uygulamasının deneysel femur defektinin iyileşmesi üzerine etkileri incelenmiş, melatonin uygulamasının 5. haftadan itibaren yeni kemik oluşumu sağladığı belirlenmiştir (Histing vd., 2012). Tibia defekti oluşturulan diyabetik sıçanlara günlük tek doz 30 mg/kg (i.p.) melatonin uygulamasının 28. günde sadece yumuşak kallus oluşumu sağladığı ve yeni kemik oluşumunun henüz başlamadığı görülmüştür (Hastalık vd., 2010). Bu çalışmalardan elde edilen bulgulara göre paranteral melatoninin yüksek dozda uygulanması gerektiğini ve buna rağmen erken dönemde rejenerasyon üzerine kısıtlı etkiler gösterdiği anlaşılmaktadır. Yukarıda da belirtildiği gibi melatoninin farmakokinetiğine ait dezavantajlar melatoninin kemik iyileştirici etkilerinden yeterince faydalanmayı engeller. Bu nedenlerle melatonin hasarlı kemik bölgesine lokal ve uzun süreli uygulanmasını sağlayacak bazı çalışmalar yapılmıştır. Ancak bu çalışmalarda da istenilen iyileşme düzeyine ulaşılamamıştır. Bu verilerden hareketle melatoninin kontrollü salım yapabilecek yenilikçi ve güncel yaklaşımlar geliştirilmiştir. Bu amaçla biyobozunur ve biyoemilir sentetik materyaller ön plana çıkmıştır.

Kemik iyileşmesi üzerine deneysel olarak etkileri araştırılan melatonin dışında da birçok farklı ajan bulunmaktadır. Bunlardan kuersetin anti-inflamatuar ve antioksidan etkileri iyi bilinen bir molekül olup kemik rejenerasyonu üzerine etkilerinin incelendiği in vivo çalışmalar bulunmaktadır. Sıçanlarda oluşturulan açık kemik kırığı modelinde kemik

iyileşmesi üzerine 4 hafta boyunca günlük 100 mg/kg oral kuersetin uygulamasının etkileri araştırılmıştır. Çalışmanın 6. haftasında alınan dokularda antioksidan ve osteogenetik parametreler incelenmiştir. Elde edilen bulgulara göre 6. haftada kuersetin uygulamasının sert kallus oluşumu sağladığı belirlenmiştir (Yurteri vd., 2023). Bir başka çalışmada ise topikal insülin uygulamasının tibia defektleri oluşturulan sıçanlarda etkileri araştırılmıştır. Alınan dokulardan yapılan H-E boyamalarda 7. ve 28. günlerde topikal insülin uygulamasının anti-inflamatuvar etkiler gösterdiği ve böylelikle kemik rejenerasyonu sağlayabileceği ileri sürülmüştür fakat yeni kemik oluşumu bildirilmemiştir (Mahmoud vd., 2020). Bir çalışmada ise farelerde 2 mm'lik femur defektlerinin fiksasyonu sonrasında kemik kaynaması üzerine 200 µg/ kg paratiroid hormon uygulamasının etkileri araştırılmıştır. Bu çalışmada 2 hafta sonra alınan dokularda yapılan analizlerde paratiroid hormon uygulanan grupta kemik kaynamasının kontrol grubuna göre daha yüksek düzeyde olduğu görülmüştür (Menger vd., 2023). Belirtilen çalışmalardan elde edilen sonuçlar birçok farklı molekül kullanılmasına rağmen erken dönemde yeni kemik oluşumu konusunda yeterince ilerleme sağlamadığını göstermektedir. Burada belirtilen ve diğer birçok molekülden farklı olarak paraneural uygulanan melatonin kemik rejenerasyonunu düşük dozlarda bile 6 haftadan daha kısa sürede sağlayabildiği anlaşılmaktadır.

Melatonin kontrollü salımının yapıldığı çalışmalarda taşıyıcı madde olarak hidrojel, kitosan, aljinat, PCL, PLA gibi çok çeşitli polimer temelli biyomateryaller kullanılmıştır (Gurler vd., 2019; Vlachou vd., 2022; Yao vd., 2022; Yeşilyurt, 2024). Kemik doku mühendisliği alanında ise melatonin çoğunlukla PLGA temelli biyomateryaller ile kullanılmış, materyalin mekanik dayanıklılığının sağlanması için çeşitli iyon veya doğal polimerler ile kombinasyon yapılarak üretilmiştir (Çetin Altındal ve Gümüşderelioğlu, 2019; Gökçe vd., 2023; Jarrar vd., 2021; Martins vd., 2017). Ancak bu çalışmaların tamamı kemik defekti alanına melatonin içeren bir biyomateryal uygulanması çalışmalarıdır. Dolayısı ile bu araştırmalarda; (a) yerleştirilen iskele içerisine osteoblastik hücre göçü, (b) yeni kemik oluşumu için iskele oluşturma yeteneği ve (c) melatonin bunları uyarıcı etkisinin olup olmadığının belirlenmesi amaçlanmıştır.

Otogreft tamiri yapılan kritik defektlerde otogreft ile ana kemiğin kaynaşması üzerine kontrollü melatonin salımı yapabilen bir biyomateryal çalışmasına rastlanılmamıştır. Kemik doku mühendisliği çalışmalarında üretilen biyomateryallerin osteoindüktif ve osteokondüktif özellikler taşıması için bileşenler belirlendikten sonra hem nano-karakterizasyonu hem ilaç yükleme etkinliği belirlenir. Bu amaçla genellikle kullanılan yöntemler SEM görüntüleme ve FTIR ölçümüdür. SEM görüntüleme ile üretilen biyomateryalin yüzey morfolojisi karakterize edilirken; FTIR ölçümü ile biyomateryalin içerdiği bileşenlerin varlığı kanıtlanır (Oliveira vd., 2018).

Morfolojik karakterizasyon ile üretilen materyalin lif yapısı ve dağılımı belirlenir. Lif yapısı mekanik dayanıklılık için önemli bir göstergedir. PLGA (50:50) nanolifleri yaklaşık olarak 350-500 nm arası lif çapına sahip olduklarından kemik doku mühendisliği çalışmalarında tercih edilirler (Khan vd., 2022). Bir biyomateryal skaffold olarak kullanılacaksa mekanik dayanıklılık oldukça önemli hale gelmektedir. Nanoliflerin hedeflenen boyutlarda birbiri ile uygun çaplarda ve süreklilik gösteren bir lif yapısına sahip olması ise hücre göçü ve adezyonu ile yeni kemik oluşumu açısından oldukça değerli bir kriterdir (Capurro ve Barberis, 2014). Çalışmamızda kullandığımız biyomateryal bir skaffold olarak kullanım amacı ile üretilmemiştir. Bu nedenle mekanik testlerine yapmaya ihtiyaç olmamıştır. Çalışmamızda nanoliflerin homojenitesi ve sürekliliğinin incelendiği SEM analizine göre PLGA/MEL nanoliflerin homojen bir dağılım ve süreklilik gösterdiği izlendi. Elde edilen SEM görüntüleme verileri literatürde PLGA ve melatonin kullanılarak üretilen nanoliflerin morfolojik karakteristiği ile benzer özelliklere sahip olduğu görüldü (Wang vd., 2022).

Nanoliflerin içerdiği kimyasal bağların (C-H) karakterizasyonu için yapılan FTIR analizine göre melatonine ait karakteristik pikler ikinci spektrumda görüldü. 3300 cm^{-1} 'deki spesifik pik melatonin yapısındaki N-H gerilmesine aittir. -CN gerilme pikleri 2900 cm^{-1} civarında ve ikincil amidlerin gerilme titreşimlerine ait pikler yaklaşık 1650 cm^{-1} 'de görülmektedir. PLGA-PEG içerisine melatonin eklenmiş nanolife ait üçüncü spektrumda hem PLGA ve PEG polimerlerine hem de melatonine ait karakteristik pikler görüldü. Ancak yapıda melatonin yüzdesi düşük olduğu için melatonine ait piklerin şiddetinin daha düşük

olduğu görülmektedir. Melatonin yüklenen PLGA nanopartiküllerinin kimyasal bağlarının karakterizasyonunda melatoninin 1650 cm^{-1} - 1200 cm^{-1} absorbans aralığında spesifik pikleri olduğu belirlenmiştir (Lee vd., 2023). Polivinilalkol (PVA) içerisine yüklenen melatonin spesifik piklerinin ise 1000 cm^{-1} - 1200 cm^{-1} arasında görüldüğü belirtilmiş ve PVA içeriğinde melatonin varlığı kanıtlanmıştır (Mirmajidi vd., 2021).

Kemik doku mühendisliği alanında gerçekleştirilen deneysel çalışmalar genellikle materyal üretimini ve karakterizasyonunu hedeflemektedir. Bununla birlikte üretilen materyallerin in vitro ve in vivo deneyler ile etkinliğinin gösterildiği çalışmaların da sayısı gün geçtikçe artmaktadır. Böylelikle üretilen materyalin karakterizasyonu yapılmakta ve öncelikle in vitro ortamda etkinliği belirlenerek kemik rejenerasyonunu en iyi şekilde sağlayabilen bir bileşim geliştirilmesi amaçlanmaktadır. Kemik rejenerasyonunun hızlı ve erken bir şekilde sağlanması halihazırda bu alanda yapılan her deneysel çalışmanın öncelikli amacıdır (Chimedtseren vd., 2023; da Silva vd., 2024).

İnsanlara kritik boyutlu kemik defektleri, kendiliğinden iyileşemeyen ve yeni kemik gelişiminin sağlanması için bir greft materyaline ihtiyaç duyulan türden kemik kayıplarını içerir. Deney hayvanlarında bu defekt modeli tibia, femur, maksillofasiyal ve kalvaryum olmak üzere dört farklı sayıda model kullanılarak oluşturulur (Güven vd., 2022; Ren vd., 2022; Souza vd., 2018; Van Oirschot vd., 2023). Bunlar arasında en sık kullanılan yöntem kritik kalvaryal defekt modelidir. Bu model (a) kemik rejenerasyonunun takibinin daha kolay izlenebilir olması (b) immobilizasyona gerek olmaması (c) uygulanan materyalin stabilizasyon gerektirmemesi nedeniyle deneysel çalışmalarda en çok tercih edilen modeldir (da Silva vd., 2024; Vyas vd., 2024). Kritik kalvaryal defekt modeli çoğunlukla rodentlerde uygulanmaktadır (Brum vd., 2020; Fazeli vd., 2023; Lee vd., 2018).

Kritik defektler sıçanlarda 6 cm ve üzeri; farelerde ise 5 cm ve üzeri ölçülerde genellikle bilateral veya tekli daire şeklinde oluşturularak kullanılır (Cooper vd., 2010). Çalışmamızda sıçanlar kritik kalvaryal kemik defekti modeli kullanıldı. Bu amaçla sıçan kalvaryumunda bilateral 6 mm çapında 2 adet defekt alanı oluşturuldu. Defekt alanlarından

Çıkarılan sağ kalvaryal kemik parçası sol kalvaryal defekt alanına, sol kalvaryal kemik parçası ise sağ kalvaryal defekt alanına yerleştirilerek otogreft tamiri yapıldı. Daha sonra defekt alanlarının zerine PLGA/MEL ve PLGA nanolifleri yerleştirilerek otogreftlenen alanların ana kemik ile hızlı ve etkin kaynaması hedeflendi.

Kritik boyutlu defektlerin cerrahi tamirinin en önemli komplikasyonlarından bir tanesi kemik fragmanlarının, müdahaleye rağmen, birbiri ile kaynaşmamasıdır. Böyle durumlarda kırık uçları arasındaki mesafe oldukça geniş olduğundan iki kemik karşılıklı olarak bir araya gelemes. Bu türden defektlerin tamiri için genellikle greft uygulaması yapılır. Bu uygulamalar arasında günümüzde altın standart bir metot olan otogreft uygulaması en sık kullanılan yöntemdir (Baldwin vd., 2019). Bununla birlikte otogreftin ana kemik ile kaynaması her zaman gerçekleşmez, geç veya yanlış kaynama gerçekleşebilir. Bu durumlar arasında otogreftte veya hastaya bağlı faktörler gösterilebilir. Bunlar;

- (a) vaskülerize olmayan greft elde edilmesi
- (b) yetersiz greft alınması
- (c) hastaya bağlı inflamatuvar veya enfektif süreçlerin defekt alanında yetersiz iyileşmeye sebep olması gibi nedenlerdir.

Bununla birlikte otogreftlenen alanda bazı hücresel moleküllerin (VEGF, TRAP, COL1) ařırđ veya düşük düzeyde ekspresyonundan dolayı da otogreftin ana kemik ile kaynaması gecikebilir, kaynamama veya yanlış kaynama gerçekleşebilir (Calori vd., 2017). Bu nedenlerle otogreft ile ana kemiğin kaynamasını modüle edecek uygulamalara ihtiyaç vardır. Bun amaçla kemik kaynama bölgesinde hücresel olayların düzenlenmesini sağlayan aynı zamanda osteoindüktif etkiler ile iyileşmeyi hızlandıran bir materyal üretimi önemli bir araştırma konusudur (Amini vd., 2012). Çalışmamızda da kemik defektlerinin hızlı ve etkili kaynaşmasını sağlamak üzere, otogreftlenen alanların üzerine yerleştirilen PLGA/MEL nanoliflerinin erken dönemde (7., 14. ve 28. günlerde) etkileri incelenmiştir.

Yeni kemik oluşumu geniş kemik defektlerinin rejenerasyon bulgularından en önemlisidir. Yeni kemik oluşumu için dengeli bir osteoblastik ve osteoklastik aktivite gereklidir. Bu süreçte osteoblastlardan ALP, BMP2, Runx2, VEGF ve osteoklastlardan da TRAP sentezlenir (Buckwalter ve Hunziker, 1996). Bunlardan ALP, BMP2, Runx2, VEGF yeni kemik oluşumunu sağlarken, TRAP enzimi ise yeni kemik oluşumu için erken dönemde oluşan kallusun rezorpsiyonunu gerçekleştirir. Böylelikle yeni kompakt lamellar kemik oluşumu gerçekleştirilir.

Çalışmamızda yeni kemik oluşum alanları histopatolojik olarak H-E boyama yöntemi ile belirlendi. Elde edilen veriler karşılaştırıldığında PLGA ve PLGA/MEL gruplarında 7., 14. ve 28. günlerde Otograft grubuna göre anlamlı düzeyde daha yüksek bir yeni kemik oluşumu gözlemlendi ($p < 0,05$). PLGA/MEL grubunda 7. ve 14. günlerde PLGA grubuna göre daha yüksek düzeyde yeni kemik oluşumu gözlenmekle beraber ($p < 0,05$), 28. günde bu iki grup arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p > 0,05$). Yapılan korelasyon analiz sonuçlarına göre kemik formasyonu ile anjiyogenezis, ALP, BMP2 ve Runx2 immün reaktiviteleri arasında anlamlı pozitif korelasyonlar belirlendi ($p < 0,05$; Şekil 30). Elde edilen sonuçlar kemik kaynama bölgesine kontrollü salım şeklinde melatonin uygulamasının 7. günde bile yeni kemik oluşumunu uyardığını göstermektedir. Melatonin aynı etkisini 14. günde de göstermiştir. Bu sonuçların melatoninin osteoindüktif etkilerine bağlı ortaya çıktığını düşünmekteyiz. Diğer taraftan yalnız başına PLGA uygulanan grupta daha iyi oranda yeni kemik oluştuğu görülmüştür. Bunun nedeni olarak PLGA'nın bir iskele oluşturma özelliği ile kemik ECM'sini taklit edebilme yeteneğine sahip olması söylenebilir. Bunun yanında PLGA bileşenlerinin (LA ve GA) biyobozunma sonrasında parçalanarak hücreler tarafından kullanılabilen bir enerji kaynağı haline geldiği bildirilmiştir (Lu vd., 2023). Bu nedenle PLGA'nın bir enerji kaynağı olarak osteoblastlar için enerji sağlamanın da yeni kemik oluşumunu artırması mümkündür.

DeneySEL çalışmalarda uygulanan biyomateryalin yeni kemik oluşumu üzerine etkileri kullanılan materyalin bileşimi ve içerdiği ajanın etkinliğine göre farklı sürelerde ortaya çıkmaktadır. Bu çalışmalardan bir tanesinde melatonin (200 mg) yüklenen ipek nanoliflerin sıçanlarda kritik kalvaryal defekt modelinde yeni kemik oluşumu üzerine

etkileri araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre 8. haftada melatonin yüklü ipek nanoliflerin kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek oranda yeni kemik oluşumu sağladığı görülmüştür (Deng vd., 2024). Çinko ve galyum içeren hidroksiapatit nanopartiküllerine yüklenen melatoninin tavşanlarda oluşturulan kritik kalvaryal defekt alanında 14. günde yeni kemik oluşumunda anlamlı düzeyde artış sağladığı bildirilmiştir (Shokri vd., 2024). Başka bir çalışmada ise melatoninli biyoaktif cam iskeleleri yaşlı sıçanlarda oluşturulan 3 mm'lik femoral defektlerde yeni kemik oluşumu üzerine etkileri araştırılmıştır. Bu çalışmada, materyalin implantasyonu sonrası 6. haftada femur dokuları alınarak H-E boyama yapılmıştır. H-E boyama sonuçlarına göre melatoninli biyoaktif cam iskeleleri 6. haftada yeni kemik oluşumunu kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde artırdığı belirtilmiştir (Xiong vd., 2024). Bu çalışma sonuçlarından da anlaşılacağı üzere melatonin yeni kemik oluşumunu yüksek dozda kontrollü salım ile sağlayabildiği ve en erken 3. haftadan itibaren yeni kemik oluşumunu indüklediği görülmektedir.

Melatoninin yeni kemik oluşumu üzerine etkileri polimer temelli biyomateryaller ile kontrollü salım çalışmalarında da ortaya koyulmuştur. Bu çalışmalardan birinde üç boyutlu biyoyazılım ile üretilen PCL ve beta trikalsiyum fosfat bileşimine yüklenen melatonin (40 mg/kg)'den oluşan iskelelerinin farelerde oluşturulan kalvaryal defekt modelinde 4. haftada yeni kemik oluşumunu başlattığı, 8. haftada ise 4. haftaya göre anlamlı düzeyde yüksek yeni kemik oluşumu sağladığı görülmüştür (Chen vd., 2024). Kritik kalvaryal defektler üzerine PLA/PCL kaplı metformin ve melatonin yüklenen jelatin nanotaşıyıcılarının etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada ise, biyomateryal uygulamasından 8 hafta sonra kalvaryal dokular alınarak yeni kemik oluşumu düzeyleri incelenmiştir. Bu çalışmada materyalin yeni kemik oluşumu üzerine etkileri otogreft ve bir materyal uygulanmayan kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır. Elde edilen veriler biyomateryalin 8. haftada otogreftlenen defekt alanındakine benzer bir yeni kemik oluşumu sağladığı ve kontrol grubundan ise daha yüksek düzeyde bir yeni kemik oluşumu sağladığı görülmüştür (Shahrezaee vd., 2018).

Çalışmamızda ise melatonin yüklü nanoliflerin yeni kemik oluşumunu ve kaynamayı 7. günden itibaren aktive ettiği görülmüştür. Buna ek olarak bu çalışmalarda biyomateryaller defekt alanında iskele olarak kullanılmıştır. Çalışmamızda literatürden farklı

olarak melatonin içeren nanolifler defekt alanında primer bir iskele olarak değil otogreftlenen defekt alanının ana kemik ile kaynaşmasını sağlamak üzere kullanılmıştır.

Taşıyıcı biyomateryaller ile birden çok farklı molekülün birlikte kullanıldığı ve yeni kemik oluşumunun incelendiği çalışmalar da bulunmaktadır. Bunlardan bir tanesinde tavşanlarda oluşturulan 20 mm'lik radius defektlerinde BMP2 içeren PLGA-jelatin mikropartiküllerinin yeni kemik oluşumu üzerine etkileri incelenmiştir. BMP2 içeren PLGA-jelatin mikropartiküllerinin 12. haftada osteoindüktif etkiler göstererek yeni kemik oluşumu sağladığı belirtilmiştir (Xia vd., 2019). VEGF içeren PLGA mikrobaloncuklarının kritik kalvaryal defektlerde yeni kemik oluşumu üzerine etkilerinin incelendiği bir çalışmada ise, 8. haftada uygulanan biyomateryalin yeni kemik oluşumu sağladığı belirtilerek anjiyogenezis stimülasyonunun yeni kemik oluşumundaki önemi vurgulanmıştır (Gong vd., 2019). Kurkumin içeren PLGA nanolif uygulamasının yeni kemik oluşumu üzerine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada sıçanlarda uygulanan femur defektlerinin rejenerasyonunu 6. haftada yeni kemik oluşumunu artırarak sağladığı bildirilmiştir (Bose vd., 2018). Kuersetin içeren magnezyum oksit-PLGA nanoliflerinin sıçanlarda oluşturulan kalvaryal defektlerin iyileşmesi üzerine etkilerinin incelendiği bir çalışmada ise kuersetin ve magnezyum oksit içeren PLGA nanoliflerinin 8. haftada osteoindüktif etkiler göstererek yeni kemik oluşumu sağladığı belirtilmiştir (He vd., 2022). Bu çalışmalardan elde edilen sonuçlara göre farklı biyomateryaller ile kontrollü salımı yapılan birçok molekülün olumlu osteoindüktif ve osteokondüktif özelliklerine rağmen, yeni kemik oluşumunu erken dönemde stimüle edememektedir. Bu durumu birçok molekülün tek bir özel sinyal yolağı üzerine etkili olmasından kaynaklandığı söylenebilir. Bu açıdan bakıldığında birden fazla sinyal yolağını aktive eden, çok yönlü kompleks osteoindüktif ajanların kullanımı erken dönemde yeni kemik oluşumunu daha etkili bir şekilde sağlayabilir. Melatoninin kemik dokuda osteoindüktif birçok yolağın aktivasyonunu tek başına sağladığı bilinmektedir. Çalışmamızın sonuçları da bunu desteklemektedir ve melatoninin yeni kemik oluşumunu erken dönemde etkili bir şekilde sağladığı belirlenmiştir.

Kritik boyuttaki kemik defektlerinin iyileşme sürecinde defekt alanında yoğun kolajen ve mineral birikimi gerçekleşir. ALP bu iki olaydan sorumlu esas enzimdir ve

osteoblastik aktivite sonucunda sentezlenir ve salımı artar (Kuru vd., 1999). Bununla birlikte yeni kemik oluşumu için osteoklastik aktivite de gereklidir. Osteoklastik aktivasyon sonucu sentezlenen TRAP enzimi kolajenize alanda meydana gelen yumuşak kallusu rezorbe etmekten sorumludur. TRAP enziminin bu etkisiyle yeni kompakt kemik oluşumu sağlanır (Blumer vd., 2012). Çalışmamızda PLGA/MEL grubunda Otogreft grubu ile karşılaştırıldığında tüm günlerde yoğun bir kolajen ve mineral birikimi gözlemlendi. PLGA/MEL grubunda PLGA grubuna göre yine tüm gruplarda kolajen birikimi ve mineralizasyon daha yoğun izlendi ($p<0,001$; $p<0,05$). Buna ek olarak çalışmamızda ALP ve TRAP pozitif hücre yoğunluğunun belirlenmesi için yapılan immünohistokimya analizi verilerine göre PLGA/MEL grubunda tüm günlerde diğer gruplara göre daha yüksek ALP ($p<0,05$, $p<0,0001$) ve TRAP ($p<0,001$; $p<0,001$) pozitif hücre yoğunluğu belirlendi. Kolajen ve mineral yoğunluğu arasında ve kolajen birikimi-ALP, kolajen birikimi-TRAP, mineralizasyon-ALP ve mineralizasyon-TRAP bulguları arasında tüm günlerde anlamlı düzeyde pozitif bir korelasyon belirlendi ($p<0,05$; Şekil 29).

Kemik rejenerasyonu düzeyinin belirlenmesi için kolajen oluşumu ve ALP düzeyleri en sık kullanılan parametrelerdendir. Defekt alanında kolajen oluşumu ALP düzeyleri gen ekspresyonlarındaki değişimler ile veya immünohistokimyasal olarak değerlendirilebilir (Vimalraj, 2020). Tibia kırıklarının kaynaması üzerine melatonin (30 mg/kg; i.p.) uygulamasının etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada 28. günde bir sıçanda kısmi yeni kemik oluşumu görülmüş ve melatonin uygulanan gruplarda kolajen birikiminin anlamlı düzeyde arttığı bildirilmiştir (Hastalık vd., 2010). Melatoninin 5 hafta süreyle intratekal uygulandığı (5 mg/kg) bir çalışmada, farelerde MSC diferansiyasyonunun ve BMP9 aktivasyonunun arttığı görülmüştür. Bununla birlikte 5. haftada yapılan ALP enzim aktivitesi ölçümlerinde melatonin uygulanan grupta ALP enzim aktivitesinde anlamlı düzeyde artış gözlenmiştir (Jiang vd., 2019). Belirtilen çalışmalarda aynı zamanda melatoninin kemik dokuda antioksidan ve antienflamatuvar etkileri de incelenmiş ve melatoninin kemik iyileştirici etkilerinin bu özelliklerine bağlı olabileceği işeri sürülmüştür. Her iki çalışmada melatonin paranteral yolla uygulanmıştır. Görüldüğü üzere paranteral yolla melatonin uygulamasında kolajen ve ALP artırıcı etkiler yaklaşık 28. günde ortaya çıkmıştır. Bizim çalışmamızda ise bu etkilerin 7. günde ortaya çıktığı görülmektedir.

Erken dönemde kolajen birikiminin ve mineralizasyonun hedeflendiği ve melatoninin kontrollü salımının yapıldığı çalışmalarda birçok farklı taşıyıcı materyal ve farklı dozlarda melatonin kullanılarak etkileri incelenmiştir. Bir çalışmada melatonin yüklü ipek nanolifleri ile kontrollü melatonin (200 mg) salımının 21. günde 5 mm'lik kalvaryal defekt oluşturulan sıçanlarda ALP, COL1 ekspresyonlarını ve mineralizasyon düzeyini artırarak osteoindüktif etkiler gösterdiği belirtilmiştir (Deng vd., 2024). Melatoninin kontrollü salımının yapıldığı melatonin içeren PCL mikropartiküllerinin kalvaryum defektleri modelinde 4. haftada defekt alanında mineral yoğunluğunu ve kolajen birikimini anlamlı düzeyde arttırdığı bildirilmiştir (Gurler vd., 2019). Diyabetik sıçanlarda 4 mm'lik kalvaryal defekt alanlarına yerleştirilen melatonin içeren PLGA nanopartiküllerinin 8. haftada ALP ve COL1 gen ekspresyonlarını kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde artırdığı gözlenmiştir (Chen vd., 2024). Sıçanlarda oluşturulan distal femur kırığı modelinde, melatoninli (5 mg ve 50 mg) sünger benzeri nanoliflerin 8. haftada COL1 ekspresyonlarını artırarak kolajen birikimini artırdığı belirlenmiştir. Bu çalışmada 50 mg melatonin yüklenen nanoliflerin COL1 ekspresyonlarını 5 mg melatonin yüklenen nanolif grubundan daha yüksek oranda artırdığı bildirilmiştir (Lv vd., 2024). PLA/Kitosan nanopartikülleri ile melatoninin kontrollü salımının yapıldığı bir çalışmada ise farelerde oluşturulan osteoporotik femur kırıklarının iyileşmesi üzerine etkileri araştırılmıştır. Bu çalışmada 4. haftada elde edilen dokularda melatoninin 100 mmol eklendiği PLA/Kitosan nanopartiküllerinin kolajen birikimi ve mineralizasyonu artırdığı görülmüştür (Zhang vd., 2024). Yukarıdaki çalışmalar melatoninli matriksler ile defekt alanında iskele oluşturmaya yönelik ve uzun süreli salımların yapıldığı çalışmalardır. Tamamen boş bir kemik alanındaki iyileşme ile iki kemiğin birbiri ile karşılıklı bulunduğu defekt alanındaki iyileşme süresinin farklı olması beklenir. Bununla birlikte her iki durumda da iyileşme ana kemikte mutlaka başlayacaktır. Bu nedenle hem bizim çalışmamızda hem de yukarıdaki çalışmada ana kemikten başlayan iyileşme alanları ve yeni kemik oluşum alanları değerlendirilmiştir. Elde ettiğimiz veriler melatonin uygulamasının daha 7. günde bile ana kemik alanından kaynama bölgesine doğru kolajen oluşumunu anlamlı düzeyde başlattığını göstermiştir. Dolayısı ile melatoninin kolajen oluşumunu defekt alanının büyüklüğünden bağımsız olarak artırabildiğini söyleyebiliriz. Benzer bulgular ALP için de gözlemlendiğinden dolayı aynı yorumlar ALP açısından da yapılabilir.

Kemik defektlerinin iyileşmesi ve kaynaşması için defekt alanında oluşan yumuşak kallus formasyonunun yerini yeni kompakt kemiğin alması gerekir. Bu yolakta anahtar rol oynayan esas faktör fonksiyonel osteoklastlardan salınan TRAP enzimidir. TRAP enzimi kaynama bölgesinde oluşan yumuşak kallusu tamamen rezorbe ettikten sonra bunun yerini yeni kompakt kemik doldurur ve ana kemik ile otogreft arasında kaynama gerçekleşir (Blumer vd., 2012; Hayman, 2008).

Melatoninin hızlı kompakt gelişimi üzerine etkilerini osteoklastogenezisi inhibe ederek gösterdiği bilinmektedir (Macdonald vd., 2021). Bu fonksiyonunu MT2 reseptörü aracılığı ile osteoblastlardan RANKL inhibitörü olan OPG sentezini indükleyerek gerçekleştirir (Tian vd., 2020). Yapılan çalışmalarda melatoninin gerek parantral gerekse kontrollü salım çalışmalarının çoğunda osteoklastogenezisi inhibe ettiği ve TRAP enzim seviyelerini azalttığı belirlenmiştir (Ballanti vd., 1997; Macdonald vd., 2021). Çalışmamızda PLGA/MEL ve PLGA gruplarında TRAP pozitif hücre sayılarının Otogreft grubuna göre fazla olması PLGA/MEL grubunda melatoninin yeni kemik oluşumunu regüle ederek, kallus rezorpsiyonunun devamlılığını sağladığı düşünüldü.

Deneysel çalışmalar melatoninin parantral uygulamasının kemik rejenerasyonu üzerine etkilerini osteogenetik belirteçler ile de ortaya koymuştur. Bu çalışmalardan bir tanesinde farelerde uygulanan femur kırık modelinde 5 hafta süre ile günlük melatonin (i.p) uygulamasının 5. haftada TRAP enzim aktivitesini baskıladığı ve hızlı bir şekilde yeni kemik oluşumu sağladığı belirtilmiştir (Histing vd., 2012). Zebra balıklarında oluşturulan kemik kırık modelinde defekt alanına lokal melatonin uygulaması yapılarak, defekt alanında TRAP pozitif hücre sayısı incelenmiştir. Buna göre 2. günde TRAP pozitif hücre yoğunluğunda anlamlı düzeyde azalma görülmüştür (Kobayashi-Sun vd., 2020).

TRAP enzim aktivitesi çoğunlukla deneysel osteoporotik hayvan modelleri çalışmalarında incelenmiştir. Bunun nedeni olarak TRAP aktivitesinin osteoporozda önemli ölçüde artış göstermesi söylenebilir (Solberg vd., 2014). Overektomi operasyonunu takiben bir ay süre ile osteoporoz gelişimi beklenir ve kemik mineral dansitesi ve kemik yoğunluğu

ölçülerek osteoporoz gelişimi belirlenir (Yousefzadeh vd., 2020). Osteoporoz gelişiminden sonra kemik rejenerasyonunun incelendiği çalışmalarda kırık modeli oluşturulur. Osteoporotik kırıkların oluşturulduğu hayvan modellerinde serum ve defekt alanında TRAP enzim seviyeleri yüksek bulunduğundan, kırıkların iyileşmesi üzerine uygulanan ajanların etkinliği bu türden kırık modellerinde TRAP enzim aktivitesinden yararlanılarak belirlenir (Mederle vd., 2018).

Melatoninin TRAP enzim aktivitesi üzerine etkilerinin araştırıldığı bir osteoporotik kırık modeli çalışmasında, oral melatonin uygulamasının (25 µg), 60. günde kemik mineral dansitesini ve kemik yoğunluğunu artırdığı görülmüştür (Ladizesky vd., 2001). Başka bir çalışmada ise 12 hafta süreyle valproik asit ve melatoninin 30 mg/kg uygulandığı osteoporotik sıçan modelinde, melatoninin yalnız başına uygulandığı grupta osteoklastik aktivitenin anlamlı düzeyde azaldığı ve TRAP enzim aktivitesinin baskılandığı görülmüştür (Tao vd., 2024).

Melatoninin kontrollü salım yapıldığı çalışmalarda da osteoporotik hayvan modelleri kullanılarak TRAP enzim aktivitesi araştırılmıştır. Bu çalışmalardan birinde melatonin içeren magnezyum katkılı PLGA nanoliflerinin uygulandığı osteoporotik tibia modelinde implante edilen nanoliflerin 1. ayda TRAP enzim aktivitesini baskılayarak kemik mineral dansitesini ve kemik mineral yoğunluğunu artırdığı ve tibia defektlerinde kontrol grubuna göre daha iyi bir iyileşme sağladığı belirtilmiştir (Liu vd., 2022). Melatonin yüklenen jelatin metakrilol-dopamin lipozomlarının osteoporotik femur kırıklarının titanyum implant ile tamiri sonrasında, 3. ayda implantın kaynaşmasını sağladığı belirtilmiştir. Bu çalışmada melatoninin osteoporoza bağlı kemik mineral dansitesinin ve yoğunluğunun azalmasına rağmen implant kaynaşmasını hızlandırdığı belirtilmiştir (Xiao vd., 2020). Bu çalışmalarda TRAP enzim aktivitesi incelenmemiş olması ile birlikte melatoninin osteoklast diferansiyasyonunu baskıladığı anlaşılmaktadır.

In vitro çalışmalarda TRAP enzim aktivitesine baktığımızda, Jarrar vd., (2021)'nin melatonin ve BMP2 içeren iskelenin RAW 264.7 hücrelerindeki osteoklastogenesis inhibisyonu üzerine etkileri araştırılmıştır. In vitro 5. günde sadece melatonin içeren grupta TRAP pozitif hücre yoğunluğunun arttığı belirtilmiştir. Melatonin ve BMP2 'nin birlikte uygulandığı grupta da benzer sonuçlar elde edilmiştir. Sadece BMP2 içeren grupta ise 8. günde anlamlı düşüş görülmüştür. Bu sonuçlardan melatoninin erken dönemde osteoklastogenesis inhibisyonu yaptığı, osteoblast/osteoklast aktivitesini düzenleyen bir modölatör olduğu görülmektedir (Jarrar vd., 2021).

Çalışmamızda osteoporotik kırık modeli veya bir patoloji modeli uygulanmadan melatoninin kontrollü salımının kemik defektlerinin iyileşmesi ve kaynaşması üzerine etkileri incelenmiştir. Buna ek olarak TRAP enzim aktivitesi de melatoninin osteoklastogenesis üzerine etkilerinin belirlenmesi amacıyla değerlendirilmiştir. TRAP enzim aktivitesinin yeni kemik oluşumunda önemli bir görevi bulunduğundan, melatonin uygulamasının bu süreçteki modölatör etkileri değerlendirilmiştir.

Kemik kırıklarında kemik dokudaki kanlanma vasküler yapının hasarlanmasından dolayı olumsuz etkilenmektedir. Yoğun vaskülarize bir yapı olan kemik dokusunda kırıkları takiben anjiyogenezisin aktivasyonu kemik iyileşmesinin önemli bir basamağıdır. Deneysel çalışmalarda yeni damar oluşumu histopatolojik olarak ve moleküler düzeyde incelenmektedir. Bu amaçla yaygın olarak kullanılan histopatolojik inceleme yöntemi PAS boyama ve moleküler düzeyde ise VEGF ekspresyonlarının incelenmesidir. Çalışmamızda PLGA/MEL nanoliflerinin yeni damar oluşumu üzerine etkileri 7., 14. ve 28. günlerde PAS boyama ve VEGF immün reaktivitesi ile belirlenmiştir. Elde ettiğimiz PAS boyama sonuçlarına göre PLGA/MEL nanoliflerinin kaynama bölgesinde Otogreft grubuna göre daha yüksek oranda yeni damar oluşumu sağladığı belirlenmiştir ($p<0,001$; $p<0,0001$). Bununla birlikte 14. gün bulgularına göre yeni damar oluşumu düzeyinin PLGA/MEL grubunda PLGA grubundan anlamlı olarak yüksek olduğu görüldü ($p<0,05$). Bu iki grup arasında 7. ve 28. günlerin PAS boyama verilerine göre anlamlı bir fark saptanmadı ($p>0,05$).

VEGF pozitif hücre sayılarının belirlendiği immünohistokimya analizine göre 7. ve 14. günlerde PLGA/MEL grubunda VEGF pozitif hücrelerin sayısının Ototograft grubuna göre anlamlı olarak yüksekti ($p<0,05$, $p<0,001$). Buna ek olarak PLGA/MEL grubunda 28. günde VEGF pozitif hücre sayısının Ototograft grubuna göre anlamlı düzeyde daha düşük seviyede olduğu görüldü ($p<0,05$). Bu durumu kompakt kemik oluşukça vasküler yapının tamamlanması ve dokunun artık VEGF aktivitesine ihtiyacı kalmaması ile açıklamak mümkündür (Zhou vd., 2025). Çalışmamızda da 28. günde yeterli vaskülarizasyon sağlandığı ve bu nedenle VEGF seviyelerinin azaldığı düşünöldü. VEGF seviyelerinin azalmasının bir başka nedeni olarak melatoninin literatürdeki birçok çalışmada belirtilenin aksine VEGF indükleyicisi değil VEGF modölatörü olması gösterilmektedir (Dai vd., 2008; Haddadi vd., 2009). Melatoninin VEGF ekspresyonu üzerine etkilerinin araştırıldığı çalışmalar da bunu desteklemektedir (Dai vd., 2008; Vimalraj vd., 2020). Buna ek olarak VEGF'in yeni kemik oluşumu sağlamak için vaskülarizasyon dışında osteogenezis sağlayan moleküllerin ekspresyonunu indüklediği bildirilmiştir (Hu ve Olsen, 2016). Bunlar arasında yeni kemik yapımından önce ortamdaki kallusun rezorpsiyonunu sağlayan TRAP enzimi de bulunmaktadır. VEGF seviyelerinin aşırı artışı TRAP enziminin de aktivasyonunu artıracğından yeni oluşun kemik de rezorbe edilebilir (Helmrich vd., 2013). Tüm bunlara ek olarak aşırı VEGF ekspresyonu kaynamamanın da nedeni olarak gösterilmiştir (Garcia vd., 2012). Bu nedenlerle melatoninin 28. günde VEGF seviyelerinde bir azalmaya neden olduğu söylenebilir.

Kemik kaynaması ve iyileşmesi üzerine yapılan kontrollü salım çalışmalarında melatoninin yeni damar oluşumu ve VEGF ekspresyonları üzerine etkilerinin araştırıldığı çalışmalar da bulunmaktadır. Sıçanlarda oluşturulan femoral defektlerin vaskülarizasyon üzerine melatonin yüklü sünger benzeri nanoliflerinin etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, 8. haftada yapılan analizlerde yeni damar oluşumu ve VEGF ekspresyonlarında kontrol grubuna göre yüksek düzeyde artış belirlenmiştir. Bu çalışmada femoral kondilde 3 mm çapında ve 2 mm derinliğinde daire şeklinde bir defekt oluşturulmuştur. VEGF ekspresyonlarının 4. haftadaki seviyelerinin 8. haftadaki seviyelerinden anlamlı düzeyde yüksek olduğu da bildirilmiştir (Lv vd., 2024). Bir çalışmada diyabetik sıçanlarda melatonin içeren sodyum/aljinat-PLGA nanoliflerinin farelerde oluşturulan kalvaryal defektin iyileşmesi üzerine etkileri incelenmiştir. Bu çalışmada 4. haftadaki VEGF ekspresyonları ve

yeni damar oluşumu seviyelerinin 8. haftadakine oranla daha yüksek olduğu görüldü. Buna ek olarak 8. haftada VEGF ekspresyonları kontrol ve materyal grubuna göre anlamlı düzeyde azalmıştır (Chen vd., 2024).

Poröz bioaktif cam uygulanan sıçanlarda kalvaryal defekt modelinde, osteoindüktif etkilerin araştırıldığı bir çalışmada, 4. haftada yeni damar oluşum seviyesinin materyal uygulanan grupta anlamlı düzeyde arttığı görülmüştür. Biyoaktif camın yeni damar oluşumu üzerine doğrudan bir etkisi olmasa da osteoblast aktivitesini artırarak VEGF sentezini dolaylı olarak indüklediği belirtilmiştir (Leu vd., 2008). D vitamini içeren PLGA nanoliflerinin BMP2 ve VEGF eksprese eden MSC ile birlikte kullanımının sıçanlarda oluşturulan kalvaryal defektlerin iyileşmesi üzerine etkilerinin incelendiği bir çalışmada ise 8. haftada PLGA'nın yalnız uygulandığı grupta ve D vitamini içeren PLGA grubunda VEGF ekspresyonlarının seviyesinin kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde artış görülmüştür (Park vd., 2024). Çalışmamız VEGF pozitif hücrelerinin yoğunluğunu ve yeni damar oluşumunu kaynama bölgesinde incelenmiştir. Elde ettiğimiz bulgulara göre melatoninli PLGA nanolifleri literatüre benzer şekilde fakat (a) erken düzeyde (7. ve 14. günlerde) VEGF pozitif hücre yoğunluğunu artırmış, (b) yeni damar oluşumu tüm günlerde devam etmiş, (c) yeni damar oluşumunun ve yeni kemik oluşumunun hızlı olduğu dönemlerde VEGF ekspresyonlarının artış gösterdiği (d) geç dönemde (28. gün) ise azaldığı görülmüştür. VEGF ve TRAP arasında korelasyon verilerine bakıldığında 7. günde ($p=0,143$) anlamlı bir korelasyon bulunmazken 14. günde pozitif ($p=0,016$) olarak belirlenen korelasyon değeri 28. günde negatif ($p=0,0167$) olarak belirlenmiştir. Yanı sıra TRAP ile yeni damar oluşum verileri arasında 7., 14. e 28. günlerin tamamında pozitif olmak üzere anlamlı korelasyonlar belirlenmiştir (sırası ile $p=0,012$; $p=0,001$; $p=0,012$).

VEGF pozitif hücre sayıları, yeni damar oluşum değerleri ile TRAP enzim aktivitesine ait veriler ayrı ayrı ve birlikte değerlendirildiğinde aşağıdaki sonuçlara ulaşılabilir;

i) Yeni damar oluşumunu uyaran VEGF 7. ve 14. günde otogreft grubunda daha düşükken 28. günde otogreft grubunda daha yüksek bulundu. Bununla birlikte otogreft grubunda VEGF pozitif hücre sayılarının tüm günlerde yaklaşık olarak 100-120 arasında

değiştii gözlenirken, melatoninli biyomateryal uygulanan grupta 140 ve 180'e ulaşan bu değerin 100 seviyelerine indiğı görölmektedir. VEGF değeriindeki bu değışimin melatonin uygulamasının 7. ve 14. günlerde VEGF üretimini hızla artırıcı bir etki göstermesinden ve yeni kemik oluşumu belirli bir düzeye ulaşınca bu etkisinin daha sınırlı ortaya çıkmasından kaynaklandığını düşündürmektedir. Literatür bildirimlerinde melatoninin bir VEGF modölatörü olduğı belirtildiğinden melatonin kemik iyileşmesinde de bu etkiyi gösterdiği söylenebilir.

ii) Yeni damar oluşumu ve VEGF arasında 28. günde belirlenen negatif korelasyonun nedeni olarak VEGF düzeylerindeki azalmanın henüz damar oluşumunu baskılayıcı bir düzeye inmediğini düşündürmektedir. Nitekim kontrol grubunda 28. günde VEGF pozitif hücre sayısı 120 iken melatonin grubunda bu değeri 100 olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlar yeni damar oluşumunun halen devam ettiğini göstermektedir.

iii) Çalışmamızda TRAP enzim aktivitesi 28. güne kadar belirlenmiştir ve tüm günlerde anlamlı düzeyde yüksek kaldığı görölmüştür. TRAP enzim aktivitesini kıyaslayacak başka bir parametre incelenmemiştir. Literatüre bakıldığında TRAP enzim aktivitesinin yeni kemik oluşumunun hızlandığı ileri dönemlerde baskılandığı görölmüştür. Çalışmamızda hızlı kaynama hedeflendiğinden son doku örnekleri 28. günde alınmıştır. TRAP enzim aktiviteleri kontrol grubu dahil tüm gruplarda ve sürekli olarak artış göstermiştir. Bununla birlikte 28. günde TRAP aktivitesindeki artışların halen anlamlı olmakla birlikte daha düşük düzeyde kaldığı görölmektedir. Aynı gün yeni kemik oluşum verilerine bakıldığında melatonin ve kontrol grubu verilerinin birbirlerine yaklaştığı görölmüştür. Bu durum TRAP enzim aktivitesindeki artışların gittikçe azalacağını ve kontrol değerlerine yaklaştacağını düşündürmektedir.

Kemik kırıklarının rejenerasyonunda olduğı gibi kaynaşmasında MSC'lerin diferansiyasyonu ve proliferasyonu oldukça önemlidir. MSC'lerden BMP2, Runx2, OCN genleri eksprese edilerek osteogenezis başlatılır. Böylelikle MSC'ler osteoblastların osteojenik diferansiyasyonunun ve mineralizasyon yeteneğinin artmasını sağlar ve defekt alanında yeni kemik oluşumunu başlatır (Tsuji vd., 2006). Bu nedenle yeni kemik oluşum alanında BMP2 veya Runx2 artışı osteoblast matürasyonunun bir göstergesi olarak kullanılır.

Melatonin MSC'lerin bu aktivasyonunu BMP, ERK, Wnt ve PKA/PKC sinyal yollarını uyarak sağlar.

BMP2 ve BMP7 kemik dokuda en çok eksprese edilen BMP ailesinin üyeleridir. Kemik kırıklarını takiben erken dönemde BMP2 seviyeleri artış gösterirken, geç dönemde BMP7 aktivitesinde yükselme gözlenir (Pinar vd., 2010). Çalışmamızda erken dönemde kemik iyileşmesi ve kaynaması hedeflediğimiz için kaynama bölgesinde BMP2 seviyelerinin belirlenmesine karar verilmiştir. Bu amaçla BMP2 pozitif hücre yoğunluğu tüm gruplarda immünohistokimyasal analiz ile belirlenmiştir. Elde ettiğimiz bulgulara göre PLGA/MEL grubunda tüm günlerde BMP2 pozitif hücre yoğunluğunun Ototograft grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek olduğu belirlendi ($p<0,001$; $p<0,001$). PLGA grubunda ise 7. ve 28. günlerde Ototograft grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek BMP2 pozitif hücre yoğunluğu olduğu gözlemlendi ($p<0,05$). Sonuçlar melatoninin özellikle 7. günde BMP2 pozitif hücre yoğunluğunda Ototograft grubuna göre 2 kat daha fazla bir artış sağladığını göstermektedir.

Melatoninin paranteral uygulandığı bir çalışmada osteoporotik farelerde 50 mg/kg melatonin uygulamasının femur defektlerinin iyileşme alanında BMP2 seviyelerini 12. haftada kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde artırdığı belirlenmiştir (Huang vd., 2021). Anterior krusiyat ligament defekt modeli uygulanan sıçanlarda günde 2 kere 30 mg/kg uygulanan melatoninin 12. haftada BMP2 seviyelerini kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde artırdığı görülmüştür. Bu çalışmada melatonin rejenerasyon etkilerini kartilaj matriks dejenerasyonunu ve artrit bağı inflamasyonu azaltarak gösterdiği ileri sürülmüştür (Zhao vd., 2024). Başka bir çalışmada ise 3 ay süre ile uygulanan PLGA ve oral melatoninin, farelerde kritik kalvaryal defekt modelinde osteoindüktif etkileri incelenmiştir. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlara göre oral melatonin uygulamasının kontrol grubuna göre BMP2 seviyelerini anlamlı düzeyde artırdığı ve PLGA ile birlikte uygulandığında ise kontrol gruplarına göre daha yüksek düzeyde artış sağladığı belirlenmiştir (Munmun vd., 2022).

Yapılan kontrollü melatonin salım çalışmalarından bir tanesinde diyabetik sıçanlarda oluşturulan kritik kalvaryal defektlerin üzerine yerleştirilen melatonin içeren PLGA nanopartikülleri ve 3 boyutlu PCL/beta trikalsiyum fosfat materyalinin 12. haftada BMP2 seviyeleri sadece PCL uygulanan gruba göre daha yüksek düzeyde artırdığı belirlenmiştir (Chen vd., 2024). Başka bir çalışmada ise melatonin ve trombosit zengin plazma içeren kalsiyum alüminat biyoaktif iskelelerinin farelerde oluşturulan kalvaryal defektler üzerine etkileri araştırılmıştır. Bu çalışmanın 6. ayında melatonin içeren kalsiyum alüminat biyoaktif iskelelerinin BMP2 ekspresyon seviyelerini trombosit zengin plazma içeren iskelelerden anlamlı düzeyde artırdığı görülmüştür. Tüm bu literatür verileri ister paranteral ister kontrollü salım ile uygulansın melatoninin MSC diferansiyasyonu ve BMP2 aktivasyonunu geç dönemde uyardığı ve uzun süre uygulanması gerektiğini göstermektedir.

Erken dönemde kemik iyileşmesi için BMP2'nin anahtar bir rol aldığı ve defekt alanında yeni kemik oluşumunun önemli bir belirteci olduğu belirtilmiştir. Bunun yanında BMP2'nin FDA onaylı bir molekül olması, deneysel kontrollü salım çalışmalarında kemik rejenerasyonunu veya kaynaşmasını sağlayıcı etkilerinin incelenmesi on yıllarda ilgi odağı olmuştur. Nie vd., (2009)'nin BMP2 içeren PLGA/hidroksiapatit bileşiminden oluşan kompozit biyomateryalin sıçanlarda oluşturulan femur defektlerinin iyileşmesi üzerine etkileri araştırılmıştır. BMP2 içeren kompozit biyomateryalin 4. haftada kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde kolajen birikimi ve yeni kemik oluşumu sağladığı belirtilmiştir (Nie vd., 2009). BMP2 içeren PLGA nanopartiküllerinin in vitro MSC'ler ile muamele edildikten 7 gün sonra BMP2 içeren PLGA uygulanan grupta ALP mRNA ekspresyonların ve osteojenik etkilerin diğer gruplardan anlamlı düzeyde yüksek olduğu görüldü (del Castillo-Santaella vd., 2024). Kritik femoral defektlerin iyileşmesi üzerine yapılan bir çalışmada farklı dozlarda rekombinant BMP2 içeren PLGA-PEG nanolifleri uygulanarak etkileri araştırılmıştır. Bu çalışmada 20 µg BMP2 içeren biyomateryalin 12. haftada otogreft grubundaki yeni kemik oluşumu düzeyine ulaştığı bildirilmiştir (Peng vd., 2016). BMP2'nin kontrollü salımının yapıldığı bu çalışmalarda osteoprogenitör hücrelerin aktivasyonu ve yeni kemik oluşumu için en önemli moleküllerden biri olan BMP2'nin kemik iyileşmesi ve kaynaşmasını geç dönemde sağlayabilecek şekilde aktive olduğu söylenebilir.

Çalışmamızda ise 7. günde kaynama bölgesinde BMP2 pozitif hücre yoğunluğunun diğer gruplara göre anlamlı düzeyde arttığı belirlenmiştir. Bu sonuçlar melatoninin PLGA nanolifleri ile kontrollü salımının osteoindüktif etkinliğini oldukça artırdığını göstermektedir.

Kemik iyileşmesinin erken döneminde osteoprogenitör hücrelerin osteoblastlara diferansiyasyonu ve bu osteoblastların matürasyonu hem kemik remodelingini hem de kaynaşmayı sağlayan esas mekanizmalardandır. Bunlar arasında özellikle osteoprogenitör hücrelerden preosteoblastlar oluşmaya başladıkça Runx2 ekspresyonunda kayda değer bir artış ortaya çıkar. Runx2 aktivitesi olgunlaşmamış osteoblastlar ortaya çıktığında zirveye ulaşır ve hücreler osteoblastlara olgunlaştıkça yavaş yavaş daha düşük değerlere gelir. BMP2 de bu mekanizmada anahtar rollerden birine sahiptir. BMP2, Runx2 ekspresyonlarının artmasını sağlar ve Runx2 de osteoblast progenitörlerinin çoğalma sürecinin kolaylaştırır (Giuliani vd., 2009). Runx2 ile osteoprogenitör hücrelerin diferansiyasyonun sağlanması olgun osteoblastların oluşması ile sonuçlanır ve osteoblastların yeni kemik oluşumu için aktivasyonu başlatılmış olur (Zhu vd., 2024). Çalışmamız erken dönemde kemik remodelingi ve kaynaşmasını amaçladığından kaynama bölgesinde Runx2 pozitif hücre yoğunluğu incelenmiştir. Elde ettiğimiz sonuçlar PLGA/MEL grubunda 7., 14. ve 28. günlerde Otograft grubuna göre anlamlı düzeyde Runx2 pozitif hücre yoğunluğu ortaya çıktığını göstermiştir ($p<0,05$, $p<0,001$).

Overektomize farelerde kemik mineral yoğunluğu ve osteoklastogenez üzerine 6 hafta boyunca oral melatonin (10-100 mg/kg) uygulamasının etkileri araştırılmıştır. Bu çalışmanın 6. haftasında yapılan analizlere göre 10 mg/kg oral melatonin uygulaması yapılan grupta, kontrol grubuna göre Runx2 ekspresyonlarının anlamlı düzeyde arttığı belirlenmiştir. Düşük doz melatonin uygulanan grupta Runx2 ekspresyon seviyelerinin yüksek doz melatonin uygulanan gruptan da anlamlı düzeyde yüksek olduğu görülmüştür. İki farklı dozda melatonin uygulamasının kemik mineral dansitesini anlamlı düzeyde artırdığı fakat aralarında istatistiksel olarak bir farklılık olmadığı belirlenmiştir (Zhou vd., 2020). Guan vd.

(2022)'nin yaptığı çalışmada overektomi yapılan sıçanlarda pre-menopozal ve post-menopozal dönemlerde oral melatonin uygulamasının etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla her iki dönemde olan iki ayrı sıçan grubunda kemik dansitesi, kemik mineral yoğunluğu ve Runx2 ekspresyon seviyeleri incelenmiştir. Çalışmada bu amaçla, 8 hafta boyunca sıçanların içme sularına 100 mg/kg dozda melatonin eklenmiştir. Yapılan analizlerde 8. haftada melatoninin pre-menopozal dönemde olan sıçanlardaki Runx2 seviyesini post-menopozal dönemdeki sıçanlardan anlamlı düzeyde daha fazla artırdığı görülmüştür. Bu durum melatoninin osteoporotik kırıklar için profilaktik bir etki oluşturma potansiyeli taşıdığını göstermektedir. Erken dönemde Runx2 artışı osteoprogenitör hücrelerin erken matürasyonunu sağlayarak kemik mineralizasyonunu aktive edebileceği belirtilmiştir (Guan vd., 2022).

Melatoninin biyomateryaller ile birlikte kullanıldığı çalışmalardan birinde poly-di-asetil fosfolipitleri ile enkapsüle edilmiş ve zebra balıklarının embriyolarında Runx2 aktivitesi üzerine etkileri değerlendirilmiştir. Melatoninin 50 nM dozunda kontrollü salımının 3. ve 7. günlerde Runx2 aktivitesini enkapsüle edilmiş melatonin grubunda kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde artırdığı görülmüştür (Ishaniya vd., 2022). Melatonin ve BMP2 içeren PLGA nanopartiküllerinden ikili salımının osteoblastik hücre hattında (MC3T3-E1) etkilerinin araştırıldığı bir in vitro çalışmada 14. günde yapılan moleküler analizlerde sadece melatonin (10 µg) içeren PLGA nanopartiküllerinin Runx2 ekspresyon seviyelerini sadece BMP2 (20 µg) içeren PLGA nanopartiküllerinden daha yüksek düzeyde artırdığı belirlenmiştir (Jarrar vd., 2021). Titanyum oksit nanotüplerinden melatoninin (0,1 M) kontrollü salımının MSC'lerin osteojenik diferansiyasyonu üzerine etkilerinin araştırıldığı bir başka in vitro çalışmada ise melatonin içeren titanyum oksit nanotüplerinin sadece titanyum oksit uygulanan gruptan daha yüksek düzeyde Runx2 ekspresyonu sağladığı ve osteojenik etkiler gösterdiği bildirilmiştir (Lai vd., 2017).

Literatürdeki melatoninin paranteral veya kontrollü salımının yapıldığı in vitro veya in vivo çalışmalar farklı dozlarda melatoninin Runx2 aktivasyonu üzerindeki etkilerini in vitro ortamda bile en erken 7. günde sağladığı göstermektedir. Çalışmamızda ise uyguladığımız melatoninli PLGA nanolifleri in vivo ortamda Runx2 düzeylerini, osteojenik

farklılaşmayı ve yeni kemik oluşumunu 7. günde sağlamıştır. Elde ettiğimiz sonuçlar uyguladığımız biyomateryal bileşiminin in vivo ortamda in vitro düzeyde elde edilen çalışmalara benzer etkiler gösterdiğini ortaya koymaktadır. Bu etkiler ürettiğimiz melatonin içeren biyomateryalin in vivo ortamda çok güçlü bir kemik yapımı uyarıcı etki gösterdiğini düşündürmüştür.

Kemik rejenerasyonunun incelendiği çalışmalarda, kemik iyileşmesinin takibi biyokimyasal olarak serum ALP seviyelerinin ölçümü ile gerçekleştirilmektedir. Kemik kırıklarını takiben istatistiksel olarak anlamlı artışın 4. ve 6. haftalarda belirlendiği bildirilmiştir (Cheng ve Zhao, 2023). Buna ek olarak yapılan deneysel çalışmalarda inanlar ve sıçanlarda serum ALP seviyelerinin benzer zamanlarda artış gösterdiği belirtilmektedir (Meller vd., 1984). Çalışmamızda bu verilerden yola çıkarak serum ALP seviyeleri 7., 14. ve 28. günlerde alınan kan örneklerinden elde edilen serumlar ile incelenmiştir. Elde ettiğimiz verilere göre tüm günlerde PLGA/MEL grubunda serum ALP seviyeleri Otogreft grubuna göre artış göstermiş olmasına rağmen istatistiksel olarak bir anlamlılık tespit edilmedi. Bununla birlikte 14. gün verilerinde PLGA grubunda serum ALP seviyelerinin PLGA/MEL ve Otogreft grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü. Bulgularımızdan yola çıkarak PLGA nanoliflerinin içerisindeki düşük doz melatoninin erken dönemde serum ALP seviyelerini anlamlı düzeyde artırmadığını düşünüyoruz.

Yapılan çalışmalarda serum ALP seviyelerinin kullanılan taşıyıcı biyomateryal gruplarında da kontrol gruplarına göre anlamlı düzeyde artış sağladığı görülmüştür. Bu çalışmalardan birinde PCL/PLGA nanoliflerinin tavşanlarda oluşturulan kritik Radius kırıklarının iyileşmesi üzerine etkileri incelenmiştir. Bu çalışmanın 4., 8. ve 12. haftalarında yapılan serum ALP analizlerine göre PCL/PLGA grubunda serum ALP seviyeleri en erken 4. haftada artış göstermiştir (Lee vd., 2016). Bu veriler ile çalışmamızın verilerinin paralel olduğu görülmektedir. Serum ALP seviyelerinin erken dönemde ve kontrollü salım yapılan bir çalışmada değil daha uzun süreli bir çalışmada ölçülmesi anlamlı sonuçlar verebilir.

5.2. Sonuç ve Öneriler

Çalışmamızda kullanılan PLGA nanolifleri bir membran yapısında olup defekt alanlarına uygulanırken herhangi bir sütür veya fiksasyon gerektirmemektedir. Böylelikle kaynama bölgesinde fazladan bir travmaya neden olmamaktadır. Bu sayede klinik translasyonu kolay olabilir.

Çalışmamızda literatürden farklı olarak melatonin içeren nanolifler defekt alanında primer bir iskele olarak değil otogreftlenen defekt alanının ana kemik ile kaynaşmasını sağlamak üzere kullanılmıştır.

Çalışmamızda 28 günlük biyobozunurluk elde etmek üzere PLGA ve PLGA/MEL nanoliflerinin formülasyonu LA:GA oranları değiştirilerek optimize edildi. Elde edilen sonuçlar LA:GA oranı 50:50 olan biyomateryalin in vitro ortamda 28. günde % 85-90 oranında (PLGA 50:50) biyobozunuma uğradığını gösterdi. Çalışmamızın bulguları PLGA (50:50) formülasyonunun farklı dozlarda melatoninini erken dönemde osteojenik etkiler gösterebilecek düzeyde salındığını göstermektedir.

Kemik kaynama bölgesine kontrollü salım şeklinde melatonin uygulamasının en erken 7. ve 14. günlerde yeni kemik oluşumunu uyardığını göstermektedir. Bu sonuçların melatoninin osteoindüktif etkilerine bağlı ortaya çıktığını düşünmekteyiz. Yalnız başına PLGA uygulanan grupta kontrol grubuna göre daha iyi oranda yeni kemik oluştuğu görülmüştür.

Melatonin yüklü nanoliflerin yeni kemik oluşumunu ve kaynamayı 7. günden itibaren aktive ettiği görülmüştür. Melatonin kontrollü salımının yapıldığı çalışmalarda yeni kemik oluşumu ve kaynaması in vitro deneylerde bile en erken 7. günde başlamaktadır. Bu durum biyomateryal bileşiminizin optimal düzeyde olduğunu göstermektedir.

Çalışma bulgularımız melatoninin PLGA yapısındaki nanolifler ile kontrollü salımının erken dönemde otogreftin ana kemik ile kaynamasını histopatolojik ve moleküler düzeyde hızlandırdığını göstermiştir. Buradan yola çıkarak melatonin içeren PLGA nanoliflerinin kritik defektlerin kaynaması üzerine kullanılabilecek etkili inovatif bir biyomateryal olduğu görülmektedir. Bununla birlikte melatoninli PLGA nanolifleri farklı kemik kaynaması modellerinde de uygulanabilir olduğunu önermekteyiz. Yalnızca ortopedik uygulamalarda değil torakotomi, diskektomi ve vertebral füzyon cerrahilerinde de kaynamayı hızlandırabilecek ve hastaların post operatif dönemde immobilizasyon sürelerini azaltabilecek düzeyde etkili olabileceğini savunuyoruz. Hem melatonin hem de PLGA'nın FDA onaylı olmasının deneysel süreçlerden klinik kullanıma kolay adapte edilebileceği açıktır.

KAYNAKÇA

- Abdelrasoul, M., El-Fattah, A. A., Kotry, G., Ramadan, O., Essawy, M., Kamaldin, J. ve Kandil, S. (2023). "Regeneration of critical-sized grade II furcation using a novel injectable melatonin-loaded scaffold". *Oral Diseases*, 29(8), 3583-3598.
- Abushahba, F., Areid, N., Kylväoja, E., Holopainen, J., Ritala, M., Hupa, L., Tuukkanen J. ve Närhi, T. (2023). "Effect of Atomic-Layer-Deposited Hydroxyapatite Coating on Surface Thrombogenicity of Titanium". *Coatings*, 13(10), 1810.
- Acikan, I., Gul, M., Artas, G., Yaman, F., Deniz, G., Bulmus, O., Kom M., Kirtay M. ve Dundar, S. (2018). "Systemic melatonin application increases bone formation in mandibular distraction osteogenesis". *Brazilian Oral Research*, 32, e85.
- Adamopoulos, I. E. (2018). "Inflammation in bone physiology and pathology". *Current opinion in rheumatology*, 30(1), 59.
- Afsharian, Y. P., Rahimnejad, M., Rabiee, S. M. ve Feizi, F. (2023). "Osteogenic and osseointegration responses of electrospun-based composites in the light of the bone regeneration problems". *Composite Structures*, 321, 117236
- Ahmadpour, E., Azizi, B., Behradfar, M., Javadi, S., Hagh, E. J. ve Ahmadpour, F. (2024). "Local Delivery of Melatonin Along With Bone Grafts to Improve Osteogenesis". *Journal of Craniofacial Surgery*, 10-1097.
- Albougha, M. S., Sugii, H., Adachi, O., Mardini, B., Soeno, S., Hamano, S., Hasegawa, D., Yoshida S., Itoyama T., Obata, J. ve Maeda, H. (2024). "Exosomes from Human Periodontal Ligament Stem Cells Promote Differentiation of Osteoblast-like Cells and Bone Healing in Rat Calvarial Bone". *Biomolecules*, 14(11), 1455.
- Alt, V., Rupp, M. ve Lang, S. (2024). "General Considerations: Analysis of Failure of Fixation: A Stepwise Approach". *Failed Fracture Fixation*, 37-54.
- Amaral, F. G. D. ve Cipolla-Neto, J. (2018). "A brief review about melatonin, a pineal hormone". *Archives of endocrinology and metabolism*, 62, 472-479.

- Amini, A. R., Laurencin, C. T. ve Nukavarapu, S. P. (2012). “Bone Tissue Engineering: Recent Advances and Challenges”. *Critical reviews in biomedical engineering*, 40(5), 363.
- Amirazad, H., Dadashpour, M. ve Zarghami, N. (2022). “Application of decellularized bone matrix as a bioscaffold in bone tissue engineering”. *Journal of Biological Engineering*, 16(1).
- Amirrah, I. N., Lokanathan, Y., Zulkiflee, I., Wee, M. F. M. R., Motta, A. ve Fauzi, M. B. (2022). “A Comprehensive Review on Collagen Type I Development of Biomaterials for Tissue Engineering: From Biosynthesis to Bioscaffold”. *Biomedicines*, 10(9), 2307.
- An, Y. Z., Song, Y. W., Thoma, D. S., Strauss, F. J. ve Lee, J. S. (2024). “Enhancing guided bone regeneration with cross-linked collagen-conjugated xenogeneic bone blocks and membrane fixation: A preclinical in vivo study”. *Clinical Oral Implants Research*, 35(10), 1226-1239.
- Anand, A., Sengupta, S., Kaňková, H., Švančárková, A., Beltrán, A. M., Galusek, D., Boccaccini, A. R. ve Galusková, D. (2022). “Influence of Copper-Strontium Co-Doping on Bioactivity, Cytotoxicity and Antibacterial Activity of Mesoporous Bioactive Glass”. *Gels*, 8(11), 743.
- Arosarena, O. A. ve Collins, W. L. (2005). “Bone Regeneration in the Rat Mandible with Bone Morphogenetic Protein-2: A Comparison of Two Carriers”. *Otolaryngology–Head and Neck Surgery*, 132(4), 592-597.
- Atalay, Y., Bozkurt, M. F., Gonul, Y., Cakmak, O., Agacayak, K. S., Köse, I., Hazman, O., Keles, H., Turamanlar, O. ve Eroglu, M. (2015). “The effects of amlodipine and platelet rich plasma on bone healing in rats”. *Drug Design, Development and Therapy*, 9, 1973-1981.
- Auersvald, C. M., Santos, F. R., Nakano, M. M., Leoni, G. B., de Sousa Neto, M. D., Scariot, R., Giovanini, A.F. ve Deliberador, T. M. (2017). “The local administration of parathyroid hormone encourages the healing of bone defects in the rat calvaria:

Micro-computed tomography, histological and histomorphometric evaluation”. *Archives of Oral Biology*, 79, 14-19.

Aykora, D. ve Uzun, M. (2024). “Bone tissue engineering for osteointegration: Where are we now?”. *Polymer Bulletin*, 81(10), 8595-8605.

Aykora, D., Oral, A., Aydeğer, C. ve Uzun, M. (2024). “3D Bioprinting Strategies for Melatonin-Loaded Polymers in Bone Tissue Engineering”. *Macromolecular Materials and Engineering*, 2400263.

Baldwin, P., Li, D. J., Auston, D. A., Mir, H. S., Yoon, R. S. ve Koval, K. J. (2019). “Autograft, Allograft, and Bone Graft Substitutes: Clinical Evidence and Indications for Use in the Setting of Orthopaedic Trauma Surgery”. *Journal of orthopaedic trauma*, 33(4), 203-213.

Ballanti, P., Minisola, S., Pacitti, M. T., Scarnecchia, L., Rosso, R., Mazzuoli, G. F. ve Bonucci, E. (1997). “Tartrate-resistant acid phosphate activity as osteoclastic marker: sensitivity of cytochemical assessment and serum assay in comparison with standardized osteoclast histomorphometry”. *Osteoporosis international*, 7, 39-43.

Bi, L., Jung, S., Day, D., Neidig, K., Dusevich, V., Eick, D. ve Bonewald, L. (2012). “Evaluation of bone regeneration, angiogenesis, and hydroxyapatite conversion in critical-sized rat calvarial defects implanted with bioactive glass scaffolds”. *Journal of biomedical materials research. Part A*, 100(12), 3267-3275.

Bilge, K., Ataş, O., Yildiz, Çalik, Dünder, S. ve Gezer Ataş, A. 2024. “Histological evaluation of tissue reaction and new bone formation of different calcium silicate-based cements in rats”. *Australian Dental Journal*, 69(1), 18-28.

Blokhuis, T. J., Calori, G. M. ve Schmidmaier, G. (2013). “Autograft versus BMPs for the treatment of non-unions: What is the evidence?”. *Injury*, 44(SUPPL.1), S40-S42.

Blumer, M. J. F., Hausott, B., Schwarzer, C., Hayman, A. R., Stempel, J. ve Fritsch, H. (2012). “Role of tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) in long bone development”. *Mechanisms of Development*, 129(5-8), 162.

- Bose, S., Sarkar, N. ve Banerjee, D. (2018). "Effects of PCL, PEG and PLGA polymers on curcumin release from calcium phosphate matrix for in vitro and in vivo bone regeneration". *Materials Today Chemistry*, 8, 110-120.
- Bourne, L. E., Wheeler-Jones, C. P. ve Orriss, I. R. (2021). "Regulation of mineralisation in bone and vascular tissue: a comparative review". *Journal of Endocrinology*, 248(2), R51-R65.
- Boyce, B., Yao, Z. ve Xing, L. (2009). "Osteoclasts have multiple roles in bone in addition to bone resorption". *Critical reviews in eukaryotic gene expression*, 19(3), 171-180.
- Boyle, W. J., Simonet, W. S. ve Lacey, D. L. (2003). "Osteoclast differentiation and activation". *Nature*, 423(6937), 337-342.
- Bray, C. C., Walker, C. M. ve Spence, D. D. (2017). "Orthobiologics in Pediatric Sports Medicine". *Orthopedic Clinics of North America*, 48(3), 333-342.
- Bruce, R. A. ve Dziewiatkowski, D. D. (1987). "Differentiation of the organic matrix in bone repair". *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 45(11), 939-944.
- Brum, I. da S., Frigo, L., Devita, R. L., Pires, J. L. da S., de Oliveira, V. H. V., Nascimento, A. L. R. ve de Carvalho, J. J. (2020). "Histomorphometric, immunohistochemical, ultrastructural characterization of a nano-hydroxyapatite/beta-tricalcium phosphate composite and a bone xenograft in sub-critical size bone defect in rat calvaria". *Materials*, 13(20), 1-13.
- Bruzzaniti, A. ve Baron, R. (2006). "Molecular regulation of osteoclast activity". *Reviews in endocrine & metabolic disorders*, 7(1-2), 123-139.
- Buckwalter, J. A. ve Hunziker, E. B. (1996). "Healing of bones, cartilages, tendons, and ligaments: A new era". *Lancet*, 348(SUPPL.2), 18.
- Bujda, M. ve Klíma, K. (2024). "Enhancing Guided Bone Regeneration with a Novel Carp Collagen Scaffold: Principles and Applications". *Journal of Functional Biomaterials*, 15(6), 150.

- Buza, J. A. ve Einhorn, T. (2016). "Bone healing in 2016". Clinical cases in mineral and bone metabolism : the official journal of the Italian Society of Osteoporosis". *Mineral Metabolism, and Skeletal Diseases*, 13(2), 101-105.
- Calmar, E. A. ve Vinci, R. J. (2002). "The anatomy and physiology of bone fracture and healing". *Clinical Pediatric Emergency Medicine*, 3(2), 85-93.
- Calori, G. M., Mazza, E. L., Mazzola, S., Colombo, A., Giardina, F., Romanò, F. ve Colombo, M. (2017). "Non-unions". *Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism*, 14(2), 186.
- Čandrlić, M., Jerbić Radetić, A. T., Omrčen, H., Franović, B., Batičić, L., Gulić, T., Čaljkušić-Mance, T., Cvek., S. Z., Malešić, L., Kačarević, Z. P. ve Cvijanović Pelozo, O. (2024). "Regeneration of Critical Calvarial Bone Defects Using Bovine Xenograft, Magnesium-Enriched Bovine Xenograft and Autologous Dentin in Rats: Micro-CT, Gene Expression and Immunohistochemical Analysis". *Journal of Functional Biomaterials*, 15(9), 270.
- Capurro, M. ve Barberis, F. (2014). "Evaluating the mechanical properties of biomaterials". *Biomaterials for Bone Regeneration: Novel Techniques and Applications*, 270-323.
- Carbajal-De la Torre, G., Zurita-Méndez, N. N., Ballesteros-Almanza, M. de L., Ortiz-Ortiz, J., Estévez, M. ve Espinosa-Medina, M. A. (2022). "Characterization and Evaluation of Composite Biomaterial Bioactive Glass–Polylactic Acid for Bone Tissue Engineering Applications". *Polymers*, 14(15), 3034.
- Carbonare, L. D., Innamorati, G. ve Valenti, M. T. (2012). "Transcription Factor Runx2 and its Application to Bone Tissue Engineering". *Stem Cell Reviews and Reports*, 8(3), 891-897.
- Carvalho, M. S., Cabral, J. M. S., da Silva, C. L. ve Vashishth, D. (2021). "Bone matrix non-collagenous proteins in tissue engineering: Creating new bone by mimicking the extracellular matrix". *Polymers*, 13(7), 1095.

- Castañeda-Rodríguez, S., González-Torres, M., Ribas-Aparicio, R. M., Del Prado Audelo, M. L., Leyva Gómez, G., Güreş, E. S. ve Sharifi Rad, J. (2023). "Recent advances in modified poly (lactic acid) as tissue engineering materials". *Journal of Biological Engineering*, 17(1), 1-20.
- Catalano, E., Cochis, A., Varoni, E., Rimondini, L. ve Azzimonti, B. (2013). "Tissue-engineered skin substitutes: An overview". *Journal of Artificial Organs*, 16(4), 397-403.
- Cauley, J. A. (2021). "The global burden of fractures". *The Lancet Healthy Longevity*, 2(9), e535-e536.
- Cerqueira, A., Romero-Gavilán, F., Araújo-Gomes, N., García-Arnáez, I., Martínez-Ramos, C., Ozturan, S., Azkargorta, M., Elortza, F., Gurruchaga, M., Suay, J. ve Goñi, I. (2020). "A possible use of melatonin in the dental field: Protein adsorption and in vitro cell response on coated titanium". *Materials Science and Engineering: C*, 116, 111262.
- Chan, Y. H., Ho, K. N., Lee, Y. C., Chou, M. J., Lew, W. Z., Huang, H. M., Lai, P.C. ve Feng, S. W. (2022). "Melatonin enhances osteogenic differentiation of dental pulp mesenchymal stem cells by regulating MAPK pathways and promotes the efficiency of bone regeneration in calvarial bone defects". *Stem Cell Research and Therapy*, 13(1).
- Chen, L., Zhang, R. Y., Xie, J., Yang, J. Y., Fang, K. H., Hong, C. X., Yang, R. B. ve Yang, L. (2021). "STAT3 activation by catalpol promotes osteogenesis-angiogenesis coupling, thus accelerating osteoporotic bone repair". *Stem Cell Research and Therapy*, 12(1), 1-16.
- Chen, P. C., Liu, J. F., Fong, Y. C., Huang, Y. L., Chao, C. C. ve Tang, C. H. (2019). "CCN3 facilitates Runx2 and osterix expression by inhibiting miR-608 through PI3K/Akt signaling in osteoblasts". *International Journal of Molecular Sciences*, 20(13), 3300.

- Chen, T., Wu, Z., Hou, Q., Mei, Y., Yang, K., Xu, J. ve Wang, L. (2024). "The Dual Angiogenesis Effects via Nrf2/HO-1 Signaling Pathway of Melatonin Nanocomposite Scaffold on Promoting Diabetic Bone Defect Repair". *International Journal of Nanomedicine*, 19, 2709-2732.
- Chen, Z., Xie, L., Xu, J., Lin, X., Ye, J., Shao, R. ve Yao, X. (2021). "Changes in alkaline phosphatase, calcium, C-reactive protein, D-dimer, phosphorus and hemoglobin in elderly osteoporotic hip fracture patients". *Annals of Palliative Medicine*, 10(2), 1079088-1071088.
- Cheng, S., Zhao, C., Liu, S., Chen, B., Chen, H., Luo, X., Wei, L., Du, C., Xiao, P., Lei, Y., Yan, Y. ve Huang, W. (2023). "Injectable Self-Setting Ternary Calcium-Based Bone Cement Promotes Bone Repair". *ACS Omega*, 8(19), 16809-16823.
- Cheng, X. ve Zhao, C. (2023). "The correlation between serum levels of alkaline phosphatase and bone mineral density in adults aged 20 to 59 years". *Medicine*, 102(32), e34755.
- Chenhui, Z., Tingting, F., Yanglin, W., Qin, Z., Ang, L., Huilin, Y. ve Jun, L. (2024). "Melatonin alleviates CoCrMo particle-induced osteolysis by inhibiting NLRP3 inflammasome activation". *Chinese Journal of Tissue Engineering Research*, 28(10), 1484.
- Chimedtseren, I., Yamahara, S., Akiyama, Y., Ito, M., Arai, Y., Gantugs, A. E., Nastume, N., Wakita, T., Hiratsuka, T., Honda, M. ve Montenegro Raudales, J. L. (2023). "Collagen type I-based recombinant peptide promotes bone regeneration in rat critical-size calvarial defects by enhancing osteoclast activity at late stages of healing". *Regenerative Therapy*, 24, 515-527.
- Choi, J. U. A., Kijas, A. W., Lauko, J. ve Rowan, A. E. (2022). "The Mechanosensory Role of Osteocytes and Implications for Bone Health and Disease States". *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 770143.

- Choy, M. H. V., Wong, R. M. Y., Chow, S. K. H., Li, M. C., Chim, Y. N., Li, T. K., Ho, W. T., Cheng, J. C. Y. ve Cheung, W. H. (2019). “How much do we know about the role of osteocytes in different phases of fracture healing? A systematic review”. *Journal of Orthopaedic Translation*, 21, 111.
- Cinici, B., Yaba, S., Kurt, M., Yalcin, H. C., Duta, L. ve Gunduz, O. (2024). “Fabrication Strategies for Bioceramic Scaffolds in Bone Tissue Engineering with Generative Design Applications”. *Biomimetics*, 9(7), 409.
- Clarke, B. (2008). “Normal bone anatomy and physiology”. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN*, 3 Suppl 3.
- Claustrat, B. ve Leston, J. 2015. “Melatonin: Physiological effects in humans”. *Neuro-Chirurgie*, 61(2-3), 77-84.
- Cook, E. A. ve Cook, J. J. (2009). “Bone Graft Substitutes and Allografts for Reconstruction of the Foot and Ankle”. *Clinics in Podiatric Medicine and Surgery*, 26(4), 589-605.
- Cooper, G. M., Mooney, M. P., Gosain, A. K., Campbell, P. G., Losee, J. E. ve Huard, J. (2010). “Testing the “critical-size” in calvarial bone defects: revisiting the concept of a critical-sized defect (CSD)”. *Plastic and reconstructive surgery*, 125(6), 1685.
- Cooper, G. M., Mooney, M. P., Gosain, A. K., Campbell, P. G., Losee, J. E. ve Huard, J. (2010). “Testing the critical size in calvarial bone defects: revisiting the concept of a critical-size defect”. *Plastic and reconstructive surgery*, 125(6), 1685-1692.
- Costa, K. L. D., Abreu, L. F., Tolomei, C. B., Eleutério, R. G., Basting, R., Balbinot, G., Collares, F. M., Lopes, P., Veiga, N., Fernandes, G. V. O. ve Peruzzo, D. C. (2024). “Use of Local Melatonin with Xenogeneic Bone Graft to Treat Critical-Size Bone Defects in Rats with Osteoporosis: A Randomized Study”. *Journal of Functional Biomaterials*, 15(5), 124.
- Çetin Altındal, D. ve Gümüşderelioğlu, M. (2019). “Dual-functional melatonin releasing device loaded with PLGA microparticles and cyclodextrin inclusion complex for osteosarcoma therapy”. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 52, 586-596.

- Çetin Altındal, D., James, E. N., Kaplan, D. L. ve Gümüşderelioğlu, M. (2019). “Melatonin-induced osteogenesis with methanol-annealed silk materials”. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 34(3), 291-305.
- Çokluk, E., Doğanay, S., Ramazan Şekeroğlu, M., Betül Tuncer, F., Çakıroğlu, H. ve Boz, M. (2021). “Investigation of the effect of melatonin administration on inflammatory mediators; MMP-2, TGF- β and VEGF levels in rats with sepsis”. *International Journal of Clinical Practice*, 75(11), e14832.
- da Silva, S. R., Martins, A. A., de Oliveira Melo, R. C., Araújo, V. S., de Araújo Silva, D. N., Chalmers, J., da Silveira, T. M., Pirih, F. Q., Andrade, R. V. S., Silva, R. A., da Silva, J. S. P., Delmonte, M. R. B., Motta, F. V., Castro, M. A. M., de Sousa Lopes, M. L. D., Leitão, R. F. C., de Araújo Júnior, R. F., Clebis, N. K. ve de Araújo, A. A. (2024). “Niobium/Hydroxyapatite Composite as a Potential Stimulator of Bone Formation in Critical Size Calvarial Defects in Rats”. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 67, e24240152.
- Dai, M., Cui, P., Yu, M., Han, J., Li, H. ve Xiu, R. (2008). “Melatonin modulates the expression of VEGF and HIF-1 α induced by CoCl₂ in cultured cancer cells”. *Journal of pineal research*, 44(2), 121-126.
- Dalgic, A.D., Atila, D., Tezcaner, A., Gürses, S. ve Keskin, D. (2023). “Diatom silica frustules-doped fibers for controlled release of melatonin for bone regeneration”. *European Polymer Journal*, 186, 111858.
- Davulcu, C. D., Saruhan, S., Bilgin, E. ve Zengin, E. C. (2024). “Effect of bone grafting on bone union in exchange nailing for the treatment of femoral shaft nonunions”. *Northern Clinics of Istanbul*, 11(4), 322-327.
- del Castillo-Santaella, T., Ortega-Oller, I., Padial-Molina, M., OValle, F., Galindo-Moreno, P., Jodar-Reyes, A. B. ve Peula-Garcia, J. M. (2024). “Formulation, Colloidal Characterization, and In Vitro Biological Effect of BMP-2 Loaded PLGA Nanoparticles for Bone Regeneration”. *Pharmaceutics*, 11(8), 388.

- Deng, L., Hou, M., Lv, N., Zhou, Q., Hua, X., Hu, X., Ge, X., Zhu, X., Xu, Y., Yang, H., Chen, X., Liu, H. ve He, F. (2024). “Melatonin-encapsulated silk fibroin electrospun nanofibers promote vascularized bone regeneration through regulation of osteogenesis-angiogenesis coupling”. *Materials Today Bio*, 25, 100985.
- Di Bella, G., Mascia, F., Gualano, L. ve Di Bella, L. (2013). “Melatonin Anticancer Effects: Review”. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(2), 2410.
- Donati, D., Zolezzi, C., Tomba, P. ve Viganò, A. (2007). “Bone grafting: historical and conceptual review, starting with an old manuscript by Vittorio Putti”. *Acta Orthopaedica*, 78(1), 19-25.
- Dong, Y., Cao, X., Huang, J., Hu, Z., Chen, C., Chen, M., Long, Q., Xu, Z., Lv, D., Rong, Y., Luo, S., Wang, H., Deng, W. ve Tang, B. (2024). “Melatonin inhibits fibroblast cell functions and hypertrophic scar formation by enhancing autophagy through the MT2 receptor-inhibited PI3K/Akt/mTOR signaling”. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Molecular Basis of Disease*, 1870(1), 166887.
- Dreyer, C. H., Rasmussen, M., Pedersen, R. H., Overgaard, S. ve Ding, M. (2020). “Comparisons of Efficacy between Autograft and Allograft on Defect Repair In Vivo in Normal and Osteoporotic Rats”. *BioMed Research International*, 2020(1), 9358989.
- Dumic-Cule, I., Peric, M., Kucko, L., Grgurevic, L., Pecina, M. ve Vukicevic, S. (2018). “Bone morphogenetic proteins in fracture repair”. *International Orthopaedics*, 42(11), 2619-2626.
- Dziadek, M., Dziadek, K., Checinska, K., Salagierski, S., Choinska, E., Szatkowski, P., Wajda, A., Kopec, A. ve Cholewa-Kowalska, K. (2023). “Polyphenolic compounds affect the long-term degradation behavior of polymer and composite materials based on PCL, PLGA, and bioactive glass”. *Sustainable Materials and Technologies*, 35, e00568.
- Elhawary, H., Baradaran, A., Abi-Rafeh, J., Vorstenbosch, J., Xu, L. ve Efanov, J. I. (2021). “Bone Healing and Inflammation: Principles of Fracture and Repair”. *Seminars in Plastic Surgery*, 35(3), 198.

- Farid, A., Michael, V. ve Safwat, G. (2023). “Melatonin loaded poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) nanoparticles reduce inflammation, inhibit apoptosis and protect rat’s liver from the hazardous effects of CCL4”. *Scientific reports*, 13(1).
- Farjaminejad, S., Farjaminejad, R., Hasani, M., Garcia-Godoy, F., Abdouss, M., Marya, A., Harsoputranto, A. ve Jamilian, A. (2024). “Advances and Challenges in Polymer-Based Scaffolds for Bone Tissue Engineering: A Path Towards Personalized Regenerative Medicine”. *Polymers*, 16(23), 3303.
- Fazeli, N., Arefian, E., Irani, S., Ardeshirylajimi, A. ve Seyedjafari, E. (2023). “Accelerated reconstruction of rat calvaria bone defect using 3D-printed scaffolds coated with hydroxyapatite/bioglass”. *Scientific Reports*, 13(1), 12145.
- Ferguson, J. W. ve Atit, R. P. (2019). “A tale of two cities: The genetic mechanisms governing calvarial bone development”. *Genesis*, 57(1), e23248.
- Flanagan, T. R., Frydel, B., Tente, B., Lavoie, M., Doherty, E., Rein, D., Emerich, D.F. ve Winn, S. R. (1994). “Tests for Validating the Safety of Encapsulated Xenografts”. *Methods in Neurosciences*, 21(C), 403-423.
- Florencio-Silva, R., Sasso, G. R. D. S., Sasso-Cerri, E., Simões, M. J. ve Cerri, P. S. (2015). “Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells”. *BioMed research international*, 2015(1), 421746.
- Flores, M. J., Brown, K. E., O’Marr, J. M., Adejuyigbe, B., Rodarte, P., Gomez-Alvarado, F., Nwachuku, K., Urva, M. ve Shearer, D. (2024). “The economic impact of infection and/or nonunion on long-bone shaft fractures: A systematic review”. *Journal of OTA International*, 7(3).
- Fok, T. C. O., Jan, A., Peel, S. A. F., Evans, A. W., Clokie, C. M. L. ve Sándor, G. K. B. (2008). “Hyperbaric oxygen results in increased vascular endothelial growth factor (VEGF) protein expression in rabbit calvarial critical-sized defects”. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 105(4), 417-422.

- Fraile-Martínez, O., García-montero, C., Coca, A., Álvarez-mon, M. A., Monserrat, J., Gómez-Lahoz, A. M., Coca, S., Álvarez-Mon, M., Acero, J., Bujan, J., García-Honduvilla, N., Asúnsolo, A. ve Ortega, M. A. (2021). “Applications of Polymeric Composites in Bone Tissue Engineering and Jawbone Regeneration”. *Polymers*, 13(19), 3429.
- Fu, Y. C., Nie, H., Ho, M. L., Wang, C. K. ve Wang, C. H. (2008). “Optimized bone regeneration based on sustained release from three-dimensional fibrous PLGA/HAp composite scaffolds loaded with BMP-2”. *Biotechnology and Bioengineering*, 99(4), 996-1006.
- Fu, Y. S., Tsai, S. W., Tong, Z. J., Yeh, C. C., Chen, T. H. ve Chen, C. F. (2024). “Wharton’s jelly of the umbilical cord serves as a natural biomaterial to promote osteogenesis”. *Biomaterials Science*, 12(24), 6284-6298.
- Fuchs, T., Stolberg-stolberg, J., Michel, P. A., Garcia, P., Amler, S., Wähnert, D. ve Raschke, M. J. (2021). “Effect of Bone Morphogenetic Protein-2 in the Treatment of Long Bone Non-Unions”. *Journal of Clinical Medicine*, 10(19), 4597.
- Ganse, B. (2024). “Methods to accelerate fracture healing - a narrative review from a clinical perspective”. *Frontiers in Immunology*, 15, 1384783.
- Gao, J., Huang, G., Liu, G., Liu, Y., Chen, Q., Ren, L., Chen, C. ve Ding, Z. (2016). “A biodegradable antibiotic-eluting PLGA nanofiber-loaded deproteinized bone for treatment of infected rabbit bone defects”. *Journal of Biomaterials Applications*, 31(2), 241-249.
- Gao, Y., Patil, S. ve Jia, J. (2021). “The Development of Molecular Biology of Osteoporosis”. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(15), 8182.
- Garcia, P., Histing, T., Holstein, J. H., Klein, M., Laschke, M. W., Matthys, R., Ignatius, A., Wildemann, B., Lienau, J., Peters, A., Willie, B, Duda, G., Claes, L., Pohlemann, T. ve Menger, M. D. (2013). “Rodent animal models of delayed bone healing and non-union formation: a comprehensive review”. *European cells & materials*, 26, 1-14.

- Garcia, P., Pieruschka, A., Klein, M., Tami, A., Histing, T., Holstein, J. H., Scheuer, C., Pohlemann, T. ve Menger, M. D. (2012). "Temporal and spatial vascularization patterns of unions and nonunions: role of vascular endothelial growth factor and bone morphogenetic proteins". *The Journal of bone and joint surgery. American volume*, 94(1), 49-58.
- Garimella, A., Ghosh, S. B. ve Ghosh, S. B. (2024). "Biomaterials for bone tissue engineering: achievements to date and future directions". *Biomedical Materials*, 20(1), 012001.
- Gathani, K. M. ve Raghavendra, S. S. (2016). "Scaffolds in regenerative endodontics: A review". *Dental Research Journal*, 13(5), 379-386.
- Genah, S., Monici, M. ve Morbidelli, L. (2021). "The Effect of Space Travel on Bone Metabolism: Considerations on Today's Major Challenges and Advances in Pharmacology". *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9).
- Gentile, P., Nandagiri, V. K., Pabari, R., Daly, J., Tonda-Turo, C., Ciardelli, G. ve Ramtoola, Z. (2015). "Influence of Parathyroid Hormone-Loaded PLGA Nanoparticles in Porous Scaffolds for Bone Regeneration". *International journal of molecular sciences*, 16(9), 20492-20510.
- Ghiasi, M. S., Chen, J., Vaziri, A., Rodriguez, E. K. ve Nazarian, A. (2017). "Bone fracture healing in mechanobiological modeling: A review of principles and methods". *Bone Reports*, 6, 87-100.
- Giannotti, L., Di Chiara Stanca, B., Spedicato, F., Nitti, P., Damiano, F., Demitri, C., Calabriso, N., Annunziata Carluccio M., Palermo, A., Siculella, L. ve Stanca, E. (2023). "Progress in Regenerative Medicine: Exploring Autologous Platelet Concentrates and Their Clinical Applications". *Genes*, 14(9).
- Gistelinck, C., Witten, P. E., Huysseune, A., Symoens, S., Malfait, F., Larionova, D., Simoens, P., Dierick, M., Van Hoorebeke, L., De Paepe, A., Kwon, R. Y. Weis, M., Eyre, D.R., Willaert, A. ve Coucke, P. J. (2016). "Loss of type I collagen telopeptide lysyl hydroxylation causes musculoskeletal abnormalities in a zebrafish model of Bruck syndrome". *Journal of Bone and Mineral Research*, 31(11), 1930-1942.

- Giuliani, N., Mangoni, M. ve Rizzoli, V. (2009). "Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in multiple myeloma: Identification of potential therapeutic targets". *Experimental Hematology*, 37(8), 879-886.
- Golpasandhagh, L., Samie, N., Sabiza, S. ve Rezaie, A. (2023). "Histopathological evaluation of the effect of melatonin gel on bone regeneration in rat model". *Journal of Indian Society of Periodontology*, 27(4), 368-373.
- Gómez-Barrena, E. ve Ehrnthaller, C. (2024). "Long bone uninfected non-union: grafting techniques". *EFORT Open Reviews*, 9(5), 329.
- Gong, Y., Li, S., Zeng, W., Yu, J., Chen, Y. ve Yu, B. (2019). "Controlled in vivo bone formation and vascularization using ultrasound-triggered release of recombinant vascular endothelial growth factor from poly (D, L-lactic-co-glycolicacid) microbubbles". *Frontiers in pharmacology*, 10, 413.
- González, A., Alonso-González, C., González-González, A., Menéndez-Menéndez, J., Cos, S. ve Martínez-Campa, C. (2021). "Melatonin as an Adjuvant to Antiangiogenic Cancer Treatments". *Cancers*, 13(13), 3263
- Gooneratne, N. S., Edwards, A. Y. Z., Zhou, C., Cuellar, N., Grandner, M. A. ve Barrett, J. S. (2012). "Melatonin pharmacokinetics following two different oral surge-sustained release doses in older adults". *Journal of pineal research*, 52(4), 437.
- Gökçe, O. N., Aykora, D., Danışman, M., Demir, U., Aydeğer, C., Suner, S. C., Oral, A., Karaboga, İ. ve Uzun, M. (2024). "Development of melatonin-embedded PLGA-PEG6000 nanofiber biomaterial, and investigation of the effects on abdominal adhesion formation". *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 39(1), 63-75.
- Grael, H., Bossard, C., Collignon, A. M., Wauquier, F., Lesieur, J., Rochefort, G. Y., Jallot, E., Lao, J. ve Wittrant, Y. (2022). "Osteogenic Effect of Fisetin Doping in Bioactive Glass/Poly(caprolactone) Hybrid Scaffolds". *ACS Omega*, 7(26), 22279-22290.
- Gu, C., Zhou, Q., Hu, X., Ge, X., Hou, M., Wang, W., Liu, H., Shi, Q., Xu, Y., Zhu, X., Yang, H., Chen, X., Liu, T. ve He, F. (2024). "Melatonin rescues the mitochondrial function of bone marrow-derived mesenchymal stem cells and improves the repair

- of osteoporotic bone defect in ovariectomized rats”. *Journal of Pineal Research*, 76(1), e12924.
- Guan, H., Kong, N., Tian, R., Cao, R., Liu, G., Li, Y., Wei, Q., Jiao, M., Lei, Y., Xing, F., Tian, P., Wang, K., Yang, P. (2022). “Melatonin increases bone mass in normal, perimenopausal, and postmenopausal osteoporotic rats via the promotion of osteogenesis”. *Journal of Translational Medicine*, 20(1), 1-15.
- Gunatillake, P. A., Adhikari, R. ve Gadegaard, N. (2003). "Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering". *European cells & materials*, 5, 1-16.
- Guo, L., Liang, Z., Yang, L., Du, W., Yu, T., Tang, H., Li, C. ve Qiu, H. (2021). “The role of natural polymers in bone tissue engineering”. *Journal of Controlled Release*, 338, 571-582.
- Guo, M., Chu, Z., Yao, J., Feng, W., Wang, Y., Wang, L. ve Fan, Y. (2016). “The effects of tensile stress on degradation of biodegradable PLGA membranes: A quantitative study”. *Polymer Degradation and Stability*, 124, 95-100.
- Gurler, E. B., Ergul, N. M., Ozbek, B., Ekren, N., Oktar, F. N., Haskoylu, M. E., Oner, E. T., Eroglu, M. S., Ozbeyli, D., Korkut, V., Temiz, A. F., Kocanalı, N., Gungordu, R. J., Kılıçkan, D. B. ve Gunduz, O. (2019). “Encapsulated melatonin in polycaprolactone (PCL) microparticles as a promising graft material”. *Materials Science and Engineering: C*, 100, 798-808.
- Güven, N., Özkan, S., Türközü, T., Koç, S., Keleş, Ö. F., Yener, Z. ve Karasu, A. (2022). “The effect of Theranekron on femur fracture healing in an experimental rat model”. *Joint Diseases and Related Surgery*, 33(2), 374-384.
- Haddadi, G. H., Shirazi, A., Sepehrizadeh, Z., Ghazi-Khansari, M., Minaee, B., Farzaneh-Nejad, A., Haddadi, M. ve Meshkibaf, M. (2009). “Melatonin modulates the expression of “vascular endothelial growth factor” gene in irradiated rat cervical spinal cord”. *IFMBE Proceedings*, 25(3), 540-543.

- Halloran, D., Durbano, H. W. ve Nohe, A. (2020). “Bone Morphogenetic Protein-2 in Development and Bone Homeostasis”. *Journal of Developmental Biology*, 8(3), 19.
- Hankenson, K. D., Dishowitz, M., Gray, C. ve Schenker, M. (2011). “Angiogenesis in Bone Regeneration”. *Injury*, 42(6), 556.
- Hassan, M., Sulaiman, M., Yuvaraju, P. D., Galiwango, E., Rehman, I. U., Al-Marzouqi, A. H., Khaleel, A. ve Mohsin, S. (2022). “Biomimetic PLGA/strontium-zinc nano hydroxyapatite composite scaffolds for bone regeneration”. *Journal of functional biomaterials*, 13(1), 13.
- Hastalık, E., Halıcı, M., Öner, M., Güney, A., Canöz, Ö., Narin, F. ve Halıcı, C. (2010). “Melatonin promotes fracture healing in the rat model”. *Joint Diseases and Related Surgery*, 21(3), 172-177.
- Hatakeyama, J., Anan, H., Hatakeyama, Y., Matsumoto, N., Takayama, F., Wu, Z., Matsuzaki, E., Minakami, M., Izumi, T. ve Nakanishi, H. (2019). “Induction of bone repair in rat calvarial defects using a combination of hydroxyapatite with phosphatidylserine liposomes”. *Journal of Oral Science*, 61(1), 111-118.
- Hayman, A. (2008). “Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) and the osteoclast/immune cell dichotomy”. *Autoimmunity*, 41(3), 218-223.
- He, X., Liu, W., Liu, Y., Zhang, K., Sun, Y., Lei, P. ve Hu, Y. (2022). “Nano artificial periosteum PLGA/MgO/Quercetin accelerates repair of bone defects through promoting osteogenic – angiogenic coupling effect via Wnt/ β -catenin pathway”. *Materials Today Bio*, 16, 100348.
- He, Y. ve Lu, F. (2016). “Development of synthetic and natural materials for tissue engineering applications using adipose stem cells”. *Stem cells international*, 2016(1), 5786257.
- He, Y., Wang, Y., Yu, S., Wang, L., Dou, Y., Ma, R., Cao, S., Song, W., ve Ma, P. (2024). “BMP2 enhance the osteogenic effect of BMSCs-derived exosomes in skull defect of diabetic rats”. *Materials & Design*, 248, 113517.

- Helmrich, U., Di Maggio, N., Güven, S., Groppa, E., Melly, L., Largo, R. D., Heberer, M., Martin, I., Scherberich, A. ve Banfi, A. (2013). "Osteogenic graft vascularization and bone resorption by VEGF-expressing human mesenchymal progenitors". *Biomaterials*, 34(21), 5025-5035.
- Histing, T., Anton, C., Scheuer, C., Garcia, P., Holstein, J. H., Klein, M., Matthys, R., Pohlemann, T. ve Menger, M. D. (2012). "Melatonin impairs fracture healing by suppressing rankl-mediated bone remodeling". *Journal of Surgical Research*, 173(1), 83-90.
- Hoang, D. M., Pham, P. T., Bach, T. Q., Ngo, A. T. L., Nguyen, Q. T., Phan, T. T. K., Nguyen, G. H., Le, P. T. T., Hoang, V. T., Forsyth, N. R., Heke, M. ve Nguyen, L. T. (2022). "Stem cell-based therapy for human diseases". *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 7(1), 1-41.
- Hollinger, J. O. ve Schmitz, J. P. (1987). "Restoration of bone discontinuities in dogs using a biodegradable implant". *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 45(7), 594-600.
- Hu, K. ve Olsen, B. R. (2016). "The roles of vascular endothelial growth factor in bone repair and regeneration". *Bone*, 91, 30.
- Huang, A. chun shuo, Ishida, Y., Hatano-sato, K., Oishi, S., Hosomichi, J., Usuni-fujita, R., Yamaguchi, H., Tsujimoto, H., Sasai, A., Ochi, A. ve Ono, T. (2024). "NF- κ B Decoy Oligodeoxynucleotide-Loaded Poly Lactic-co-glycolic Acid Nanospheres Facilitate Socket Healing in Orthodontic Tooth Movement". *International Journal of Molecular Sciences*, 25(10), 5223.
- Huang, J., Li, Y. ve He, C. (2021). "Melatonin having Therapeutic Bone Regenerating Capacity in Biomaterials". *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 23(5), 707-718.
- Huang, J., Li, Y., Wang, L. ve He, C. (2021). "Combined Effects of Low-Frequency Pulsed Electromagnetic Field and Melatonin on Ovariectomy-Induced Bone Loss in Mice". *Bioelectromagnetics*, 42(8), 616-628.

- Huang, X., Chen, W., Gu, C., Liu, H., Hou, M., Qin, W., Zhu, X., Chen, X., Liu, T., Yang, H. ve He, F. (2023). “Melatonin suppresses bone marrow adiposity in ovariectomized rats by rescuing the imbalance between osteogenesis and adipogenesis through SIRT1 activation”. *Journal of Orthopaedic Translation*, 38, 84-97.
- Huang, Y., Xu, Y., Huang, Z., Mao, J., Hui, Y., Rui, M., Jiang, X., Wu, J., Ding, Z., Feng, Y., Gu, Y., ve Chen, L. (2024). “Melatonin and calcium phosphate crystal-loaded poly(L-lactic acid) porous microspheres reprogram macrophages to improve bone repair”. *Journal of Materials Chemistry B*, 12(30), 7367-7383.
- Inoue, S., Fujikawa, K., Matsuki-Fukushima, M. ve Nakamura, M. (2020). “Repair processes of flat bones formed via intramembranous versus endochondral ossification”. *Journal of Oral Biosciences*, 62(1), 52-57.
- Ishaniya, W., Sumithaa, C., Raghunandhakumar, S., Vimalraj, S. ve Ganeshpandian, M. (2022). “Nano-encapsulation of melatonin into polydiacetylene-phospholipid assembly for sustained-release and enhanced bone formation in zebrafish”. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 72, 103415.
- Jain, A., Kumar, S., Aggarwal, A. N. ve Jajodia, N. (2015). “Augmentation of bone healing in delayed and atrophic nonunion of fractures of long bones by partially decalcified bone allograft (decal bone)”. *Indian Journal of Orthopaedics*, 49(6), 637.
- Jaiswal, A. K., Dhumal, R. V., Ghosh, S., Chaudhari, P., Nemani, H., Soni, V. P., Vanage, G. R., ve Bellare, J. R. (2013). “Bone healing evaluation of nanofibrous composite scaffolds in rat calvarial defects: a comparative study”. *Journal of biomedical nanotechnology*, 9(12), 2073-2085.
- Jakoi, A. M., Iorio, J. A. ve Cahill, P. J. (2015). “Autologous bone graft harvesting: a review of grafts and surgical techniques”. *Musculoskeletal Surgery*, 99(3), 171-178.
- Jang, H. J. ve Yoon, J. K. (2024). “The Role of Vasculature and Angiogenic Strategies in Bone Regeneration”. *Biomimetics*, 9(2), 75.

- Jarrar, H., Çetin Altındal, D. ve Gümüşderelioğlu, M. (2021). “Scaffold-based osteogenic dual delivery system with melatonin and BMP-2 releasing PLGA microparticles”. *International Journal of Pharmaceutics*, 600, 120489.
- Jayawardena, H. S. N., Liyanage, S. H., Rathnayake, K., Patel, U. ve Yan, M. (2021). “Analytical Methods for Characterization of Nanomaterial Surfaces”. *Analytical chemistry*, 93(4), 1889.
- Jia, F., Guan, J., Wang, J., Li, M., Zhang, Y., Xie, L., Han, P., Lin, H., Huang, X., Lan, J. ve Huang, Y. (2025). “Zinc and melatonin mediated antimicrobial, anti-inflammatory, and antioxidant coatings accelerate bone defect repair”. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 245, 114335.
- Jiang, T., Xia, C., Chen, X., Hu, Y., Wang, Y., Wu, J., Chen, S. ve Gao, Y. (2019). “Melatonin promotes the BMP9-induced osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells by activating the AMPK/ β -catenin signalling pathway”. *Stem Cell Research and Therapy*, 10(1), 1-13.
- Jiang, X., Liu, J., Li, S., Qiu, Y., Wang, X., He, X., Pedersen, T., Mustafa, K., Mustafa, M., Kantarcı, A. ve Xing, Z. (2022). “The effect of resolvin D1 on bone regeneration in a rat calvarial defect model”. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 16(11), 987-997.
- Jin, S., Xia, X., Huang, J., Yuan, C., Zuo, Y., Li, Y. ve Li, J. (2021). “Recent advances in PLGA-based biomaterials for bone tissue regeneration”. *Acta biomaterialia*, 127, 56-79.
- Jones, M. L., Bancroft, J. D. ve Gamble, M. 2008. “Connective Tissues and Stains”. *Theory and Practice of Histological Techniques*, Sixth Edition, 135-160.
- Jun, J. Y., Kim, J. H., Kim, M., Hong, S., Kim, M., Ryu, G. H., Park, J. H., Jung, H. S. ve Sohn, Y. (2023). “Persicae Semen Promotes Bone Union in Rat Fractures by Stimulating Osteoblastogenesis through BMP-2 and Wnt Signaling”. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(8), 7388.

- Kailasa, S., Reddy, M. S. B., Maurya, M. R., Rani, B. G., Rao, K. V. ve Sadasivuni, K. K. (2021). "Electrospun Nanofibers: Materials, Synthesis Parameters, and Their Role in Sensing Applications". *Macromolecular Materials and Engineering*, 306(11).
- Kalfas, I. H. (2001). "Principles of bone healing". *Neurosurgical focus*, 10(4), 1-4.
- Kaliva, M. ve Vamvakaki, M. (2020). "Nanomaterials characterization". *Polymer Science and Nanotechnology: Fundamentals and Applications*, 401-433.
- Kammerer, A., Hartmann, F. A., Nau, C., Leiblein, M., Schaible, A., Neijhoft, J., Henrich, D., Verboket, R. ve Janko, M. (2024). "The Impact of Defect Size on Bone Healing in Critical-Size Bone Defects Investigated on a Rat Femur Defect Model Comparing Two Treatment Methods". *Bioengineering*, 11(3), 287.
- Kangari, P., Roshangar, L., Tanideh, N., Afshari, F., Chenari, N., Talaei-Khozani, T. ve Razmkhah, M. (2024). "Shilajit Boosts Osteogenic Ability of Mesenchymal Stem Cells for Regeneration of Rat Bone Defect". *Regenerative Engineering and Translational Medicine*, 10(2), 284-293.
- Kangari, P., Talaei-Khozani, T., Razeghian-Jahromi, I. ve Razmkhah, M. (2020). "Mesenchymal stem cells: amazing remedies for bone and cartilage defects". *Stem Cell Research & Therapy*, 11, 1-21.
- Kasuya, S., Kato-Kogoe, N., Omori, M., Yamamoto, K., Taguchi, S., Fujita, H., Imagawa, N., Sunano, A., Inoue, K., Ito, Y., Hirata, A., Ueno, T. ve Moy, P. K. (2018). "New Bone Formation Process Using Bio-Oss and Collagen Membrane for Rat Calvarial Bone Defect: Histological Observation". *Implant dentistry*, 27(2), 158-164.
- Kaval, B., Şen, F. D., Batmaz, K. K., Ekinci, M. ve Öztürk, A. A. (2023). "Latest research about active pharmaceutical ingredient loaded Poly Lactic Acid-co-Glycolic Acid (PLGA) based drug delivery system in Türkiye". *European Journal of Life Sciences*, 1(3), 127-139.
- Kernen, E., De Rooij, N., Smit, T., Huyghe, J., Van Duyl, W., Tanase, D. ve French, P. J. (2005). "Microelectrodes for measuring streaming potential in bone". *Proceedings of IEEE Sensors*, 2005, 810-813.

- Khan, A., Hadano, Y., Takehara, H. ve Ichiki, T. (2022). "Effects of physico-chemical treatments on PLGA 50:50 electrospun nanofibers". *Polymer*, 261, 125400.
- Kheiry, E. V., Parivar, K., Baharara, J., Bazzaz, B. S. F. ve Iranbakhsh, A. (2018). "The osteogenesis of bacterial cellulose scaffold loaded with fisetin". *Iranian journal of basic medical sciences*, 21(9), 965.
- Kikyo, N. (2024). "Circadian Regulation of Bone Remodeling". *International Journal of Molecular Sciences*, 25(9), 4717.
- Kim, I. G., Hwang, M. P., Du, P., Ko, J., Ha, C. won, Do, S. H. ve Park, K. (2015). "Bioactive cell-derived matrices combined with polymer mesh scaffold for osteogenesis and bone healing". *Biomaterials*, 50(1), 75-86.
- Kim, J. L., Park, S. H., Jeong, D., Nam, J. S. ve Kang, Y. H. (2012). "Osteogenic activity of silymarin through enhancement of alkaline phosphatase and osteocalcin in osteoblasts and tibia-fractured mice". *Experimental Biology and Medicine*, 237(4), 417-428.
- Kim, K. T., Lee, Y. S. ve Han, I. (2020). "The role of epigenomics in osteoporosis and osteoporotic vertebral fracture". *International Journal of Molecular Sciences*, 21(24), 1-22.
- Kim, W. J., Shin, H. L., Kim, B. S., Kim, H. J. ve Ryoo, H. M. (2020). "RUNX2-modifying enzymes: therapeutic targets for bone diseases". *Experimental & Molecular Medicine*, 52(8), 1178-1184.
- Klettner, A., Kampers, M., Töbelmann, D., Roider, J. ve Dittmar, M. (2021). "The Influence of Melatonin and Light on VEGF Secretion in Primary RPE Cells". *Biomolecules*, 11(1), 114.
- Kobayashi-Sun, J., Suzuki, N., Hattori, A., Yamaguchi, M. ve Kobayashi, I. (2020). "Melatonin suppresses both osteoblast and osteoclast differentiation through repression of epidermal Erk signaling in the zebrafish scale". *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 530(4), 644-650.

- Kommenou, A., Karayannopoulou, M., Polizopoulou, Z. S., Constantinidis, T. C. ve Dessiris, A. (2005). "Correlation of serum alkaline phosphatase activity with the healing process of long bone fractures in dogs". *Veterinary Clinical Pathology*, 34(1), 35-38.
- Komori, T. (2022). "Whole Aspect of Runx2 Functions in Skeletal Development". *International Journal of Molecular Sciences*, 23(10), 5776.
- Koons, G. L., Diba, M. ve Mikos, A. G. (2020). "Materials design for bone-tissue engineering". *Nature Reviews Materials*, 5(8), 584-603.
- Kowalczyk, D. ve Pitucha, M. (2019). "Application of FTIR method for the assessment of immobilization of active substances in the matrix of biomedical materials". *Materials*, 12(18), 2972.
- Kuru, L., Griffiths, G. S., Petrie, A. ve Olsen, I. (1999). "Alkaline phosphatase activity is upregulated in regenerating human periodontal cells". *Journal of Periodontal Research*, 34(2), 123-127.
- Ladizesky, M. G., Cutrera, R. A., Boggio, V., Somoza, J., Centrella, J. M., Mautalen, C. ve Cardinali, D. P. (2001). "Effect of melatonin on bone metabolism in ovariectomized rats". *Life Sciences*, 70(5), 557-565.
- Lai, M., Jin, Z., Tang, Q. ve Lu, M. (2017). "Sustained release of melatonin from TiO₂ nanotubes for modulating osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in vitro". *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 28(15), 1651-1664.
- Lane, C., Lin, A. ve Goyal, N. (2023). "Scalp and Calvarium Reconstruction". *Otolaryngologic clinics of North America*, 56(4), 741-755.
- Lee, D. H., Kim, I. K., Cho, H. Y., Seo, J. H., Jang, J. M. ve Kim, J. (2018). "Effect of herbal extracts on bone regeneration in a rat calvaria defect model and screening system". *Journal of the Korean Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*, 44(2), 79-85.
- Lee, E. J., Kasper, F. K. ve Mikos, A. G. (2014). "Biomaterials for Tissue Engineering". *Annals of biomedical engineering*, 42(2), 323.

- Lee, H. Y., An, S. B., Hwang, S. Y., Hwang, G. Y., Lee, H. L., Park, H. J., Shin, J., Kim, K. N., Wee, S. W., Yoon, S., L. ve Ha, Y. (2024). "Synergistic Enhancement of Spinal Fusion in Preclinical Models Using Low-Dose rhBMP-2 and Stromal Vascular Fraction in an Injectable Hydrogel Composite". *Materials Today Bio*, 101379.
- Lee, J. Y., Son, S. J., Son, J. S., Kang, S. S. ve Choi, S. H. (2016). "Bone-Healing Capacity of PCL/PLGA/Duck Beak Scaffold in Critical Bone Defects in a Rabbit Model". *BioMed Research International*, 2016, 2136215.
- Lee, S., Kim, H. J., Cho, H. B., Kim, H. R., Lee, S., Park, J. I. ve Park, K. H. (2023). "Melatonin loaded PLGA nanoparticles effectively ameliorate the in vitro maturation of deteriorated oocytes and the cryoprotective abilities during vitrification process". *Biomaterials Science*, 11(8), 2912-2923.
- Lei, X., Xu, Z., Huang, L., Huang, Y., Tu, S., Xu, L. ve Liu, D. (2023). "The potential influence of melatonin on mitochondrial quality control: a review". *Frontiers in Pharmacology*, 14, 1332567.
- Leu, A., Stieger, S. M., Dayton, P., Ferrara, K. W. ve Leach, J. K. (2008). "Angiogenic Response to Bioactive Glass Promotes Bone Healing in an Irradiated Calvarial Defect". *Tissue Engineering. Part A*, 15(4), 877.
- Li, S., Zhang, L., Liu, C., Kim, J., Su, K., Chen, T., Zhao, L., Lu, X., Zhang, H., Cui, Y., Cui, X., Yuan, F. ve Pan, H. (2023). "Spontaneous immunomodulation and regulation of angiogenesis and osteogenesis by Sr/Cu-borosilicate glass (BSG) bone cement to repair critical bone defects". *Bioactive Materials*, 23, 101-117.
- Li, Y. ve Zhang, Z. Z. (2018). "Sustained curcumin release from PLGA microspheres improves bone formation under diabetic conditions by inhibiting the reactive oxygen species production". *Drug Design, Development and Therapy*, 12, 1453.
- Li, Yiran, Fang, L., Zhang, R., Wang, S., Li, Y., Yan, Y., Yu, Y., Cheng, Y. C. ve Sun, Y. P. (2020). "Melatonin stimulates VEGF expression in human granulosa-lutein cells: A potential mechanism for the pathogenesis of ovarian hyperstimulation syndrome". *Molecular and Cellular Endocrinology*, 518, 110981.

- Lin, X., Patil, S., Gao, Y. G. ve Qian, A. (2020). "The Bone Extracellular Matrix in Bone Formation and Regeneration". *Frontiers in Pharmacology*, 11, 521497.
- Linder, C. H., Enander, K. ve Magnusson, P. (2014). "Alkaline phosphatase interacts with collagen during mineralization". *Bone Abstracts*, 3.
- Liu, C., Zhang, W., Gao, M., Yang, K., Tan, L. ve Zhao, W. (2022). "A Degradable and Osteogenic Mg-Based MAO-MT-PLGA Drug/Ion Delivery System for Treating an Osteoporotic Fracture". *Pharmaceutics*, 14(7), 1481.
- Liu, J. C., Lengner, C. J., Gaur, T., Lou, Y., Hussain, S., Jones, M. D., Borodic, B., Colby, J. L., Steinman, H. A., van Wijnen, A. J., Jones, S. N., Stein, G. S. ve Lian, J. B. (2011). "Runx2 protein expression utilizes the Runx2 P1 promoter to establish osteoprogenitor cell number for normal bone formation". *Journal of Biological Chemistry*, 286(34), 30057-30070.
- Liu, X., Ma, Y., Chen, M., Ji, J., Zhu, Y., Zhu, Q., Guo, M. ve Zhang, P. (2021). "Ba/Mg co-doped hydroxyapatite/PLGA composites enhance X-ray imaging and bone defect regeneration". *Journal of Materials Chemistry B*, 9(33), 6691-6702.
- Lu, L., Peter, S. J., D. Lyman, M., Lai, H. L., Leite, S. M., Tamada, J. A., Uyama, S., Vacanti, J. P., Robert Langer ve Mikos, A. G. (2000). "In vitro and in vivo degradation of porous poly(DL-lactic-co-glycolic acid) foams". *Biomaterials*, 21(18), 1837-1845.
- Lu, Y., Cheng, D., Niu, B., Wang, X., Wu, X. ve Wang, A. (2023). "Properties of Poly (Lactic-co-Glycolic Acid) and Progress of Poly (Lactic-co-Glycolic Acid)-Based Biodegradable Materials in Biomedical Research". *Pharmaceutics*, 16(3), 454.
- Luchetti, F., Canonico, B., Bartolini, D., Arcangeletti, M., Ciffolilli, S., Murdolo, G., Piroddi, M., Papa, S., Reiter, R. J. ve Galli, F. (2014). "Melatonin regulates mesenchymal stem cell differentiation: a review". *Journal of Pineal Research*, 56(4), 382-397.
- Luo, Y., Chen, S., Shi, Y. ve Ma, J. (2018). "3D printing of strontium-doped hydroxyapatite based composite scaffolds for repairing critical-sized rabbit calvarial defects". *Biomedical Materials*, 13(6), 065004.

- Lv, N., Hou, M., Deng, L., Hua, X., Zhou, X., Liu, H., Zhu, X., Xu, Y., Qian, Z., Li, Q., Liu, M. ve He, F. (2024). "A sponge-like nanofiber melatonin-loaded scaffold accelerates vascularized bone regeneration via improving mitochondrial energy metabolism". *Materials Today Bio*, 26, 101078.
- Ma, Q., Reiter, R. J. ve Chen, Y. (2019). "Role of melatonin in controlling angiogenesis under physiological and pathological conditions". *Angiogenesis*, 23(2), 91-104.
- Mabrouk, M., Ibrahim Fouad, G., Beherei, H. H. ve Das, D. B. (2022). "Barium Oxide Doped Magnesium Silicate Nanopowders for Bone Fracture Healing: Preparation, Characterization, Antibacterial and In Vivo Animal Studies". *Pharmaceutics*, 14(8), 1582.
- Macdonald, I. J., Tsai, H. C., Chang, A. C., Huang, C. C., Yang, S. F. ve Tang, C. H. (2021). "Melatonin Inhibits Osteoclastogenesis and Osteolytic Bone Metastasis: Implications for Osteoporosis". *International Journal of Molecular Sciences*, 22(17), 9435.
- Mahmoud, H. M., Sheriff, H. E. ve Zaki, A. A. (2020). "Effect of topical Insulin administration on bone defect healing in diabetic rats". *Brazilian Dental Science*, 23(2), 5-p.
- Maji, K. ve Pramanik, K. (2022). "Electrospun scaffold for bone regeneration". *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 71(11), 842-857.
- Marcotulli, M., Iafrate, L., Senturk, E., Pica, A., Marinozzi, F., Bini, F., Ruocco, G., Scognamiglio, C. ve Cidonio, G. (2024). "Active Biomaterials for Bone Tissue Regeneration". *Stimuli-Responsive Materials for Tissue Engineering*, 211-246.
- Marek, R., Ćwieka, H., Donohue, N., Holweg, P., Moosmann, J., Beckmann, F., Brcic, I., Schwarze, U. Y., Iskhakova, K., Chaabane, M., Sefa, S., Zeller-Plumhoff, B., Weinberg, A. M., Willumeit-Römer, R., Sommer, N. G. ve Sommer, N. G. (2023). "Degradation behavior and osseointegration of Mg–Zn–Ca screws in different bone regions of growing sheep: a pilot study". *Regenerative Biomaterials*, 10, rbac077.

- Marelli, B., Ghezzi, C. E. ve Nazhat, S. N. (2013). "Mineralization of nanomaterials for bone tissue engineering". *Nanomaterials in Tissue Engineering*, 387-416.
- Maria, S. ve Witt-Enderby, P. A. (2014). "Melatonin effects on bone: potential use for the prevention and treatment for osteopenia, osteoporosis, and periodontal disease and for use in bone-grafting procedures". *Journal of Pineal Research*, 56(2), 115-125.
- Maria, S., Witt-Enderby, P. A. 2014. "Melatonin effects on bone: potential use for Martins, L. G., khalil, N. M. ve Mainardes, R. M. (2017). "PLGA Nanoparticles and Polysorbate-80-Coated PLGA Nanoparticles Increase the In vitro Antioxidant Activity of Melatonin". *Current Drug Delivery*, 15(4), 554-563.
- Martins, L. G., Khalil, N. M. ve Mainardes, R. M. (2017). "Application of a validated HPLC-PDA method for the determination of melatonin content and its release from poly(lactic acid) nanoparticles". *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 7(6), 388.
- Martins, L. G., Khalil, N. M. ve Mainardes, R. M. (2017). "PLGA Nanoparticles and Polysorbate-80-Coated PLGA Nanoparticles Increase the In vitro Antioxidant Activity of Melatonin". *Current Drug Delivery*, 15(4), 554-563.
- Masters, A., Pandi-Perumal, S. R., Seixas, A., Girardin, J.-L. ve McFarlane, S. I. (2014). "Melatonin, the Hormone of Darkness: From Sleep Promotion to Ebola Treatment". *Brain disorders & therapy*, 4(1), 1000151.
- McGee-Lawrence, M. E., Carpio, L. R., Bradley, E. W., Dudakovic, A., Lian, J. B., van Wijnen, A. J., Kakar, S., Hsu, W. ve Westendorf, J. J. (2014). "Runx2 is required for early stages of endochondral bone formation but delays final stages of bone repair in Axin2-deficient mice". *Bone*, 66, 277-286.
- McGovern, J. A., Griffin, M. ve Hutmacher, D. W. (2018). "Animal models for bone tissue engineering and modelling disease". *Disease models & mechanisms*, 11(4), 033084.
- Mederle, O. A., Balas, M., Ioanoviciu, S. D., Gurban, C. V., Tudor, A. ve Borza, C. (2018). "Correlations between bone turnover markers, serum magnesium and bone mass density in postmenopausal osteoporosis". *Clinical Interventions in Aging*, 13, 1383.

- Mei, G., Wang, J., Wang, J., Ye, L., Yi, M., Chen, G., Zhang, Y., Tang, Q. ve Chen, L. (2024). "The specificities, influencing factors, and medical implications of bone circadian rhythms". *The FASEB Journal*, 38(13), e23758.
- Meller, Y., Kestenbaum, R. S., Mozes, M., Mozes, G., Yagil, R. ve Shany, S. (1984). "Mineral and endocrine metabolism during fracture healing in dogs". *Clinical orthopaedics and related research*, 187(187), 289-295.
- Mendes, D., Domingues, J. A., Hausen, M. A., Cattani, S. M. M., Aragones, A., Oliveira, A. L. R., Inácio, R. F., Barbo, M. L. P. ve Duek, E. A. R. (2017). "Study of Mesenchymal Stem Cells Cultured on a Poly(Lactic-co-Glycolic Acid) Scaffold Containing Simvastatin for Bone Healing. *Journal of Applied Biomaterials & Functional Materials*, 15(2), 133.
- Menger, M. M., Tobias, A. L., Bauer, D., Bleimehl, M., Scheuer, C., Menger, M. D., Histing, T. ve Laschke, M. W. (2023). "Parathyroid hormone stimulates bone regeneration in an atrophic non-union model in aged mice". *Journal of Translational Medicine*, 21(1), 844.
- Migliorini, F., Cuzzo, F., Torsiello, E., Spiezia, F., Oliva, F. ve Maffulli, N. (2021). "Autologous Bone Grafting in Trauma and Orthopaedic Surgery: An Evidence-Based Narrative Review". *Journal of Clinical Medicine*, 10(19), 4347.
- Mirmajidi, T., Chogan, F., Rezayan, A. H. ve Sharifi, A. M. (2021). "In vitro and in vivo evaluation of a nanofiber wound dressing loaded with melatonin". *International Journal of Pharmaceutics*, 596, 120213.
- Miron, R. J. (2024). "Optimized bone grafting". *Periodontology* 2000, 94(1), 143-160.
- Mirza-Aghazadeh-Attari, M., Mihanfar, A., Yousefi, B. ve Majidinia, M. (2022). "Nanotechnology-based advances in the efficient delivery of melatonin". *Cancer Cell International*, 22(1), 1-11.

- Mittal, G., Sahana, D. K., Bhardwaj, V. ve Ravi Kumar, M. N. V. (2007). “Estradiol loaded PLGA nanoparticles for oral administration: Effect of polymer molecular weight and copolymer composition on release behavior in vitro and in vivo”. *Journal of Controlled Release*, 119(1), 77-85.
- Molitoris, K. H., Huang, M. ve Baht, G. S. (2024). “Osteoimmunology of Fracture Healing”. *Current Osteoporosis Reports*, 22(3), 330-339.
- Montarele, L. F., Pitol, D. L., Pereira, B. F., Feldman, S., Fazan, V. P. S. ve Issa, J. P. M. (2022). “Histological and Immunohistochemical Analysis of the Effects of Topical Melatonin Treatment Associated with Collagen Sponge and rhBMP-2 Protein on Bone Remodeling”. *Biomolecules*, 12(12), 1738.
- Munmun, F. ve Witt-Enderby, P. A. (2021). “Melatonin effects on bone: implications for use as a therapy for managing bone loss”. *Journal of pineal research*, 71(1), e12749.
- Munmun, F., Mohiuddin, O. A., Hoang, V. T., Burow, M. E., Bunnell, B. A., Sola, V. M., Carpentieri, A. R. ve Witt-Enderby, P. A. (2022). “The role of MEK1/2 and MEK5 in melatonin-mediated actions on osteoblastogenesis, osteoclastogenesis, bone microarchitecture, biomechanics, and bone formation”. *Journal of Pineal Research*, 73(2), e12814.
- Namdar, A. ve Salahinejad, E. (2023). “Advances in ion-doping of Ca-Mg silicate bioceramics for bone tissue engineering”. *Coordination Chemistry Reviews*, 478, 215001.
- Narayanan, G., Vernekar, V. N., Kuyinu, E. L. ve Laurencin, C. T. (2016). “Poly (Lactic Acid)-Based Biomaterials for Orthopaedic Regenerative Engineering”. *Advanced drug delivery reviews*, 107, 247.
- Nashi, N. ve Kagda, F. H. (2023). “Current concepts of bone grafting in trauma surgery”. *Journal of Clinical Orthopaedics and Trauma*, 43, 102231.
- Nie, H., Ho, M. L., Wang, C. K., Wang, C. H. ve Fu, Y. C. (2009). “BMP-2 plasmid loaded PLGA/HAp composite scaffolds for treatment of bone defects in nude mice”. *Biomaterials*, 30(5), 892-901.

- Notodihardjo, F. Z., Kakudo, N., Kushida, S., Suzuki, K. ve Kusumoto, K. (2012). “Bone regeneration with BMP-2 and hydroxyapatite in critical-size calvarial defects in rats”. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*, 40(3), 287-291.
- Oliveira, J. P. R., Melendez-Ortiz, H. I., Bucio, E., Alves, P. T., Lima, M. I. S., Goulart, L. R., Mathor, M. B., Varca, G. H. C. ve Lugao, A. B. (2018). “Current Methods Applied to Biomaterials- Characterization Approaches, Safety Assessment and Biological International Standards”. *Current topics in medicinal chemistry*, 18(4), 256-274.
- Olson, J. L., Atala, A. ve Yoo, J. J. (2011). “Tissue Engineering: Current Strategies and Future Directions”. *Chonnam Medical Journal*, 47(1), 1.
- Osyczka, A. M., Diefenderfer, D. L., Bhargave, G. ve Leboy, P. S. (2004). “Different Effects of BMP-2 on Marrow Stromal Cells from Human and Rat Bone”. *Cells Tissues Organs*, 176(1-3), 109-119.
- Ottewell, P. D. (2016). “The role of osteoblasts in bone metastasis”. *Journal of Bone Oncology*, 5(3), 124-127.
- Otto, E., Knapstein, P. R., Jahn, D., Appelt, J., Frosch, K. H., Tsitsilonis, S. ve Keller, J. (2020). “Crosstalk of Brain and Bone—Clinical Observations and Their Molecular Bases”. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(14), 4946.
- Oury, F., Khrimian, L., Denny, C. A., Gardin, A., Chamouni, A., Goeden, N., Huang, Y., Lee, H., Srinivas, P., Gao, X-B., Suyama, S., Langer, T., Mann, J. J., Horvath, T. L., Bonnin, A. ve Karsenty, G. (2013). “Maternal and offspring pools of osteocalcin influence brain development and functions”. *Cell*, 155(1), 228-241.
- Park, K. H., Kang, J. W., Lee, E. M., Kim, J. S., Rhee, Y. H., Kim, M., Jeong, S. J., Park, Y. G. ve Kim, S. H. (2011). “Melatonin promotes osteoblastic differentiation through the BMP/ERK/Wnt signaling pathways”. *Journal of Pineal Research*, 51(2), 187-194.

- Park, S. Y., Lee, J. K., Lee, S. H., Kim, D. S., Jung, J. W., Kim, J. H., Baek, S. W., You, S., Hwang, D. Y. ve Han, D. K. (2024). "Multifunctional vitamin D-incorporated PLGA scaffold with BMP/VEGF-overexpressed tonsil-derived MSC via CRISPR/Cas9 for bone tissue regeneration". *Materials Today Bio*, 28, 101254.
- Paulini, M. R., Montarele, L. F., Pitol, D. L., Giannocco, G., Pereira, B. F., Buchaim, D. V., Reis, C. H. B., Buchaim, R. L. ve Issa, J. P. M. (2024). "Gene expression analysis of cytokines and MMPs in melatonin and rhBMP-2 enhanced bone remodeling". *World Journal of Orthopedics*, 15(11), 1075.
- Peng, K. T., Hsieh, M. Y., Lin, C. T., Chen, C. F., Lee, M. S., Huang, Y. Y. ve Chang, P. J. (2016). "Treatment of critically sized femoral defects with recombinant BMP-2 delivered by a modified mPEG-PLGA biodegradable thermosensitive hydrogel". *BMC Musculoskeletal Disorders*, 17(1), 1-14.
- Phutane, P., Telange, D., Agrawal, S., Gunde, M., Kotkar, K. ve Pethe, A. (2023). "Biofunctionalization and applications of polymeric nanofibers in tissue engineering and regenerative medicine". *Polymers*, 15(5), 1202.
- Pınar, U., Huri, Y., Hasirci, N. ve Hasirci, V. (2010). "Kemik Doku Mühendisliği". *Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*. 2010; 19: 206.
- Ping, Z., Wang, Z., Shi, J., Wang, L., Guo, X., Zhou, W., Hu, X., Wu, X., Liu, Y., Zhang, W., Yang, H., Xu, Y., Gu, Y. ve Geng, D. (2017). "Inhibitory effects of melatonin on titanium particle-induced inflammatory bone resorption and osteoclastogenesis via suppression of NF- κ B signaling". *Acta Biomaterialia*, 62, 362-371.
- Ponzano, M., Wiest, M. J., Coleman, A., Newton, E., Pakosh, M., Patsakos, E. M., Magnuson, D.S.K., Giangregorio, L.M. ve Craven, B. C. 2023. "The use of alkaline phosphatase as a bone turnover marker after spinal cord injury: A scoping review of human and animal studies". *Journal of Spinal Cord Medicine*, 46(2), 167-180.
- Poza, J. J., Pujol, M., Ortega-Albás, J. J. ve Romero, O. (2022). "Melatonin in sleep disorders". *Neurología (English Edition)*, 37(7), 575-585.

- Prakobkarn, J., Makeudom, A., Jenvoraphot, T., Supanchart, C., Krisanaprakornkit, S., Punyodom, W. ve Daranarong, D. (2022). “Biphasic nanofibrous scaffolds based on collagen and PLC for controlled release LL-37 in guided bone regeneration”. *Journal of Applied Polymer Science*, 139(7), 51629.
- Pretel, H., Lizarelli, R. F. ve Ramalho, L. T. (2007). “Effect of low-level laser therapy on bone repair: Histological study in rats”. *Lasers in Surgery and Medicine: The Official Journal of the American Society for Laser Medicine and Surgery*, 39(10), 788-796.
- Qian, J., Qin, H., Zeng, P., Hou, J., Mo, X., Shen, G., Zeng, H., Zhang, W., Chen, Y. ve Wan, G. (2023). “Metal-organic Zn-zoledronic acid and 1-hydroxyethylidene-1,1-diphosphonic acid nanostick-mediated zinc phosphate hybrid coating on biodegradable Zn for osteoporotic fracture healing implants”. *Acta biomaterialia*, 166, 685-704.
- Qu, H., Fu, H., Han, Z. ve Sun, Y. (2019). “Biomaterials for bone tissue engineering scaffolds: a review”. *RSC Advances*, 9(45), 26252.
- Radio, N. M., Doctor, J. S. ve Witt-Enderby, P. A. (2006). “Melatonin enhances alkaline phosphatase activity in differentiating human adult mesenchymal stem cells grown in osteogenic medium via MT2 melatonin receptors and the MEK/ERK (1/2) signaling cascade”. *Journal of Pineal Research*, 40(4), 332-342.
- Ramchandani, M. ve Robinson, D. (1998). “In vitro and in vivo release of ciprofloxacin from PLGA 50:50 implants”. *Journal of Controlled Release*, 54(2), 167-175.
- Rasoulilian, B., Sheikholislam, Z., Houshdar Tehrani, M. H., Chegeni, S., Hoveizi, E., Rezayat, S. M. ve Tavakol, S. (2024). “Unveiling the superior function of RADA in bone regeneration compared to KSL as two critical cores within self-assembling peptide nanofibers: Insights from in vitro and in vivo studies”. *Regenerative Therapy*, 26, 999-1009.

- Rathod, B., Desai, S., Samvelyan, H. J., Bock, L., Wu, J., Ohlsson, C., Palmquist, A., Alm, J. J., Newton, P. T., Andersson, G. ve Windahl, S. H. (2024). "Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP/ACP5) promotes bone length, regulates cortical and trabecular bone mass, and maintains growth plate architecture and width in a sex- and site-specific manner in mice". *Bone*, 188, 117223.
- Reich, K. M., Viitanen, P., Apu, E. H., Tangl, S. ve Ashammakhi, N. (2020). "The effect of diclofenac sodium-loaded PLGA rods on bone healing and inflammation: A histological and histomorphometric study in the femur of rats". *Micromachines (Basel)*, 11(12), 1-20.
- Reiter, R. J., Mayo, J. C., Tan, D. X., Sainz, R. M., Alatorre-Jimenez, M. ve Qin, L. (2016). "Melatonin as an antioxidant: under promises but over delivers". *Journal of pineal research*, 61(3), 253-278.
- Ren, M., Wang, X., Hu, M., Jiang, Y., Xu, D., Xiang, H., Lin, J. ve Yu, B. (2022). "Enhanced bone formation in rat critical-size tibia defect by a novel quercetin-containing alpha-calcium sulphate hemihydrate/nano-hydroxyapatite composite". *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 146, 112570.
- Ribeiro, M. R. G., Guilherme, H. G., Braga, A. N., Abreu, A. G., Pereira, É. M., Rodrigues, V., Bauer, J. ve de Fátima Carvalho Souza, S. (2023). "Physicochemical and histological analysis of an experimental endodontic repair material containing 45S5 bioactive glass". *Biotechnology letters*, 45(7), 799-809.
- Riggin, C. N., Qu, F., Kim, D. H., Huegel, J., Steinberg, D. R., Kuntz, A. F., Soslowsky, L. J., Mauck, R. L. ve Bernstein, J. (2017). "Electrospun PLGA Nanofiber Scaffolds Release Ibuprofen Faster and Degrade Slower after In Vivo Implantation". *Annals of biomedical engineering*, 45(10), 2348.
- Roberts, T. T. ve Rosenbaum, A. J. (2012). "Bone grafts, bone substitutes and orthobiologics: The bridge between basic science and clinical advancements in fracture healing". *Organogenesis*, 8(4), 114.

- Rosa, A. R., Steffens, D., Santi, B., Quintiliano, K., Steffen, N., Pilger, D. A. ve Pranke, P. (2017). "Development of VEGF-loaded PLGA matrices in association with mesenchymal stem cells for tissue engineering". *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 50(9), e5648.
- Sá, M. A., Ribeiro, H. J., Valverde, T. M., Sousa, B. R., Martins Júnior, P. A., Mendes, R. M., Ladeira, L.O., Resende, R.R., Kitten, G.T. ve Ferreira, A. J. (2016). "Single-walled carbon nanotubes functionalized with sodium hyaluronate enhance bone mineralization". *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 49(2), e4888.
- Sadowska, J. M., Ziminska, M., Ferreira, C., Matheson, A., Balouch, A., Bogle, J., Wojda, S., Redmond, J., Elakashif, A., Dunne, N., McCarthy, H. O., Donahue, S. ve O'Brien, F. J. (2023). "Development of miR-26a-activated scaffold to promote healing of critical-sized bone defects through angiogenic and osteogenic mechanisms". *Biomaterials*, 303, 122398.
- Saito, E., Liao, E. E., Hu, W. W., Krebsbach, P. H. ve Hollister, S. J. (2013). "Effects of designed PLLA and 50:50 PLGA scaffold architectures on bone formation in vivo". *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 7(2), 99-111.
- Saito, N., Okada, T., Horiuchi, H., Murakami, N., Takahashi, J., Nawata, M., Ota, H., Miyamoto, S., Nozaki, K. ve Takaoka, K. (2001). "Biodegradable poly-D, L-lactic acid-polyethylene glycol block copolymers as a BMP delivery system for inducing bone". *JBJS*, 83(1), S92-S98.
- Salhotra, A., Shah, H. N., Levi, B. ve Longaker, M. T. (2020). "Mechanisms of bone development and repair". *Nature reviews Molecular cell biology*, 21(11), 696-711.
- Samsonraj, R. M., Dudakovic, A., Zan, P., Pichurin, O., Cool, S. M. ve Van Wijnen, A. J. (2017). "A Versatile Protocol for Studying Calvarial Bone Defect Healing in a Mouse Model". *Tissue Engineering. Part C, Methods*, 23(11), 686.

- Saptaji, K., Asriyanti, Khoiriyah, N., Muryanti, L. ve Setiawan, I. (2024). "Review of the Potential use of Poly (lactic-co-glycolic acid) as Scaffolds in Bone Tissue Recovery". *Makara Journal of Science*, 28(1), 4.
- Schell, H., Duda, G. N., Peters, A., Tsitsilonis, S., Johnson, K. A. ve Schmidt-Bleek, K. (2017). "The haematoma and its role in bone healing". *Journal of experimental orthopaedics*, 4(1), 5.
- Schmidt, A. H. (2021). "Autologous bone graft: Is it still the gold standard?". *Injury*, 52, S18-S22.
- Schneider, M. R. (2021). "Von Kossa and his staining technique". *Histochemistry and Cell Biology*, 156(6), 523-526.
- Selvaraj, V., Sekaran, S., Dhanasekaran, A. ve Warriar, S. (2024). "Type 1 collagen: Synthesis, structure and key functions in bone mineralization". *Differentiation*, 100757.
- Shah, K. N. ve Kamal, R. N. (2024). "Bone Graft Substitutes—What Are My Options?". *Hand Clinics*, 40(1), 13-23.
- Shahrezaee, M., Salehi, M., Keshtkari, S., Oryan, A., Kamali, A. ve Shekarchi, B. (2018). "In vitro and in vivo investigation of PLA/PCL scaffold coated with metformin-loaded gelatin nanocarriers in regeneration of critical-sized bone defects". *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 14(7), 2061-2073.
- Sheikh, Z., Sima, C. ve Glogauer, M. (2015). "Bone replacement materials and techniques used for achieving vertical alveolar bone augmentation". *Materials*, 8(6), 2953-2993.
- Shi, X., Wang, Y., Ren, L., Gong, Y. ve Wang, D. A. (2009). "Enhancing alendronate release from a novel PLGA/hydroxyapatite microspheric system for bone repairing applications". *Pharmaceutical Research*, 26(2), 422-430.
- Shibuya, M. (2011). "Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Receptor (VEGFR) Signaling in Angiogenesis: A Crucial Target for Anti- and Pro-Angiogenic Therapies". *Genes & Cancer*, 2(12), 1097.

- Shin, H. J., Lee, C. H., Cho, I. H., Kim, Y. J., Lee, Y. J., Kim, I. A., Park, K. D., Yui, N. ve Shin, J. W. (2006). "Electrospun PLGA nanofiber scaffolds for articular cartilage reconstruction: mechanical stability, degradation and cellular responses under mechanical stimulation in vitro". *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 17(1), 103-119.
- Shokri, M., Kharaziha, M., Ahmadi Tafti, H., Dalili, F., Mehdiavaz Aghdam, R., Ghiassi, S. R. ve Baghaban Eslaminejad, M. (2024). "Melatonin-loaded mesoporous zinc- and gallium-doped hydroxyapatite nanoparticles to control infection and bone repair". *Biomaterials Science*, 12(16), 4194-4210.
- Skakle, J. (2005). "Applications of X-ray powder diffraction in materials chemistry". *Chemical Record*, 5(5), 252-262.
- Sohrabi, M., Hesarakhi, S., Shahrezaee, M. ve Shams-Khorasani, A. (2024). "The release behavior and in vitro osteogenesis of quercetin-loaded bioactive glass/hyaluronic acid/sodium alginate nanocomposite paste". *International Journal of Biological Macromolecules*, 280, 136094.
- Solberg, L. B., Brorson, S. H., Stordalen, G. A., Bækkevold, E. S., Andersson, G., ve Reinholt, F. P. (2014). "Increased Tartrate-Resistant Acid Phosphatase Expression in Osteoblasts and Osteocytes in Experimental Osteoporosis in Rats". *Calcified Tissue International*, 94(5), 510.
- Somasundaram, S., D, F., Genasan, K., Kamarul, T. ve Raghavendran, H. R. B. (2024). "Implications of Biomaterials and Adipose-Derived Stem Cells in the Management of Calvarial Bone Defects". *Regenerative Engineering and Translational Medicine*, 1-25.
- Sordi, M. B., Fredel, M. C., da Cruz, A. C. C., Sharpe, P. T. ve de Souza Magini, R. (2023). "Enhanced bone tissue regeneration with hydrogel-based scaffolds by embedding parathyroid hormone in mesoporous bioactive glass". *Clinical oral investigations*, 27(1), 125-137.

- Souza, A. T. P., Freitas, G. P., Lopes, H. B., Ferraz, E. P., Oliveira, F. S., Beloti, M. M. ve Rosa, A. L. (2018). "Effect of cell therapy with allogeneic osteoblasts on bone repair of rat calvaria defects". *Cytotherapy*, 20(10), 1267-1277.
- Stanton, E., Feng, J., Kondra, K., Sanchez, J., Jimenez, C., Brown, K. S., Skiles, M.L., Urata, M.M., Chai, Y. ve Hammoudeh, J. A. (2024). "A Calvarial Defect Model to Investigate the Osteogenic Potential of Umbilical Cord Stem Cells in Bone Regeneration". *Plastic and Reconstructive Surgery*, 153(3), 637-646.
- Stojanov, S. ve Berlec, A. (2020). "Electrospun Nanofibers as Carriers of Microorganisms, Stem Cells, Proteins, and Nucleic Acids in Therapeutic and Other Applications". *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, 511400.
- Sui, Y., Liu, S., Ou, C., Liu, Q. ve Meng, G. (2021). "Experimental investigation for the influence of graphene oxide on properties of the cement-waste concrete powder composite". *Construction and Building Materials*, 276, 122229.
- Sun, F., Sun, X., Wang, H., Li, C., Zhao, Y., Tian, J. ve Lin, Y. (2022). "Application of 3D-Printed, PLGA-Based Scaffolds in Bone Tissue Engineering". *International Journal of Molecular Sciences*, 23(10), 5831.
- Takeuchi, I., Fukuda, K., Kobayashi, S. ve Makino, K. (2016). "Transdermal delivery of estradiol-loaded PLGA nanoparticles using iontophoresis for treatment of osteoporosis". *Bio-medical materials and engineering*, 27(5), 475-483.
- Tang, H., Qi, C., Bai, Y., Niu, X., Gu, X. ve Fan, Y. (2023). "Incorporation of Magnesium and Zinc Metallic Particles in PLGA Bi-layered Membranes with Sequential Ion Release for Guided Bone Regeneration". *ACS biomaterials science & engineering*, 9(6), 3239-3252.
- Tang, Y., Tang, W., Lin, Y., Long, J., Wang, H., Liu, L. ve Tian, W. (2008). "Combination of bone tissue engineering and BMP-2 gene transfection promotes bone healing in osteoporotic rats". *Cell biology international*, 32(9), 1150-1157.

- Tao, Z. S., Hu, X. F. ve Sun, T. (2024). "Melatonin prevents bone loss in osteoporotic rats with valproic acid treatment by anti-inflammatory and anti-oxidative stress". *International Immunopharmacology*, 141, 112932.
- Tatlı, Z. B. ve Belge, A. (2016). "Kırık İyileşmesinin Biyolojisi ve Moleküler Yönleri". *Türkiye Klinikleri Veteriner Bilimleri-Cerrahi- Özel Konular*, 2(1), 74-80.
- Teimouri, M. ve Lalehzar, S. (2023). "Evaluation of the therapeutic effect of dressing containing Silver (Ag coat) in the process of healing skin blisters caused by limb fractures: a clinical trial study". *BMC surgery*, 23(1), 101.
- Tian, Y., Gong, Z., Zhao, R. Ve Zhu, Y. (2020). "Melatonin inhibits RANKL-induced osteoclastogenesis through the miR-882/Rev-erb α axis in Raw264.7 cells". *International Journal of Molecular Medicine*, 47(2), 633.
- Torres-Lagares, D., Castellanos-Cosano, L., Serrera-Figallo, M. ángeles, García-García, F. J., López-Santos, C., Barranco, A., Rodríguez-Gonzalez Elipe, A., Rivera-Jiménez, C. ve Gutiérrez-Pérez, J. L. (2017). "In Vitro and in Vivo Study of Poly(Lactic-co-Glycolic) (PLGA) Membranes Treated with Oxygen Plasma and Coated with Nanostructured Hydroxyapatite Ultrathin Films for Guided Bone Regeneration Processes". *Polymers*, 9(9), 410.
- Tresguerres, F. G. F., Torres, J., López-Quiles, J., Hernández, G., Vega, J. A. ve Tresguerres, I. F. (2020). "The osteocyte: A multifunctional cell within the bone". *Annals of Anatomy*, 227, 151422.
- Trucillo, P. (2024). "Biomaterials for Drug Delivery and Human Applications". *Materials*, 17(2), 456.
- Tsuji, K., Bandyopadhyay, A., Harfe, B. D., Cox, K., Kakar, S., Gerstenfeld, L., Einhorn, T., Tabin, C. J. ve Rosen, V. (2006). "BMP2 activity, although dispensable for bone formation, is required for the initiation of fracture healing". *Nature Genetics*, 38(12), 1424-1429.

- Tu, C., Chen, J., Huang, C., Xiao, Y., Tang, X., Li, H., Ma, Y., Yan, J., Li, W., Wu, H. ve Liu, C. (2020). "Effects of electromagnetic fields treatment on rat critical-sized calvarial defects with a 3D-printed composite scaffold". *Stem Cell Research and Therapy*, 11, 1-14.
- Uzun, M., Gencer, M., Turkon, H., Oztopuz, R. O., Demir, U. ve Ovali, M. A. (2017). "Effects of Melatonin on Blood Pressure, Oxidative Stress and Placental Expressions of TNF α , IL-6, VEGF and sFlt-1 in RUPP Rat Model of Preeclampsia". *Archives of medical research*, 48(7), 592-598.
- Valdrè, G., Mongiorgi, R., Ferrieri, P., Corvo, G., Cattaneo, V. ve Tartaro, G. P. (1995). "La microscopia elettronica a scansione (SEM) e microanalisi (EDS) applicata allo studio dei biomateriali per uso odontostomatologico. Nota 6.". *Minerva stomatologica*, 44(1-2), 55-68.
- Vallmajo-Martin, Q., Millan, C., Müller, R., Weber, F. E., Ehrbar, M. ve Ghayor, C. (2024). "Enhanced bone regeneration in rat calvarial defects through BMP2 release from engineered poly(ethylene glycol) hydrogels". *Scientific Reports*, 14(1), 1-15.
- Vater, C., Hetz, M., Quade, M., Lode, A., Gelinsky, M., Rammelt, S., Zwingenberger, S. ve Bretschneider, H. (2023). "Combined application of BMP-2 and naturally occurring bioactive factor mixtures for the optimized therapy of segmental bone defects". *Acta biomaterialia*, 157, 162-174.
- Venugopal, J., Low, S., Choon, A. T. ve Ramakrishna, S. (2008). "Interaction of cells and nanofiber scaffolds in tissue engineering". *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials*, 84(1), 34-48.
- Viguet-Carrin, S., Garnero, P. ve Delmas, P. D. (2006). "The role of collagen in bone strength". *Osteoporosis international*, 17(3), 319-336.
- Vimalraj, S. (2020). "Alkaline phosphatase: Structure, expression and its function in bone mineralization". *Gene*, 754, 144855.

- Vimalraj, S., Saravanan, S., Raghunandhakumar, S. ve Anuradha, D. (2020). “Melatonin regulates tumor angiogenesis via miR-424-5p/VEGFA signaling pathway in osteosarcoma”. *Life Sciences*, 256, 118011.
- Vlachou, M., Siamidi, A., Anagnostopoulou, D., Christodoulou, E. ve Bikiaris, N. N. (2022). “Modified Release of the Pineal Hormone Melatonin from Matrix Tablets Containing Poly(L-lactic Acid) and Its PLA-co-PEAd and PLA-co-PBAd Copolymers”. *Polymers*, 14(8), 1504.
- Vyas, A., Mondal, S., Kumawat, V. S., Ghosh, S. B., Mishra, D., Sen, J., Khare, D., Dubey, A. K., Nandi, S. K. ve Bandyopadhyay-Ghosh, S. (2024). “Biom mineralized fluorocanaseite-reinforced biocomposite scaffolds demonstrate expedited osteointegration of critical-sized bone defects”. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 112(1), e35352.
- Wang, J., Li, D., Li, T., Ding, J., Liu, J., Li, B. ve Chen, X. (2015). “Gelatin Tight-Coated Poly(lactide- co-glycolide) Scaffold Incorporating rhBMP-2 for Bone Tissue Engineering”. *Materials (Basel, Switzerland)*, 8(3), 1009-1026.
- Wang, S., Liu, Y., Lou, C., Cai, C., Ren, W., Liu, J., Gong, M., Shang, P. ve Zhang, H. (2023). "Moderate static magnetic field promotes fracture healing and regulates iron metabolism in mice". *BioMedical Engineering Online*, 22(1), 1-16.
- Wang, T., Guo, S. ve Zhang, Y. (2024). “Effect of nHA/CS/PLGA delivering adipose stem cell-derived exosomes and bone marrow stem cells on bone healing—in vitro and in vivo studies”. *Scientific Reports*, 14(1), 1-15.
- Wang, Z., Chen, T., Wu, Z., Jiang, X., Hou, Q., Miao, S., Xia, R. ve Wang, L. (2022). “The dual-effects of PLGA@MT electrospun nanofiber coatings on promoting osteogenesis at the titanium–bone interface under diabetic conditions”. *Journal of Materials Chemistry B*, 10(21), 4020-4030.

- Wei, W., Zeve, D., Wang, X., Du, Y., Tang, W., Dechow, P. C., ... Wan, Y. (2011). "Osteoclast Progenitors Reside in the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ -Expressing Bone Marrow Cell Population". *Molecular and Cellular Biology*, 31(23), 4692.
- Wildemann, B., Ignatius, A., Leung, F., Taitzman, L. A., Smith, R. M., Pesántez, R., Stoddart, M. J., Richards, G. R. ve Jupiter, J. B. (2021). "Non-union bone fractures". *Nature Reviews Disease Primers*, 7(1), 1-21.
- Won Suh, I., In Kim, J., Kumar Shrestha, B., Rim Jang, S. ve Hee Park, C. (2024). "Flower-like $\text{Ti}(\text{HPO}_4)_2$ bioceramic-laden 3D printed platform for enhanced bone regeneration via BMP signaling pathway". *Chemical Engineering Journal*, 487, 150757.
- Wu, D. Z., Zhu, G. Z., Zhao, K., Gao, J. W., Cai, G. X., Li, H. Z., Huang Y., Tu, C., Zhuang, J., Huang Z. ve Zhong, Z. M. (2024). "Age-related decline in melatonin contributes to enhanced osteoclastogenesis via disruption of redox homeostasis". *Molecular Medicine*, 30(1), 1-14.
- Wu, Z., Wang, B., Tang, J., Bai, B., Weng, S., Xie, Z., Shen, Z., Yan, D., Chen, L., Zhang, J. ve Yang, L. (2020). "Degradation of subchondral bone collagen in the weight-bearing area of femoral head is associated with osteoarthritis and osteonecrosis". *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*, 15(1), 526.
- Xia, P., Wang, S., Qi, Z., Zhang, W. ve Sun, Y. (2019). "BMP-2-releasing gelatin microspheres/PLGA scaffolds for bone repairment of X-ray-radiated rabbit radius defects. Artificial Cells", *Nanomedicine and Biotechnology*, 47(1), 1662-1673.
- Xiao, L., Lin, J., Chen, R., Huang, Y., Liu, Y., Bai, J., Ge, G., Shi, X., Chen, Y., Shi, J., Aiging, L., Yang, H., Geng, D. ve Wang, Z. (2020). "Sustained release of melatonin from GelMA liposomes reduced osteoblast apoptosis and improved implant osseointegration in osteoporosis". *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020(1), 6797154.

- Xiong, H., Qiu, H., Wang, C., Qiu, Y., Tan, S., Chen, K., Zhao, J. ve Song, J. (2024). "Melatonin-loaded bioactive microspheres accelerate aged bone regeneration by formation of tunneling nanotubes to enhance mitochondrial transfer". *Materials Today Bio*, 28, 101175.
- Xu, A., Zhuang, C., Xu, S., He, F., Xie, L., Yang, X. ve Gou, Z. (2018). "Optimized Bone Regeneration in Calvarial Bone Defect Based on Biodegradation-Tailoring Dual-shell Biphasic Bioactive Ceramic Microspheres". *Scientific Reports*, 8(1), 1-14.
- Xu, X., Hui, W., Liu, N. ve Zhang, Y. (2021). "Effects of ergosteroside combined risedronate on fracture healing and BMP-2, BMP-7 and VEGF expression in rats". *Acta Cirúrgica Brasileira*, 36(11), e361107.
- Xu, Y., Shen, Z., Zhou, Y., Zhou, Y., Zhou, J., Qian, X., Wei, Y. ve Qiu, J. (2023). "Osteogenic and anti-inflammatory effects of SLA titanium substrates doped with chitosan-stabilized selenium nanoparticles via a covalent coupling strategy". *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, 224, 113217.
- Yan, Q., Xiao, L. Q., Tan, L., Sun, W., Wu, T., Chen, L. W., Mei, Y. ve Shi, B. (2015). "Controlled release of simvastatin-loaded thermo-sensitive PLGA-PEG-PLGA hydrogel for bone tissue regeneration: in vitro and in vivo characteristics". *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 103(11), 3580-3589.
- Yang, L., Liu, S., Fang, W., Chen, J. ve Chen, Y. (2019). "Poly(lactic-co-glycolic acid)-bioactive glass composites as nanoporous scaffolds for bone tissue engineering: In vitro and in vivo studies". *Experimental and Therapeutic Medicine*, 18(6), 4874.
- Yao, J., Xin, R., Zhao, C. ve Yu, C. (2024). "MicroRNAs in osteoblast differentiation and fracture healing: From pathogenesis to therapeutic implication". *Injury*, 55(4), 111410.
- Yao, M., Liang, S., Zeng, Y., Peng, F., Zhao, X., Du, C., Ma, X., Huang, H., Wang, D. ve Zhang, Y. (2024). "Dual Factor-Loaded Artificial Periosteum Accelerates Bone Regeneration". *ACS Biomaterials Science and Engineering*, 10(4), 2200-2211.

- Yao, Z., Qian, Y., Jin, Y., Wang, S., Li, J., Yuan, W. E. ve Fan, C. (2022). "Biomimetic multilayer polycaprolactone/sodium alginate hydrogel scaffolds loaded with melatonin facilitate tendon regeneration". *Carbohydrate Polymers*, 277, 118865.
- Yilmaz, D., Marques, F. C., Fischer, Y., Zimmermann, S., Hwang, G., Atkins, P. R., Mathavan, N., Singh, A., de Souza, P.P.C., Kuhn, G. A., Wehrle, E. ve Müller, R. (2024). "Elucidating the mechano-molecular dynamics of TRAP activity using CRISPR/Cas9 mediated fluorescent reporter mice". *Heliyon*, 13, 10(12), e32949.
- Yong, W., Ma, H., Na, M., Gao, T., Zhang, Y., Hao, L., Yu., H., Hang, Y. ve Deng, X. (2021). "Roles of melatonin in the field of reproductive medicine". *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 144, 112001.
- Young, M. F. (2003). "Bone matrix proteins: their function, regulation, and relationship to osteoporosis". *Osteoporosis international*, 14, 35-42.
- Yousefzadeh, N., Kashfi, K., Jeddi, S. ve Ghasemi, A. (2020). "Ovariectomized rat model of osteoporosis: a practical guide". *EXCLI Journal*, 19, 89.
- Yu, H., Liu, H., Shen, Y. ve Ao, Q. (2023). "Synthetic biodegradable polymer materials in the repair of tumor-associated bone defects". *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 11, 1096525.
- Yu, S., Sun, T., Liu, W., Yang, L., Gong, H., Chen, X., Li., J. ve Weng, J. (2022). "PLGA Cage-Like Structures Loaded with Sr/Mg-Doped Hydroxyapatite for Repairing Osteoporotic Bone Defects". *Macromolecular bioscience*, 22(8), 2200092.
- Yue, S., He, H., Li, B. ve Hou, T. (2020). "Hydrogel as a Biomaterial for Bone Tissue Engineering: A Review". *Nanomaterials*, 10(8), 1-25.
- Yurteri, A., Yıldırım, A., Çelik, Z. E., Vatansev, H. ve Durmaz, M. S. (2023). "The effect of quercetin on bone healing in an experimental rat model". *Joint Diseases and Related Surgery*, 34(2), 365-373.

- Zhang, L., Jiao, G., Ren, S., Zhang, X., Li, C., Wu, W., Wang, H., Liu, H., Zhou, H. ve Chen, Y. (2020). "Exosomes from bone marrow mesenchymal stem cells enhance fracture healing through the promotion of osteogenesis and angiogenesis in a rat model of nonunion". *Stem Cell Research and Therapy*, 11(1), 1-15.
- Zhang, L., Wang, Z., Xiao, Y., Liu, P., Wang, S., Zhao, Y., Shen, M. ve Shi, X. (2018). "Electrospun PEGylated PLGA nanofibers for drug encapsulation and release". *Materials Science and Engineering C*, 91, 255-262.
- Zhang, L., Zhang, J., Ling, Y., Chen, C., Liang, A., Peng, Y., Chang, H., Su, P. ve Huang, D. (2013). "Sustained release of melatonin from poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) microspheres to induce osteogenesis of human mesenchymal stem cells in vitro". *Journal of Pineal Research*, 54(1), 24-32.
- Zhang, T., Han, W., Zhao, K., Yang, W., Lu, X., Jia, Y., Qin, A. ve Qian, Y. (2019). "Psoralen accelerates bone fracture healing by activating both osteoclasts and osteoblasts". *The FASEB Journal*, 33(4), 5399-5410.
- Zhang, T., Neunaber, C., Ye, W., Wagner, A., Bülow, J. M., Relja, B. ve Bundkirchen, K. (2024). "Aging Influences Fracture Healing on the Cellular Level and Alters Systemic RANKL and OPG Concentrations in a Murine Model". *Advanced Biology*, 8(11), 2300653.
- Zhang, W., Rong, H., Liang, J., Mao, C., Li, Z., Dai, Z., Li, D., Guo, W., Chen, S., Wang, Z. ve Wei, J. (2024). "Chitosan modified with PAP as a promising delivery system for melatonin in the treatment of osteoporosis: targeting the divalent metal transporter 1". *Journal of biological engineering*, 18(1), 27.
- Zhang, W., Zhu, C., Ye, D., Xu, L., Zhang, X., Wu, Q., Zhang, X., Kaplan, D.L. ve Jiang, X. (2014). "Porous silk scaffolds for delivery of growth factors and stem cells to enhance bone regeneration". *PLoS ONE*, 9(7), e102371.
- Zhao, F., Yang, Z., Xiong, H., Yan, Y., Chen, X. ve Shao, L. (2023). "A bioactive glass functional hydrogel enhances bone augmentation via synergistic angiogenesis, self-swelling and osteogenesis". *Bioactive Materials*, 22, 201-210.

- Zhao, M., Qiu, D., Miao, X., Yang, W., Li, S., Cheng, X., Tang, J., Chen, H., Ruan, H., Liu, Y., Wei, C. ve Xiao, J. (2024). “Melatonin Delays Arthritis Inflammation and Reduces Cartilage Matrix Degradation through the SIRT1-Mediated NF- κ B/Nrf2/TGF- β /BMPs Pathway”. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(11), 6202.
- Zheng, K., Bai, J., Chen, W., Xu, Y., Yang, H., Li, W., Li, P., Tong, L., Wang, H., Chu, P. K. ve Geng, D. (2023). “Multifunctional BPs/MT@PLGA-ALE Nanospheres for Treatment of Osteoporotic Fracture with Near-Infrared Irradiation”. *Advanced Functional Materials*, 33(18), 2214126.
- Zhou, J., Akrami, N., Wang, H., Fang, L., Shen, J., Yu, C., Zhang B. ve Zhu, D. (2025). “Enhanced healing of critical-sized bone defects using degradable scaffolds with tailored composition through immunomodulation and angiogenesis”. *Bioactive Materials*, 44, 371-388.
- Zhou, Y., Wang, C., Si, J., Wang, B., Zhang, D., Ding, D., Zhang, J. Ve Wang, H. (2020). “Melatonin up-regulates bone marrow mesenchymal stem cells osteogenic action but suppresses their mediated osteoclastogenesis via MT2-inactivated NF- κ B pathway”. *British Journal of Pharmacology*, 177(9), 2106-2122.
- Zhu, S., Chen, W., Masson, A. ve Li, Y. P. (2024). “Cell signaling and transcriptional regulation of osteoblast lineage commitment, differentiation, bone formation, and homeostasis”. *Cell Discovery*, 10(1), 1-39.
- Zhu, W., Robey, P. G. ve Boskey, A. L. (2008). “The Regulatory Role of Matrix Proteins in Mineralization of Bone”. *Osteoporosis, Two-Volume Set*, 191-240.
- Zoch, M. L., Clemens, T. L. ve Riddle, R. C. (2015). “New Insights into the Biology of Osteocalcin”. *Bone*, 82, 42.

EKLER

EK 1

ETİK KURUL KARARI



T.C.
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

Karar Tarihi : 22.09.2023

Karar No : 2023/08

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURUL KARARI

TOPLANTI TARİHİ : 22.09.2023
TOPLANTI SAYISI : 2023/08
DOSYA KAYIT NUMARASI : 2023-2300225607
KARAR NUMARASI : 2023/08-07
YARDIMCI ARAŞTIRMACILAR : Prof. Dr. , Dr. Öğretim Üyesi
Doç. Dr. , Öğr. Gör. Damla AYKORA, Arş. Gör.
Öğr. Gör. , Dr. Öğr. Gör. , Dr. Öğr. Üyesi
HAYVAN TÜRÜ VE SAYISI : Wistar albino, 54+27 adet erkek sıçan

Proje yürütücüsü Prof. Dr. Metehan UZUN tarafından Etik Kurulumuza sunulan "Melatonin İçeren PLGA Yapısındaki Nanolif Uygulamasının Otogreft Tamiri Yapılan Kritik Kalvaryal Kemik Defektlerinin İyileşmesi Üzerine Etkilerinin İncelenmesi" başlıklı proje Hayvan Deneylerine ilişkin ilgili mevzuat hükümleri çerçevesinde Hayvan Deneyleri Etiği açısından uygun olduğuna; oybirliği ile karar verilmiştir.