

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**PROANTOSİYANİDİN TAŞIYAN NANOFİBERLERİN ÜRETİMİ VE
DIŞ PULPASI KÖK HÜCRELERİNİN ODONTOBLASTİK
FARKLILAŞMA POTANSİYELİ ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

Doç. Dr. Elif BALLIKAYA

**Oral Biyoloji Programı
DOKTORA TEZİ**

**ANKARA
2024**

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PROANTOSİYANİDİN TAŞIYAN NANOFİBERLERİN ÜRETİMİ
VE DIŞ PULPASI KÖK HÜCRELERİNİN ODONTOBLASTİK
FARKLILAŞMA POTANSİYELİ ÜZERİNE ETKİSİNİN
İNCELENMESİ

Doç. Dr. Elif BALLIKAYA

Oral Biyoloji Programı
DOKTORA TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Betül ÇELEBİ SALTİK

ANKARA
2024

ONAY SAYFASI**PROANTOSİYANİDİN TAŞIYAN NANOFİBERLERİN ÜRETİMİ VE DIŞ
PULPASI KÖK HÜCRELERİNİN ODONTOBLASTİK FARKLILAŞMA
POTANSİYELİ ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ****Öğrenci: ELİF BALLIKAYA****Danışman: Prof. Dr. Betül Çelebi Saltık**

Bu tez çalışması 31.05.2024 tarihinde jürimiz tarafından “Oral Biyoloji Doktora Programı” nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: *Prof. Dr. Abdullah Cevdet Akman* (imza)
(Hacettepe Üniversitesi)

Üye: *Prof. Dr. Özgür UYANIK* (imza)
(Hacettepe Üniversitesi)

Üye: *Prof. Dr. Nalan Oya San Keskin* (imza)
(Ankara Hacı Bayram Veli Üniversitesi)

Üye: *Doç. Dr. Fatima Susanna Aerts Kaya* (imza)
(Hacettepe Üniversitesi)

Üye: *Doç. Dr. Seçil Çalışkan* (imza)
(Eskişehir Osmangazi Üniversitesi)

Bu tez, Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Müge YEMİŞCİ ÖZKAN
Enstitü Müdürü

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan **“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”** kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. ⁽¹⁾
- Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren ... ay ertelenmiştir. ⁽²⁾
- Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir. ⁽³⁾

10/06/2024

ELİF BALLIKAYA

¹“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”

⁽¹⁾ Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez **danışmanın önerisi ve enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulu** iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.

⁽²⁾ Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internette paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkânı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez **danışmanın önerisi ve enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulunun** gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.

⁽³⁾ Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, **tezin yapıldığı kurum** tarafından verilir *. Kurum ve kuruluşlarla yapılan iş birliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, **ilgili kurum ve kuruluşun önerisi** ile **enstitü** veya **fakültenin** uygun görüşü üzerine **üniversite yönetim kurulu** tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir.

Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir

* Tez **danışmanın önerisi ve enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulu** tarafından karar verilir

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Prof. Dr. Betül Çelebi Saltık danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.

Doç. Dr. Elif BALLIKAYA

TEŞEKKÜR

Diş Hekimliğinde Oral Biyoloji Doktora programının açılmasını sağlayan Prof. Dr. Rüya Yazıcı, Prof. Dr. Esra Ergin ve bu programa emeklerini veren program sorumlusu tüm değerli Hocalarıma ve Ağız Diş Sağlığı Araştırmaları Ana Bilim Dalı Başkanı Sayın Dekanımız Prof. Dr. Tülin Taner Hocam'a emekleri ve katkıları için teşekkürlerimi sunarım. Rejeneratif endodonti alanında öğrettikleri ile dental pulpa kök hücrelerine ilginin gelişmesinde çok değerli katkıları olan saygıdeğer Hocam Prof. Dr. Zafer Cavit Çehrelî'ye teşekkürlerimi sunarım. Kök hücre bölümünden aldığım seçmeli dersler sayesinde tanıştığım ve hayranlık duyduğum çok değerli Hocam ve danışmanım Sayın Prof. Dr. Betül ÇELEBİ SALTİK'a ilk önce danışmanım olmayı kabul ettiği ve de tüm tez çalışmam boyunca birikimleri ve tecrübeleriyle bana yol gösterdiği, benden desteğini hiç esirgemediği, doktoranın gereklilikleri konusunda hep bir sonraki adıma beni hazırladığı ve bana her anlamda kazandırdıkları için minnetlerimi ve teşekkürlerimi sunarım. Doktora tez konumun planlanmasında ve gerçekleşmesinde çok büyük katkıları olan, varlığı ve pozitif enerjisi ile beni rahatlatan, kendisiyle tanıştığım için şanslı olduğumu hissettiren Prof. Dr. Nalan Oya San Keskin'e minnet ve teşekkürlerimi sunarım. Hücre kültürü çalışmalarımda ve tüm deneylerimde katkıları olan, her günümde benimle laboratuvarında olan ve Kök Hücre Bilimlerinde yüksek lisansını başarıyla tamamlayan değerli arkadaşım Sena Babadağ'a, tecrübelerini ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen ve bizleri motive eden Özlem Altundağ'a, araştırmaya katkıları sebebiyle AHBV Polatlı Fen Edebiyat Fakültesi'nde yüksek lisans öğrencisi olan İmre Tüzün'e teşekkürlerimi sunarım.

Oral Biyoloji doktora programına emek veren ve bizleri motive eden değerli Hocalarım sayın Prof. Dr. Rahime Nohutçu ve Prof. Dr. Abdullah Cevdet Akman'a,

Tez ve ders dönemim boyunca her konuda desteklerini hissettiren değerli hocalarım Prof. Dr. Meryem Uzamış Tekçiçek'e, Prof. Dr. M. Seval Ölmez'e, Prof. Dr. Melek D. Turgut'a, Doç. Dr. Cansu Özşin Özler'e, Dr. Öğr. Üyesi Tülin İleri Keçeli'ye, Dr. Öğr. Üyesi Gizem Erbaş Ünverdi'ye, Dr. Öğr. Üyesi Beste Özgür'e, Dr. Öğr. Üyesi Pınar Serdar Eymirli'ye ve tüm Pedodonti Bölümü iş arkadaşlarıma,

Sevinçlerime ve hüznlerime ortak olan değerli arkadaşım Doç. Dr. Nagihan Koç'a, doktora ders döneminde edindiğim ve çok sevdiğim arkadaşım Pınar Karacakaya'ya, Kök Hücre Bilimleri'ne gittiğimde güler yüzleriyle bana yabancılık hissettirmeyen başta Mehmet Emin Şeker, Engin Özçelik ve tüm Kök Hücre Bilimleri çalışanlarına, çekilmiş dişleri almamda yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen Ağız Diş Çene Cerrahisi bölümü çalışanlarına,

Bana güvenen ve destekleri ile her zaman yanımda olan sevgili aileme, eşime ve çok sevdiğim oğlum Ümit'e

En içten teşekkürlerimle...

Son olarak, bu tez çalışması ve ön çalışma için maddi destek sağlayan Türkiye Sağlık Enstitüleri Başkanlığı'na (Tüseb, A Grubu Acil Ar-Ge Proje Destek Programı, 20124 no'lu proje) ve Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne (Kariyer destek projesi, proje numarası: TKB2022-20103) teşekkür ederiz.

ÖZET

Ballıkaya, E., Proantosiyanidin Taşıyan Nanofiberlerin Üretimi ve Diş Pulpası Kök Hücrelerinin Odontoblastik Farklılaşma Potansiyeli Üzerine Etkisinin İncelenmesi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Oral Biyoloji Doktora Tezi, Ankara, 2024. Bu tez çalışmasında, tek başına poli-laktik asit nanofiberleri (PLA-Nf) ile birlikte proantosiyanidinlerin daha uzun süre salınımını sağlamak için 75 µg/mL proantosiyanidin (PA) içeren PLA_PA-Nf ve PLA-IC-Nf matları elektrospining tekniği kullanılarak üretilmiş ve nanofiberlerin dental pulpa kök hücrelerinin (DPKH) canlılığı ve odontojenik farklılaşma yeteneği üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Nanofiberlerin morfolojisi, bileşimi, hidrofilitesi sırasıyla SEM, ATR-FTIR spektroskopisi ve temas açısı ölçümleri ile karakterize edilmiştir. Nanofiberlerden PA'nın salımı, belirlenen aralıklarda 30 gün boyunca izlenmiştir. İnküzyon kompleksi içeren PLA-IC-Nf'ler, PLA_PA-Nf'lere kıyasla PA'nın daha uzun süreli salınımını sağlamıştır. Antioksidan kapasite, 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil yöntemi kullanılarak değerlendirilmiş ve *Staphylococcus aureus* ve *Escherichia coli*'ye karşı antibakteriyel etkiler, koloni oluşturan birimler sayılarak araştırılmıştır. Odontojenik farklılaşmanın değerlendirilmesi için kalsiyum birikimi, alkalen fosfataz aktivitesi, Alizarin kırmızısı ile boyama 14 ve 18. günlerde değerlendirilmiş, *OCN*, *RUNX-2*, *DSPP* ve *DMP-1* gen ifadeleri ise 18. günde değerlendirilmiştir. Sonuç olarak, başarıyla geliştirilen PLA-IC-Nf, *S. aureus* ve *E. coli*'ye karşı etkili antibakteriyel aktivite, antioksidan aktivite ve inküzyon kompleksi içermeyen nanofiberlere kıyasla artmış hidrofilite sergilemiştir. Başlangıçta sitotoksikite gösterse de daha kontrollü salım yapması nedeniyle hücre kültürünün kendini yeniden oluşturmasına izin vererek zamanla tek başına DPKH'lar ile benzer canlılık düzeylerine ulaşmıştır PLA-IC-Nf örnekleri, *DSPP*, *DMP-1* ve ALP aktivitesini yükselterek DPKH'ların odontojenik farklılaşmasını arttırmıştır.

Anahtar Kelimeler: elektrospining, polilaktik asit, siklodekstrin, proantosiyanidin, dental pulpa kök hücresi.

Bu tez çalışması, Türkiye Sağlık Enstitüleri Başkanlığı (TÜSEB) tarafından desteklenmiştir (Proje numarası: 20124).

Bu projedeki ön çalışma, Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından, kariyer destek projesi kapsamında desteklenmiştir (Proje numarası: TKB2022-20103).

ABSTRACT

Ballikaya, E., The Production of Nanofibers Bearing Proanthocyanidins and Their Effects on the Odontoblastic Differentiation Potential of Dental Pulp Stem Cells, Hacettepe University Graduate School of Health Sciences, Oral Biology Doctor of Philosophy Thesis, Ankara, 2024. In this thesis study, bare poly-lactic acid nanofibers (PLA-Nf), 75 µg/mL proanthocyanidin-incorporated PLA_PA-Nf, and PLA-IC-Nf mats to enable the sustained release of proanthocyanidins through a β-CD-inclusion complex were fabricated through the electrospinning technique. The effects of nanofibers on viability and the odontogenic differentiation capability of DPSCs were investigated. The morphology, composition, hydrophilicity of the nanofibers was characterized by SEM, ATR-FTIR spectroscopy, and contact angle measurements, respectively. The release of PA from the fibers was monitored for 30 days at predetermined intervals. The inclusion complex enabled the electrospun PLA-IC-Nfs to demonstrate a more sustained release profile of PA compared to the PLA_PA-Nfs. The antioxidant capacity was evaluated using the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl assay, and the antibacterial effects against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* were investigated counting the colony-forming units. To assess odontogenic differentiation; calcium deposition, alkaline phosphatase activity, Alizarin red staining was measured at 14 and 18 days, while OCN, RUNX-2, DSPP, and DMP-1 gene expressions were evaluated at day 18. As a result, the successfully developed PLA-IC-Nf exhibited effective antibacterial activity against *S. aureus* and *E. coli*, antioxidant activity, and increased hydrophilicity compared to nanofibers without the inclusion complex. Although it showed initial cytotoxicity, which gradually decreased over time to levels comparable with DPSCs alone, allowing the cell culture to reestablish itself due to more controlled release. PLA-IC-Nf samples promoted odontogenic differentiation of DPSCs by upregulating the DSPP, DMP-1 and ALP activity.

Keywords: electrospinning, polylactic acid, cyclodextrin, proanthocyanidin, dental pulp stem cells.

This thesis study was funded by the Health Institutes of Türkiye (TUSEB) (Grant number: 20124).

The preliminary study in this project was funded by Hacettepe University Scientific Research Project Coordination Unit as part of the Career Start Projects. (Grant Number: TKB-2022-20103).

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR	xi
ŞEKİLLER	xiii
TABLolar	xv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	6
2.1. Dentin Pulpa Kompleksi	6
2.2. Dental Pulpa Kök Hücreleri	7
2.3. Pulpitis	8
2.4. Geleneksel ve Doku Mühendisliğine Dayalı Vital Pulpa Tedavi Yöntemleri	11
2.4.1. Geleneksel Vital Pulpa Tedavileri	11
2.4.2. Doku Mühendisliğine Dayalı Vital Pulpa Tedavi Yöntemleri	13
2.5. Nanofiberler ve Elektroeğirme Yöntemi ile Üretimi	18
2.6. Elektroeğirme ile Üretilen Nanofiberlerin Dentin Pulpa Kompleksinin Rejenerasyonunda Kullanımı	19
2.7. Nanofiberlerin Siklodekstrinler ile Birlikte Biyoaktif Ajan/İlaç Taşıyıcı Sistemler Olarak Kullanımı	20
2.8. Üzüm Çekirdeği Oligomerik Proantosiyandinleri	21
3. GEREÇ VE YÖNTEM	24
3.1. Araştırmanın Tipi	24
3.2. Araştırma Yeri	24
3.3. Araştırmanın Evreni, Örneklemi, Araştırma Grubu	24
3.4. Araştırmanın Yöntemi ve Veri Toplama Araçları	25
3.4.1. Dental Pulpa Kök Hücrelerinin İzolasyonu ve Çoğaltılması	25
3.4.2. Dental Pulpa Kök Hücrelerinin Karakterizasyonu	26

3.4.3. DPKH'ların Farklı Konsantrasyonlarda PA ile Muamele Edilmesi ve Uygun Konsantrasyonun Belirlenmesi	29
3.4.4. Malzeme Sentez ve Karakterizasyonu	30
3.4.5. Dental Pulpa Kök Hücrelerinin Elektroeğirilmiş Nanofiber Matlar ile Kültürü ve Odontojenik/Osteoblastik Farklılaşma Analizleri	33
3.5. İstatistiksel Analiz	36
4. BULGULAR	37
4.1. Dental Pulpa Kök Hücrelerinin İzolasyonu, Çoğaltılması ve Karakterizasyonu	37
4.2. Farklı Konsantrasyonlarda PA ile Muamele Edilen DPKH'ların WST Analizi Sonuçları	39
4.3. Malzeme Sentez ve Karakterizasyonu	40
4.3.1. SEM Analizleri	40
4.3.2. ATR-FTIR Analizleri	41
4.3.3. Nanofiberlerin İslanabilirliğinin Analizi	41
4.3.4. Nanofiberlerin Bozunum Testi	42
4.3.5. Nanofiberlerin Antioksidan Analizleri	44
4.3.6. Nanofiberlerin Antibakteriyel Analizleri	45
4.4. İn-vitro Sitotoksisite Testi Sonuçları	46
4.5. Dental Pulpa Kök Hücrelerinin Nanofiberler Üzerinde Kültürü ve Osteo/Odontojenik Farklılaşmasının Değerlendirilmesi	47
4.5.1. Kalsiyum Tayini	47
4.5.2. Alkalen Fosfataz Aktivitesinin Tayini	47
4.5.3. Alizarin Kırmızısı Boyaması	47
4.5.4. Osteo/Odontojenik Farklılaşmaya Özgü Genlerin İfadesinin Değerlendirilmesi	48
5. TARTIŞMA	50
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	57
7. KAYNAKLAR	59
8. EKLER	
EK 1. Etik Kurul Onayı (Ön Çalışma)	
EK 2. Etik Kurul Onayı (Tez)	
EK 3. Dijital Makbuz	
EK 4. Orjinallik Raporu	
9. ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER ve KISALTMALAR

ALP	Alkalen fosfataz
AmfB	Amfoterisin B
ACP	Amorf Kalsiyum Fosfat
ASP	Aspirin
ATR	Attenuated total reflection (Zayıflatılmış Toplam Yansıma)
β	Beta
Ca+2	Kalsiyum
CD	Siklodekstrin
cDNA	Komplementer deoksiribo nükleik asit
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMEM-HG	DMEM High Glucose
DMEM-LG	DMEM Low Glucose
DNA	Deoksiribonükleik Asit
2,2-difenil-1-pikrilhidrazil	DPPH
DPKH	Dental pulpa kök hücreleri
DSPP	Dentin sialo-fosfoprotein
ECM	Hücre dışı matriks
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FBS	Fetal sığır serumu
FTIR	Fourier transform infrared spectroscopy (Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi)
IC	İnklüzyon kompleksi
KB	Kontrol besi yeri
kob	Koloni oluşturan birim
LPS	Lipopolisakkarit
MetOH	Methanol;
MMP	Matriks Metalloproteinaz
mRNA	Mesajcı Ribonükleik Asit

MTA	Mineral Trioksit Agregat
Nf	Nanofiber
OB	Osteojenik besi yeri
OCN	Osteokalsin
OCT3/4	Oktomer-Bağlayıcı Transkripsiyon Faktörü 3/4
PAMP	Patojen ilişkili moleküler yapılar
PLA	Polilaktik asit
PBS	Fosfat tamponlu salin
pH	Power of Hydrogen
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
RSV	Resveratrol
rpm	Dakikada devir hızı
RT	Ters (reverse) transkriptaz
RUNX-2	Runt ile ilişkili transkripsiyon faktörü 2
SEM	Scanning Electron Microscopy
SOX2	Cinsiyet belirleme bölgesi Y ile ilişkili box proteini 2
TBR	Toll benzeri reseptörler
UV	Ultraviyole
WST-1	Water Soluble Tetrazolium-1
α-MEM	alpha Minimum Essential Medium
μg	Mikrogram
μl	Mikrolitre
3B	3 Boyutlu

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. Tez kapsamında yapılan deneysel aşamaların özeti	5
2.2. Bakteriler ve yan ürünleri tarafından uyarılan pulpanın enflamatuar mikroçevresi ve dental pulpa kök hücrelerinin davranışları	11
2.3. Doku mühendisliği temelli uygulamalarda dentin-pulpa kompleksinin rejenerasyonunu ve enflamasyonun kontrolünü kolaylaştıran hedef yapılara örnekler	16
2.4. Elektroçirime düzeneğinin şematik resmi ve Nanosan laboratuvarında kullanılan mevcut düzenek	19
2.5. Dentin-pulpa kompleksinin rejenerasyonunu arttırmak amacıyla nanofiber matların kullanımının gösterilmesi.	20
4.1. Dental pulpa kök hücrelerinin ışık mikroskop görüntüsü (a) ve 21. gün sonundaki adipojenik farklılaşmalarının Oil Red O boyama (b), osteojenik farklılaşmalarının Alizarin Kırmızısı boyama (c) ile gösterilmesi, DPKH'ların CD90, CD73 ve CD105 pozitifliği, CD34 ve CD45 negatifliğinin akım sitometri ile gösterilmesi (d), DPKH'lardan <i>OCT3/4</i> , <i>NANOG</i> ve <i>SOX2</i> ifadesinin GAPDH referans geni kullanılarak GZ-qPZR ile analizi (ort±SS, n= 3) (e).	38
4.2. DPKH'ların LPS ile indüklenmemiş (a,b) ve indüklenmiş (c) koşullarda farklı konsantrasyonlarda PA ile muamele edilmesini takiben birinci gündeki canlılığının test edilmesi (ort±SS, n=3, Tek yönlü ANOVA, * $p < 0.05$).	39
4.3. Sadece PLA-Nf (a-c), PLA_PA-Nf (e-g) ve PLA-IC-Nf (i-k) matlarının taramalı elektron mikroskopu görüntüleri ve sadece PLA-Nf (d), PLA_PA-Nf (h) ve PLA-IC-Nf (l) matlarının çap boyut dağılımları.	40
4.4. B-CD, PLA, PA tozlarının ve PLA-IC-Nf matının ATR-FTIR spektrumları (a); ve PLA-Nf, PLA_PA-Nf ve PLA-IC-Nf matlarının temas açısı (b), şişme oranı (c) zamana bağlı bozunumunun (d); β -CD, PA ve IC'nin Termogravimetrik Analiz (TGA) eğrisinin (e) gösterilmesi	43
4.5. PLA-Nf, PLA_PA-Nf ve PLA-IC-Nf matlarının antioksidan aktivitesi (a); ve PLA_PA-Nf ve PLA-IC-Nf matlarından zamana bağlı PA salımının (b) gösterilmesi	44
4.6. PLA-Nf, PLA_PA-Nf ve PLA-IC-Nf matlarının <i>E. coli</i> ve <i>S. aureus</i> 'a ait koloni sayım görüntüleri ve agar fotoğrafları (Ort ± SS, n = 3).	45
4.7. DPKH'ların PLA-Nf, PLA_PA-Nf ve PLA-IC-Nf matları üzerinde kültürlerinin 1., 3. ve 7. gündeki canlılığının test edilmesi (ort±SS, n=3, Tek yönlü ANOVA, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).	46
4.8. Kontrol ve osteojenik besiyerlerinde kültür edilen Nanofiber ve kontrol gruplarının 14. (a) ve 18. (b) günlerdeki kalsiyum konsantrasyonlarının (ort	

- \pm SS, n=3, Tek yönlü ANOVA, * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$) grafikleri ve Alizarin Kırmızısı Boyaması (c) görüntüleri. 48
- 4.9.** DPKH'ların PLA-IC-Nf matlarda 18 gün boyunca kontrol besiyeri ve osteojenik besiyeri ile kültürü sonrası, osteo/odontogenik farklılaşmaya (a–d) özgü genlerin (*OCN*, *RUNX-2*, *DSPP*, *DMP-1*) GZ-qPZR ile analizi sonuçları (ort \pm SS, n = 3, Tek yönlü ANOVA, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$). 49

TABLolar

Tablo	Sayfa
2.1. Doku Mühendisliğinde kullanılabilen iskele yapılarına örnekler (75, 76, 77, 78).	17
3.1. Hücre köklülük belirteçlerinin ifadesini değerlendirmek için GZ-qPZR deneylerinde kullanılan primer çiftleri ve dizileri	29
3.2. Osteojenik/odontoblastik farklılaşma belirteçlerinin ifadesini değerlendirmek için GZ-qPZR deneylerinde kullanılan primer çiftleri ve dizileri	36

1. GİRİŞ

Dental pulpa; dişin kron ve kök kısmında bulunan, dentin ile çevrelenen, fibroblast, odontoblastlar ve farklılaşmamış mezenkimal hücreler (MKH) de olmak üzere çeşitli hücrelerden oluşan ektomezenkim kökenli bir bağ dokusudur (1). Odontoblastlar ve farklılaşmamış kök hücreler dentin oluşumundan ve ekstrasellüler matriks (ECM) proteinlerinin salgılanmasından sorumludur. Ancak travma, çürük veya çürüğün uzaklaştırılması sırasında pulpa dokusu açığa çıkabilmekte, bakteri ve bakteri ürünlerinin dentin tübülleri yoluyla veya direk olarak pulpaya ulaşmasıyla pulpanın ve pulpal hücrelerin canlılığını tehlikeye düşürecek enflamatuar olaylar gelişebilmektedir (1). Açığa çıkan pulpanın iyileşmesi ve uzun dönem prognozu için ideal bir pulpa örtücü malzemesi kullanmak hayati önem taşır. Günümüzde pulpayı örtmek için geleneksel kaplama malzemelerinin kullanılmasının yanı sıra en ideal ve etkili biyomalzemenin geliştirilmesi amacıyla doku mühendisliği temelli yaklaşımlar ve potansiyel terapötik etkili birçok bileşik veya hedef molekül araştırılmaktadır (2, 3).

Dental pulpa kök hücreleri (DPKH), üçüncü büyük azı dişleri ve özellikle ortodontik sebeplerle çekilen premolar dişlerin pulpalarından kolayca izole edilebilmesi sebebiyle benzersiz bir mezenkimal kök hücre (MKH) kaynağıdır (4, 5). Çok yönlü farklılaşma kapasiteleri (örneğin; dentinojenik, osteojenik, adipojenik, nörojenik), MKH'ye özgül hücre yüzey belirteçlerini ifade edebilmesi, kendini yenileme ve klonojenik çoğalma özellikleri, ayrıca salgıladıkları çözünür faktörler sebebiyle immünomodülatör ve anti-inflamatuar kapasitelerinin olması sebebiyle DPKH'lar kök hücre temelli tedavilerde kullanım açısından umut vaat etmektedir (5, 6) Doku mühendisliği temelli yaklaşımlarda hücrelerin çoğalmasını desteklemek ve doku defektine uygun mekanik özellikler sunmak için ECM yapısını taklit eden iskele (scaffold) kullanılmaktadır (7, 8). Sentetik polimerler çeşitli biyomedikal uygulamalarda iskele yapısı olarak yaygın kullanılmaktadır ve polilaktik asit (PLA), poliglikolik asit (PGA), polikaprolakton (PCL) ve polietilen glikol (PEG) doku mühendisliğinde en sık kullanılan sentetik polimerlerdendir (9).

Elektroegirme tekniği, doğal ve sentetik polimerlerle iskeleler üretmek için kullanılabilen popüler ve etkili bir yöntemdir ve çeşitli dental rejeneratif

uygulamalarda da kullanılmıştır (10). Elektroeğirilmiş nanofiberler uygun mekanik özellikler sunabilir ancak yerine kullanılacakları dokuların biyobozunurluğunu taklit edebilme, hücre bağlanmasını ve çoğalmasını artırabilme ve hidrofilik özellikler katma amacıyla çeşitli bioaktif bileşikler veya ilaç salım sistemleri ile birlikte kullanılarak sinerjistik yaklaşımlar geliştirilmiştir (11).

Doğal ürünlerin biyomalzemeler olarak kullanılmasına artan eğilim göz önüne alındığında, bitkilerde bulunan flavonoidler gibi bazı doğal bileşikler çeşitli oranlarda iskelelere dahil edilmiş ve hasar görmüş pulpa dokusu için terapötik ajan olarak da önerilmiştir (12). Üzüm ve yaban mersini gibi bitkilerde bulunan ve doğal antioksidan, antimikrobiyal ve anti-inflamatuar özellikleriyle bilinen bir polifenol grubu olan oligomerik proantosiyanidinler (PA) dış hekimliğinde birçok yönüyle değerlendirilmiştir (13, 14). Ayrıca, üzüm çekirdeği proantosiyanidinlerinin hücresel yaşlanmayı azalttığı da bildirilmiştir (15). Ancak doğal antioksidanların mikroçevreden etkilenmesi ve bozulma eğilimi, düşük emilimi gibi sebeplerle biyoyaralanımlarının düşük olması polimerik nanoparçacıkların içerisinde veya siklodekstrinler içerisinde enkapsülasyonu gibi yöntemlerle kullanılarak stabilitesinin artırılmasına yönelik çalışmaların ortaya çıkmasına neden olmuştur. Doğal bileşenler olarak kabul edilen siklodekstrinler (CD), doğal bakteriyel bozulma veya enzimatik sindirim yoluyla nişastadan oligosakkarit yapısına dönüştürülerek elde edilir. Genellikle lipofilik ilaçların suda çözünürlüğünü artırmak için kullanılırlar ve daha uzun süreli mükemmel bir ilaç salım profili sağlarlar. Bununla birlikte, siklodekstrinlerin rejeneratif diş tedavilerinde kullanımı hala araştırma aşamasındadır ve sadece birkaç çalışma mevcuttur (16, 17).

Literatürde, DPKH'lara toksik olmayan en uygun PA konsantrasyonunun ne olduğu konusunda hem yapılan sınırlı sayıda çalışma olması ve değişen konsantrasyonların bildirilmesi, hem de kullanılan PA içeriğinin satın alınan markaya/ürüne göre değişebilmesi (14) sebebiyle ön çalışma planlanmıştır.

Literatürde yer alan bilgiler ve ön çalışmamızdaki konsantrasyon sonuçları doğrultusunda, bu doktora tez çalışmasında; elektroeğirme işlemi kullanılarak 75 µg/mL proantosiyanidin içeren (PLA_PA-Nf, PLA-IC-Nf) ve içermeyen nanofiber (PLA-Nf) yapılarının üretimi ve üretilen nanofiberlerin karakterizasyonu,

biyobozunurluğu, antioksidan ve antibakteriyel kapasitelerinin gösterilmesi, DPKH'ların canlılığı ve farklılaşma potansiyeline etkisinin araştırılması hedeflenmiş ve bu amaçla yapılan çalışmalar Şekil 2.1'de şematize edilmiş ve aşağıda maddeler halinde verilmiştir:

En uygun PA konsantrasyonunun ne olduğunu belirleyebilmek için yapılan çalışmalar kısaca şu şekildedir:

- 18-24 yaş arası, sağlıklı ve son iki haftadır herhangi bir antibiyotik kullanmamış, sigara içmeyen ve gömülü yirmi yaş dişlerini çekilmesi için randevusu bulunan bireylerden onamlarının alınmasını takiben GO 22/431 sayılı etik kurul kararının (Ek 1.) kriterlerine uygun şekilde çekim sonrası dental pulpa izolasyonu, DPKH eldesi, proliferasyonu ve elde edilen kök hücrelerin karakterizasyonu ile ilgili testler,
- 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS ile 24 saat indüklenmiş ve indüklenmemiş DPKH'ların 25, 50, 75, 100 ve 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ konsantrasyonlarında PA ile 24 saat muamele edilmesini takiben hücre canlılığının WST-1 analizi ile test edilmesi,

Elektroegirme ile nanofiberlerin üretilmesini takiben;

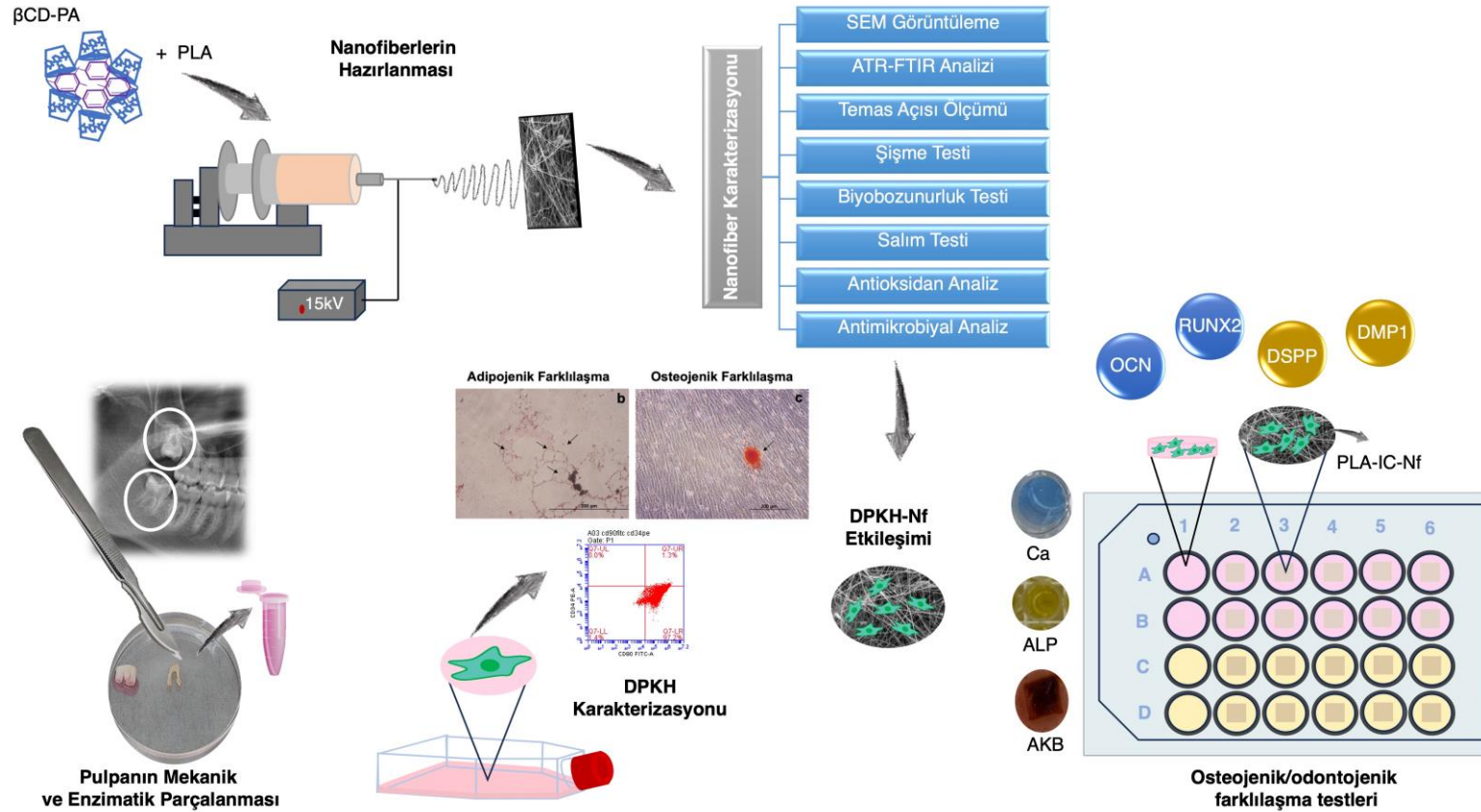
- Mikro yapının incelenmesinde taramalı elektron mikroskop (SEM) analizi,
- PLA, PA, CD ve PLA-IC-Nf toz formlarının fizikokimyasal karakterizasyonu için ATR-FTR analizi,
- Nanofiberlerin hidrofilik/hidrofobik yapılarının test edilmesinde temas açısı ve su tutma kapasitesi, şişme testi,
- Nanofiber yapılarının biyobozunurluğunun, PA salımının ve antioksidan kapasitelerin testi,
- PLA_PA-Nf ve PLA-IC-Nf yapılarının *E. Coli* ve *S. aureus*'a antibakteriyel etkileri test edilmiştir.

Üretilen nanofiber matların biyoyumluluğunu ve DPKH'ların osteo/odontojenik farklılaşma kapasiteleri üzerine etkilerini göstermek amacıyla;

- 18-24 yaş arası, sağlıklı ve son iki haftadır herhangi bir antibiyotik kullanmamış, sigara içmeyen ve gömülü yirmi yaş dişlerini çekilmesi için

randevusu bulunan bireylerden onamlarının alınmasını takiben GO 21/1318 sayılı etik kurul kararının (Ek. 2) kriterlerine uygun şekilde çekim sonrası dental pulpa izolasyonu, DPKH eldesi, proliferasyonu ve elde edilen kök hücrelerin karakterizasyonu ile ilgili testler,

- DPKH'ların nanofiberler üzerinde birinci, üçüncü ve yedinci gün kültürü sonrası canlılık testi,
- DPKH'ların PLA-IC-Nf matlar üzerinde 14 ve 18 gün kültürü sonrası Alizarin kırmızısı ile osteo/odontojenik farklılaşmayı gösteren kalsiyum odaklarının boyanması ve süpernatandaki kalsiyum miktarının kantitatif olarak Quantichrom Kalsiyum Test Kiti ile değerlendirilmesi testleri,
- DPKH'ların PLA-IC-Nf matlar üzerinde ve tek başına 14 ve 18 gün kültürü sonrası toplanan süpernatandaki alkalen fosfataz aktivitesinin gösterilmesi ve Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (GZ-PZR) ile odonto/osteojenik farklılaşmayı gösteren bazı gen belirteçlerinin (*RUNX-2*, *OCN*, *DSPP*, *DMP-1*) ifadesi test edilmiştir.



Şekil 2.1. Tez kapsamında yapılan deneysel aşamaların özeti. Bu şekil, Elif Ballıkaya tarafından CC-BY 4.0 lisansı ile kullanılan "abstract" adlı şekilden uyarlanmış ve CC-BY 4.0 lisansı ile lisanslanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Dentin Pulpa Kompleksi

Dişler, oldukça özelleşmiş yapısal özelliklere ve işlevlere sahiptir. Dişin merkezinde ve kök kanalında yer alan diş pulpası, dişin yaşam boyu canlılığını ve işlevselliğini sağlar. Diş pulpası, heterojen pulpa hücrelerinden oluşan yumuşak bir bağ dokusudur ve yapısında fibroblastlar, odontoblastlar, bağışıklık hücreleri, endotelial hücreler, nöronlar, mezenkimal kök hücreler (MKH) ve ekstrasellüler matriks (ECM) bulunur (18). Dentin diş pulpasını çevrelediği için çoğunlukla pulpa-dentin kompleksi olarak adlandırılır. Pulpa-dentin kompleksi embriyolojik olarak kranial nöral krest hücrelerinden türemiştir. Odontoblastlar, pulpanın çevresinde tek bir tabaka halinde sıralanır, dentinin organik ekstrasellüler matriksini salgılar ve bu matriksin mineralizasyonu ile birincil dentini oluşturur (19, 20). Odontoblastların sitoplazmik uzantıları mineralize dentine nüfuz eder ve dentin tübüleri içinde yer alır. Mineralize dentin tübüler yapı gösterir ve intertübüler ve peritübüler dentin olarak ayrılır. Tübüllerin genişliği, dentin-pulpa sınırından dentin-mine bağlantısına doğru daralır. ECM molekülleri, odontoblastlardan salgılanan matriks vezikülleri ve kan serumundan meydana gelen çökelti mineralizasyona aracılık eder ve dentin ECM'sinde hidroksiapatit (HA) birikimi meydana gelir (21).

Dentinin inorganik fazı ve organik matriksi sırasıyla ağırlığın yaklaşık %70 ve %20'sini oluşturur. Özellikle tip I ve kısmen tip V olmak üzere kolajen, dentin matriksinin yaklaşık %90'ını oluşturur. Proteoglikanlar, enzimler [(örneğin; matriks metalloproteinazlar (MMP)], ve yaklaşık %2 lipidler dahil olmak üzere olmayan proteinler, kalan dentin organik matriksini oluşturur (22). Kolajen olmayan proteinler; ECM yapısının organizasyonu, mineralizasyonun kontrolü, büyüme faktörlerinin düzenlenmesi ve hücre proliferasyonu, farklılaşma, yapışma ve göç gibi işlevlerde rol oynayan sinyal yollarının etkinleştirilmesini sağlar (23). MMP'ler hemen hemen tüm ECM bileşenlerini parçalayabilir ve bu nedenle birçok biyolojik ve patolojik süreçte işlevlere sahiptirler (24).

Diş pulpa dokusu, dentinogenez ve pulpa savunmasında kritik bir role sahiptir. En dıştaki odontoblast tabakasının altında, zengin ekstrasellüler matriks içeren ve

fibroblastlar tarafından sentelzenen hücreler zengin bir bölge bulunur. Ardından, çok yönlü mezenkimal öncü hücreler, granüositler, dendritik hücreler ve pulpa fibroblastları içeren hücreden zengin bir bölge ve damar ile sinir plexusunu içeren pulpa çekirdeği gelir. Bu mezenkimal öncü hücrelere diş pulpa kök hücreleri (DPKH) denir ve yeni dentin oluşturarak alttaki pulpayı koruyan odontoblast benzeri hücrelere dönüşebilirler (18)

2.2. Dental Pulpa Kök Hücreleri

Diş pulpa dokusu, MKH'ların benzersiz bir kaynağıdır ve yapısındaki MKH'lar (DPKH) insan kemik iliği kaynaklı MKH'lar (KMKH) ile benzerlikler taşır. DPKH'lar, odontoblastların öncül popülasyonudur ve ilk olarak 2000 yılında Gronthos ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır (25). DPKH'lar, ektoderm tabakasından göç eden nöral krest hücrelerinden oluşur ve fibroblast benzeri morfolojiye sahip olma, plastik yüzeye yapışma ve *in vitro* koloni oluşturma, kendini yenileme, klonojenik ve proliferatif özellikler sergileme gibi MKH özelliklerine sahiptirler (26). Mineralize dentin matriksini oluşturan odontoblastlara dönüşebilir ve dentinojenik, osteojenik, adipojenik, nörojenik gibi çok yönlü farklılaşma kapasitelerine sahiptir (27, 28). Ayrıca, çözünür faktörler salgılayarak immünomodülatör ve anti-inflamatuar özellikler gösterir ve kök hücre tabanlı rejeneratif terapiler için umut vermektedir (27, 29). KMKH'lara kıyasla DPKH'lar, özellikle ortodontik nedenlerle çekilen üçüncü azı ve premolar dişlerden elde edilebildiği için izolasyon açısından kolaylık sunar (30).

DPKH'lar; ECM, diğer yerel hücreler ve bunların etkileşimlerinden oluşan karmaşık bir mikroçevrede yer almaktadır. Hücre-mikroçevre etkileşimleri, MKH aracılı rejeneratif tedavilerde kritik bir rol oynar. Mikroçevreyi bilmek, endojen MKH fonksiyonunu restore etmek için mikroçevreyi iyileştirmenin çözümlerini geliştirmek, MKH'ların hastalıklı mikroçevreye direncini artırmak ve mikroçevreyi modüle etmek, MKH aracılı rejeneratif terapileri optimize etmek için önerilen stratejilerdendir (31).

Hastalıklı mikroçevre, mikroçevredeki biyokimyasal, mekanik ve fiziksel çeşitli faktörler DPKH'ların kaderini yani kendini yenileme ile farklılaşma arasındaki dengelerini etkiler. Mekanik kompresyonlar, dinamik hidrostatik basınç ve dalgalı sıvı akışı gibi mekanik uyarılar sinyal yollarını aktive ederek DPKH farklılaşmasını

tetikleyebilir (32). Dentin tübülleri aracılığıyla doğrudan bakterilere veya toksinlerine maruz kalmak veya çürük kaynaklı olarak ECM'nin enzimatik bozunması; proinflamatuvar mediatörlerin salgılanmasına ve sonuç olarak vazodilatasyon, artmış kan akışı, eksüda oluşumu ve dental pulpada ödem gelişimine yol açar. Bunu takiben ise vazokonstriksiyon, CO₂ seviyelerinde artma, pH seviyelerinde azalma ve sonuç olarak pulpal iltihaplanma meydana gelir (33). Pulpal iltihaplanmanın klasik tedavilerinde hastalıklı dokunun uzaklaştırılmasını takiben etkinliği ve prognozuna yönelik bazı kısıtlılıkları olan özel biyouyumlu malzemeler kullanılmaktadır (34). Mevcut malzemelerin geliştirilip, yeni malzemelerin piyasaya çıkmasının yanı sıra, son çalışmalarda pulpitisin fizyopatolojik özelliklerine (35, 36), dental pulpanın mikroçevresine (37, 38) ve özellikle dentin-pulpa kompleksinin rejenerasyonuna (39, 40) odaklanılmıştır. Pulpitisten etkilenmiş dişlerde iltihabi mekanizmayı daha iyi anlamak, terapötik protokollerin incelenmesi ve dolayısıyla pulpal iyileşme ve rejenerasyonu teşvik etmek için esastır.

2.3. Pulpitis

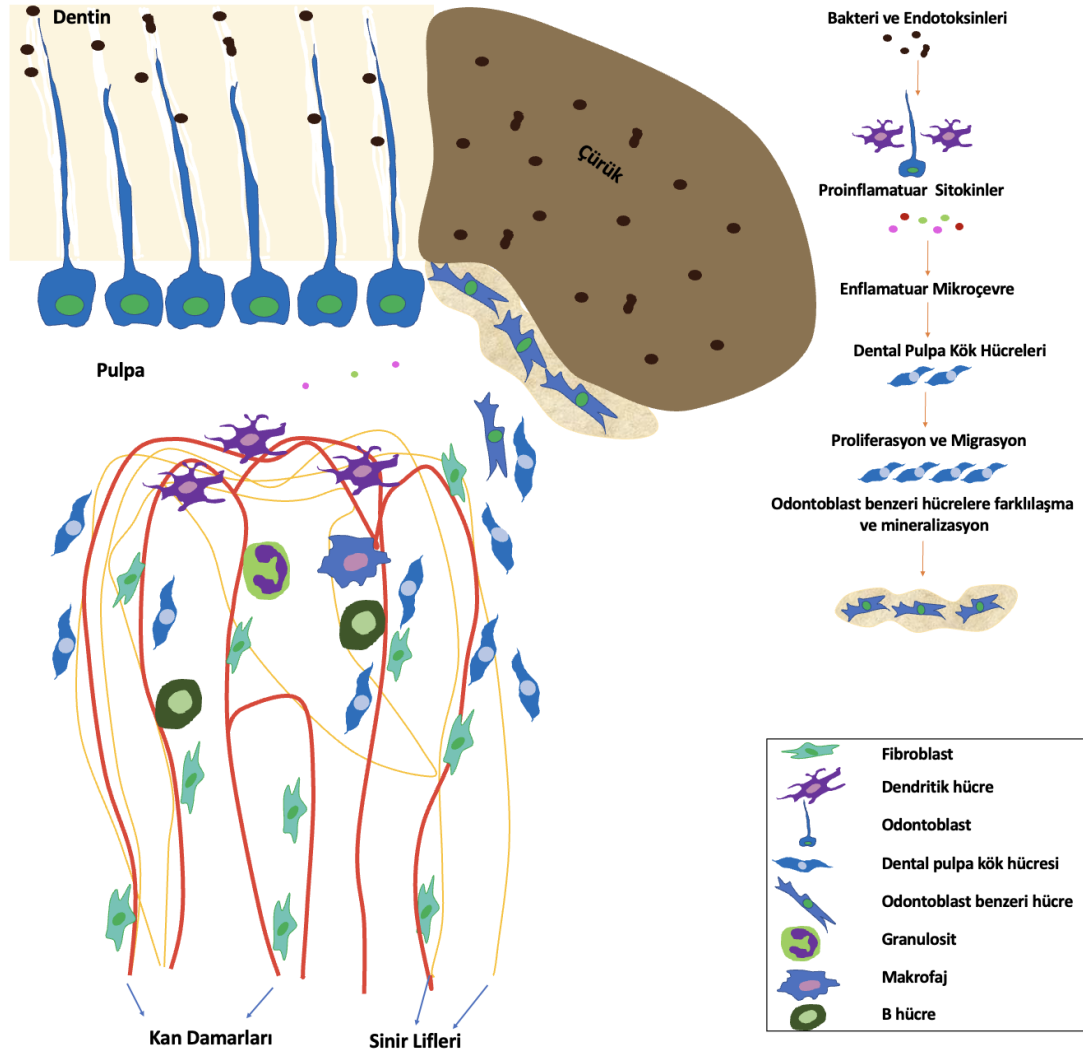
Diş / kavite preperasyonu, diş kurutma veya lüksasyon olmaksızın travma gibi kısa süreli iritanlar genellikle akut enflamasyona neden olur. Uyarının ortadan kalkmasını ise sıklıkla enflamasyonun çözülmesi ve dokunun onarılması izler. Tedavi edilmemiş diş çürükleri, kırık restorasyonlar, çatlaklar, erozyon, kötü restorasyonların mikrosızıntısı, apikal kan damarlarını etkileyen ciddi travma gibi uzun süreli iritanlar ise pulpanın kronik enflamasyonuna ve sonuçta pulpa nekrozu oluşumuna neden olur (41). Başlangıçtaki iritan ne olursa olsun, çoğunlukla bir çürük, çatlak veya restorasyon-diş ara yüzünde kırılma gibi bir yoldan bakteriyel giriş, pulpa enfeksiyonunun en yaygın nedenidir (41). Erken kolonize olan gram-pozitif bakterilerin organik asitleri tarafından çözünen mine hidroksiapatit kristalleri, asitlere ve bakterilere daha geçirgen hale gelir. Bakteriyel geçiş, mine-dentin bağlantısından dentin demineralizasyonu ve dentin tübülleri ile pulpaya doğrudur. Çürük lezyon derinleştikçe, azalmış karbonhidrat ve oksijen, artmış pH nedeniyle mikrobiyatada gram negatif anaerobik çubuklar baskın hale gelir. Bakteriler ve metabolitleri, dentin tübüllerinden pulpa boşluğuna nüfuz eder (41). Bu patojen ilişkili moleküler yapılar (PAMP), çürük kaynaklı pulpa iltihaplanmasının erken tetikleyicileri olarak bilinir

(35). Pulpa ve dentin arasında yer alan odontoblastlar ve bunların dentin tübülleri içerisine uzanan hücresel uzantıları, bu iritanları algılayarak savunmanın ilk hattını oluşturur (42, 43). Bu hücrelerin yanı sıra pulpa fibroblastları, lökositler ve pulpa kök hücreleri de PAMP'ları tehdit olarak tanır ve doğuştan gelen bağışıklık sistemini de aktive ederek fagositozu uyarır. Diş çürüğünde baskın olarak bulunan Gram-pozitif bakterilerin hücre duvarı bileşeni Lipoteikoik asit ve gram-negatif bakteri hücre duvarı bileşeni lipopolisakkarit (LPS), Toll benzeri reseptörler (TBR) tarafından tanınır. Antijenin TBR'lere ve sitozolik nükleotid bağlayıcı oligomerizasyon bölgesi 2'ye (NOD2) bağlanması, proinflamatuvar sitokinlerin ve kemokinlerin salınmasına yol açarak pulpa ve çürük lezyonu ara yüzüne dendritik hücrelerin ve diğer bağışıklık hücrelerinin yönelmesini ve bakteriyel toksinlerin nötralize edilmesini teşvik eder (42, 43). Odontoblastlar ve hücresel uzantıları beta-defensinler gibi bir dizi antibakteriyel ürün salgılar ve böylece mikroorganizmaların zar bütünlüğünü bozarak antimikrobiyal aktivite gösterir (43). Ayrıca, odontoblastlar ve dendritik hücrelerden sitokin ve prostaglandinlerin salımı ile inflamatuvar hücrelerin (T hücreleri, makrofajlar, nötrofiller, B hücreleri) bölgeye aktivasyonu ve dolayısıyla pulpal cevap tetiklenir; T-lenfositlerin CD4/CD8 oranı artar (42, 44).

Sağlıklı dental pulpa invazif patojenlere karşı etkili bağışıklık yanıt ve savunma geliştirir. M1 ve M2 fenotiplerini gösteren mononükleer hücreler olan makrofajlar, bakterilere karşı doğuştan gelen savunmanın ilk hatlarından birini oluşturur. Patojen bir saldırıya karşı konak hücrenin yanıtının başarısı veya başarısızlığı, hangi aktivasyon fenotipinin kullanıldığına bağlıdır. Enfeksiyonun başlangıç aşamasında, makrofajların M1 fenotipine doğru polarizasyonu baskındır (45). Bunlar bakteriyel aktiviteye karşı inflamatuvar yanıtta hayati bir rol oynarlar. Ayrıca, proinflamatuvar sitokinleri ve kemokinleri ifade ederek invaze olan bakterilerin öldürülmesini ve enflamasyonun çözülmesini sağlarlar. M1 makrofajların yanıtı, dokunun zarar görmesini engellemek için M2-polarize makrofajların aktivasyonu tarafından kontrol altına alınır. M2 makrofajlar tarafından salınan anti-inflamatuvar mediatörler, M1 makrofajları düzenler, inflamasyonu bastırır ve doku onarımını, yeniden şekillenmesini ve vaskülojenezi destekler (45). Bakterilerin yok edilmesinde bir başarısızlık olursa, M1 makrofaj fenotipi devam eder veya M2 fenotipi M1

makrofaj fenotipine geri döner ve buna bağlı olarak proinflamatuvar yanıtlar şiddetlenir ve yara iyileşme süreci bozulur (46, 47).

Rölatif olarak yavaş ilerleyen çürük lezyonunun varlığında veya patojenlerin uzaklaştırılıp uygun bir restorasyonla hastalığın durdurulmasında reaksiyoner dentin oluşumu tetiklenebilir. Odontoblastlar tarafından oluşturulan bu mineralize bariyer, pulpal savunma ve yara iyileşmesinin önemli bir özelliği olup pulpayı çürük lezyonundan ve bakterilerden ayırır. Ancak, daha hızlı ilerleyen çürük lezyonu durumunda odontoblastların ölümü gerçekleşir ve diş pulpasındaki kök hücreler veya fibroblastlar tarafından farklılaşan odontoblast benzeri hücreler, tübüler ve amorf yapıya sahip onarıcı dentin oluşumuna yol açar (38, 42). Bakteriler ve yan ürünleri tarafından uyarılan pulpanın enflamatuvar mikroçevresi ve dental pulpa kök hücrelerinin davranışları Şekil 2.2’de resmedilmiştir. Eğer enfeksiyon kontrol altına alınamazsa, daha şiddetli bir bağışıklık ve iltihap yanıtı gelişir ve bu da pulpa dokusunun nekrozu ile sonuçlanabilir (39). Nekrotik doku oluşumunun genellikle oksijen, besin kaynağı, lenfatik drenaj kapasitesi ve yara temizliğinde azalma sonucunda diş pulpasındaki yerel bağışıklık hücreleri tarafından gerçekleştiği düşünülür (36).



Şekil 2.2. Bakteriler ve yan ürünleri tarafından uyarılan pulpanın enflamatuar mikroçevresi ve dental pulpa kök hücrelerinin davranışları (2).

2.4. Geleneksel ve Doku Mühendisliğine Dayalı Vital Pulpa Tedavi Yöntemleri

2.4.1. Geleneksel Vital Pulpa Tedavileri

Dental pulpanın canlılığını sürdürmek; olgunlaşmamış daimi dişlerde kök gelişiminin devam etmesini ve dış uyaranlara cevap verebilmesini sağlamak için esastır. Pulpa açığa çıktığında uygulanan geleneksel vital pulpa tedavileri; direk pulpa kaplama, kısmi veya total pulpotomi'dir. Bu tedaviler ile zarar görmüş enfekte pulpanın uzaklaştırılması ve iyileştirilmesi, enfeksiyon bölgesinin altındaki sağlıklı dokunun ise korunması amaçlanmaktadır (48). Pulpa kaplama malzemesi tarafından

indüklenen kök hücreler veya öncüllerin odontoblast benzeri hücrelere dönüşümüne bağlı olarak dentin köprüsü oluşumu ve pulpa canlılığının korunması, malzemenin başarısını gösterir. Pulpa üzerine koruyucu bir bariyer olarak çoğunlukla kalsiyum hidroksit veya mineral trioksit agregat (MTA) gibi bir kalsiyum silikat siman kullanılır. Çürüğe bağlı pulpanın açığa çıkması durumunda kullanıldığında, hidrolik tri-/dikalsiyum silikat simanlar, kalsiyum hidroksite kıyasla daha güvenilir ve uzun vadeli tedavi sonuçları sağlamıştır (49, 50). Klinik teşhis, pulpa yaralanmasının büyüklüğü ve türü (çürük, travma, iatrojenik vb.), kullanılan malzeme, malzemenin biyoyumluluğu, enfeksiyon kontrol kabiliyeti ve sızdırmazlığı gibi faktörlerin pulpanın prognozunu etkilediği bilinmektedir (51). MTA ve kalsiyum silikat gibi biyoseramikler doku sıvıları ile temas edince kalsiyum hidroksit üretir ve takiben kalsiyum hidroksitin fosfat ile reaksiyona girmesi ise hidroksiapatit kristallerinin oluşumuna yol açar. Yapılan çalışmalara göre MTA; biyoyumludur, pulpa üzerini sızdırmaz bir şekilde kapatır ve pulpanın açığa çıktığı bölgede mineralize doku oluşumunu indükleme yeteneği gibi özellikler göstermektedir (52, 53). Ayrıca, MTA ile dental pulpa kök hücrelerinin doğrudan teması sonucunda, dentin sialofosfoprotein (*DSPP*), kemik sialoprotein (*BSP*), osteokalsin (*OCN*) gibi odontogenezis ile ilgili proteinlerin ifadesinde ve alkalen fosfataz (*ALP*) aktivitesinde artış gözlemlenmiştir (53, 54). Ancak, pulpanın iltihabi durumunun öngörülemezliği ve MTA'nın sınırlı anti-enflamatuar özellik göstermesi nedeniyle, ideal pulpa kaplama malzemesi arayışı devam etmektedir (55, 56). Ayrıca, bakteri kaynaklı lokal metabolik asidoz veya doku iltihabı nedeniyle asidik mikroçevreye maruz kalma, kalsiyum silikat bazlı malzemelerin mikrosertliğini, yüzey mikroyapısını ve apatit oluşturma kabiliyetini değiştirmektedir (57, 58, 59). Pulpitis teşhisindeki belirsizlik ve hangi vakalarda vital pulpa tedavilerinin uygulanabileceği konusunda tam bir kanıtın olmaması mevcut vital pulpa tedavilerinin önemli bir kısıtlılığıdır. Geri dönüşümsüz pulpa iltihabı veya yeniden enfeksiyon nedeniyle pulpa kaplama tedavilerinin %45'inin beş yıl sonra, %80'inin ise on yıl sonra başarısızlık gösterdiği bildirilmiştir (60). Ayrıca, pulpanın çürük maruziyeti ve ileri düzey inflamasyonu, tedavinin lisans öğrencisi veya genel diş hekimi tarafınan uygulanması pulp kaplama veya pulpotomi işlemlerinin öngörülebilirliğini en az %50'nin altına düşürmüştür (61).

Bugüne kadar, hidrolik kalsiyum silikat simanların dokuda oluşturduğu biyolojik cevap, kalsiyum hidroksite göre daha kalın ve daha yüksek kaliteli mineralize köprüler oluşturması olarak bildirilmesine rağmen, her ikisinin tepkisi de onarıcı niteliktedir ve oluşan sert yara dokusu tübüler yapıda olup dentin olarak kabul edilmez (62). Bu durum, pulpanın yara iyileşmesi sırasında odontoblast oluşumu ve gelişim süreçlerindeki karmaşık doğasını tekrarlamaması ya da mevcut malzemelerin spesifik olmayan etkileri nedeniyle olabilir (63). Hasta veya klinik açıdan, pulpa kaplama malzemelerinin daha kalın, daha yüksek kaliteli tübüler dentin oluşumunu teşvik etmesinin tedavi sonucuna etkisi az olabilir. Şu anki onarıcı yara iyileşme tepkileri kabul edilebilir klinik sonuçlar sağlasa da (64) hastaların, klinisyenlerin ve son olarak bilim insanlarının istekleriyle ilgili aşamalar göz önünde bulundurularak değerlendirilirse; rejeneratif doku cevabı sağlayacak, iltihaplanma veya onarıcı süreçlere yönelik yeni nesil biyomateryallerin geliştirilmesi yararlıdır ve son derece önemlidir (3, 65).

Dentin-pulpa kompleksi rejenerasyonunu arttıran, dokunun savunmasını ve onarımını modüle eden ideal tedavi tipi ve malzemeyi keşfetmek amacıyla son çalışmalarda doku mühendisliği yaklaşımları kullanılmıştır (66, 67). Doku mühendisliği ve moleküler biyoloji alanlarındaki ilerlemeler sayesinde hedefe yönelik tedavilerin, daha akıllı pulp kaplama malzemelerinin geliştirilmesi ve bu malzemelerin otolog kök hücreler ile kombinasyonu yenilikçi ve umut vadeden yöntemlerdir. Doku benzeri mikroortamın karmaşıklığı sebebiyle rekonstrüksiyonunda oluşan zorluklar; hücre temelli, iskele temelli ve iskelesiz hücre temelli olmak üzere çeşitli terapötik yaklaşımların ortaya çıkmasına neden olmuştur (67).

2.4.2. Doku Mühendisliğine Dayalı Vital Pulpa Tedavi Yöntemleri

Hücre Temelli Yaklaşımlar

Dentin rejenerasyonu için gömülü üçüncü molar veya insan süt dişinden elde edilebilen otolog DPKH'ların kullanımı önceki çalışmalarda önerilmiştir (68, 69). Ji ve arkadaşları (69), Beagle köpeklerinin premolar dişlerinde oluşturdukları pulpa ekspoza üzerine otolog DPKH ve kalsiyum hidroksit uygulamış ve dentin rejenerasyonunu değerlendirmişlerdir. Pulpa ekspoza alanına doğrudan DPKH

implantasyonunu takiben kalsiyum hidroksit uyguladıklarında tek başına kalsiyum hidroksit veya DPKH'ya kıyasla dentin rejenerasyonunda olumlu etkiler gözlemlenmişlerdir (69). Hücre temelli dentin-pulpa dokusu mühendisliği için gerekli hücreler, hücre transplantasyonu veya pulpada kalan kök hücrelerin göç, proliferasyon ve farklılaşmasının uyarıldığı yaklaşım (cell homing) yoluyla sağlanabilir (48, 70).

İskelesiz Hücre Temelli Yaklaşımlar

İnsan kaynaklı iskele yapıları; ECM bileşenleri ve büyüme faktörleri veya kök hücreler açısından zengin yapılar klinik olarak uygulanabilir yeni rejeneratif tedavi yöntemlerine izin verir. Ancak, hücre ekimi yapılan alandaki mevcut proteolitik enzimler ECM ve hücrelerin büyüme faktörlerini parçalayabilir (71). İskelesiz doku mühendisliği yaklaşımlarında hücre tabakaları (cell sheets), hücresel sferoidler (cell-spheroid), doku iplikçikleri gibi kohezif 3 boyutlu (3B) yapıları kullanılabilir ve kök hücre uygulamasının optimizasyonu için tasarlanmıştır (71). Hücre tabaka teknolojisinde hücreler sıcaklık duyarlı polimerler kullanılarak kaplanmış hücre kültür kaplarında yetiştirilir. Normal vücut sıcaklığında, hücreler yüzeye yapışırken; sıcaklık düşürüldüğünde, polimer yüzeyi hidrofilik hale gelir ve hücrelerin zarar görmeden yüzeyden ayrılmasına izin verir (72). Bu yöntem ile doku mühendisliği için hücre tabakalarının elde edilmesi, proteolitik enzim kullanmadan hücrelerin tabaka halinde, hücre-hücre bağlantıları, ECM, büyüme faktörleri ve iyon kanallarının da korunarak, ayrılmasını sağlar (72). Na ve arkadaşları (73), apikal papilla kök hücrelerini kullanarak 3B ve iskelesiz bir kök hücre tabakası peleti tasarlamışlar. İnsan işlenmiş dentin matriksi parçalarına hücre tabakası veya hücre tabakası peletlerini yerleştirip immün yetmez farelere nakletmişlerdir. 3B kök hücre tabakası peletlerinin dental pulpa/dentin benzeri doku rejenerasyonu için umut vaat ettiğini ve aynı zamanda iki boyutlu hücre tabakasına kıyasla fiziksel olarak daha stabil olduğunu belirtmişlerdir. Bu pelet sistemi, yeterli büyüklük ve iyi işlenebilirliğe sahip olmasının yanı sıra rejenerasyon için hayati olan ECM bileşenleri açısından da zengindir (73).

Bir diğer çalışmada, insan göbek kordon veni endotelial hücreleri, DPKH'lardan elde edilen mikro doku sferoidlerine eklenmiş ve diş kök kesitlerinin kanal boşluğuna yerleştirilip immün yetmez farelerin deri altına implante edilmiştir. Dört haftalık implantasyon sonrası histolojik incelemede iyi vaskülarize ve hücreli,

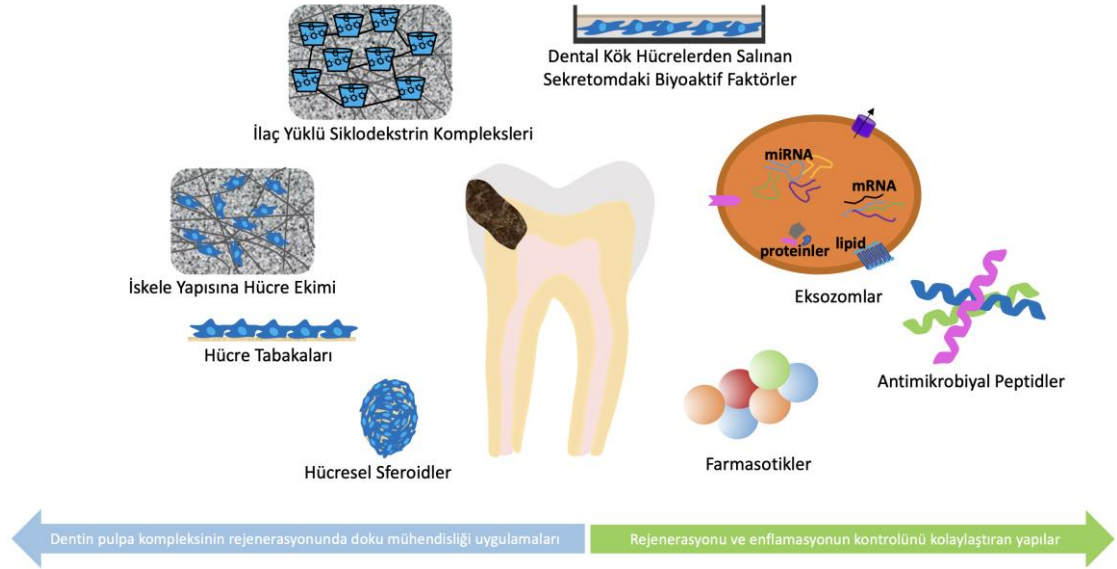
pulpa benzeri doku varlığı gözlenmiştir. Dentine komşu yüzeyde odontoblast benzeri hücrelerin sıralandığı, dentin tübüleri içine uzanan hücresel uzantıların varlığı ve nestin ve dentin sialofosfoprotein (DSPP) ifade edildiği gösterilmiştir. Mevcut yaklaşımın, hücre tabakalarına kıyasla yüzlerce uniform boyutta kendi kendine bir araya gelmiş, daha kontrollü mikrodoku oluşumu sağladığı belirtilmiştir.

Sadece hücrelerin ve hücrelerin ECM'sinin kullanıldığı iskelesiz sistemler, iskele temelli tedavilere kıyasla daha doğal bir alternatif sunar ve aynı zamanda hücrelerin eksojen iskele malzemesine homojen olmayan bir şekilde taşınması gibi zorlukları ortadan kaldırır. DPKH tabakalarının nörotrofik kök/projenitör hücrelerin taşınmasında daha başarılı olması, daha iyi immünomodülatör etkilere sahip olabileceğini düşündürmektedir. Diş hekimliğinde yapılan çalışmalarda iskelesiz sistemler yalnızca rejenerasyon için yürütülürken, iskele tabanlı tedaviler enflamasyon kontrolünde uygulanmıştır (73).

İskele Temelli Stratejiler

Hücreler, integrinler, selektinler ve kadherinler gibi hücre yüzeyindeki proteinler aracılığıyla kolajen (COL), fibronektin ve laminin gibi ECM proteinlerine bağlanır. İntegrinler, heterodimerik transmembran reseptörlerdir ve bağlandıkları ECM proteini türüne bağlı olarak çeşitli sinyalizasyon kaskadlarını başlatarak, hücrelerin proliferasyonu, farklılaşması ve göçünü düzenlemektedir (74). İskele temelli doku mühendisliğinde ECM'yi taklit eden doğal, sentetik veya kompozit iskeleler oluşturulur. Bu amaçla polimerler, hidrojeller ve konağın kendisinden elde edilen iskele yapıları kullanılabilir (51). Biyomedikal uygulamalar için kullanılan iskeleler, bir dizi temel özelliğe sahip olmalıdır: Kan damarları gelişimi ve büyüme faktörlerinin difüzyonu için yeterli alan sağlayacak şekilde hücre infiltrasyonunu destekleyecek gözenekliliğe, dokular tarafından yer değiştirilirken çevreyle ve yerine gelecek dokularla uyumlu bir şekilde bozunabilme özelliğine, herhangi bir istenmeyen etki veya zararlı bağışıklık yanıtı oluşturmadan işlevini yerine getirebilme, yani biyouyumluluğa sahip olması gerekmektedir. Ayrıca, iskele yüzeyinin hücrelerin tutunmasını ve farklılaşmasını teşvik etmesi, cerrahi sırasında işlenebilir olması ve çevre dokularla mekanik uyum sağlayacak yeterli özelliklere sahip olması önemlidir. Son olarak, maliyet etkinliği de göz önünde

bulundurulmalıdır. Bu nedenlerle, yenilenmesi istenen dokunun özelliklerine uygun olarak günümüze dek birçok iskele yapısı üzerinde çalışılmıştır (75). Doku mühendisliği temelli uygulamalarda dentin-pulpa kompleksinin rejenerasyonunu ve inflamasyonunu kontrolünü kolaylaştıran hedef yapılara örnekler Şekil 2.3.'de , kullanılabilen iskele yapıları ise Tablo 2.1. de özetlenmiştir.



Şekil 2.3. Doku mühendisliği temelli uygulamalarda dentin-pulpa kompleksinin rejenerasyonunu ve enflamasyonun kontrolünü kolaylaştıran hedef yapılara örnekler (2)

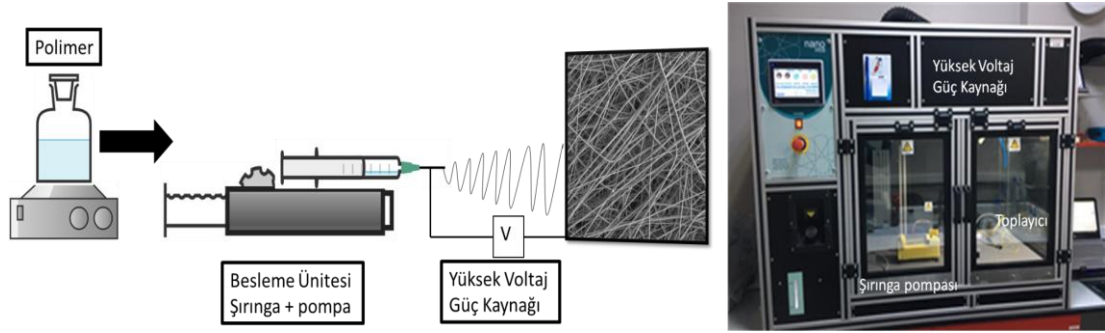
Tablo 2.1. Doku Mühendisliğinde kullanılabilen iskele yapılarına örnekler (75, 76, 77, 78).

Sentetik Polimerler	Doğal Polimerler	Doğal Hidrojeller	Sentetik Hidrojeller	Konağın kendisinden elde edilen iskele yapıları
PLA: poli(laktik asit)	Polisakkaritler	Kolajen	PEG: Poli(etilen glikol)	Hücesizleştirilmiş ekstraselüler matriks
PGA: poli(glikolik asit)	Kitin	Fibrin	SSAP: Kendiliğinden montaj yapan peptidler	Trombositten zengin plazma
PLGA: PLA ve PGA'nın kopolimeri	Siklodekstrinler	Hiyalüronik asit (proteoglikanlar)	Polimetakrilamid	Trombositten zengin fibrin
PCL: poli(ϵ -kaprolakton)	Aljinat	Kitosan	Poliamidler	
PEG: poli(etilen glikol)	Dekstran	Aljinat		
Poli(eter ester)	Kitosan	Jelatin		
Poli(üretanlar)	Selüloz			
Poli(bütülen tereftalat)	Nişasta			
	Hiyalüronan			

2.5. Nanofiberler ve Elektroğirme Yöntemi ile Üretimi

Doğal ECM'nin nanoboyuttaki yapısına benzerlik gösteren, 1 nm-100 nm kadar değişen çaplarda çok ince liflerden oluşan nanofiber iskeleler ve bir dizi üretim teknikleri geliştirilmiştir. Elektroğirme tekniği ile üretilen nanofiber iskele yapıları hücreler için uygun özelliklere, yüksek gözenekli yüzey alanına sahiptir ve nispeten kolay üretiminin de olması sebebiyle kullanımı avantajlıdır (79). Bu teknikte polimer ya da polimer olmayan yüksek moleküler ağırlıklı maddeler uygun bir çözücüde çözülür ve bu çözelti şırıngaya doldurulur. Şırınga pompası şırınga içerisindeki çözeltiyi şırınga boyunca itecek sürekli bir basınç oluşturur. Yüksek voltajlı güç kaynağı, şırınga ile toplayıcı levha arasında gerilim uygular. Elektrostatik itme kuvveti ve dış elektrik alanın etkisiyle damlacık ucunda bulunan çözelti Taylor konisi konik bir şekil alır. Elektrostatik kuvvetler yüzey gerilimini etkisiz hale getirdiğinde, elektriksel olarak yüklenmiş jet damlacıktan toplayıcı levhaya doğru atılır. Jet içindeki çözücünün buharlaşması ve elektrostatik itme kuvveti, jetin incelmeye yol açar (Şekil 2.4). Bu işlem sonunda toplayıcı üzerinde nano boyutlarda lifler birikir. Nanofiber üretimini ve fiberlerin morfolojik özelliklerini etkileyen faktörler üç ana kategoride incelenebilir: Çözeltinin karakteristikleri (çözeltinin viskozitesi, yüzey gerilimi, elektiriksel iletkenliği, dielektrik özellikleri ve polimer yapısı gibi faktörler), işlem değişkenleri (uygulanan voltaj miktarı, çözeltinin akış hızı, şırınga ucu ile toplayıcı arasındaki uzaklık) ve ortamın sıcaklığı ve bağıl nem oranı gibi çevresel faktörlerdir (80).

Çok sayıda sentetik polimer, yarı sentetik polimer ve biyopolimerden elektroğirme yöntemi ile nanofiber elde edilmesi mümkündür. Ancak bu polimerlerin uygulama alanlarına göre seçilmesi gerekmektedir. İpek, kolajen, kitosan, aljinat, fibrin, jelatin gibi doğal polimerler; polivinil alkol, polidioxanone, poli-L-laktik asit (PLLA), poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA), poli kaprolakton (PCL), polietilen oksit (PEO) gibi sentetik polimerler ve polimer&polimer, polimer&hidroksiapatit karışımları gibi kompozit polimerler elektroğirme için kullanılmıştır (79) (Tablo 1).

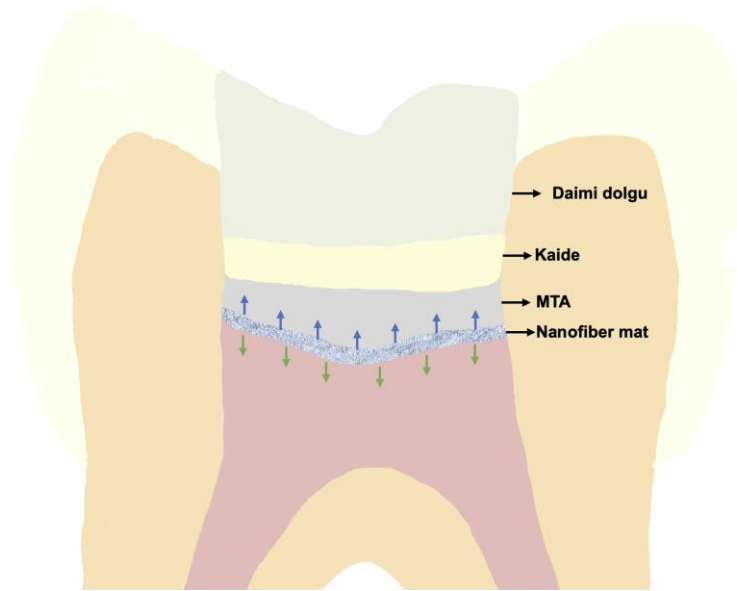


Şekil 2.4. Elektroğirme düzeneğinin şematik resmi ve Nanosan laboratuvarında kullanılan mevcut düzenek. Elektroğirme düzeneği dört ana parçadan oluşmaktadır: (1) yüksek voltajda güç kaynağı, (2) pompa, (3) şırınga ve (4) metal malzemeden yapılmış bir toplayıcı.

2.6. Elektroğirme ile Üretilen Nanofiberlerin Dentin Pulpa Kompleksinin Rejenerasyonunda Kullanımı

Elektroğirme tekniği ile elde edilen polimerik nanofiberler, dentin pulpa kompleksinin rejenerasyonunda umut verici adaylar olarak önerilmektedir (79). Pulpa yaralanması genellikle enflamatuvar bir yanıtla birlikte olduğundan ve dentin-pulpa kompleksinin rejenerasyonu uzun süreli bir işlem olduğundan, anti-enflamatuvar etkilere sahip, kontrollü salım yaparak daha uzun süre etki gösteren elektroğirilmiş matlar tasarlanmıştır (81). Terapötik etkiyi artırmak veya nanofiblerin yüzeylerini modifiye etmek, dental dokuların rejenerasyonunu desteklemek amacıyla bazı ilaçlar veya biyoaktif ajanlar nanofiblere katılmıştır (82). Örneğin, Yang ve arkadaşları (83) amorf kalsiyum fosfat (ACP) ve aspirin (ASP) yüklü tek katmanlı poli (laktik asit) (PLA) elektroğirilmiş membran üretmişler ve bunu iki PLGA elektroğirilmiş membran arasına hapsederek sandviç yapmışlardır. Dentin oluşumunu teşvik etmenin yanı sıra enflamasyonu uzun süreli baskıladığı için dental pulpa rejenerasyonu ve diğer kemik defektlerinin onarımında bu membranın kullanım potansiyeli olduğu belirtilmiştir. Yan ve arkadaşları (84), deneysel pulpitis modeli oluşturulan sıçanların üst birinci azı dişlerinde pulpa ekspoz alanının üzerini ASP/PLGA-ASP/ACP/PLLA-PLGA kompozit membranı ile örtmüş ve kontrol olarak MTA kullanmışlardır. ASP/ACP/PLLA-PLGA kompozit membran grubunda, MTA grubuna kıyasla daha yüksek dentin matrik proteini (DMP-1) ifadesi olduğunu göstermişlerdir. Erken aşamada ASP'nin salımının enflamasyonu kontrol altına aldığı ve DPKH'ların proliferasyonu ve farklılaşması için uygun bir mikroçevre sağladığı, ardından gelen

ASP ve ACP'nin ardışık salımının inflamasyonu azaltmada ve mineralize bariyer oluşumunu teşvik etmede olumlu etkilere sahip olduğu öne sürülmüştür. Lee ve arkadaşları yaptıkları *in vivo* bir araştırmada (85), sertleşmemiş MTA'dan salınan toksik bileşiklerin pulpaya olumsuz etkilerini gidermek, MTA'ya bağlı oluşan renklenmeyi önlemek ve de oluşan dentin köprüsünün kalitesini test etmek amacıyla pulpa ve MTA arasına bir bariyer olarak elektroğirilmiş PCL fiber mat yerleştirmişlerdir. Bu tedavi yaklaşımı sonucunda tek başına MTA'ya kıyasla daha kısa sürede ve daha kalın dentin köprüsü oluşumu gözlenmiş ve renklenme oluşmamıştır. Nanofiber matların dentin-pulpa kompleksinin rejenerasyonunu arttırmak amacıyla kullanımı Şekil 2.5'de resmedilmiştir.



Şekil 2.5. Dentin-pulpa kompleksinin rejenerasyonunu arttırmak amacıyla nanofiber matların kullanımının gösterilmesi.

2.7. Nanofiberlerin Siklodekstrinler ile Birlikte Biyoaktif Ajan/İlaç Taşıyıcı Sistemler Olarak Kullanımı

Siklodekstrinler (CD'ler), çeşitli bakteriler tarafından nişastadan elde edilen ve glukopiranoz birimlerinden oluşan halka şeklinde makromoleküllerdir. Alfa, beta ve gama olmak üzere üç tipi bulunan CD'ler, içi hidrofobik ve dışı hidrofilik bir yapıya sahiptir. Bu özellikleri, CD'lerin çeşitli hidrofobik veya amfifilik moleküllerle konuk-konak kompleksi oluşturmasını sağlar, bu da moleküllerin çözünürlüğünü, kararlılığını ve biyoyararlanımını artırır (86). Siklodekstrinler, beyaz, kokusuz, tatlı, nem

çekmeyen ve kristal toz formunda oldukları için uzun süre bozulmadan saklanabilir ve suda az çözünen maddelerin çözünürlüğünü artırmak için yaygın olarak kullanılır (87). Ayrıca molekülleri enkapsüle ederek kararlılıklarını korumalarına yardımcı olmaları veya kontrollü salımlarına olanak vermeleri nedeniyle sağlık alanında kullanımları gün geçtikçe artmaktadır (88). Ayrıca, 1:1 veya 2:1 oranında inklüzyon kompleksi oluşumu ile sınırlı olan ilaç yükleme kapasitelerinin, CD'lerin, nanofiber ağ yapılarının içerisine alınmasıyla, 30 kata kadar artabildiği yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir (89, 90). CD'ler nanofiberlerin fiziksel ve mekanik özelliklerinin iyileştirilmesine, uyarılara cevap verebilme, konuk molekül hapsetme, ayarlanabilir dolaşım süresi ve ilaç salımı gibi önemli fonksiyonel özellikler sunan nano boyutlu sistemlerin tasarımına da olanak tanımaktadır (90, 91). Dagherry ve arkadaşları (17), β -CD IC kullanarak Deksmetazonun (DEX) sürekli salımını sağlayan bir ilaç salım sistemi geliştirmiştir. Elektroçirme tekniği ile PLGA/DEX-CD-IC nanofiber matlar elde edilip süt dişlerinden elde edilen kök hücrelerin mineralizasyon kapasitesini artırmayı ve doğrudan pulpa kaplama stratejisi için kullanım potansiyelini araştırmayı amaçlamışlardır. Araştırma sonuçlarına göre, β -CD ile DEX kompleksi oluşturulduktan sonra DEX'in çözünürlüğünde önemli iyileşmeler gözlemlenmişler ve özellikle %5 DEX/ β -CD-IC içeren grubun kök hücrelere toksik olmadığını, mineralizasyonu önemli derecede artırdığını, CD içermeyen gruba (PLGA/DEX) kıyasla daha sürdürülebilir DEX salımı elde ettiklerini bildirmişlerdir. Sonuç olarak, bu nanofiberlerin sürekli DEX salımı, biyoyumluluğu ve odontojenik farklılaşmayı uyarma yetenekleri sayesinde vital pulpa tedavisinde büyük bir potansiyel taşıdığı belirlenmiştir. Mevcut bu çalışmalardan da yola çıkarak çalışmamızda da üzüm çekirdeği proantosiyanidinin kontrollü salımını yapan nanofiber ilaç salım sisteminin üretimi, DPKH'lar üzerine etkileri ve böylece vital pulpa tedavilerindeki kullanım potansiyelinin araştırılması amaçlanmıştır.

2.8. Üzüm Çekirdeği Oligomerik Proantosiyanidinleri

Üzüm, içerdiği fenolik bileşikler sayesinde insan sağlığına antioksidan, antimikrobiyel, anti-enflamatuvar ve antikarsinojenik, kardiyoprotektif ve yaşlanmayı geciktirici faydaları bulunan bir meyvedir (92). Fenolik terimi bileşiğin bir benzen halkasına bir veya daha fazla hidroksil (OH⁻) grubunun bağlı olduğunu gösterir (93).

Üzüm çekirdeği polifenol ekstraksiyonu için önemli bir yan üründür ve monomerik flavanoller (kateşin ve epikateşin), dimerik, trimerik ve polimerik prosiyanidinler, fenolik asitler (gallik asit ve ellagik asit) gibi fenolik yapıda birçok flavonoid içerir. Flavonoidler serbest radikalleri uzaklaştırabilir ve böylece dokuları serbest radikal atağı ve lipid peroksidasyonuna karşı koruyarak antioksidan özellik gösterirler (94). Üzüm çekirdeği flavan-3-ol bileşiğinin oligomerleri olan proantosiyandinleri (pa) yüksek miktarda içerir; kateşin, epikateşin, flavan-3-ol olarak da isimlendirilir (94). Oligomerik PA'lar 2-9 arası monomer birimlerinden oluşur ve kolajeni çarpaz bağlayabilen doğal bir ajan olduğundan kolajenin mekanik özelliklerini artırmada oldukça etkilidir (13). Houde ve arkadaşları (95) üzüm çekirdeğindeki proantosiyandinlerin makrofajlarda periodontopatojenlerin lipopolisakkaritlerinden kaynaklanan oksidatif stresi anlamlı derecede azalttığını bildirmişlerdir. Antioksidan aktivitesini proenflamatuar mediyatörlerden nitrik oksiti ve serbest oksijen radikallerini temizleyerek ve oluşumunu inhibe ederek, indüklenbilir nitrik oksit sentazın (iNOS) oluşumunu düzenleyerek gösterdiğini belirtmişlerdir. Bu nedenle fagositik hücrelerin aşırı cevabından kaynaklı enflamatuar hastalıklarda doğal pa'ların kullanımının ve ilaç geliştirilmesinin faydalı olabileceğini belirtmişlerdir (95).

Flavanoidlerin çeşitli metallerle şelasyon yaptığı (96) ve doku yıkımında önemli rol oynayan MMP'lerin aktivasyonu için gerekli olan kalsiyum ve çinko gibi metaller ile de şelasyon yapabileceği (97) belirtilmiştir. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* LPS'si ile makrofajların uyarılması sonrası makrofajlar çeşitli konsantrasyonlarda üzüm çekirdeği özütü ile muamele edilmiştir. Sonuç olarak üzüm çekirdeği özütünün MMP-1, 3, 7, 8, 9, ve 13'ü inhibe ettiği, MMP salımının baskılanmasının NF-kB, p65 ve AP-1 aktivasyonunun inhibisyonu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Üzüm çekirdeği özütündeki anti-enflamatuar özelliklerin NF-kB sinyal yolağını inhibe etmesinden ve aynı zamanda MMP'lerin aktivasyonu için gerekli metallerin şelasyonundan kaynaklanabileceği öngörülmüştür (97).

Bununla birlikte, son yıllarda antioksidanların biyoyararlanımını arttırmak ve özelliklerini korumak için nano- ve mikroteknoloji ile antioksidanlar polimerik ya da polimerik olmayan matrikslerde (nanopartiküller, nanokapsüller, nano ve mikroemülsiyonlar) kapsüllenmiştir (80, 98). Enkapsülasyon işlemi biyoaktif

bileşenlerin bozunmasına ve aktivitelerinin azalmasına sebep olabilecek dış faktörlere karşı korunma, bazı aktif bileşiklerin çözünürlüğü ve biyoyararlanımında ise iyileşme sağlar. Kong ve arkadaşları (99), üzüm çekirdeği özütü ve sülfobütil eter- β CD inklüzyon kompleksleri oluşturmuş ve böylece üzüm çekirdeği özütünün suda çözünürlüğünün arttığını, ısı, ışık ve oksijenden etkilenmesine karşı koruma sağlayarak stabilitesinin de arttığını bildirmişlerdir.

Biz de çalışmamızda iyileşme ve doku rejenerasyonu için uygun bir mikroçevre sağlamanın yanı sıra mineralizasyonun indüklemesine izin veren, önemli antibakteriyel özelliklere sahip doğal bir biyoaktif ajan olan üzüm çekirdeği proantosiyanidini kullanmayı ve bu biyoaktif ajanın enkapsülasyonu için CD ile inklüzyon kompleksi oluşturup, elektroçirme tekniği ile PLA, PLA_PA-NF ve PLA-IC-Nf matların üretimini amaçladık. Ürettiğimiz nanofiberlerin karakterizasyon işlemlerini takiben DPKH'ların canlılığı ve odontoblastik farklılaşması üzerine etkilerini de test ettik.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırmanın Tipi

Bu araştırma tanımlayıcı tipte hücre kültürü çalışmasıdır.

3.2. Araştırma Yeri

Dental pulpa örnekleri, H.Ü. Diş Hekimliği Fakültesi Ağız Diş Çene Cerrahisi Bölümü Lokal Ameliyathanesi'nde çekilen dişlerden alınmıştır. En uygun proantosiyanidin konsantrasyonunu belirlemek için yapılan ön çalışmada hücre kültürü çalışmaları H.Ü. Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde gerçekleştirilmiştir. Nanofiberlerin üretimi, elektroegirme yöntemi ile Ankara Hacı Bayram Veli Üniversitesi Polatlı Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde, primer hücre kültürü çalışmaları, moleküler biyoloji ve immünohistokimyasal yöntemler ise H.Ü. Kök Hücre Bilimleri Ana Bilim Dalı ve Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde gerçekleştirilmiştir.

3.3. Araştırmanın Evreni, Örneklemi, Araştırma Grubu

Araştırma grubu Hacettepe Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi Bölümünde gömülü yirmi yaş dişleri çekimi için randevu verilen, herhangi bir sistemik hastalığı bulunmayan 18-24 yaş arası 5'er hastadan oluşmaktadır. Dental pulpa örnekleri dişlerinin araştırma amacıyla kullanılmasına izin veren ve bilgilendirilmiş onam formunu imzalayan 5 hastadan ön çalışma için GO 22/431 sayılı etik kurul kararının (Ek 1.) kriterlerine uygun şekilde, 5 ayrı hastadan da GO 21/1318 sayılı etik kurul kararının (Ek. 2) kriterlerine uygun şekilde tez çalışması için elde edilmiştir.

Araştırmaya dahil olma ve olmama kriterleri aşağıdaki gibidir:

Dahil olma kriterleri:

- ✓ 18-30 yaş arasında olmak
- ✓ Hastaların, çekilen gömülü yirmi yaş dişlerinin araştırma amacıyla kullanılmasına onam vermiş olmaları

Dahil olmama kriterleri:

- ✓ Hastaların herhangi bir sistemik hastalığa sahip olması,
- ✓ Son iki hafta içerisinde antibiyotik kullanmış olmaları
- ✓ Dişlerde çürük ve/veya hipomineralizasyon olması

3.4. Araştırmanın Yöntemi ve Veri Toplama Araçları

Hastaların çekilmiş dişlerinden pulpa kök hücresi izolasyonu, çeşitli konsantrasyonlarda PA'nın DPKH'ların canlılığı üzerine etkisi, sentezlenen çeşitli nanofiber matların elde edilen kök hücrelerle etkililişimi ve incelenecek değişkenler aşağıda detaylarıyla anlatıldığı gibi değerlendirilmiş ve kaydedilmiştir:

3.4.1. Dental Pulpa Kök Hücrelerinin İzolasyonu ve Çoğaltılması

Hacettepe Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Ağız, Diş ve Çene Radyolojisi Bölümünde yapılan muayeneleri sonucunda çekimi uygun görülen ve Hacettepe Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi Bölümü'nden gömülü yirmi yaş diş çekimi için randevu almış hastalardan araştırmaya dahil etme kriterlerine uygun 18-24 yaş arasındaki 5'er hastanın çekilmiş dişleri hastaların yazılı onamalarının alınmasını takiben dental pulpa izolasyonu için kullanılmıştır Uygun PA konsantrasyonunun belirlenmesi amacıyla yürüttüğümüz ön araştırmadaki DPKH eldesi ve karakterizasyonu işlemleri de aşağıda açıklandığı gibidir. Bu nedenle, ön araştırma yöntem ve sonuçlarından farklı konsantrasyonlarda PA'nın DPKH'lara etkisinin WST-1 ile analizine dair detaylara bu tez yazımında verilmiştir.

Çekilen dişler %70'lik alkol emdirilmiş gazlı bezler ile silinip kron ve kök kısmındaki doku artıkları steril kretuar ile uzaklaştırılmıştır. Ardından fosfat tamponlu salin çözletisi (PBS) ile yıkanmış ve diş kronu mine-sement sınırı boyunca steril distile su soğutması altında elmas frez kullanılarak pulpa dokusuna kadar inceltilmiş ve kron kök birbirinden ayrılmadan +4°C'deki α -MEM (Minimum Essential Medium - Alpha, Biological Industries, Israel), %5 penisilin-streptomisin (Pen-Strep, Sigma) ve %5 Amfoterisin B (Amf B, Biological Industries) içeren 50 ml'lik steril falkon içerisinde 10-15 dk içinde H.Ü Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi'ne taşınmıştır.

50 ml'lik steril falkon içinde hücre kültürü laboratuvarına getirilen diş steril bir davye yardımıyla kök kısmından sabitlenip mine-sement sınırı boyunca inceltildiği yerden diğer bir davye yardımıyla nazikçe kırılarak pulpa dokusu açığa çıkarılmış ve kök içerisindeki pulpa dokusu steril kanal eğeleri ile izole edildikten sonra cam petri kabı içerisinde bisturi ile küçük parçalara ayrılarak mekanik parçalama yapılmıştır. 0,3 mg/ml kolajenaz (Sigma) ile 37°C'de 2 saat enzimatik sindirim gerçekleştirildikten sonra 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiş, takiben hücreler pipetlenerek homojenize edilmiş ve 40 µm'lik filtreden (Cell Strainer, Bd Biosciences Discovery Labware, Ct, ABD; 352340) geçirilmiştir. Tekrar santrifüj (1200 rpm, 5 dakika) edildikten sonra enzimatik besi yeri uzaklaştırılmış ve hücreler daha önceden 37°C'de su banyosunda ısıtılmış α-MEM +%1 pen-strep (100u penicillin/0,1 mg/ml streptomycin) + %20 fetal sığır serumu (FBS, Gibco) + 1% L-glutamin içeren besi yerinde T-75 ya da T-25 flasklara ekilerek 37°C ve %5 CO₂'li inkübatöre kaldırılmıştır. Kültür besi yeri 3 günde bir değiştirilmiş ve hücreler %80-85 konfluense ulaştığında tripsin (Grisp) ile pasajlama işlemi yapıp tripan mavisi boyası ile canlı hücrelerin sayısı hesaplanmıştır. Pasaj 2 ve 3 'deki hücrelerin karakterizasyonları yapılarak daha sonraki deneylerde kullanılmak üzere azotta muhafaza edilmiştir (100). İşlemler H.Ü Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde gerçekleştirilmiştir.

3.4.2. Dental Pulpa Kök Hücrelerinin Karakterizasyonu

Uluslararası Hücresel Tedaviler Derneği'ne (ISCT) göre MKH'leri tanımlamak için gereken minimum kriterlerden ilki standart kültür koşullarında hücrelerin hücre kültür kabına yapışabilmesidir (101) ve bu özellik ters ışık mikroskobu ile değerlendirilmiştir. İkinci gerekli kriter olan mezenkimal kök hücrelere özgü yüzey belirtçelerini ifade edip etmediği ise hücreler 2. pasaja ulaştıklarında akım sitometri ile bakılmıştır. Üçüncü kriter olan multipotent farklılaşma potansiyellerine sahip olması gerekliliği ise 2.pasajdaki hücrelerin standart *in vitro* farklılaşma koşulları altında osteojenik ve adipojenik farklılaşma testlerinin yapılması ile gerçekleştirilmiştir. Çalışmamızda ayrıca köklülük belirteçleri olan *SOX2*, *NANOG* ve *OCT3/4* genlerinin ifade edilip edilmediği gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ile değerlendirilmiştir.

Akım Sitometri ile Dental Pulpa Kök Hücrelerinin Yüzey Belirteçlerinin Tayini

Akım sitometri analizi için pasaj 2' deki hücreler, $2,5 \times 10^5$ hücre /ml FACS tamponu ile süspanse edilerek 4 FACS tüpüne bölünmüş ve 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj ile çöktürülmüştür. Takiben hücreler floresan-konjuge anti-insan antikoru (anti-human CD90-FITC, anti-human CD73-FITC, anti-human CD105-PE, anti-human CD45-APC ve anti-human CD34-PE) ile işaretlenmiştir. Tüm antikolar Becton Dickinson Pharmingen'den (BD, USA) temin edilmiştir. Antikolar ile işaretlenen hücreler 30 dakika karanlıkta bekletildikten sonra FACS tamponu ile 2 defa yıkama yapılmıştır. İzotip kontrol olarak IgG1-PE, IgG1-FITC ve IgG1-APC kullanılmıştır. Analizler akım sitometri cihazı (BD Accuri) ile yapılmıştır (102).

Dental Pulpa Kök Hücrelerin Farklılaşma Kapasitelerinin Tayini

Adipojenik farklılaşmanın değerlendirilmesi

Hücreler ikinci pasaja geldiklerinde 5×10^4 hücre/kuyucuk olacak şekilde altı kuyucuklu kültür kaplarına ekilmiştir. Konfluense ulaşan hücrelerin üzerine adipojenik farklılaşma besi yeri [DMEM-LG, 10 mm İndometazin (Santa Cruz Biotechnology, Oregon, ABD), 0,5 mm 3-isobutil-1-metil-ksantin (Sigma), 1 μ m Dekametazon (Sigma), 10 μ g/ml insülin (Santa Cruz Biotechnology)] eklenmiştir. Kontrol grubu olarak hücreler, standart büyüme besi yerinde (DMEM-LG, %1 penstrep, %1 l-glutamin ve %10 FBS) kültür edilmiştir. Kuyucuklar 21 gün 37°C' de %5' lik CO₂' li ortamda inkübe edilerek haftada iki kez besi yeri değişimi yapılmıştır. Hücre farklılaşması, kültürün 7, 14 ve 21. günlerinde inverted ışık mikroskobu ile takip edilmiştir. Adipojenik farklılaşma 21. günün sonunda Oil Red-O boyaması sonucu tayin edilmiştir. Kontrol ve farklılaşma kuyucuklarında bulunan hücrelerdeki adipojenik farklılaşma (yağ damlacıklarının oluşumu) ışık mikroskobu ile yapılan morfolojik inceleme sonucu tayin edilmiştir (41).

Osteojenik farklılaşmanın değerlendirilmesi

İzole edilen hücreler, ikinci pasaja geldiklerinde 5×10^4 hücre/kuyucuk olacak şekilde altı kuyucuklu kültür kaplarına ekilmiştir. Konfluense ulaşan hücrelerin

üzerine osteojenik farklılaşma besi yeri [DMEM-LG, %10 FBS, 10^{-7} M deksametazon (Sigma), 0,2 mM askorbik asit (Sigma) ve 10 mM β -gliserofosfat (Sigma)] eklenmiştir. Kontrol grubu olarak ise hücreler, standart büyüme besi ortamında (DMEM-LG, %1 penstrep, %1 L-glutamin ve %10 FBS) kültüre edilmiştir. Tüm kuyucuklar 21 gün 37°C ' de %5' lik CO_2 ' li ortamda inkübe edilmiş ve haftada iki kez besi yeri değişimi yapılmıştır. Hücre farklılaşması, kültürün 7, 14 ve 21. günlerinde ters ışık mikroskobu ile takip edilmiştir. 21. günün sonunda Alizarin Kırmızısı Boyası ile kontrol ve farklılaşma ortamlarında bulunan hücrelerdeki osteojenik farklılaşma (kalsiyum kristallerinin birikimi), ışık mikroskobu ile yapılan inceleme sonucu tayin edilmiştir (102).

Hücre Köklülük Belirteçlerinin Değerlendirilmesi

Üç germ yaprağı olan ektoderm, mezoderm ve endoderm tabakalarına ve bu tabakaların oluşturduğu yapılara farklılaşabilme potansiyeline pluripotensi denir ve henüz farklılaşmamış hücrelerden ifade edilen *SOX2*, *NANOG* ve *OCT3/4* belirteçleri hücrelerin köklülüğünü göstermektedir. Köklülüğü gösteren bu belirteçlerin erken pasajlardaki dental pulpa kök hücrelerinden ifade edildiği önceki çalışmalarda bildirilmiş ve çalışmamızda da değerlendirilmiştir (103). İkinci pasaj diş pulpası kök hücre peletinden total RNA izolasyonunun gerçekleştirilmesi için total RNA İzolasyon Kiti (Nepenthe) üreticinin talimatlarına göre uygulanmıştır. Kısaca, ilk olarak hücre peleti üzerine 750 μL RL (RNA lysis buffer) eklenmiş ve takiben pipetleme yapılarak oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında pelet üzerine 200 μL kloform eklenmiş ve vorteks edildikten sonra oda sıcaklığında 3 dakika inkübasyon ve takiben 4°C 'de 13000 rpm'de 12 dakika santrifüj edilmiştir. Üstteki sıvı faz toplanarak yeni bir tüpe aktarılmış ve %100 etanol eklenmiştir. Ardından 60 saniye 13.000 rpm'de santrifüj edilerek süpernatant yeni bir tüpe aktarılmış ve üzerine 500 μL PW tamponu eklenip 3.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edilmiştir. Kolon yeni tüplere aktarılarak üzerine 10 μL RNAz içermeyen su eklenerek 12.000 g'de 2 dakika santrifüj edilmiştir. İzolasyonu gerçekleştirilen RNA konsantrasyonu 260 nm'de, NanoDrop spektrofotometre (ND-1000 spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific Inc.) cihazı ile ölçülmüştür. RNA örneklerinden cDNA Sentez Kiti (iScript cDNA Synthesis Kit, Bio-Rad, Kat No: 1708891) kullanılarak tamamlayıcı DNA (cDNA) sentezi

gerçekleştirilmiş ve ardından LightCycler® 480 II (Roche, Almanya) PZR cihazı kullanılarak gen ifadeleri (*NANOG*, *OCT3/4* ve *SOX2* genlerin ifadesi ve referans gen Glikozaldehit 3-Fosfat Dehidrogenaz (GAPDH) karşılaştırılmalı olarak) ölçülmüştür (Tablo 3.1). LightCycler® 480 II yazılımı kullanılarak hedef ve referans genler için eşik döngü (Ct) değeri hesaplanmış, hücrelerdeki gen ifadelerindeki değişimler göreceli ($2^{-\Delta Ct}$ yöntemi) kantitasyon ile hesaplanıp istatistiksel analizi gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3.1. Hücre köklülük belirteçlerinin ifadesini değerlendirmek için GZ-qPZR deneylerinde kullanılan primer çiftleri ve dizileri

Gen	Forward	Reverse
<i>NANOG</i>	AAAGAATCTTCACCTATGCC	GAAGGAAGAGGAGAGACAGT
<i>SOX-2</i>	TAATTAGAATTCATGTACAACA TGATGGAGACG	TAATTAGGTACCTCACATGTGTGAG AGGGGCAGTGTGC
<i>OCT3/4</i>	GTATTCAGCCAAACGACCATC	CTGGTTCGCTTTCTCTTTTCG
<i>GAPDH</i>	CGAGATCCCTCCAAAATCAA	CATGAGTCCTTCCACGATACCAA

Kantitatif PZR Koşulu:

95°C 10 dakika,
95°C 10 saniye
60°C 30 saniye,
72°C 1 saniye (45 döngü) ve
40°C 30 saniye.

3.4.3. DPKH'ların Farklı Konsantrasyonlarda PA ile Muamele Edilmesi ve Uygun Konsantrasyonun Belirlenmesi

Proantosiyanidin farklı konsantrasyonlarının DPKH'lar üzerinde hem LPS ile indüklenmiş hem de indüklenmemiş ortamdaki etkilerini değerlendirmek amacıyla 2 µg/mL LPS ile 24 saat indüklenmiş ve indüklenmemiş DPKH'lar öncelikle 25, 50 µg/mL PA konsantrasyonları ile muamele edilmiştir. Herhangi bir etkisi gözlenmemesi üzerine konsantrasyon grupları artırılarak 75, 100 ve 200 µg/mL PA konsantrasyonları ile 24 saat muamele edilmesini takiben hücre canlılığını test etmek amacıyla WST analizi yapılmıştır.

3.4.4. Malzeme Sentez ve Karakterizasyonu

Nanofiber Ağ Yapılarının Elektroğirme Yöntemi ile Üretilmesi

Çalışmamızda nanofiberlerin üretimi için elektroğirme yöntemi kullanılmıştır. Polimer olarak Polilaktik Asit (PLA, mw=60,000 da, Sigma-Aldrich), çözücü olarak ise Kloroform (Isolab, HPLC için, %99.8) ve Metanol (MeOH, %99.8, Baker HPLC Analyzed, j.t. Baker) kullanılmıştır. Elde edilen nanofiberlerin boncuksuz (bead-free), düzgün yapıda ve çaplarının nano boyutta olması için elektroğirme tekniği ile birçok parametre düzenlenmiştir. Sistemde kullanılan polimerin cinsi/moleküler ağırlığı, çözücünün çeşidi, çözeltinin vizkositesi ve çözeltinin iletkenliği denemelerle optimize edilmiştir. Ayrıca, elektroğirme aparatında uygulanan voltaj, liflerin toplanma mesafesi, polimer çözeltisinin akış hızı, şırınga ucunun çapı da istenilen özellikte nanofiber elde edilmesi için önemlidir ve ayarlanmıştır. Elektroğirme yöntemiyle üretilen nanofiber materyaller şu şekildedir:

- 1) PLA-Nf (Kontrol)
- 2) PLA_PA-Nf
- 3) PLA-IC-Nf

Sadece PLA nanofiberlerin üretimi için, PLA polimeri, Kloroform/MeOH (2:1) (v/v) içinde %20 (W/v) olarak hazırlanmış ve manyetik bir karıştırıcı üzerinde karıştırılmıştır. PA yüklü PLA nanofiberi elde etmek için, %20 (W/v) PLA polimeri, Kloroform/MeOH (2:1) (v/v) çözücü ile homojen bir karışım elde edilene kadar karıştırılmıştır. Ardından, 75 µg/ml PA polimer karışımına eklenerek manyetik bir karıştırıcıda karıştırılmıştır.

Katı halde PA/CD inkluzyon kompleksi (IC) üretimi için dondurarak kurutma tekniği kullanılmıştır. Bu amaçla, β -CD 1:2 oranında etanol-su karışımında çözdürülmüş ve PA homojen β -CD çözeltisine karıştırılarak eklenmiştir. Çözelti, manyetik karıştırıcıda bir gece boyunca karıştırılmış ve -80°C'de 24 saat dondurulmuştur. Karışım 48 saat boyunca bir liyofilizasyon cihazına konulmuştur (104). IC ile yüklenmiş PLA'nın üretimi için, %3 IC, %20 (W/v) PLA polimerine eklenerek manyetik bir karıştırıcıda karıştırılmıştır.

Her bir çözelti için akış hızı 3 ml/saat, uygulanan gerilim 15 KV ve uçtan toplayıcıya mesafe 10 cm olarak ayarlanmıştır. Elektroğirme işlemleri, %20 bağıl nemde ve 24 °C'de gerçekleştirilmiştir (105).

Üretilen Nanofiberlerin Karakterizasyon Çalışması

Taramalı elektron mikroskop analizi

Üretilen nanofiberin morfolojisini belirlemek için SEM ile görüntüleme yapılmıştır. Bu amaçla üretilen nanofiber örneği SEM stabına yerleştirilmiş ve yaklaşık 5 nm kalınlığında paladyum-altın kaplama yapıldıktan sonra SEM analizi (Tescan Gaia 3 Fıb-Sem Mikroskobu, Çek Cumhuriyeti) yapılmıştır. Elde edilen mikrografılar üzerinde nanofiberlerin çap ölçümleri en az 100 noktada Image J programı (Ver. 1.53n, nih, ABD) ile ölçülerek hesaplanmıştır. SEM ile görüntüleme için Hacettepe Üniversitesi Hünitek Araştırma Merkezi'nden hizmet alımı yapılmıştır.

Temas açısı analizleri

Üretilen nanofiber ağ yapılarının hidrofobik/hidrofilik özelliklerini belirlemek için kalibre edilmiş bir mikroşırınga kullanılarak nanofiber matların üzerine ultrasaf su damlası damlatılmış ve ardından, damla-yüzey arayüzünü kaydeden bir optik mikroskoba (Biolin Scientific, Attention Theta Model, İsveç) bağlı kamera ile görüntüler çekilmiş ve yüzey ile su damlası arasındaki açı hesaplanmıştır.

Zayıflatılmış toplam yansıma-fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (ATR-FTIR) analizi

PLA, PA, CD ve PLA-IC-Nf toz formlarının fizikokimyasal karakterizasyonu, ATR-FTIR (Shimadzu, Irapinity-1s Model, Japonya) ile gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, örneklerin ATR-FTIR spektrumları, her bir spektrumda 64 tarama ile 4000 ila 400 cm^{-1} dalga sayısı aralığında kaydedilmiştir. Ayrıca, termogravimetrik analiz (TGA) ile inklüzyon kompleksinin (IC) varlığı doğrulanmıştır. Ölçümler, Shimadzu DTG-60 cihazı ve platin kap kullanılarak yapılmıştır (ısıtma 10 °C/dak; N2 atmosferi).

Şişme testi/su tutma kapasitesinin belirlenmesi

Nanofiber yapılarının şişme davranışının belirlenmesi için örnekler PBS içerisinde 24 saat boyunca bekletilerek test edilmiştir (106). Bu test için nanofiber yapılar 0.8 x 0.8 cm boyutlarında kesilmiş ve sonra PBS çözeltisinde (ph: ~7.2, 10 mm) bekletilmiştir. Örneklerin ağırlıklarını ölçmeden önce yüzeylerindeki fazla su süzgeç kağıtları ile alınmış ve ardından örnekler oda sıcaklığında kurutulmuştur. Nanofiberlerin şişme/su tutma testleri AHBV Üniversitesi, Nanosan Laboratuvarı'nda yapılmıştır.

Şişme oranı aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\text{Şişme Oranı} \left(\frac{g}{g} \right) = \frac{W_s - W_1}{W_1}$$

Bu formülde W1 kuru ağırlığı ve Ws şişmiş örneklerin ağırlığını temsil etmektedir.

Nanofiberlerin biyobozunumunun incelenmesi

Nanofiber matlar 0.8 x 0.8 cm boyutunda kesildikten sonra her bir kesilmiş matın başlangıç ağırlığı ölçülmüş ve ardından *in vitro* biyobozunumunun incelenmesi için 20 ml yapay vücut sıvısı (124 mm NaCl, 2 mm KCl, 2 mm MgSO4, 1.25 mm NaH2.PO4, 2 mm CaCl2, 26 mm NaHCO3, 10 mm d-glukoz içeren damıtılmış su, pH: ~7.4) içeren erlenmayerlere konulmuştur. Erlenmayerler 37 °C'de 1, 2, 7, 14 ve 28 gün boyunca inkübe edilmiştir. Farklı zaman aralıklarında, üç adet mat çıkarılmış ve bozunmuş örnekler önce damıtılmış suyla yıkanmış ve ardından oda sıcaklığında 24 saat kurutulmuştur. Matların ağırlığı, bozunma derecesini belirlemek için ölçülmüştür.

Nanofiberlerin antioksidan analizleri

Antioksidan analizleri 2,2-difenil-1-pikrilhidrazili [(DPPH), Sigma Aldrich] temel alan protokol ile yapılmıştır. Bu amaçla metanol içerisinde çözülerek DPPH solüsyonu hazırlanmış, bu solüsyondan 3 ml alınarak antioksidan özelliğe bakılacak örnek içerisine eklenmiş ve 15 dk inkübasyon süresi sonrası renk değişimi 517 nm'de UV-Vis spektrofotometre kullanılarak ölçülmüştür.

Nanofiberlerin antibakteriyel analizleri

Sadece PLA-Nf, PLA_PA-Nf ve PLA-IC-Nf'nin antibakteriyel etkisi, gram (+) *Staphylococcus aureus* (ATTC 6338) ve gram (-) *Escherichia coli* (ATTC 8739) bakterileri üzerine koloni oluşturma sayım yöntemi ile araştırılmıştır. Bu amaçla, öncelikle bakteriler bulyon besi yerinde 37 °C'deki 100 rpm çalkalamalı inkübatörde 24 saat süresince aktifleştirilmiştir. 0,8 cm büyüklüğünde kesilmiş fiberler, 0.5 mcfarland değerine ayarlanmış *E. coli* and *S. aureus* içeren tüplere eklenerek, 37 °C'de 100 rpm çalkalamalı inkübatörde 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda, tüplerden alınan örnekler, PBS tampon ile seri dilüsyon yapılarak 10 µl agar besi yeri üzerine drigalsi özesi yardımıyla yayılmıştır. Agarlar, 37 °C'de 24 h inkübe edilmiş ve sonrasında canlı bakteri sayımı yapılmıştır. Sonuçlar koloni oluşturan birim (kob) olarak değerlendirilmiştir. Çalışmada kullanılan bakteri kültürleri, Nanosan Laboratuvarı kültür koleksiyonundan elde edilmiştir.

In vitro salım deneyleri

Nanofiberlerin taşıdığı PA'nın *in vitro* salım deneyleri PBS içerisinde (pH=6.8) yapılmıştır. Bu amaçla, yaklaşık 25 mg nanofiber 30 ml PBS içerisinde 37 °C, 100 rpm çalkalama hızında inkübasyona bırakılmış. Belirlenen zamanlarda örnek alınarak yerine aynı hacimde PBS eklenmiş ve inkübasyon devam ettirilmiştir. Alınan örnekler, UV-vis spektrofotometrede önce dalga taraması yapılarak bulunan maksimum absorbans değerinde okutulmuş ve çıkan sonuçlar standartlara göre hesaplanmıştır.

3.4.5. Dental Pulpa Kök Hücrelerinin Elektroeğirilmiş Nanofiber Matlar ile Kültürü ve Odontojenik/Osteoblastik Farklılaşma Analizleri

Dental Pulpa Kök Hücrelerinin Malzemeler ile Kültürü

Elektroeğirilmiş matlar (PLA, PLA_PA-Nf ve PLA-IC-Nf) yaklaşık 0,8x0,8 cm boyutlarında kare şeklinde kesilerek her bir yüzeyi ultraviyole (UV) ışını ile 30 dk dezenfekte edilmiştir. +4 °C'de muhafaza edilen matlar hücre kültüründe kullanım öncesinde de her iki yüzeyi UV altında 20'şer dk boyunca steril edilmiştir.

Pasaj 2 (P2)'deki DPKH'lar 24 kuyucuklu hücre kültür plakalarına, nanofiber örnekleri içeren ve nanofiber içermeyen negatif kontrol kuyucukları da dahil olmak her bir kuyucuğa 10.000 hücre/ml yoğunluğunda olmak üzere ekilmiştir. Hücrelerin matlara ve kuyucuk tabanına (kontrol grubu) tutunması için 30 dk boyunca inkübatörde bekletildikten sonra üzerlerine besi yeri [DMEM-LG (Gibco) +100 u/ml pen/strep+ %10 fetal sığır serumu (FBS, Gibco)] eklenmiştir. Kültürler 1, 3 ve 7 gün boyunca sürdürülmüştür. Hücre metabolik aktivitesi, birinci, üçüncü ve yedinci günlerde suda çözünür bir tetrazolium tuzu olan WST-1'in (%10) her bir kuyucukta 2 saat boyunca bekletilmesi sonrasında değerlendirildi. Her bir kuyudan alınan 350 µl besi yeri spektrofotometrik ölçüm için mikropilaya okuyucularına (ELİSA okuyucu, TECAN) aktarıldı. Çözeltilerin absorbansları 450 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüldü.

Dental Pulpa Kök Hücrelerinin Osteo/Odontojenik Farklılaşmasının Değerlendirilmesi

PLA-IC-Nf matları 24 kuyucuklu plakalar içerisine yerleştirilip her iki yüzeyden 20dk boyunca UV ile sterilize edildikten sonra Nf matlar üzerine 10.000 hücre/ml eklenip 30 dk boyunca inkübatörde hücrelerin matlara tutunması beklendikten sonra kontrol ve osteojenik besiyerleri nazikçe eklenmiştir.

Tüm örneklerin 37°C' de %5' lik CO₂ inkübatörde 18 gün kültürleri yapılmıştır. 21 gün kültür yapılması planlanan malzemelerin 18 gün kültürlerinin yapılmasına nanofiber mebranların biyobozunum deneylerinde bozunumun 18.günde artması ve malzemenin etkisini görmek istememiz sebebiyle karar verilmiştir. 2 farklı grup (tek başına DPKH, PLA-IC-Nf), iki farklı besi yeri ile [kontrol besi yeri (KB); DMEM-LG (gibco) +100 u/ml pen/strep+ %10 fetal sığır serumu (FBS, Gibco), osteojenik farklılaşma besi yeri (OB); (Stempro, Gibco)] muamele edilerek 4 farklı grup elde edilmiştir.

Kalsiyum tayini

14. ve 18. günde farklılaşma besi yeri ilave edilen ve edilmeyen gruplardaki kalsiyum sentezinin kantitatif ölçümü için Quantichrom Kalsiyum Test Kiti (Bioassay

Systems, Abd) kullanılmıştır. Hücreler üzerindeki besi yeri atılıp 0.6 m HCl eklenerek 4 saat 37 °C’de inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra hücelere pipetleme yapılmış ve kit içeriğindeki bileşenler üreticinin talimatlarına göre eklenmiştir. Dilüsyon yapılmış örnekler ve kit içerisinde bulunan standart kalsiyum örnekleri hazırlandıktan sonra mikropkaya okuyucuda (ELİSA okuyucu, TECAN) 620 nm dalga boyunda okutulmuş ve çıkan sonuçlar standartlara göre hesaplanmıştır.

Alkalen fosfataz aktivitesinin tayini

Kültürün 14. ve 18. günlerinde her bir kuyudaki süpernatantlar (Conditioned medium) isimlerinin kaydedildiği ependorflara alınmış ve ALP aktivitesinin test edilmesi işlemlerine kadar -20°C’de muhafaza edilmiştir. Hücre içi ALP aktivitesinin test edilmesi için ependorflar -20°C’den alınarak oda sıcaklığına getirilmiş ve Alkalen Fosfataz Test Kiti (ALP Kolorimetrik Test Kiti, Abcam, Cambridge, United Kingdom) kullanılmıştır. Üretici firmanın talimatları doğrultusunda ependorflardan alınan örnekler ve teste ait olan standartlar, reaktifler ve solüsyonlar hazırlanmıştır. Mikropkaya okuyucuda (ELİSA okuyucu, TECAN) 450 nm dalga boyunda okutulmuş ve çıkan sonuçlar standartlara göre hesaplanmıştır (107).

Alizarin kırmızısı boyama testi

Alizarin kırmızısı boyama (AKB) testi için 14 ve 18. günlerde kuyucuklardaki besiyerleri uzaklaştırılıp her bir grup iki defa PBS (1ml) ile yıkandıktan sonra %3,7 nötral tamponlu formaldehit (Sigma) ile 37°C’de 20 dakika süreyle sabitlenmiştir. PBS ile bir defa daha yıkandıktan sonra örnekler sulu Alizarin kırmızısı çözeltisiyle oda sıcaklığında 15 dakika boyunca boyanmıştır. Ardından kuyucuklar distile su ile yıkayıp kuyucuklardaki boyamanın yoğunluğu fotoğrafları çekilerek görsel olarak değerlendirilmiştir.

Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ile hücre farklılaşmasının tayini

DPKH’ların tek başına ve PLA-IC-NF’ler üzerinde kontrol ve osteojenik besi yeri kullanılarak 18 günlük kültürünü takiben her bir gruptan alınan örneklerde hücrelerin osteojenik/odontojenik farklılaşmaya özgü genleri (*RUNX-2*, *OCN*, *DSPP*, *DMP-1* ve referans gen *GAPDH*; Tablo 3.2) ifade edip etmediği gerçek zamanlı

polimeraz zincir reaksiyonu (GZ-PZR) ile kantitatif olarak tayin edilmiştir. GZ-PZR ile ölçüm protokolü “Hücre Köklülük Belirteçlerinin Değerlendirilmesi” altbaşlığında açıklandığı gibi yapılmıştır.

Tablo 3.2. Osteojenik/odontoblastik farklılaşma belirteçlerinin ifadesini değerlendirmek için GZ-qPZR deneylerinde kullanılan primer çiftleri ve dizileri

Gen	Forward	Reverse
<i>GAPDH</i>	CGAGATCCCTCCAAAATCAA	CATGAGTCCTTCCACGATACCAA
<i>RUNX-2</i>	ACCAGATGGGACTGTGGTTA	AAGGTGAAACTCTTGCCTCG
<i>OCN</i>	CTCACACTCCTCGCCCTATTG	GCTTGGACACAAAGGCTGCAC
<i>DMP-1</i>	TTGTGAACTACGGAGGGTAGAG GT	TTGTGAACTACGGAGGGTAGAGG
<i>DSPP</i>	TAGCATGGGCCATTCCAGTT	ACTGGCATTTAACTCATCCTGTAC

3.5. İstatistiksel Analiz

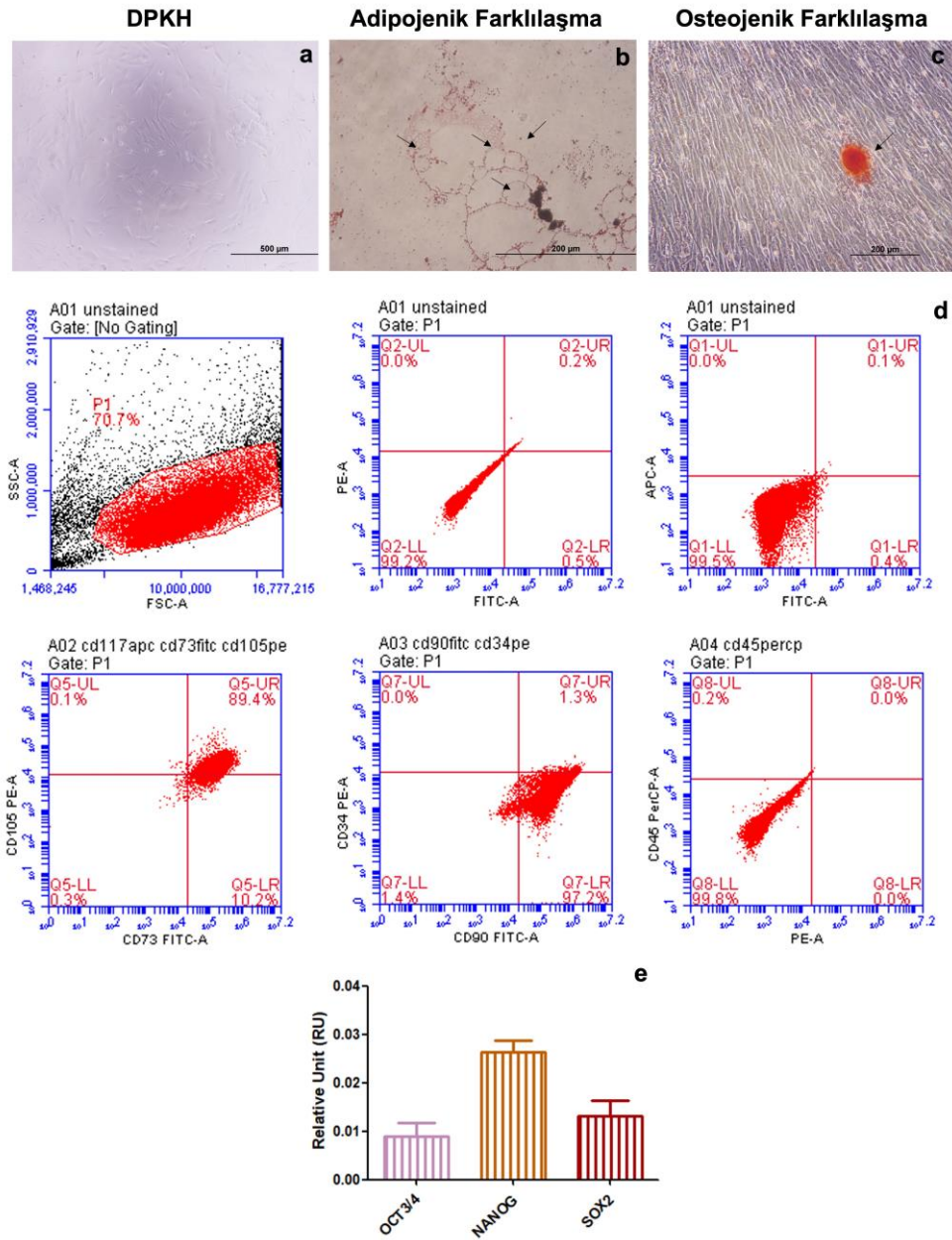
Proje kapsamında yapılan deneylerden elde edilen verilerin analizinde GraphPad Prism 5.0 yazılımı (GraphPad, San Diego, CA, ABD) kullanılmış ve $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Veri dağılımının normal olup olmadığını değerlendirmek için Shapiro-Wilk testi kullanılmış; veriler normal dağılım varsayımına uyduğunda çoklu grup karşılaştırmaları için tek yönlü varyans analizi (Tek yönlü ANOVA) ardından Tukey’in post-hoc testi uygulanmıştır. Veriler normal dağılım varsayımını karşılamadığında, çoklu grup karşılaştırmaları için Kruskal-Wallis testi ve ardından Dunn’in post hoc testi uygulanmıştır. Her farklı deney koşulu için en az üç tekrar ($n=3$) çalışılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Dental Pulpa Kök Hücrelerinin İzolasyonu, Çoğaltılması ve Karakterizasyonu

Bu çalışmada, üç sağlıklı katılımcıdan çekilen üçüncü büyük azı dişlerinden izole edilen DPKH'ların hücre ekimden 3 gün sonra kültür kabına yapıştığı ve proliferatif potansiyelle kısa zamanda yoğunluğa ulaşıp iğsi morfolojiye sahip oldukları gözlemlenmiştir (Şekil 4.1a). P2 DPKH'ların kültürünün 21. gününde, adipojenik farklılaşmaları Oil Red-O boyaması ile yağ damlacıkları oluşumunun osteojenik farklılaşmaları ise Alizarin Kırmızısı boyaması sonucundaki kalsiyum birikiminin mikroskopik olarak gözlemlenmesiyle doğrulanmıştır (Şekil 4.1.b ve Şekil 4.1.c)

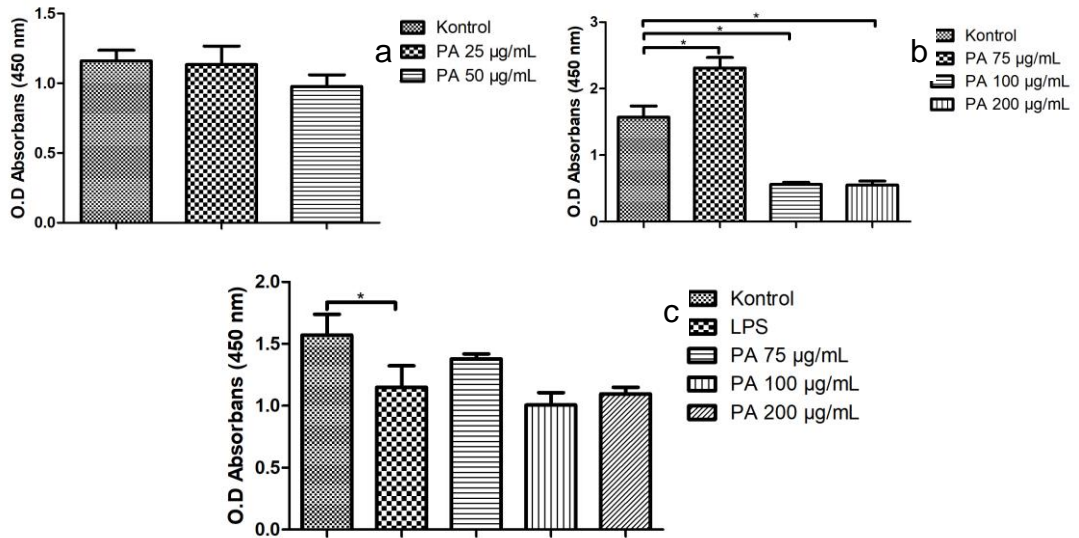
Elde edilen hücrelerde mezenkimal kök hücrelerine özgü yüzey belirteçlerinden CD90 (%98,5), CD73 (%99,6) ve CD105 (%89,5) pozitiflikleri ve hematopoetik hücrelere özgü yüzey belirteçlerinden CD34 (%1,3) ve CD45 (%0,2) negatiflikleri yapılan akım sitometri analizleri ile gösterilmiştir (Şekil 4.1d). Ayrıca DPKH'ların köklülük belirteçleri olan *NANOG*, *SOX2* ve *OCT3/4*'ü ifade ettiği gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ile gösterilmiştir (Şekil 4.1e)



Şekil 4.1. Dental pulpa kök hücrelerinin ışık mikroskop görüntüsü (a) ve 21. gün sonundaki adipojenik farklılaşmalarının Oil Red O boyama (b), osteojenik farklılaşmalarının Alizarin Kırmızısı boyama (c) ile gösterilmesi, DPKH'ların CD90, CD73 ve CD105 pozitifliği, CD34 ve CD45 negatifliğinin akım sitometri ile gösterilmesi (d), DPKH'lardan *OCT3/4*, *NANOG* ve *SOX2* ifadesinin GAPDH referans geni kullanılarak GZ-qPZR ile analizi (ort±SS, n= 3) (e).

4.2. Farklı Konsantrasyonlarda PA ile Muamele Edilen DPKH'ların WST Analizi Sonuçları

WST analizi sonuçlarına göre (Şekil 4.2a), 25, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ konsantrasyonlarda PA'nın DPKH'ların canlılığı üzerinde belirgin bir etkisi görülmemiştir. Konsantrasyon grupları artırılarak 50, 75 ve 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PA konsantrasyonları ile 24 saat muamele edilmesini takiben hücre canlılığı WST analizi ile test edildiğinde ise 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PA'nın DPKH'ların canlılığını 1,48 kat arttırdığı gözlenmiştir ($p<0.05$) (Şekil 4.2b). Sadece dental pulpa kök hücrelerine kıyasla 100 ve 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PA konsantrasyonları ile muamele edilen DPKH'larda ise hücre canlılığı anlamlı derecede daha düşük bulunmuştur (sırasıyla 2,80 kat ve 2,85 kat, $p<0.05$). DPKH'ların 24 saat 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS ile indüklendiği ortam koşulları için ise 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PA ile 24 saat muamele edilen DPKH'larda PA ile muamele edilmeyen LPS ile indüklenmiş DPKH'lara kıyasla hücre canlılığı artma eğilimi göstermiştir ($p>0.05$). Bu nedenle DPKH'lara toksik etki göstermeyen 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PA içeren nanofiberlerin sentezlenmesine karar verilmiştir.

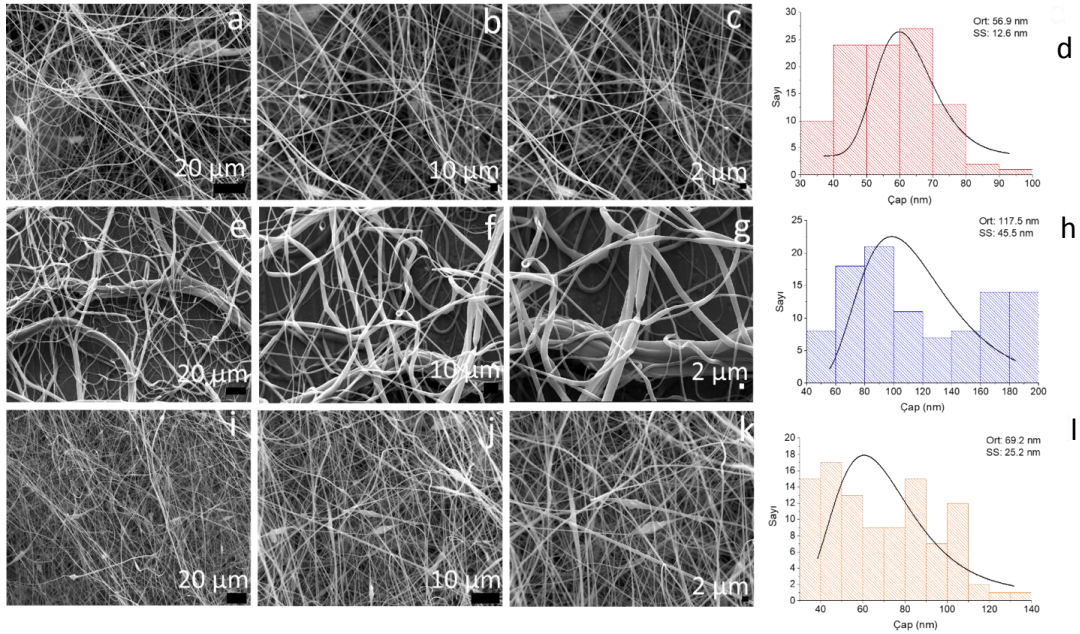


Şekil 4.2. DPKH'ların LPS ile indüklenmemiş (a,b) ve indüklenmiş (c) koşullarda farklı konsantrasyonlarda PA ile muamele edilmesini takiben birinci gündeki canlılığının test edilmesi (ort±SS, n=3, Tek yönlü ANOVA, * $p<0.05$).

4.3. Malzeme Sentez ve Karakterizasyonu

4.3.1. SEM Analizleri

Nanofiberlerin şekli ve çapı geliştirilen materyallerin özelliklerini belirlemektedir. Sadece PLA-Nf (a-c), PLA_PA-Nf (e-g) ve PLA-IC-Nf (i-k) matların SEM görüntüleri Şekil 4.3'de gösterilmektedir. SEM analizi sonuçlarına göre, tek başına PLA-Nf'ler düzenli ve boncuksuz bir morfolojiye sahiptir ve çapları 56.9 ± 12.6 nm'dir (Şekil 4.3d). PLA-Nf'ye PA katılması, şerit şeklinde liflerle sonuçlanmış ve en yüksek çapa (117.5 ± 45.5 nm) sahip olmuştur (Şekil 4.3h). Son olarak, PLA-IC-Nf'ler; 69.2 ± 25.2 nm çapında (Şekil 4.3l), boncuksuz ve yeterince düzenli morfoloji göstermiştir. PLA_PA-Nf'ler ile karşılaştırıldığında PLA-IC-Nf nanofiberlerinin çapı çok daha küçüktür.



Şekil 4.3. Sadece PLA-Nf (a-c), PLA_PA-Nf (e-g) ve PLA-IC-Nf (i-k) matlarının taramalı elektron mikroskobu görüntüleri ve sadece PLA-Nf (d), PLA_PA-Nf (h) ve PLA-IC-Nf (l) matlarının çap boyut dağılımları.

4.3.2. ATR-FTIR Analizleri

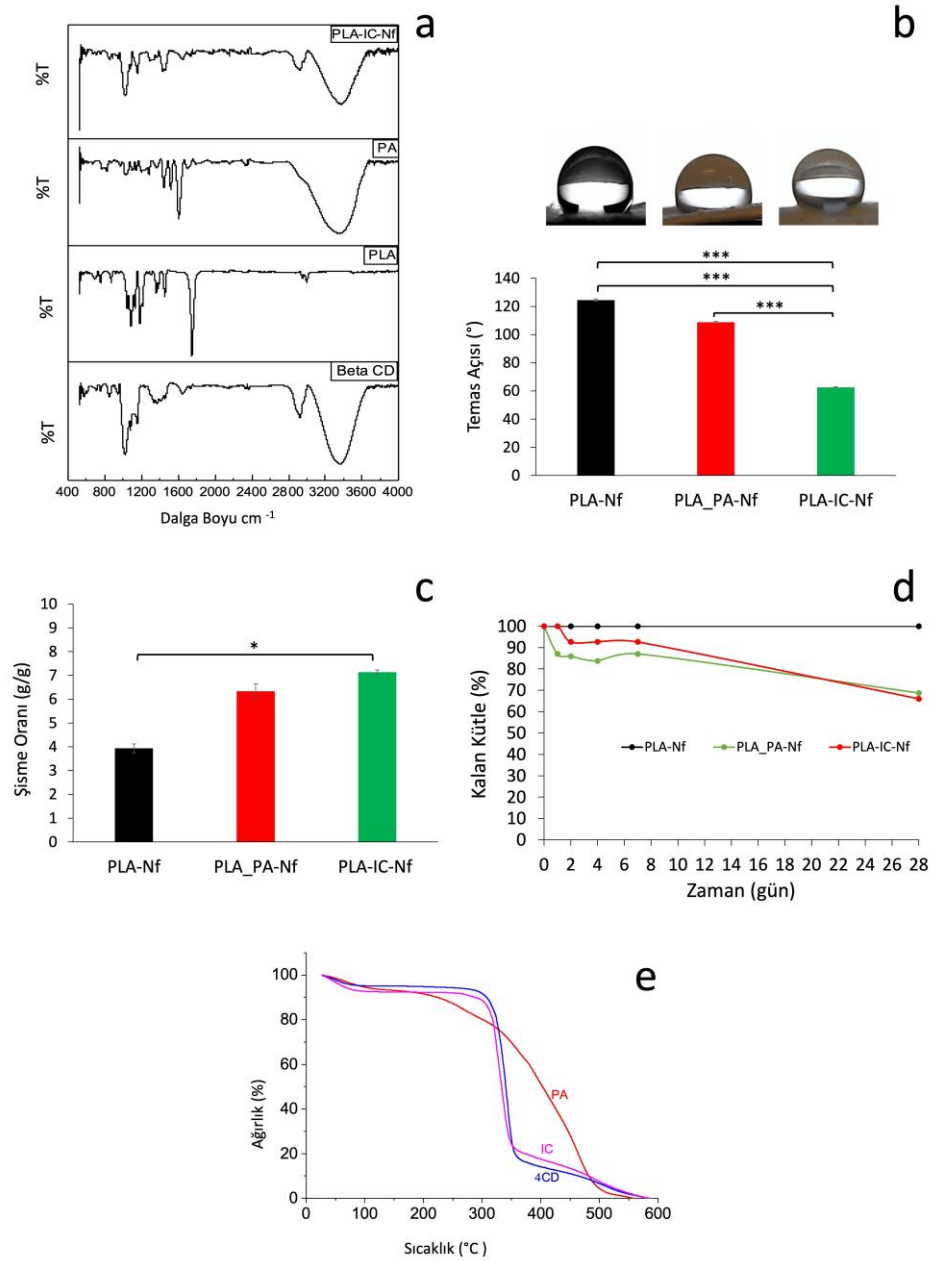
B-CD, PLA, PA tozlarının ve PLA-IC-Nf matının ATR-FTIR spektrumları Şekil 4.4a'da gösterilmektedir ve literatürde bildirilen değerler ile uyumludur. Karakteristik pikler, β -CD'nin toz formunda 1030 cm^{-1} , 1080 cm^{-1} ve 1155 cm^{-1} 'de O gerilme, 1638 cm^{-1} 'de H-OH eğilme, 2927 cm^{-1} 'de C-H alifatik gerilme ve 3401 cm^{-1} 'de O-H gerilme için ortaya çıkmaktadır (108). PLA'nın toz formundaki karakteristik absorpsiyon bantları, 1749 cm^{-1} 'de C=O titreşim pikini, 1453 cm^{-1} 'de CH₃ asimetrik makaslama, 1181 cm^{-1} 'de C-O asimetrik germe ve CH₃ burkulma, 1080 cm^{-1} 'de C-O-C germe, 1042 cm^{-1} 'de C-CH₃ germe ve 867 cm^{-1} 'de C-COO germe pikini içerir (109). PA spektrumunda, 3365 cm^{-1} 'de pik yapan geniş bir absorpsiyon bandı, proantosiyanidinlerin fenolik hidroksilleri arasındaki hidrojen bağının oluşumuna atfedilmiştir. 1610 cm^{-1} 'de ise poliflavonoid bölgesinin karakteristik fonksiyonel gruplarına atfedilmiştir (108).

4.3.3. Nanofiberlerin İslanabilirliğinin Analizi

Potansiyel bir doku mühendisliği malzemesinin hidrofilik olması hücrelerin tutunması ve çoğalması için gerekli olduğundan, nanofiber matların ıslanabilirliği ile ilişkili olarak su temas açısı ölçülmüştür. Şekil 4.4b sadece PLA-Nf, PLA_PA-Nf ve PLA-IC-Nf'nin temas açılarını göstermektedir. PLA-Nf ($124,5 \pm 0,8^\circ$) ve PLA_PA-Nf ($108,8 \pm 0,6^\circ$) hidrofobik özellikler gösterirken, IC eklendikten sonra ıslanabilirliğin değiştiği temas açısı ölçümleriyle doğrulanmıştır. PLA-IC-Nf matlar en yüksek ıslanabilirliği ($62,6 \pm 0,3^\circ$) göstermiş ve iyi ıslanabilirliğe sahiptir ($p < 0.001$). 24 saat boyunca PBS çözeltisinde bekletildikten sonra nanofiber matlarının şişme derecesi Şekil 4.4c'de gösterilmiştir. İnküzyon kompleksi içeren PLA nanofiberleri, tek başına PLA ve PLA_PA nanofiberlerine kıyasla en fazla şişme derecesi göstermiştir ($p < 0.05$). Matlardaki CD ve PA, suyun difüzyonunu ve şişmeyi teşvik etmiştir. Diğer yandan, PLA hidrofobik bir bileşik olduğundan, nanofiber matlarının hidrofobikliğini artırarak şişme derecesinin azalmasına neden olmuş olabilir.

4.3.4. Nanofiberlerin Bozunum Testi

Nanofiber matların bozunma profili Şekil 4.4d'de gösterilmektedir. Yapay vücut sıvısına batırılmasının 28 günü boyunca PLA-Nf kütlelerinde herhangi bir değişiklik olmazken PA ve IC içeren PLA-Nf farklı bir davranış göstermiştir. PA içeren PLA-Nf, 28 gün sonra %31,2 bozunurken, IC kompleksi içeren PLA-Nf %33,9 oranında bozunmuştur. β -CD için, ilk ağırlık kaybı yaklaşık 100°C'ye kadar suyun buharlaşması nedeniyle ve ikinci önemli ağırlık kaybı yaklaşık 350°C'de β -CD'nin bozunması nedeniyle gerçekleşir. PA için ağırlık kaybı 100°C'de başlar ve 500°C'ye kadar sürekli ağırlık kaybı gözlemlenir. IC tozu termogramı, üç ağırlık kaybı gösterir; birinci 100°C'de yine suyun buharlaşması nedeniyle, ikinci ve üçüncü 300 ve 350 °C'de gerçekleşir. PA'nın artan termal bozunumu, IC oluşumu ile PA ve CD molekülleri arasındaki etkileşimlerin kanıtıdır (Şekil 4.4e).

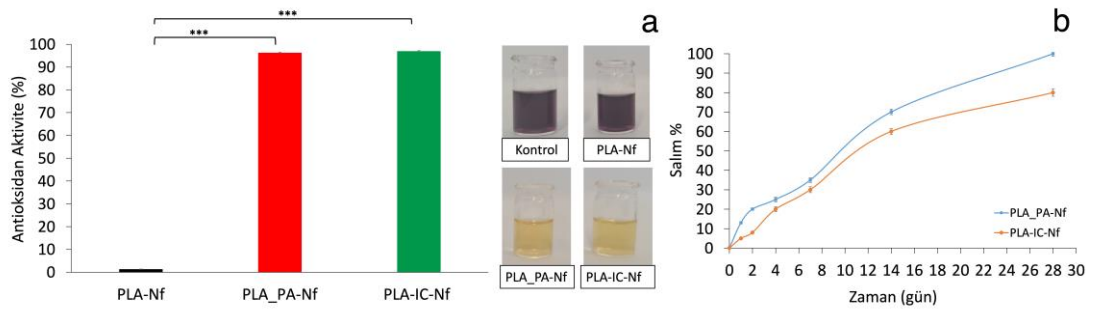


Şekil 4.4. B-CD, PLA, PA tozlarının ve PLA-IC-Nf matının ATR-FTIR spektrumları (a); ve PLA-Nf, PLA_PA-Nf ve PLA-IC-Nf matlarının temas açısı (b), şişme oranı (c) zamana bağlı bozunumunun (d); β -CD, PA ve IC'nin Termogravimetrik Analiz (TGA) eğrisinin (e) gösterilmesi. Nf'lerin temas açısının ve şişme oranının çoklu karşılaştırmaları için sırasıyla ANOVA ile Tukey'in post-hoc testi, Kruskal-Wallis testi ile Dunn'in post-hoc testi kullanılmıştır (Ort \pm SS, n = 3, * p < 0.05, *** p < 0.001).

4.3.5. Nanofiberlerin Antioksidan Analizleri

DPPH antioksidan analiz yöntemi kullanılarak PLA_PA-Nf ve PLA-IC-Nf içindeki PA'nın antioksidan kapasitesi araştırılmış ve sonuçları Şekil 4.5a'da gösterilmiştir. PLA-Nf, PLA_PA-Nf ve PLA-IC-Nf'nin antioksidan aktivitesi sırasıyla 1.3 ± 0.1 , 96.3 ± 0.2 ve 97 ± 0.2 olarak hesaplanmıştır. Tepkime öncesindeki DPPH çözeltilisinin fotoğrafları ile tepkimedenden sonra PLA-Nf, PLA_PA-Nf ve PLA-IC-Nf'nin fotoğrafları Şekil 4.5a'da gösterilmiştir. Beklendiği gibi, PLA-Nf oldukça düşük antioksidan aktivite göstermiştir ve bu nanofiberlerin yüksek yüzey alanına bağlı olarak DPPH çözeltilisini absorbe etmesi ile ilişkilendirilebilir. PLA-IC-Nf'nin antioksidan aktivitesi, PLA_PA-Nf'ninkine kıyasla bir miktar yüksek olsa da her iki çözeltilinin renginin açık sarı olduğu görülmüştür. Elektroçirime, PA'nın antioksidan aktivitesini olumsuz etkilememiş; PLA_PA-Nf ve PLA-IC-Nf hala oldukça yüksek antioksidan aktivite göstermiştir.

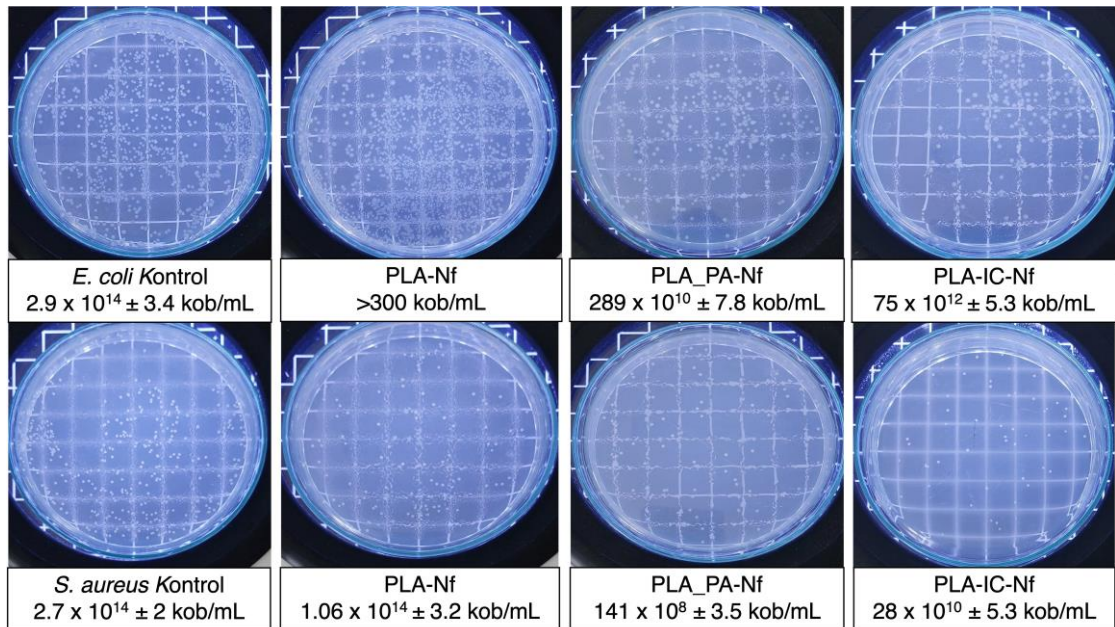
Şekil 4.5b, PLA-Nf ve PLA-IC-Nf'den PA salımını göstermektedir. PA içeren PLA nanofiberden 2 günde PA'nın yaklaşık %20'si salınmış ve ardından yaklaşık %100'ü salınana kadar 28 gün boyunca oldukça yavaş bir salım gerçekleşmiştir. Buna karşılık IC, PA'yı korumuş ve PLA-IC-Nf'den salım oranı, 28 gün sonra bile %20 seviyesinde kalmıştır.



Şekil 4.5. PLA-Nf, PLA_PA-Nf ve PLA-IC-Nf matlarının antioksidan aktivitesi (a); ve PLA_PA-Nf ve PLA-IC-Nf matlarından zamana bağlı PA salımının (b) gösterilmesi. Nf'lerin antioksidan aktivitesinin çoklu karşılaştırmaları için ANOVA ile Tukey'in post-hoc testi kullanıldı (Ort \pm SS, n = 3, *** $p < 0.001$).

4.3.6. Nanofiberlerin Antibakteriyel Analizleri

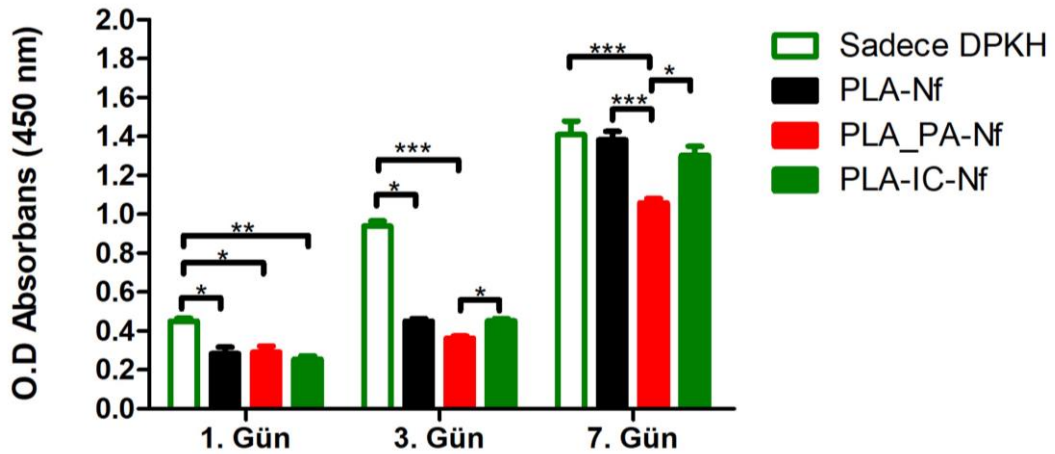
PLA-Nf, PLA_PA-Nf ve PLA-IC-Nf'nin Gram-negatif *E. coli* ve Gram-pozitif *S. aureus* bakterilerine karşı antibakteriyel aktivitesi test edilmiştir. Bakteri sayıları ile birlikte temsili fotoğraflar Şekil 4.6'da gösterilmiştir. Tablolarda ve sayımlarda görüldüğü üzere PLA-Nf; *E. coli*'ye antibakteriyel aktivite göstermemiştir. Kontrol olarak kullanılan *E. coli* sayısı 29×10^{13} (kob/mL)'dür. PLA_PA-Nf ve PLA-IC-Nf içeren gruplardaki bakterilerin sayısının azaldığı gözlenmiş ve sırasıyla $0,289 \times 10^{13}$ (kob/mL) ve $7,5 \times 10^{13}$ (kob/mL) olarak hesaplanmıştır. Antibakteriyel aktivite deneyleri *S. aureus* ile gerçekleştirildiğinde, sadece PLA-Nf antibakteriyel aktivite göstermezken, 27×10^{13} (kob/mL) *S. aureus* sayısı PLA_PA-Nf içeren örnekte $1,41 \times 10^{10}$ (kob/mL) ve PLA-IC-Nf için 28×10^{10} (kob/mL) değerine kadar azalmıştır. PLA_PA-Nf yapısının, PLA-IC-Nf yapısından daha yüksek antibakteriyel etkiye sahip olduğu görülmektedir. Bu durum aynı zamanda salım deneyi sonuçları ile de uyumludur. PA'nın polimer içine eklenmesiyle Nf üretildiğinde PA'nın Nf'den ortama salımı daha hızlı ve daha fazla olmaktadır. PA, CD'ye eklendiğinde, PA'nın ortama salım hızı ve miktarı daha yavaş ve daha az olduğundan antibakteriyel etki PLA_PA-Nf'ye kıyasla daha az gerçekleşmiştir.



Şekil 4.6. PLA-Nf, PLA_PA-Nf ve PLA-IC-Nf matlarının *E. coli* ve *S. aureus*'a ait koloni sayım görüntüleri ve agar fotoğrafları (Ort \pm SS, n = 3).

4.4. İn-vitro Sitotoksosite Testi Sonuçları

DPKH'ların Nf matları üzerinde kültürleri sonrası canlılıkları WST-1 ile ölçülmüştür (Şekil 4.7). WST analizi sonuçlarına göre, yalnızca DPKH'ların (kontrol grubu) canlılığı, DPKH'ların PLA-Nf, PLA_PA-Nf ve PLA-IC-Nf üzerinde kültürlendiği deneysel gruplara göre birinci günde anlamlı derecede daha yüksek bulunmuştur (sırasıyla 1.74 kat, $p<0.05$; 1.77 kat, $p<0.05$; ve 1.79 kat, $p<0.01$). Üçüncü günde; PLA_PA-Nf grubunda kontrol grubuna göre 2.67 kat ($p<0.01$) ve PLA-IC-Nf gruplarına göre 0.80 kat ($p<0.05$) daha düşük DPKH canlılığı gözlenirken kontrol grubu, PLA ve PLA-IC-Nf grupları arasında ise benzer düzeyde gözlenmiştir ($p>0.05$). Yedinci günde PLA_PA-Nf grubu; kontrol, PLA-Nf ve PLA-IC-Nf gruplarına göre daha düşük DPKH canlılığı gösterirken (sırasıyla 1.33 kat, $p<0.001$; 1.30 kat, $p<0.001$ ve 1.23 kat, $p<0.05$), DPKH canlılıkları kontrol, PLA ve PLA-IC-Nf grupları arasında istatistiksel olarak farklı bulunmamıştır ($p > 0.05$).



Şekil 4.7. DPKH'ların PLA-Nf, PLA_PA-Nf ve PLA-IC-Nf matları üzerinde kültürlerinin 1., 3. ve 7. gündeki canlılığının test edilmesi (ort±SS, n=3, Tek yönlü ANOVA, * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$).

4.5. Dental Pulpa Kök Hücrelerinin Nanofiberler Üzerinde Kültürü ve Osteo/Odontojenik Farklılaşmasının Değerlendirilmesi

4.5.1. Kalsiyum Tayini

Kontrol ve osteojenik farklılaşma besi yeri ile muamele edilen sadece DPKH ve PLA-IC-Nf gruplarının 14. ve 18. günlerdeki kalsiyum konsantrasyonunu niceliksel olarak ölçmek için Quantichrom Kalsiyum Test Kiti kullanılmıştır. Osteojenik farklılaşma besi yeri ile muamele edilen sadece DPKH'lar ($0.27 \pm 0.01 \mu\text{g/dl}$, $p < 0.05$) ve PLA-IC-Nf grubu ($0.28 \pm 0.01 \mu\text{g/dl}$, $p < 0.01$), kontrol besi yeri ile muamele edilmiş sadece DPKH'lara ($0.24 \pm 0.01 \mu\text{g/dl}$) kıyasla daha yüksek kalsiyum konsantrasyonları göstermiştir. Benzer şekilde 18. günde de osteojenik besi yeri ile muamele edilen gruplarda kontrol besi yeri kullanılanlara göre daha yüksek kalsiyum konsantrasyonu gözlenmiştir (Şekil 4.8a). Osteojenik besi yeri ile muamele edilen PLA-IC-Nf grubu ($0.56 \pm 0.02 \mu\text{g/dl}$), kontrol besi yeri ile muamele edilen PLA-IC-Nf grubuna ($0.38 \pm 0.01 \mu\text{g/dl}$) kıyasla istatistiksel olarak daha yüksek kalsiyum konsantrasyonu göstermiştir ($p < 0.001$).

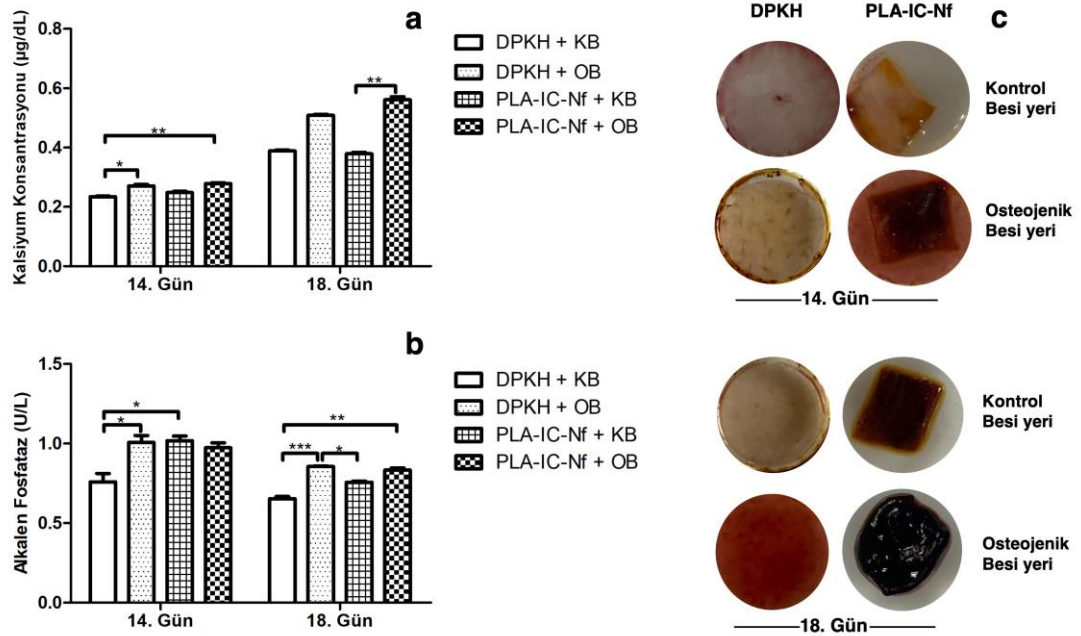
4.5.2. Alkalen Fosfataz Aktivitesinin Tayini

14. ve 18. günlerdeki hücre içi ALP aktivitesi değerlendirildiğinde; osteojenik besi yeri ile muamele edilmiş DPKH'lar ($1.01 \pm 0.10 \text{ U/L}$) ve kontrol besi yeri ile muamele edilmiş PLA-IC-Nf grubu ($1.01 \pm 0.06 \text{ U/L}$), kontrol besi yeri ile muamele edilmiş DPKH'lara ($0.76 \pm 0.12 \text{ U/L}$) kıyasla 14.günde anlamlı derecede daha yüksek ALP aktivitesi göstermiştir ($p < 0.05$). 18. günde ise, osteojenik ortamdaki DPKH'lar ($0.85 \pm 0.01 \text{ U/L}$) ve PLA-IC-Nf grubu ($0.83 \pm 0.04 \text{ U/L}$), kontrol ortamındaki DPKH'lara ($0.65 \pm 0.04 \text{ U/L}$) göre anlamlı derecede daha yüksek ALP aktivitesi göstermiştir (Şekil 4.8b)

4.5.3. Alizarin Kırmızısı Boyaması

Hücre farklılaşması, DPKH'ların Nf matlar üzerinde ve tek başına kültürünün 7., 14. ve 18. günlerinde, inverted ışık mikroskobu ile gözlemlenmiş ve aynı zamanda 14. gün ve 18. günün sonunda kalsiyum odaklarını boyayan ve dolayısıyla osteojenik/odontojenik farklılaşmayı gösteren alizarin kırmızısı boyaması yapılmıştır.

Alizarin kırmızısı boyaması sonucu oluşan turuncu/kırmızı renklenme, PLA-IC-Nf içeren grupta tek başına DPKH'lara göre, 18.gündeki örneklerde ise 14. gündekilere kıyasla daha yoğun gözlenmiştir (Şekil 4.8c).

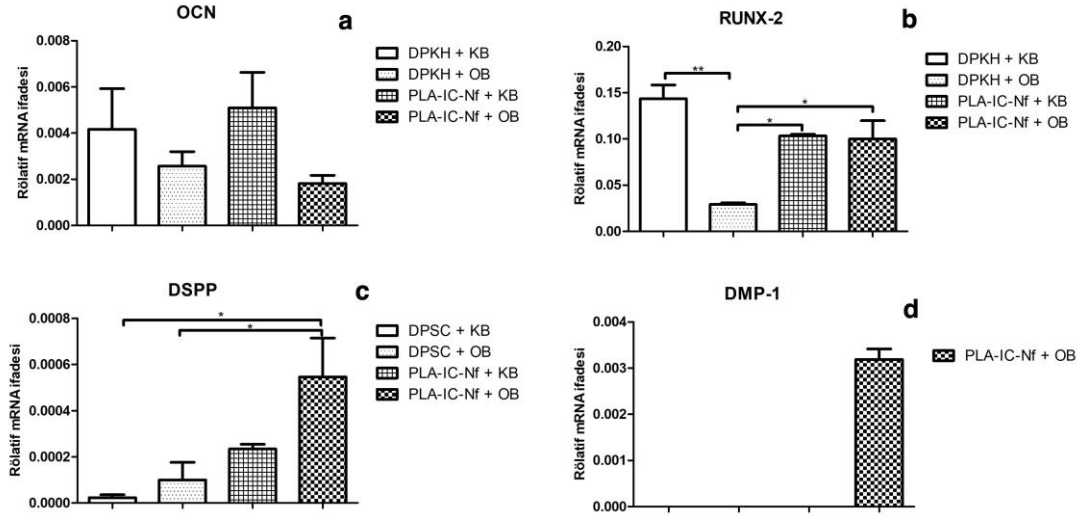


Şekil 4.8. Kontrol ve osteojenik besiyerlerinde kültür edilen Nanofiber ve kontrol gruplarının 14. (a) ve 18. (b) günlerdeki kalsiyum konsantrasyonlarının (ort \pm SS, n=3, Tek yönlü ANOVA, * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$) grafikleri ve Alizarin Kırmızısı Boyaması (c) görüntüleri.

4.5.4. Osteo/Odontojenik Farklılaşmaya Özgü Genlerin İfadesinin Değerlendirilmesi

DPKH ekilmiş PLA-IC-Nf örneklerinin iki farklı besi yeri kullanılarak (kontrol ve osteojenik besi yeri) kültür edilmesinin 18.gününde osteo- ve odontojenik farklılaşmaya özgü gen ifadeleri, kuyucuklardan alınan örneklerde GZ-qPZR kullanılarak belirlenmiş ve sonuçlar Şekil 4.9a–d'de gösterilmiştir. Gruplar arasında *OCN* ifadesi açısından anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p > 0.05$). *RUNX-2* ifadesi, osteojenik besi yeri ile muamele edilen sadece DPKH grubunda diğer gruplara kıyasla anlamlı ölçüde daha düşük bulunmuştur. *DSPP* ifadesinin, kontrol besi yeri kullanılan gruplar içerisinde PLA-IC-Nf grubunda sadece DPKH grubuna kıyasla 10 kat daha fazla olduğu görülmüştür ($p > 0.05$). Osteojenik besi yeri ile muamele edilen gruplar içerisinde de PLA-IC-Nf grubu sadece DPKH'lara kıyasla 5.48 kat daha yüksek *DSPP*

ifadesi göstermiştir ($p<0.01$). Osteojenik besi yeri kullanılan PLA-IC-Nf grubu *DMP-1* ifadesini tek başına gösterirken, kontrol besi yeri kullanılan sadece DPKH'lara kıyasla *RUNX-2* (3.42 kat, $p<0.01$) ve *DSPP* (23.8 kat, $p<0.01$) açısından anlamlı derecede daha yüksek ifade etmiştir.



Şekil 4.9. DPKH'ların PLA-IC-Nf matlarda 18 gün boyunca kontrol besiyeri ve osteojenik besiyeri ile kültürü sonrası, osteo/odontogenik farklılaşmaya (a–d) özgü genlerin (*OCN*, *RUNX-2*, *DSPP*, *DMP-1*) GZ-qPZR ile analizi sonuçları (ort±SS, n = 3, Tek yönlü ANOVA, * $p<0.05$, ** $p<0.01$).

5. TARTIŞMA

Pulpa iltihabı genellikle derin çürükler sonucu oluşur ve bir yandan tedavi sürecinin başarıya ulaşım ulaşmamasında belirleyici olan iyileşmeyi teşvik ederken diğer yandan ise kontrol altına alınmazsa pulpa nekrozuna yol açan hassas bir denge durumudur (38). Reaktif oksijen türleri (ROS) ve enflamasyon, doku rejenerasyonu ile hasar arasındaki dengeyi koruyan hücre sinyalizasyon mekanizmalarını düzenlemede kritik rollere sahiptir. Bu nedenle, kök hücrelerin çoğalması, farklılaşması ve canlılığını iyileştirmenin yanısıra kök hücre senesensini ve yaşlanma sürecini önleyebilecek, oksidatif stres ve enflamasyonun kontrolüne odaklanan çalışmalara ihtiyaç vardır (110).

Üzüm ve kızılcık gibi bitkilerde bulunan ve doğal antioksidan, antimikrobiyal ve anti-enflamatuar özellikleri ile bilinen bir polifenol grubu olan oligomerik proantosiyandinler, faydaları sebebiyle diş hekimliğinde birçok açıdan değerlendirilmiştir (13, 14). Üzüm çekirdeği proantosiyandinlerinin hücresel yaşlanmayı hafiflettiği de bilinmektedir (15). Pulpa iltihabı sırasında oksidatif stres ve iltihabı düzenlemenin önemi göz önünde bulundurularak, çalışmamızda β -CD içeren kompleks aracılığıyla proantosiyandinlerin sürdürülebilir salımını sağlayacak yenilikçi, biyobozunur elektroğirilmiş nanofiber matların geliştirilmesi ve DPKH'lara etkilerinin değerlendirilmesi hedeflenmiştir.

Elektroğirme tekniği ile üretilen nanofiberler, oksijen ve besin maddelerinin erişimini kolaylaştıran uygun gözenek boyutu ve geometrisinin elde edilmesine ve hücre metabolitlerinin drenajına olanak tanır (111). PLA; sentetik biyobozunur alifatik polyesterdir ve genellikle yenilenebilir kaynaklardan (mısır nişastası veya şeker kamışı gibi bitkisel bazlı malzemeler kullanılarak) üretilir ve elektroğirme yöntemi ile kolayca üretilebilmektedir (112). Bu polimer biyobozunur ve biyoyumlu olup FDA (Gıda ve İlaç İdaresi) tarafından güvenilir olarak kabul edilmekte ve bozunum ürünleri böbrek yoluyla atılmaktadır (113). Biyoyumluluğu sebebiyle biyomedikal alanda yaygın olarak kullanılmakta, elektrospun nanofiberlerin yapısında ya tek başına ya da kopolimer olarak sıklıkla tercih edilmektedir (114). Bu avantajları ve biyomedikal alanda yaygın kullanımı sebebiyle çalışmamızda da PLA kullanımını tercih edilmiştir. Elektroğirilmiş PLA nanofibri iskeleler, ham PLA malzemesine kıyasla daha büyük

bir yüzey alanına sahiptir, bu da sonuç olarak daha yüksek protein adsorpsiyonuna ama aynı zamanda daha hızlı bozunmaya yol açar (114).

PLA'nın biyobozunurluk, biyouyumluluk ve düşük immünojenik olması gibi üstün özellikleri nedeniyle oldukça umut verici olmasına rağmen, hücre yapışmasını ve çoğalmasını engelleyebilecek hidrofobikliği ve düşük yüzey enerjisi gibi kısıtlılıkları nedeniyle kullanımında bazı zorluklar bulunmaktadır (115). Ancak, bu zorlukları ele almak, hidrofobikliği azaltarak fiziksel ve mekanik özelliklerini geliştirmek, hücre malzeme arasındaki etkileşimi daha da iyileştirmek, nanofiber ağ yapılarının çapı, dizilimi ve ağlar arasındaki por yapılarını arzu edilen dokunun gelişimine uygun hale getirmek amacıyla polimer yapılarına biyoaktif bileşenler, biyomoleküller veya diğer polimer yapıları katılabilmektedir (114, 116, 117). Çalışmamızda hem PA'nın avantajlarından yararlanmak hem de ısı, ışık ve oksijenden etkilenmesi ve suda hızlı çözünmesi gibi kullanımını sınırlayan bazı kısıtlılıklarını (99) gidermek amacıyla da PLA yapısına tek başına PA veya PA salımı yapan CD kompleksi eklenmiştir. SEM görüntüleri göz önünde bulundurulduğunda, PA veya inklüzyon kompleksi PLA polimerine eklendiğinde gözlenen nanoliflerin çap kalınlığındaki artış beklenen bir sonuçtur ve literatürdeki çalışmalara benzerdir. Wang ve arkadaşları (118), farklı oranlarda PA eklendiğinde, çıplak zein Nflere kıyasla NF'lerin lif çaplarında bir artış bildirmiştir. PA, PLA polimerine eklendiğinde, nanolif kalınlıklarında bir heterojenlik oluşur çünkü nanolif kalınlaşır ve bir kurdele şeklini alır. Ancak, PA ve CD inklüzyonu bir kompleks oluşturduğunda, PA'nın CD'nin boşluk yapısına girmesi nedeniyle PLA_PA-Nf'ye kıyasla daha ince çaplı nanolifler elde edilmiştir.

PA polimere dahil edilerek Nf üretildiğinde, PA'nın Nf'ten ortama salımı daha hızlı ve daha fazla miktarda olmaktadır. PA CD'ye eklendiğinde üretilen Nf yapısında ise ortama salınan PA'nın hızı ve miktarı daha yavaş ve daha az olmakta, bu da antibakteriyel etkinliği nispeten daha az etkili kılmaktadır. PA salım deneyi sonuçlarıyla da tutarlı olduğu üzere, PA içeren PLA-Nf yapısı PLA-IC-Nf'lere kıyasla daha yüksek antibakteriyel etki göstermektedir. Ancak, PA içeren her iki Nf de etkili antibakteriyel ve antioksidan aktivite göstermiştir. Inklüzyon kompleksinden salım mekanizması göz önünde bulundurulduğunda, PLA-IC-Nf'ten PA'nın daha yavaş ve

sürdürülebilir salımının DAHA uzun süreli antibakteriyel etki sağlayabileceğini varsayabiliriz. Ancak, bu varsayım farklı zaman aralıklarında antibakteriyel etkinin değerlendirildiği daha ileri çalışmalarla test edilmelidir. Faki ve arkadaşları (119), elektroğirme işleminin üzüm çekirdeği özütlerini (ÜÇÖ) nano enkapsüle etmede kullanım potansiyelinin olduğunu ve aynı zamanda ÜÇÖ'nün PVA/ β -CD ile nanoenkapsülasyonu işlemi sonrasında antioksidan özelliğinin korunduğunu bildirmişlerdir. Çalışmamızda da elektroğirme işlemi sonucunda, PA'nın antioksidan aktivitesi olumsuz etkilenmemiştir. Locilento ve arkadaşları da (120), ÜÇÖ'yü (%10) PLA veya PLA/PEO ile ve elektroğirme yöntemiyle enkapsüle ederek elde ettikleri nanofiberlerin antioksidan özellik gösterdiğini ve hatta 45 gün sonra bile antioksidan özelliğinin korunduğunu bildirmişlerdir. ÜÇÖ yüklü PLA/PEO nanofiberleri üzerinde insan deri fibroblast hücrelerini kültüre ettiklerinde ise biyoyumlu olduğunu ve bu nedenle yara pansumanı uygulamalarında kullanım potansiyeli taşıdığını belirtmişlerdir. Birçok bitki ve üzüm çekirdeğinde de bulunan polifenolik bileşik resveratrol, Riccitiello ve arkadaşları (121), tarafından PLA veya PCL ile enkapsüle edilmiş ve PLA ile enkapsüle edildiğinde sürekli ve daha yavaş, kontrollü resveratrol (RSV) salımının olduğu bildirilmiştir. PCL ile enkapsüle edilen örnekler başlangıçta daha hızlı bir salım ve takiben daha yavaş bir resveratrol salımı göstermişlerdir. Her iki örnek DPKH'lar üzerine benzer osetoindüktif özellik gösterse de PLA_RSV örnekleri aynı zamanda osteoklastik aktiviteyi inhibe ettiğinden kemik farklılaşmasını ve yapımını indüklemede kullanım potansiyeli taşıdığı belirtilmiştir. RSV'nin osteoklastogenezisi inhibe etmesi için gereken miktar osteoblastik farklılaşmayı uyarması için gereken miktardan anlamlı derecede daha düşük olmasından dolayı daha yavaş salım yapan PLA enkapsülasyonunun yıkımı da inhibe ettiğini bildirmişlerdir. Liu ve arkadaşları (122), güçlü antioksidan özellikleriyle bilinen bir bitkisel esansiyel yağı olan sinamaldehit'in (CA) β -CD içine kapsüllenmesini ve CA/ β -CD kompleksinin elektroğirme kullanılarak PLA bazlı kompozit liflere dahil edilmesini araştırmıştır. Çalışmamızın sonuçları ile de uyumlu olarak CA/ β -CD kompleksinin nanoliflerin hidrofiliğini artırdığını ve *E. coli* ve *S. aureus'a* karşı önemli antibakteriyel aktivite sergilediğini, ayrıca insan cilt fibroblastları üzerinde düşük sitotoksikite gösterdiğini gözlemlemişlerdir. Sonuç olarak, PLA/CA/ β -CD nanofiber

matlarının yara örtüsü ve diğer biyomedikal alanlarda kullanım potansiyeli taşıdığını öne sürmüşlerdir.

Çalışmamızda, nanofiberlerin antibakteriyel etkisinin değerlendirildiği pek çok çalışmada olduğu gibi, (123, 124, 125) gram pozitif ve gram negatif türleri temsil eden bakteri örnekleri kullanılmıştır. Richert ve arkadaşları (36), çürük ve endodontik enfeksiyonlarla ilişkii temel mikroorganizmalar olmadığı halde *in vitro* pulpitis modellerinde bu bakterilerin veya yan ürünlerinin tutarlı ve tekrarlanabilir sonuçlar verdiği inancı sebebiyle çoğunlukla seçildiğini bildirmiştir. Yine de, PA salımı yapan nanofiber matların pulpitis ilişkii mikroorganizmalara karşı potansiyelini ve pulpa üzerinde uygulanabilirliğini araştırmak gerekmektedir.

Çalışmamızda başarıyla sentezlenen nanofiber matların biyoyumluluğunu test etmek amacıyla DPKH'lar kullanılmıştır. DPKH'lar kendilerine özgü yüzey belirteçleri olmamakla birlikte donorün sağlığı, yaşı gibi çeşitli faktörlere bağlı olarak önemli bir heterojenlik sergiler ve embriyonik kök hücre belirteçlerini de ifade edebilir (126). Bu çalışmada, herhangi bir ilaç kullanmayan belirli yaşlardaki sağlıklı hastalardan elde edilen DPKH'lar; plastik yüzeylere yapışma özelliği, mezenkimal kök hücrelere özgü yüzey belirteçlerinin pozitifliği, hematopoetik kök hücre belirteçlerinin negatifliği ve çoklu farklılaşma potansiyeli göstermiştir. Ayrıca, bu çalışmada da DPKH'lardan *OCT3/4*, *NANOG* ve *SOX2*'nin ifade edildiği gösterilmiştir ki bu durum DPKH'ların farklılaşmamış embriyonik kök hücrelere özgü pluripotensi özelliğinin ve kendini yenileme yeteneklerinin korunduğunu gösterir (103). DPKH'ların geç pasajlarının kullanılması; ifade edilen yüzey belirteçlerini, kök hücre özelliklerinin korunmasını ve hücre yaşlanmasını etkileyebileceği için bu çalışmanın tüm deneylerinde erken pasajlardaki (P2) DPKH'lar kullanılmıştır (127, 128).

DPKH'lar avantajları sebebiyle doku mühendisliğinde bugüne kadar çokça tercih edilmiş, çeşitli doğal ve sentetik biyomalzemeler üzerinde kültürlenerek kullanılmıştır (129, 130, 131). PA içeren PLA-IC-Nf matların üretimi ve DPKH'lara etkisinin araştırılmasına ise ilk defa çalışmamızda bakılmıştır. PLA-IC-Nf matlar başlangıçta sitotoksikite gösterse de daha kontrollü salım yapması nedeniyle hücre kültürünün kendini yeniden oluşturmasına izin vererek tek başına DPKH'lar ile benzer canlılık düzeylerine ulaşmıştır. PLA_PA-Nf örneklerinden PA'nın daha hızlı salımı,

daha düşük hücre canlılığına neden olmuş olabilir ki önceki çalışmalarda da PA konsantrasyonunun hücre canlılığını etkilediği gösterilmiştir (132). Cardoso ve arkadaşları (132), çeşitli konsantrasyonlarda (100, 50, 10 ve 5 µg/ml) üzüm çekirdeği özütünün insan gingival fibroblastları (HGF) üzerinde sitotoksik ve genotoksik etkilerini değerlendirdiği çalışmalarında, 100 ve 50 µg/ml konsantrasyonlarının genotoksik ve sitotoksik olduğunu 10 ve 5 µg/ml konsantrasyonlarının ise 24 saatlik bir süre sonunda hücre canlılığını artırdığını bildirmişlerdir. Çalışmamızda, PA'nın DPKH canlılığı üzerine etkilerini değerlendirdiğimiz ön çalışmamızın sonuçlarına dayanarak proantosiyanidin konsantrasyonu 75 µg/ml olarak tercih edilmiştir. PA'nın 25, 50 µg/ml konsantrasyonları (24 saat muamele sonrası) DPKH'ların canlılığı üzerinde herhangi bir etki göstermemiş, 75 µg/ml hücre canlılığını anlamlı derecede arttırırken 100 ve 200 µg/ml konsantrasyonları ise anlamlı derecede düşürmüştür.

Çalışmamızda nanofiber gruplarda başlangıçtaki daha düşük hücre canlılığı PLA'nın bilinen hidrofobikliğine bağlı hücrelerin yapışmasının ve dolayısıyla çoğalmasının daha güç olmasına atfedilebilir (133, 134). Nitekim hem PLA hem de PLA-IC-Nf birinci günde DPKH'lara kıyasla daha düşük canlılık gösterirken üçüncü ve yedinci günlerde benzer canlılık düzeylerine ulaşmıştır. Ayrıca, osteoindüktif özelliklerine bağlı olarak nanofiberlerin kök hücrelerin kaderini etkilediği ve proliferasyon ile farklılaşma arasındaki dengeyi farklılaşma yönüne kaydırıldığı da iyi bilinmektedir (135). Bulgularımız PLA-IC-Nf'nin artmış ıslanabilirliğinin hücre yapışmasını, canlılığını ve infiltrasyonunu kolaylaştırabileceği fikrini desteklemektedir. Üstelik, PLA_PA-Nf'ye kıyasla PLA-IC-Nf'den PA'nın daha yavaş salımı, PA'nın hücre canlılığı üzerindeki toksik etkisini hafifletmiş olabilir.

Mineralize dokularda önemli miktarda salgılanan ALP, sert doku oluşumunda ve kemik matrisi mineralizasyonunda kritik bir rol oynar ve osteoblast, odontoblast farklılaşmasının bir göstergesi olarak kabul edilir (136). Bu çalışmada, PLA-IC-Nf, 14. ve 18. kültür periyotları boyunca ALP üretimini ve salımını olumsuz etkilememiş, aksine arttırarak mineralizasyona katkıda bulunmuştur. 18. gündeki ALP ifadelerinin 14. güne göre daha düşük olması ise ALP'nin tipik olarak farklılaşmanın erken evrelerinde ifade edilmesine atfedilebilir (137).

Polifenollerin ve üzüm çekirdeği özütlerinin osteoblastların fonksiyonel aktivitesi üzerindeki etkisi önceki *in vitro* çalışmalarda da bildirilmiş (138, 139) ve buna bağlı artan mineralizasyon nodülleri Alizarin Kırmızısı boyaması ile de gösterilmiştir (140). Çalışmamızda da DPKH'ların osteo/odontogenik farklılaşması 14. ve 18. günlerde iki farklı ortam koşulu altında hem tek başına DPKH'lar hem de PLA-IC-Nf gruplarında Alizarin Kırmızısı boyaması ile değerlendirilmiştir. Alizarin Kırmızısı boyaması, PLA-IC-Nf içeren kültürlerde ve ayrıca 18. günde 14. güne göre daha yoğun gözlenmiştir. Osteojenik, odontojenik farklılaşma belirteçleri olan *OCN*, *RUNX-2*, *DSPP* ve *DMP-1*'in DPKH'lardan ifadesi ise GZ-qPZR ile değerlendirilmiş ve *OCN* için gruplar arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir. *OCN*'nin farklılaşmanın erken (141) veya geç dönemlerinde (142) ifade edildiği konusunda çalışma sonuçları farklılık gösterse de osteoblast farklılaşmasındaki rolü ve mineralizasyonun ilk evrelerinde kalsiyum ve fosfat çökmesini düzenlendiği bildirilmiştir. Osteojenik besi yeri ile muamele edilen gruplarda daha düşük *OCN* ifadesi eğilimi, osteoindüktif ortamdaki hücrelerin mineralizasyonun daha ileri evrelerine zaten ilerlemiş olmasından kaynaklanıyor olabilir. 18. günde, osteojenik besi yeri ile muamele edilen sadece DPKH grubundaki *RUNX-2* ifadesinin, diğer gruplara kıyasla anlamlı ölçüde düşük olduğu görülmüştür. Bu durum *RUNX-2*'nin farklılaşmanın erken dönemlerinde ifade edildiği ve osteojenik besi yeri ile kültüre alınan hücrelerde farklılaşmanın geç aşamasına ilerledikçe doğal bir şekilde *RUNX-2* ifadelerinin azalması gerektiği bilgisi ile uyumludur. Ancak, ortam koşullarının *RUNX-2* ifadesi üzerinde gözlenen bu etkisi nanofiberlerin varlığında görülmemiştir. Polifenoller gibi proantosiyanidinlerin farklılaşmanın erken aşamalarında *RUNX-2* ifadesini artırdığı bilirse de farklı zaman noktalarında PZR analizi yapılması farklılaşmanın çeşitli aşamaları boyunca proantosiyanidinlerin etkisinin nasıl olduğunu daha iyi anlamamızı sağlayabilir. *DSPP*, hem kontrol hem de osteojenik besi yeri ile muamele edilen PLA-IC-Nf gruplarında sadece DPKH'lara kıyasla sırasıyla 10 kat ($p>0.05$) ve 5.48 kat ($p<0.01$) daha fazla ifade edilmiştir. Bu bulgu, nanofiberlerin kemik rejenerasyonunda bildirilen olumlu etkileri rolüyle uyumludur. Nanofiber iskelelerin sertliği ve gözenekli yapısı gibi diğer özelliklerine kök hücrelerin şekillerini ve gerilimini değiştirerek yanıt verdiği ve bu durumun kemik yapımı için kritik yolakları düzenlediği çalışmalarda gösterilmiştir (143, 144). Yalnızca osteojenik besi yeri ile muamele edilen PLA-IC-Nf

grupları *DMP-1* ifadesi göstermiş, kontrol besi yeri kullanılan gruplardan sadece DPKH'lara kıyasla ise daha fazla *RUNX-2* (3.42 kat, $p<0.01$) ve *DSPP* (23.8 kat, $p<0.01$) ifadesi göstermiştir. Bu bulgular, *DSPP* ve *DMP-1*'in odontoblastik farklılaşmanın erken aşamaları ve dentin mineralizasyonunun geç aşamalarındaki rollerini dikkate aldığımızda önemlidir. PLA-IC-Nf'nin özellikle diş doku rejenerasyonunda umut verici bir aday olabileceğini göstermektedir. Nitekim *DSPP* özellikle dentin yapımında işlev görürken, *DMP-1* hem kemik hem de dentin yapımında etkilidir. Kulakovski ve arkadaşları (14), üzüm çekirdeği özütünden elde edilen PA türünün (gallik asitli ve gallik asitli olmayan) DPKH'lar üzerindeki etkilerini değerlendirmiş ve gallik asitli PA'nın, DPKH'ların çoğalmasını azaltıp farklılaşmaya teşvik ettiği ve odontoblastik genlerin ifadesini arttırdığını göstermişlerdir. Ancak, gallik asitli olmayan PA ise DPKH çoğalması veya farklılaşması üzerinde bir etki göstermemiştir. Çalışmamızda ise her ikisi açısından zengin olan üzüm çekirdeği oligomerik proantosiyandinleri kullanmıştır. Gelecekteki araştırmalarda inklüzyon komplekslerinden gallik asitli PA'ların salımına yönelik çalışılabilir.

Başarıyla geliştirilen PLA-IC-Nf, inklüzyon kompleksi içermeyen nanoliflere göre artmış hidrofilitiklik, *S. aureus* ve *E. coli*'ye karşı etkili antibakteriyel aktivite ve yüksek antioksidan aktivite göstermiştir. Başlangıçta gösterdiği sitotoksosite, hücre kültürünün daha kontrollü PA salımı nedeniyle kendini yeniden oluşturmasına olanak tanımış ve tek başına DPKH'larinkine benzer canlılık seviyelerine ulaşmıştır. PLA-IC-Nf örnekleri, *DSPP* ve ALP aktivitesini yukarı yönlü düzenleyerek odontoblastların odontojenik diferansiyasyonunu teşvik etmiştir. Bununla birlikte, elde edilen sonuçları hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak doğrulamak için ek araştırmalar gerekmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında elde edilen sonuçlara göre;

- PLA, PLA_PA-Nf ve PLA-IC-Nf matları elektroğirme yöntemiyle başarıyla sentezlenmiş, düzenli ve boncuksuz bir morfoloji göstermişlerdir.
- Nanofiberlere PA katılması nanofiberlerin çapını arttırmış, PLA-IC-Nf yapısında fiberlerin çapı PLA_PA-Nf yapısındakine kıyasla anlamlı derecede daha düşük görülmüştür.
- Nanofiberlere PA katılması tek başına PLA nanofiber matına kıyasla nanofiberlerin ıslanabilirliğini arttırmış; PLA-IC-Nf matlar PLA_PA-Nf matlara kıyasla da daha iyi hidrofilik yapı göstermiştir.
- PLA-IC-Nf matlardan PA salımı PLA_PA-Nf'lere kıyasla daha yavaş ve kontrollü gerçekleşmiştir.
- PLA_PA-Nf matlar, yapısındaki PA salımının daha hızlı olması sonuçları ile uyumlu olarak PLA-IC-Nf matlara kıyasla, *E. coli* ve *S. aureus*'a karşı daha etkili antibakteriyel aktivite gösterse de her ikisi de etkili antibakteriyel ve antioksidan aktivite göstermişlerdir.
- PLA-IC-Nf matlar DPKH'ların canlılığını birinci günde azaltmakla birlikte üçüncü ve yedinci günde kontrol grubu olan tek başına DPKH'lar ile benzer canlılık seviyeleri göstermiş, PLA_PA-Nf'ye kıyasla ise anlamlı derecede daha fazla hücre canlılığı göstermiştir.
- Kalsiyum birikimlerini boyayan Alizarin Kırmızısı Boyamasının PLA-IC-Nf gruplarında sadece DPKH'lara kıyasla daha yoğun olduğu görülmüştür.
- Kalsiyum konsantrasyonlarının QuantiChrom Kalsiyum Test Kiti ile ölçülmesi sonuçlarına göre 14.günde; osteojenik besi yeri ile muamele edilen sadece DPKH ve PLA-IC-Nf, kontrol besi yeri ile muamele edilen sadece DPKH'ya kıyasla, 18.günde ise osteojenik besi yeri ile muamele edilen PLA-IC-Nf grubu kontrol besi yeri ile muamele edilen PLA-IC-Nf grubuna kıyasla daha yüksek kalsiyum konsantrasyonlarına sahiptir.
- PLA-IC-Nf matlar üzerinde 18 gün kültür edilen DPKH'ler, oste/odontojenik farklılaşma belirteçleri açısından değerlendirildiğinde, tüm grupların *DMP-1* hariç *RUNX-2*, *OCN* ve *DSPP* ifade ettiği, *DMP*'nin ise

sadece osteojenik farklılaşma besi yeri kullanılan PLA-IC-Nf grubunda ifade edildiği görülmüştür. Osteojenik besi yeri ile muamele edilen PLA-IC-Nf; kontrol DPKH'ya kıyasla 23.8 kat, kontrol besi yerine maruz kaldığında ise 10.2 kat daha fazla DSPP ifadesi göstermiş ve odontoblastik farklılaşmayı desteklemiştir.

Öneriler;

- Farklı konsantrasyonlarda proantosiyanidin içeren nanofiber matların etkisinin değerlendirilmesi en etkili konsantrasyonun ne olduğunu belirlemede faydalı olabilir.
- İfade edilen farklılaşma belirteçlerinin farklı zamanlarda GZ-qPZR ile analiz edilmesi PLA-IC-Nf matlardan PA salımının farklılaşmanın erken veya geç dönemlerindeki etkisini daha iyi değerlendirmeye olanak sağlayabilir.
- Üretilen PLA-IC-Nf matlarının pulpa ekspozu oluşturulan hayvan modellerinde etkisinin değerlendirilmesi, hem odontojenik farklılaşma belirteçlerinin değerlendirilmesini hem de oluşan tamir dentini yapısının histolojik, kalitatif ve kantitatif olarak da değerlendirilmesine izin verebilir.

7. KAYNAKLAR

1. Yu C, Abbott PV. An overview of the dental pulp: its functions and responses to injury. *Australian dental journal*. 2007;52:S4-S16.
2. Ballikaya E, Çelebi- Saltik B. Approaches to vital pulp therapies. *Aust Endod J*. 2023;49(3):735-49.
3. Duncan HF. Present status and future directions—Vital pulp treatment and pulp preservation strategies. *Int Endod J*. 2022;55:497-511.
4. Huang GT-J, Gronthos S, Shi S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *J Dent Res*. 2009;88(9):792-806.
5. Kok ZY, Alaidaroos NY, Alraies A, Colombo JS, Davies LC, Waddington RJ, et al. Dental pulp stem cell heterogeneity: Finding superior quality “needles” in a dental pulpal “haystack” for regenerative medicine-based applications. *Stem Cells Int*. 2022;2022:1-20.
6. P De Miguel M, Fuentes-Julian S, Blazquez-Martinez A, Y Pascual C, A Aller M, Arias J, et al. Immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells: advances and applications. *Curr Mol Med*. 2012;12(5):574-91.
7. Pham QP, Sharma U, Mikos AG. Electrospinning of polymeric nanofibers for tissue engineering applications: a review. *Tissue Eng*. 2006;12(5):1197-211.
8. Vacanti CA. The history of tissue engineering. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2006.
9. Pankajakshan D, Albuquerque M, Bottino M. Electrospun nanofibers for regenerative dentistry. *Electrospun materials for tissue engineering and biomedical applications*: Elsevier; 2017. p. 357-84.
10. EzEldeen M, Moroni L, Nejad ZM, Jacobs R, Mota C. Biofabrication of engineered dento-alveolar tissue. *Biomater Adv*. 2023;148(2023):1-15.
11. Nirwan VP, Kowalczyk T, Bar J, Buzgo M, Filová E, Fahmi A. Advances in electrospun hybrid nanofibers for biomedical applications. *Nanomaterials*. 2022;12(11):1829.
12. Alipour M, Pouya B, Aghazadeh Z, SamadiKafil H, Ghorbani M, Alizadeh S, et al. The antimicrobial, antioxidative, and anti-inflammatory effects of polycaprolactone/gelatin scaffolds containing chrysin for regenerative endodontic purposes. *Stem Cells Int*. 2021;2021:1-11.
13. Kulakowski D, Leme-Kraus AA, Nam J-w, McAlpine J, Chen S-N, Pauli GF, et al. Oligomeric proanthocyanidins released from dentin induce regenerative dental pulp cell response. *Acta Biomater*. 2017;55:262-70.
14. Kulakowski D, Phansalkar RM, Leme-Kraus AA, McAlpine JB, Chen S-N, Pauli GF, et al. Galloylated proanthocyanidins in dentin matrix exhibit biocompatibility and induce differentiation in dental stem cells. *J Bioact Compat Polym*. 2022;37(3):220-30.

15. Nie Y, Stürzenbaum SR. Proanthocyanidins of natural origin: molecular mechanisms and implications for lipid disorder and aging-associated diseases. *Adv Nutr.* 2019;10(3):464-78.
16. Braga SS. Cyclodextrins as Multi-Functional Ingredients in Dentistry. *Pharmaceutics.* 2023;15(9):2251.
17. Daghery A, Aytac Z, Dubey N, Mei L, Schwendeman A, Bottino MC. Electrospinning of dexamethasone/cyclodextrin inclusion complex polymer fibers for dental pulp therapy. *Colloids Surf, B.* 2020;191(2020):1-8.
18. Avery J, Chiego D. In: Rudolph P, editor. *Essentials of Oral Histology and Embryology: A Clinical Approach.* 3rd ed. St. Louis, Mo: Mosby Elsevier; 2006. p. 177-83.
19. Galler KM, Weber M, Korkmaz Y, Widbiller M, Feuerer M. Inflammatory response mechanisms of the dentine–pulp complex and the periapical tissues. *Int J Mol Sci.* 2021;22(3):1480.
20. Ahmed GM, Abouauf EA, AbuBakr N, Dörfer CE, El-Sayed KF. Tissue engineering approaches for enamel, dentin, and pulp regeneration: an update. *Stem Cells Int.* 2020;2020.
21. Goldberg M, Kulkarni AB, Young M, Boskey A. Dentin: Structure, Composition and Mineralization: The role of dentin ECM in dentin formation and mineralization. *Front Biosci (Elite Ed).* 2011;3:711.
22. Tjäderhane L, Carrilho MR, Breschi L, Tay FR, Pashley DH. Dentin basic structure and composition—an overview. *Endodontic Topics.* 2009;20(1):3-29.
23. Orsini G, Ruggeri Jr A, Mazzoni A, Nato F, Manzoli L, Putignano A, et al. A review of the nature, role, and function of dentin non- collagenous proteins. Part 1: proteoglycans and glycoproteins. *Endodontic Topics.* 2012;21(1):1-18.
24. Mazzoni A, Breschi L, Carrilho M, Nascimento FD, Orsini G, Ruggeri Jr A, et al. A review of the nature, role, and function of dentin non- collagenous proteins. Part II: enzymes, serum proteins, and growth factors. *Endodontic Topics.* 2009;21(1):19-40.
25. Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(25):13625-30.
26. Nuti N, Corallo C, Chan B, Ferrari M, Gerami-Naini B. Multipotent differentiation of human dental pulp stem cells: a literature review. *Stem Cell Rev Rep.* 2016;12(5):511-23.
27. Huang G-J, Gronthos S, Shi S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *J Dent Res.* 2009;88(9):792-806.
28. Shi X, Mao J, Liu Y. Pulp stem cells derived from human permanent and deciduous teeth: Biological characteristics and therapeutic applications. *Stem Cells Transl Med.* 2020;9(4):445-64.

29. P De Miguel M, Fuentes-Julian S, Blazquez-Martinez A, Y Pascual C, A Aller M, Arias J, et al. Immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells: advances and applications. *Curr Mol Med*. 2012;12(5):574-91.
30. Kok ZY, Alaidaroos NY, Alraies A, Colombo JS, Davies LC, Waddington RJ, et al. Dental Pulp Stem Cell Heterogeneity: Finding Superior Quality “Needles” in a Dental Pulpal “Haystack” for Regenerative Medicine-Based Applications. *Stem Cells Int*. 2022;2022.
31. Zheng C, Chen J, Liu S, Jin Y. Stem cell-based bone and dental regeneration: a view of microenvironmental modulation. *Int J Oral Sci*. 2019;11(3):1-15.
32. Marrelli M, Codispoti B, Shelton RM, Scheven BA, Cooper PR, Tatullo M, et al. Dental pulp stem cell mechanoresponsiveness: effects of mechanical stimuli on dental pulp stem cell behavior. *Front Physiol*. 2018;9:1685.
33. Brodzikowska A, Gondek A, Rak B, Paskal W, Pełka K, Cudnoch-Jędrzejewska A, et al. Metalloproteinase 14 (MMP-14) and hsa-miR-410-3p expression in human inflamed dental pulp and odontoblasts. *Histochem Cell Biol*. 2019;152(5):345-53.
34. Mitsiadis T, Orsini G, Jimenez-Rojo L. Stem cell-based approaches in dentistry. *Eur Cell Mater*. 2015;30:248-57.
35. Farges J-C, Alliot-Licht B, Renard E, Ducret M, Gaudin A, Smith AJ, et al. Dental pulp defence and repair mechanisms in dental caries. *Mediators Inflamm*. 2015;2015.
36. Richert R, Ducret M, Alliot- Licht B, Bekhouche M, Gobert S, Farges JC. A critical analysis of research methods and experimental models to study pulpitis. *Int Endod J*. 2022.
37. Huang X, Li Z, Liu A, Liu X, Guo H, Wu M, et al. Microenvironment Influences Odontogenic Mesenchymal Stem Cells Mediated Dental Pulp Regeneration. *Front Physiol*. 2021;12:503.
38. Cooper PR, Holder MJ, Smith AJ. Inflammation and regeneration in the dentin-pulp complex: a double-edged sword. *J Endod*. 2014;40(4):S46-S51.
39. Cooper PR, Takahashi Y, Graham LW, Simon S, Imazato S, Smith AJ. Inflammation–regeneration interplay in the dentine–pulp complex. *J Dent*. 2010;38(9):687-97.
40. Adnan S, Ullah R. Top-cited articles in regenerative endodontics: a bibliometric analysis. *J Endod*. 2018;44(11):1650-64.
41. Yu C, Abbott PV. An overview of the dental pulp: its functions and responses to injury. *Aust Dent J*. 2007;52:S4-S6.
42. Galler KM, Weber M, Korkmaz Y, Widbiller M, Feuerer M. Inflammatory Response Mechanisms of the Dentine–Pulp Complex and the Periapical Tissues. *Int J Mol Sci*. 2021;22(3):1480.
43. Veerayutthwilai O, Byers M, Pham TT, Darveau R, Dale B. Differential regulation of immune responses by odontoblasts. *Oral Microbiol Immunol*. 2007;22(1):5-13.

44. Staquet M-J, Durand S, Colomb E, Romeas A, Vincent C, Bleicher F, et al. Different roles of odontoblasts and fibroblasts in immunity. *J Dent Res.* 2008;87(3):256-61.
45. Atri C, Guerfali FZ, Laouini D. Role of human macrophage polarization in inflammation during infectious diseases. *Int J Mol Sci.* 2018;19(6):1801.
46. Shapouri- Moghaddam A, Mohammadian S, Vazini H, Taghadosi M, Esmaeili SA, Mardani F, et al. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *J Cell Physiol.* 2018;233(9):6425-40.
47. Ricucci D, Siqueira Jr JF, Li Y, Tay FR. Vital pulp therapy: histopathology and histobacteriology-based guidelines to treat teeth with deep caries and pulp exposure. *J Dent.* 2019;86:41-52.
48. Schmalz G, Widbiller M, Galler KM. Clinical perspectives of pulp regeneration. *J Endod.* 2020;46(9):S161-S74.
49. Cushley S, Duncan H, Lappin M, Chua P, Elamin A, Clarke M, et al. Efficacy of direct pulp capping for management of cariously exposed pulps in permanent teeth: a systematic review and meta- analysis. *International endodontic journal.* 2021;54(4):556-71.
50. Iaculli F, Rodríguez-Lozano FJ, Briseño-Marroquín B, Wolf TG, Spagnuolo G, Rengo S. Vital pulp therapy of permanent teeth with reversible or irreversible pulpitis: an overview of the literature. *Journal of clinical medicine.* 2022;11(14):4016.
51. Moussa DG, Aparicio C. Present and future of tissue engineering scaffolds for dentin- pulp complex regeneration. *J Tissue Eng Regen Med.* 2019;13(1):58-75.
52. Torabinejad M, Chivian N. Clinical applications of mineral trioxide aggregate. *J Endod.* 1999;25(3):197-205.
53. Paranjpe A, Zhang H, Johnson JD. Effects of mineral trioxide aggregate on human dental pulp cells after pulp-capping procedures. *Journal of endodontics.* 2010;36(6):1042-7.
54. Zhao X, He W, Song Z, Tong Z, Li S, Ni L. Mineral trioxide aggregate promotes odontoblastic differentiation via mitogen-activated protein kinase pathway in human dental pulp stem cells. *Mol Biol Rep.* 2012;39(1):215-20.
55. Zhu N, Chatzistavrou X, Papagerakis P, Ge L, Qin M, Wang Y. Silver-doped bioactive glass/chitosan hydrogel with potential application in dental pulp repair. *ACS Biomater Sci Eng.* 2019;5(9):4624-33.
56. Kim D-H, Jang J-H, Lee B-N, Chang H-S, Hwang I-N, Oh W-M, et al. Anti-inflammatory and mineralization effects of proroot MTA and endocem MTA in studies of human and rat dental pulps in vitro and in vivo. *J Endod.* 2018;44(10):1534-41.
57. Bayraktar K, Basturk FB, Turkaydin D, Gunday M. Long-term effect of acidic pH on the surface microhardness of ProRoot mineral trioxide aggregate, Biodentine, and total fill root repair material putty. *Dent Res J (Isfahan).* 2021;18:1-5.

58. Deepthi V, Mallikarjun E, Nagesh B, Mandava P. Effect of acidic pH on microhardness and microstructure of theraCal LC, endosequence, mineral trioxide aggregate, and biodentine when used as root repair material. *J Conserv Dent*. 2018;21(4):408.
59. Tian J, Zhang Y, Lai Z, Li M, Huang Y, Jiang H, et al. Ion release, microstructural, and biological properties of iRoot BP Plus and ProRoot MTA exposed to an acidic environment. *J Endod*. 2017;43(1):163-8.
60. Goldberg M, Six N, Chaussain C, DenBesten P, Veis A, Poliard A. Dentin extracellular matrix molecules implanted into exposed pulps generate reparative dentin: a novel strategy in regenerative dentistry. *J Dent Res*. 2009;88(5):396-9.
61. Bjørndal L, Fransson H, Bruun G, Markvart M, Kjældgaard M, Näsman P, et al. Randomized clinical trials on deep carious lesions: 5-year follow-up. *Journal of Dental Research*. 2017;96(7):747-53.
62. Dammaschke T, Nowicka A, Lipski M, Ricucci D. Histological evaluation of hard tissue formation after direct pulp capping with a fast-setting mineral trioxide aggregate (RetroMTA) in humans. *Clin Oral Investig*. 2019;23:4289-99.
63. Duncan HF, Cooper PR. Pulp innate immune defense: translational opportunities. *Journal of Endodontics*. 2020;46(9):S10-S8.
64. Duncan H, Cooper P, Smith A. Dissecting dentine–pulp injury and wound healing responses: consequences for regenerative endodontics. 2019;52(3):261-6.
65. Diogenes A, Ruparel NB, Shiloah Y, Hargreaves KM. Regenerative endodontics: a way forward. *The Journal of the American Dental Association*. 2016;147(5):372-80.
66. Sanaei-rad P, Jamshidi D, Adel M, Seyedjafari E. Electrospun poly (l- lactide) nanofibers coated with mineral trioxide aggregate enhance odontogenic differentiation of dental pulp stem cells. *Polym Adv Technol*. 2021;32(1):402-10.
67. Banerjee K, Radhakrishnan J, Ayyadurai N, Ganesan P, Kamini NR. Advances in Neoteric Modular Tissue Engineering Strategies for Regenerative Dentistry. *Journal of Science: Advanced Materials and Devices*. 2022:100491.
68. Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, et al. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(10):5807-12.
69. Ji Y-M, Jeon SH, Park J-Y, Chung J-H, Choung Y-H, Choung P-H. Dental stem cell therapy with calcium hydroxide in dental pulp capping. *Tissue Eng Part A*. 2010;16(6):1823-33.
70. Morotomi T, Washio A, Kitamura C. Current and future options for dental pulp therapy. *Jpn Dent Sci Rev*. 2019;55(1):5-11.
71. Shang F, Yu Y, Liu S, Ming L, Zhang Y, Zhou Z, et al. Advancing application of mesenchymal stem cell-based bone tissue regeneration. *Bioact Mater*. 2021;6(3):666-83.

72. Yamada N, Okano T, Sakai H, Karikusa F, Sawasaki Y, Sakurai Y. Thermo-responsive polymeric surfaces; control of attachment and detachment of cultured cells. *Die Makromolekulare Chemie, Rapid Communications*. 1990;11(11):571-6.
73. Na S, Zhang H, Huang F, Wang W, Ding Y, Li D, et al. Regeneration of dental pulp/dentine complex with a three-dimensional and scaffold-free stem cell sheet-derived pellet. *J Tissue Eng Regen Med*. 2016;10(3):261-70.
74. Mezu-Ndubuisi OJ, Maheshwari A. The role of integrins in inflammation and angiogenesis. *Pediatr Res*. 2021;89(7):1619-26.
75. Elkhenany H, Elkodous MA, Newby SD, El-Derby AM, Dhar M, El-Badri N. Tissue engineering modalities and nanotechnology. *Regenerative medicine and stem cell biology*. 2020:289-322.
76. Wu DT, Munguia-Lopez JG, Cho YW, Ma X, Song V, Zhu Z, et al. Polymeric scaffolds for dental, oral, and craniofacial regenerative medicine. *Molecules*. 2021;26(22):7043.
77. Edgar L, McNamara K, Wong T, Tamburrini R, Katari R, Orlando G. Heterogeneity of scaffold biomaterials in tissue engineering. *Materials*. 2016;9(5):332.
78. Deng J, Gao C. An introduction to scaffolds, biomaterial surfaces, and stem cells. *Polymeric Biomaterials for Tissue Regeneration: From Surface/Interface Design to 3D Constructs*: Springer; 2023. p. 1-38.
79. Seo S-J, Kim H-W, Lee J-H. Electrospun nanofibers applications in dentistry. *J Nanomater*. 2016;2016.
80. Li D, Xia Y. Electrospinning of nanofibers: reinventing the wheel? *Advanced materials*. 2004;16(14):1151-70.
81. Kost B, Svyntkivska M, Brzeziński M, Makowski T, Piorkowska E, Rajkowska K, et al. PLA/ β -CD-based fibres loaded with quercetin as potential antibacterial dressing materials. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2020;190:110949.
82. Zafar M, Najeeb S, Khurshid Z, Vazirzadeh M, Zohaib S, Najeeb B, et al. Potential of electrospun nanofibers for biomedical and dental applications. *Materials*. 2016;9(2):73.
83. Yang F, Wang J, Li X, Jia Z, Wang Q, Yu D, et al. Electrospinning of a sandwich-structured membrane with sustained release capability and long-term anti-inflammatory effects for dental pulp regeneration. *Biodes Manuf*. 2022;5(2):305-17.
84. Yan W, Yang F, Liu Z, Wen Q, Gao Y, Niu X, et al. Anti-Inflammatory and Mineralization Effects of an ASP/PLGA-ASP/ACP/PLLA-PLGA Composite Membrane as a Dental Pulp Capping Agent. *J Funct Biomater*. 2022;13(3):106.
85. Lee L-W, Hsiao S-H, Hung W-C, Lin Y-H, Chen P-Y, Chiang C-P. Clinical outcomes for teeth treated with electrospun poly (ϵ -caprolactone) fiber meshes/mineral trioxide aggregate direct pulp capping. *J Endod*. 2015;41(5):628-36.

86. Narayanan G, Shen J, Matai I, Sachdev A, Boy R, Tonelli AE. Cyclodextrin-based nanostructures. *Progress in Materials Science*. 2022;124:100869.
87. Liu F, Majeed H, Antoniou J, Li Y, Ma Y, Yokoyama W, et al. pH and temperature stability of (–)-epigallocatechin-3-gallate- β -cyclodextrin inclusion complex-loaded chitosan nanoparticles. *Carbohydrate polymers*. 2016;149:340-7.
88. Çelen N, Bilensoy E, ÇALIŞ S. Siklodekstrinler ve Biyomedikal Alandaki Uygulamaları. *Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy*. 2016;36(1):50-69.
89. Van De Manakker F, Vermonden T, Van Nostrum CF, Hennink WE. Cyclodextrin-based polymeric materials: synthesis, properties, and pharmaceutical/biomedical applications. *Biomacromolecules*. 2009;10(12):3157-75.
90. Gref R, Duchene D. Cyclodextrins as “smart” components of polymer nanoparticles. *Journal of drug delivery science and technology*. 2012;22(3):223-33.
91. Samprasit W, Akkaramongkolporn P, Ngawhirunpat T, Rojanarata T, Kaomongkolgit R, Opanasopit P. Fast releasing oral electrospun PVP/CD nanofiber mats of taste-masked meloxicam. *International Journal of Pharmaceutics*. 2015;487(1-2):213-22.
92. Xia E-Q, Deng G-F, Guo Y-J, Li H-B. Biological activities of polyphenols from grapes. *International journal of molecular sciences*. 2010;11(2):622-46.
93. Monagas M, Bartolomé B, Gómez-Cordovés C. Updated knowledge about the presence of phenolic compounds in wine. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2005;45(2):85-118.
94. Yilmaz Y, Toledo RT. Health aspects of functional grape seed constituents. *Trends Food Sci Technol*. 2004;15(9):422-33.
95. Houde V, Grenier D, Chandad F. Protective effects of grape seed proanthocyanidins against oxidative stress induced by lipopolysaccharides of periodontopathogens. *Journal of periodontology*. 2006;77(8):1371-9.
96. Mira L, Tereza Fernandez M, Santos M, Rocha R, Helena Florêncio M, Jennings KR. Interactions of flavonoids with iron and copper ions: a mechanism for their antioxidant activity. *Free Radic Res*. 2002;36(11):1199-208.
97. La VD, Bergeron C, Gafner S, Grenier D. Grape Seed Extract Suppresses Lipopolysaccharide- Induced Matrix Metalloproteinase (MMP) Secretion by Macrophages and Inhibits Human MMP- 1 and– 9 Activities. *J Periodontol*. 2009;80(11):1875-82.
98. Vilchez A, Acevedo F, Cea M, Seeger M, Navia R. Applications of electrospun nanofibers with antioxidant properties: A review. *Nanomaterials*. 2020;10(175):2-25.
99. Kong F, Su Z, Zhang L, Qin Y, Zhang K. Inclusion complex of grape seeds extracts with sulfobutyl ether β -cyclodextrin: Preparation, characterization,

- stability and evaluation of α -glucosidase and α -amylase inhibitory effects in vitro. *Lwt.* 2019;101:819-26.
100. Abuarqoub D, Awidi A, Abuharfeil N. Comparison of osteo/odontogenic differentiation of human adult dental pulp stem cells and stem cells from apical papilla in the presence of platelet lysate. *Archives of oral biology.* 2015;60(10):1545-53.
 101. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006;8(4):315-7.
 102. Saltık BÇ, Yağcı BG. Expansion of human umbilical cord blood hematopoietic progenitors with cord vein pericytes. *Turkish Journal of Biology.* 2017;41(1):49-57.
 103. Kawashima N. Characterisation of dental pulp stem cells: a new horizon for tissue regeneration? *Arch Oral Biol.* 2012;57(11):1439-58.
 104. Herrera A, Rodríguez FJ, Bruna JE, Abarca RL, Galotto MJ, Guarda A, et al. Antifungal and physicochemical properties of inclusion complexes based on β -cyclodextrin and essential oil derivatives. *Food Res Int.* 2019;121:127-35.
 105. Li D, Frey MW, Baeumner AJ. Electrospun polylactic acid nanofiber membranes as substrates for biosensor assemblies. *J Membr Sci.* 2006;279(1-2):354-63.
 106. Çay A, Miraftab M, Kumbasar EPA. Characterization and swelling performance of physically stabilized electrospun poly (vinyl alcohol)/chitosan nanofibres. *Eur Polym J.* 2014;61:253-62.
 107. Sabbagh J, Ghassibe-Sabbagh M, Fayyad-Kazan M, Al-Nemer F, Fahed JC, Berberi A, et al. Differences in osteogenic and odontogenic differentiation potential of DPSCs and SHED. *Journal of Dentistry.* 2020;101(103413):1-9.
 108. Lin Y, Zhi H, Liu S, Chen B, Fu Y, Liu Z. Green synthesis, characterization and application on the proanthocyanidins-functionalized Fe₃O₄@ Ag nanoparticles. *Chem Pap.* 2023;77(4):2115-24.
 109. Chieng BW, Ibrahim NA, Wan Yunus WMZ, Hussein MZ. Poly (lactic acid)/poly (ethylene glycol) polymer nanocomposites: Effects of graphene nanoplatelets. *Polymers.* 2013;6(1):93-104.
 110. Buzoglu HD, Burus A, Bayazit Y, Goldberg M. Stem Cell and Oxidative Stress-Inflammation Cycle. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2023;18(5):641-52.
 111. Bar JK, Kowalczyk T, Grelewski PG, Stammitz S, Paprocka M, Lis J, et al. Characterization of biological properties of dental pulp stem cells grown on an electrospun poly (l-lactide-co-caprolactone) scaffold. *Materials.* 2022;15(5):1900.
 112. Wang X, Li G, Liu Y, Yu W, Sun Q. Biocompatibility of biological material polylactic acid with stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Biomed Rep.* 2017;6(5):519-24.

113. Lasprilla AJ, Martinez GA, Lunelli BH, Jardini AL, Maciel Filho R. Poly-lactic acid synthesis for application in biomedical devices—A review. *Biotechnology advances*. 2012;30(1):321-8.
114. Maleki H, Azimi B, Ismaeilimoghadam S, Danti S. Poly (lactic acid)-based electrospun fibrous structures for biomedical applications. *Applied Sciences*. 2022;12(6):3192.
115. Liu S, Qin S, He M, Zhou D, Qin Q, Wang H. Current applications of poly (lactic acid) composites in tissue engineering and drug delivery. *Compos B Eng*. 2020;199:108238.
116. Banitaba SN, Gharehaghaji AA, Jeddi AAA. Fabrication and characterization of hollow electrospun PLA structure through a modified electrospinning method applicable as vascular graft. *Bulletin of Materials Science*. 2021;44:1-7.
117. Karakurt I, Ozaltin K, Vesela D, Lehocky M, Humpolíček P, Mozetič M. Antibacterial activity and cytotoxicity of immobilized glucosamine/chondroitin sulfate on polylactic acid films. *Polymers*. 2019;11(7):1186.
118. Wang H, Hao L, Niu B, Jiang S, Cheng J, Jiang S. Kinetics and antioxidant capacity of proanthocyanidins encapsulated in zein electrospun fibers by cyclic voltammetry. *J Agric Food Chem*. 2016;64(15):3083-90.
119. Faki R, Gursoy O, Yilmaz Y. Effect of electrospinning process on total antioxidant activity of electrospun nanofibers containing grape seed extract. *Open Chemistry*. 2019;17(1):912-8.
120. Locilento DA, Mercante LA, Andre RS, Mattoso LH, Luna GL, Brassolatti P, et al. Biocompatible and biodegradable electrospun nanofibrous membranes loaded with grape seed extract for wound dressing application. *Journal of Nanomaterials*. 2019;2019:1-11.
121. Riccitiello F, De Luise A, Conte R, D'Aniello S, Vittoria V, Di Salle A, et al. Effect of resveratrol release kinetic from electrospun nanofibers on osteoblast and osteoclast differentiation. *European Polymer Journal*. 2018;99:289-97.
122. Liu Y, Liang X, Zhang R, Lan W, Qin W. Fabrication of electrospun polylactic acid/cinnamaldehyde/ β -cyclodextrin fibers as an antimicrobial wound dressing. *Polymers*. 2017;9(10):464.
123. Samberg ME, Mente P, He T, King MW, Monteiro-Riviere NA. In vitro biocompatibility and antibacterial efficacy of a degradable poly (L-lactide-co-epsilon-caprolactone) copolymer incorporated with silver nanoparticles. *Ann Biomed Eng*. 2014;42:1482-93.
124. Terranova L, Louvrier A, Hébraud A, Meyer C, Rolin G, Schlatter G, et al. Highly structured 3D electrospun conical scaffold: a tool for dental pulp regeneration. *ACS Biomater Sci Eng*. 2021;7(12):5775-87.
125. Bian T, Pang N, Xing H. Preparation and antibacterial evaluation of a beta-tricalcium phosphate/collagen nanofiber biomimetic composite scaffold. *Mater Chem Phys*. 2021;273:125059.

126. Al Madhoun A, Sindhu S, Haddad D, Atari M, Ahmad R, Al-Mulla F. Dental pulp stem cells derived from adult human third molar tooth: a brief review. *Front Cell Dev Biol.* 2021;9:1-20.
127. Bertolo A, Baur M, Guerrero J, Pötzel T, Stoyanov J. Autofluorescence is a reliable in vitro marker of cellular senescence in human mesenchymal stromal cells. *Scientific reports.* 2019;9(1):2074.
128. Liu J, Ding Y, Liu Z, Liang X. Senescence in mesenchymal stem cells: functional alterations, molecular mechanisms, and rejuvenation strategies. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8:1-17.
129. Yang X, Yang F, Walboomers XF, Bian Z, Fan M, Jansen JA. The performance of dental pulp stem cells on nanofibrous PCL/gelatin/nHA scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials.* 2010;93(1):247-57.
130. Soares DG, Zhang Z, Mohamed F, Eyster TW, de Souza Costa CA, Ma PX. Simvastatin and nanofibrous poly (l-lactic acid) scaffolds to promote the odontogenic potential of dental pulp cells in an inflammatory environment. *Acta Biomater.* 2018;68:190-203.
131. Asghari F, Salehi R, Agazadeh M, Alizadeh E, Adibkia K, Samiei M, et al. The odontogenic differentiation of human dental pulp stem cells on hydroxyapatite-coated biodegradable nanofibrous scaffolds. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials.* 2016;65(14):720-8.
132. Cardoso LM, Pansani TN, de Souza Costa CA, Basso FG. Regulation of interleukin-6 and matrix metalloproteinases syntheses by bioflavonoids and photobiomodulation in human gingival fibroblasts. *Lasers Med Sci.* 2022;37(7):2973-87.
133. Wu J, Hong Y. Enhancing cell infiltration of electrospun fibrous scaffolds in tissue regeneration. *Bioact Mater.* 2016;1(1):56-64.
134. Liang B, Feng T, Yuan X, Zhao K, Li C, Han Y. Proportion-dependent osteogenic activity of electrospun nano-hydroxyapatite/polylactic acid fiber membrane in vitro and in vivo. *Mater Des.* 2022;219:110834.
135. Yu D, Wang J, Qian K-j, Yu J, Zhu H-y. Effects of nanofibers on mesenchymal stem cells: environmental factors affecting cell adhesion and osteogenic differentiation and their mechanisms. *J Zhejiang Univ Sci B.* 2020;21(11):871.
136. Orimo H. The mechanism of mineralization and the role of alkaline phosphatase in health and disease. *J Nippon Med Sch.* 2010;77(1):4-12.
137. Arora S, Cooper PR, Ratnayake JTB, Friedlander L, Rizwan SB, Seo B, et al. A critical review of in vitro research methodologies used to study mineralization in human dental pulp cell cultures. *Int Endod J.* 2022;55:3-13.
138. Torre E, Iviglia G, Cassinelli C, Morra M, Russo N. Polyphenols from grape pomace induce osteogenic differentiation in mesenchymal stem cells. *Int J Mol Med.* 2020;45(6):1721-34.

139. Zakłós-Szyda M, Nowak A, Pietrzyk N, Podsędek A. Viburnum opulus L. juice phenolic compounds influence osteogenic differentiation in human osteosarcoma Saos-2 cells. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(14):4909.
140. Coelho MC, Vetucci VR, Fernandes RR, Sanchez PKV, Siessere S, Bombonato-Prado KF. Low concentrations of grape seed extract maintain osteoblast morphology, cell adhesion, and mineralization. *Braz Dent J*. 2023;34:97-104.
141. Nakamura A, Dohi Y, Akahane M, Ohgushi H, Nakajima H, Funaoka H, et al. Osteocalcin secretion as an early marker of in vitro osteogenic differentiation of rat mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Part C Methods*. 2009;15(2):169-80.
142. Lin K, Xia L, Gan J, Zhang Z, Chen H, Jiang X, et al. Tailoring the nanostructured surfaces of hydroxyapatite bioceramics to promote protein adsorption, osteoblast growth, and osteogenic differentiation. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2013;5(16):8008-17.
143. Chen J-P, Chang Y-S. Preparation and characterization of composite nanofibers of polycaprolactone and nanohydroxyapatite for osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2011;86(1):169-75.
144. Seyedjafari E, Soleimani M, Ghaemi N, Shabani I. Nanohydroxyapatite-coated electrospun poly (l-lactide) nanofibers enhance osteogenic differentiation of stem cells and induce ectopic bone formation. *Biomacromolecules*. 2010;11(11):3118-25.

8. EKLER

EK 1. Etik Kurul Onayı (Ön Çalışma)



T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

Sayı : 16969557

1735

Konu :

ARAŞTIRMA PROJESİ DEĞERLENDİRME RAPORU

Toplantı Tarihi : 19 NİSAN 2022 SALI
Toplantı No : 2022/07
Proje No : GO 22/431 (Değerlendirme Tarihi: 19.04.2022)
Karar No : 2022/07-49

Üniversitemiz Diş Hekimliği Fakültesi Pedodonti Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Dr. Öğr. Üyesi Elif BALLIKAYA'nın sorumlu araştırmacı olduğu, Doç. Dr. Betül Çelebi SALTİK, Doç. Dr. Nalan Oya San KESKİN ile birlikte çalışacakları, GO 22/431 kayıt numaralı "*Nisin ve Proantosiyanidin'in Diş Pulpası Kök Hücreleri Üzerindeki Etkisinin Değerlendirilmesi*" başlıklı proje önerisi araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş olup, 20 Nisan 2022 - 20 Nisan 2023 tarihleri arasında geçerli olmak üzere etik açıdan **uygun bulunmuştur**. Çalışma tamamlandığında sonuçlarını içeren bir rapor örneğinin Etik Kurulumuza gönderilmesi gerekmektedir.

1. Prof. Dr. G. Burça AYDIN	(Başkan)	8. Doç. Dr. Hande Güney DENİZ	(Üye)
2. Prof. Dr. M. Özgür UYANIK	(Üye)	9. Doç. Dr. Tolga YILDIRIM	(Üye)
		İZİNLİ	
3. Prof. Dr. Ayşe Kin İŞLER	(Üye)	10. Doç. Dr. Merve BATUK	(Üye)
4. Prof. Dr. Sibel PEHLIVAN	(Üye)	11. Doç. Dr. Gülten KOÇ	(Üye)
5. Doç. Dr. H. Tuna Çak ESEN	(Üye)	12. Dr. Öğr. Üyesi Müge DEMİR	(Üye)
6. Doç. Dr. Nüket Paksoy ERBAYDAR	(Üye)	13. Av. Buket ÇINAR	(Üye)
KATILMADI			
7. Doç. Dr. Betül Çelebi SALTİK	(Üye)		

EK 2. Etik Kurul Onayı (Tez)



T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

Sayı : 16969557-1192

Konu : **ARAŞTIRMA PROJESİ DEĞERLENDİRME RAPORU**

Toplantı Tarihi : 21 HAZİRAN 2022 SALI
Toplantı No : 2022/11
Proje No : GO 21/1318 (Onay Tarihi: 07.12.2021)
Karar No : 2022/11-02

Kurulumuzun 07.12.2021 tarihli toplantısında GO 21/1318 kayıt numarası ile onaylanmış olan, Üniversitemiz Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi öğretim üyelerinden Doç. Dr. Betül Çelebi SALTİK'in sorumlu araştırmacı olduğu, Doç. Dr. Nalan Oya San KESKİN ile birlikte çalışacakları ve Dr. Öğr. Üyesi. Elif BALLIKAYA'nın doktora tezi olan, GO 21/1318 kayıt Numaralı **"Proantosiyanidin Taşıyan Poliroksan/Polilaktik Asit Nanofiberlerin Üretimi ve LPS ile İndüklenmiş ve İndüklenmemiş Diş Pulpası Kök Hücrelerinin Odontoblastik Farklılaşma Potansiyeli Üzerine Etkisinin İncelenmesi"** başlıklı projeniz için vermiş olduğunuz 02.06.2022 tarihli protokol revizyonu ve başlık değişikliği dilekçesi talebi Kurulumuzun 21.06.2022 tarihli toplantısında görüşülmüş ve **uygun bulunmuştur**. Çalışmanın başlığı **"Proantosiyanidin Taşıyan Nanofiberlerin Üretimi ve Diş Pulpası Kök Hücrelerinin Odontoblastik Farklılaşma Potansiyeli Üzerine Etkisinin İncelenmesi"** olarak değiştirilmiş ve kayıtlarımıza eklenmiştir. Çalışma tamamlandığında sonuçlarını içeren bir rapor örneğinin Etik Kurulumuza gönderilmesi gerekmektedir.

İZİNLİ		KATILMADI	
1. Prof. Dr. G. Burça AYDIN	(Başkan)	8. Doç. Dr. Betül Çelebi SALTİK	(Üye)
2. Prof. Dr. M. Özgür UYANIK	(Başkan V.)	9. Doç. Dr. Hande Güney DENİZ	Üye
3. Prof. Dr. Ayşe Kin İŞLER	(Üye)	10. Doç. Dr. Merve BATUK	(Üye)
4. Prof. Dr. Sibel PEHLİVAN	(Üye)	11. Doç. Dr. Gülten KOÇ	(Üye)
5. Prof. Dr. Nüket Paksoy ERBAYDAR	(Üye)	12. Dr. Öğr. Üyesi Müge DEMİR	(Üye)
6. Prof. Dr. Tolga YILDIRIM	(Üye)	13. Av. Buket ÇINAR	(Üye)
İZİNLİ			
7. Doç. Dr. H. Tuna Çak ESEN	(Üye)		

EK 3. Dijital Makbuz

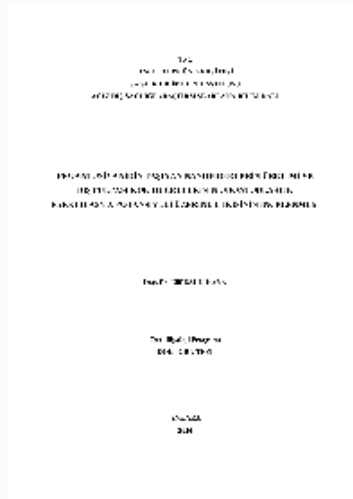


Dijital Makbuz

Bu makbuz ödevinizin Turnitin'e ulaştığını bildirmektedir. Gönderiminize dair bilgiler şöyledir:

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen: Elif Ballıkaya
Ödev başlığı: Proantosiyanidin Taşıyan Nanofiberlerin Üretimi ve Diş Pulp...
Gönderi Başlığı: Proantosiyanidin Taşıyan Nanofiberlerin Üretimi ve Diş Pulp...
Dosya adı: TEZ.docx
Dosya boyutu: 16.07M
Sayfa sayısı: 63
Kelime sayısı: 12,550
Karakter sayısı: 90,474
Gönderim Tarihi: 10-Haz-2024 06:23ÖS (UTC+0300)
Gönderim Numarası: 2399674025



EK 4. Orjinallik Raporu

Proantosiyanidin Taşıyan Nanofiberlerin Üretimi ve Diş Pulpası Kök Hücrelerinin Odontoblastik Farklılaşma Potansiyeli Üzerine Etkisinin İncelenmesi

ORJİNALLİK RAPORU

%9	%7	%5	%2
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	Elif Ballıkaya, Sena Babadag, Imre Tüzün, Nalan Oya San Keskin, Betül Çelebi-Saltık. "Proanthocyanidin/β-Cyclodextrin Inclusion Complex in Electrospun Polylactic Acid Nanofibers: Preparation, Characterization, and Effects on Dental Pulp Stem Cells", ACS Applied Polymer Materials, 2024 Yayın	%2
2	openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	%1
3	Submitted to Hacettepe University Öğrenci Ödevi	%1
4	openaccess.hacettepe.edu.tr İnternet Kaynağı	%1
5	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	%1
6	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	%1

9. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Ad Soyad: ELİF BALLIKAYA