



T.C.

ALTINBAŞ ÜNİVERSİTESİ

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Çocuk Diş Hekimliği Ana Bilim Dalı / Doktora Programı

**TASARIM ALAN YOLU İLE OLUŞTURULAN
İLOPROST-TERMOSENSİTİF JELİN İNSAN
DENTAL PULPA KÖK HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ
ETKİLERİNİN İN-VİTRO İNCELENMESİ**

Feyza IŞIK KABLAN

Doktora Tezi

Danışman

Prof. Dr. Figen SEYMEN

Eş Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Arkan Yashar Ezzulddin BARBAR

İstanbul, 2025

**TASARIM ALAN YOLU İLE OLUŞTURULAN İLOPROST-
TERMOSENSİTİF JELİN İNSAN DENTAL PULPA KÖK
HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN İN-VİTRO
İNCELENMESİ**

Feyza İŐIK KABLAN

Çocuk Diş Hekimliğı Ana Bilim Dalı

Doktora Tezi

ALTINBAŞ ÜNİVERSİTESİ

2025

“Feyza IŞIK KABLAN” tarafından hazırlanmış ve 30.05.2025 tarihinde sunulmuş “TASARIM ALAN YOLU İLE OLUŞTURULAN İLOPROST-TERMOSENSİTİF JELİN İNSAN DENTAL PULPA KÖK HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN İN-VİTRO İNCELENMESİ” başlıklı tez Çocuk Diş Hekimliği Ana Bilim Dalında Doktora Tezi olarak **oy birliği** ile kabul edilmiştir.

Dr. Öğr. Üyesi Arkan YASHAR

Ezzulddin BARBAR

Eş Danışman

Prof. Dr. Figen SEYMEN

Danışman

Tez Savunma Sınavı Jüri Üyeleri:

Prof. Dr. Hayriye SÖNMEZ

Klinik Bilimler Bölümü,

Altınbaş Üniversitesi

Prof. Dr. Tunç AKKOÇ

Temel Bilimler Bölümü,

Marmara Üniversitesi

Doç. Dr. Mine KORUYUCU

Klinik Bilimler Bölümü,

İstanbul Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Sabiha CEREN İLİSULU Klinik Bilimler Bölümü,

Altınbaş Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Hazal ÖZCAN

Klinik Bilimler Bölümü,

Altınbaş Üniversitesi

Bu tezin Doktora tezi olarak bütün şartları sağladığımı beyan ederim.

Bu tezdeki tüm bilgilerin akademik kurallara ve etik davranışlara uygun olarak edinildiğini ve sunulduğunu beyan ederim. Ayrıca, bu kuralların ve davranışların gerektirdiği şekilde, bu çalışmada, orijinal olmayan tüm materyalleri ve sonuçları tamamen alıntı yaptığımı ve referans gösterdiğimi de beyan ederim.

Feyza IŞIK KABLAN

İmzası



İTHAF

Eğitim hayatım boyunca beni daima özveriyle destekleyen canım aileme ithaf ediyorum.



TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim ve tez sürecim boyunca bilgi, deneyim ve desteğiyle bana yol gösteren, değerli katkılarıyla çalışmama yön veren ve her aşamada beni sabırla destekleyen değerli tez danışman hocam ve Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Figen Seymen'e;

Doktora tezimin planlanmasında ve gerçekleştirilmesinde emeği geçen, tez çalışmamın Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi İmmünoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda yapılmasına imkan tanıyan Sayın Prof. Dr. Tunç Akkoç'a, deneysel çalışmalar sürecinde sabır ve fedakarlıkla bana yardımcı olan sevgili Zeynep Tunca'ya

Tez çalışmam boyunca akademik bilgi ve tecrübeleriyle bana katkı sağlayan, laboratuvar imkanlarını ve zamanını bana ayıran eş danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Arkan YASHAR'a;

Doktora eğitimim süresince eğitimime katkılarından dolayı Anabilim Dalımızın kıymetli üyeleri *Prof. Dr. Hayriye Sönmez'e, Dr. Öğr. Üyesi Sabiha Ceren İlisulu'ya ve Dr. Öğr. Üyesi Hazal Özcan'a;*

Davetimizi kırmayıp gelerek bizleri onurlandıran değerli jüri üyelerimiz *Prof. Dr. Tunç Akkoç ve Doç. Dr. Mine Koriyucu'ya;*

Doktora eğitimim boyunca her zaman desteklerini ve sevgilerini hissettiğim asistan arkadaşlarım Dt. Özlem Karabıyık, Dt. Sıla Bolay ve Dt. Merve Mandal'a ve beraber çalıştığım Altınbaş Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Çocuk Dişhekimliği Anabilim Dalı'ndaki sevgili asistan arkadaşlarıma;

Bu uzun ve zorlu akademik yolculuk boyunca her daim yanımda olan, koşulsuz sevgileri, sabırları ve destekleriyle bana güç veren sevgili aileme

Sonsuz sevgi ve teşekkürlerimle.

ÖNSÖZ

Bu tez, Altınbaş Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Dairesi Başkanlığı tarafından TEZ-P2023-7 numaralı proje ile desteklenmiştir.



ÖZET

TASARIM ALAN YOLU İLE OLUŞTURULAN İLOPROST- TERMOSENSİTİF JELİN İNSAN DENTAL PULPA KÖK HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN İN-VİTRO İNCELENMESİ

IŞIK KABLAN, Feyza

Doktora, Çocuk Diş Hekimliği Ana Bilim Dalı, Altınbaş Üniversitesi

Danışman: Prof. Dr. Figen SEYMEN

Eş Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Arkan YASHAR

Tarih: 05/2025

Sayfa: 209

AMAÇ: Prostatiklin analogu olan İloprost anjiyogenez sürecini indükleyebildiği ve hücrel proliferasyonu teşvik edebildiği için dental pulpa rejenerasyonunda terapötik bir ajan olarak kullanılma potansiyeline sahip olduğu düşünülmektedir. İloprost'un sıvı formda olması ve kısa yarı ömrü, pulpa odası ve kök kanallarına klinik uygulanmasını güçleştirmekte, bu bölgelerde kontrollü salım sağlamayı zorlaştırmaktadır. Bu çalışmanın amacı, İloprost'un kontrollü salımını sağlayabilmek amacıyla ilaç taşıyıcı sistem olarak kullanılabilecek sıcaklığa duyarlı enjekte edilebilir bir hidrojel tasarlanmasıdır. Ayrıca geliştirilen bu hidrojel sisteminin ve İloprost'un sitotoksik etkileri ile anjiyogenezle ilişkili VEGF gen ekspresyonu üzerindeki etkilerinin in vitro olarak değerlendirmesi hedeflenmektedir.

GERÇE VE YÖNTEM: Bu çalışmada, sıcaklığa duyarlı enjekte edilebilir bir hidrojel sisteminin geliştirilmesinde Tasarımla Kalite (QbD) yaklaşımı kullanılmış ve Modde® yazılımı aracılığıyla Deney Tasarımı (DOE) oluşturulmuştur. %18 Poloksamer 407 ve %5 Poloksamer 188 soğuk yöntemle birleştirilerek sıcaklığa duyarlı enjekte edilebilir bir hidrojel hazırlanıp İloprost'un seyreltilmesinde kullanılarak farklı konsantrasyonlara sahip İloprost grupları (10^{-6} M ve 2×10^{-6} M) hazırlanmıştır. Bu formülasyonlar karakterize edilmiş

ve DPSC'lere uygulanmış; sitotoksik etkileri MTT analizi ile, anjiyogenezele ilişkili VEGF gen ekspresyonu üzerindeki etkileri ise RT-PCR yöntemi ile değerlendirilmiştir.

BULGULAR: Formülasyonun karakterize edildiği adezyon, kohezyon, jelleşme sıcaklığı ve vizkozite gibi çalışmalardan elde edilen veriler DPSC'lere uygulanabilirlik açısından uygun bulunmuştur. MTT analizi sonucunda Poloksamer içeren gruplarda sitotoksik etki gözlemlenirken, İloprost'un her iki farklı dozunda 24. saatte sitotoksikite gözlemlenmemiştir. RT-PCR analizinde ise 10^{-6} M İloprost grubunda VEGF mRNA ekspresyonu kontrol grubuna kıyasla 24. ve 72. saatte anlamlı düzeyde artış göstermiştir.

SONUÇ: Çalışmamızın sınırları içerisinde geliştirdiğimiz hidrojel in %100 dilüsyonunun DPSC üzerinde sitotoksik etkiye sahip olduğu, ileride yapılacak çalışmalarda hidrojel in seyreltilerek uygulanması ve bu şekilde biyolojik özelliklerinin değerlendirilmesi önerilmektedir. Öte yandan İloprost gruplarının dental pulpa kök hücreleri üzerinde sitotoksikite göstermemesi ve VEGF gen ekspresyonunda artış elde edilebildiği için İloprost'un dentin-pulpa kompleksi rejenerasyonu açısından potansiyel bir terapötik ajan olabileceğini ortaya koymaktadır.

Anahtar Kelimeler: Poloksamer 407, Poloksamer 188, İloprost, MTT, RT-PCR, Tasarımla Kalite.

ABSTRACT

IN VITRO STUDY OF THE EFFECTS OF İLOPROST-THERMOSENSİTİVE GEL ON HUMAN DENTAL PULP STEM CELLS

ISIK KABLAN, Feyza

PhD, Department of Pediatric Dentistry, Altınbaş University,

Supervisor: Prof. Dr. Figen SEYMEN

Co-Supervisor: Asst. Prof. Dr. Üyesi Arkan YASHAR

Date: 05/2025

Pages: 209

AIM: Iloprost, a prostacyclin (PGI₂) analogue, promotes angiogenesis and cellular proliferation, suggesting its potential as a regenerative agent in dental pulp therapy. However, its liquid form and short half-life pose challenges for clinical application and sustained delivery. This study aimed to design a thermosensitive, injectable hydrogel to enable controlled Iloprost release and to evaluate the cytotoxicity and VEGF gene expression effects of both the hydrogel and Iloprost on dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro.

MATERIALS AND METHODS: QbD approach was employed for hydrogel formulation, utilizing Modde® software to establish a Design of Experiments (DoE). A hydrogel was prepared using 18% Poloxamer 407 and 5% Poloxamer 188 by cold method. Iloprost was incorporated at two concentrations (10^{-6} M and 2×10^{-6} M). The formulations were characterized for adhesion, cohesion, gelation temperature, and viscosity. DPSCs were exposed to the formulations, and cytotoxicity was assessed using the MTT assay, while VEGF mRNA expression was analyzed by RT-qPCR.

RESULTS: Characterization results indicated that the hydrogel formulations were suitable for DPSC application. Poloxamer-only groups showed cytotoxicity in the MTT assay, whereas Iloprost groups did not exhibit cytotoxic effects at 24 hours. RT-qPCR analysis

revealed a significant increase in VEGF expression at 24 and 72 hours in the 10^{-6} M Iloprost group compared to the control.

CONCLUSION: The undiluted hydrogel formulation showed cytotoxicity, indicating the need for further studies with diluted forms. However, the absence of cytotoxicity and the upregulation of VEGF expression in Iloprost-treated groups support its potential as a therapeutic agent for dentin-pulp regeneration.

Keywords: Poloxamer 407, Poloxamer 188, Iloprost, MTT, RT-PCR, Quality by Design.



İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	viii
ABSTRACT	x
TABLO LİSTESİ.....	xix
ŞEKİL LİSTESİ	xxi
KISALTMALAR.....	xxiv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1 DENTİN PULPA KOMPLEKSİ.....	4
2.1.1 Pulpanın Tabakaları.....	5
2.1.1.1 Odontoblast tabakası	5
2.1.1.2 Hücreden Fakir Tabaka:	5
2.1.1.3 Hücreden zengin tabaka:	5
2.1.1.4 Santral tabaka	6
2.1.2 Pulpanın Hücreleri.....	6
2.1.2.1 Odontoblastlar	6
2.1.2.2 Fibroblastlar	7
2.1.2.3 İmmünolojik savunma hücreleri	8
2.2 KÖK HÜCRELER.....	8
2.2.1 Kök Hücrelerin Sınıflandırılması	9
2.2.1.1 Farklılaşma ve bölünme özelliklerine göre kök hücreler.....	9
2.2.1.2 Kökenlerine göre kök hücre tipleri	10
2.2.2 Dental Dokulardan Elde Edilen Mezenkimal Kökenli Kök Hücreler.....	11
2.2.2.1 Dental folikül kök hücreleri	11
2.2.2.2 Apikal papilla kök hücreleri.....	11
2.2.2.3 Periodontal ligament kök hücreleri	12
2.2.2.4 Eksfoliye olmuş süt dişlerinden elde edilen kök hücreler.....	12
2.2.2.5 Dental pulpa kök hücreler	12

2.3	VİTAL PULPA TEDAVİLERİ	13
2.3.1	Vital Pulpa Tedavilerinde Rejenerasyon ve Onarım	14
2.3.1.1	Dentin rejenerasyonu ve onarımı	14
2.3.1.2	Pulpa rejenerasyonu ve onarımı	16
2.4	VİTAL PULPA TEDAVİLERİNDE KULLANILAN MATERYALLER	18
2.4.1	Kalsiyum Hidroksit	18
2.4.2	Mineral Trioksit Agregat	19
2.4.3	Biodentine	19
2.4.4	BioAggregate	20
2.4.5	TheraCal LC	20
2.4.6	Super MTA Patı	21
2.4.7	Çinko Oksit Öjenol (ZOE)	21
2.4.8	Cam İyonomer Siman ve Reçine Modifiye Cam İyonomer Siman	21
2.4.9	Propolis	21
2.4.10	Hücre Dışı Matriks	22
2.4.10.1	Kolajen	22
2.4.10.2	Hyalüronik asit	22
2.4.11	Bitkisel Materyaller	22
2.4.11.1	Kurkumin	22
2.4.11.2	Aloe vera	23
2.4.12	İloprost	23
2.5	PROSTANOİDLER	23
2.5.1	Prostanoid Biyosentezi	24
2.5.2	Prostasiklin (Prostaglandin I ₂ , PGI ₂), ...	24
2.5.3	Prostosiklin analogu İloprost	25
2.5.3.1	İloprost'un klinik kullanımı	27
2.5.3.2	İloprost'un dental pulpa kök hücreleri üzerindeki etkisi	27
2.6	HİDROJELLER	28

2.6.1 Doğal ve Sentetik Hidrojellerin Karşılaştırılması	29
2.6.1.1 Doğal hidrojeller	29
2.6.1.2 Sentetik hidrojeller	29
2.6.2 Oral ve Maksillofasial Bölgede Kullanılan Hidrojeller	30
2.6.3 Dental Pulpa Hastalıklarında Hidrojellerin Kullanılması	31
2.6.3.1 Pulpa kuafajı.....	31
2.7 SICAKLIĞA DUYARLI HİDROJELLER	32
2.7.1 Sıcaklığa Duyarlı Hidrojellerin Fizikokimyasal Özellikleri	32
2.7.1.1 Mekanik özellikleri	32
2.7.1.2 Adezyon	32
2.7.1.3 Faz geçişi.....	33
2.7.1.4 İlaç salım özelliği	34
2.7.1.5 Biyobozunma ve adezyon	36
2.7.2 Sıcaklığa Duyarlı Hidrojellerin İlaç Taşımada Kullanımı	37
2.7.3 Sıcaklığa Duyarlı Hidrojellerin Sınıflandırılması	37
2.8 POLOKSAMERLER.....	40
2.8.1 POLOKSAMER 407.....	42
2.9 BİYUYUMLULUK VE SİTOTOKSİSİTE	43
2.9.1 Dental Materyallerin Biyoyumluluk Değerlendirme Yöntemleri	43
2.9.2 İn Vitro Sitotoksiste Testleri	44
2.9.2.1 Hücre kültürü testleri.....	46
2.9.2.2 Agar diffüzyon testi.....	48
2.9.2.3 Filtre difüzyon testi	48
2.9.2.4 Dentin bariyer testi.....	49
2.9.3 Sitotoksiste Değerlendirme Yöntemleri	49
2.9.3.1 Canlılık değerlendirme (kısa dönem toksisite) testleri.....	49
2.9.3.2 Yaşam değerlendirme (uzun dönem toksisite) testleri	50
2.9.3.3 Proliferasyon değerlendirme testleri	50

2.9.3.4	Metabolik sitotoksosite değerlendirme testleri	50
2.9.4	MTT Yöntemi.....	51
2.10	İLAÇ FORMÜLASYON GELİŞTİRMEDE KALİTE KAVRAMI.....	52
2.10.1	Kalite ve Kalite Kontrolü.....	52
2.10.2	QbD Kavramı ve Faydaları.....	53
2.10.2.1	QBD aşamaları.....	54
3.	GEREÇ VE YÖNTEM	56
3.1	FORMÜLASYONUN HAZIRLANMASINDA KULLANILAN KİMYASAL MADDELER, ARAÇLAR VE GEREÇLER	57
3.2	FORMÜLASYONUN HAZIRLANMASI.....	58
3.2.1	İloprost'un Fizikokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi.....	58
3.2.1.1	İloprost'un fiziksel görünümü ve pH değerinin ölçülmesi	58
3.2.1.2	İloprost'un çözünürlüğünün değerlendirilmesi	58
3.2.1.3	İloprost'un FT-IR spektrumunun belirlenmesi	59
3.2.1.4	İloprost'un UV spektrumunun belirlenmesi ve λ_{max} ölçülmesi	59
3.2.2	İloprost İçin Spektrofotometrik Yöntemin Validasyonu.....	60
3.2.2.1	Doğrusallık.....	60
3.2.3	ÖN FORMÜLASYON ÇALIŞMALARI	60
3.3	FORMÜLASYON GELİŞTİRMEDE QBD YAKLAŞIM KULLANILMASI	61
3.3.1	Hedef ürün kalite profili	61
3.3.1.1	Kritik kalite özellikleri (CQA).....	62
3.3.1.2	Risk değerlendirme çalışmaları.....	63
3.3.1.3	Deney tasarımı (DoE) çalışmaları.....	65
3.3.2	Deney Tasarım Matrisindeki Formülasyonların Hazırlanması	67
3.3.3	Optimizasyon Öncesi Karakterizasyon Çalışmaları ve Tasarım Alanı	68
3.3.3.1	Viskozite tayini	69
3.3.3.2	Sol-Jel geçiş sıcaklığı tayini.....	69
3.3.4	Tasarım Alanının Oluşturulması ve Formülasyonun Optimizasyonu	70
3.3.4.1	Optimum formülasyonun hazırlanması.....	70

3.3.5 Optimum Formülasyonun Karakterize Edilmesi.....	71
3.3.5.1 Görsel inceleme ve pH değerlendirilmesi	71
3.3.5.2 Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ve yüzey morfolojisi	71
3.3.5.3 Viskozite	72
3.3.5.4 Yayılabilirlik	72
3.3.5.5 Tutarlılık, ekstüre edilebilirlik ve kohezivlik.....	73
3.3.5.6 Reolojik özelliklerin belirlenmesi	74
3.3.5.7 İlaç içeriği tayini	75
3.3.5.8 İn vitro ilaç salım çalışmaları.....	75
3.3.5.9 Stabilité çalışmaları.....	76
3.4 HÜCRE KÜLTÜRÜNÜN HAZIRLANMASI VE MTT ANALİZİ.....	76
3.4.1 Hücre İzolasyonu ve Kültüründe Kullanılan Cihazlar, Malzemeler ve Solüsyonlar	76
3.4.2 Çalışma Çözeltilerinin Hazırlanması.....	78
3.4.2.1 Hücre kültürleri için özel besiyeri hazırlanması	78
3.4.2.2 Phosphate-Buffered Saline (PBS) solüsyonunun hazırlanması	79
3.4.2.3 MTT stok çözeltisi hazırlanması.....	79
3.4.3 Dental Pulpa Mezenkimal Kök Hücrelerin Çözülmesi, Pasajlanması ve Çoğaltılması	79
3.4.3.1 Dental pulpa mezenkimal kök hücre elde edilmesi.....	79
3.4.3.2 Hücrelerin çoğaltılması ve pasajlanması.....	83
3.4.4 Formülasyonun Farklı Konsantrasyonlarının Hazırlanması.....	88
3.4.5 Dental Pulpa Kök Hücrelerine Formülasyonların Uygulanması.....	89
3.4.6 MTT Testi ile Sitotoksité Analizi	90
3.5 ANJİYOGENEZLE İLİŞKİLİ VEGF’NİN GEN EKSPRESYON DÜZEYİNİN REAL TIME-PCR YÖNTEMİYLE İNCELENMESİ.....	92
3.5.1 RNA İzolasyonu İçin Örneklerin Hazırlanması	92
3.5.2 Total RNA İzolasyonu.....	93
3.5.3 Faz Ayrımı (RNA’nın DNA ve Proteinden Ayrılması)	94

3.5.4 RNA Çöktürme.....	94
3.5.5 RNA Yıkama ve Konsantrasyonunun Ölçülmesi.....	95
3.5.6 RNA'dan cDNA (Tamamlayıcı DNA) Sentezi.....	95
3.5.7 Gerçek Zamanlı Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu- Real Time PCR (RT-PCR) Analizi	96
3.5.7.1 Verilerin değerlendirilmesi	98
3.6 İSTATİSTİK ANALİZ	99
4. BULGULAR	100
4.1 ETKEN MADDEİNİN KARAKTERİZASYON BULGULARI	100
4.1.1 İloprost'un Fizikokimyasal Özelliklerinin Ait Bulgular	100
4.1.1.1 İloprost'un fiziksel özellikleri ve ph değerine ait bulgular	100
4.1.1.2 İloprost'un UV Spektrumu ve λ_{max} belirlenmesi bulguları.....	100
4.1.2 FTIR Analizi ile Değerlendirilen Bileşen Uyumluluğu Bulguları	101
4.1.3 İloprost'un Spektrofotometrik Yöntemle Miktar Tayini ve Yöntem Validasyonuna İlişkin Bulgular	102
4.1.3.1 Doğrusallık.....	102
4.2 ÖN FORMÜLASYON ÇALIŞMALARININ BULGULARI.....	103
4.3 TASARIM ALANI VE OPTİMİZASYON ÖNCESİ KARAKTERİZASYON BULGULARI.....	103
4.3.1 Jelleşme sıcaklığı, 25 ⁰ C Viskozite, 37 ⁰ C Viskozite	103
4.3.2 Formülasyonun Optimizasyon Sonuçları ve Veri Analizi	104
4.3.3 Optimum Formülasyonun Karakterizasyonuna Ait Bulgular	106
4.3.3.1 Görsel inceleme ve pH değerlendirmesi	106
4.3.3.2 SEM analizine ait bulgular.....	106
4.3.3.3 Optimum formülasyona ait viskozite bulguları.....	107
4.3.3.4 Yayılabilirlik ve adezyon bulguları.....	107
4.3.3.5 Ekstrüde edilebilirlik, tutarlılık ve kohezyon bulguları	108
4.3.3.6 Reolojik özellikler	109
4.3.3.7 İlaç miktarı ve miktar tekdüzeliği	110
4.3.3.8 İn vitro ilaç salım bulguları	110

4.3.3.9	Stabilite Çalışmaları	111
4.3.4	Sitotoksosite Çalışma Bulguları	111
4.3.5	Hücrelerin Canlılığı Üzerindeki Etkilerin Karşılaştırılması.....	112
4.3.5.1	24. saat hücre canlılık değerlerinin gruplar arasında karşılaştırılması.....	112
4.3.5.2	72. saat hücre canlılık değerlerinin gruplar arasında karşılaştırılması.....	114
4.3.6	Grupların Hücre Canlılık Değerlerinin Kendi İçinde Karşılaştırılması	115
4.4	ANGİYOGENEZLE İLİŞKİLİ VEGF GEN EKSPRESYONU DÜZEYİNİN RT-PCR ANALİZ BULGULARI	116
4.4.1	Gruplar Arası VEGF Gen Ekspresyon Düzeylerinin Zamana Göre Karşılaştırılması	117
4.4.2	Materyallerin VEGF Gen Ekspresyonu RT-PCR Bulgularının Zamana Bağlı Grup İçeri Karşılaştırmalı İstatistiksel Analizi	118
5.	TARTIŞMA VE SONUÇ	119
	REFERANSLAR	154
	EK A	191

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 3.1: Formülasyonun Hazırlanmasında Kullanılan Kimyasallar.	57
Tablo 3.2: Formülasyonun Hazırlanmasında Kullanılan Cihazlar.	57
Tablo 3.3 Formülasyon Hazırlanmasında Kullanılan Bilgisayar Programları.	57
Tablo 3.4: Ön Formülasyon Çalışmalarında Kullanılan Konsantrasyonlar.	61
Tablo 3.5: Hedef Ürün Profili ve Gerekçeleri.	62
Tablo 3.6: Kritik Kalite Özellikleri.	63
Tablo 3.7: Risk Sınıflandırması.....	64
Tablo 3.8: Risk Değerlendirme Göstergesi.	65
Tablo 3.9: Girdi Değişkenlerinin Tanımlanması.....	66
Tablo 3.10: Tasarımdaki Çıktılar.	66
Tablo 3.11: Deney Tasarım Matrisi.....	67
Tablo 3.12: Formülasyonun İçeriği.	68
Tablo 3.13: Optimum Formülasyonun İçeriği ve Oranları.....	71
Tablo 3.14: Hücre İzolasyonu ve Kültüründe Kullanılan Cihazlar.	76
Tablo 3.15: Hücre İzolasyonu ve Kültüründe Kullanılan Sarf Malzemeler.....	77
Tablo 3.16: Hücre İzolasyonu ve Kültüründe Kullanılan Solüsyonlar.	78
Tablo 3.17: MTT Testinde Kullanılan Solüsyonlar ve Cihazlar.	78
Tablo 3.18: Total RNA İzolasyonu İçin Kullanılan malzemeler.	93
Tablo 3.19: cDNA Reaksiyon Karışımı.	96
Tablo 3.20: Termal Döngüleyici Cihaz Programı.	96
Tablo 3.21: Kullanılan Primerler.....	97
Tablo 3.22: RT-PCR Reaksiyon Bileşenleri ve Miktarları.	97

Tablo 3.23: Real Time qPCR Analiz Aşamaları.	98
Tablo 4.1: UV Spektrumuna Ait Tepe Noktası.	100
Tablo 4.2: Farklı Konsantrasyonlardaki Absorbans Değerleri.	102
Tablo 4.3: Karakterizasyon Bulguları.	104
Tablo 4.4: MODDE® Yazılımı Tarafından Her Bir Yanıt İçin Hesaplanan İstatistiksel Değerler.	105
Tablo 4.5: Yayılabilirliği ve Adezyon Özellikleri.....	108
Tablo 4.6: Ekstrüdate, Tutarlılık, Kohezyon Değerleri.....	109
Tablo 4.7: İlaç Miktarı ve Miktar Tekdüzeliliğine Ait Bulgular	110
Tablo 4.8: Stabilite Çalışmaları Sonuçları.....	111
Tablo 4.9: Hücre Canlılık Değerlerinin Karşılaştırılması	112
Tablo 4.10: Grupların Zamana Bağlı Hücre Canlılık Değerlerinin İkili Karşılaştırılması.	113
Tablo 4.11: Grupların MTT Sonuçlarının Kendi İçinde Zamana Göre Karşılaştırılması.	116
Tablo 4.12 VEGF Genine Ait Rölatif Ekspresyon Düzeylerinin Sonuçları.....	116
Tablo 4.13: Grupların VEGF Gen Ekspresyonuna Ait Sonuçların İkili Karşılaştırılması	118
Tablo 4.14: Grupların VEGF Ekspresyon Düzeylerinin Grup İçinde Zamana Bağlı Karşılaştırılması.....	118

ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 3.1: İloprost.	58
Şekil 3.2: pH Metrenin Kalibre Edilmesi.	58
Şekil 3.3: Çözünürlük Çalışması.	58
Şekil 3.4 FTIR Spektrofotometresi.....	59
Şekil 3.5 UV-Vis Spektrofotometresi.....	60
Şekil 3.6: Ishikawa Diyagram.	64
Şekil 3.7: Manyetik Karıştırıcı.	68
Şekil 3.8: Viskozimetre Cihazı.....	69
Şekil 3.9: Mekanik Karıştırıcı ve Isıtıcı.....	70
Şekil 3.10: Formülasyonun Kurutulmuş Hali.....	71
Şekil 3.11: Viskozimetre.	72
Şekil 3.12: Tekstür Analiz Cihazı.....	73
Şekil 3.13: Reometre Cihazı.....	74
Şekil 3.14: Franz Difüzyon Hücresi.	75
Şekil 3.15: Reseptör Bölmeden Örnek Alınması.....	75
Şekil 3.16 : Dondurulmuş İnsan Dental Pulpa Kök Hücreleri.	79
Şekil 3.17: Buzdolabı.	80
Şekil 3.18: Su Banyosu.....	80
Şekil 3.19: Biyogüvenlik Kabini.	80
Şekil 3.20: DMEM Solüsyonu.	81
Şekil 3.21: Kullanılan Falkonlar.....	81
Şekil 3.22: Çözünen Hücrelerin Santrifüj İçin Tüpe aktarılması.	81

Şekil 3.23: Santrifüj Cihazı.	82
Şekil 3.24: Santrifüj Sonrası Hücre Peleti.	82
Şekil 3.25: Pipetaj İşlemi.....	82
Şekil 3.26: İnkübatör.	83
Şekil 3.27: %70-80 Yoğunluğa Ulaşmış Hücreler.	83
Şekil 3.28: DPBS ve DPBS ile Hücrelerin Yıkanması.....	84
Şekil 3.29: Tripsin-EDTA Solüsyonu.	84
Şekil 3.30 Hücrelerin Plaka Yüzeyinden Kaldırılması.....	84
Şekil 3.31: DMEM Eklenerek Tripsin Enzim Aktivite Durdurulması.....	85
Şekil 3.32: Santrifüj.....	85
Şekil 3.33: Hücrelerin Süspanse Edilmesi.....	85
Şekil 3.34: Thoma Lamı.	86
Şekil 3.35: Tripan Mavisı.	86
Şekil 3.36: Lama Hücrelerin Yerleştirilmesi.....	86
Şekil 3.37: Hücre Sayılması.	87
Şekil 3.38: Formülasyonlar Hazırlanırken Balık Mıknatısla Karıştırılması.....	88
Şekil 3.39: MTT Analizi İçin Hazırlanan Formülasyonlar.....	88
Şekil 3.40: Enjektör, 0,44'lik ve 0,22'lik Filtre.	89
Şekil 3.41: Filtrelerden Geçirilmesi.....	89
Şekil 3.42: Yeni Besiyerinin Eklenmesi.....	90
Şekil 3.43: MTT Solüsyonunun Hazırlanması.	90
Şekil 3.44: Solüsyon Uygulandıktan Hemen Sonra.	91
Şekil 3.45: Solüsyon Sonrası 4. Saat.	91
Şekil 3.46: Spektrofotometrik Plaka Okuyucu.	92
Şekil 3.47: RT-PCR Analizi İçin Hücrelerin Ekilmesi ve İloprost'un Uygulanması.....	92

Şekil 3.48: PureZOL™ RNA Isolation Reaktifi.	93
Şekil 3.49: Yüksek Hızlı Mikro Santrifüj.....	94
Şekil 3.50: Nanodrop.....	95
Şekil 3.51 iScript cDNA Synthesis Kit.	96
Şekil 4.1: İloprost'un pH Değeri.	100
Şekil 4.2: Uv Absorbans Grafiği.	101
Şekil 4.3: Ftr Spektrumları.	101
Şekil 4.4: İloprost'un Kalibrasyon Doğrusu Grafiği	103
Şekil 4.5: Tasarım Alanı.....	105
Şekil 4.6: 25°C'deki Sıvı Formu.	106
Şekil 4.7: 37 ⁰ C deki Jel Formu.....	106
Şekil 4.8: SEM Görüntüsü.....	107
Şekil 4.9: Gözenek Boyutu Dağılımı.....	107
Şekil 4.10 Yayılabilirlik ve Adhezyon özellikleri (g.s).....	108
Şekil 4.11: Tutatrlılık, ekstrudabilite ve kohezyon değerleri (N=3).	108
Şekil 4.12: G'-G'' eğrileri	109
Şekil 4.13: İn Vitro İlaç Salım Grafiği.	110

KISALTMALAR

CİS	:	Cam İyonomer Siman
DFSC	:	Dental Folikül Kök Hücre
DMEM	:	Dulbecco'nun Modifiye Eagle Medyumu
DMSO	:	Dimetil Sülfoksit
DNA	:	Deoksiribo Nükleik Asit
DPBS	:	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
DPSC	:	Dental Pulpa Kök Hücre
EDTA	:	Etilendiamintetraasetik asit
FBS	:	Fötal Sığır Serumı
FDA	:	Food and Drug Administration, Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
ISO	:	Uluslararası Standardizasyon Birliği
MTT	:	Metilmazol Difenil Tetrazolyum Testi
PBS	:	Phosphate Buffered Saline, Fosfat Tampon Solüsyonu
PDLSC	:	Periodontal Ligament Kök Hücre
PGI ₂	:	Prostasiklin
RNA	:	Ribo Nükleik Asit
RMÇİS	:	Rezin Modifiye Cam İyonomer Siman
SCAP	:	Dental Apikal Papilla Kökenli Kök Hücre
SEM	:	Scanning Electron Microscope, Taramalı Elektron Mikroskobu
SHED	:	Eksfoliyel Süt Dişlerindeki Kök Hücre
VEGF	:	Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü

1. GİRİŞ

Diş pulpası, dentin dokusuyla çevrili, yoğun damar ağ yapısına sahip bir bağ dokusudur. Pulpanın vitalitesinin korunması, restoratif ve endodontik tedavilerde son derece önemlidir. Çürük lezyonları veya travmatik etkenlere bağlı olarak pulpa dokusunun açığa çıkması, odontoblastlar, pulpa fibroblastları, immün hücreler ve endotel hücreleri gibi çeşitli hücre tiplerinin inflamatuvar ve rejeneratif yanıt verdiği bir doku hasarı durumuna yol açmaktadır (Limjeerajarus, Chanarattanubol ve ark., 2014).

Odontoblastların hasar görmesi durumunda, primer dentin üretiminden sorumlu bu hücreler fonksiyonlarını kaybedebilmektedir. Bu tür hasarlara karşı pulpa dokusu, kendini korumak ve yeniden yapılandırmak amacıyla bir savunma yanıtı başlatır. Bu süreçte, pulpa stromasında yer alan mezenkimal kökenli progenitör hücreler, mikroçevreden gelen sinyaller doğrultusunda aktive olur ve odontoblast-benzeri bir fenotip kazanarak farklılaşmaktadır. Sonuç olarak, bu hücreler, hasarlı bölgeye lokalize olarak dentin benzeri bir yapı olan tersiyer dentini (reaktif veya tamir dentini) üretmektedir. Bu bağlamda, çeşitli biyoaktif ajanların uygulanması, hücre proliferasyonu ve farklılaşmasını uyararak tersiyer dentin köprüsü oluşumunu teşvik edebilir (Rombouts ve ark., 2017).

Pulpa dokusunun vitalitesini koruma amacıyla yüzyıllar boyunca çeşitli materyaller geliştirilmiş olup; bu amaçla kullanılan kalsiyum hidroksit uzun yıllar boyunca “altın standart” olarak kabul edilmiştir ancak beklenen düzeyde klinik başarıyı sağlayamamaktadır (Davaie ve ark., 2021). Vital pulpa tedavisinde kullanılan materyallerin, radyoopasite, boyutsal stabilite, biyouyumluluk, biyoaktivite gibi belirli fizikokimyasal ve biyolojik özelliklere sahip olması gerekmektedir. Ayrıca, bu materyaller yalnızca pulpa vitalitesini korumakla kalmamalı, aynı zamanda pulpa hasarı durumunda anjiyogenez sürecini ve tamir dentini oluşumunu da destekleyebilmelidir. Mevcut materyallerin bu özellikleri tam anlamıyla karşılayamaması, araştırmacıları farklı içeriklere sahip alternatif materyallerin geliştirilmesine yönlendirmiştir (W. L. O. da Rosa ve ark., 2018).

Prostasiklin (PGL₂), güçlü bir fizyolojik vazodilatör ajan olup anjiyogenez ve hücrel proliferasyonu artırma özelliğiyle öne çıkmaktadır (Limjeerajarus, Chanarattanubol ve ark., 2014; Limjeerajarus, Osathanon ve ark., 2014). Çeşitli çalışmalarda PGL₂'in birçok farklı hücre tipinde vasküler endotelial büyüme faktörünün (VEGF) mRNA ekspresyonunu

arttırarak hem hücre proliferasyonunu hem de anjiyogenezi anlamlı düzeyde desteklediği gösterilmiştir (Hung ve ark., 2009; Kamio ve ark., 2008). PGL₂'nin dental pulpanın onarımı ve rejenerasyonunda VEGF gen ekspresyonunu artırmış ve endotelial hücrelerin proliferasyonunu teşvik etmiştir. Yine de PGL₂'nin dental pulpa üzerindeki etkisine dair sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır (Tran-Hung ve ark., 2006; Okiji ve ark., 1989).

PGL₂'nin kimyasal olarak kararsız bir molekül olması nedeniyle, daha stabil yapıya sahip sentetik bir analogu olan İloprost geliştirilmiş ve klinik kullanımda yerini almıştır (Limjeerajarus, Chanarattanubol, ve ark., 2014). İloprost, özellikle pulmoner hipertansiyon ve Raynaud sendromu tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Y. Zhu ve ark., 2010). İloprost, kan damarlarını genişleterek ve trombosit agregasyonunu azaltarak vaskülarizasyonu artırmaktadır. Klinik çalışmalarda, İloprost infüzyonunun ardından dolaşımdaki endotelial hücreler ve bunların öncüllerinin sayısının arttığı gösterilmiştir. Ayrıca İloprost uygulaması, bu hücrelerde ICAM-1, BCL2 ve VEGF ekspresyonlarını da artırmıştır. Tüm bu veriler, İloprost'un anjiyogenezi destekleyici etkisini ortaya koymaktadır. Ancak İloprost'un vücut içindeki yarı ömrü yaklaşık 30 dakikadır. Bu nedenle, ilacın yavaş ve sürekli bir şekilde kontrollü salımını sağlayabilecek bir sistem geliştirilmesi gerekmektedir (Limjeerajarus, Chanarattanubol, ve ark., 2014).

Terapötik seviyelere ulaşmak için bir ilacın veya biyomolekülün salımının kontrol edilmesi klinik açıdan önemlidir (Uhrich ve ark., 1999). Bu nedenle bölgeye özgü, sürekli terapötik ilaç seviyelerini uzun süreler boyunca sağlayabilen ve yan etkileri azaltabilen ilaç dağıtım sistemlerinin geliştirilmesi önemlidir (Rescignano ve ark., 2014;Thumsing ve ark., 2014).

Hidrojeller, topikal anestezi, enfeksiyon kontrolü, yara iyileşmesi (Z. Xu ve ark., 2020), doku rejeneratif mühendisliği, 3 boyutlu hücre kültürü sistemleri ve antikanser tedavisi dahil olmak üzere çeşitli deneysel çalışma ve klinik çeviri alanlarında taşıma amacıyla uygulanmıştır (S. Xu ve ark., 2022). Ayrıca hidrojeller, invazif olmayan ağrı yönetimi için iğnesiz anestezi (Amorim ve ark., 2020) ve kanser çalışmaları için 3 boyutlu hücre kültürü sistemi dahil olmak üzere yardımcı terapötik teknikler sağlar (S. Xu ve ark., 2022). Bu nedenle, hidrojeller oral ve maksillofasiyal hastalıkların tedavisinde umut vadeden aday materyaller olarak değerlendirilmektedir. Proteinlerin veya ilaçların hidrojeller aracılığıyla kontrollü şekilde salımı, özellikle diş kök kanalı gibi dar alanlara materyal enjeksiyonu açısından tercih edilen bir yöntemdir (Chang ve ark., 2017).

Poloksamerler tamamen biyobozunabilir ve biyouyumlu bir polimer olup, kolayca hidrojel formuna dönüştürülebilmesi sayesinde ilaç salım sistemleri için cazip bir taşıyıcıdır (Kumari ve ark., 2010). Poloksamerler, yüzey özellikleri değişken olan blok kopolimerlerdir. Lokal tedavilerde Poloksamer jelinin enjeksiyonu, uygulandığı bölgede bir depo oluşturur ve bu depo, hedef organa ilacın yavaş ve sürekli salımını sağlar (Jarak ve ark., 2020). Bu özellikleri nedeniyle, FDA onaylı biyouyumlu bir polimer olan poloksamerler, ilaç salım sistemleri için etkili bir taşıyıcı olarak değerlendirilmektedir (Nie ve ark., 2011).

Diş pulpası tedavisinde dişin vitalitesinin korunması son derece önemlidir. Günümüzde pulpa rejenerasyonu geleneksel kök kanal tedavisiyle karşılaştırıldığında tercih edilen yöntemdir (Limjeerajarus ve ark., 2019). Dental pulpa rejenerasyonu, anjiyojenik faktör ekspresyonunun arttırılması ve ardından mezenkimal kök hücrelerin diş pulpası oluşumu için uyarılmasıyla başlatılır. Son yıllarda doku mühendisliği ve kök hücre araştırmalarındaki ilerlemeler, pulpa/dentin revaskülarizasyonu ve rejenerasyonu için potansiyel bir tedavi seçeneğinin ortaya çıkarmıştır. Vital pulpa tedavisinde başarının anahtarı, dental pulpanın sağlıklı bir ortamda ve yeterli kan akışıyla desteklenmesidir (Maraldi ve ark., 2013).

Bu doğrultuda bu tez çalışmasının amacı, anjigenezisi indüklemek amacıyla kullanılan prostosiklin analogu olan İloprost'un dental pulpa kök hücreleri üzerindeki sitotoksisini ve anjiyojenik faktör olan VEGF'nin mRNA ekspresyonu üzerindeki etkisini in vitro olarak değerlendirerek bu materyalin vital pulpa tedavilerinde dental pulpa rejenerasyonu elde edebilmek amacıyla kullanılabilirliğinin uygunluğunu değerlendirmektir. İkinci amaç ise bu materyalin sıvı formda olması ve yarı ömrünün kısa olması gibi özellikleri klinik kullanımda pulpa odasına ve kök kanallarına uygulamayı zorlaştırdığı için taşıyıcı sistem olarak Poloksamer 407 ve Poloksamer 188'i birleştirerek sıcaklığa duyarlı enjektde edilebilir bir hidrojel tasarlayıp bu hidrojin insan dental pulpa kök hücreleri üzerindeki sitotoksitesini değerlendirmektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 DENTİN PULPA KOMPLEKSİ

Dentin-pulpa kompleksi, pulpa ve pulpanın etrafını çevreleyen dentinin bir araya gelmesiyle oluşan yapıdır (Abbass ve diğerleri, 2020). Dentin ve pulpa histolojik olarak farklı yapılara sahip olmalarına rağmen, benzer embriyolojik kökenleri ve işlevsel bütünlükleri nedeniyle bu iki yapı genellikle dentin-pulpa kompleksi olarak adlandırılmaktadır (Yong ve Cathro, 2021). Diş pulpası, dişin vitalitesinin korunmasından sorumlu vasküler bir bağ dokusu iken; dentin, bu canlı dokuyu çevreleyerek koruma işlevi görmektedir (Kawashima ve Okiji, 2016). Pulpa ve dentin, fonksiyonlarını bütüncül bir şekilde yerine getirirken, bu sistemde odontoblastlar kritik bir rol üstlenmektedir (Yong ve Cathro, 2021). Pulpa, dentin üretiminin yanı sıra dentine besin ve sinirsel destek sağlarken; pulpa tarafından oluşturulan dentin tabakası da pulpayı koruyucu bir bariyer görevi görmektedir (Fawzy El-Sayed ve ark., 2019).

Dentin oluşumunda görevli olan odontoblast hücrelerinin gövdeleri pulpa içinde konumlanmaktadır ve dentin tübülleri içerisinde uzantıları bulunmaktadır. Bundan dolayı pulpa dentin ile yakın bir ilişki içindedir (Imran Farooq ve ark., 2021). Pulpa-dentin kompleksinde karşılıklı etkileşim vardır, dentin üzerindeki etkiler pulpa bileşenlerini etkileyebileceği gibi pulpada meydana gelen hasarlar da üretilen dentin miktarını ve kalitesini etkileyebilmektedir (Fawzy El-Sayed ve ark., 2019). Pulpa dokusu, pulpa homeostazını koruyan, rejeneratif yeteneğini kolaylaştıran ve reaksiyonel dentin oluşturan duyarlılık ve immün koruyucu özelliklere sahiptir (Sugiaman ve ark., 2023) .

Diş pulpası, dişin hem koronal hem de radiküler kısmında bulunan ve kan damarları, sinirler ve lenfatik damarları içeren bir dokudur (Abbass ve ark., 2020; Sugiaman ve ark., 2023). Yapı olarak diş pulpasının %75'i su ve %25'i ise organik maddelerden oluşmaktadır. Bu organik yapının yaklaşık %60'ını tip I kollajen, %40'ını ise tip III kollajen oluşturmaktadır (Imran Farooq ve ark., 2021) .

2.1.1 Pulpanın Tabakaları

Pulpa dokusu, dıştan içe doğru odontoblast tabakası, hücreden fakir tabaka (Weil tabakası), hücreden zengin tabaka ve santral tabaka olmak üzere dört farklı histolojik tabakadan oluşmaktadır (Imran Farooq ve ark., 2021; Sugiaman ve ark., 2023).

2.1.1.1 Odontoblast tabakası

Pulpanın en dıştaki hücre tabakasını oluşturan odontoblast tabakası histolojik kesitlerde predentinin hemen altında ve hücreden fakir bölgenin hemen üstünde yer almaktadır (Hargreaves ve ark., 2021). Odontoblast tabakası, odontoblast hücrelerinin hücre gövdelerinden ve bunların sitoplazmik uzantılardan oluşur (Imran Farooq ve ark., 2021). Matürasyon ve yaşlanma sırasında pulpa alanının daralmasına bağlı olarak odontoblast tabakasında, özellikle koronal pulpada hücre sayısında sürekli bir artış söz konusudur. Odontoblastlarda meydana gelen apoptoz ile bu sınırlı alana uyum sağlandığı görülmektedir (Sugiaman ve ark., 2023).

2.1.1.2 Hücreden Fakir Tabaka:

Odontoblast tabakasının hemen altında ve hücreden zengin tabakanın üzerinde yer almaktadır. Ortalama 40 µm genişliğinde hücre içermeyen bölge olan bu yapı, Weil'in hücresiz tabakası olarak da adlandırılmıştır. (Shabbir ve ark., 2021). Vasküler kılcal damarları, miyelinsiz sinir lifleri ve fibroblastların ince sitoplazmik uzantılarının dallanmasını içermektedir. Hücreden fakir tabaka hem hücreden zengin tabakayı hem de odontoblast tabakasını destekleyici bir yapıya sahiptir (Imran Farooq ve ark., 2021).

2.1.1.3 Hücreden zengin tabaka:

Santral tabakanın üzerinde ve hücreden fakir tabakanın hemen altında görülmektedir. Bu tabakada hücre yoğunluğu koronal pulpada radiküler pulpaya göre daha belirgindir (Hargreaves ve ark., 2021). Bu tabaka fibroblastlar, makrofajlar ve dendritik hücreler gibi savunma hücrelerinin yanı sıra farklılaşmamış mezenkimal kök hücreleri de içerebilmektedir. Hücreden zengin tabakada bulunan bu farklılaşmamış hücrelerin proliferasyonu ve farklılaşması odontoblast hücrelerinin sayısının korunmasını sağlamaktadır (Shabbir ve ark., 2021).

2.1.1.4 Santral tabaka

Hücreden zengin tabakanın altında yer almaktadır. Diğer tabakalarla karşılaştırıldığında daha büyük çaplı kan damarlarına ve sinir pleksuslarına (genellikle myelinli A-lifleri ve myelinsiz C-lifleri) sahiptir. Bu tabakayı amorf hidratlı matriks jel ve kollajen fibrilleri oluşturmaktadır (Kawashima ve Okiji, 2016b).

2.1.2 Pulpanın Hücreleri

Perivasküler alanları ve diş pulpasını oluşturan hücreler, odontoblastlar, fibroblastlar, progenitör hücreler (farklılaşmamış mezenkimal hücreler), savunma hücreleri (makrofajlar, lenfositler, mast hücreleri vb.) ve diğer hücreler (kök hücreler) olmak üzere dört gruba ayrılmaktadır (Abbass ve ark., 2020; Imran Farooq ve ark., 2021).

2.1.2.1 Odontoblastlar

Odontoblastlar, dentin oluşumundan görevlidir ve epitelyal mezenkimal etkileşimlerle tetiklenen dental papillanın ekto-mezenkimal hücrelerinin farklılaşmasından köken almaktadırlar (Hargreaves ve ark., 2021). Odontoblastlar, glikoprotein sentezi ve sekresyonuna özgü ayırt edici morfolojik özellikleri kazanarak farklılaşmaktadırlar. Odontoblastlar, kök gelişimi tamamlanana kadar primer dentini oluştururken; sekonder dentin ise, primer dentine benzer şekilde, kök gelişiminden sonra oluşmaktadır (Imran Farooq ve ark., 2021). Odontoblastlar ile altlarındaki mezenkimal hücreler arasındaki sitoplazmik bağlantılar, pulpa hasarı durumunda sinyal iletimini sağlayarak mezenkimal hücrelerin proliferasyonunu ve odontoblastlara farklılaşmasını desteklemektedir. (Abbass ve ark., 2020). Odontoblast hücrelerinin sahip olduğu odontoblastik uzantılar dentin tabakasına uzanan kanalcıklar olan "dentin tübülleri" nin içinde yer almaktadır. Predentinde ise bu uzantılar, mineralize olmamış kollajen lifleri ile çevrilidir. Bu lifler dentin matriksinin oluşmasında görev alır (Bleicher, 2014). Odontoblastik farklılaşma süreci; hücre proliferasyonunu, göçü ve farklılaşmasını teşvik edebilen biyoaktif moleküller tarafından düzenlenmektedir (Shabbir ve ark., 2021; Abbass ve ark., 2020). Transforme eden büyüme faktörü-beta (TGF- β), kemik morfojenik proteinleri (BMP), epidermal büyüme faktörü, fibroblast büyüme faktörü 2 (FGF2), insülin benzeri büyüme faktörleri (IGF), trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) ve hepatosit büyüme faktörü dahil olmak üzere çeşitli büyüme faktörleri, diş gelişiminin erken evrelerinde odontoblastik farklılaşmada rol

oynamaktadır (Kawashima ve Okiji, 2016). Odontoblastlar farklılaştıktan sonra TGF- β , BMP'ler, insülin benzeri büyüme faktörü 1 (IGF-1), insülin benzeri büyüme faktörü 2 (IGF-2), FGF-2 ve anjiyojenik faktörler dahil olmak üzere biyoaktif molekülleri salgılayabilir. Bu biyoaktif moleküller dentin matriksi içinde sıkışır ve rejenerasyon sürecinde rol üstlenmek üzere matriks yıkımı üzerine pulpa dokularına salınabilir (Bleicher, 2014; Gittens ve Uludag, 2001). Odontoblastların diş çürüğü veya kavite hazırlığı gibi çeşitli uyaranlara verdikleri yanıt, inflamatuvar reaksiyonun şiddetine bağlı olarak şekillenmektedir (Bleicher, 2014). Düşük düzeyli inflamasyon veya hafif uyarılar, dentin matriksi ve pulpa hücrelerinden salınan biyoaktif moleküller aracılığıyla dentin rejenerasyonunu indüklerken, şiddetli uyaranlar ve inflamasyon hücresel ölümü indükler ve dentin rejenerasyonunu bozar (Abbass ve ark., 2020).

2.1.2.2 Fibroblastlar

Fibroblastlar pulpadaki hücrelerin büyük çoğunluğunu oluşturmaktadır ve özellikle hücreden zengin tabakada bol miktarda bulunmaktadır. Uygun sinyaller aldıklarında farklılaşmamış hücre özellikleri göstererek dokuya özgü hücrelere (örneğin odontoblast benzeri hücreler) dönüşme yeteneğine sahiptirler. Bu hücreler ekstraselüler matriksin (ECM) protein bileşenlerini sentezleyip korumakla görevlidir; bu doğrultuda tip I ve tip III kollajenlerin, proteoglikanların ve glikozaminoglikanların (GAG)'ların üretiminde rol almaktadırlar. Fibroblastlar aynı zamanda kollajenlerin fagositozu için pulpadaki kollajen döngüsünden sorumludurlar (Al-Shaher ve ark., 2004). Pulpada bulunan fibroblastların büyük bir kısmı farklılaşmamış hücre özelliği taşımaktadır ve güncel literatürde bu hücreler genellikle mezenkimal kök hücreler (MKH) olarak adlandırılmaktadır. Farklı dokulardan türetilen MKH'ler, genellikle dokuya özgü hücre fonksiyonlarını desteklerken, uygun sinyallerle yönlendirildiklerinde diğer hücre soylarına da farklılaşabilme potansiyeline sahiptirler. Kemik ve yağ dokularından elde edilen MKH'lerde olduğu gibi, pulpa kaynaklı MKH'ler de kültür ortamında yüksek proliferasyon kapasitesi sergilemekte ve uygun koşullarda nörojenik, adipojenik, kondrojenik ve osteojenik hatlara farklılaşabilmektedir (Tran-Hung ve ark., 2006). Fitzgerald ve ark., tarafından yapılan bir çalışmada, odontoblastların farklılaşmasından önce görülen mitotik aktivitenin özellikle perivasküler fibroblastlar arasında meydana geldiği gösterilmiştir (Fitzgerald ve ark., 1990). Fibroblast hücreleri büyümeleri ve protein sentezleyebilmeleri için nöropeptitler tarafından

uyarılmaktadır. Bu hücreler inflamasyon sırasında nöral büyüme faktörü (NGF) ve proinflamatuvar sitokinler üretmektedir. NGF'in sadece diş gelişimi aşamasında değil pulpal yaralanma sonucu oluşan odontoblast yanıtlarının düzenlenmesinde de önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir (Chmielewsky ve ark., 2016).

2.1.2.3 İmmünolojik savunma hücreleri

Makrofajlar, monositlerden ve lenfositlerden farklılaşarak oluşan ve kan bileşenleriyle birlikte pulpaya ulaşan immünolojik savunmada görevli olan dendritik hücreler odontoblast tabakasına yakın bir şekilde konumlanmışlardır. Ayrıca sitoplazmik uzantılarının dentin tübülleri içerisine kadar uzandığı görülmektedir (Astudillo-Ortiz ve ark., 2023). Pulpa dokusunun ortasında lokalize olan immünolojik savunma hücrelerinin sayısı, inflamasyon ve doku tamir sürecine bağlı olarak artmaktadır. Bu hücreler inflamatuvar yanıt sırasında antijen sunucu hücre görevini üstlenerek protein yapısındaki antijenleri hücre içine alır ve bu antijenleri, MHC sınıf II molekülleri aracılığıyla T lenfositlerine sunarak immün yanıtın başlatılması sağlamaktadırlar (Abbass ve ark., 2020; Imran Farooq ve ark., 2021). Fibroblastlara benzer şekilde makrofajlar da pulpadaki sinyal yollarında aktif rol almaktadır. Uygun inflamatuvar uyaranlar tarafından aktive edilen makrofajlar, interlökin (IL-1), tümör nekroz faktörü (TNF), büyüme faktörleri ve diğer sitokinleri üretebilmektedir. Sağlıklı pulpada bulunan T lenfositler, makrofajlar ve dendritik hücreler; pulpanın bağışıklık yanıtını başlatmak için gerekli hücresel donanımına sahiptir. Buna karşılık, B lenfositlerin sağlıklı pulpa dokusunda daha az sayıda bulunduğu bildirilmektedir (Goldberg ve Smith, 2004).

2.2 KÖK HÜCRELER

Kök hücreler; kendilerini yenileyebilme ve köken aldıkları dokuya ait hücre tiplerine farklılaşabilme yeteneğine sahip, uygun koşullar sağlandığında ise vücut içinde ya da laboratuvar ortamında birçok farklı hücre tipine dönüşebilen farklılaşmamış hücreler olarak tanımlanmaktadır (Moore ve Lemischka, 2006). Doku ve organlarda hasar meydana geldiğinde, kök hücreler hasar gören hücrelerin yerine geçerek bu hücre tiplerine farklılaşabilmektedir. (Zakrzewski ve ark., 2019). 1800'lü yılların başında Carl Rudolph Virchow tüm hücreler başka hücrelerden gelişir anlamına gelen 'Omnis cellula e cellula' tanımlamasını yapmıştır (Konstantinov, 2000). 1900'lü yıllarda ise Alexander Maksimov

tarafından kök hücre terimi kullanılmıştır (Konstantinov, 2000). Bu yıllarda yapılan çalışmalar ile kemik iliğinde mevcut olan bir grup hücrenin kan sistemini oluşturan hücrelere farklılaşmasına öncülük edebilmesinin keşfedilmesi ile kök hücre terimi kullanılmaya başlanmış ve farklı organlarda çeşitli dokulara ait olan kök hücreler keşfedilmiştir (Ramalho-Santos ve Willenbring, 2007).

2.2.1 Kök Hücrelerin Sınıflandırılması

Kök hücreler, vücutta yer aldıkları konuma göre embriyonik kök hücreler ve erişkin (yetişkin) kök hücreler olmak üzere iki ana gruba ayrılmaktadır; farklılaşma ve bölünme özelliklerine göre ise totipotent, pluripotent, multipotent, oligopotent ve unipotent olarak sınıflandırılabilirler (Erceg ve ark., 2023).

2.2.1.1 Farklılaşma ve bölünme özelliklerine göre kök hücreler

Totipotent kök hücreler

Embriyonun iç hücre kitlesinden türetilmekte olup en yüksek farklılaşma potansiyeline sahip kök hücreler olarak kabul edilmektedir. Bu hücreler, bölünerek endoderm, mezoderm ve ektoderm gibi embriyonik germ tabakalarına; ayrıca plasenta, vitellüs kesesi ve amnion gibi ekstraembriyonik yapılara farklılaşabilme yeteneğine sahiptir. Bu sayede yeni embriyoların oluşumuna katkıda bulunabilirler (Zakrzewski ve ark., 2019).

Pluripotent kök hücreler

Pluripotent kök hücreler (PSCs), ektoderm, mezoderm veya endoderm gibi temel germ tabakalarından türeyen çeşitli özelleşmiş hücre tiplerine farklılaşabilme kapasitesine sahiptir. Pluripotent kök hücreler, embriyonik kök hücreler (ESC) ve indüklenmiş pluripotent kök hücreler (iPSC) olmak üzere iki alt gruba ayrılmaktadır. Embriyonik kök hücreler, döllenmeden sonraki yaklaşık 4-14 gün içinde blastokist aşamasında elde edilirken; indüklenmiş pluripotent kök hücreler, yetişkin hücrelerin genetik ve epigenetik olarak yeniden programlanması yoluyla laboratuvar ortamında yapay olarak üretilmektedir (Sui ve ark., 2020).

Multipotent kök hücreler

Multipotent kök hücreler, sınırlı bir farklılaşma kapasitesine sahip olup yalnızca belirli bir hücre soyuna ait farklı hücre tiplerine dönüşebilme yeteneği göstermektedir. Bu hücrelere örnek olarak, yalnızca çeşitli kan hücrelerine farklılaşabilen hematopoietik kök hücreler verilebilir (Nakashima ve Iohara, 2011). Bu kategoride yer alan bir alt grup ise, yetişkin kök hücreler arasında bulunan mezenkimal stromal hücrelerdir. Bu hücreler yüksek multipotent farklılaşma kapasiteleri ve terapötik potansiyelleri nedeni ile rejeneratif tıp ve doku mühendisliği alanlarında ideal hücre grubu olarak değerlendirilmektedir. Bu hücreler, kemik iliği, yağ dokusu, kıkırdak, göbek kordonu kanı, tükürük bezleri ve çeşitli dental dokular gibi farklı kaynaklardan elde edilebilmektedir (Gronthos ve ark., 2002).

Oligopotent kök hücreler

Bulundukları doku içerisinde yalnızca birkaç hücre grubuna farklılaşma yeteneğine sahip hücrelerdir. Bu hücre tipine örnek olarak, yetişkin lenfoid veya miyeloid kök hücreler gösterilebilir (Zakrzewski ve ark., 2019).

Unipotent kök hücreler

Sadece kendi türünde hücreler üretebilen, ancak, kendini yenileme kapasitesine sahip olan hücreler unipotent kök hücreler olarak adlandırılmaktadır. Yetişkin kas hücreleri unipotent kök hücrelere örnek olarak gösterilebilir (Zakrzewski ve ark., 2019).

2.2.1.2 Kökenlerine göre kök hücre tipleri

Mezodermal, ektodermal ve endodermal kökenli bütün vücut hücrelerine farklılaşabilme kapasitesine sahip, sınırsız bölünme yeteneği gösteren ve bu nedenle ‘ölümsüz’ olarak da adlandırılabilen hücrelerdir. Embriyonik kök hücreler, pluripotent kök hücre grubunda yer almaktadır. Yetişkin kök hücreler, ölen hücreleri yenilemek ve hasar gören dokuları onarmak amacıyla hücre bölünmesi yoluyla çoğalan, farklılaşmamış totipotent veya multipotent hücrelerdir. Yetişkin kök hücrelerin canlı organizmadaki birincil rolleri, bulundukları dokuyu korumak ve onarmaktır (Zakrzewski ve ark., 2019).

2.2.2 Dental Dokulardan Elde Edilen Mezenkimal Kökenli Kök Hücreler

Dental dokulardan elde edilen bu kök hücreler, kendini yenileme kapasitesine sahip olup multipotent özellik gösterirler ve bölünebilme yeteneğine sahiptirler. Osteojenik, adipojenik, kondrojenik, nörojenik ve miyojenik hücre soylarına farklılaşma potansiyeline sahiptirler. Pulpa kaynaklı bu kök hücreler aynı zamanda odontoblastlara da farklılaşabilmektedirler. Diş pulpasının tüm bölgelerinde bulunabilmelerine rağmen, özellikle perivasküler alanlarda ve odontoblast tabakasına bitişik olan Hohl'un hücreden zengin tabakası bölgesinde yoğun şekilde yerleşmişlerdir (Zakrzewski ve ark., 2019).

2.2.2.1 Dental folikül kök hücreleri

Dental folikül kök hücreleri, gelişim aşamasındaki diş tomurcuğunu çevreleyen gevşek bağ dokusundan elde edilmektedir. Bu hücre popülasyonu, sementoblast, osteoblast ve periodontal ligament hücrelerine farklılaşabilme kapasitesine sahiptir (W. Guo ve ark., 2012). Bu hücreler otuzun üzerinde pasaj sonrasında dahi proliferasyon yeteneklerini koruyabilmekte olup, bu özellikleri sayesinde uzun süreli hücre kültürü uygulamaları için uygun bir model oluşturmaktadır (W. Guo ve ark., 2012; Luan ve ark., 2006). Klinik uygulamalarda, genellikle üçüncü büyük azı dişlerinin folikül kesesinden izole edilmektedirler (W. Guo ve ark., 2012).

2.2.2.2 Apikal papilla kök hücreleri

Bu hücreler, olgunlaşmamış diş kökleri içerisinde bulunan mezenkimal yapılar olup, insanlarda immatür sürekli dişlerin apikal papillalarından izole edilmektedir. Apikal papilla kök hücreler (SCAP), odontoblastların kaynağını oluşturmakta ve apeksogenezin gerçekleşmesini sağlamaktadır (Fawzy El-Sayed ve ark., 2019). Bu kök hücreler, in vitro koşullarda indüklenerek odontoblast-benzeri hücrelere, nöron-benzeri hücrelere ya da adipositlere farklılaştırılabilir. SCAP'ler, dental pulpa kök hücrelerine kıyasla daha yüksek proliferasyon kapasitesine sahip olmaları nedeniyle, doku rejenerasyonu uygulamalarında daha avantajlı bir hücresel kaynak olarak değerlendirilmektedir (Lambricht ve ark., 2014).

2.2.2.3 Periodontal ligament kök hücreleri

Periodontal ligament kök hücreleri (PDLSC), periodontal ligament veya sement dokusunun rejenerasyonunda yaygın olarak kullanılan hücrelerdir. Bu hücreler, mezenkimal kökenli hücre soylarına farklılaşabilme yeteneğine sahip olup; kolajen sentezleyen hücreler, adipositler, sement dokusu ve osteoblast-benzeri hücreleri in vitro koşullarda oluşturabilmektedirler. PDLSC'ler hem diş kökü yüzeyinde hem de alveolar kemik yüzeyinde bulunmakla birlikte, ancak alveolar kemik yüzeyindeki hücrelerin, kök yüzeyindekilere kıyasla daha yüksek farklılaşma kapasitesi gösterdiği bildirilmektedir (Iwata ve ark., 2010).

2.2.2.4 Eksfoliye olmuş süt dişlerinden elde edilen kök hücreler

Süt dişlerinin sahip olduğu pulpa dokusu yoğun damar içermektedir ve kök hücre açısından zengin bir kaynak olarak değerlendirilmektedir. Yetişkinlerin dental pulpasından elde edilen kök hücrelerle karşılaştırıldığı zaman eksfoliye süt dişlerinden izole edilen kök hücreler, daha yüksek proliferatif aktiviteye sahiptirler. Bu özelliklerinden dolayı daha fazla odontojenik ve osteojenik farklılaşma kapasitesine sahiptirler. Eksfoliye süt dişlerinden izole edilen kök hücrelerin elde edilmesi ve kültürü nispeten daha kolaydır ve kriyoterapi ile dondurulduktan iki yıl sonrasına kadar rejeneratif özelliklerini koruyabildikleri gösterilmiştir (Zakrzewski ve ark., 2019) .

2.2.2.5 Dental pulpa kök hücreler

İnsan dental pulpasından izole edilen ilk dental pulpa kaynaklı kök hücrelerdir ve diş pulpası dokusu içerisinde, özellikle pulpanın perivasküler bölgesinde yer almaktadırlar (Raspini ve ark., 2018). 2000'li yıllarda Gronthos ve arkadaşları tarafından 3. büyük azı dişlerinden elde edilerek tanımlanmıştır (Gronthos ve ark., 2000). Dental pulpa kök hücreleri, yüksek diferansiyasyon kapasitesine sahip ve dentin/pulpa benzeri kompleksleri yenileyebilme yeteneği gösteren hücrelerdir (Raspini ve ark., 2018). Gelişmiş bir dişin tüm yapısını oluşturma kapasitesine sahip olan bu hücreler, özellikle dental pulpa kök hücrelerinin periodontal dokuların fotobiyomodülasyon (lazer stimülasyonu) gibi yenilikçi tedavi yaklaşımları ile birleştirildiğinde, hücrelerin çoğalması ve farklı hücre tiplerine dönüşümünü teşvik ederek rejeneratif uygulamalarda önemli faydalar sağlayabilir (Zakrzewski ve ark., 2019).

Dental pulpa kök hücreleri odontojenik, osteojenik, kondrojenik, adipojenik, vasküler ve nörojenik hücre soylarına farklılaşabilme yeteneğine sahiptir (Christodoulou ve ark., 2018). Dental pulpa kök hücrelerinin farklılaşma süreçleri, çeşitli büyüme faktörleri tarafından düzenlenmektedir. Örneğin, temel fibroblast büyüme faktörü (bFGF), transformasyon büyüme faktörü- β (TGF- β), sinir büyüme faktörü (NGF), platelet türevli büyüme faktörü (PDGF) ve kemik morfojenik proteinler (BMP'ler) gibi büyüme faktörleri, dental pulpa kök hücrelerinin farklılaşması, hücre proliferasyonu ve yara iyileşmesi süreçleri üzerinde belirleyici rol oynamaktadır (Tsutsui, 2020).

Dental pulpa kök hücrelerinin en verimli şekilde elde edilebildiği kaynak bölgeler, genellikle üçüncü büyük azı dişleridir. Bu hücrelerin tedavi amaçlı kullanımında öne çıkan avantajlar arasında; cerrahi olarak kolay erişilebilir olmaları, etik açıdan herhangi bir sorun teşkil etmemeleri, uzun yaşam sürelerine sahip olmaları, yüksek farklılaşma potansiyelleri, kültür ortamında kolaylıkla çoğaltılabilmeleri ve yüksek verimle izole edilebilmeleri yer almaktadır (Fawzy El-Sayed ve ark., 2019). Dental olmayan kök hücrelere kıyasla daha fazla dentin dokusu üretme kapasitesi ve anti-inflamatuar özellikleri nedeniyle doku mühendisliği açısından en kullanışlı dental hücre kaynağı olarak değerlendirilmektedir (Raspini ve ark., 2018). Bu hücreler, maksillofasiyal ve ortopedik rekonstrüksiyonlar için de potansiyel bir kaynak olabilmektedirler (Fawzy El-Sayed ve ark., 2019).

2.3 VİTAL PULPA TEDAVİLERİ

Vital bir dişin çiğneme kuvvetlerine karşı gösterdiği yapısal direnç, kanal tedavisi uygulanmış bir dişe kıyasla daha yüksek olduğundan, diş vitalitesinin korunması günümüzde uygulanan tedavilerde temel hedeflerden biri olarak kabul edilmektedir (Dammaschke ve ark., 2010). Amerikan Endodontistler Birliği (AAE), Endodontik Terimler Sözlüğü'nün onuncu baskısında vital pulpa tedavisini (VPT), “travma, çürük veya terapötik prosedürler nedeniyle hasar görmüş pulpa dokusunun sağlıklı durumunun korunmasını ve sürdürülmesini amaçlayan tedavi” olarak tanımlamaktadır (Lin ve ark., 2019).

Vital pulpa tedavilerinde, pulpanın canlılığını ve fonksiyonlarını sürdürülebilmesi amaçlanmaktadır (Lin ve ark., 2020). Vital pulpa tedavisinin yüksek başarı oranları, enfekte dokuyu ortadan kaldırma yeteneğine, ilgili hemorajik kontrole ve iyileşmeyi uyaran uygun bir ortam yaratmak için biyoyumlu materyallerin yerleştirilmesine bağlıdır. (Yong ve

Cathro, 2021). Vital pulpa tedavilerinde temel amaç dentin-pulpa kompleksinin hasar sonrası bütünlüğünü korumak ve bakteriyel saldırıya karşı fiziksel bir bariyer oluşturarak tersiyer dentin oluşumunu desteklemek amacıyla doku onarımını kolaylaştırmaktır. Bu yaklaşım, uzun süredir kabul gören, irreversible pulpitis tanısı konulan pulpa dokularının iyileşme kapasitesine sahip olmadığı yönündeki görüşle uyumludur ve bu nedenle VPT'nin yalnızca sağlıklı ya da geri dönüşümlü pulpitisli dokulara uygulanması gerektiği savunulmuştur (Boyer ve Nguyen, 2023). Buna karşılık olarak derin çürüklere sahip bazı semptomatik sürekli dişlerin direk pulpa kuafajı, parsiyel pulpotomi ve total pulpotomi ile uygulamalarla başarılı bir şekilde tedavi edilebileceği gösterilmiştir (Ballıkaya ve Çelebi-Saltık, 2023). Bu sonuç genellikle iltihaplı veya nekrotik pulpa dokularının vital dişlerin koronal pulpası içinde yer aldığı gösteren kanıtlarla açıklanmıştır. Bu nedenle vital pulpa tedavileri, uygun vaka seçimi ile reversible ve irreversible pulpitisin daha az maliyetli ve daha az invaziv tedavisini sağlayan uygun bir seçenektir (Lin ve ark., 2020). Bu tedavi seçeneklerinde çeşitli faktörler değerlendirilerek uygulanacak tedaviye karar verilmektedir. Bu faktörler hastanın genel durumu ve klinik hikayesi, çürüğün ilerleme miktarı, pulpal yaralanmanın büyüklüğü ve perforasyonun boyutları, pulpanın mevcut semptomları ve uyaranlara verdiği cevaplar, pulpada meydana gelen kanamanın derecesi, periodontal dokuların durumu, pulpanın perfore olmasından sonra geçen süre ve ilerde yapılması planlanan restorasyon çeşidi şeklinde sıralanmaktadır (Duncan ve ark., 2022).

2.3.1 Vital Pulpa Tedavilerinde Rejenerasyon ve Onarım

Rejenerasyon gereksinimi, genellikle doku hasarının veya kaybının boyutuyla doğru orantılıdır. Pulpa ve dentin arasında anatomik ve fonksiyonel olarak keskin bir sınır bulunmadığından, ani travmalar veya ilerleyici çürük lezyonları gibi durumlar bu iki dokunun bütünlüğünü bozarak, her ikisinde de patolojik süreçlerin gelişmesine yol açabilmektedir. Dentin-pulpa kompleksinde meydana gelen hasarlar, rejeneratif açıdan yalnızca tek bir doku değil, her iki dokuyu da kapsayan bütüncül bir yaklaşımla ele alınmalıdır (Widbiller ve Schmalz, 2021).

2.3.1.1 Dentin rejenerasyonu ve onarımı

Dişin sert dokusunda asit üreten mikroorganizmalar tarafından meydana gelen çürüğe bağlı doku kaybı, geri dönüşü olmayan bir süreç olarak kabul edilmektedir (Widbiller ve Schmalz,

2021). Uygulanan tedavide öncelik, yumuşak ve renk değişikliğine uğramış dentin dokusunun uzaklaştırılmasıdır. Bunu takiben pulpada oluşacak enfeksiyonu önlemek amacıyla dişin uygun şekilde restore edilmesi gerekmektedir (Schwendicke ve ark., 2013; Schwendicke, Frencken, ve ark., 2016). Güncel çürük uzaklaştırma yöntemlerinde meydana gelecek travmayı ve pulpanın ekspoz olmasını önlemek için asemptomatik dişlerde veya reversible pulpitisli dişlerde derin çürükler tam olarak temizlenmemektedir (Bjørndal ve ark., 2017). Bu yöntem bir veya iki aşamada gerçekleştirilebilmektedir. İki aşamalı prosedürde, pulpaya yakın olan enfekte dentin dokunulmadan bırakılır ve birkaç ay sonra uzaklaştırılır, tek aşamalı prosedürde ise pulpaya komşu enfekte dentin bırakılarak tedavi tamamlanmaktadır (Duncan ve ark., 2019). Çürük üzerine yerleştirilen restoratif materyalleri bakteri metabolizmasında meydana getirdiği etkiler sonucunda çürük lezyonunu etkisiz hale getirerek bakteriyel beslenmeyi engeller ve yumuşamış dentin dokusunun remineralizasyonunu kolaylaştırır (Widbiller ve Schmalz, 2021).

Reaksiyoner dentinin oluşumu

Odontoblastlar, hafif düzeydeki uyarılara karşı, öncelikle dentin tübülleri içerisinde mineral birikimi ile başlayan ve ardından sekonder dentine benzer, tübüler yapının devamlılığını sürdüren reaksiyoner dentin formasyonu ile yanıt verir. Ancak, bu yeni oluşan dentin tabakası zaman zaman düzensiz yapıda ve düşük yoğunlukta olabilmektedir (Widbiller ve Schmalz, 2021). Ayrıca, sadece çürük metabolitleri değil, aynı zamanda pulpaya yakın dentine uygulanan (indirek pulpa kuafajı) kalsiyum hidroksit veya trikalsiyum silikat siman gibi biyoaktif diş materyalleri de reaksiyoner dentinogenezi tetikleyebilmektedir (Farges ve ark., 2015). Bu şekilde oluşan dentin, hasara karşı fizyolojik bir yanıt niteliğindedir ve hem fonksiyonel hem de mikroanatomik kriterleri karşıladığı için, dentin-pulpa kompleksinin korunmasına yönelik bir rejeneratif süreç olarak değerlendirilmektedir (Widbiller ve Schmalz, 2021).

Tamir dentini oluşumu

Pulpadaki inflamatuvar durumun kontrol altında olması hâlinde, kök hücreler aktive olarak hasarlı bölgeye göç eder ve burada odontoblast benzeri hücrelere farklılaşırlar. Bu hücreler dentin dokusunun oluşumunu sağlamaktadır. Oluşan dentin artık tamir dentini olarak adlandırılmaktadır. Reaksiyoner dentinden farklı olarak, düzensiz bir yapıya sahiptir

(Goldberg ve Smith, 2004). Biyoaktif materyaller açıkta kalan veya direkt pulpa kuafajı ve pulpotomi gibi uygulamalarda pulpa dokusuna doğrudan uygulandığında genellikle tamir dentini oluşturmaktadır (Tran ve ark., 2019). Rejeneratif biyolojik bakış açısına göre bu süreç, dentin-pulpa kompleksini iyileştirmeyi amaçlayan, ancak dokunun orijinal mikro anatomisinin tam olarak restorasyonunu sağlayamayan hasarlı pulpanın onarımı olarak görülebilir. Son olarak mikrobiyolojik yükün çok ağır olması ve pulpa iltihabının kontrolsüz ve yıkıcı hale gelmesi durumunda doku nekroz riskiyle karşı karşıya kalır ve ne reaksiyoner ne de tamir dentini oluşturamaz (Widbiller ve Schmalz, 2021).

2.3.1.2 Pulpa rejenerasyonu ve onarımı

Mikroorganizmaların dentine ulaşması durumunda, enfeksiyona bağlı olarak bağışıklık yanıtının zayıflaması ve savunma fonksiyonlarının yalnızca belirli bir düzeye kadar sürdürülebilir olması halinde, pulpa dokusunun canlılığı tehdit altına girmektedir (Ricucci ve ark., 2019).

Reaksiyoner veya tamir dentin oluşumuna ek olarak, pulpa dokusundaki humoral ve hücrel bağışıklık mekanizmaları da aktive olur ve bu süreç genellikle geri dönüşümlü nitelikte lokal bir inflamasyonla sonuçlanır. Ancak bakterilerin yaygın invazyonu, şiddetli ve diffüz bir inflamasyonla karakterize edilen, geri dönüşümsüz pulpitis'e yol açmaktadır (Farges ve ark., 2015). Dentin-pulpa kompleksinde en periferik konumda yer alan hücreler olan odontoblastlar, uzun intratübüler uzantıları sayesinde antijenlerle ilk karşılaşan hücrelerdir ve bu sayede pulpa dokusunun doğal bağışıklık yanıtını tetiklerler (Widbiller ve Schmalz, 2021). Dendritik hücreler de stratejik olarak konumlanarak antijen sunumu sürecinde odontoblastları destekler. Genellikle patojenik uyarıcılar, desen tanıma reseptörleri (PRR'ler) arasında yer alan Toll-benzeri reseptörler (TLR'ler) aracılığıyla tespit edilir. Bu reseptörler sayesinde, patojene özgü moleküler desenler (PAMP'lar) tanımlanarak bağışıklık yanıtı başlatılır. Odontoblastlardaki TLR'lerin uyarılması, proinflamatuvar sitokinlerin ve antimikrobiyal peptitlerin salgılanmasını tetikleyerek, dolaşımdaki bağışıklık hücrelerinin lezyon bölgesine çekilmesini ve istilacı bakterilerin hızlı bir şekilde yok edilmesini sağlamaktadırlar (Galler ve ark., 2021).

Çürük lezyonunun derinliği arttıkça immün yanıt da artar ve bu süreçte T-lenfositler, B-lenfositler, nötrofilik granülositler ve makrofajların birikimi giderek yoğunlaşır. Ayrıca

inflamasyonun erken evrelerinde, dokunun sınırlı bir bölgesinde anjiyogenez başlar ve sinir lifleri inflamatuvar sürecin bir parçası olarak dendritik hücrelerle etkileşime girer (Widbiller ve Schmalz, 2021). Bağışıklık reaksiyonunun sınırlandırılması ve kontrol altında tutulması, pulpa dokusunun; bağışıklık hücreleri tarafından salınan yıkıcı moleküller ve enzimlerin neden olabileceği ikincil hasarlardan korunması açısından büyük önem taşımaktadır. Pulpa dokusunun iyileşebilmesi için inflamasyonun yayılmaması, şiddetlenmeden duraklaması ve sonunda ortadan kaldırılması gerekmektedir. Bu ise ancak, pulpadaki mikrobiyal enfeksiyonun öncelikli olarak klinik müdahale (çürük dokunun selektif uzaklaştırılması, indirek veya direkt pulpa kuafajı ve kavitenin uygun bir şekilde restorasyonu) yoluyla kontrol altına alınması durumunda gerçekleşebilmektedir. Lokal bağışıklık hücreleri, daha sonra pulpa dokusunda kalan mikroorganizmaları hedef alarak eliminasyonlarını sağlar. Tüm mikroorganizmaların ortadan kaldırılması ve inflamasyonun çözülmesiyle birlikte, doku homeostazı yeniden sağlanabilir ve iyileşme süreci başlayabilmektedir. İyileşme sürecinde bağışıklık yanıtı sırasında pulpa dokusunda ortaya çıkan değişiklikler geriler ve pulpa dokusu yapısal olarak yeniden düzenlenir (Widbiller ve Schmalz, 2021). İnflamasyonun azalmasının ardından dental pulpada doku onarım sürecine işaret eden tek belirti genellikle "pulpa taşları" olarak bilinen ektopik kalsifikasyonlardır. Hem odontoblastlar hem de pulpa fibroblastları, rastgele mineralizasyon sürecine katılabilir ve tübüler yapı içeren ya da içermeyen şekilde gerçek veya sahte pulpa taşlarının oluşmasına neden olabilir. Pulpa taşları bu bağlamda, bir tür yara izi olarak değerlendirilebilirken; çevre dokular, bu süreçten bağımsız olarak tamamen sağlıklı bir şekilde iyileşebilmektedir (Goga ve ark., 2008).

Diş pulpasının inflamatuvar tepkileri genellikle irritasyonla ilişkilidir ve lokalize seyreder. Bu nedenle, tedavi sırasında şiddetli şekilde etkilenmiş bölgeler selektif olarak kaldırılabilir. Geçmişte, klinik kriterlere dayanarak pulpa dokusunun geri dönüşümlü veya geri dönüşümsüz olarak hasarlandığı kabul edilirdi. Ancak günümüzde tedavi yaklaşımları, renk değişimi ve kanama miktarı gibi intraoperatif kriterlere dayanarak, iltihaplı bölgelerin lokal olarak uzaklaştırılmasını önermektedir (Duncan ve ark., 2022). Bu doğrultuda, pulpanın parsiyel veya kuronal uzaklaştırılması (kısmi veya total pulpotomi), daha önce irreversible olarak sınıflandırılan durumlarda dahi kalan sağlıklı artık dokunun iyileşmesini destekleyebilecek bir tedavi seçeneği haline gelmiştir (Lin ve ark., 2019). Regeneratif-biyolojik bir bakış açısıyla bakıldığı zaman, sağlam bir odontoblast tabakasının varlığıyla

pulpa dokusunun iyileşmesi öngörülebilir; çünkü fizyolojik sınırlar içerisinde orijinal yapının reversible bir şekilde yeniden kazanılması mümkündür. Ancak, odontoblastlar zararlı uyarıcılar ya da pulpa ekspozu nedeniyle vitalitelerini kaybederse, bu hücreler odontoblast benzeri hücrelerle yer değiştirir ve bu yeni farklılaşmış hücreler tamir dentini (onarıcı dentin) üretir (Cicero ve ark., 2023). Tamir dentini oluşumu, pulpa bağ dokusunun regeneratif iyileşmesini sağlasa da dentin-pulpa arayüzünün mikroanatomisi yapısal olarak orijinal formundan farklıdır. Bu nedenle genel sonuç, dentin-pulpa kompleksi açısından doku onarımı olarak düşünülmelidir. Ancak, hasar çok yoğun veya çok yaygınsa hem rejenerasyon hem de onarım yoluyla iyileşme yetersiz kalır ve tüm pulpa dokusunda nekroz meydana gelmektedir (Widbiller ve Schmalz, 2021).

2.4 VİTAL PULPA TEDAVİLERİNDE KULLANILAN MATERYALLER

Vital pulpa tedavilerinde kullanılan kuafaj ajanlarının biyouyumlu, sitotoksik olmayan, antibakteriyel etkili ve uygun mekanik özelliklere sahip olması, tedavi başarısını doğrudan etkilemektedir (Modena ve ark., 2009). King (1871), pulpayı irrite etmeyen, düşük çözünürlüklü ve ısı iletimini engelleyen materyallerin tercih edilmesi gerektiğini belirtmiştir (Damaschke, 2008). Geçmişte KH, CİS, rezin bazlı kompozitler, ZOE ve çeşitli biyolojik ajanlar kullanılmış, ancak bu materyallerin sınırlılıkları nedeniyle kalsiyum silikat bazlı materyaller (KSBM) günümüzde ön plana çıkmıştır (Tziafas ve ark., 2002). Yeni geliştirilen materyallerin vital pulpa tedavilerinin başarısını artırdığı bildirilmekte, bu alandaki araştırmalar devam etmektedir (Linu ve ark., 2017).

2.4.1 Kalsiyum Hidroksit

Kalsiyum hidroksit (KH), geçmişte direkt pulpa kuafajında altın standart olarak kabul edilmiştir (Ba-Hattab ve ark., 2016; Matsuura ve ark., 2021). Yüksek pH'ı sayesinde fibroblastları uyarır, asidik ortamları nötralize eder, antimikrobiyal etki gösterir ve pulpa iyileşmesini destekler (Stuart ve ark., 1991). Ancak, yüksek çözünürlüğü ve dentine zayıf bağlanması nedeniyle yeterli sızdırmazlık sağlayamaz. Ayrıca, oluşan dentin köprülerinde sıkça görülen tünel defektleri, bakteriyel sızıntıya neden olabilir (Z. Li ve ark., 2015). Sert doku onarımını teşvik etmesine rağmen bu etkinin mekanizması tam olarak açıklanamamıştır; kalsiyum iyonlarının KH'den değil, dokudan kaynaklandığı bildirilmiştir

(Schröder, 1985). Bu nedenlerle KH, günümüzde direkt pulpa kuafajı için ideal bir materyal olarak görülmemektedir (Ba-Hattab ve ark., 2016).

2.4.2 Mineral Trioksit Agregat

Mineral Trioksit Agregat (MTA), dentin-pulpa kompleksindeki yara iyileşmesini destekleyen ve diş hekimliğinde yaygın olarak kullanılan bir materyaldir (W. L. O. da Rosa ve ark., 2018). Yapısı Portland çimentosuna benzer olup trikalsiyum silikat, dikalsiyum silikat, trikalsiyum alüminat ve radyoopasite için bizmut oksit içerir (Camilleri, 2008). Yüksek biyouyumluluğu, sızdırmazlık özelliği ve dentin köprüsü oluşumunu teşvik etmesi nedeniyle pulpa tedavilerinde etkilidir (Okiji ve Yoshida, 2009). MTA, biyoaktif protein salınımı yoluyla onarımı destekler, progenitör hücre göçünü ve odontoblast benzeri hücre farklılaşmasını teşvik eder, apoptoza yol açmaz. KH ile karşılaştırıldığında, daha az inflamatuvar yanıt oluşturarak iyileşmeyi hızlandırır (Schwendicke ve ark., 2016). Ayrıca, kalsiyum iyonu salarak hidroksiapatit oluşumunu tetikler; bu yapı dentin duvarına kimyasal sızdırmazlık sağlar (Sarkar ve ark., 2005). Sitokin ekspresyonunu artırarak iyileşmeyi destekleyen bir mikroçevre oluşturur (Reyes-Carmona ve ark., 2010). Ancak, uzun sertleşme süresi, renklenme eğilimi, uygulama zorlukları ve yüksek maliyet, kullanımını sınırlandırmaktadır (Lipski ve ark., 2018).

2.4.3 Biodentine

Biodentine, trikalsiyum silikat bazlı, biyoaktif bir sementtir ve direkt pulpa kuafajında MTA ile benzer etki göstermektedir (About, 2018). Saf trikalsiyum silikat, kalsiyum karbonat ve zirkonyum oksit içerir; bizmut oksit içermemesi, renk stabilitesi ve biyouyumluluk açısından avantaj sağlar (Arandi ve Thabet, 2021). MTA'ya kıyasla daha kısa sertleşme süresi, daha kolay uygulanabilirlik ve üstün mekanik özellikler sunar. Ancak düşük radyoopasite ve kıvam ayarlama zorlukları dezavantajlarıdır.

Biodentine'in saldığı kalsiyum ve hidroksil iyonları, yüksek pH oluşturarak antibakteriyel etki sağlar ve pulpa ile materyal arasında koagülatif nekroz tabakası oluşturur bağlanmaktadır (Bhavana ve ark., 2015). Ayrıca, salınan silikon iyonları dentin köprüsü oluşumunu ve mineralizasyonu destekler (Arandi ve Thabet, 2021). Biodentine tedavileri

sonrasında düzenli odontoblast tabakası, minimal inflamasyon ve tam dentin köprüsü oluşumu gözlenmiştir (Brizuela ve ark., 2017) (Lipski ve ark., 2018).

2.4.4 BioAggregate

BioAggregate, biyolojik ve fiziksel özellikler açısından MTA'ya göre üstünlük gösteren, trikalsiyum silikat, dikalsiyum silikat, monobazik kalsiyum fosfat, amorf silikon dioksit ve tantal oksit içeren bir materyaldir (Davaie ve ark., 2021). Alüminyum ve bizmut oksit içermemesi, biyouyumluluğunu artırmakta ve inflamatuvar hücre yanıtını azaltabilmektedir (L. Zhu ve ark., 2014; Bhavana ve ark., 2015). Kök ucu dolgu materyali olarak mükemmel sızdırmazlık ve yüksek biyouyumluluk sağlamaktadır (Kim ve ark., 2016). Pulpa kaplamasında, odontoblastik farklılaşma ve mineralizasyonu MTA'dan daha fazla teşvik ettiği bildirilmiştir (S. Zhang ve ark., 2013). Ancak bazı çalışmalarda MTA'nın daha kalın dentin köprüsü oluşturduğu, BioAggregate'ın ise homojen sert doku bariyeri sağladığı belirtilmiştir. Pulpa tedavilerinde kullanım potansiyeli taşısa da, BioAggregate'ın etkinliğini destekleyen daha fazla çalışma gereklidir azaltabilmektedir (L. Zhu ve ark., 2014)

2.4.5 TheraCal LC

Orijinal MTA'nın eksikliklerinin üstesinden gelmek için, modifiye reçine bazlı MTA materyalleri geliştirilmiştir. Bu MTA'ların çoğu, tozun bileşimini veya partikül boyutunu değiştirerek kuruma süresini en aza indirmeyi amaçlamaktadır (Komabayashi ve ark., 2016). TheraCal LC, reçine bazlı bir kalsiyum silikat materyali olup, pulpa kaplama ajanı olarak ve restoratif materyallerle kullanıldığında koruyucu bir astar olarak kullanılabilir (Arandi ve Rabi, 2018). Bu materyal dördüncü nesil kalsiyum silikat materyali olarak sınıflandırılmaktadır (Dutta ve Saunders, 2017; Arandi ve Rabi, 2018). TheraCal LC'nin, insan diş pulpası hücrelerinin çoğalması ve diferansiyasyonunu tetikleyen ve yeni mineralize sert dokuların oluşumuna katkıda bulunan kalsiyum iyonları salgılayabildiği gösterilmiştir (Gandolfi ve ark., 2012). TheraCal LC, Biodentine ve MTA'nın çürük pulpa maruziyeti üzerindeki etkinliği birbirleriyle karşılaştırıldığında, TheraCal, Biodentine ve MTA arasında genel başarı oranında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Bu nedenle, TheraCal LC'nin direk pulpa kuafajı materyali olarak kullanılması önerilmiştir (Peskersoy ve ark., 2021).

2.4.6 Super MTA Patı

Son zamanlarda, reçine bazlı bir MTA materyali olan Super MTA Patı piyasaya sürülmüştür. Super MTA Patı, ışıkla sertleşmeyi gerektirmeyen bir polimerizasyon başlatıcısı olarak TBB (tribütilboran) ile birleştirilmiş Portland çimentosu içeren reçine modifiye bir MTA'dır. Super MTA Patı, pulpa kaplama materyali olarak yüksek biyouyumluluk sergilemekle birlikte, homojen bir dentin köprüsü oluşumunu teşvik edebilir. Super MTA Patı'nın açığa çıkan pulpa üzerindeki doku reaksiyonu, terapötik etkinliği açısından TheraCal LC'ye benzerdir. Kısa ve uzun vadeli klinik sonuçları desteklemek için klinik çalışmalara gereksinim vardır (Inami ve ark., 2019).

2.4.7 Çinko Oksit Öjenol (ZOE)

ZOE, kalsiyum hidroksit (KH) ve kalsiyum silikat bazlı simanlara benzer şekilde antibakteriyel özellikler göstermektedir. Ancak, içerdği öjenolün yüksek düzeyde sitotoksik olduğu bilinmektedir. Yapılan bir çalışmada, ZOE ile yapılan direk pulpa kuafajı uygulamasında, 12 hafta sonra pulpa iyileşmesi olmadığı, kronik inflamasyon gözlemlendiği ve dentin köprüsü oluşumunun gerçekleşmediği tespit edilmiştir. Bu nedenle ZOE'ün direk pulpa kuafaj ajanı olarak kullanılması önerilmemektedir (Hilton, 2009; Ho ve ark., 2006).

2.4.8 Cam İyonomer Siman ve Reçine Modifiye Cam İyonomer Siman

Cam iyonomer (CİS) ve reçine modifiye cam iyonomer (RMCİS) materyalleri asidik yapıdadır ve kalsiyum hidroksit veya kalsiyum silikat bazlı simanların sahip olduğu antibakteriyel özelliklerden yoksundur. Bu materyallerin düşük pH seviyesinin uzun süre devam etmesi pulpa dokusuna zarar verebilmektedir. Yapılan karşılaştırmalarda, KH'nin GI ve RMGI'ya göre daha iyi pulpa iyileşmesi sağladığı, ancak GI ve RMGI uygulamalarında kronik inflamasyon geliştiği ve 10 ay sonra bile dentin köprüsü oluşmadığı bildirilmiştir. Bu nedenle GI ve RMGI, direk pulpa kuafajı materyali olarak kullanımı uygun görülmemektedir (L. Chen ve Suh, 2017; Ho ve ark., 2006).

2.4.9 Propolis

Propolis, bal arıları tarafından bitki reçinelerinden toplanan doğal bir üründür. Antimikrobiyal, antienflamatuvar, antioksidan ve doku yenileyici özelliklere sahiptir; bu

etkiler flavonoidler ve kafeik asit gibi aktif bileşenlerine atfedilmektedir (Öcal ve Dayı, 2022;Gökçek ve Bodrumlu, 2015).Diş hekimliğinde özellikle restoratif, endodontik ve periodontal uygulamalarda kullanılmaktadır. Reçineli yapısı, dentin tübüllerini tıkayarak inflamasyonu azaltır. KH ile karşılaştırıldığında benzer pulpal iyileşme sağlamış, bazı çalışmalarda ise tübüler dentin oluşumunu indüklediği ve KH'ye kıyasla daha kalın dentin köprüsü oluşturduğu bildirilmiştir (Ahangari ve ark., 2011).

2.4.10 Hücre Dışı Matriks

2.4.10.1 Kolajen

Kolajen, diş hekimliği ve ortopedide doku mühendisliği ile rekonstrüktif cerrahide yaygın kullanılan, hücre dışı matrikste en bol bulunan doğal bir polimerdir. Mekanik özellikleri nedeniyle dental rejenerasyon uygulamalarında kullanıma uygundur kanıtlanmıştır (Kitasako ve ark., 2002). Mineralizasyon oluşumuna doğrudan bir uyarıda bulunmaksızın, kalsifikasyonun başlamasına yardımcı olmaktadır. Pulpa hücrelerinin göçü, adezyonu ve dentin oluşumunu teşvik eder. Kök hücrelerle yapılan çalışmalarda hücre proliferasyonunu artırdığı gösterilmiştir. Biyouyumlu ve biyoaktif yapısının yanı sıra, sentetik olarak da üretilmektedir (W. Zhang ve ark., 2006).

2.4.10.2 Hiyalüronik asit

Hiyalüronik asit, biyoaktif özelliklere sahip olup büyüme faktörleri için bir depo işlevi görür ve özellikle kırık dokusunda yoğun olarak bulunur. Ancak, düşük mekanik dayanıklılık ve yapısal karmaşıklık, başlıca dezavantajlarıdır (V. Rosa ve ark., 2016). Odontoblastlar ve fibroblastlar üzerinde yapılan karşılaştırmalı bir çalışmada, KH ve dentin adezivlerine kıyasla daha düşük toksisite gösterdiği ve mineralizasyonu desteklediği bildirilmiştir (Bogović ve ark., 2011). Ayrıca, sıçan modelinde yapılan bir çalışmada, yüksek molekül ağırlıklı hiyalüronik asit ile tamir dentini oluşumu ve pulpa merkezine doğru ilerleme gözlenmiştir (Sasaki ve Kawamata-Kido, 1995).

2.4.11 Bitkisel Materyaller

2.4.11.1 Kurkumin

Zencefil bitki ailesine ait *Curcuma longa* bitkisinden elde edilen sarı renkli fenolik bir pigment olan kurkumin, FDA tarafından “genel olarak güvenli” kabul edilen bitkisel bir

bileşiktir (Hewlings ve Kalman, 2017). Antienflamatuvar, antimikrobiyal ve antikanser etkileri bulunmaktadır (Basnet ve Skalko-Basnet, 2011). Dental alanda, özellikle vital pulpa tedavilerinde antimikrobiyal ajan olarak kullanımı önerilmektedir ((Sinjari ve ark., 2019). Mavi LED ışıkla birlikte kullanımının enfekte dentin çürüklerindeki antimikrobiyal etkisini artırdığı gösterilmiştir edilmiştir (Cusicanqui Méndez ve ark., 2018)..

2.4.11.2 Aloe vera

Aloe vera bitkisi antienflamatuvar, antimikrobiyal ve antioksidan özellikleri ile bilinir (Guo ve Mei, 2016). Fibroblastları uyarak pulpa iyileşmesini olumlu desteklediği bildirilmesine rağmen Aloe vera'nın, dental pulpa fibroblastları ile yapılan bir çalışmada, düşük sitotoksositeye rağmen yüksek genotoksosite gözlemlenmiştir (Carvalho ve ark., 2018). Aloe vera'nın KH ile karşılaştırıldığı hayvan modelinde, biyouyumlu olduğu ve tamir dentini oluşumunu desteklediği rapor edilmiştir edilmiştir (Gala-García ve ark., 2008).

2.4.12 İloprost

Bir prostasiklin analogu olan İloprost, VEGF salımını uyarak anjiyogenez ve hücrel farklılaşmayı artırmaktadır. Osteo/odontojenik belirteçler ile anjiyojenik faktörlerin ekspresyonunu teşvik ederek tamir dentini oluşumunu indüklediği gösterilmiştir. Pulpal doku üzerinde yapılan deneysel bir çalışmada, İloprost uygulaması sonrasında VEGF, PDGF, FGF-2 ve mRNA ekspresyonunun doza bağlı olarak arttığı ve buna bağlı olarak anjiyogenez ile kan akımının hızlanarak rejenerasyonu desteklediği bildirilmiştir. Ayrıca, İloprost'un KH'ye kıyasla tersiyer dentin oluşumunu daha etkin şekilde indüklediği rapor edilmiştir.

2.5 PROSTANOİDLER

Prostanoidler, yirmi karbonlu yağ asitlerinden türeyen oksitlenmiş lipid aracı moleküller olup eikosanoid ailesinin bir üyesidir. Prostaglandinler 1960'ta izole edilmiş ve kimyasal olarak karakterize edilmiştir. Bu alandaki öncü çalışmaları nedeniyle Bengt Samuelsson, Sune Bergström ve John Vane, 1982 yılında Nobel Fizyoloji ve Tıp Ödülü'ne layık görülmüştür (Bergstroem ve Samuelsson, 1965). Prostanoidler, bağışıklık yanıtlarının düzenlenmesi, kardiyovasküler homeostaz, tümör oluşumu ve gastrointestinal sistem

bütünlüğü gibi birçok fizyolojik ve patofizyolojik süreçte önemli düzenleyici roller üstlenmektedir (M. T. Wang ve ark., 2007).

2.5.1 Prostanoid Biyosentezi

Prostanoidler, hücre zarlarında bulunan fosfolipidler içerisinde yer alan araşidonik asit (AA)'ten türetilen lipid mediatörleridir. Bu sürece aktifleşmiş fosfolipaz A₂ (PLA₂) enziminin AA'yı serbestleştirmesiyle başlar. Serbest bırakılan arşidonik asit (AA), ardından siklooksijenazlar (COX) tarafından halkalaşması katalizlenerek protaglandin G₂ (PGG₂) oluşumu sağlanır. Daha sonra, peroksidaz aktivitesi PGG₂'yi reaktif ara ürün olan prostaglandin H₂ (PGH₂)'ye dönüştürür. Dokuya özgü prostaglandin sentazlar veya izomerazlar, PGH₂'yi biyolojik olarak aktif prostaglandinlere (PGD₂, PGE₂, PGF₂ α ve prostasiklin olarak da bilinen PGI₂) ve tromboksan A₂'ye (TxA₂) dönüştürür. Bu prostanoidler yarı ömürlü olup lokal mikro çevrede etki göstermektedirler. Etkilerini, özgül G protein bağlı reseptörler aracılığıyla gerçekleştirirler (M. T. Wang ve ark., 2007). Bu reseptörler, dokuya özgü dağılım ve sinyal yolları açısından farklılık göstererek prostanoidlerin otokrin ve parakrin yollarla çeşitli biyolojik işlevleri yerine getirmesini sağlamaktadır

2.5.2 Prostasiklin (Prostaglandin I₂, PGI₂),

Prostasiklin olarak da bilinen Prostaglandin I₂ (PGI₂), ilk kez 1976 yılında keşfedilmiştir. Araşidonik asit türevlerinden sentezlenen lipid mediatörler olan prostanoidler ailesine aittir (Moncada ve ark., 1976). Diğer prostaglandinler gibi, PGI₂ de 20 karbonlu doymamış bir karboksilik asit yapısına sahiptir ve bir siklopentan halkası içer (Szymanska ve Blitek, 2023). Biyosentezinde prostaglandin endoperoksid sentaz enzimi araşidonik asidi kararsız bir ara ürün olan prostaglandin H₂'ye (PGH₂) dönüştürür. Ardından, membrana bağlı PGI₂ sentaz (PTGIS) enzimi, PGH₂'yi yeniden düzenleyerek PGI₂ sentezini gerçekleştirir. PTGIS, temel olarak endotel ve düz kas hücrelerinde lokalize olmakla birlikte, organizmanın diğer çeşitli hücre tiplerinde de eksprese edilmektedir (Stitham ve ark., 2011).

Baskın olarak endotel hücreleri tarafından araşidonik asit metabolizmasının başlıca ürünü olarak sentezlenen PGI₂, hedef hücrelerde, PGI₂'ye özgü G proteini bağlı reseptör olan PTGIR aracılığıyla biyolojik etkisini gösterir. PTGIR, tipik bir yedi transmembran bölgeye

sahip reseptördür ve PGI₂ ile etkileşime girdiğinde, Gs alt birimi vasıtasıyla adenilat siklazin aktive olmasına yol açar; bu da hızlı bir şekilde cAMP oluşumunu sağlar. Bu klasik PGI₂ sinyalizasyonu, vasküler fonksiyonların düzenleyerek, düz kaslardaki damar hücrelerinin vazodilatasyonunu teşvik ederek ve trombosit agregasyonunu inhibe ederek (anti-trombotik) kardiyovasküler sistemde görev almaktadır (Szymanska ve Blitek, 2023). Bunun yanı sıra, antiproliferatif, sitoprotektif özelliklere sahiptir (K. K. Wu ve Liou, 2005). Bu özellikleri sayesinde kardiyovasküler sistemde hayati bir rol oynamaktadır (Kawabe ve ark., 2010).

Güçlü bir kemoatraktan ve anjiyojenik molekül olan PGI₂'nin birçok hücre tipinde VEGF ekspresyonunu indükleyerek hücre çoğalmasını ve anjiyogenezi arttırdığını (Limjeerajarus, Osathanon, ve ark., 2014; Kamio ve ark., 2008) ve kemiğin yeniden şekillenmesini etkilediği bildirilmiştir (Kamio ve ark., 2008). Yapılan çalışmalarda PGI₂ sentaz geninin genetik olarak silinmesi, kemik oluşumunun bozulmasına neden olur, bu da PGI₂'nin sert dokunun yeniden şekillendirilmesinde rol oynadığını gösterilmektedir (G. T. J. Huang ve ark., 2010). PGI₂, fizyolojik pH koşullarında kararsız bir yapıya sahip olduğundan, in vivo ortamda yaklaşık 2–3 dakika gibi oldukça kısa bir etki süresine sahiptir (Moncada ve Vane, 1978).

2.5.3 Prostosiklin analogu İloprost

İloprost, genel formülü (16R,S)-metil-18,18,19,19-tetradehidro-6a-karbaprostaglandin I₂ olan bir prostasiklin analogudur. İloprost uzun etkili, sentetik, güçlü, kısa ömürlü bir prostasiklin analogudur ve PGI₂ ile aynı farmakodinamik etkilere sahiptir (Wahyudi ve ark., 2023). PGI₂'ye benzer şekilde, İloprost'un vazodilatör ve antitrombosit etkileri vardır, ancak PGI₂'den daha stabil olup, daha uzun bir yarı ömre (20–30 dakika) sahiptir ve daha iyi çözünürlük gösterir (Schillinger ve ark., 1986).

Prostasiklin analogu İloprost, trombosit aktivasyonunun güçlü ve geniş etki profiline sahip bir inhibitörüdür. Periferik vasküler iskemik hastalığı olan hastada 2 ng/kg/dk'ya kadar İloprost infüzyonu uygulanarak trombosit agregasyonunun önemli ölçüde inhibisyonu kaydedilmiştir ve infüzyon durduğu zaman İloprost'un etkisi önemli ölçüde azalmaktadır. İloprostun antiagregan etkisi, trombosit yüzeyindeki reseptörlerin adenil siklazı aktive etmesi yoluyla gerçekleşir. Bu aktivasyon, hücre içi siklik adenosin monofosfat (cAMP) düzeylerini artırarak fosfolipaz aktivitesini ve sitozolik kalsiyum konsantrasyonunu düşürür; böylece trombosit agregasyonunu inhibe eder (Hassoun, 2009).

İloprost, dokulara kan akışının azalmasıyla karakterize edilen hastalıkların klinik tedavisinde kullanılan sentetik bir prostasiklin analogu olup vasküler düz kas hücrelerinde vazodilatasyonu uyarır ve aynı zamanda anjiyogenezi teşvik eder (Hoeper ve ark., 2008; Limjeerajarus ve ark., 2014). Kan damarlarının genişlemesini uyararak kanın akış hızını azaltır ve kanın hasarlı dokulara tekrar ulaşmasını sağlar. İloprost, araşidonik asit, tromboksan A2 analogu, anjiyotensin II ve fenilefrin tarafından tetiklenen vazokonstriksiyonu inhibe etme kapasitesine sahiptir ve bu aynı zamanda insanlarda periferik damar direncini ve ortalama arteriyel kan basıncını azaltabilmesini sağlamaktadır. Böbrek kan akışını artırdığı da bildirilmiştir (Hassoun, 2009).

Yapılan çalışmalarda İloprost, fibroblastlardan VEGF salımını uyarmış ve endotel hücrelerinin çoğalmasına neden olmuştur. Bununla birlikte İloprost'un ekzojen uygulanması monositler, dendritik hücreler ve makrofajlar tarafından VEGF üretimini artırmaktadır (Kamio ve ark., 2008; Nakalekha ve ark., 2010). İloprost infüzyonundan sonra hastaların dolaşımlarındaki endotel hücrelerinin ve progenitörlerinin seviyelerinin arttığı da gösterilmiştir (Tinazzi ve ark., 2010). İloprost tedavisi recindesü bu hücrelerde ICAM-1, BCL2 ve VEGF ekspresyonunu da artırmaktadır (Tinazzi ve ark., 2010). Tüm bu veriler İloprost'un anjiyogenez üzerindeki destekleyici etkisini göstermektedir.

Son zamanlarda prostasiklinin anti-inflamatuvar özelliklere sahip olduğu gösterilmiştir. İloprost'un, insan periferik mononükleer hücrelerinde ve kemik iliği kaynaklı dendritik hücrelerde LPS kaynaklı proinflamatuvar sitokin TNF-a üretimini azaltarak anti-inflamatuvar etkilere sahip olduğu gösterilmiştir (Zhou ve ark., 2007). İloprost tarafından azaltılan diğer pro-inflamatuvar sitokinler, interlökin-12 (IL-12), interlökin-1 alfa (IL-1a) ve Interlökin-6'dır (IL-6). Ayrıca anti-inflamatuvar sitokinlerin (IL-10) ekspresyonunu artırır.. Bu etki, hücre içi cAMP'nin IP'ye bağlı yukarı regülasyonu ve ayrıca NF-kB aktivitesinin sinyal ekseninin engellenmesiyle modüle edilir (Müller ve ark., 2010).

İloprost'un farmakodinamik profilinin bir diğer önemli özelliği sitoprotektif (hücre koruyucu) etkisidir. Farelerde yapılan bir çalışmada, İloprost'un parasetamole nedeniyle oluşan karaciğer hasarı gibi bağlı toksik etkiler karşısında sitoprotektif özelliğe sahip olduğunu kanıtlamıştır (Nasseri-Sina ve ark., 1992). İloprost ayrıca klinik olarak kemik nekrozunu önlemek için de kullanılmaktadır (Jäger ve ark., 2011).

2.5.3.1 İloprost'un klinik kullanımı

Prostasiklin, kan damarlarının istenmeyen tıkanmasını veya daralmasını ortadan kaldırabildiği ve arterlerden daha fazla kan akmasını sağlayabildiği için iskemi nedeniyle oluşan ülserasyonun iyileşme sürecine yardımcı olabilmektedir (McHugh ve ark., 1988). Bu özellikleri nedeniyle İloprost, Reynaud hastalığı, tromboanjitis obliterans ve diyabetik anjiyopati veya periferik aterosklerotik obliteratif hastalığı gibi periferik vasküler hastalıklarda yaygın olarak kullanılmaktadır (Loureiro ve ark., 2007).

2.5.3.2 İloprost'un dental pulpa kök hücreleri üzerindeki etkisi

Yakın zamanda yapılan çalışmaların sonuçlarına göre İloprost'un direk pulpa kuafajı tedavilerinde potansiyel bir ajan olarak kullanılabileceği düşünülmektedir. İloprost'un, dental pulpa kök hücrelerinde VEGF, fibroblast büyüme faktörü-2 ve trombosit türevli büyüme faktörünün mRNA ekspresyonunu artırarak anjiyojenik farklılaşmayı indükleyebildiği gösterilmiştir (Limjeerajarus ve ark., 2014). Ayrıca insan dental pulpa hücrelerinin migrasyonunu hızlandırdığı (Seang ve ark., 2019), (Jearanaiphaisarn ve ark., 2018) ve diş organ kültüründe kılcal damarlanmayı artırarak anjiyogenezi teşvik ettiği (Seang ve ark., 2018), dental pulpada kan akışını indüklediği ve in vivo olarak dentin oluşumunu artırdığı bildirilmiştir (Limjeerajarus, Chanarattanubol, ve ark., 2014; Limjeerajarus ve ark., 2019; Limjeerajarus, Osathanon, ve ark., 2014). İloprost IL-6 ve IL-12 ekspresyonunu azaltarak dental pulpa kök hücreleri üzerinde anti inflamatuvar etki göstermiştir (Wahyudi ve ark., 2023). İloprost'un sıvı formda kullanılması, işlevlerini ve hedef bölgeye dağıtımını sınırlandırmakta ve klinik kullanımda diş biyomateryali olarak kullanımını daha fazla araştırmak için optimal bir dağıtım sisteminin geliştirilmesine gereksinim duyulmaktadır (Limjeerajarus ve ark., 2019), (Stitham ve ark., 2011). İloprost ve MTA'nın birleştirildiği çalışmalarda daha düzenli yapıda dentin tübüllerinin meydana geldiği ve osteojenik farklılaşma potansiyelini önemli ölçüde iyileştirdiği görülmüştür (Almeshari ve ark., 2021, 2022). Bununla birlikte, klinik kullanım için İloprost'un kontrollü ve uzun süreli salımını sağlayabilmek için PLGA ve poloksamer gibi hidrojellerle birleştirilerek yapılan çalışmalarda İloprost'un etki süresinin uzatıldığı sonuçlar elde edilmiştir (Limjeerajarus ve ark., 2019, 2020).

2.6 HİDROJELLER

1960'larda O. Wichterle ve D. Lim tarafından geliştirilen polyhydroxyethylmethacrylate (HEMA) hidrojel, tipik hidrojel özellikleriyle tanımlanan ilk çapraz bağlanmış ağ malzemesidir (Wichterle ve Lím, 1960). Hidrojeller, monomerlerin fiziksel veya kimyasal çapraz bağlanmasıyla oluşan, çapraz bağlı hidrofilik polimerlerden meydana gelen üç boyutlu polimer ağlarıdır ve biyolojik uygulamalarda yaygın olarak kullanılan materyallerdir (Amoli ve ark., 2022).

Polimer ağlarının hidrofilik bölgeleri, su ile etkileşime girerek hidrasyona uğrar ve bu sayede üç boyutlu ağ yapıları içerisinde yüksek miktarda suyu absorbe edebilir. Bu yapı, hidrojelleri diğer biyomalzemelerden ayıran temel özelliklerden biridir (Liu ve ark., 2023). Su emilimini etkileyen başlıca etkileşimler arasında kılcal kuvvetler, osmotik basınç ve hidrasyon kuvvetleri yer almakta olup, bu kuvvetler çapraz bağlı polimer zincirleri tarafından uygulanan karşı kuvvetlerle dengelenmektedir (Buwalda ve ark., 2014). Yüksek su içeriğine sahip olmaları, hidrojellere biyolojik dokulara benzer fiziksel özellikler kazandırır. Bu da onlara mükemmel biyoyumluluk, biyobozunurluk, porozite, viskoelastisite ve hidrofiliklik gibi üstün biyomalzeme özellikleri kazandırmaktadır (W. Chen ve ark., 2024). Ayrıca, yumuşak ve esnek yapıları, çevre dokularda oluşabilecek hücrel inflamatuvar yanıtları en aza indirir (Buwalda ve ark., 2014).

Hidrojellerin biyoyumlu yapıları, onları vücut içi uygulamalar için ideal hale getirmektedir. Gözenekli yapıları, hücre büyümesi ve çeşitli biyolojik süreçlerin gerçekleşmesi için gerekli mikro ortamı sağlar. Viskoelastik özellikleri, doğal dokuların mekanik özelliklerini taklit etmelerine olanak tanırken; yüksek hidrofiliklikleri, su ve biyolojik sıvılarla etkileşimlerini artırarak biyolojik entegrasyonlarını kolaylaştırır (Buwalda ve ark., 2014).

Hidrojellerin üç boyutlu ağ yapısının, hücre dışı matriks (ECM) ile yüksek düzeyde benzerlik göstermesi dikkat çekicidir. Bu yapı, hücreler için doğal mikroçevreye benzer bir ortam sunarak hücre proliferasyonu ve farklılaşmasını destekleyebilir (Buwalda ve ark., 2014). Bu özelliklerine ek olarak, kolayca şekil değiştirebilme ve biyoyumluluk özelliğine sahip bir malzeme olarak hem ilaç taşıma hem de doku rejenerasyonu alanlarında mükemmel performans sergilemektedir (J. Yang ve ark., 2023). İlaç salım sistemlerinde özellikle sıcaklık ve pH gibi çevresel uyaranlara duyarlı “akıllı” hidrojeller, kontrollü şişme ve ilaç

salım profilleri sayesinde öne çıkmaktadır (Buwalda ve ark., 2014). Diş hekimliği alanında da ağız hastalıklarının tedavisi ve oral doku rejenerasyonu gibi uygulamalarda hidrojel bazı yaklaşımlara yönelik ilgi artmış, özellikle uyaranlara duyarlı hidrojel sistemleri üzerine son yıllarda yoğun araştırmalar yürütülmüştür (A. Chen ve ark., 2023). Hidrojeller içerdikleri polimerlerin kaynağına göre doğal ve sentetik olarak sınıflandırılabilirler. Ayrıca hidrojel sistemleri, polimerik bileşimlerine, kökenlerine, fiziksel görünümüne, konfigürasyonlarına, çapraz bağlanma türlerine veya elektrik yüklerine göre de sınıflandırılabilmektedirler (Abbass ve ark., 2020), (Khan, Arbab, ve ark., 2023).

2.6.1 Doğal ve Sentetik Hidrojellerin Karşılaştırılması

2.6.1.1 Doğal hidrojeller

Doğal hidrojeller, hayvansal proteinlerden elde edilen kolajen ve jelatini, hayvan epitelinde ve bağ dokusunda yaygın olarak bulunan HA'yı, yosun ve deniz yosunlarının sitoplazmasından ve hücre duvarından elde edilen aljinatı içermektedir. Doğal polimerler esas olarak kollajen, fibrin, kitosan, aljinat veya hyaluronik asittir (Abbass ve ark., 2020). Bu biyomalzemeler toksik değildir, son derece biyogüvenilir ve biyouyumludur, bu da onları çeşitli biyomedikal uygulamalar için uygun hale getirmektedir (A. Chen ve ark., 2023). Doğal hidrojeller iyi biyouyumluluk ve biyobozunurluğa sahiptir, ancak zayıf mekanik özellikleri, kontrol edilemeyen bozulma oranları ve immün reaksiyona sebep olma potansiyelleri pratik uygulamalarını sınırlamaktadır (A. Chen ve ark., 2023). Bununla birlikte, doğal polimer bazı hidrojeller, doğal dokuları taklit etme yetenekleri ile karakterize edilseler de zayıf mekanik özellikleri nedeniyle kolayca geri dönüşümsüz olarak zarar görebilmektedir (Abbass ve ark., 2020).

2.6.1.2 Sentetik hidrojeller

Sentetik olanlar polilaktik asit (PLA) bazı hidrojeller, polidimetilsiloksan, polietilen glikol (PEG) veya kendi kendine birleşen peptitlerdir (Abbass ve ark., 2020). Sentetik hidrojeller, adından da anlaşılacağı gibi kimyasal reaksiyonlarla oluşturulur. Zayıf mekanik özelliklere, kararlılığa ve düşük bakteri öldürücü etkinliğe sahip doğal hidrojellerle karşılaştırıldığında, sentetik polimer hidrojeller yüksek moleküler ağırlığa ve kararlı mekanik özelliklere sahiptirler. Ayrıca, sentetik hidrojellerin yapısal morfolojisi amaçlanan işlevselliklerine ve parçalanabilirliklerine göre uyarlanabilmektedir. Bu nedenle, düşük parçalanabilirlik, etkili

jel oluşumu ve uzun raf ömrü gibi avantajlarla tasarlanabilmektedirler. Ancak, sentetik polimer hidrojel­ler tipik olarak antimikrobiyal değildir ve antimikrobiyal işlem gerektirmektedir (R. Wang ve ark., 2021). Günümüzde, sentetik hidrojel­ler genellikle PLA, PEG ve GelMA gibi doğal kaynaklardan elde edilen sentetik polimerlerden yapılmaktadır. Ancak, sentetik polimer hidrojel­ler biyouyumlu değildir ve biyolojik olarak parçalanmaz, bu da onları destekleyici hücreler için uygunsuz hale getirmektedir (Tavelli ve ark., 2020). Sentetik olanlar ise önemli ölçüde daha yüksek mekanik özelliklere ve ayarlanabilir fizikokimyasal özelliklere sahiptir, ancak doğal doku benzerliğinden yoksundurlar (Abbass ve ark., 2020). Polikaprolakton (PCL), polietilen glikol (PEG), Pluronic (poloksamer) ve benzeri sentetik polimerler genellikle daha güçlü mekanik özelliklere sahiptir ancak daha iyi biyolojik işlevsellik elde etmek için sıklıkla yüzey modifikasyonu gerektirmektedir (Liu ve ark., 2023).

Farklı doğal veya sentetik polimerler, daha iyi lokal ilaç dağıtımını sağlamak için enjekte edilebilir, sıcaklığa duyarlı, yapışma ve diğer özelliklere sahip olanlar da dahil olmak üzere hidrojel­ler oluşturmak için kimyasal veya fiziksel olarak çapraz bağlanabilir (Liu ve ark., 2023). Kimyasal çapraz bağlanma fonksiyonel gruplar arasında kovalent bağlar oluşturarak farklı polimer moleküllerini birbirine bağlar ve bunlar genellikle yüksek oranda çapraz bağlanmaya sahip olduğu için daha güçlü mekanik özelliklere sahiptir (Liu ve ark., 2023). Ancak çapraz bağlayıcıların toksisitesinin dikkate alınması gerekir (Liu ve ark., 2023). Buna karşılık, fiziksel çapraz bağlanan hidrojel­ler esas olarak kovalent olmayan etkileşimlerle jelleştirilir; bunlar çapraz bağlayıcılara ihtiyaç duymadıklarından ancak nispeten daha düşük fiziksel özelliklere sahip olduklarından sentezlenmesi daha kolaydır (Liu ve ark., 2023).

2.6.2 Oral ve Maksillofasial Bölgede Kullanılan Hidrojel­ler

Hidrojel­ler, hassas biyoaktif bileşiklerin veya canlı hücrelerin kapsüllenmesi için üç boyutlu (3B) matriksler oluşturabilmektedir. Çeşitli doğal ve sentetik hidrojel­lerin kombinasyonu, kraniyofasiyal ve oral dokuların rejenerasyonu ve onarımı için umut vaat etmektedir. Oral ve maksillofasiyal hastalıklarda hidrojel­lerin topikal ilaç salımı üzerine yapılan çalışmalarda ilaç salımı için taşıyıcı olarak hidrojel­ler kullanılmış, bunlar ya ilacı doğrudan taşımış ya da ilacı içeren nanopartikülleri taşıyarak ilacın sürekli salımını sağlamıştır (Alavi ve ark., 2022). Bu alanda yapılan çalışmalarda, hidrojel sistemlerinin topikal uygulamasını kolaylaştırmak veya belirli uyarılar altında ilaçların kontrollü salımını sağlamak için enjekte

edilebilirlik, yapışma, pH duyarlılığı vb. gibi farklı özelliklere sahip hidrojel sistemleri araştırılmıştır (Norouzi ve ark., 2016).

Oral ve maksillofasiyal bölgede topikal ilaç uygulama çalışmaları için en yaygın kullanılan hidrojel matrisi, kimyasal veya fiziksel çapraz bağlama ile oluşturulan enjekte edilebilir hidrojellerdir (Kondiah ve ark., 2016). Enjekte edilebilir hidrojeller, belirli bir geometriyle sınırlı olmadıkları ve düzensiz kök kanallarını, periodontal cepleri, kemik yapısındaki bozukluklar vb. doldurmak için uygun oldukları için ilaç iletimi alanında yaygın olarak kullanılmaktadırlar (Fan ve ark., 2022). Özellikle, bazı enjekte edilebilir hidrojeller sıcaklık, ışık ve pH gibi uyaranlara yanıt olarak bir sol-jel geçişi sergiler. Bunlar arasında, enjekte edilebilir sıcaklığa duyarlı hidrojeller, genellikle düşük sıcaklıklarda enjekte edilebildikleri ve vücut sıcaklığında hızla jele dönüşebildikleri için en yaygın kullanılan hidrojel sistemlerinden biridir (Q. Wang ve ark., 2019).

2.6.3 Dental Pulpa Hastalıklarında Hidrojellerin Kullanılması

Son yıllarda pulpanın vitalitesinin daha fazla korunması ve yeniden yapılandırılması amacıyla pulpa rejenerasyonu ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır (Schmalz ve ark., 2020). Farklı bileşimlere sahip hidrojeller, özellikle kök kanalı içindeki dar alana uygun enjekte edilebilir özelliklere sahip olanlar, geniş ölçüde uyarlanabilir özelliklere sahip olduğundan, birçok çalışma, kanal içi ilaç dağıtımı için taşıyıcı olarak hidrojelleri seçmiş ve bunların pulpa kuafajı, kök kanalı dezenfeksiyonu ve pulpa rejenerasyonundaki uygulamalarını araştırmışlardır (Matoug-Elwerfelli ve ark., n.d.) (Samiei ve ark., 2021).

2.6.3.1 Pulpa kuafajı

Pulpa, çürük veya travma nedeniyle açığa çıktığında tersiyer dentin birikimini artırmak için pulpa kuafaj ajanları ile kaplanabilir (Whitehouse ve ark., 2021). Tarihsel olarak, kalsiyum hidroksit pulpa kuafajı için altın standart olmuştur, ancak başka materyallerin uygulanması için birçok çalışma yapılmıştır. Komabayashi ve ark. direk kuafaj malzemeleri üzerine, ışıkla sertleşen PEGMC hidrojeline kalsiyum hidroksit yükleyerek kontrollü kalsiyum iyon salımı sağlamışlar ve hidrojinin adeziv sistemler ile benzer bir sitotoksositeye sahip olduğunu görmüşlerdir (Komabayashi, Wadajkar, ve ark., 2016). Yapılan çalışmada daha iyi biyouyumluluğa sahip hidrojel sistemlerini araştırmak için kalsiyum fosfat nanopartikülleri içeren enjekte edilebilir bir karboksimetil-kitosan ve glisidil eter hidrojelini ekspozit olan diş

pulpasının korunmasındaki rolünü araştırarak hidrojel sisteminin biyouyumlu olduğunu ve kalan diş pulpası kök hücrelerinin çoğalmasını ve farklılaşmasını teşvik etmede yararlı bir etkiye sahip olduğunu göstermiştir (Osmond ve Krebs, 2021). Wu ve ark. tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, hidrojel kuafaj materyaline kalsiyum iyonlarına ek olarak büyüme faktörleri de entegre edilmiştir. Bu kapsamda, vasküler endotelial büyüme faktörünün (VEGF) sürekli salımını sağlamak ve dental pulpa kök hücrelerinin odontojenik farklılaşmasını teşvik etmek amacıyla, kitosan/beta-gliserofosfat bazlı bir hidrojele VEGF yüklenmiştir. Çalışmada, bu sistemin pulpotomi sonrası pulpa örtülmesinde potansiyel yararları değerlendirilmiştir (S. Wu ve ark., 2019).

2.7 SICAKLIĞA DUYARLI HİDROJELLER

Sıcaklığa duyarlı hidrojeller, ortam sıcaklığındaki değişimlere geri dönüşümlü olarak yanıt verebilen sistemlerdir. Bu özellik bu hidrojellere, belirli bir sıcaklık aralığında sol fazdan jel fazına geçebilme özelliği kazandırmaktadır. Sıcaklık tarafından uyarıldığında, sıcaklığa duyarlı yüksek moleküler polimerler, dağınık misel durumundan yoğun üç boyutlu ağ yapılarına geçmektedir.

2.7.1 Sıcaklığa Duyarlı Hidrojellerin Fizikokimyasal Özellikleri

2.7.1.1 Mekanik özellikleri

Hidrojeller, iki farklı mekanik davranış türü sergileyebilen polimerik materyallerdir (vizkoelastik ve elastomerik). Bu özellikler, hidrojin şişme oranıyla yani ne kadar su emdiğiyle belirlenir; örneğin, eğer hidrojin şişme oranı düşükse, elastomerik özellikler sergilerken, yüksek bir şişme oranı vizkoelastik özellik gösterir. Doğal olarak, polimerlerin mekanik dayanımı düşüktür; ancak araştırmacılar, ilaç taşıma uygulamalarında kullanılmak üzere sıcaklığa duyarlı hidrojellerin mekanik özelliklerini ayarlamak için farklı matriks ve takviye materyalleri üzerinde deneyler yapmışlardır (Rahimnejad ve Zhong, 2017).

2.7.1.2 Adezyon

Adezyon, biyomalzemelerin canlı dokularla etkileşimini ve biyolojik uyumunu belirleyen temel özelliklerden biridir. Adezyon derecesini malzemenin iç yapısı ve kimyasal bağ yapma kapasitesi belirler. Ancak hidrojeller, çekirdeklerinde yüksek oranda su içermeleri nedeniyle, genellikle zayıf yapışma özellikleri sergiler. Aşırı su Emilimi, hidrojel ile

uygulandığı alt zemin arasında bağlanmayı zayıflatmakta ve bu iki yüzey arasında boşluk oluşmasına neden olmaktadır. Bu durum, adezyonun etkinliğini sınırlayan önemli bir dezavantajdır (Rahimnejad ve Zhong, 2017). Ayrıca, su moleküllerinin hidrojel adeziv bölgeleriyle hidrojen bağları oluşturmaları, hidrojel ile hedef substrat arasındaki yüzeyler arası etkileşimi azaltmaktadır. İnsan doku ve organlarının nemli ve hassas yüzeylere sahip olması, bu durumu daha da karmaşık hale getirmekte ve hidrojellerin biyomedikal uygulamalardaki etkin adezyonunu sınırlamaktadır (Khan, Arbab, ve ark., 2023). Araştırmacılar, hidrojel adezyon sorunlarının üstesinden gelebilmek için çeşitli stratejiler geliştirmiş ve hidrojel sentezi öncesinde hedef yüzey dokusunun özelliklerini dikkate almışlardır (Bölgen ve ark., 2015). Hemen hemen tüm biyomedikal uygulamalarda hücre-doku ve yüzey dokusu etkileşimi temel bir gerekliliktir. Bu bağlamda, sıcaklığa duyarlı hidrojeller, doğal yapışkanlık özelliği gösteren termopolimer içerikleri sayesinde, geleneksel hidrojellere kıyasla daha yüksek adezyon kabiliyeti sergilemiştir (Khan, Arbab, ve ark., 2023; Stetsyshyn ve ark., 2020). Dolayısıyla, sıcaklığa duyarlı hidrojeller, geleneksel hidrojel sistemlerindeki yetersiz adezyon problemini aşmak için umut vadeden bir alternatif olarak değerlendirilmektedir (Khan, Arbab, ve ark., 2023).

2.7.1.3 Faz geçişi

Faz ayrımı, polimer çözeltisinin belirli bir sıcaklığın (kritik çözünme sıcaklığı, CST) üzerinde veya altında olduğunda meydana gelir. Bu faz ayrımı, polimer zincirleri arasındaki hidrofobik etki nedeniyle olur, bu nedenle polimer, bir hidrojel oluşturmak üzere sulu çözeltide kendiliğinden bir araya gelir ve toplanır (Fan ve ark., 2022). Faz geçişi, malzemelerin dış uyaranlara maruz kaldıklarında fiziksel durumlarını değiştirdiği bir mekanizmadır. Bu özellik, sıcaklığa duyarlı hidrojellerin en ayırt edici özelliklerinden biridir. Temel mekanizma, zayıf bağların (hidrojen bağları, iyonik etkileşimler, Van der Waals kuvvetleri ve hidrofobik bağlar) ayrışmasını içerir ve bu durum, sol-jel veya tam tersi yönde bir faz geçişi ile sonuçlanır. Ayrıca, kopolimerlerin fonksiyonel grupları da hidrojel faz değişimini etkiler (Stetsyshyn ve ark., 2020)..

Sıcaklığa duyarlı hidrojel faz geçiş özellikleri, kullanılan polimerlerin türüne bağlı olarak, UCST (Üst Kritik Çözünme Sıcaklığı) ve LCST (Alt Kritik Çözünme Sıcaklığı) gibi özelliklerle belirlenir (Qiao ve ark., 2022). Faz ayrımı sırasında düşük ve yüksek kritik çözünme sıcaklıkları sırasıyla LCST ve UCST olarak temsil edilir. LCST, alt kritik çözelti

sıcaklığı olarak tanımlanmıştır; yani, termal olarak duyarlı polimerlerin faz geçişi, bu sıcaklığın üzerindeki bir ortamda meydana gelir ve malzeme düşük sıcaklıkta çözünür; LCST'nin üzerinde ısıtıldığında, moleküller çözeltiden çökelir ve sol-jel faz geçişine uğrar. UCST, üst kritik çözelti sıcaklığı olarak tanımlanmıştır; yani, termal olarak duyarlı polimerlerin faz geçişi, bu sıcaklığın altındaki bir ortamda meydana gelir ve malzeme düşük sıcaklıkta çözünmez; UCST'nin üzerinde ısıtıldığında, malzeme çözünür. LCST'ye sahip ısıya yanıt veren polimerler, bu polimerlerin yalnızca LCST'nin üzerinde hidrojel oluşturabilmesi ve bu sıcaklığın insan vücut sıcaklığına daha yakın olması nedeniyle iyi biyomedikal uygulama potansiyellerine sahiptir. Kara sakızı, nişasta, agaroz ve soğuk yapıştırıcı içeren ısıya yanıt veren polisakkaritlere sahip polimerlerin bir UCST'si vardır ve fizyolojik sıcaklıkta yanıt veremezler. LCST'de polimer çözünür ve sıvı formda bulunur. LCST'de daralma başlar, hidrofobik ve çözünmez hale gelir, bir hidrojel oluşturur. Daha spesifik olarak, kritik sıcaklığa yakın polimerler çözünür formdan çözünmez formuna bir faz değişikliği gösterir (Fan ve ark., 2022).

Moleküler düzeyde, ısıya yanıt veren polimerlerin hidrofobik molekülleri yüksek sıcaklıklarda etkileşime girer ve polimer zincirinde çöken su moleküllerine maruz kalır ve bir hidrojel oluşturmak üzere şişer. Termodinamik olarak, sol-jel durumundaki faz ayrımı geçişi, özgürlük nedeniyle yeniden konumlandırılır. Serbest enerji birliği, entalpi, entropi ve sıcaklıkla ($\Delta G = H - T\Delta S$) değişir çünkü pozitif entalpi terimi ΔH , entropi terimi ΔS 'den daha küçüktür. Sıcaklık artışı, $T\Delta S$ 'de bir artışa yol açar; negatif bir ΔG değeri, polimer zincirlerinin birliğini destekler.

2.7.1.4 İlaç salım özelliği

Geleneksel olarak, farklı hastalıkların tedavisinde oral ve intravenöz ilaç uygulama yöntemleri kullanılmaktadır. Bu yöntemlerin günümüzde hala etkili olduğu düşünülmekle birlikte, kontrollü ilaç salımının sağlanamaması gibi ciddi sorunlara da neden olmaktadır ve bu durum bazen ölümcül sonuçlara yol açabilmektedir. Bu sorunların üstesinden gelmek için, sıcaklığa duyarlı hidrojeller, kontrollü ve sürekli ilaç salımı özellikleri açısından üstün bir performans sergilemiştir (Khan ve ark., 2023). Sıcaklığa duyarlı hidrojellerin ilaç salım mekanizması, üç ana tipe ayrılmaktadır: difüzyon bazlı salım, şişme bazlı salım ve erozyon bazlı salım (Hamidi ve ark., 2008).

Difüzyon kontrolü

Parçacıkların yüksek konsantrasyondan düşük konsantrasyona hareketi, difüzyon olarak adlandırılır. Fick'in birinci difüzyon yasasına göre, difüzyon kontrolü hidrojeller ilaç salım mekanizması için en uygun mekanizmadır. Difüzyon kontrollü ilaçların kullanıldığı bir ilaç sistemi, rezervuar (*İlaç, hidrojelin çekirdek kısmında (rezervuar) bulunur ve kontrollü bir şekilde dışarı difüze olur*) veya matris sistemi (*İlaç, hidrojel matrisine homojen olarak dağılmıştır ve ilaç molekülleri hidrojel yapısından dışarı doğru difüze olur*) olarak adlandırılır. Hidrojel matrisinden ilaçların difüzyonu esas olarak jel matrisinin ızgara boyutuna ve ilaç molekülünün su yarıçapına bağlıdır. Difüzyon, kimyasal yapıyı oluşturan çapraz bağlanma derecesi gibi birkaç parametreden etkilenir. Uygulanabilir olduğunda, sıcaklık, pH, ışık veya manyetik alan gibi çevresel uyaranların türü ve hidrojelin fiziksel durumunu ve ilaç salımını etkileyebilecek olan uyarımın yoğunluğu veya şiddeti de önemli parametrelerdir. Hidrojel ağının mekanik dayanıklılığı, bozunabilirliği ve difüzyonu gibi fiziksel özellikleri büyük ölçüde ızgara boyutuna bağlıdır. Genişleme durumundaki bir hidrojelin tipik boyutu 5 ~ 100 nm'dir, bu da çoğu küçük moleküler ilaçtan daha büyüktür. Bu nedenle, küçük moleküler ilaçların difüzyonu sürekli devam etmez. Buna karşılık, oligonükleotitler gibi makromoleküler ilaçlar, protein ilaçlarının salım zamanını kontrol eder (Kristl ve ark., 1991).

Şişme kontrolü

Polimer, salım ortamı ile temas ettiğinde şişerek genişlediğinde, ilaç bu jel tabakası aracılığıyla geçiş yapar. Bu nedenle, bu tür sistemler şişme kontrollü sistemler olarak adlandırılır. Şişme kuvveti, makromoleküler zincirin gevşemesi ve difüzyonuna bağlıdır. Şişme kuvveti, makromoleküler gevşeme süreci tarafından kontrol edildiğinde, ilaç salımı Fick'in difüzyon yasasına uymamaktadır ve bu durum Tip II difüzyon ya da non-Fickian difüzyon olarak tanımlanır. Şişme kontrollü salım sistemlerinde, ilaç başlangıçta camsı halde bulunan bir polimer matris içerisinde dağılmış durumdadır ve bu yapı içerisinde ilacın difüzyonu mümkün değildir. Sistem, su gibi termodinamik olarak uyumlu bir salım ortamı ile temas ettiğinde, polimer şişerek viskoelastik bir duruma geçer ve ilaç, bu şişmiş polimer yapı aracılığıyla salınır (Bell ve Peppas, 1995).

Erozyon kontrolü

Erozyona uğrayan bir hidrojelde, ilaç yüzeyden salınabilir ya da hidrojel tamamen eriyerek ilacın salımını sağlar. Hidrojellerin çözünerek ilaç salımı mekanizmasında temel unsurlar, çözünme ve degradasyondur; bu süreçte polimerin ana zinciri veya moleküler yapısı kırılarak ilaç serbest bırakılır. Bu durum, polimer zincirinin hidroliz yoluyla veya enzimatik degradasyon ile parçalanmasını ya da polimer ağı ile ilaç salımı arasında geri dönüşümlü veya geri dönüşümsüz bir etkileşimi içerir. Polimer erozyonuna ilişkin üç temel mekanizma aşağıdaki gibidir (Heller ve ark., 1980):

- a. Polimer zincirinin bağlı bulunduğu yüzeyden ayrılmasıyla gerçekleşen bağ degradasyonu,
- b. İlacın suda çözünmesini sağlayan hidroliz, iyonizasyon veya protonasyon süreçleri,
- c. kararsız primer bağların degradasyonu sonucunda düşük moleküler ağırlıklı ve suda çözünebilir moleküllerin oluşumu. Bu mekanizmalar, birbirinden bağımsız olarak gerçekleşebileceği gibi, bir arada da etkili olabilir (Langer ve Peppas, 1983).

2.7.1.5 Biyobozunma ve adezyon

Hidrojeller, jel oluşum sürecinin bir sonucu olarak doku yüzeyiyle fiziksel veya kimyasal bir etkileşim kurarak dokunun yüzeyine yapışır. Hidrojeller uygulandığı zaman sıvı formdayken doku yüzeyindeki veya dokunun yapısındaki boşluklara nüfuz eder. Bu çözelti, dokunun hücre dışı matrisi (ECM) içinde bulunan proteinler ve glikozaminoglikanlarla yayılır ve bu bileşenlerle etkileşime girer. Jel oluşumu, iki ağın stabilitesine yol açar. Bunlar hidrojinin kendi iç yapısını oluşturan polimer zincirlerinden oluşan polimer hidrojel ağı ve doku ile doku yüzeyinde bulunan protein ve glikozaminoglikan ağıdır. Bu işlem stabilizasyondan önce hidrojel sıvı haldeyken gerçekleştiği için, iki ağ birbirine sıkıca dolanır. Geçirgen polimer ağı olarak adlandırılan bu yapı, polimer hidrojeller ile doku arasında adezyon sağlar (Fan ve ark., 2022).

Hidrojel uygulandığı zaman hücreler ve dokuların yüzeyiyle teması kaçınılmazdır (Erthal ve ark., 2021). Bu nedenle, biyomedikal uygulamalarda kullanılan hidrojellerin kabul edilebilir biyouyumluluk ve biyobozunabilirlik özelliklerine sahip olması gerekir. Hidrojellerin hidrofilik yüzeyi, vücut sıvılarıyla temas ettiğinde düşük arayüz serbest enerjisi sergiler, bu

durum bu yüzeylerde proteinlere ve hücrelere adezyon eğilimini azaltır, bu da biyomedikal uygulamalarda istenmeyen birikimleri önler (Hennink ve Van Nostrum, 2002). Biyobozunabilirlik, ideal bir hidrojel özelliği olduğundan, yapısına genellikle zayıf bir bağ eklenir. Bu bağ, fizyolojik koşullarda genellikle hidroliz yoluyla yok edilir, yani oluşan bileşik zararsız ürünlere metabolize edilebilir veya böbrek filtrasyon süreciyle atılabilir. Misel oluşturan blok kopolimerler de biyobozunabilir olmalıdır, çünkü termal reaksiyon bloğunun moleküler ağırlığı eşik değerden düşükse, hidrofobik blok bozunmasıyla elde edilen polimer böbrekler tarafından hızla atılır (Fan ve ark., 2022).

2.7.2 Sıcaklığa Duyarlı Hidrojellerin İlaç Taşımada Kullanımı

Oral ve intramüsküler ilaç uygulama yolları, kullanım kolaylığı ve etkinlikleri nedeniyle yaygın olarak tercih edilmektedir. Ancak bu yöntemler, sınırlı kontrollü salım, ilaç taşımada zayıf hedefe yönelim ve sistemik yan etkiler gibi çeşitli kısıtlamalar taşımaktadır. Bu sınırlamaları aşmak için araştırmacılar ilaç taşıma sistemlerinde sıcaklığa duyarlı hidrojeller gibi akıllı malzemeler üzerinde çalışmalar yürütmektedir (Khan, Kumar, ve ark., 2023).

Sıcaklığa duyarlı hidrojeller; mekanik kararlılık, yüksek biyouyumluluk, sıcaklık değişimlerine duyarlı yanıt verebilme ve kolay formülasyon geliştirme gibi avantajları sayesinde ilaç taşıma sistemleri için uygun adaylar olarak değerlendirilmektedir (Schmaljohann, 2006) (Khan, Arbab, ve ark., 2023).

Sol-jel geçiş özelliği sayesinde, sıcaklığa duyarlı hidrojeller vücudun farklı bölgelerine uygulanabilir. Bu jeller, fizyolojik sıcaklıkta matriks yapıları içerisinde çeşitli hidrofilik ve hidrofobik ilaçları uzun süreli salım için depolayabilmektedir (Khan, Arbab, ve ark., 2023). Sıcaklığa duyarlı hidrojellerden biyolojik aktif bileşenlerin sürekli ve hedefe yönelik salımı, geleneksel ilaç uygulama yollarında karşılaşılan sınırlamaları aşarak bu sistemleri ilaç taşıma alanında umut vadeden bir seçenek haline getirmektedir (Öztürk ve ark., 2018).

2.7.3 Sıcaklığa Duyarlı Hidrojellerin Sınıflandırılması

Sıcaklığa duyarlı hidrojeller doğal veya türetilmiş kökenli sıcaklığa duyarlı polimerlerden yapılmıştır. Bu sıcaklığa duyarlı polimerler, sıcaklık değişikliklerine duyarlılık göstererek uygulanan sıcaklığa bağlı olarak yapılarını değiştirebilirler (Khan, Arbab, ve ark., 2023). Doğal sıcaklığa duyarlı polimerler, peptid ve glukoz halka yapılarına sahipken, türetilmiş

sıcaklığa duyarlı polimerler bir dizi kimyasal modifikasyon yoluyla oluşturulur. Bu kimyasal modifikasyonlar, polimerlerin sıcaklığa duyarlı özellikler kazanmasını sağlar ve çeşitli biyomedikal uygulamalarda kullanımlarını mümkün kılar (Khan, Arbab, ve ark., 2023).

Doğal sıcaklığa duyarlı polimerler, kimyasal çeşitlilik bakımından çok sınırlı oldukları için türetilmiş polimerlere kıyasla bazı sınırlılıklara sahiptir. Bu durum, termal geçiş özellikleriyle ilgili sorunlara neden olur. Öte yandan, türetilmiş polimerler geniş bir kimyasal çeşitliliğe sahip olduğundan, doğal olarak meydana gelen sıcaklığa duyarlı polimerlerden daha fazla potansiyele sahiptirler (Khan, Arbab, ve ark., 2023).

Sentetik malzemeler arasında poloksamerler (Boonlai ve ark., 2018) (Dang ve ark., 2019), poli N-izopropilakrilamidler (Ma ve ark., 2020; Y. Yang ve ark., 2016) ve polietilen glikol (Patel ve ark., 2021; W. K. Xu ve ark., 2019) bulunur; doğal olarak oluşan malzemeler arasında kitosan (Velázquez ve ark., 2019) (Tentor ve ark., 2017)[46-49] ve selüloz (Y. Huang ve ark., 2020) (Nigmatullin ve ark., 2019) yer almaktadır.

Poli (N-izopropilakrilamid), sıcaklığa duyarlı (termo-duyarlı) bir malzemedir. Yapısında hem hidrofilik amid ($-CONH_2$) grupları hem de hidrofobik izopropil ($-CH(CH_3)_2$) grupları bulunur. Düşük sıcaklıklarda, poli (N-izopropilakrilamid)'in üç boyutlu ağ yapısında birçok boşluk mevcuttur. Bu boşluklar su ile doludur; su molekülleri amid gruplarıyla hidrojen bağları oluşturur ve polimer yüzeyinde bir su molekülü tabakası meydana gelir. Sıcaklık yükseldiğinde, hidrojen bağları bozulur, izopropil grupları su kaybeder, su içeriği azalır, hidrofobik grupların birleşimi artar, su dışarı atılır ve jel büzülür. Ancak, bu termo-duyarlı hidrojel in biyobozunabilirliği ve mekanik özellikleri zayıf olduğundan, uygulama alanları sınırlıdır. Genellikle diğer polimerler eklenerek geçimli polimer ağları (interpenetrating polymer networks, IPN'ler) oluşturulur. Örneğin, polivinilpirolidon (PVP) eklenerek poli (N-izopropilakrilamid)/polivinilpirolidon (PNIPAM/PVP) geçimli polimer ağı oluşturulmuştur. PVP'nin eklenmesi, hidrojel in sıcaklık yanıt süresini kısaltmış, ancak kritik çözünme sıcaklığını (LCST) değiştirmemiştir (Feng ve ark., 2017).

Selüloz türevleri, glikoz moleküllerinin β -1,4-glikozidik bağlarla birbirine bağlandığı biyolojik makromoleküllerdir. Selüloz moleküllerinin çok sayıda hidrojen bağı içermesi nedeniyle, düşük sıcaklıklarda selüloz bazlı sıcaklığa duyarlı malzemeler, polimerleşme gerçekleşmeden yalnızca hidrofobik gruplar etrafında basit fiziksel etkileşimler

oluşturmaktadır. Sıcaklık yükseldiğinde ise hidrojen bağları bozulur ve kademeli olarak hidratasyon kaybı meydana gelir. Selüloz molekülleri arasındaki güçlü hidrofobik etkileşim, üç boyutlu ağların oluşumuna neden olur ve böylece sıcaklığa duyarlı bir hidrojel meydana gelir [56]. Selüloz bazlı termo-duyarlı hidrojeller, toksik olmamaları, iyi biyouyumluluk ve biyobozunabilirlik özellikleri sayesinde biyomedikal malzeme olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. (L. Zhu ve Zhang, 2016).

Kitosan, doğada yaygın olarak bulunan kitinin deasetilasyonu ile elde edilen doğal bir alkali amino polisakkarittir. Yapısında β -1,4 glikozidik bağlarla birbirine bağlanmış N-asetilglukozamin grubu ve glukozamin kalıntısı bulunur [57]. Kitosan, yüksek biyouyumluluğu, düşük sitotoksitesi ve biyobozunabilirliği sayesinde biyomedikal alanda yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak kitosan tek başına termo-duyarlı değildir; bu özellik genellikle sodyum gliserofosfat ile karıştırılarak sağlanır. Bu karışımda, kitosan üzerindeki amino grupları ile sodyum gliserofosfat arasında elektrostatik çekim oluşur. Sıcaklık yükseldiğinde bu elektrostatik çekimler bozulur, kitosan zinciri su kaybederek jel yapısına dönüşür. Sıcaklık belli bir seviyeye ulaştığında, kitosan deasetillenir, zincir üzerindeki hidrofilik ve hidrofobik bileşenler birbiriyle etkileşime girer ve viskozite artarak hidrojel yapının oluşumunu sağlar (Schnell ve ark., 2020).

Polietilen glikol (PEG), polilaktid ve glikolidden (polilaktid-ko-glikolid, PLGA) oluşan bir b-a-b triblok kopolimeri olan PLGA-PEG-PLGA'yı oluşturmak üzere karıştırılabilir. Bu kopolimer su içinde çözüldüğünde, çekirdek-zar yapısına sahip küresel miseller oluşturmaktadır. Sıcaklığa duyarlılığı sayesinde ilaç taşıma sistemlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Kopolimerin sıcaklık duyarlılığı, yapısındaki hidrofilik grup (PEG) ve hidrofobik grup (PLGA) tarafından kontrol edilir. Sıcaklık faz geçiş sıcaklığının altında olduğunda, hidrofobik PEG çekirdeği ve hidrofilik PLGA kabuğu kendiliğinden düzenlenerek miseller oluşturur. Sıcaklık faz geçiş sıcaklığına ulaştığında ise PEG zincirleri arasındaki etkileşim kuvvetleri artar, PLGA kabuğu su kaybeder ve misel agregasyonu artar. Bu da polimer çözeltisinin bir hidrojele dönüşmesine neden olur (Yu ve ark., 2009). Polimerin sol-jel geçiş sıcaklığı, PEG ve PLGA oranına bağlı olarak kontrol edilebilir. Molekül zincirinde PEG oranı arttıkça faz geçiş sıcaklığı yükselirken, PLGA oranı arttıkça faz geçiş sıcaklığı düşer [45]. Bu yapıya benzer diğer triblok kopolimer yapılar arasında polikaprolakton-ko-laktid-polietilen glikol-polikaprolakton-ko-laktid (PCL-PEG-PCL),

poli(kaprolakton-ko-glikolik asit)-polietilen glikol-poli(kaprolakton-ko-glikolik asit) (PCGA-PEG-PCGA) ve poli(D,L-laktid)-polietilen glikol-poli(D,L-laktid) (PDLLA-PEG-PDLLA, PLEL) yer almaktadır (Kitagawa ve ark., 2018).

Poloksamer, polietilen oksit-polipropilen oksit-polietilen oksit (PEO-PPO-PEO) triblok kopolimerlerinden oluşan bir polimer türüdür [53]. Yapısında, ortada yer alan hidrofobik polipropilen oksit (PPO) çekirdeği ve her iki ucunda bulunan hidrofilik polietilen oksit (PEO) zincirleri bulunur (Fu ve ark., 2015). Isıtıldığında, poloksamer miselindeki hidrofobik polipropilen oksit grubu susuz kalır ve belirli bir sıcaklığa ulaşıldığında miseller birbirleriyle temas ederek bir ağ yapısı oluşturur. Bu ağ yapısının oluşumu, viskozitedeki artışla kendini gösterir ve bir hidrojel oluşur (Jarak ve ark., 2020).

2.8 POLOKSAMERLER

Poloksamerler, 1940'lı yılların sonunda Wyandotte Chemical Corporation tarafından sentezlenen ve endüstriyel uygulamalar amacıyla üretilen ilk blok kopolimerlerdir. 1950'li yıllarda ise BASF (Iselin, NJ, ABD) tarafından deterjan formülasyonlarının geliştirilmesinde kullanılmaya başlanmıştır; tarım, gıda ve boya sanayi gibi çeşitli alanlarda da uygulama alanı bulmuştur (Almeida ve ark., 2018). Poloksamerin ilaç salımında kullanımı 1970'li yılların başında ortaya çıkmıştır; zayıf mekanik özelliklere sahip olmalarına rağmen yüksek derecede etkili terapötik ajanların hedef hücreye taşıyabildiği için daha güvenli ve daha hızlı tedavi arayışına bir yanıt olmuştur (J. Li ve ark., 2015). Biyouyumlu ve sıcaklığa bağlı olarak geri dönüşümlü faz değiştirebilen hidrojellerdir (Alexandridis ve Hatton, 1995).

Günümüzde, ticari olarak Pluronic® (BASF), Antaron® (Rhodia), Synperonic® (Croda) ve Lutrol®, gibi isimlerle bilinirler. Poloksamerler aynı zamanda Pluronic olarak da bilinir ve her kopolimerin morfolojisini belirten özel bir adlandırma sistemi getirilmiştir: L (sıvı için), P (macun için) veya F (pullar için). Bu harfleri, PPO'nun (propilen oksit) moleküler ağırlığını belirten bir veya iki rakam, ardından PEO'nun (etilen oksit) ağırlık fraksiyonunu belirten son rakam izler.

Poloksamerlerin fizikokimyasal özellikleri ve uygulamaları ilk kez Alexandridis ve Hatton tarafından 1995 yılında detaylı bir şekilde incelenmiştir (Alexandridis ve Hatton, 1995). Poloksamerler veya Pluronic®, polimerlere amfifilik ve yüzey aktif özellikler kazandıran polar (polietilen oksit) ve polar olmayan (polipropilen oksit) bloklardan oluşur. Bu

polimerler, poli(etilen oksit)-b-poli(propilen oksit)-b-poli(etilen oksit) (PEO-PPO-PEO) şeklinde sıralanan suda çözünür noniyonik üçlü blok kopolimer bir yapıya sahiptir. Hidrofobik ve hidrofilik davranışları olan propilen oksit (PO) ve etilen oksit (EO) zincirleri arasındaki farklı oranlar (1:9 ila 8:2) sudaki çözünürlüklerini belirlemektedir. Bu farklılıklar, poloksamerlerin in vivo özelliklerini ve hücrelerle ve hücre membranlarıyla etkileşimlerini değiştirir ve yenilikçi nanotıp tıbbi ürünlerin ve yeni biyomalzemelerin tasarımı için yüksek potansiyel sunar (Russo ve Villa, 2019).

Bu polimerler, sodyum veya potasyum hidroksit gibi bir alkali katalizörün varlığında PO ve EO monomerlerinin sıralı eklenmesiyle sentezlenir. Bu süreçte, farklı sayıda hidrofilik EO ve hidrofobik PO birimlerine sahip farklı kopolimerler elde edilir. Ayrıca, bu kopolimerler farklı hidrofilik-lipofilik denge (HLB) değerlerine sahiptirler (Y. Chen ve ark., 2021). Sentez sırasında kopolimer bileşiminin (PPO/PEO oranı) ve moleküler ağırlığın (PEO ve PPO blok uzunluğu) değiştirilmesi, belirli teknolojik alanlarda kullanılabilen ve özel özellikler sergileyen makromoleküler yüzey aktif maddelerin elde edilmesine olanak sağlar (McLain, 2008). Poloksamerler ticari olarak bulunabilirlikleri, geniş molekül ağırlık aralıkları, kendine özgü davranışları ve esneklikleri nedeniyle farmasötik teknoloji ve biyomedikal alanlarda uygun bir seçimdir. Poloksamerler FDA onaylıdır ve ABD ve Avrupa Farmakopesinde listelenmiştir; toksik ve tahriş edici değildirler, bu nedenle çözündürücü, emülsifiye edici, stabilizatörler olarak kullanılabilirler ve oral, parenteral ve topikal yollarla uygulanabilirler (Johnston ve Palmer, 1993) (Russo ve Villa, 2019).

Poloxamer 407 ve poloxamer 188 (P188) son yıllarda ilaç dağıtım sistemleri araştırmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Poloxamer 407'deki oksiranın 1,2-epoksipropana ağırlık oranı 7:3'tür ve ortalama bağl moleküler kütlesi 12.600'dür. P188'in ortalama moleküler ağırlığı 8400'dür (Zarrintaj ve ark., 2020). Poloxamer 407 ve Poloxamer 188'in sulu çözeltileri, belirli bir konsantrasyonda ters sıcaklık duyarlı özellikler sergiler. Bu özellik, bu poloksamerlerin konsantre sulu çözeltilerinin, düşük sıcaklıklarda sol (akışkan) halde bulunurken, sıcaklık artışıyla birlikte jel haline geçmesiyle sonuçlanır. Bu hidrojeller düşük sıcaklıklarda sıvı halde kalırlar, ancak vücut sıcaklığında veya oda sıcaklığında yarı katı bir jel haline gelirler ve sıcaklık düştüğünde orijinal sıvı hallerine geri dönerler (Boonlai ve ark., 2018). Bu şekilde, jelleşme sistemi lokal düzeyde uzun bir süre muhafaza edilir ve ilacın salımı kontrollü ve uzatılmış olur. Suda iyi çözünürlüğü, düşük biyotoksisite,

organizmalar için düşük uyarım ve iyi biyouyumluluğu sayesinde, poloksamerler biyomedikal alanda, özellikle de ağız boşluklarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Poloksamerler kullanılarak, oral mukozit tedavisinde kullanılan moksifloksasin ve simvastatin içeren bir in situ jel hazırlığı geliştirilmiştir (Pagano ve ark., 2020).

2.8.1 POLOKSAMER 407

Poloxamer 407 (P407), triblok kopolimer bir yapıya sahiptir ve moleküler ağırlığı 12.6 kDa'dır. Her molekül, ortada hidrofobik bir PPO (polipropilen oksit) bloğu ve her iki tarafında hidrofilik PEO (polietilen oksit) bloğuna sahiptir (J. Chen ve ark., 2013). Bu molekülün %70'ini polietilen oluşturur ve %30'dan fazla polietilen oksit içeren kopolimerler suda kolayca çözünür. Bu nedenle, P407 su içinde kolayca çözünebilir ve iyi bir termal tersinirlik özelliğine sahiptir (Y. Chen ve ark., 2021).

Düşük sıcaklıklarda P407'nin moleküler yapısı hidratlanmış bir tabaka ile çevrilidir. Sıcaklık arttığı zaman çözücü ile kopolimerin hidrofilik zinciri arasındaki hidrojen bağlarının kırılmasına neden olur. Bu durum polimerler arasındaki hidrofobik etkileşimi ve misel oluşumunu destekleyerek sıvı fazdan jel faza geçişi teşvik eder (Y. Chen ve ark., 2021). Sıcaklığa duyarlı P407 sulu çözeltisinin jel oluşum mekanizması, sıcaklık artışının önce P407 misellerinin kübik bir yapıya yeniden düzenlenmesine neden olması ve ardından altıgen bir yapının oluşması şeklindedir. P407 formülasyonu üzerinde yapılan çalışmalar, %15-30 konsantrasyona sahip formülasyonların vücut sıcaklığında jel formu alabileceğini göstermektedir (McLain, 2008). Poloksamer 407 bazlı sıcaklığa duyarlı jel, sıcaklık hassasiyeti gibi özelliklere sahiptir; yani oda sıcaklığında sıvı, vücut sıcaklığında ise jel formundadır. Bu avantaj, onu en cazip ilaç taşıyıcısı haline getirmektedir. P407 bazlı sıcaklık hassasiyetine sahip bir jel, ilaç uygulama alanına uygulandığında, lezyon için gereken ilaç konsantrasyonunun belirli bir süre boyunca korunmasını sağlar. Bu, gerekli dozajı ve uygulama sıklığını azaltarak ilacın yan etkilerini azaltır ve hasta uyumunu artırır (Y. Chen ve ark., 2021). P407'nin özel kimyasal yapısı sayesinde jelin hem polar hem de apolar maddelerle etkileşime girmesini sağlayarak iki farklı afinite özelliğine sahip olmasını sağlamaktadır. Bu durum sayesinde endüstriyel uygulamalarda faydalı bir yüzey aktif madde olarak kullanılmaktadır. P407, iyi bir çözünürlük kapasitesine ve düşük biyolojik toksisiteye sahiptir. İyi ilaç salım yeteneğine sahip olmanın yanında çeşitli biyolojik moleküller ve

kimyasal reaktantlarla da iyi bir uyumluluk sağlar. Bu nedenle, P407, bir çözücü, emülgatör veya stabilizatör olarak kullanılabilir (Fakhari ve ark., 2017).

P407 çözünürlük, biyouyumluluk ve biyofilm üzerinde irritasyon yapmama özellikleri sayesinde mukozal ilaç taşıma sistemlerine uygulanabilir. Verilere göre, P407, hidrofobik moleküllerin çözünmesine yardımcı olur ve bu moleküllerin ortamda tamamen ve hızlı bir şekilde çözünmesini teşvik eder (L. Huang ve ark., 2016). P407 bazlı sıcaklığa duyarlı jeller biyouyumlu olmasına rağmen, mekanik dayanıklılıkları nedeniyle fizyolojik ortamda hızla eliminasyona uğrama eğilimindedir. Bu nedenle, sıcaklığa duyarlı jeli mükemmelleştirmek için daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir. Ayrıca, araştırma verileri, jel konsantrasyonundaki artışın jel parçalanma hızını azalttığını göstermektedir. Dolayısıyla, jel konsantrasyonu daha yüksek olduğunda, jel lezyon bölgesinden daha zor temizlenir; bu da lezyon için olumsuz bir durumdur (Akkari ve ark., 2016).

2.9 BİYOUYUMLULUK VE SİTOTOKSİSİTE

Biyouyumluluk, bir materyalin hedef dokuya yerleştirildiği zaman dokunun bu materyale verdiği reaksiyon ve fonksiyon yeteneği olarak tanımlanmaktadır. Biyouyumluluk, bir materyalin yumuşak ve sert dokuyla etkileşime girerken, lokal veya sistemik toksisiteye veya alerjik, trombojenik, mutajenik veya kanserojen doku reaksiyonlarına neden olmadan uyum sağlayabilme yeteneğini ifade eder (Wataha ve ark., 1999) (Schmalz, 1997). Biyouyumlu olmayan materyallere karşı meydana gelen olumsuz doku reaksiyonları, toksik etki olarak yorumlanmaktadır. Bu reaksiyonlar meydana geldiği zaman çeşitli makro moleküllerin sentezlenmesinin önlenmesi, hücre yapı ve fonksiyonlarında meydana gelen belirgin bozulmalar sitotoksiste olarak tanımlanmaktadır (Demirci ve Tuncer, 2011).

Günümüzde bir malzemenin tıbbi etkinliği mekanik ve estetik özelliklerine ek olarak biyolojik güvenliği ve dokularla uyumluluğu açısından da değerlendirilmelidir. Bu bağlamda, klinik uygulamalarda kullanılan dental materyallerin seçiminde biyouyumluluk en önemli kriterlerden biridir (Hanks ve ark., 1996).

2.9.1 Dental Materyallerin Biyouyumluluk Değerlendirme Yöntemleri

Uluslararası Standardizasyon Organizasyonu (ISO) tarafından yayımlanan ISO 7405 ve ISO 10993 standartları, biyouyumluluk testlerinin belirli kriterler doğrultusunda yürütülmesini

sağlamak amacıyla oluşturulmuştur. Bu standartlara göre, diş hekimliğinde kullanılan tıbbi materyal ve cihazların biyouyumluluklarının değerlendirilmesi için yapılacak testler, üç aşamada tamamlanmalıdır. Bu aşamalar, *in vitro* testler (Faz 1), *in vivo* hayvan deneyleri (Faz 2) ve klinik kullanım testleri (Faz 3) (Demirci ve TUNCER, 2011).

2.9.2 *In Vitro* Sitotoksosite Testleri

Biyomateryaller hücrelerin kromozom yapılarında (sitotoksosite, nörotoksosite, mutajenite, östrogenesite), metabolik aktivitelerinde (geçirgenliği arttırarak) ve membranlarında bozukluklar meydana getirebilmektedir (Maciej Serda ve ark., 2021). Uygulanan materyallerin hücrenin yaşamına olan etkisi biyouyumluluğunu belirleyici faktördür. Sitotoksosite, materyalin uygulanmasından sonra moleküler olaylar sonucunda makromolekül sentezinin bozulması ve bunun sonucunda hücre yapı ve fonksiyonlarında meydana gelen hasar oluşumudur. Kısaca, bir materyalin canlı hücreler üzerindeki toksik etki oranını ifade etmektedir (Demirci ve TUNCER, 2011).

Materyal bileşenlerinin yoğunluğuna ve dokuyla etkileşim süresine bağlı olarak uygulanan materyalin toksisitesi farklılık gösterebilmektedir (Modena ve ark., 2009). Sitotoksik bir materyale belirli bir süre maruz kalan hücrelerde nekroz, apoptoz, otofaji gelişmektedir. Bu biyolojik olaylar sonucunda hücreler canlılığını yitirebilmekte ya da proliferasyon yeteneklerini kaybedebilmektedir (Maciej Serda ve ark., 2021).

Sitotoksosite belirlenirken *in vitro* olarak uygulanan farklı testler ve yöntemler geliştirilmiştir. Bu testler, bir kimyasal maddenin olası toksik potansiyelinin *in vitro* olarak değerlendirilmesi amacıyla hücre kültürleri üzerinde uygulanan biyouyumluluğun ilk aşaması olan testler olarak kabul edilmektedir. Hücre temelli sitotoksosite deneyleri, *in vivo* çalışmaların verileriyle uyumlu ve pratik olmalarından dolayı, hayvan çalışmalarına alternatif olarak toksikoloji çalışmalarında tercih edilmeye başlanmıştır (Składanowski ve ark., 2016).

Canlı organizma dışında, deney tüpü veya petri kabının içerisinde yapılan *in vitro* testler, sitotoksosite incelemelerinde çoğunlukla kullanılan yöntemlerden biridir. *In vitro* çalışmalar, hücre sistemleri üzerinde materyal bileşenlerindeki moleküllerin salım ve etkilerini inceleme olanağı sunmaktadır. Sitotoksosite testlerinde hücrenin morfolojisi, canlılığı, gelişimi, sayısı ve metabolizması, hücre membran hasarı ve geçirgenliği, çeşitli enzim aktivitelerinin, RNA,

DNA ve protein sentezinin durması değerlendirilmektedir (Nicholson, 2002) (Sakaguchi ve Powers, 2012). Daha karmaşık olan hayvan deneylerine geçmeden önce bir materyal hakkında ön bilgi elde etmemizi sağlamaktadır (Hanks ve ark., 1996).

In vitro olarak tasarlanan sitotoksosite çalışmalarında genellikle hücre kültürleri kullanılmaktadır. Hücre kültürleri, canlı bir organizmadan elde edilmiş dokuların laboratuvar koşullarında canlı tutulup çoğaltılması ile oluşturulan biyolojik sistemlerdir. Hücre kültürleri, primer hücre kültürleri, sonlu hücre kültürleri ve sürekli hücre kültürleri olarak sınıflandırılırlar. Özellikle ilaç etkinliğinin ve kimyasal maddelerin toksik etkilerinin değerlendirildiği çalışmalarda, farklı hücre kültürlerinin kullanıldığı *in vitro* testlerin kullanılabilirliğinin ve geçerliliğinin arttığı görülmektedir.

İn vitro test sistemlerinin avantajları; moleküler düzeyde çalışmaların yapılmasını sağlar. Hücrelerde oluşan değişimler kalitatif ve kantitatif olarak belirlenebilir; hücrenin bulunduğu ortamın koşulları değiştirilerek, hücrelerde ortaya çıkabilecek değişiklikler izlenebilir; insan hücre kültürleri kullanılarak, hücre tipine göre, hücrenin büyüme ve çoğalması için gereksinim duyduğu koşullar daha çabuk ve kolay belirlenir; farklı hücre tiplerinde farklı kimyasal maddeler ile ortaya çıkabilecek toksik etkiler daha az maliyet ve zaman harcanarak incelenebilir; hücresel olaylarda özelleşmiş bir işlevin değerlendirilmesine ve uygun hücre tipi seçilerek istenen organdaki etkinin incelenmesine olanak sağlar (Pizzoferrato ve ark., 1994; Schmalz, 1994).

İn vitro test sistemlerinin dezavantajları ise türler arası farklılıklar nedeniyle, bazı hayvan hücre kültürleri insan hücreleriyle benzer yanıt vermeyebilir. İnsan hepatositleri gibi bazı kültürlerin de bulunması zor ve pahalıdır. Bazı hücre tipleri klonal büyüme göstermediklerinden kültür ortamlarında kısa sürede canlılıklarını kaybedebilir. Bu hücre kültürlerinin kronik toksisite testlerinde kullanılmaları olanaksızdır. Bazı hücreler yavaş çoğalır ve bu hücreler kısa sürede fenotipik değişikliklere uğrayabilir. Tek bir test sistemi için tek bir hücre kullanılması ve bu durumda *in vitro* testlerin *in vivo* test sonuçlarını tam olarak yansıtması beklenemez. *İn vitro* toksisite testleri için yayınlanmış ve kabul edilmiş az sayıda kılavuz bulunmaktadır (Pizzoferrato ve ark., 1994).

Hücre kültüründe hücrelerin canlılığının belirlenmesinde kullanılan sitotoksosite testlerinde, membran bütünlüğü bozulan hücre içerisine alınan tripan mavisi, eritrosin veya naftalin

siyahı gibi boyalar ya da membran bütünlüğü bozulmamış sağlam hücrelerin içerisine alınan diasetil florasan, nötral kırmızı gibi boyalar kullanılır (Demirci ve TUNCER, 2011) (Niles ve ark., 2009). Uluslararası Standart Organizasyonu (ISO) testlerin belirli standartlarda yapılması amacıyla diş hekimliğinde kullanılan tıbbi materyallerin biyouyumluluğunun değerlendirilmesi için ISO 7405 standartları sunulmuştur. Bu standartlardan geçen testlere ek olarak ISO 10993-5 standartları da in vitro sitotoksite testleri için önerilen genel bir test protokolüdür. ISO standartlarına göre in vitro sitotoksite değerlendirmelerinde kullanılan test yöntemleri şunlardır:

- a. Hücre kültürü testleri
- b. Agar difüzyon testi
- c. Filtre difüzyon testi
- d. Dentin bariyer testi

Bu testler test edilecek materyalin hücre, enzim ya da diğer biyolojik sistemlerle temasıyla gerçekleştirilir. Test edilecek malzemenin, hücre kültür ortamında hücre sayısı, büyüme oranı, morfolojik özellikleri, metabolik fonksiyonları kontrol grupları ile karşılaştırılarak değerlendirilir. Deneyler arada herhangi bir bariyer olmaksızın materyalin hücre ile direkt temasıyla ya da materyal ile hücre arasında küçük bir bariyer yerleştirilmesiyle indirekt şekilde uygulanabilir (Demirci ve TUNCER, 2011).

2.9.2.1 Hücre kültürü testleri

Diş hekimliğinde kullanılan materyallerin sitotoksitesini in vitro olarak belirlemede en yaygın olarak kullanılan yöntem hücre kültür testleridir. Bu testlerin temel amacı, canlı dokulardan elde edilen hücrelerin laboratuvar ortamında yaşamasını ve çoğalmasını sağlamaktır (Freshney, 2005). Hücre kültürleri, canlı dokulardan alınan hücrelerin fizyolojik durumu taklit edecek şekilde vücut ısı ve uygun besi yerlerinde çoğaltılmasıyla oluşturulmaktadır (Demirci ve TUNCER, 2011).

Bu teknik, in vivo olarak hızlı bir şekilde incelenemeyen fiziksel ve kimyasal etkiler, mutajenik faktörler ile yapısal ve kromozomal bozuklukların hızlı bir şekilde belirlenmesine olanak tanır. Hücre kültürü testleri, dental malzemelerin içeriğindeki bileşenlerin hücre kültürü üzerine doğrudan yerleştirilmesi ilkesine dayanır. Malzemenin potansiyel

sitotoksitesitesi, doz-yanıt eğrisi yardımıyla belirlenmektedir (Alonso-Español ve ark., 2023) (Vidal ve ark., 2017) (Hadzik ve ark., 2022). Bu yöntem, materyallerin hücreler üzerinde meydana getirdiği etkilerin doğrudan gözlemlenebilmesi, kısa süreli etkileşimlerin incelenebilmesi ve uygulamaların tekrar edilebilmesi gibi avantajlar sunmaktadır. Ancak, hijyen koşullarından etkilenebilir olması, yüksek maliyetli bir yöntem olması ve birincil kültür sonrasında hücrelerin ardışık pasajlarda farklılaşması veya ölmesi gibi dezavantajları da bulunmaktadır (Murray ve ark.,2020).

Hücre kültürü yöntemi, direk hücre kültürü yöntemi ve bariyer testi yöntemi olmak üzere iki farklı şekilde uygulanabilmektedir. Direk hücre kültürü yöntemi, dental malzeme veya bileşenlerin kısa süreli (24 saatten daha az) olarak kültürdeki hücrelere doğrudan uygulanmasını içermektedir. Bu yöntemde malzeme, hücrelerle veya kültür ortamıyla fiziksel temas halindedir. Bariyer testi yöntemi ise oral ortamda bulunan dentin, pulpa ile kaviteye uygulanan materyal arasında bariyer görevi üstlenmektedir. Bu nedenle materyal ve hücrenin direkt teması ile uygulanan testler, klinik durumu taklit etmede yeterli olmamaktadır. Bariyer test yönteminde ise dentini taklit eden ve uygulanan materyal bileşenlerinin difüzyonuna izin veren çeşitli maddeler, bariyer olarak kullanılmaktadır. Yapay bariyer sistemleri kullanarak bileşenlerin difüzyonunu sağlar ve dentin geçirgenliğini taklit (Demirci ve TUNCER, 2011) (Moharamzadeh ve ark., 2009).

İn vitro sitotoksitesite testlerinde en yaygın kullanılan hücre hatları, primer hücreler veya sürekli hücre hatlarıdır. Bu hücre hatları arasında L-929 fare fibroblast hücreleri, WI-38 insan embriyonik akciğer hücreleri, HeLa insan epitel hücreleri ve ECV-304 insan endotel hücreleri yer almaktadır (Freshney, 2005). Primer hücreler, belirli bir doku veya organdan izole edilerek kültüre alınan ve 24 saatten fazla canlı tutulabilen hücrelerdir. Bu hücreler ile in vivo koşullara benzer bir deneysel ortam sağlama avantajına sahiptir (Freshney, 2005). Sürekli hücre hatları, primer hücrelerin transformasyona uğraması sonucunda elde edilen ve sınırsız şekilde çoğalabilme yeteneğine sahip hücrelerdir (Murray ve ark., n.d.-b),(Freshney, 2005). Hücre kültürleri oluşturulurken, ideal ortam koşulları 37°C sıcaklık, %5 CO₂ ve %95 nem oranı olarak belirlenir. Kültüre ayrıca antioksidanlar ve antibiyotikler eklenir. Kültüre alınan hücrelerdeki fiziksel ve patolojik değişiklikler, ışık mikroskobu veya elektron mikroskobu kullanılarak analiz edilir. Elde edilen sonuçlar malzeme ile ilişkili potansiyel sitotoksitesiteyi gösterebilmektedir ama hücre kültüründe elde edilen bulguların klinik

koşullarla direk ilişkilendirilmemesi gerekir. Bunun sebebi hücre kültüründe elde edilen sonuçlar, in vivo koşulları tam anlamıyla yansıtamaz (Murray ve ark., n.d.-b) (Freshney, 2005) (Yıldırım ve ark., n.d.).

2.9.2.2 Agar difüzyon testi

Agar difüzyon testinde nötral boyayla boyanmış hücrelerin üzeri agar ile kaplanmaktadır ve örnek materyal agar üzerine yerleştirilmektedir. Bundan dolayı sitotoksitesisi incelenen malzemenin %1,5 agar içerisinden difüze olabilmesi gerekmektedir. Malzemenin agar ile 24 saatlik difüzyon sürecinin ardından, toksik etki belirlenirken hücre membranının geçirgenliğine bağlı olarak boyanın lizozomlardaki birikim miktarı değerlendirilmektedir. (Murray ve ark., n.d.-b) (Yıldırım ve ark., n.d.). Kolay uygulanabilir ve ekonomik bir yöntem olmasına karşın, agarda çözünemeyen ya da yeterli difüzyon kapasitesine sahip olmayan materyal ya da bileşenler, hücrelerle doğrudan etkileşime giremediğinden, sitotoksiteleri doğru şekilde belirlenememektedir. Bu bağlamda, test materyalinin agar ortamında hücre tabakasına ulaşması gerekliliği, yöntemin sınırlayıcı bir yönü olarak değerlendirilmektedir (Demirci ve TUNCER, 2011) (Murray ve ark., n.d.-a).

2.9.2.3 Filtre difüzyon testi

Restoratif tedavilerde kullanılan birçok malzeme uygulandığı zaman hücrelerle direk temas halinde olmadığından, hücre kültürü ile materyaller arasına bir filtre yerleştirmenin daha objektif bir değerlendirme sağlayacağı şeklinde değerlendirilmektedir. Bu yaklaşım materyallerin hücrelere dolaylı etkilerini daha doğru bir şekilde analiz etmeye olanak tanımaktadır (Murray ve ark., n.d.-b) (Yıldırım ve ark., n.d.). Bu yöntemde uygulanan materyalin sitotoksik etkisini gösterebilmesi için, 0.45 µm'lik selüloz filtreden difüze edilebilmesi önemlidir. Filtrenin bir tarafına uygulanan materyal karşı tarafına ise hücreler yerleştirilmektedir. Uygulanan materyalin hücrelerde meydana getirdiği hasarlar boyanma yoğunluğunun incelenmesiyle veya dekolorizasyon alanının ölçülmesiyle tespit edilmektedir (Demirci ve TUNCER, 2011) (Murray ve ark., n.d.-a). Boyanan alanın boyutuna, koyuluk derecesine ve etkilenen alana bağlı olarak skorlama değişim göstermektedir (Wennberg ve ark., 1983). Bu yöntemde primer hücre hattı olarak genellikle epitel hücreler ve fibroblastlar tercih edilmektedir; bu filtrenin bir tarafına hücreler, diğer tarafına ise incelenen materyal yerleştirilir. Filtreden difüze olan malzemenin sitotoksik etkisiyle

meydana gelen hücre hasarı ve hücre ölümü, nötral kırmızı boyama yöntemiyle belirlenmektedir (Moharamzadeh ve ark., 2009).

2.9.2.4 Dentin bariyer testi

1974 yılında Outhwaite ve arkadaşları tarafından, dentin geçirgenliğini taklit eden bölümlü oda (split chamber) cihazı geliştirilmiş ve bu sistemin, dental materyallerin biyouyumluluğunu değerlendirmede kullanılabileceği fikri ortaya konmuştur (Outhwaite ve ark., 1974). Dentin tabakası, dental materyaller dış dokularına uygulandığı zaman pulpa tabakası için koruyucu bir bariyer görevi görmektedir. Dentin tabakasının bu özelliğini taklit edebilmek için geliştirilen bu yöntemde, test edilen materyale ait monomerlerin difüzyon kabiliyeti ölçülmektedir. Diğer testlerden farklı olarak, ağız ortamını daha iyi taklit eden bu yöntemde, dental malzemeden salınan monomerler ile hedef hücre arasında sığır dentin diskleri veya insan dentin dokusu bariyer olarak kullanılmaktadır (Hadzik ve ark., 2022). Dentin disklerinin asitle dağlanan tarafında hücreler üretilmekte ve bu kısım pulpa bölümü olarak tanımlanmaktadır. Uygulanacak materyal silikon bir tüpün içerisinde dentin diskinin diğer kısmına uygulanmakta ve dişin yapısını taklit edebilecek materyallerin sitotoksitesinin değerlendirilmesi amaçlanmaktadır (Modena ve ark., 2009).

2.9.3 Sitotoksosite Değerlendirme Yöntemleri

Uluslararası Standardizasyon Organizasyonu'nun 7405 ve 10993-5 koşullarına göre uygulanan sitotoksosite test yöntemlerinin değerlendirilmesinde; hücre sayımı, hücre zarının zedelenmesi, boyama ve metabolik değişiklikler gibi parametreler incelenmektedir.

2.9.3.1 Canlılık değerlendirme (kısa dönem toksisite) testleri

Canlılık değerlendirme testleri, test edilen materyalin kısa süreli toksik etkilerinin hücre kültürü üzerindeki yansımalarını belirlemek amacıyla uygulanmaktadır. Bu testlerde, hücre kültüründe canlı kalabilen hücrelerin oranı hesaplanarak materyalin sitotoksik potansiyeli değerlendirilir (Demirci ve TUNCER, 2011) (Freshney, 2005). Değerlendirme süreci, hücre membran bütünlüğünün bozulup bozulmamasına bağlı olarak gerçekleştirilen boyama yöntemlerine dayanmaktadır. Membran bütünlüğü bozulmuş hücreler tripan mavisi, eritrosin veya naftalin siyahı gibi vital boyalarla; membranı sağlam olan canlı hücreler ise diasetil floresan veya nötr kırmızı gibi boyalarla işaretlenerek belirlenmektedir. Bu testler,

kolorimetrik veya floresan ölçüm yöntemleri ile kültürdeki canlı hücre yüzdesinin nicel olarak saptanmasına olanak sağlar (Demirci ve TUNCER, 2011) (Yıldırım ve ark., n.d.).

2.9.3.2 Yaşam değerlendirme (uzun dönem toksisite) testleri

Yaşam değerlendirme testleri ile düşük yoğunluktaki tek tip hücre süspansiyonunda bulunan hücrelerin koloni oluşturabilme yetenekleri değerlendirilmektedir. Uygulanan testlerle hücreler üzerine uygulanmış materyalin uzun dönemde meydana getirdiği toksik reaksiyonların hücre yaşamına olan etkileri incelenmektedir. Kısa dönem testleri olan canlılık değerlendirme testleri; kullanışlı, kolay uygulanabilen ve hızlı testler olmasına rağmen yalnızca test esnasındaki ölü hücreleri göstermesinden dolayı materyalin uzun dönem toksik etkilerini belirlemede yeterli bilgi vermemektedir. Oysa toksik etkilere maruz kalan hücreler birkaç saat, gün veya daha fazla süre etki gösterebilmektedir. Bu nedenle yaşam değerlendirme testi olarak, kısa dönem testleri yerine uzun dönem testleri kullanılmaktadır (Freshney, 2005).

2.9.3.3 Proliferasyon değerlendirme testleri

Proliferasyon değerlendirme testleri, materyalin çeşitli bileşenlerinin hücre proliferasyonu üzerine etkisinin incelendiği, en köklü ve en sık kullanılan yöntemlerden biridir. Hücre kültüründe olan hücrelerin birkaç gün sonraki sayımıyla materyale ait bileşenlerin hücre proliferasyonu üzerine etkisi tespit edilmektedir. Test süresi içerisinde belirli bir anda yapılan hücre sayımı, belirgin bir sonuç vermemektedir. Bu nedenle testin erken aşamalarında bir büyüme eğrisinin elde edilmesi gerekmektedir. Büyüme eğrisinde kontrol hücrelerinin log fazında (üreme fazında) veya mid-log fazında bulunduğu bir an seçilmelidir. Anlamlı bir etki tespit edildiği takdirde elde edilen gelişme eğrisinin ikinci bir gelişme eğrisi ile desteklenmesi gerekmektedir veya diğer değerlendirme yöntemleri uygulanmalıdır. Kültürdeki hücrelerin birkaç gün sonra sayılması, çeşitli malzeme bileşenlerinin hücre proliferasyonu üzerindeki etkisini belirlemek için kullanılmaktadır. H-Timidin ve Bromodeoksiüridin testleri, proliferasyon değerlendirme yöntemleri arasında yer almaktadır (Demirci ve Tuncer, 2011).

2.9.3.4 Metabolik sitotoksisite değerlendirme testleri

Örnek sayısının fazla olduğu durumlarda yaşam değerlendirme testlerinin hazırlık aşamasının uzun sürmesi, test analizlerinin zaman alması ve zahmetli olması nedenleriyle

metabolizma değerlendirme testleri alternatif test yöntemi olarak geliştirilmiştir. Metabolizma değerlendirme testleri, doğrudan hücre canlılığını ölçmek için kullanılmamakla birlikte, hücre sayısındaki artış, DNA ya da protein sentezinin belirlenmesi yoluyla devam eden metabolik aktiviteyi saptamaya olanak tanımaktadır. Metabolizma testleri ve protein içerik analizleri aracılığıyla, uzun vadede meydana gelebilecek hasarın anlaşılabilmesi amacıyla hücrelerin metabolik veya proliferatif kapasiteleri değerlendirilmektedir.

Ucuz ve hızlı bir yöntem olan metabolizma değerlendirme testlerinde, mikrolaka okuyuculu spektrofotometre yardımıyla hücrelerin canlılıkları tespit edilmektedir. Laktat dehidrogenaz (LDH) testi, alamar mavisi testi ve kolorimetrik MTT testi bu gruba giren testlerdir. Bu yöntemde, genellikle daha hassas çalışmalar gerektiren hücrelerin metabolik veya proliferatif kapasiteleri ile enzim aktivitesi bozulmaları, mikrolaka okuyucu spektrofotometre yardımıyla ölçülmekte ve değerlendirilmektedir (Freshney, 2005) (Yıldırım ve ark., n.d.). Bu testlerle doğrudan hücre canlılığı değerlendirmesi yapılamamaktadır. Ancak, bu testler hücre sayısındaki net artışı, toplam protein miktarını veya DNA artışını belirleyebilmektedir (Vidal ve ark., 2017) (Damas ve ark., 2011).

2.9.4 MTT Yöntemi

Suda çözünebilen bir tetrazolyum tuzu olan MTT testi, dental malzemelerin sitotoksitesinin belirlenmesinde sıkça kullanılan bir yöntemdir (Fotakis ve Timbrell, 2006). Kolorimetrik bir test olan MTT testinde, hücrelerdeki dehidrogenaz enzim aktivitesi ölçülür. Materyalin sitotoksik etkisi sonucunda, hücrelerdeki dehidrogenaz aktivitesi bozulur ve mitokondrinin aktif olduğu hücrelerde mavi renkli formazan oluşumu gözlenmez. Materyalin sitotoksikite miktarını belirlemek için oluşan formazan, optik yoğunluk ölçülerek ya da elektron mikroskobu ile değerlendirilen formazan ışığı ile analiz edilir (Jenkins, 1999). MTT testi, çok sayıda hücre kültüründe canlı hücre oranının belirlenmesinde kolay, güvenilir ve hızlı bir yöntem olarak kullanılır. Ayrıca bu test, büyüme döngüsünün herhangi bir evresindeki canlı hücre yoğunluğu hakkında da bilgi sağlar (Niu ve ark., 2001).

2.10 İLAÇ FORMÜLASYON GELİŞTİRMEDE KALİTE KAVRAMI

2.10.1 Kalite ve Kalite Kontrolü

Frederick Taylor, 1911 yılında yayımlanan *Bilimsel Yönetimin İlkeleri* adlı eserinde kalite kontrol kavramını literatüre kazandırmıştır. Bu çalışmasında sistemlerdeki kusurları ayrıntılı bir şekilde analiz etmiş ve denetimin önemine dikkat çekmiştir. Taylor'ın bu prosedürlerinin tıp alanına resmi olarak entegrasyonu ve farmasötik endüstrisinin kalite kavramını benimsemesi, 'İyi Üretim Uygulamaları' (GMP) kurallarının pratik uygulamalara dahil edilmesini zorunlu kılmıştır. Bu süreç, farmasötik ürünlerin hastalara uygulanmadan önce gerekli kalite standartlarına uygun olup olmadığının değerlendirilmesini gerektirmekte ve bu değerlendirme, GMP'nin temel bir bileşeni ve zorunlu bir ön koşulu haline gelmiştir (Gundogdu ve ark., 2020).

Uluslararası Teknik Gerekliliklerin Uyumlaştırılması Konseyi (ICH), 1990 yılında Amerika Birleşik Devletleri, Avrupa ve Japonya'nın ortak girişimiyle kurulmuştur. ICH amacı doğrultusunda, kalite, verimlilik, güvenlik ve multidisipliner alanlarda farmasötik otoriteler ile endüstri arasındaki iş birliğini artırmaya yönelik güncel yönergeler yayınlamıştır. Bu konsey, Farmasötik ürünlerin son halinin ve aktif bileşenlerin kalite açısından dikkate alınması gereken faktörlerinin vurgulandığı kalite rehberi sunmuştur. Bitmiş farmasötik ürünler için kalite testlerinin ayrıntılarını açıklayan ICH Q6 kılavuzu, Yönlendirme Komitesi tarafından onaylanmış ve 1997 yılında ilk kez yayımlanmıştır (Beg ve ark., 2019; F. Wang ve ark., 2023).

Bu rehber, bir farmasötik ürünün piyasaya sunulmadan önce gerçekleştirilmesi gereken kapsamlı incelemeleri içermektedir. İlgili prosedürler, kalite kontrol süreci olarak tanımlanır ve bu süreç; laboratuvar operasyonları, üretim sürecinde kullanılan veya harcanan tüm materyallerin detaylı analizi, ara değerlendirmeler ve nihai ürün örneklerinin incelenmesi faaliyetlerini kapsamaktadır. Farmasötik sektörde kalite yönetimi alanındaki en son gelişme, 2008 yılında ICH Q10 "Farmasötik Kalite Sistemi"nin onaylanmasıdır. ICH Q10 kılavuzunun ana odağı, kalite politikası, yönetim yükümlülükleri, süreç performansının ve ürün kalitesinin sürekli iyileştirilmesi ve farmasötik kalite sisteminin devamlı geliştirilmesi konularına yöneliktir (Aksu ve Mesut, 2015).

ICH Q10, sürekli gelişim ve iyileştirme süreci boyunca güçlü ve optimal bir ilaç ürünü geliştirilmesinin önemini vurgulayan tamamlayıcı bir kılavuzdur. Aynı zamanda, ürün trendlerini takip etme uygulaması da bu sürecin bir parçasıdır. Trend takibi, çeşitli istatistiksel araçların kullanılmasını içerir. Bu araçlar sayesinde, nihai ürünün hem anlık hem de uzun vadeli durumu değerlendirilebilir ve süreç matematiksel yöntemlerle izlenebilir. Bu çalışma, ürünle ilgili sonrası ruhsatlandırma süreçlerini ve yönergelerini kapsamaktadır. ICH, farmasötik ürünlerin kayıt sonrası takibi ve geliştirme çalışmalarına önemli bir vurgu yapmaktadır. Bu bağlamda, ICH Q8 Farmasötik Geliştirme kılavuzu 2004 yılında yayımlanmış ve değerlendirilmesi için geri bildirim açılmıştır. Bu kılavuz, ICH Q9 Risk Değerlendirme yönergeleri ile, Ar-Ge aşamasında ilaç ürünlerinin uygun şekilde tasarlanmasını sağlamak, kayıt sonrası ilaç üreticileri ve düzenleyici otoritelerin iş yükünü azaltmak ve kullanım sırasında beklenen etkileri gösteren ilaçların geliştirilmesini kolaylaştırmak için hizmet vermektedir. Kaliteye Dayalı Tasarım (QbD), adım adım risk değerlendirme metodolojisi ve istatistiksel araçlar kullanan yenilikçi bir yaklaşımdır (L. X. Yu ve ark., 2014).

2.10.2 QbD Kavramı ve Faydaları

2002 yılı FDA tarafından ICH Q8 aracılığıyla ilk defa “Kalite ile Tasarım” (QbD) kavramı tanıtılmıştır. Bu yönerge, ilaç geliştiricilere bir ürün ve üretim sürecini geliştirmek için bilimsel yaklaşımları ve kalite risk yönetimini nasıl kullanacakları konusunda talimatlar sunmaktadır (L. X. Yu ve ark., 2014). Amaç, QbD prensipleri gibi yenilikçi teknolojiler kullanılarak ürün ve üretim sürecinin kapsamlı bir şekilde anlaşılmasını sağlamaktır. Ayrıca, bu yönerge, ürünün tüm yaşam döngüsü boyunca yeniliği destekleme ve sürekli iyileştirme olanakları sunmaktadır (Burger ve Wolff, 2012).

ICH Q8 kılavuzuna göre, QbD, önceden belirlenen hedeflerle başlayan ve ürün ile üretim süreci hakkında derinlemesine bir anlayış geliştirmeyi, aynı zamanda süreç düzenlemesini güvenilir bilimsel prensipler ve kalite risk yönetimi temeline dayandırmayı önceliklendiren metodik bir ürün geliştirme stratejisidir (Aksu ve Mesut, 2015). Farmasötik Kaliteye Dayalı Tasarım (QbD) metodolojisi, ürün ve süreç özelliklerinin başlangıç değerlendirmesini yaparak ve uygun üretim kontrollerini uygulayarak farmasötik ürünlerin hedeflenen kalitesini garanti eder (Maciej Serda ve ark., 2015).

QbD, nihai farmasötik ürünün baştan itibaren belirlenen özelliklere sürekli olarak uyum sağlamasını ve bu sayede “ilk seferde doğru” bir sonuç elde edilmesini sağlar. QbD metodolojisi, ilacın tasarımının bilimsel prensipler ve kalite unsurlarına dayalı olarak, erken planlama ve değerlendirme aşamalarından itibaren şekillendirilmesini sağlamaktadır (Gundogdu ve ark., 2020).

2.10.2.1 QBD aşamaları

Hedef ürün profilinin belirlenmesi (TPP)

TPP'nin belirlenmesi, hedef hasta popülasyonu, ilacın uygulama yolu, uygun dozaj, terapötik doz aralığı ve farmasötik dozaj formunun fiziksel özellikleri gibi çeşitli faktörlere dayanmaktadır. Daha açık bir şekilde ifade etmek gerekirse, TPP belgesi, ilacın klinik ve farmakolojik özelliklerinin kısa ve öz bir şekilde özetini sunmaktadır (Aksu ve Mesut, 2015).

Kalite hedef ürün profilinin tanımlanması (QTPP),

Kalite Hedef Ürün Profili (QTPP), bir farmasötik ürünün hedeflenen kaliteyi garanti etmek amacıyla elde edilmesi gereken kalite özelliklerinin ileriye dönük bir özeti olarak tanımlanmıştır. Bu özellikler, ilacın güvenliği ve etkinliği göz önünde bulundurularak belirlenir. Söz konusu unsurlar, dozaj formu ve bu forma uygun uygulama yolu, dozaj formunun kuvvetleri, terapötik bileşenin salımı veya iletimi ve geliştirilmekte olan belirli dozaj formuna ilişkin farmakokinetik özellikleri kapsar. Bu özellikler, çözünürlük ve aerodinamik performansı içerebilirken, kalite kriterleri arasında ise sterilite ve saflık gibi, pazara sunulacak ürün için uygun kabul edilen kriterler yer almaktadır (L. X. Yu ve ark., 2014).

Kritik kalite niteliklerinin belirlenmesi (CQA)

CQA, fiziksel, kimyasal, biyolojik veya mikrobiyolojik nitelikteki bir özellik veya karakteristiği ifade eder ve ürünün hedeflenen kalitesinin garanti altına alınabilmesi için uygun bir limit, aralık veya dağılım içinde olması gerekir. Süreç geliştirmeye başlanmadan önce, ürünün Kritik Kalite Niteliklerinin (CQA) belirlenmesi zorunludur, çünkü süreç geliştirme, CQA tarafından belirtilen istenen ürün kalitesinin ve istenen tek düzenliliğinin

elde edilmesini sağlamalıdır. CQA listelerinin, yürütülen devam eden prelinik, stabilite ve klinik araştırmalardan elde edilen veriler ışığında ürün geliştirme sürecinin önemli aşamalarında periyodik olarak yeniden değerlendirilmesi beklenmektedir. Bu gibi durumlarda, sürecin yetkinliğinin değerlendirilmesi büyük önem taşımaktadır (Beg ve ark., 2019; F. Wang ve ark., 2023).

Kritik malzeme niteliklerinin ve kritik proses parametrelerinin belirlenmesi

QbD metodolojisinde Kritik Kalite Nitelikleri (CQA), öncelikle formülasyon hazırlığında kullanılan malzemelerin özellikleri ve uygulanan sürecin özellikleri tarafından etkilenir. Malzemeler ve süreçlere ilişkin girdiler Kritik Malzeme Nitelikleri ve Kritik Proses Parametreleri olarak adlandırılmaktadır. Bir maddenin kritik veya kritik olmayan olarak sınıflandırılması, güvenlik, etkinlik ve kalite üzerindeki etkisi, risk değerlendirme metodolojisi kullanılarak yapılacak bir değerlendirme ile belirlenir (L. X. Yu ve ark., 2014)..

Tasarım alanı oluşturma

Tasarım Alanı kavramı, gerekli formülasyonların gerçekleştirileceği belirli zaman dilimlerinin tespit edilmesini ve ardından bu formülasyonların belirtilen zaman aralıkları içinde uygulanmasını içerir. Tasarım Alanı'nın doğru bir şekilde oluşturulması, uygun bir veri setinin kullanılması açısından büyük önem taşımaktadır. Veri aralığının doğru bir şekilde oluşturulması, optimizasyon bulguları ve yüksek kaliteli ürünler üretmeye yönelik tasarlanmış yapay zekâ algoritmalarının doğru bir şekilde değerlendirilmesi için kritik bir faktördür. Bu yapılmadığı takdirde, yanlış değerlendirmeler ve alt optimal sonuçlar ortaya çıkabilir (Beg ve ark., 2019).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu tez çalışması için Altınbaş Üniversitesi Bilimsel Araştırma Etik Kurulu'nun 08.08.2024 tarihli ve 1 sayılı toplantısında, 20 sayılı karar ile etik kural onayı alınmıştır.

Bu tez çalışmasında; İloprost etken maddesinin vital pulpa tedavilerinde potansiyel bir biyomsteryal olarak kullanılabilirliği değerlendirilmiştir; İloprost'un insan dental pulpa mezenkimal kök hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi ve VEGF gen ekspresyonu seviyesi üzerindeki etkisi incelenmiştir. Ayrıca İloprost'un kontrollü salımını sağlamak amacıyla Poloksamer 407 (P407) ve Poloksamer 188 (P188) polimerlerinin birleştirilerek sıcaklığa duyarlı enjekte edilebilir bir hidrojel formülasyonu geliştirilmiştir.

İloprost etken maddesinin ve poloksamer 407/188 in birleştirilmesiyle elde edilen sıcaklığa duyarlı hidrojin hazırlanması ve karakterizasyonu için yapılan çalışmalar Altınbaş Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir. SEM analizi için Yıldız Teknik Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı araştırma merkezi kullanılmıştır. Reoloji testi ise Bezmialem Üniversitesi İlaç Uygulama ve Araştırma Merkezinde yapılmıştır. Optimum formülasyonun insan dental pulpa kök hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisini incelemek için hücre kültürlerinin hazırlanması ve MTT analizi Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi İmmünoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir. Real-time PCR analizi Gen-Era Ar. Ge. San. Tic. Ltd. Şti. Laboratuvarı'nda yapılmıştır.

3.1 FORMÜLASYONUN HAZIRLANMASINDA KULLANILAN KİMYASAL MADDELER, ARAÇLAR VE GEREÇLER

Çalışmada kullanılan kimyasallar (Tablo 3.1), cihazlar (Tablo 3.2) ve kullanılan bilgisayar programlar (Tablo 3.3) tablolarda gösterilmektedir.

Tablo 3.1: Formülasyonun Hazırlanmasında Kullanılan Kimyasallar.

KİMYASALLAR	FİRMA
Benzoik Asit	SIGMA, ABD
Etanol	SIGMA, ABD
Fosfat Tamponu	SIGMA, ABD
Iloprost	CAYMAN, ABD
Poloksamer 407	BASF, ALMANYA
Poloksamer 188	BASF, ALMANYA
Ultra saf su	ATAMAN KİMYA, TÜRKİYE

Tablo 3.2: Formülasyonun Hazırlanmasında Kullanılan Cihazlar.

CİHAZLAR	MARKA ve ÜRETİCİ FİRMA
Tekstür Analiz Cihazı	TA-XT plus C Texture analyser, Birleşik Krallık
Vizkozimetre	Myr VR 3000, İspanya
FTIR Spektroskopisi	IRAffinity-1S, Shimadzu, Japonya
pH metre	Table top pH meter, ISOLAB, Germany
Dijital termometre	TP- Digital thermometer, Hindistan
Analitik terazi	Sartorius, Almanya
Ultrasonik su banyosu	SK7210HP, KUDOS, Çin
İnkubatör	Memmert Incubator, Almanya
UV-Vis spektrofotometre	UV-1800, SHIMADZU, Japonya
Reometre	Anton Paar- MCR 102, Almanya

Tablo 3.3 Formülasyon Hazırlanmasında Kullanılan Bilgisayar Programları.

MODDE®	(Sartorius Stedim Biotech Data Analytics AB, Almanya)
Microsoft Office	Version 2023. Washington, ABD.

3.2 FORMÜLASYONUN HAZIRLANMASI

3.2.1 İloprost'un Fizikokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi

3.2.1.1 İloprost'un fiziksel görünümü ve pH değerinin ölçülmesi

Formülasyon hazırlanmadan önce İloprost'un (Şekil 3.1) fiziksel görünümü değerlendirilmiş ve pH değeri ölçülmüştür. pH değeri belirlenirken Isolab pH metre cihazı (Şekil 3.2) kullanılmıştır. pH değerleri 4, 7, 10 olan standart çözeltilerle kalibre edilmiş elektronik pH metre kullanarak etken maddenin pH değeri ölçülmüştür.



Şekil 3.1: İloprost.



Şekil 3.2: pH Metrenin Kalibre Edilmesi.

3.2.1.2 İloprost'un çözünürlüğünün değerlendirilmesi

Aktif bileşenin ultra saflaştırılmış suda çözünürlüğünü değerlendirmek amacı ile 9.5 mL distile su içine yaklaşık 50 µg İloprost eklenerek $35 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 'de tıpalı bir test tüpünde çalkalanarak çözünürlük analizleri üç tekrar halinde gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.3).



Şekil 3.3: Çözünürlük Çalışması.

3.2.1.3 İloprost'un FT-IR spektrumunun belirlenmesi

İloprost (Cayman,18215-500ug %97), P407 (Sigma Aldrich,16758-250g), P188 (Colliphor p188, BASF) ve Benzoik asit (Sigma Aldrich, USA) 1:1a/a oranında hazırlanarak uyumlulukları FTIR spektroskopisi kullanılarak değerlendirilmiştir. Her bir madde sıvı formda IRAffinity Shimadzu makinesinin elmas kristalli örnek bölmesine yerleştirilerek (Şekil 3.4) 400 – 4000⁻¹ cm dalga aralığında spektrumlar elde edilmiştir.



Şekil 3.4 FTIR Spektrofotometresi.

3.2.1.4 İloprost'un UV spektrumunun belirlenmesi ve λ_{max} ölçülmesi

Standart kalibrasyon eğrisinin oluşturulabilmesi amacıyla, İloprost etken maddesinin maksimum absorbans gösterdiği dalga boyunun (λ_{max}) belirlenmesi için çift ışınlı UV-Vis spektrofotometre cihazı (UV-1800, Shimadzu) (Şekil 3.5) kullanılmıştır. Öncelikle saf su ile kalibre edilen spektrofotometrede daha sonra saf suda 50 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyona sahip İloprost çözeltisinin spektrumu 200 – 700 nm dalga boyu aralığında ölçülmüştür. Elde edilen spektrumda, İloprost'un maksimum absorbans gösterdiği dalga boyları (λ_{max}) saptanmıştır. Bu işlem 3 defa tekrarlanmıştır.



Şekil 3.5: UV-Vis Spektrofotometresi.

3.2.2 İloprost İçin Spektrofotometrik Yöntemin Validasyonu

3.2.2.1 Doğrusallık

Analitik yöntemin doğrusallığı, belirli bir konsantrasyon aralığında elde edilen test sonuçlarının, ilgili madde ve/veya etken madde konsantrasyonu ile doğru orantıya sahip olmasıdır. Bu çalışma kapsamında İloprost'un suda 50 ug/ml konsantrasyonda stok çözeltisi hazırlanmıştır. Bu stok çözelti seyreltilerek 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,56, 0,78, 0,39 ug/ml konsantrasyonlarında çözeltiler elde edilmiştir. Bu çözeltilerin absorpsiyonları, maksimum dalga boyu olan 197 nm'de Uv-vis spektrofotometre ile ölçülmüş ve bu veriler kullanılarak kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. Elde edilen verilerle doğrusal regresyon denklemi elde edilmiş, determinasyon katsayısı (R^2) ve standart sapma (SS) değerleri hesaplanmıştır.

3.2.3 ÖN FORMÜLASYON ÇALIŞMALARI

Ön formülasyon çalışmaları, formülasyona eklenecek etken madde ve yardımcı maddelerin fizikokimyasal, biyofarmasötik ve stabilite özelliklerinin belirlenerek, en uygun farmasötik formülasyonun geliştirilmesine yönelik yapılan temel araştırmalardır. Ön formülasyon çalışmalarında kullanılacak P 407 ve P 188 miktarlarına karar vermek için literatür taraması yapılmıştır ve yapılan çalışmalarda polimer miktarları göz önüne alınarak Tablo 3.4' de

verilen konsantrasyonlardaki jeller distile su ile toplam 50 grama tamamlanacak şekilde hazırlanmıştır. Hazırlanırken soğuk yöntem kullanılarak oda sıcaklığında (24 ± 2 °C) 0.5, 1, 2, 3, 6, 12, ve 24 saat boyunca manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Bu süreler sonunda karışımın homojenlik, viskozite ve jelleşme sıcaklığı olmak üzere 3 farklı fiziksel parametresi görsel olarak incelenmiştir.

Tablo 3.4: Ön Formülasyon Çalışmalarında Kullanılan Konsantrasyonlar.

Polimer Tipi	Konsantrasyon (% a/a)				
Formülasyon Kodu	F1	F2	F3	F4	F5
Poloksamer 407	0.5	5	8	15	20
Poloksamer 188	0.5	5	8	15	20

3.3 FORMÜLASYON GELİŞTİRMEDE QBD YAKLAŞIM KULLANILMASI

Bu çalışmalar QbD yaklaşımına uygun bir şekilde ürün geliştirebilmek için ‘hedeflenen ürün kalite profili’ ne göre kritik parametreler belirlenmiş ve bu parametrelerin kalite üzerinde oluşturdukları potansiyel riskler tanımlanıp bu riskleri en aza indirmek için istatistiksel deney tasarımlarından yararlanılarak optimum bir ilaç tasarımı elde edilmiştir.

3.3.1 Hedef ürün kalite profili

QbD odaklı yaklaşımı kullanarak bir ürün geliştirmenin ilk adımı, Kalite hedef ürün profilini (QTPP) belirlemektir. Hedef ürünün kalite profilini ve temel kalite özelliklerini belirlemek için hedeflenen ürünün özellikleri tanımlanmıştır. Tablo 3.5’ de detaylı olarak hedeflediğimiz ürünün QTPP’si, dozaj formu, uygulama yolu, uygun dozaj, ambalajı, terapötik endikasyon, stabilite ve görünümü gibi hedef ürün kalite profili sunulmuştur.

Tablo 3.5: Hedef Ürün Profili ve Gerekçeleri.

HEDEF ÜRÜN PROFİLİ	HEDEF	GEREKÇE
Dozaj form	İn situ jel (poloksamer bazlı)	Biyoyararlanımı artırır, doz sıklığını azaltır ve kontrollü ilaç salımı sağlar.
Uygulama Yolu	Lokal	Lokal etki sistemik yan etkiler azaltır. Diş pulpasına doğrudan uygulanabilir
Uygun Doz	10 ⁻⁶	Etki göstermek için gerekli konsantrasyon
Ambalajı	Cam şişe	Olası bozulma ve etkileşimi önlemek için.
Terapötik endikasyon	Vital pulpa tedavileri	İloprost vazodilatör etkisiyle pulpada kan akışını artıracak, anti-inflamatuvar etkisiyle inflamasyonu azaltacak ve hücre rejenerasyonunu teşvik edecektir.
Stabilite	En az 3 ay raf ömrü	Kabul edilen raf ömrüne eşdeğer veya bundan daha iyi
Biyoyumluluk	Biyoyumlu olmalı	Dokulara zarar vermemeli, tahriş ve alerjik reaksiyon riskini en aza indirmelidir

3.3.1.1 Kritik kalite özellikleri (CQA)

QbD'de yaklaşımında ikinci aşama CQA'ların taranması ve değerlendirilmesidir (Tablo 3.6). CQA'lar, tipik olarak bir ürünün performansını etkileyen fiziko-kimyasal ve biyolojik faktörler gibi tanımlanmış özelliklerdir. İstenen ürün kalite profilini elde etmek için, nihai ürünün kalitesini, etkinliğini ve güvenliğini etkileyen CQA'ları belirlemek amacıyla (Tablo 3.6) hazırlanmıştır.

Tablo 3.6: Kritik Kalite Özellikleri.

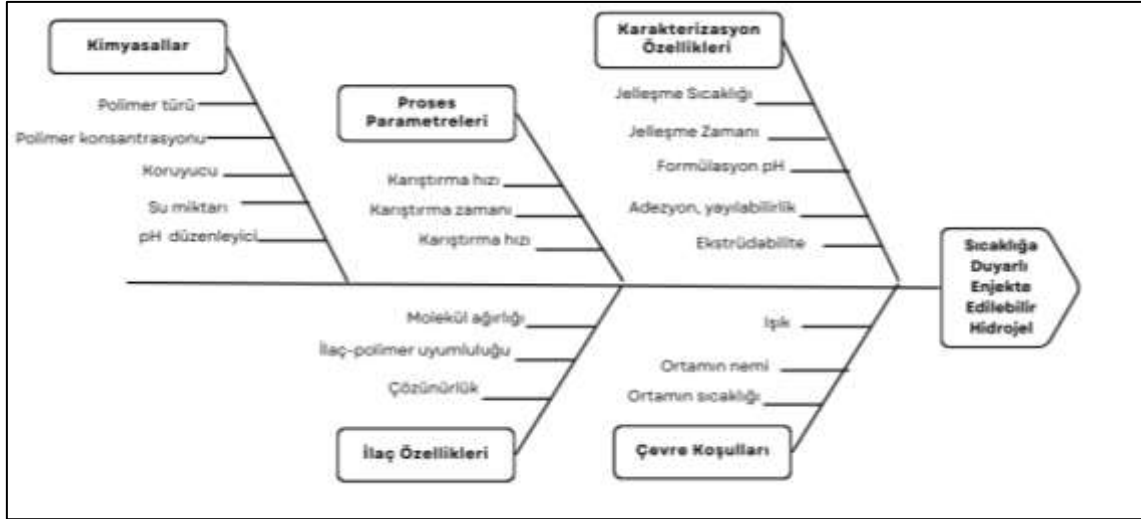
CQA'lar	Hedef	Kritik kalite özelliği mi?	Açıklama
37°C'de viskozite	5000-400000 mPa.s	Evet	Vücut sıcaklığındaki jel formu yerinde kalacak şekilde yoğun bir formda olmalıdır.
25°C'de viskozite	50 - 200 mPa.s	Evet	Oda sıcaklığında sıvı formda olması gerekir.
Jelleşme zamanı	30 saniyenin altında	Evet	Ağız içine uygulandığında en kısa sürede jelleşmelidir.
Jelleşme sıcaklığı	26° C – 37° C	Evet	Ağızdaki sıcaklık değişebileceğinden maksimum 37°C sıcaklıkta jelleşmesi gerekmektedir.
pH	Kan pH'a yakın	Hayır	Formülasyon hazırlanırken kontrol edilebilir
Renk ve Berraklık	Transparan	Hayır	Formülasyon hazırlanırken kontrol edilebilir
Koku	Hoş olmayan bir koku	Hayır	Formülasyon hazırlanırken kontrol edilebilir.

3.3.1.2 Risk değerlendirme çalışmaları

Sıcaklığa duyarlı hidrojel için kritik kalite özellikleri olarak belirlenen viskozite ve jelleşme sıcaklığı, ilaç geliştirme çalışmaları sırasında incelenecektir. Kritik kalite özelliklerini etkileyen, kritik materyal özellikleri (CQA) ve kritik proses parametreleri (CPP) risk değerlendirilmesi sonucunda belirlenmiştir.

Balık kılçığı modeli

Çalışmada kritik parametreler belirlenirken Şekil 3.6'de gösterildiği gibi balık kılçığı modeli (Ishikawa diyagramı) kullanılmıştır. Sebep sonuç diyagramı olarak da bilinen Ishikawa diyagramı, formülasyon geliştirme sırasında değerlendirilen potansiyel risk faktörlerini ve bunlara karşılık gelen nedenleri tanımlayabilen temel bir risk değerlendirme kolaylaştırma yöntemidir. Ishikawa diyagramı yardımıyla bitmiş ürün kalitesi üzerinde etkili olabilecek malzeme, ekipman ve parametreleri sıralanmıştır.



Şekil 3.6: Ishikawa Diyagramı.

Başlangıç risk modeli

Risk değerlendirme modeli (Risk Estimation Matrix (REM)), risk olasılığına dayalı olarak oluşturulan formülasyonda risk taşıyan bileşenler “yüksek”, “orta” veya “düşük” olarak derecelendirilmiştir. Bu risk değerlendirmesinde risk seviyeleri yapılan 5 ön çalışma sonuçlarına ve literatürden toplanan verilere göre belirlenmiştir.

Tablo 3.7: Risk Sınıflandırması.

SEVİYE	RİSK TANIMI
DÜŞÜK	Risk seviyesi tamamen kabul edilebilir düzeydedir. Ek araştırma veya müdahale gerektirmez.
ORTA	Risk seviyesi sınırda kabul edilebilir olup, riskin azaltılması veya ortadan kaldırılması için ilave araştırma veya değerlendirme gerekebilir.
YÜKSEK	Risk seviyesi kabul edilemez düzeydedir. Kritik kontrol noktalarının belirlenmesi ve kapsamlı araştırmaların yapılması zorunludur

Tablo 3.7’de gösterilen risk seviyelerine göre üretim sürecinin aktif bileşenlerinin, yardımcı maddelerinin ve işlemlerinin özellikleri için bir başlangıç risk değerlendirmesi yapılmıştır (Tablo 3.8).

Tablo 3.8: Risk Değerlendirme Göstergesi.

CQA	Materyal Özellikleri ve İşlem Parametreleri					
	İLOPROST	ULTRA SAF SU	P 407	P 188	BENZOİK ASİT	FOSFAT TAMPONU
pH	Düşük	Düşük	Düşük	Düşük	Düşük	Yüksek
Viskozite	Düşük	Yüksek	Yüksek	Yüksek	Düşük	Düşük
Yayılabilirlik	Düşük	Düşük	Yüksek	Yüksek	Düşük	Düşük
Adezyon	Düşük	Orta	Yüksek	Yüksek	Düşük	Düşük
Tutarlılık	Düşük	Düşük	Yüksek	Yüksek	Düşük	Düşük
Ekstrüdatebilirlik	Düşük	Düşük	Yüksek	Yüksek	Düşük	Düşük
Kohezyon	Düşük	Düşük	Yüksek	Yüksek	Düşük	Düşük
Reolojik Özellikler	Düşük	Orta	Yüksek	Yüksek	Düşük	Düşük
In Vitro ilaç salım	Düşük	Orta	Yüksek	Yüksek	Düşük	Düşük
TOPLAM: Kritik kalite üzerindeki etkileri	Düşük	Orta	Yüksek	Yüksek	Düşük	Düşük

3.3.1.3 Deney tasarımı (DoE) çalışmaları

Yüksek risk düzeyinde sınıflandırılan parametrelerinin (Tablo 3.8’de kırmızı renkle gösterilmiştir) formülasyonun kalitesi üzerindeki etkilerini doğrudan ve yeterli düzeyde ortaya koyamayacağı düşünülmektedir. Bu nedenle, söz konusu etkileri daha sistematik ve kantitatif biçimde değerlendirmek amacıyla deneysel tasarım (DoE) benimsenmiştir. Çeşitli bağımsız ve bağımlı değişkenler, literatürdeki önceki çalışmalara, ön denemeler, risk değerlendirmesi sonuçlarına dayanarak belirlenmiştir (Tablo 3.9). Deneysel çıktılar, 25⁰C viskozite, 37⁰C viskozite, ve jelleşme sıcaklığı (Tablo 3.10) olarak tanımlanmıştır. Bu değişkenlerin istatistiksel olarak optimize edilebilmesi amacıyla, in sitü jel formülasyonuna yönelik tam faktöriyel (full factorial) deneysel tasarım matrisi yapılandırılmıştır. Ön çalışmalar kapsamında, deneysel girdilere ait değişkenler ve çıktı değişkenlerinin minimum

ve maksimum seviyeleri tanımlanmıştır. Etkin madde miktarı sabit tutulmuş ve belirlenen bu parametreler MODDE Pro 12 yazılımına girilerek 12 koşullu deneysel tasarım matrisi oluşturulmuştur (Tablo 3.11). Bu matris doğrultusunda batch formülasyonlar hazırlanmış ve değerlendirilmek üzere karakterizasyon testleri uygulanmıştır.

Tablo 3.9: Girdi Değişkenlerinin Tanımlanması.

Faktör kodları	Girdi Değişkenleri	Ham madde	Düşük (-1)	Yüksek (1)
X1	Polimer	P407	% 10	% 20
X2	Polimer	P188	% 5	% 15
X3	Çözücü	Su	%85	%65

Tablo 3.10: Tasarımdaki Çıktılar.

Yanıt Kodu	Yanıt
Y1	25 ⁰ C Viskozite
Y2	37 ⁰ C Viskozite
Y3	Jelleşme Sıcaklığı

Tablo 3.11: Deney Tasarım Matrisi.

<i>Formülasyon kodları</i>	<i>P407</i>	<i>P188</i>	<i>SU</i>	<i>Benzoik Asit</i>
N1	10	5	84,97	0,03
N2	15	5	79,97	0,03
N3	20	5	74,97	0,03
N4	10	10	79,97	0,03
N5	15	10	74,97	0,03
N6	20	10	69,97	0,03
N7	10	15	74,97	0,03
N8	15	15	69,97	0,03
N9	20	15	64,97	0,03
N10	15	10	74,97	0,03
N11	15	10	74,97	0,03
N12	15	10	74,97	0,03

3.3.2 Deney Tasarım Matrisindeki Formülasyonların Hazırlanması

Gerçekleştirilen ön çalışmalar ve literatürden elde edilen bulgular doğrultusunda, formülasyonda kullanılacak bileşenlerin miktarları belirlenmiştir. QbD yaklaşımı kapsamında yapılan risk değerlendirme ve faktör analizlerine dayanarak minimum sayıda deneme ile optimum formülasyonun elde edilmesi hedeflenmiştir. Bu doğrultuda, deney tasarım matrisine göre 12 farklı in situ jel formülasyonları hazırlanmış ve karakterizasyon çalışmaları için test edilmiştir. Kullanılma gerekçeleri Tablo 3.12’de sunulan bileşenler Modde yazılımı tarafından oluşturulan deney tasarım matrisinde bulunan oranlara göre birleştirilmiştir. Birinci aşamada, P 407 ve P 188 belirlenen oranlarda beherde birleştirmiş ve soğuk yöntem kullanılarak (10-15 derece) 500 rpm’de manyetik karıştırıcı (Şekil 3.7) yardımıyla 12 saat boyunca suda çözündürülmüştür ve su içinde seyreltilmiş olan İloprost çözeltisi sisteme ilave edilmiştir. Çözeltiye 0.03 gram benzoik asit eklenmiş ve karıştırılmaya devam edilmiştir

Tablo 3.12: Formülasyonun İçeriği.

Maddeler	Kullanım Gerekçeleri
İloprost (CAYMAN,18215-500ug %97 saflık)	Etken Madde
Poloksamer P407 (Sigma aldrich,16758-250g)	Jel ajanı
Poloksamer P188 (Colliphor p188, BASF)	Jel ajanı
Benzoik asit (Sigma aldrich, USA)	Koruyucu
Fosfat Tamponu	pH düzenleyici
Su	Çözücü ve taşıyıcı

İkinci aşamada formülasyonun pH'ının fizyolojik aralığa (7.35-7.45) ulaşması amacıyla kademeli olarak fosfat tamponu eklenmiştir. Son olarak formülasyonun tam jelleşmesinin sağlanması için buzdolabında 12 saat boyunca bekletilmiştir.



Şekil 3.7: Manyetik Karıştırıcı.

3.3.3 Optimizasyon Öncesi Karakterizasyon Çalışmaları ve Tasarım Alanı

Deneysel tasarım matrisi doğrultusunda, farklı oranlarda hazırlanan 12 adet in situ jel formülasyonu elde edilmiştir. Bu formülasyonlar üzerinde çeşitli karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda viskozite değerleri ve jelleşme sıcaklıkları detaylı olarak incelenmiş ve değerlendirilmiştir.

3.3.3.1 Viskozite tayini

Hazırlanan in situ jel formülasyonlarının viskozite değerleri, viskozimetre cihazı kullanılarak belirlenmiştir (Şekil 3.8). Formülasyonlar beher içerisine alınarak oda sıcaklığında dengelenmiş ve ölçümler için hazır hâle getirilmiştir. Ölçüm sırasında, cihazda L4 tipi mil ucu kullanılmıştır. Mil 1 ile 100 rpm aralığında döndürülmüş ve 2 dakikalık karıştırma süresinin ardından numunenin viskozite değeri kaydedilmiştir. Aynı prosedür, formülasyonların önce 25 °C, ardından da 37 °C sıcaklıklarda olmak üzere iki farklı koşulda uygulanmıştır. Bu sayede, viskozite değerlerindeki sıcaklığa bağlı değişim değerlendirilmiştir.



Şekil 3.8: Viskozimetre Cihazı.

3.3.3.2 Sol-Jel geçiş sıcaklığı tayini

İn situ jel formülasyonlarından örnek alınarak +4 °C’de soğutulmuş test tüplerine aktarılmıştır. Tüpler, dikey tüp standı ile birlikte su banyosuna yerleştirilmiş ve her 2 dakikada sıcaklık 1°C arttırılarak kademeli olarak ısıtılmıştır (Şekil 3.9). Jelleşme sıcaklığı, test tüpü 90° eğildiği zaman formülasyonun yüzeyinde hareket gözlenmemesi kriterine göre belirlenmiştir. Sıvı formadan jel formuna geçtiği andaki sıcaklık sol-jel geçiş sıcaklığı olarak tanımlanmıştır Tüm deneyler üç tekrar (n=3) şeklinde gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.9: Mekanik Karıştırıcı ve Isıtıcı.

3.3.4 Tasarım Alanının Oluşturulması ve Formülasyonun Optimizasyonu

Formülasyonlara ait karakterizasyon çalışmalarından elde edilen deneysel veriler MODDE® Pro 12.1 yazılımına aktarılmıştır. Optimizasyon süreci kapsamında, üç faktöre dayalı yanıt yüzeyi metodolojisi (Response Surface Methodology, RSM) ve tam faktöriyel deney tasarımı uygulanmıştır. Elde edilen modeller, yazılım tarafından hesaplanan R^2 , Düzeltilmiş R^2 ve Q^2 değerleri doğrultusunda değerlendirilmiş ve analiz sonuçlarına göre, yüksek açıklayıcılık kapasitesi ve tahmin doğruluğuna sahip geçerli modeller elde edilmiştir. Bu kapsamda, belirlenen kriterlere uygun olarak optimum formülasyon başarıyla geliştirilmiştir.

3.3.4.1 Optimum formülasyonun hazırlanması

MODDE® Pro 12.1 yazılımından elde edilen optimum formülasyona göre %18 P 407 ve %5 P 188 bir beher içerisinde soğuk yöntemle (10-15 derece) birleştirilmiştir (Tablo 3.13). Karıştırma işlemi, manyetik karıştırıcı yardımıyla 500 rpm'de 12 saat boyunca ve sonrasında çözeltiye 0.03 gram benzoik asit ilave edilerek 1 saat daha karıştırılmıştır. Formülasyonun pH değeri, fizyolojik sınırlar içerisinde (7.35–7.45) olacak şekilde kademeli olarak fosfat tamponu eklenerek ayarlanmıştır. Son aşamada, İloprost formülasyona ilave edilerek tam hidrasyonunun sağlanabilmesi için numune buzdolabında 12 saat süreyle bekletilerek jelleşme süreci tamamlanmıştır.

Tablo 3.13: Optimum Formülasyonun İçeriği ve Oranları.

Optimum Formülasyon İçeriği	Optimum formülasyon oranları % (a/a)
Poloxamer 407	18
Poloxamer 188	5
İloprost	10^{-6}
Benzoik Asit	0.003
pH tampon	pH' ısı 7.3'e gelene kadar

3.3.5 Optimum Formülasyonun Karakterize Edilmesi

3.3.5.1 Görsel inceleme ve pH değerlendirilmesi

Hazırlanan optimum formülasyon görünüm, renk, fiziksel yapı ve faz ayrımı açısından makroskobik olarak incelenmiştir. Formülasyonun pH'ı Bölüm 3.2.1.1'de anlatılan yöntemle ölçülmüş ve pH okumaları üç kez tekrarlanmıştır.

3.3.5.2 Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ve yüzey morfolojisi

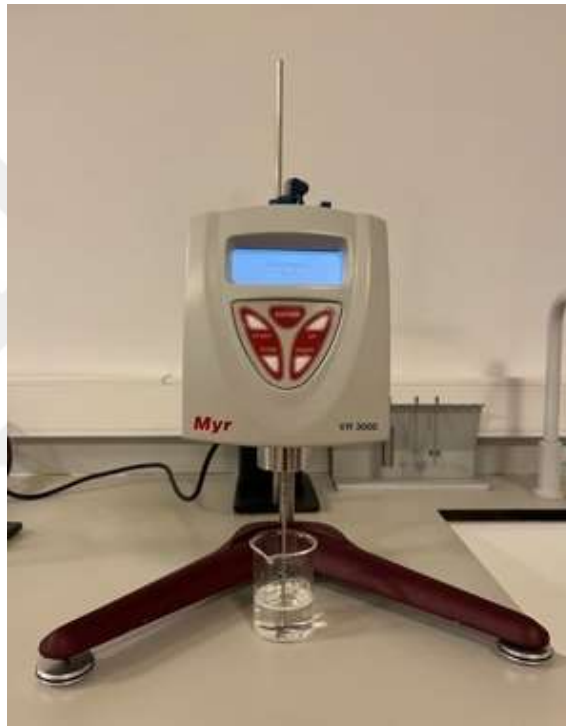
Çalışmamızda örneğin yüzey morfolojisi, partikül büyüklüğü ve mikroyapısal özellikleri Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) kullanılarak değerlendirilmiştir. SEM ile görüntüleme işlemi öncesinde, formülasyona ait numuneler kurutulmuş, ardından analize uygun boyutlarda parçalara ayrılmıştır (Şekil 3.10).



Şekil 3.10: Formülasyonun Kurutulmuş Hali.

3.3.5.3 Viskozite

Formülasyonların viskozite ölçümleri, prob numarası L4 olan Brookfield Dijital viskozimetre (LV DVE tipi) (Şekil 3.11) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Viskozite ölçümleri yapılmadan önce cihaz otomatik olarak sıfırlanmıştır ve prob takılmadan kalibre edilmiştir. Optimum formülasyon hava kabarcıklarının oluşumunu önleyecek bir şekilde behere yerleştirilmiştir. Numunenin viskozitesi 1.5 rpm hızda test edilmiştir. Numunenin sıcaklığı 25° C ve 37 ° C'de olacak şekilde ısıtıldıktan sonra viskozite doğrudan ölçülmüştür. Ölçümler üç örnek olarak yapılmıştır.



Şekil 3.11: Viskozimetre.

3.3.5.4 Yayılabilirlik

Yayılabilirlik ve adezyon analizleri, TTC Yayılabilirlik Probu takılmış TA-XT Plus C Texture Analyser (Stable Micro Systems, United Kingdom) cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.12). Test öncesinde cihaz, kalibre edilmiştir. Cihaz, erkek koni probu ve formülasyonun yerleştirildiği dişi koni adı verilen iki karşılıklı tutucudan oluşmaktadır. Bu iki uç birleştirildiğinde 90° açı oluşturacak şekilde hizalanmıştır. Teste başlamadan önce erkek koni probu, dişi koni numune kabına dikkatlice indirilmiş ve uygun

pozisyon sağlanmıştır. Numune dişi koniye yerleştirilmiş ve test sırasında, formülasyon erkek ve dişi konilerin yüzeyleri arasında 45° açıyla dışa doğru akmaya zorlanmıştır. Hesaplamalar bilgisayar aracılığıyla Exponent yazılımı üzerinden tamamlanmıştır. Ölçüm sırasında karşılaşılan direnç, Newton veya gram cinsinden hesaplanmış; elde edilen eğri üzerinden ortalama maksimum kuvvet ve pozitif eğrinin altındaki alan değerlendirilmiştir. Pozitif eğrinin altındaki kalan alan yayılabilirliğin nicel bir göstergesidir. Adezyon analizinde ise aynı cihaz kullanılarak, ürünün belirli bir yüzeye olan yapışma kuvveti değerlendirilmiştir. Bu testte, ürünü test yüzeyinden ayırmak için gereken maksimum kuvvet ölçülmüş ve ürünün adezivliği bu kuvvet ile orantılı olarak değerlendirilmiştir. Yüzeyler arasındaki bağın koparılması için gereken kuvvetin artışı, adeziv özelliğin yüksek olduğunu göstermektedir. Ölçümler 25 °C ve 37 °C sıcaklıklarda, üçlü tekrarlar gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.12: Tekstür Analiz Cihazı.

3.3.5.5 Tutarlılık, ekstüre edilebilirlik ve kohezivlik

Tutarlılık, ekstüre edilebilirlik ve kohezivlik özelliklerini belirlemek amacıyla Back Extrusion Rig (A/BE) probu takılı tekstür analiz cihazı (TA-XT Plus; Stable Micro Systems) (Şekil 3.12) kullanılmıştır. Formülasyonları yerleştirmeden önce cihaz kalibre edilmiş ve test kabının %75'i in sitü jel ile doldurulmuştur. Ölçüm için gereken kuvvet, Newton veya

gram cinsinden hesaplanmıştır. 2.00 mm/s'lik sabit bir hız testinde, prob 25.00 mm'lik bir mesafeye kadar bastırılmıştır ve ürün diskin kenarlarından yukarı doğru itilmiştir. Ardından, sonda gerçek konumuna geri dönmektedir. Prob başlangıç konumuna döndüğünde, kabın kalkmasını önlemek için güvenli bir şekilde yerinde tutulmaktadır. Tekstür analiz cihazı bilgisayara bağlanarak eğri, ortalama maksimum kuvveti ve ortalama alanı hesaplamak için Exponent yazılım programı kullanılmıştır. Alan ne kadar büyük olursa, oluşturulan jelin kıvamı o kadar yoğun olmaktadır. Bu nedenle tutarlılığı belirlemek için pozitif eğrinin altındaki alan kullanılmıştır. Ekstrüde edilebilirlik için, formülasyona aşağı doğru bastırılırken jeli disk ve kap arasındaki boşluktan çıkarmak için gereken maksimum kuvvet, ekstrüde edilebilirliği tanımlar. Kohezyon, grafik üzerinde negatif olan ve prob dönüşüyle oluşturulan alandır. Numunenin kohezyon değeri ne kadar negatif olursa numune o kadar "koheziv" olur. Testler üç tekrar halinde ve 25 santigrat derece sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir.

3.3.5.6 Reolojik özelliklerin belirlenmesi

Optimum formülasyonun reolojik özelliklerini belirlemek amacıyla Plate Cone CP50-3 sistemine sahip reometre cihazı (Anton Paar, MCR 102, Austria) (Şekil 3.13) kullanılmıştır. Ölçümler, formülasyonun sıcaklık artışıyla birlikte gösterdiği akış davranışlarını ortaya koymak ve sol-jel geçiş noktasını belirlemek amacıyla gerçekleştirilmiştir



Şekil 3.13: Reometre Cihazı.

3.3.5.7 İlaç içeriği tayini

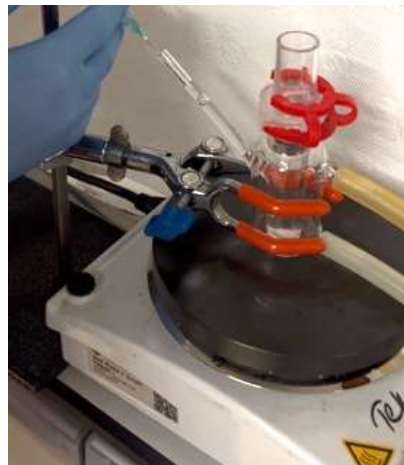
Optimum in sitü jel formülasyonunun etken madde içeriği belirlenirken 1 mL hacmindeki in sitü jel örneği alınarak, daha önce belirlenmiş olan λ_{max} (maksimum absorbands dalga boyu) değerinde UV-Vis spektrofotometre ile analiz edilmiştir. Ölçülen absorbands değerleri, önceden hazırlanmış standart kalibrasyon eğrisi yardımıyla değerlendirilmiş ve formülasyondaki etkin madde miktarı hesaplanmıştır.

3.3.5.8 İn vitro ilaç salım çalışmaları

İn vitro ilaç salım çalışmalarında Franz difüzyon hücreleri (Şekil 3.14) kullanılmıştır. Dializ membran kullanılmadan önce pH 7.4 fosfat tamponu içerisinde 6 saat süreyle bekletilmiştir. Hazırlanan dializ membrane, donör ve reseptör bölmeleri arasına yerleştirilmiş.



Şekil 3.14: Franz Difüzyon Hücresi.



Şekil 3.15: Reseptör Bölmeden Örnek Alınması.

Reseptör bölmesine, 32 °C sıcaklıkta tutulan ve manyetik karıştırıcıyla sürekli karıştırılan 7 mL pH 7.4 fosfat tampon çözeltisi eklenmiştir (Şekil 3.15). Salım süresince, belirli zaman aralıklarında (0, 30, 60, 120, 180, 240, 300 ve 360. dakikalarda) reseptör bölmeden 1 mL örnek alınmış (Şekil 3.16) ve sonrasında aynı hacimde taze tampon çözeltisi eklenerek hacim sabit tutulmuştur. Toplanan örneklerdeki etken madde miktarı, daha önce belirlenmiş dalga boyunda UV-spektrofotometre kullanılarak analiz edilmiştir

3.3.5.9 Stabilite çalışmaları

Optimum formülasyon uygun hava geçirmez kapta tutuldu ve inkübatörde 25 ± 2 ° C ve 60 ± 5 nem oranı Uluslararası Harmonizasyon Topluluğu (ICH) yönergelerine göre bir aylık stabilite testine tabi tutuldu. Örneklerin fiziksel özellikleri, viskozitesi ve pH'ı birinci gün, birinci hafta, ikinci hafta ve birinci ay olarak incelenmiştir.

3.4 HÜCRE KÜLTÜRÜNÜN HAZIRLANMASI VE MTT ANALİZİ

3.4.1 Hücre İzolasyonu ve Kültüründe Kullanılan Cihazlar, Malzemeler ve Solüsyonlar

Hücre izolasyonu ve kültürünün hazırlanması için kullanılan cihaz, malzeme ve solüsyonlar Tablo 3.14 ve Tablo 3.15 ve Tablo 3.16'da ve MTT analizinde kullanılan solüsyonlar ve cihazlar Tablo 3.17'de görülmektedir.

Tablo 3.14: Hücre İzolasyonu ve Kültüründe Kullanılan Cihazlar.

Laminar akım hücre kültür kabini	(Nüve, MN120, Ankara, Türkiye)
37°C Su banyosu	(Nüve, BM 30, Ankara, Türkiye)
CO2'li inkübatör	(Nüve, EC160, Ankara, Türkiye)
Buzdolabı	(+4 °C) (Uğur, Aydın, Türkiye)
İnvert Mikroskop	(Nikon Eclipse Ts2)
Santrifüj Cihazı	(Nüve, NF400R, Ankara, Türkiye)
Mikropipet Seti	(Thermo Fischer, USA)

Tablo 3.15: Hücre İzolasyonu ve Kültüründe Kullanılan Sarf Malzemeler.

Tek kullanımlık, steril plastik Pastör pipeti
Steril pudrasız cerrahi eldiven
Bistüri Uçları
50 ml'lik steril falkon tüpler
15 ml'lik steril santrifüj tübü
75 cm ² ' lik hücre kültür flaskları
25 cm ² ' lik hücre kültür flaskı
24 kuyulu steril hücre kültürü flaskları
48 kuyulu steril hücre kültürü flaskları
0.22 µm steril medyum süzme filtresi
0.45 µm steril medyum süzme filtresi
2 µl- 20 µl'lik otomatik pipet
20 µl-200 µl' lik otomatik pipet
100 µl - 1000 µl'lik otomatik pipet
Şarjlı pipet pompası
Steril petri kabı
Hemasitometre lamı
Kriyotup 1 ml

Tablo 3.16: Hücre İzolasyonu ve Kültüründe Kullanılan Solüsyonlar.

Solüsyon	Marka
%70 Alkol	
Tripan Mavisi Solüsyonu %0.4	Sigma-Aldrich T8154, St. Louis, MO, USA
Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM)	(DMEM, Thermo Fischer;USA; 31885023)
Dublecco' s Phosphate Buffered Saline (DPBS)	(DPBS, Thermo Fischer; USA; 1419094)
Dimetilsülfoksit (DMSO)	DMSO, Santa Cruz, USA; 358801
%0,25 Tripsin EDTA Solüsyonu	Thermo Fischer, USA; 25200056
Penicillin/streptomycin/amfotericin	Thermo Fischer, USA; 15140122
Fetal Sığır Serumu	(FBS; Thermo Fischer, USA; 10270106)
Dimetil sülfoksit	DMSO, SERVA, Almanya
Phosphate Buffered Saline	(PBS, Thermo Fischer; USA; 14200067)

Tablo 3.17: MTT Testinde Kullanılan Solüsyonlar ve Cihazlar.

MTT Solüsyonu	(MTT, Sigma-Aldrich, 475989)
Spektrofotometre	Perkin Elina

3.4.2 Çalışma Çözeltilerinin Hazırlanması

3.4.2.1 Hücre kültürleri için özel besiyeri hazırlanması

%89 DMEM HG (Dulbecco's modified Eagle's medium, 4,5 g/L glikoz) besi ortamı, %1 Penisilin-Streptomisin ve %10 (v/v) inaktif fetal sığır serumu (FBS) birleştirilerek hücre kültürlerine özel besiyeri hazırlanmıştır.

3.4.2.2 Phosphate-Buffered Saline (PBS) solüsyonunun hazırlanması

Hücreleri yıkamak, tamponlamak veya geçici süre saklamak amacı ile 1 tablet Phosphate-Buffered Saline (PBS tablet GİBCO 18912014) 200 mililitre distile su içerisinde eritilmiştir.

3.4.2.3 MTT stok çözeltisi hazırlanması

5 mg MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür] 1 mL PBS içinde çözerek 12 mM stok çözelti hazırlanmıştır.

3.4.3 Dental Pulpa Mezenkimal Kök Hücrelerin Çözülmesi, Pasajlanması ve Çoğaltılması

3.4.3.1 Dental pulpa mezenkimal kök hücre elde edilmesi

Çalışma için gerekli olan hücre numuneleri Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Kök Hücre Birimi'nden temin edilen dondurulmuş insan dental pulpa mezenkimal kök hücreleri kullanılmıştır (Şekil 3.16). Çalışmaya başlama safhasından yani hücre ekim işleminin başlangıç zamanına kadar hücreler -80 °C derin dondurucuda (Nüve DF 490) bekletilmiştir.



Şekil 3.16: Dondurulmuş İnsan Dental Pulpa Kök Hücreleri.

Deney gününe kadar buzdolabında (Nüve DF490) (Şekil 3.17) saklanan kryotüp (Şekil 3.16) çıkartılınca vakit kaybetmeden 37°C'deki su banyosu (Şekil 3.18) içerisinde 1 dk bekletilerek oda sıcaklığında çözünmüş bir hale getirilmiştir. Bu aşamadan sonra yapılan her işlem steril şartlarda ve hava akışlı kabin ortamında gerçekleştirmiştir (Şekil 3.19). Çalışmada kullanılan gereçler %70'lik etanol ile sterilize edilmiştir.



Şekil 3.17: Buzdolabı.



Şekil 3.18: Su Banyosu.



Şekil 3.19: Biyogüvenlik Kabini.



Şekil 3.20: DMEM Solüsyonu.

İçeriği çözünen kryotüp biyogüvenlik kabinine alınmıştır ve üzerine hazırlanan 1 mL DMEM (Şekil 3.20) eklenerek falkon tüpüne aktarılmıştır. Daha sonra falkon tüp (Şekil 3.21) içerisine yaklaşık 5 ml daha DMEM solüsyonu ilave edilmiştir (Şekil 3.22).

Hücreler 1500 rpm (devir/dakika)'de +4°C'de 5 dk santrifüj cihazında (Nüve NF 1200R) (Şekil 3.23) çöktürülmüştür (Şekil 3.24) Santrifüj sonrasında oluşan üst faz (süpernatant) atılmış ve bu şekilde hücre ortamı yıkanarak saklama ortamındaki DMSO uzaklaştırılmıştır.



Şekil 3.21: Kullanılan Falkonlar.



Şekil 3.22: Çözünen Hücrelerin Santrifüj İçin Tüpe Aktarılması.



Şekil 3.23: Santrifüj Cihazı.



Şekil 3.24: Santrifüj Sonrası Hücre Peleti.



Şekil 3.25: Pipetaj İşlemi.

Geriye kalan kısım (hücre peleti) üzerine 1 ml DMEM eklenerek birkaç kez pipetaj (Şekil 3.25) yapılarak homojenize edildi. Homojenize edilen hücrelerin üzerine 8 mL DMEM hücre besiyeri eklenerek T 75 flaska yerleştirildi. Sonrasında 37°C'de, %5 CO₂ içeren %95 nemli ortama sahip olan inkübatörde (New Brunswick Galaxy 170 S) hücrelerin çoğalması için bekletildi (Şekil 3.26).



Şekil 3.26: İnkübatör.

3.4.3.2 Hücrelerin çoğaltılması ve pasajlanması

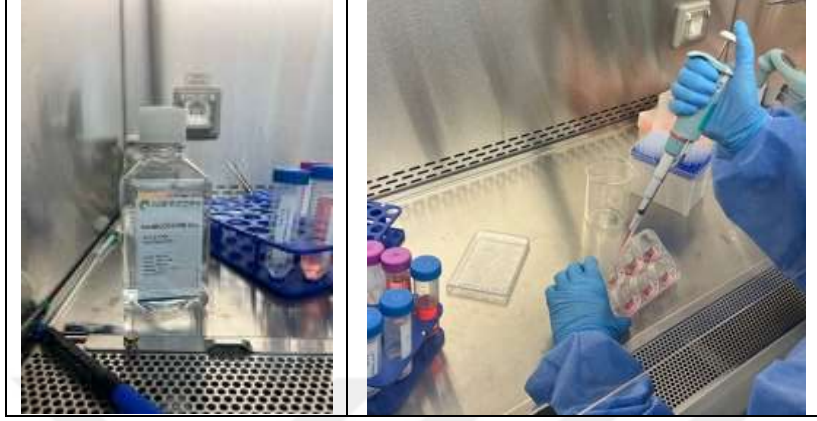
T 75 flask içerisinde inkübatörde bekletilen hücrelerin iki günde bir besiyerleri değiştirilmiştir. Hücreler %70-80 yoğunluğa (Şekil 3.27) ulaşmış konfluent özellik kazandığında, tripsinizasyon yöntemi kullanılarak hem morfolojilerini korumak hem de canlılıklarını yitirmemeleri amacıyla hücrelerin *birinci pasajlama işlemi* (tripsinizasyon) gerçekleştirildi. Birinci kültür işlemi sıfırcı pasaj (P0) olarak kabul edilerek, birinci kültür işleminden sonra her kültür işlemi için pasaj sayıları P1, P2, şeklinde belirlenerek toplamda 3 kez pasajlama işlemi yapılmıştır.



Şekil 3.27: %70-80 Yoğunluğa Ulaşmış Hücreler.

Laminar akışlı steril kabin içerisinde gerçekleştirilen pasajlama işleminde mevcut besi yeri steril pipetlerle aspire edilmiştir. Kültür ortamdaki hücresel atıklar ve serum artılarının arındırılması amacıyla pipet ucu değdirilmeden yapışan hücrelerin yüzeyleri 2 kez 5 mL DPBS (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline) ile yıkanmıştır (Şekil 3.28). Yıkama işlemi sonrasında DPBS solüsyonu uzaklaştırılarak, kuyucukların yüzeylerindeki hücrelerin yüzeyden ve birbirlerinden ayrılmasını sağlamak için pasajlama işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu işlemde yeni bir pipet kullanılarak 37°C' de ısıtılmış 2 mL Tripsin-EDTA solüsyonu (PAN BIOTECH, USA) (Şekil 3.29) hücreler üzerine eklenmiştir ve 37°C inkübatörde 4 dakika bekletilerek hücrelerin yüzeyden ayrılması sağlanmıştır (Şekil 3.30). Bu işlem

sonrasında flask mikroskopik (Leica, Germany) olarak incelendiğinde hücrelerin üretim kabı tabanından serbestleştiği gözlemlenmiştir.



Şekil 3.28: DPBS ve DPBS ile Hücrelerin Yıkınması.



Şekil 3.29: Tripsin-EDTA Solüsyonu.



Şekil 3.30 Hücrelerin Plaka Yüzeyinden Kaldırılması.

4 dk sonunda tripsin enziminin proteolitik etkisinin ortadan kaldırılabilmesi için üzerine tripsinle aynı miktarda özel besiyeri eklenerek, tripsin enzim aktivitesi durdurulmuştur (Şekil 3.31) ve hücreler toplanmıştır.



Şekil 3.31: DMEM Eklerek Tripsin Enzim Aktivite Durdurulması.

Toplanan hücreler 15 ml’lik steril falkon tüpe aktarıldı, 1500 RPM’de 5 dk. santrifüjlenerek (Şekil 3.32) yüzeydeki süpernatant uzaklaştırılmıştır. Çöken hücreler üzerine hazırlanan özel besi yeri eklenerek hücreler nazıkçe süspanse edilmiştir (Şekil 3.33). Bu sırada birkaç kez pipetaj yapılarak hücrelerin homojen şekilde dağılması sağlanmıştır.



Şekil 3.32: Santrifüj.



Şekil 3.33: Hücrelerin Süspanse Edilmesi.

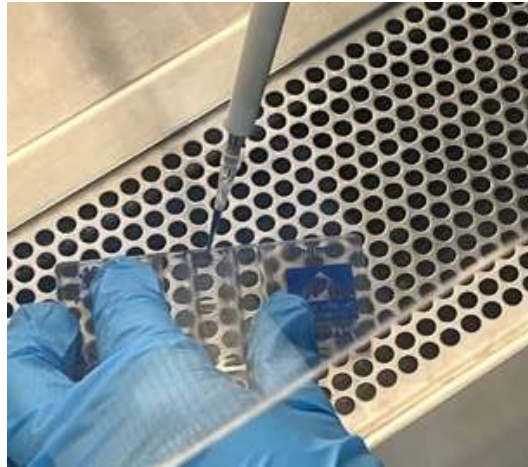
Hücrelerin canlılığı ve sayımı, tripan mavisi boya yöntemi ile Thoma Lamı (Heinz Herenz, Germany) (Şekil 3.34) kullanılarak belirlenmiştir. Bu yöntemde; hücre süspansiyonu üzerine mikropipet yardımıyla %0.4'lük tripan mavisi (Sigma Aldrich, Missouri, ABD) (Şekil 3.35) ile 1:1 oranında karıştırıldıktan sonra, Thoma Lamı üzerine yüklenerek (Şekil 3.36) ışık mikroskobu altında 40x büyütme ile hücre sayımı yapıldı (Şekil 3.37).



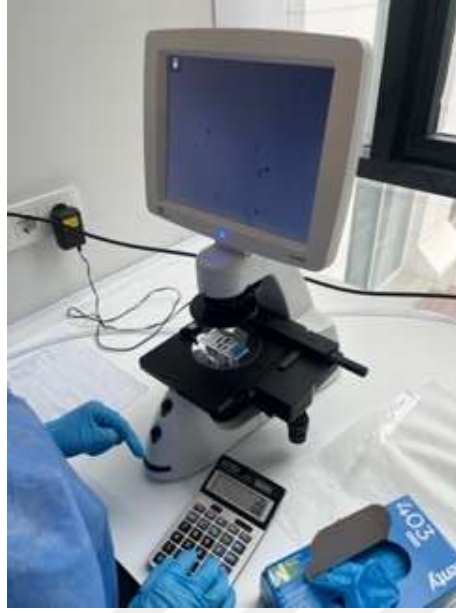
Şekil 3.34: Thoma Lamı.



Şekil 3.35: Tripan Mavisi.



Şekil 3.36: Lama Hücrelerin Yerleştirilmesi.



Şekil 3.37: Hücre Sayılması.

Hücre sayımı için; $Hs \times Do \times Ss$ formülü kullanıldı.

Hs: Mikroskop altında sayılan hücre sayısı

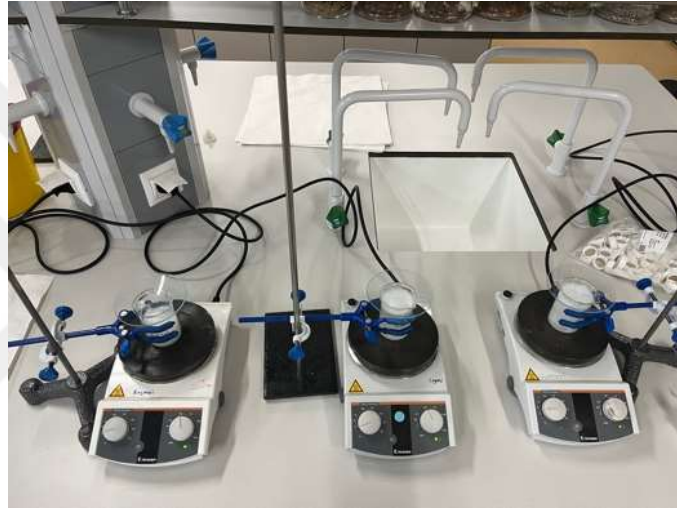
Do: Seyreltme oranı

Ss: Standart sonuç elde etmek için kullanılan sabit sayı (10.000)'dir.

Bu formüle göre elde edilen toplam sayı, 1 ml'de ne kadar sayıda hücre olduğunu gösterdi. Hücre sayım işlemi tamamlandıktan sonra uygun oranda hücre kültür süspansiyonu 10 ml hücre kültür medyumuna ile sulandırılıp homojenize edildi ve 48 kuyucuklu plakaya ekim işlemi yapıldıktan sonra 48 kuyucuklu plaka inkübatöre yerleştirildi. Bu şekilde dental pulpa mezenkimal kök hücrelerin 1. pasajlama işlemi gerçekleştirildi. Her iki günde bir hücre kültür medyumunu değiştirilerek, mikroskop altında hücrelerin konfluent olup olmadığı takip edildi. Hücre kültür işlemleri hücreler 3. pasaja gelene kadar tekrarlandı. Canlılık deneyleri için 3. pasajdaki hücreler kullanıldı. P3'e gelen DPMKH'nden 100000 kadarı PCR işlemi için ayrılırken kalan 10000 sayıdaki hücreler DP-MKH'nin formülasyonlarının uygulanıp MTT analizi yapılması için ayrıldı.

3.4.4 Formülasyonun Farklı Konsantrasyonlarının Hazırlanması

İloprost solüsyonu, %18 P407 ve %5 P188'in birleştirilmesiyle (Şekil 3.38) hazırlanan sıcaklığa duyarlı enjekte edilebilir hidrojelde seyreltilerek formülasyonlar hazırlanmıştır. Grup 1 boş hidrojel, Grup 2 İloprost'un 10^{-6} M konsantrasyonda olacak şekilde hidrojelde seyreltildiği, Grup 3 İloprost'un 2×10^{-6} M konsantrasyonda olacak şekilde hidrojelde seyreltildiği grup olarak hazırlanmıştır. Bu gruplar hazırlanan insan dental pulpa kök hücre kültürlerine uygulanmıştır. Ayrıca İloprost'un seyreltilmesiyle 10^{-6} M (Grup 4) ve 2×10^{-6} M (Grup 5) konsantrasyonlarda hazırlanmıştır (Şekil 3.39).



Şekil 3.38: Formülasyonlar Hazırlanırken Balık Mıknatıs ile Karıştırılması.



Şekil 3.39: MTT Analizi İçin Hazırlanan Formülasyonlar.

Hazırlanan formülasyonlar steril hale getirilebilmek için enjektöre aktarılmış ve sonrasında sırasıyla 0,44'lük ve 0,22'lik (Şekil 3.40) filtrelerden süzölmüştür (Şekil 3.41). Köpük oluşumunu engellemek için sonikasyon yapılmış ve 1 gün +4°C buzdolabında bekletilmiştir.



Şekil 3.40: Enjektör, 0,44'lik ve 0,22'lik Filtre.



Şekil 3.41: Filtrelerden Geçirilmesi.

3.4.5 Dental Pulpa Kök Hücrelerine Formülasyonların Uygulanması

Hücre sayımı yapıp 3. pasaja getirilen hücreler 96 kuyucuklu plaklara her birinde 1×10^5 hücre bulunacak şekilde her grup için ayrı ayrı olmak üzere ekim yapıldı. Ekim işlemi sonrası üzerlerine besiyeri eklenerek inkübatöre konuldu. 4 gün sonra hazırlanan formülasyonlar hücreler üzerine uygulandı. Çalışma gruplarının 24. ve 72. Saat formülasyona maruz kalacak şekilde formülasyonlar hücrelerin üzerine eklendi. Bu sürelerin sonunda besiyerleri değiştirildi (Şekil 3.42) ve hücreler üzerindeki sitotoksiteyi değerlendirmek için MTT solüsyonu hazırlanarak (Şekil 3.43) kuyucuklara uygulanmıştır.



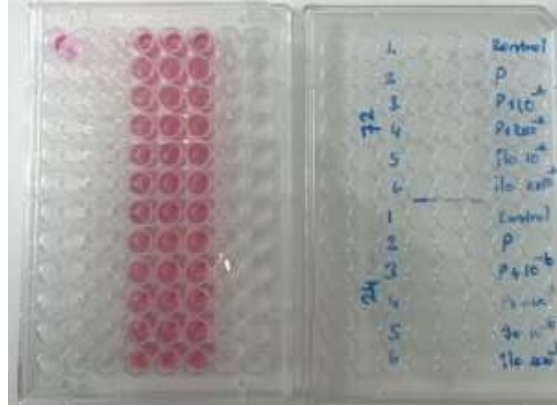
Şekil 3.42: Yeni Besiyerinin Eklenmesi.



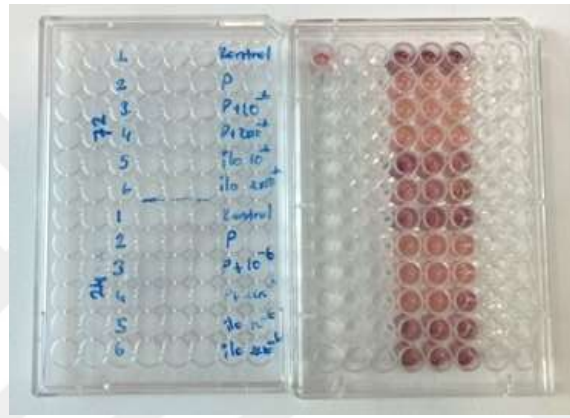
Şekil 3.43: MTT Solüsyonunun Hazırlanması.

3.4.6 MTT Testi ile Sitotoksite Analizi

İloprost'un ve optimum formülasyonun insan dental pulpa kök hücreleri üzerindeki sitotoksitesinin MTT analizi yapılarak değerlendirilmesinde bir adet 96-kuyucuklu well plate kullanılmıştır. Deney saati gelen kuyucuklardaki besiyeri uzaklaştırılmış ve kuyucuklara 110 μ l MTT solüsyonu (her 1 ml DMEM üzerine 100 μ l 12 mM MTT) eklenmiştir (Şekil 3.44). 100 μ L mediuma eklenen 10 μ L MTT stok çözeltisi negatif kontrol olarak kabul edilmiştir. MTT'ye maruz bırakılan hücreler 37 °C'de dört saat boyunca inkübe edilmiştir (Şekil 3.45). Hücre canlılığı 570 nm'de otomatik petri okuyucu (Şekil 3.46) kullanılarak ölçülmüş ve çıkan değerler kontrol grupları ile karşılaştırılmıştır.



Şekil 3.44: Solüsyon Uygulandıktan Hemen Sonra.



Şekil 3.45: Solüsyon Sonrası 4. Saat.

Değerlendirme: Kontrol grubunda hücre canlılığı % 100 olarak kabul edildi, deney gruplarında hücrelerinin canlılık oranları % olarak ifade edildi.. Testin değerlendirilmesi yapılırken test edilen hücrelerin canlılık oranı kontrol grubuna göre % olarak ifade edilerek aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$\% \text{ CANLILIK ORANI} = \frac{\text{Test kuyucuğunun absorbansı}}{\text{Kontrol kuyucuğunun absorbansı}} \times 100$$



Şekil 3.46: Spektrofotometrik Plaka Okuyucu.

3.5 ANJİYOGENEZLE İLİŞKİLİ VEGF’NİN GEN EKPRESYON DÜZEYİNİN REAL TIME-PCR YÖNTEMİYLE İNCELENMESİ

3.5.1 RNA İzolasyonu İçin Örneklerin Hazırlanması

Dental pulpa mezenkimal kök hücreleri her kuyucukta 1×10^5 hücre olacak şekilde 24 kuyucuklu kültür plaklarına ekilmiştir. Hücreler eklendikten sonra 48 saat boyunca kültüre edilmiştir. İloprost’un 10^{-6} ve 2×10^{-6} şeklinde iki farklı konsantrasyonunun uygulandığı hücreler Şekil 3.47’de görülmektedir. Gruplardan biri 24 saat, diğeri 72 saat boyunca, %5 CO₂ ve %95 (h/h) hava ile yüksek oranda nemlendirilmiş bir atmosferde (RH %80), 37°C sıcaklıkta inkübe edilmiştir.



Şekil 3.47: RT-PCR Analizi İçin Hücrelerin Ekilmesi ve İloprost’un Uygulanması.

İnkübasyon süresi tamamlandıktan sonra, hücreler her bir kuyucuğa 1 ml tripsin-EDTA (%0.25) çözeltisi eklenerek uzaklaştırılmıştır. Tripsinizasyonun ardından ,1 ml %10 FBS içeren hücre kültür medyumunu eklenerek Tripsin-EDTA aktivasyonu durduruldu. Hücreleri içeren medyum 15 mL’lik tüplere alınarak 10 dakika boyunca 1500 rpm (devir/dakika)’de santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra hücre peleti 1 mL kültür medyumunu ile

süspanse edildi ve 1,5 mL'lik ayrı bir santrifüj tüpüne aktarıldı. Mikro santrifüj cihazında 10 dakika 1500 rpm (devir/dakika) santrifüj edilen örneklerin süpernatantı atıldıktan sonra tüpün dibinde kalan pelet RNA izolasyonu için 80°C'de saklandı.

3.5.2 Total RNA İzolasyonu

Dental pulpa mezenkimal kök hücrelerinden total RNA, üreticinin talimatlarına uygun olarak PureZOL™ RNA İzolasyon Reaktifi (#7326880, Bio-Rad Laboratones, United States) (Şekil 3.48) kullanılarak izole edilmiştir. Total RNA izolasyonu için kullanılan malzemeler Tablo 3.18'de gösterilmiştir. Bu protokol, hücre ve doku örneklerinden yüksek verimli RNA izolasyonu için kullanılan fenol-kloroform bazlı bir yöntemdir.

Tablo 3.18: Total RNA İzolasyonu İçin Kullanılan malzemeler.

PureZOL™ RNA Isolation Reagent (#7326880, Bio-Rad)
Kloroform
İzopropanol
%75 Etanol (RNase-free DEPC su ile hazırlanmış)
RNase-free su veya TE tamponu
Mikrosantrifüj tüpleri
Pipet ve RNase-free uçlar
Santrifüj cihazı



Şekil 3.48: PureZOL™ RNA Isolation Reaktifi.

Tüm olgulara ait hücre hattı örneklerinden yaklaşık 1 milyon hücre alınarak ezilmiştir ve homojenizatör kullanılarak parçalanıp 2ml ependorf tüplere aktarılmıştır. Sonrasında tüplere 1 mL Purezol eklenmiştir ve tüpler 45 saniye vortekslenmiştir. Böylece tüpteki hücreler homojen bir görünüm alarak parçalanmış ve tripure reagent etkisiyle de pembe bir renk görünümü almıştır. Vortekslenen tüpler buz içine alınmış ve 2 dakika bekletilmiştir.

3.5.3 Faz Ayrımı (RNA'nın DNA ve Proteinden Ayrılması)

Tüplerde homojen hale gelen dokuda faz oluşumunu sağlaması amacı ile 200 ul kloroform eklenip 5 dk bekletilmiştir. Kloroform; homojen hale gelen dokuda faz oluşumunu sağlar 12.000 rpm' de 4 C ' de 20 dakika santrifüj (Şekil 3.49) yapıldıktan sonra 3 faz oluşmuştur;

FAZ 1 (Sulu faz) : RNA içerir (Renksizdir)

FAZ 2 : DNA içerir (Beyaz renklidir)

FAZ 3 (Organik faz): Protein içerir (Kırmızı renktedir)



Şekil 3.49: Yüksek Hızlı Mikro Santrifüj.

3.5.4 RNA Çöktürme

RNA izolasyonu elde edebilmek için renksiz olan 1.faz yeni tüpe aktarılmıştır. Bu tüpe RNA' yı DNA ve diğer doku artıklarından arındırmak için 500 ul izopropanol eklenmiştir. 12.000 rpm'de 4 C'de 10 dak santrifüjlenmiştir ve süpernatant uzaklaştırılmıştır. RNA, tüpün dibinde beyaz bir pellet olarak görüldüğünde oluşan beyaz pelet üzerine 1 ml %75 EtOH eklenmiş ve 7.500 x g'de 4 C'de 5 dak santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonunda süpernatant atılmış ve 57 C' de EtOH uçurulmuştur.

3.5.5 RNA Yıkama ve Konsantrasyonunun Ölçülmesi

Santrifüjün ardından supernatant atıldıktan sonra kalan pelete 50-100 µl RNase/DNase içermeyen su eklenerek pipetaj yapılmıştır. İzolasyonun ardından RNA konsantrasyonları spektrofotometrik yöntemlerle ölçülmüştür. Elde edilen RNA örneklerinin konsantrasyonu ve saflıkları 260 ve 280 nm'deki dalga boylarında absorbanlarının ölçülmesiyle belirlenmiştir. İdeal saflıktaki kaliteli RNA'nın A260/ A280 absorban oranının 1,8-2,0 olması beklenmiştir. Spektrofotometrik ölçümün yanı sıra RNA degradasyonunun kontrolü agaroz jel elektroforeziyle gerçekleştirilmiştir. Genel olarak reaksiyon başına 5ng total RNA'nın ortalama düzeyde ekspre edilen mRNA tespitinde yeterli olacağı düşünülmüştür. Buna bağlı olarak gen ifadesi bakılacak materyalin özelliğine bağlı olarak RNA miktarı reaksiyon başına 5ng ile 5 µg arasında alınmıştır. Bu aşamada elde ettiğimiz m-RNA ların degrade olmasını engellemek için, örnekler -80 derecede saklanmıştır.

3.5.6 RNA'dan cDNA (Tamamlayıcı DNA) Sentezi

RNA izolasyonu sonrası RNA'lardan ters transkriptaz enzimi aracılığıyla cDNA sentezi işlemi gerçekleştirilmiştir. RNA konsantrasyonları Nanodrop (Nano-Drop 2000, Thermo Fisher Scientific, USA) (Şekil 3.50) ile ölçüldükten sonra, cDNA sentezi için iScript cDNA Synthesis Kit (BioRad; 1708891) (Şekil 3.51) protokolü baz alınarak total RNA'dan cDNA sentezi yapılmıştır. Tablo 3.19' da belirtilen kimyasallar gösterilen miktarda birleştirilerek cDNA reaksiyon karışımı hazırlanmıştır. Her tüpe 4 µl 5x Reaklion mix, 1 µl Reverse Transkriptaz ve 15 µl RNA+H₂O'dan eklenip toplam 20 µl'ye tamamlanmıştır. Tüpler termal ısı döngüleyici (thermal cycler) cihazına yerleştirilmiş ve Tablo 3.20'de gösterildiği gibi program çalıştırılmıştır.



Şekil 3.50: Nanodrop.



Şekil 3.51 iScript cDNA Synthesis Kit.

Tablo 3.19: cDNA Reaksiyon Karışımı.

cDNA Reaksiyon Bileşenleri	Hacim (µl)
5x Reaktion mix	4 µl
Reverse Transkriptaz	1 µl
RNA+H ₂ O'dan	15 µl
Total Hacim	20 µl

Tablo 3.20: Termal Döngüleyici Cihaz Programı.

Aşamalar	Süre/Sıcaklık
Hazırlık	5 dakika, 25°C
Revers transkripsiyon	20 dakika, 46°C
RT inaktivasyonu	1 dakika, 95°C
Son aşama	∞, 4°C

3.5.7 Gerçek Zamanlı Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu- Real Time PCR (RT-PCR) Analizi

cDNA sentezi sonrası gen ekspresyon düzeylerinin kantitatif olarak analizi gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ile gerçekleştirildi. Ana karışım (master mix) ve primerler (Tablo 3.21) ticari olarak temin edilmiştir. RT-PCR için hazırlanan master mix solüsyonu,

QuantiTect SYBR Green PCR Kiti (#204145, Qiagen, Hilden, Almanya) kullanılarak üretici talimatlarına uyularak, dH₂O (deiyonize su) ve her primerden 10 pmol olacak şekilde karıştırıldı (Tablo 3.22). RT-PCR reaksiyon karışımının üzerine her bir örneğin cDNAs'ı 5 ng eklendi. Real Time PCR (RT-PCR) deneyleri, iCycler RT-PCR sistem analizi (Bio-Rad, Hercules, CA) aracılığıyla Tablo 3.23'de verilen protokole göre 96 kuyucuklu RT-PCR kültür kapları kullanılarak gerçekleştirildi.

Tablo 3.21: Kullanılan Primerler.

Gen	Yön	Primer Prob Dizisi
VEGF	Forward	5'-ATGAGGACACCGGCTCTGACCA-3'
	Reverse	5'-AGGCTCCTGAATCTTCCAGGCA-3'
GADPH	Forward	5'-CACTGCCAACGTGTCAGTGTTG-3
	Reverse	5'-GTAGCCCAGGATGCCCTTGAG-3

Tablo 3.22: RT-PCR Reaksiyon Bileşenleri ve Miktarları.

Reaktif	Miktar
Deiyonize su	32 µL
SYBR Green	100 µL
İleri Primer	10 µL
Geri Primer	10 µL

RT-PCR analizinde denatürasyon (Denaturation), bağlanma (Annealing) ve uzama (Extention) olmak üzere 3 aşamada toplam 40 döngü yapıldı ve olası bir DNA kontaminasyonu veya varsa primer dimerleşmesini belirlemek amacıyla erime eğrisi (Melting Curve) analizi de gerçekleştirildi (Tablo 3.23).

Tablo 3.23: Real Time qPCR Analiz Aşamaları.

PCR Aşamaları	Döngü sayısı	Süre	Sıcaklık
Başlangıç Denatürasyon	1	5dk	95°C
Denatürasyon	40	30sn	95°C
Bağlanma	40	30sn	95°C
Uzama	40	40sn	95°C
Erime Eğrisi	4	4sn	95°C

3.5.7.1 Verilerin değerlendirilmesi

VEGF hedef genlerinin ekspre edilip edilmediğini anlamak için ekspresyon düzeyi bir hücrede her zaman sabit olan referans (housekeeping) gen ile karşılaştırılarak normalizasyonları sağlanmıştır. Bu çalışmada referans gen olarak GAPDH geni kullanıldı ve GAPDH genine göre hedef genlerin kaç kat değiştiğine bakıldı. PCR analizi sonucu her bir kuyucuk için floresan değerlerinin eşik değerini geçtiği nokta olan eşik döngüsü (Ct) değeri elde edilmiştir. Reaksiyonun sağlıklı olarak gerçekleştiği doğrulandıktan sonra, hedef genin referans gene göre ekspresyon seviyesindeki değişimi belirlemek için $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (2-Delta Delta Ct) yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemle göre öncelikle materyalin uygulandığı örnekler için hedef genin Ct değerinden referans genin Ct değeri çıkarılarak ΔCt (treated) değeri elde edilmiştir.

$$\Delta Ct \text{ (treated)} = Ct \text{ (hedef gen)} - Ct \text{ (referans gen)}$$

Daha sonra 98naliz98l konsantrasyonlarının uygulanmadığı 98naliz98 örneklerinin ΔCt (untreated) değeri hesaplanmıştır.

$$\Delta Ct \text{ (untreated)} = Ct \text{ (hedef gen)} - Ct \text{ (referans gen)}$$

Ardından her bir 98naliz98l, konsantrasyon ve zamana ait ΔCt değerinden control grubuna ait ortalama ΔCt değerinin çıkarılmasıyla her bir örneğe ait $\Delta\Delta Ct$ değeri elde edilmiştir.

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ (treated)} - \Delta Ct \text{ (untreated)}$$

4. BULGULAR

4.1 ETKEN MADDEİN KARAKTERİZASYON BULGULARI

4.1.1 İloprost'un Fizikokimyasal Özelliklerinin Ait Bulgular

4.1.1.1 İloprost'un fiziksel özellikleri ve pH değerine ait bulgular

İloprost'un ethanol içinde çözeltisi berrak, viskozitesi düşük ve sıvı formdadır. Suda çözünebilir özellik göstermiştir ve pH değeri 5.35 (Şekil 4.1) olarak bulunmuştur.



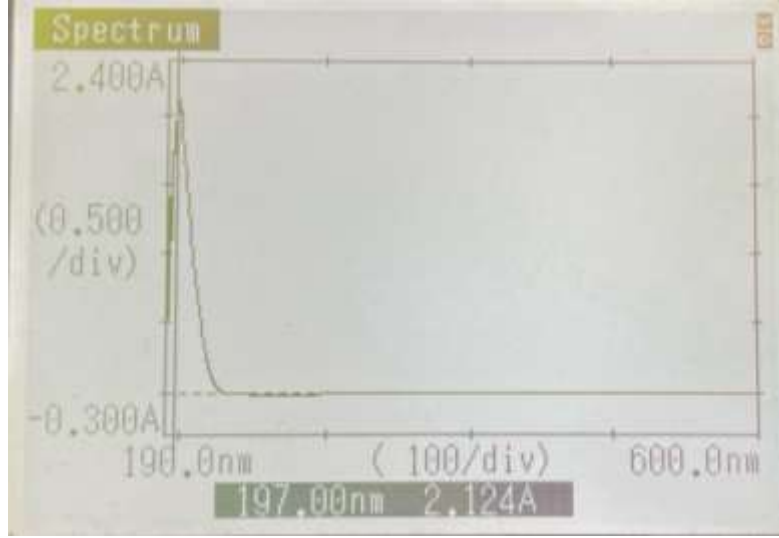
Şekil 4.1: İloprost'un pH Değeri.

4.1.1.2 İloprost'un UV Spektrumu ve λ_{max} belirlenmesi bulguları

Bu çalışmada İloprost' a ait UV spektrumu incelenmiş ve elde edilen verilere Tablo 4.1 ve Şekil 4.2'de yer verilmiştir. Şekil 4.2'de UV-Vis spektrofotometreden alınmış spektrogram (absorbans grafiği) çıktısı görülmektedir. UV spektrumunda, 197 nm dalga boyunda belirgin bir pik (tepe noktası) saptanmıştır. Bu pik, 2.124 A absorbans değeri ile maksimum ışık soğurmasını temsil etmekte olup, İloprost'un λ_{max} (maksimum dalga boyu) değeridir.

Tablo 4.1: UV Spektrumuna Ait Tepe Noktası.

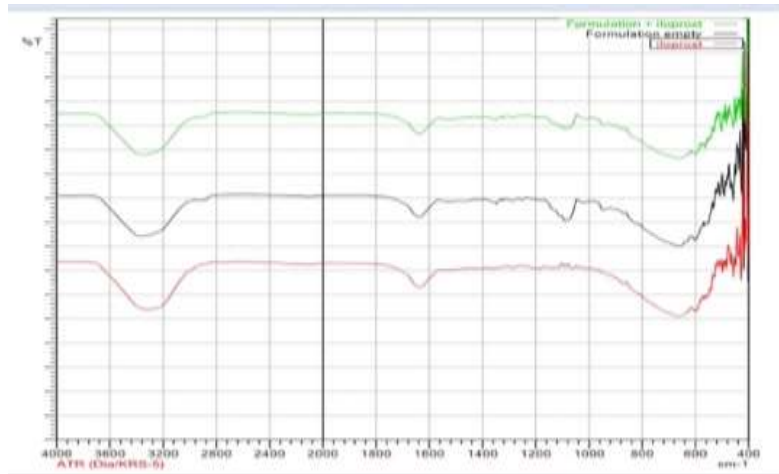
λ_{max} (nm)	Absorbsiyon
197 nm	2.124 A



Şekil 4.2: Uv Absorbans Grafiği.

4.1.2 FTIR Analizi ile Değerlendirilen Bileşen Uyumluluğu Bulguları

Etanol içinde çözündürülmüş İloprost, hazırlanan sıcaklığa duyarlı hidrojel ve İloprost ile sıcaklığa duyarlı hidrojinin birleştirilmesiyle elde edilen formülasyonuna ait FTIR spektrumları, $400\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$ dalga boyu aralığında ve 1 cm^{-1} çözünürlükte elde edilmiş olup Şekil 4.3'te sunulmaktadır. Elde edilen verilere göre, kullanılan polimerler ile etkin maddenin birbiriyle geçimli olduğu sonucuna ulaşılmıştır.



Şekil 4.3: Ftir Spektrumları.

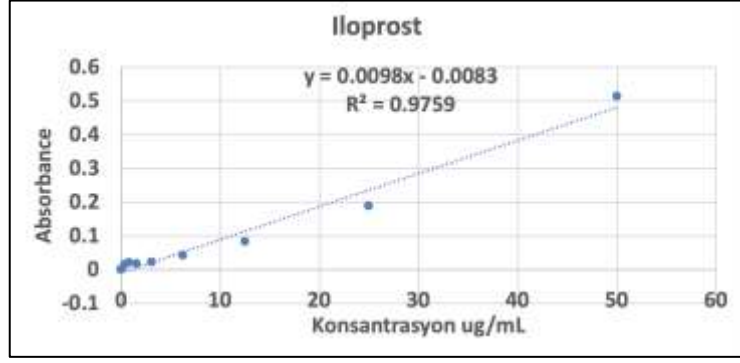
4.1.3 İloprost'un Spektrofotometrik Yöntemle Miktar Tayini ve Yöntem Validasyonuna İlişkin Bulgular

4.1.3.1 Doğrusallık

Gerçekleştirilen çalışmalara göre hazırlanan standart çözeltilere ait 197 nm'de bulunan ortalama absorbens değerleri Tablo 4.2'de ve bu değerlerden elde edilen kalibrasyon grafiği Şekil 4.4'te verilmiştir. İloprost için hazırlanan bu kalibrasyon doğrultusunda, 0-50 µg/mL konsantrasyon aralığında yapılan ölçümlerde doğrusallık katsayısı (R^2) 0.9759 olarak belirlenmiştir.

Tablo 4.2: Farklı Konsantrasyonlardaki Absorbans Değerleri.

KONSANTRASYON (µg/ml)	Ortalama Absorbans +SS
50	0.313 ± 0.01
25	0.189 ± 0.005
12.5	0.083±0.004
6.25	0.042±0.003
3.125	0.022±0.002
1.56	0.017±0.002
0.78	0.020±0.002
0.39	0.014±0.002
0	0 ±0.000



Şekil 4.4: İloprost'un Kalibrasyon Doğrusu Grafiği

Kalibrasyon doğrusu grafiğine göre aşağıdaki denklem elde edilmiştir.

$$Y = 0.0098x - 0.0083$$

y: Absorbans

x: Konsantrasyon (mcg/ml)

R²: Determinasyon katsayısı

4.2 ÖN FORMÜLASYON ÇALIŞMALARININ BULGULARI

Ön formülasyon çalışmaları kapsamında hazırlanan jellerin homojenlik durumu, 24 °C’de ve 37 °C’deki viskozite değerleri ile jelleşme sıcaklığı gibi fiziksel parametreleri görsel olarak değerlendirilmiştir. Bu değerlendirmeler sonucunda %0.5–20 konsantrasyon aralığının uygulanabilir olduğu sonucuna varılmıştır. Bu sonuçlara göre formülasyonun üretimi esnasında üzerinde çalışılması gereken kritik parametreler 24°C vizkozite, 37°C vizkozite ve jelleşme sıcaklığı şeklinde belirlenmiştir.

4.3 TASARIM ALANI VE OPTİMİZASYON ÖNCESİ KARAKTERİZASYON BULGULARI

4.3.1 Jelleşme sıcaklığı, 25⁰C Viskozite, 37⁰C Viskozite

Kaliteyle Tasarım (QbD) yaklaşımı doğrultusunda belirlenen 12 farklı in situ jel formülasyonuna ait karakterizasyon çalışmalarına ait bulgular Tablo 4.3’de gösterilmektedir. Bu karakterizasyon kapsamında, her bir formülasyonun jelleşme sıcaklığı, 25 °C viskozite değeri ve 37 °C viskozite değeri değerlendirilmiştir

Tablo 4.3: Karakterizasyon Bulguları.

Formülasyon Kodu	Jelleşme sıcaklığı	Viskozite 25 ⁰ C	Viskozite 37 ⁰ C
N1	93.8 ± 1.2	1 ± 0.3	24 ± 1.5
N2	40.8 ± 0.9	50 ± 5.0	76 ± 6.2
N3	25 ± 0.5	230 ± 23	873540 ± 130
N4	56.3 ± 1.1	1 ± 0.3	34 ± 2.0
N5	37 ± 0.7	50 ± 5.0	124 ± 10.5
N6	25 ± 0.5	410 ± 41	1.07E+06 ± 160
N7	50.6 ± 1.0	30 ± 3.0	62 ± 5.2
N8	32 ± 0.6	120 ± 12	400 ± 35.0
N9	21 ± 0.5	4990 ± 49,9	1.93E+06 ± 290
N10	37 ± 0.7	34 ± 3.6	139 ± 11.0
N11	37.5 ± 0.8	34 ± 8.4	145 ± 12.0
N12	36 ± 0.7	34 ± 2.1	138 ± 11.

Bu sonuçlara göre P407'nin konsantrasyonunun artıp P188'in konsantrasyonunun aynı olduğu çalışmalar karşılaştırıldığı zaman jelleşme sıcaklığı azalırken, vizkozitenin arttığı görülmüştür. Aynı şekilde P188'in konsantrasyonunun artıp P407'nin konsantrasyonunun aynı olduğu çalışmalar karşılaştırıldığı zaman çalışmalarda jelleşme sıcaklığı azalırken, vizkozitenin arttığı görülmüştür.

4.3.2 Formülasyonun Optimizasyon Sonuçları ve Veri Analizi

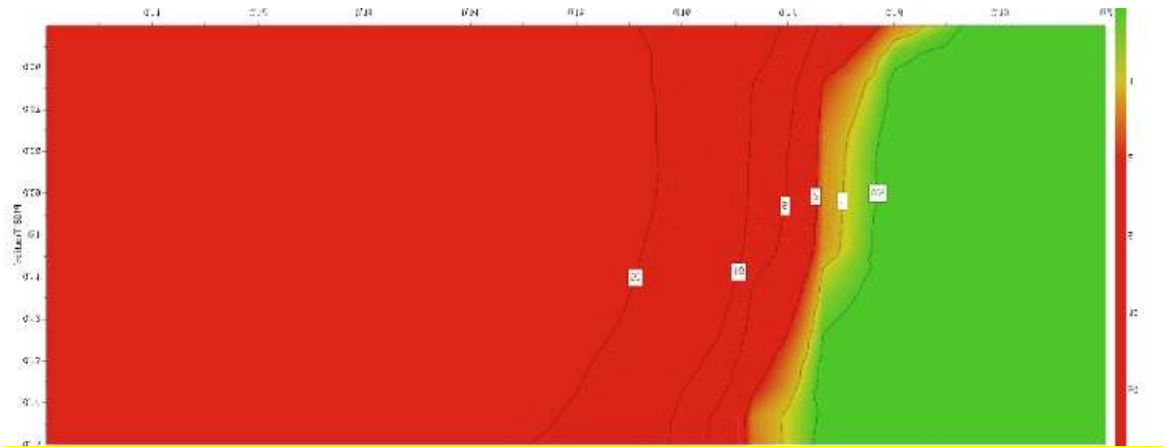
Ön formülasyon çalışmalarında elde edilen karakterizasyon verileri (Tablo 4.3), MODDE[®] Pro 12.1 yazılımına aktararak Yanıt Yüzeyi Metodolojisi (Response Surface Methodology, RSM) kapsamında 104 analiz edilmiştir. Yazılım tarafından her bir yanıt için oluşturulan modellerin istatistiksel değerleri Tablo 4.4'te sunulmaktadır.

Tablo 4.4: MODDE® Yazılımı Tarafından Her Bir Yanıt İçin Hesaplanan İstatistiksel Değerler.

YANITLAR	R ²	Düzeltilmiş R ²	Q ²	Model geçerliliği	Yeniden üretilebilirlik
Jelleşme sıcaklık	0.906	0.881	0.798	0.802	0.944
Viskozite 25°C	0.942	0.863	0.729	0.887	0.872
Viskozite 37°C	0,965	0.935	0,509	0.712	0.935

Bu sonuçlar, her bir modelin güvenilirliğini ve tahmin edilebilirliğini göstermektedir. Özellikle R² ve düzeltilmiş R² değerlerinin 0.85'in üzerinde olması, formülasyon davranışlarının deneysel verilerle yüksek oranda açıklanabildiğini göstermektedir. Q² değeri, modelin çapraz doğrulama ile tahmin gücünü yansıtmaktadır. Jelleşme sıcaklığı ve 25 °C viskozite yanıtları için elde edilen Q² değerleri oldukça tatmin edici seviyededir (>0.7). 37 °C viskozite için Q² nispeten daha düşük olmasına rağmen (>0.5), model genel geçerlilik eşiğini karşılamaktadır.

MODDE® yazılımı tarafından yapılan istatistiksel ve matematiksel hesaplamalar sonucunda, belirlenen faktör seviyelerine bağlı olarak tasarım alanı (design space) oluşturulmuştur. Tasarım alanı grafiği Şekil 4.5'te sunulmuştur. Grafik üzerindeki yeşil alan, optimizasyon kriterlerini sağlayan ve güvenli yanıt aralığını temsil eden bölgeleri göstermektedir.



Şekil 4.5: Tasarım Alanı.

4.3.3 Optimum Formülasyonun Karakterizasyonuna Ait Bulgular

MODDE® yazılımı tarafından oluşturulan tasarım alanından elde edilen optimum parametreler doğrultusunda, en uygun formülasyon geliştirilmiştir. Hazırlanan formülasyon, 25 °C’de sıvı fazda olup, 37 °C’de jel fazına geçiş göstermektedir.



Şekil 4.6: 25°C’deki Sıvı Formu.



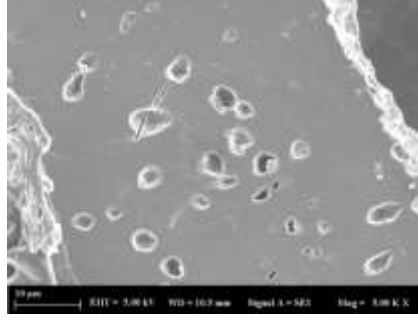
Şekil 4.7: 37°C deki Jel Formu.

4.3.3.1 Görsel inceleme ve pH değerlendirmesi

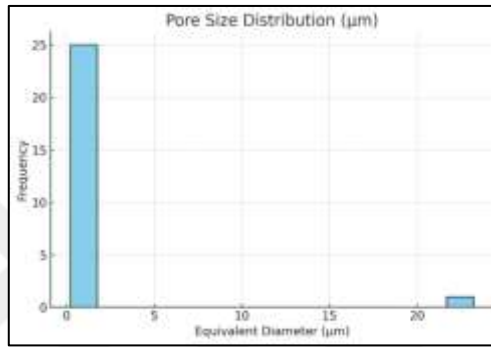
Hazırlanan optimum in situ jel formülasyonunun makroskopik düzeyde yapılan değerlendirmesinde, homojen ve berrak bir görünüm gözlemlenmiştir. Bu durum, formülasyon bileşenlerinin birbiriyle uyumlu bir şekilde dağıldığını ve stabil bir 106naliz oluşturduğunu göstermektedir. pH değeri, fizyolojik sınırlar içerisinde olacak şekilde 7.3 ± 0.1 olarak ölçülmüştür ($n = 3$).

4.3.3.2 SEM analizine ait bulgular

SEM görüntüsü Şekil 4.8’de sunulmuştur. Ölçek çubuğu olarak $10 \mu\text{m} = 128$ piksel referans alınmıştır. Bu görüntü üzerinden yapılan ölçümler doğrultusunda, gözenek boyutu dağılımı değerlendirilmiş olup, elde edilen sonuçlar Şekil 4.9’da grafiksel olarak gösterilmiştir.



Şekil 4.8: SEM Görüntüsü.



Şekil 4.9: Gözenek Boyutu Dağılımı.

Nicel 107naliz, 10 μm 'lik ölçek çubuğu (128 piksel) referans alınarak görüntü işleme yöntemleriyle gerçekleştirilmiştir. Elde edilen veriler doğrultusunda, formülasyona ait ortalama gözenek çapı 1.50 μm , medyan değeri ise 0.50 μm olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlar, jel yapısının mikro düzeyde poröz olduğunu ve heterojen bir gözenek dağılımına sahip bulunduğunu göstermektedir.

4.3.3.3 Optimum formülasyona ait viskozite bulguları

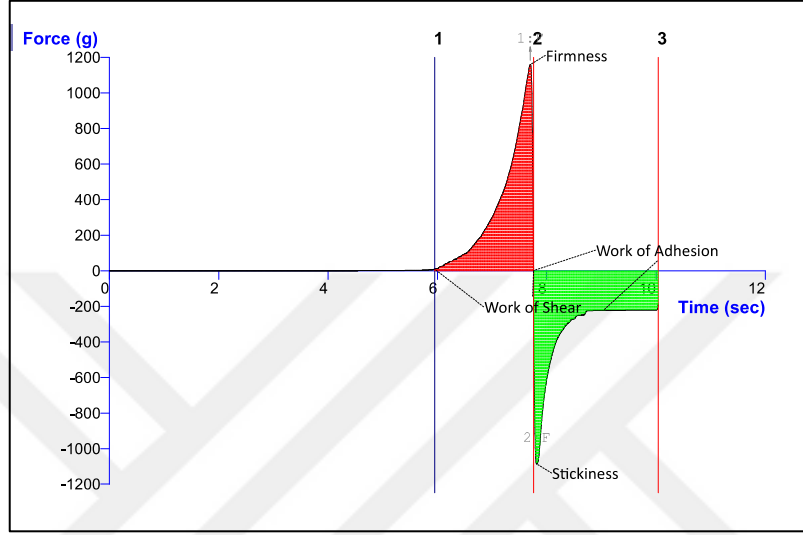
Optimum formülasyonun viskozitesi 25°C sıcaklığında 1.5 rpm'de 1 milipaskal-saniye (mPa·s), 37 °C'de sıcaklığında 1.5 rpm'de 338.960± milipaskal-saniye (mPa·s) olarak bulunmuştur.

4.3.3.4 Yayılabilirlik ve adezyon bulguları

Yayılabilirlik ve adezyon özellikleri Tablo 4.5' teki gibi bulunmuştur. Optimum formülasyonun yayılabilirlik ve yapışma özelliklerini gram–saniye ilişkisi üzerinden gösteren (N=3) sayısal değerler Şekil 4.10'da görülmektedir.

Tablo 4.5: Yayılabilirliği ve Adezyon Özellikleri.

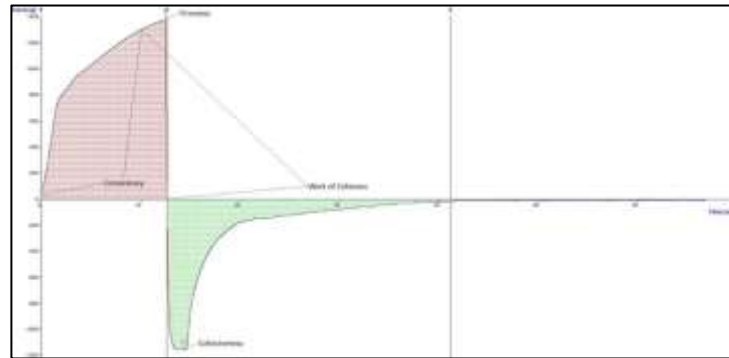
Testler	Sonuçlar
Yayılabirlik (g.s) $\pm$ SD	619,18 $\pm$ 2,13
Adezyon (g.s) $\pm$ SD	1086,39 $\pm$ 9,33



Şekil 4.10 Yayılabilirlik ve Adhezyon özellikleri (g.s)

4.3.3.5 Ekstrüde edilebilirlik, tutarlılık ve kohezyon bulguları

Ekstrüde edilebilirlik, tutarlılık, ve kohezyon değerlendirmesine ait bulgular Şekil 4.11’de ve Tablo 4.6’de gösterilmiştir.



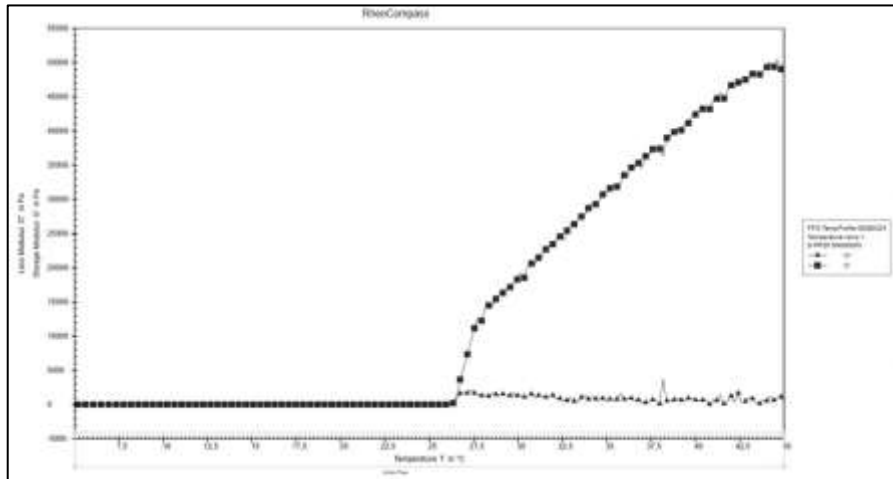
Şekil 4.11: Tutarlılık, ekstrudabilite ve kohezyon değerleri (N=3).

Tablo 4.6: Ekstrüdate, Tutarlılık, Kohezyon Değerleri

Formülasyon için yapılan test	Sonuçlar
Ekstrüdate (g) $\pm$ SD	1379,43 SD 12,30
Tutarlılık (g.s) $\pm$ SD	13002,10 SD 9,68
Kohezyon (g) $\pm$ SD	-1156,69 SD 6,23
Kohezyon İş (g.s) $\pm$ SD	-6119,50 SD 4,97

4.3.3.6 Reolojik özellikler

Reolojik Özelliklerin Şekil 4.12'deki reogramda belirtildiği gibi olduğu bulunmuştur. Reogramdaki sonuçlara göre, sıcaklığın artmasıyla birlikte viskozitenin belirgin şekilde arttığı gözlemlenmiştir. Bu bulgu, formülasyonun termosensitif (sıcaklığa duyarlı) yapıda olduğunu ve belirli bir sıcaklıktan itibaren jel formuna geçtiğini göstermektedir. Yapılan gözlemlere göre, yaklaşık 26 °C'den itibaren sol-jel geçişi başlamış; bu geçiş sırasında depolama modülü (G'), kayıp modülünü (G'') geçerek sistemin elastik karakter kazandığını göstermiştir.



Şekil 4.12: G'-G'' eğrileri

4.3.3.7 İlaç miktarı ve miktar tekdüzeliği

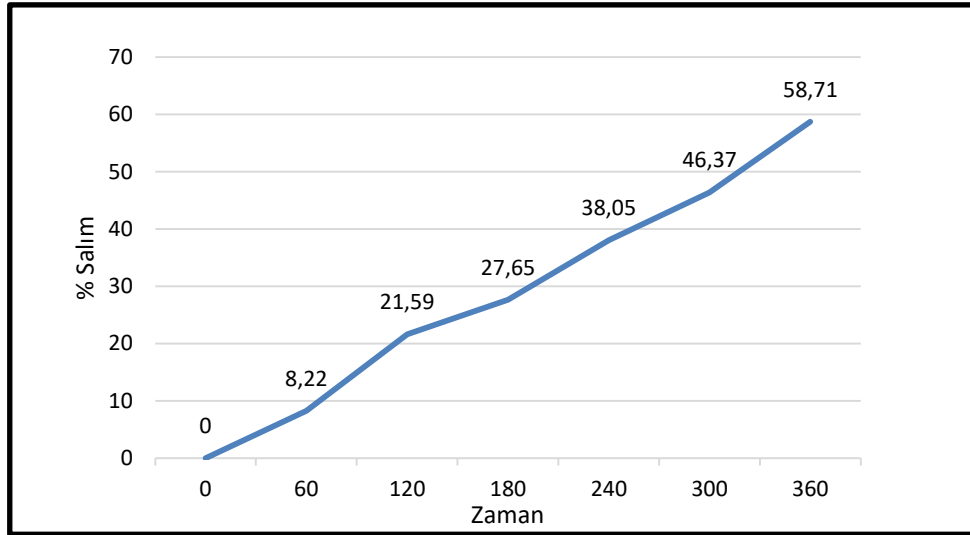
İlaç miktarı ve miktar tekdüzeliğine ait bulgular Tablo 4.7’de gösterilmiştir.

Tablo 4.7: İlaç Miktarı ve Miktar Tekdüzeliğine Ait Bulgular

Test Çalışması	1. Okuma Absorbans Değeri	2. Okuma Absorbans Değeri	3. Okuma Absorbans Değeri	4. Okuma Absorbans Değeri	5. Okuma Absorbans Değeri	6. Okuma Absorbans Değeri	7. Okuma Absorbans Değeri	8. Okuma Absorbans Değeri	9. Okuma Absorbans Değeri	10. Okuma Absorbans Değeri
	0,0012	0,0013	0,0013	0,0014	0,0014	0,0014	0,0015	0,0015	0,001	0,001
	1	1	4	2	8	9	2	6	6	64
Okunan absorbansların ortalama değeri					0,001457					
İlaç içeriği (%)					97,13 %					
İçerik standart sapması					0.0139					

4.3.3.8 İn vitro ilaç salım bulguları

İn vitro ilaç salım çalışmalarına ait bulgular şekil 4.13’te görülmektedir.



Şekil 4.13: İn Vitro İlaç Salım Grafiği.

4.3.3.9 Stabilite Çalışmaları

Stabilite çalışmaları amacıyla formülasyonun pH, viskozite (25 °C ve 37 °C), adezyon ve yayılabilirlik özellikleri değerlendirilmiştir. Elde edilen veriler Tablo 4.8’de sunulmaktadır

Tablo 4.8: Stabilite Çalışmaları Sonuçları.

Zaman	pH	Viskozite 25°C (mPa.s)	Viskozite 37°C (mPa.s)	Adezyon	Yayılabilirlik
1.hafta	7.3±0.1	1.0±0.2	338960±50	1086,39 ±15.01	619,18 ± 90.1
2.hafta	7.3±0.1	1.2±0.2	338000±51	1080,00 ±14.02	620,00 ± 83.1
3.hafta	7.2±0.1	1.1±0.2	337500±50.5	1075,00 ±14.01	615.00 ± 81.0
4.hafta	7.2±0.1	1.1±0.2	336800±49.5	1070,00 ±13.5	610,00 ± 74.0

4.3.4 Sitotoksikite Çalışma Bulguları

İloprost, Poloksamer 407/188 hidrojel, farklı konsantrasyonlarda İloprost içeren Poloksamer 407/188 hidrojel ve kontrol gruplarının insan dental pulpa kök hücreleri üzerinde 24 saat ve 72 saatlik inkübasyon sonrası meydana getirdiği sitotoksik etkiler, MTT analizi yöntemi ile değerlendirilmiştir. Hücre canlılığına ait kantitatif veriler Tablo 4.9’da grup numaraları ile sunulmuş olup, her bir grup için ortalama hücre canlılığı yüzdesi ± standart sapma değerleri verilmiştir.

GRUP 1: Kontrol

GRUP 2: Poloksamer

GRUP 3: Poloksamer+ 10⁻⁶ M İloprost

GRUP 4: Poloksamer+ 2x10⁻⁶ M İloprost

GRUP 5: 10⁻⁶ M İloprost

GRUP 6: 2x10⁻⁶ M İloprost

Tablo 4.9: Hücre Canlılık Değerlerinin Karşılaştırılması

	GRUP 1	GRUP 2	GRUP 3	GRUP 4	GRUP 5	GRUP 6	^a p
	Mean±Sd (Median)	Mean±Sd (Median)	Mean±Sd (Median)	Mean±Sd (Median)	Mean±Sd (Median)	Mean±Sd (Median)	
24 Saat	100±0 (100)	22.98±2.59 (22.6)	23.09±2.4 (22.25)	25.04±5.67 (26.76)	82.63±4.77 (82.53)	98.36±11.43 (99.6)	0,001 **
72 saat	100±0 (100)	17.54±2.02 (18.19)	17.61±1.67 (17.23)	19.04±2.57 (18.69)	56.11±6.52 (54.27)	57.42±9.78 (58.2)	0,001 **

^aKruskall Wallis Testi****p<0,01**

4.3.5 Hücrelerin Canlılığı Üzerindeki Etkilerin Karşılaştırılması

4.3.5.1 24. saat hücre canlılık değerlerinin gruplar arasında karşılaştırılması

Dental pulpa mezenkimal kök hücrelerinin canlılık oranları, 24. saatte farklı gruplar arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubu (Grup 1) için hücre canlılığı %100 olarak belirlenmiş, bu oran Poloksamer (Grup 2) grubu için 22.98; Poloksamer+İloprost 10^{-6} (Grup 3) için 23.09; Poloksamer+İloprost 2×10^{-6} (Grup 4) için 25.04; İloprost 10^{-6} (Grup 5) için 82.63 ve İloprost 2×10^{-6} (Grup 6) için 98.36 olarak elde edilmiştir (Tablo 4.9).

Kruskall-Wallis testi ile yapılan çoklu grup karşılaştırmasında, 24.saatte gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu belirlenmiştir ($p=0,001$; $p<0,01$) (Tablo 4.9).

Tablo 4.10: Grupların Zamana Bağlı Hücre Canlılık Değerlerinin İkili Karşılaştırılması.

Gruplar	24 Saat	72 Saat
1-2	0,001**	0,001**
1-3	0,001**	0,001**
1-4	0,001**	0,001**
1-5	0,001**	0,001**
1-6	0,577	0,001**
2-3	0,917	0,907
2-4	0,465	0,402
2-5	0,001**	0,001**
2-6	0,001**	0,001**
3-4	0,465	0,347
3-5	0,001**	0,001**
3-6	0,001**	0,001**
4-5	0,001**	0,001**
4-6	0,001**	0,001**
5-6	0,047*	0,602

Grup 1: Kontrol, Grup 2: Poloksamer, Grup 3: Poloksamer+ 10^{-6} M İloprost, Grup 4: Poloksamer+ 2×10^{-6} M İloprost, Grup 5: 10^{-6} M İloprost, Grup 6: 2×10^{-6} M İloprost

* $p < 0,05$

** $p < 0,01$

Kontrol grubunun (Grup 1) hücre canlılık değerleri; Poloksamer (Grup 2) ($p=0,001$), Poloksamer+İloprost 10^{-6} (Grup 3) ($p=0,001$), Poloksamer+İloprost 2×10^{-6} (Grup 4) ($p=0,001$) ve İloprost 10^{-6} (Grup 5) ($p=0,001$) gruplarından hücrelerin canlılık değerleri istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur (Tablo 4.10).

Poloksamer grubu (Grup 2) ve Poloksamer+İloprost 10^{-6} (Grup 3) grubu arasında hücre canlılık oranları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p=0,917$) (Tablo 4.10).

Poloksamer grubu (Grup 2) ve Poloksamer+İloprost 2×10^{-6} (Grup 4) grubu arasında hücre canlılık oranları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamaktadır ($p=0,465$). Poloksamer (Grup 2) grubuna ait hücrelerin canlılık değerleri, İloprost 10^{-6} (Grup 5) ($p=0,001$) ve İloprost 2×10^{-6} (Grup 6) ($p=0,001$) gruplarından istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük bulunmuştur (Tablo 4.10).

Poloksamer+İloprost 10^{-6} (Grup 3) grubu ve Poloksamer+iloprost 2×10^{-6} (Grup 4) grubu arasında hücre canlılık oranları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Poloksamer+iloprost 10^{-6} (Grup 3) grubunun hücre canlılık oranları, İloprost 10^{-6} (Grup 5) ($p=0,001$) ve İloprost 2×10^{-6} (Grup 6) ($p=0,001$) gruplarından istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük bulunmuştur (Tablo 4.10).

Poloksamer+İloprost 2×10^{-6} (Grup 4) grubunun hücre canlılık oranları, İloprost 10^{-6} (Grup 5) ($p=0,001$) ve İloprost 2×10^{-6} (Grup 6) ($p=0,001$) gruplarından istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük bulunmuştur (Tablo 4.10).

İloprost 10^{-6} (Grup 5) grubunun hücre canlılık oranları iloprost 2×10^{-6} (Grup 6) ($p=0,047$) grubundan istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük bulunmuştur ($p=0,047$) (Tablo 4.10).

4.3.5.2 72. saat hücre canlılık değerlerinin gruplar arasında karşılaştırılması

Gruplara göre 72 saat MTT sonuçları istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermektedir ($p=0,001$; $p<0,01$) (Tablo 4.9).

Yapılan ikili karşılaştırmalara göre; Kontrol grubunun (Grup 1) MTT değerleri, Poloksamer (Grup 2) grubu ($p=0,001$), Poloksamer+İloprost 10^{-6} (Grup 3) grubu ($p=0,001$), Poloksamer+İloprost 2×10^{-6} (Grup 6) grubu ($p=0,001$) ve İloprost 10^{-6} (Grup 5) ($p=0,001$) gruplarından istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur (Tablo 4.10).

Poloksamer (Grup 2) grubunun MTT değerleri, İloprost 10^{-6} (Grup 5) ($p=0,001$) ve İloprost 2×10^{-6} (Grup 6) ($p=0,001$) gruplarından istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük bulunmuştur (Tablo 4.10).

Poloksamer+iloprost 10^{-6} (Grup 3) grubunun MTT değerleri, İloprost 10^{-6} (Grup 5) ($p=0,001$) ve İloprost 2×10^{-6} (Grup 6) ($p=0,001$) gruplarından istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük bulunmuştur (Tablo 4.10).

Poloksamer+İloprost 2×10^{-6} (Grup 6) grubunun MTT değerleri, İloprost 10^{-6} (Grup 5) ($p=0,001$) ve İloprost 2×10^{-6} (Grup 6) ($p=0,001$) gruplarından istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük bulunmuştur (Tablo 4.10).

4.3.6 Grupların Hücre Canlılık Değerlerinin Kendi İçinde Karşılaştırılması

Poloksamer Grubu; 24 saat ölçümüne göre 72 saat ölçümünde görülen hücrelerin canlılık değerlerindeki azalış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,001$; $p<0,01$) (Tablo 4.11).

Poloksamer+ İloprost 10^{-6} Grubu; 24 saat ölçümüne göre 72 saat ölçümünde görülen hücrelerin canlılık değerlerindeki azalış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,001$; $p<0,01$) (Tablo 4.11).

Poloksamer+ İloprost 2×10^{-6} Grubu; 24 saat ölçümüne göre 72 saat ölçümünde görülen hücrelerin canlılık değerlerindeki azalış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,001$; $p<0,01$) (Tablo 4.11).

İloprost 10^{-6} Grubu; 24 saat ölçümüne göre 72 saat ölçümünde görülen hücrelerin canlılık değerlerindeki azalış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,001$; $p<0,01$) (Tablo 4.11).

İloprost 2×10^{-6} Grubu; 24 saat ölçümüne göre 72 saat ölçümünde görülen hücrelerin canlılık değerlerindeki azalış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,001$; $p<0,01$) (Tablo 4.11)

Tablo 4.11: Grupların MTT Sonuçlarının Kendi İçinde Zamana Göre Karşılaştırılması.

	24 Saat	72 Saat	
	Mean±Sd (Median)	Mean±Sd (Median)	^b p
¹ Kontrol	100±0 (100)	100±0 (100)	-
² Poloksamer	22.98±2.59 (22.6)	17.54±2.02 (18.19)	0.001**
³ Poloksamer+ İloprost10 ⁻⁶	23.09±2.4 (22.25)	17.61±1.67 (17.23)	0.001**
⁴ Poloksamer+İloprost 2x10 ⁻⁶	25.04±5.67 (26.76)	19.04±2.57 (18.69)	0.001**
⁵ İloprost 10 ⁻⁶	82.63±4.77 (82.53)	56.11±6.52 (54.27)	0.001**
⁶ İloprost 2x10 ⁻⁶	98.36±11.43 (99.6)	57.42±9.78 (58.2)	0.001**

^bWilcoxon Signed Rank Test **p<0,01

4.4 ANJİYOGENEZLE İLİŞKİLİ VEGF GEN EKSPRESYONU DÜZEYİNİN RT-PCR ANALİZ BULGULARI

Çalışmada, insan dental pulpa kök hücrelerine farklı konsantrasyonlardaki İloprost solüsyonlarıyla 24 ve 72 saat süreyle inkübe edilmesi sonrasında, angiyoenezisle ilişkili olan VEGF genine ait ortalama rölatif ekspresyon düzeyleri ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) belirlenmiştir. Elde edilen veriler Tablo 4.12’te sunulmaktadır. Kontrol grubu olarak, üçüncü pasajdan (P3) şablon

Tablo 4.12 VEGF Genine Ait Rölatif Ekspresyon Düzeylerinin Sonuçları

	¹ Kontrol	² 10 ⁻⁶	³ 2x10 ⁻⁶	
	Mean±Sd (Median)	Mean±Sd (Median)	Mean±Sd (Median)	^a p
24 saat	1±0.09 (1.03)	4.01±0.69 (3.73)	0.96±0.24 (0.94)	0,001**
72 saat	1.01±0.15 (1.04)	2.75±0.47 (2.75)	0.84±0.11 (0.77)	0,001**

^aKruskall Wallis Testi **p<0,01

4.4.1 Gruplar Arası VEGF Gen Ekspresyon Düzeylerinin Zamana Göre Karşılaştırılması

24 saat İloprost'a maruz kalan hücrelerde, 10^{-6} M İloprost grubunda kontrol grubuna kıyasla VEGF gen ekspresyon düzeyinin yaklaşık 4 kat arttığı gözlemlenmiştir. 2×10^{-6} M İloprost grubunda ise kontrol grubuna kıyasla VEGF gen ekspresyon düzeyinde değişiklik çok az veya yok şeklinde azalma gözlemlenmiştir (Tablo 4.12).

Aynı zaman diliminde farklı gruplar arasındaki 24.saatteki VEGF gen ekspresyon düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmektedir ($p=0,001$; $p<0,01$) (Tablo 4.12).

Yapılan ikili karşılaştırmalara göre 24. saat değerlerinde 10^{-6} M İloprost grubunun VEGF gen ekspresyonu düzeyindeki artışın kontrol grubundan yüksek olması istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,001$) (Tablo 4.13).

Yapılan ikili karşılaştırmalara göre 24. saat değerlerinde 10^{-6} M İloprost grubunun VEGF gen ekspresyonundaki artış, 2×10^{-6} M İloprost grubundan yüksek olması anlamlı bulunmuştur ($p<0,01$) (Tablo 4.13).

Yapılan ikili karşılaştırmalara göre 24. saat değerlerinde 2×10^{-6} M İloprost grubunun VEGF gen ekspresyon düzeyindeki azalışın kontrol grubundan düşük olması istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Tablo 4.13).

72 saat İloprost'a maruz kalan hücrelerde, kontrol grubuna kıyasla 10^{-6} M konsantrasyondaki İloprost grubunda VEGF gen ifadesinin 2.75 kat arttığı gözlemlenmiştir. 2×10^{-6} M konsantrasyondaki İloprost grubunda ise VEGF gen ekspresyon düzeyinde değişiklik yoktur veya çok az azalma gözlemlenmiştir (Tablo 4.12).

Aynı zaman diliminde farklı gruplar arasındaki 72.saatteki VEGF gen ekspresyon düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık belirlenmiştir ($p<0,01$) (Tablo 4.12).

Yapılan ikili karşılaştırmalara göre 10^{-6} M İloprost grubunun 72. saat VEGF gen ekspresyon düzeyinin, kontrol ($p=0,001$) ve 2×10^{-6} M İloprost grubundan yüksek olması istatistiksel olarak anlamlı belirlenmiştir ($p<0,01$) (Tablo 4.13).

Tablo 4.13: Grupların VEGF Gen Ekspresyonuna Ait Sonuçların İkili Karşılaştırılması

	24 Saat	72 Saat
<i>Kontrol - 10⁻⁶ M İloprost</i>	0,001**	0,001**
<i>Kontrol - 2x10⁻⁶ M İloprost</i>	0,075	0,753
<i>10⁻⁶ M İloprost - 2x10⁻⁶ M İloprost</i>	0,001**	0,001**

*p<0,05

**p<0,01

4.4.2 Materyallerin VEGF Gen Ekspresyonu RT-PCR Bulgularının Zamana Bağlı Grup İçi Karşılaştırmalı İstatistiksel Analizi

Kontrol grubunun 24. ve 72. saatteki VEGF gen ekspresyon düzeyleri karşılaştırıldığında 72. saatte gözlemlenen kat değişiminin 24. saate kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermediği belirlenmiştir (p>0,05) (Tablo 4.14).

10⁻⁶ M İloprost grubunda 24. ve 72. saatlerde ölçülen VEGF gen ekspresyon düzeyleri karşılaştırıldığında, 72. saatte gözlemlenen kat değişimindeki azalışın 24. saate kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir (p=0,043; p<0,05) (Tablo 4.14).

2x10⁻⁶ M İloprost grubunda 24. ve 72. saatlerde ölçülen VEGF gen ekspresyon düzeyleri karşılaştırıldığında, 72. saatte gözlemlenen kat değişiminin 24. saate göre istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermediği belirlenmiştir (p>0,05) (Tablo 4.14).

Tablo 4.14: Grupların VEGF Ekspresyon Düzeylerinin Grup İçinde Zamana Bağlı Karşılaştırılması

	24 Saat	72 Saat	
	Mean±Sd (Median)	Mean±Sd (Median)	^b p
Kontrol	1±0.09 (1.03)	1.01±0.15 (1.04)	0,893
10⁻⁶ M İloprost	4.01±0.69 (3.73)	2.75±0.47 (2.75)	0.043*
2x10⁻⁶ M İloprost	0.96±0.24 (0.94)	0.84±0.11 (0.77)	0.500

^bWilcoxon Signed Rank Test *p<0,05

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Vital pulpa tedavilerinde kullanılan materyallerin pulpa rejenerasyonu üzerindeki etkisi, tedavi başarısını değerlendirme kriterlerinden biri olup anjiyogenezis üzerinde etkili olabilecek materyallerin vital pulpa tedavisinde kullanımı tedavi başarısını olumlu yönde etkileyebilmektedir. Eksojen bir prostasiklin analogu olan İloprost'un anjiyogenezisi artırıcı etkisi literatürde ayrıntılı olarak incelenmiş olsa da, dental pulpa kök hücreleri üzerindeki etkilerine yönelik çalışmalar oldukça sınırlıdır. Bu çalışmada, vital pulpa tedavilerinde kullanılması amacıyla, İloprost'un kontrollü salımını sağlayacak sıcaklığa duyarlı enjekte edilebilir bir hidrojel tasarlanmış ve bu hidrojin karakterize edilmesi için çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

Diş pulpası dişin merkezinde yer alan dişin vitalitesini korumakla sorumlu etrafı dentin dokusu ile çevrili gevşek bir bağ dokusudur (Kawashima ve ark., 2016). Pulpa dokusunun içinde fibroblastlar, odontoblastlar, iltihap ve immün sistemi hücrelerinin yanı sıra, perivasküler alanlarda ve Hohl'un hücre açısından zengin bölgesinde bulunan dental pulpa kök hücrelerini barındırmaktadır (Huang, 2009).

Travma, çürük, restoratif işlemler ve anatomik anomaliler gibi durumlar sonucunda pulpa dokusu ekspoze olup hasar gördüğü zaman, bu bölgedeki odontoblastlar zarar görmektedir (Aguilar ve ark., 2011) (Saghiri ve ark., 2015). Bu tür durumlarda doku tamir mekanizması devreye girerek, pulpanın etkilenmemiş bölgelerinde yer alan dental pulpa kök hücrelerinin hasarlı bölgeye göç etmesi ve burada odontoblast benzeri hücre popülasyonlarını oluşturarak doku rejenerasyonunu başlatması hedeflenmektedir (Farges ve ark., 2015).

Diş hekimliğinde vital pulpa tedavileri, dentin oluşumunu uyarmak, pulpa vitalitesini korumak ve bu vitaliteyi sürdürebilmek için dentin-pulpa kompleksinin rejenerasyonu açısından büyük bir önem taşımaktadır (Abbass ve ark., 2020)(Sharma ve ark., 2019). Vital pulpa tedavisi terimi başlangıçta sadece pulpa kuafajı için kullanılmaktayken daha sonra materyallerin ve tekniklerin gelişmesiyle beraber pulpanın canlılığını korumayı hedefleyen bütün tedaviler için kullanılmaya başlanmıştır. Ayrıca tanım daha da genişletilerek “pulpanın canlılığını korumayı amaçlayan stratejiler” olarak isimlendirilmiştir (Duncan ve ark., 2019). Bu tedaviler ilk defa 1756 yılında Pfaff tarafından tanımlanan altın folyo uygulamasıyla başlamıştır. Günümüze kadar bir çok farklı yöntem ve bir çok farklı materyal

pulpanın vitalitesini korumak amacıyla uygulanmıştır (Hanna ve ark., 2020). Son zamanlarda, doku mühendisliği ve kök hücre araştırmalarındaki ilerlemeler, pulpa/dentin revaskülarizasyonu ve rejenerasyonu için potansiyel bir tedavi keşfine yol açmıştır (Lin ve ark., 2020).

Vital pulpa tedavisinde başarıya ulaşmanın anahtarı, diş pulpasının sağlıklı bir mikroyapı ve yeterli kan akışıyla korunabilmesidir (Lin ve ark., 2020). Hasar gören pulpa dokusunda onarım süreci, neovaskülarizasyon ile başlar; bunu prekürsör hücrelerin proliferasyonu, göçü ve odontoblast benzeri hücrelere farklılaşması izlenmektedir (Mullane ve ark., 2008; Clarkin ve ark., 2008). Yeni vasküler ağların oluşumu, oksijen ve besin maddelerinin dokuya taşınmasını sağlayarak doku rejenerasyonu için gerekli mikroçevrenin oluşumunda kritik bir öneme sahiptir (Bae ve ark., 2012). Bu süreçte VEGF gibi anjiyojenik faktörler, kök hücreleri çevre dokulardan hasar bölgesine çekerek vaskülarizasyon ve anjiyogenezin erken evrelerinde önemli görev üstlenmektedir (Mullane ve ark., 2008).

Vital pulpa tedavilerinde kullanılan mevcut biyomateryallerin, progenitör hücrelerin etkin bir şekilde hedeflenmesi ve farklılaşması için gerekli olan spesifik biyolojik kontrolü sağlayamadıkları için, inflamasyon ve enfeksiyöz sürecini kontrol etme açısından büyük ölçüde yetersiz kaldığı gösterilmiştir (Schmalz ve Smith, 2014). Güncel diş hekimliği araştırmaları, bu sınırlamaların üstesinden gelmek için geleneksel yöntemlere kıyasla daha güvenilir ve etkili stratejilerin geliştirilmesine odaklanmıştır (Murray ve ark., 2007). Dentin-pulpa kompleksi onarım mekanizmalarına ilişkin bilgi birikiminin artmasıyla birlikte, yalnızca geleneksel teknikleri destekleyen değil; aynı zamanda malzeme bilimleri, genetik, proteomik ve kök hücre tedavisi gibi alanlardaki gelişmeleri entegre eden terapötik yaklaşımlar ön plana çıkmıştır. Bu nedenle rejeneratif diş hekimliğinde malzeme biliminin etkin kullanımı büyük önem taşımaktadır (Mitsiadis ve ark., 2012). Kullanılan materyaller, ekspozite olan pulpanın üzerini örtecek bariyer görevi görmeli ve kök kanal tedavisine ihtiyaç duyulmasını engelleyerek pulpa dokusunun canlılığını koruyabilmelidir (Poggio ve ark., 2014). Bundan dolayı diş dokularına direkt temas eden bu materyaller dokuda; alerjik, iritan, iltihabi, toksik, genotoksik veya karsinojenik bir yanıtı neden olmamalıdır (Schmalz, 1994; Islam ve ark., 2023).

Prostasiklin (PGI₂); fibroblastlar, osteositler ve vasküler endotel hücreleri gibi çeşitli hücre tipleri tarafından üretilmektedir. PGI₂, VEGF ekspresyonunu uyararak hücre

proliferasyonunu ve anjiyogenezi artırmakta, ayrıca kemik rejenerasyonunu etkilemektedir (Melgosa ve ark., 2010; Y. Zhu ve ark., 2010). İloprost, stabil ve uzun etkili bir PGI₂ analogu olup, kanlanmanın yetersiz olduğu, durumlarda klinik tedavide yaygın olarak kullanılmaktadır (Melgosa ve ark., 2010). Kan damarlarının genişlemesini uyarak kan akışını yavaşlatmakta ve İloprost infüzyonundan sonra dolaşımdaki endotel hücrelerinin ve bunların öncüllerinin seviyelerinde artış meydana getirmektedir (Hassoun, 2009; Jäger ve ark., 2011). Ayrıca bu hücrelerde ICAM-1, BCL₂ ve VEGF ekspresyonunun arttığı ve anjiyogenezin meydana geldiği görülmüştür (Tinazzi ve ark., 2010).

Yiğitaslan ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, pulmoner hipertansiyonlu ratların İloprost'la, tedavisinde VEGF protein seviyelerinin anlamlı derecede yüksek olduğu bulunmuştur (Yiğitaslan ve Sirmagul, 2012). Rademaker ve arkadaşlarının sistemik skleroz ile ilişkili Raynaud fenomeni üzerine yaptığı çalışmada, tedavi amacıyla uygulanan İloprost infüzyonu sonrasında hastaların dijital kan akışında artış ve buna bağlı olarak el sıcaklığında belirgin bir artış gözlemlenmiştir (Rademaker ve ark., 1989). Benzer şekilde, Multicenter ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada da, sistemik skleroz kaynaklı Raynaud fenomeni bulunan hastalarda intravenöz İloprost infüzyonunun kısa vadeli tedavide etkili olduğu gösterilmiştir (Limjeerajarus, Osathanon, ve ark., 2014). Bu çalışmalar, İloprost'un anjiyogenezi teşvik eden eksojen bir prostasiklin analogu olduğunu ortaya koymaktadır

Anjiyogenez, diş pulpa dokusunun hasar gördüğü durumlarda onarım ve rejenerasyon süreçlerinde kritik bir rol oynamaktadır. Erken inflamasyon aşamasında lokal düzeyde yeni damar oluşumu, pulpaya oksijen ve besin sağlayarak pulpa dokusunun nekrozunun önlenmesi açısından çok önemlidir (Rombouts ve ark., 2017). Son zamanlarda, anjiyogenezisi teşvik etmek amacıyla İloprost direk pulpa kuafajı için potansiyel bir ajan olarak düşünülmüştür ve birçok çalışmada bu amaçla kullanılmıştır (Limjeerajarus, Chanarattanubol, ve ark., 2014). Yapılan çalışmalarda İloprost dental pulpa kök hücrelerine uygulandığı zaman hücre göçünü indüklediği (Seang ve ark., 2019) (Almeshari ve ark., 2022), VEGF mRNA ekspresyonunda artışa neden olduğu (Almeshari ve ark., 2022)(Limjeerajarus ve ark., 2019), (Limjeerajarus ve ark., 2020),(Limjeerajarus, Chanarattanubol, ve ark., 2014)(Seang ve ark., 2018) (Limjeerajarus, Osathanon, ve ark., 2014), IL-16, IL-12 ekspresyonunu azaltarak anti inflamatuvar etkiye sahip olduğu (Wahyudi ve ark., 2023), osteojenik farklılaşmayı yani osteo-odontojenik genlerin mRNA

ekspresyonunu artırdığı görülmüştür (Limjeerajarus, Chanarattanubol, ve ark., 2014) (Almeshari ve ark., 2022). Ayrıca in vivo rat modellerinde pulpa dokusunda tersiyer dentin oluşumunu teşvik etme (Limjeerajarus, Chanarattanubol, ve ark., 2014) (Limjeerajarus ve ark., 2019)(Almeshari ve ark., 2021), pulpal kan akışında artış (Limjeerajarus ve ark., 2019) (Limjeerajarus, Osathanon, ve ark., 2014) ve pulpal inflamatuvar etkiyi azaltmaya (Almeshari ve ark., 2021) sahip olduğu çeşitli çalışmalarla ortaya konmuştur. Periodantal ligament kök hücrelerinde de VEGF ve COL1 mRNA ekspresyonunu arttırdığı ve periodantal ligamentin yeniden oluşumunu teşvik ettiği görülmüştür (Jearanaiphaisarn ve ark., 2018).

Vasküler sistem, dişin dentin-pulpa kompleksinde inflamasyonun düzenlenmesi ve rejeneratif süreçlerin başlatılmasında temel bir rol oynamaktadır. Bu kompleksin yenilenebilmesi için anjiyogenezi indükleyebilen biyomoleküllere ihtiyaç duyulmaktadır. Revaskülarizasyonu tetikleyen anjiyojenik sinyaller, yalnızca yeni damar oluşumunu sağlamakla kalmaz; aynı zamanda doku büyümesi ve homeostazın sürdürülmesi için gerekli olan oksijen ve besin maddelerinin taşınmasını sağlayarak rejenerasyon için elverişli bir mikroçevre oluşturur. VEGF, FGF-2 ve PDGF gibi büyüme faktörleri, anjiyogenezi sürecinin erken evrelerinde kilit rol oynayan önemli anjiyojenik mediatörlerdir (Hoeben ve ark., 2004). Bu faktörler, hasar görmüş veya travmatize olmuş dokularda anjiyogenezi ve neovaskülarizasyonu uyararak iyileşme sürecini başlatırlar (Mullane ve ark., 2008). Özellikle VEGF, anjiyogenezi destekleyerek dokuya oksijen ve besin taşınmasını artırmakta; aynı zamanda kök/progenitör hücrelerin hasarlı bölgelere göçünü ve proliferasyonunu teşvik etmektedir (Cross ve Claesson-Welsh, 2001). Bu süreç, hücre diferansiyasyonunu ve doku rejenerasyonunu kolaylaştırarak iyileşmenin etkinliğini artırır.

Yapılan çalışmalarda, insan dental pulpasının hipoksi taklit eden kimyasal ajanlar ve histon deasetilaz gibi çeşitli uyarıcılarla stimüle edilmesi sonucunda VEGF ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir (J. J. Kim ve ark., 2012). VEGF, güçlü bir endotelial hücre mitojeni olarak, bu hücrelerin büyüme faktörleri salgılamasını, inflamatuvar süreçleri desteklemesini ve odontoblast benzeri hücreleri hasarlı bölgeye çekmesini sağlayarak dental pulpa iyileşmesine katkıda bulunmaktadır. Dental pulpa hücreleri, bu endotelial hücrelerden gelen sinyallere yanıt vererek tersiyer dentin oluşumunu desteklemektedir (Min ve ark., 2011). Ayrıca, bu büyüme faktörlerinin hem dentin matriksinde hem de pulpa dokusunda

bulunduğu bildirilmiş; anjiyogenezi, kemotaksisi, hücre proliferasyonu ve diferansiyasyonunu etkileyerek dental pulpa rejenerasyonunu yönlendirdiği ortaya konmuştur (Limjeerajarus, Osathanon, ve ark., 2014). Son dönemde yapılan çalışmalarda ise, yara iyileşmesinin erken evresinde ekzojen VEGF uygulanmasının, dental pulpa kök hücrelerinde odontojenik gen ekspresyonunu artırdığı rapor edilmiştir (Aksel ve Huang, 2017). VEGF dahil olmak üzere çeşitli anjiyojenik büyüme faktörlerinin dentin matriksinde bulunduğu bildirilmiştir. Bu faktörler, odonto-/osteoprogenitör hücrelerin hasarlı bölgeye göçünü teşvik ederek dentin-pulpa kompleksinin onarıcı yanıtına katkı sağlayabilir (Roberts-Clark ve Smith, 2000)

Limjeerajarus ve ark, 2014 yılında yaptıkları çalışmada İloprost'un dental pulpa revaskülarizasyonu üzerindeki etkisi değerlendirmiş ve 24 saat sonra, İloprost tedavisi VEGF, FGF-2 ve PDGF mRNA düzeylerini doza bağımlı şekilde belirgin biçimde arttırmıştır (Limjeerajarus, Osathanon ve ark., 2014). Limjeerajarus ve ark, 2014 yılında yaptığı bir diğer çalışmada 24 saat sonra, 10^{-6} M İloprost tedavisi VEGF mRNA düzeylerini doza bağımlı ve anlamlı bir şekilde arttırmıştır (Limjeerajarus, Chanarattanubol ve ark., 2014). Jearanaiphaisarn ve ark. 2016 yılında periodontal ligament kök hücreleri üzerinde yaptıkları çalışmada 24 saat sonra VEGF mRNA düzeyi anlamlı bir şekilde artmıştır (Jearanaiphaisarn ve ark., 2018). Seang ve arkadaşları 2018 yılında yaptıkları çalışmada insan dental pulpa kök hücrelerinde VEGF protein ekspresyonuna olan etkisi incelendiği zaman 72.saatte, 24.saatte göre anlamlı bir artış olduğu görülmüştür (Seang ve ark., 2018). Limjeerajarus ve ark, yaptığı çalışmada 72.saatte kontrol grubuna göre anlamlı bir azalış olduğu görülmüştür ama pulpal kan akışında da artış görülmüştür (Limjeerajarus ve ark 2019). Limjeerajarus ve ark.'nın yaptıkları çalışmada İloprost uygulandıktan 72 saat sonra kontrol grubuna göre VEGF mRNA düzeyi anlamlı bir şekilde artmıştır (Limjeerajarus ve ark., 2020). Tüm bu çalışmaların sonuçlarından yola çıkarak bu çalışmada da etken madde olan İloprost'un dental pulpa kök hücrelerine uygulandıktan sonra VEGF mRNA ekspresyonu üzerindeki 24 saat ve 72 saat sonraki etkileri RT-PCR analizi ile değerlendirilmiştir.

Limjeerajarus ve ark., prostasiklin I₂ (PGI₂) analoğu olan İloprost'un, in vitro koşullarda VEGF ekspresyonunu artırdığı ve bu artışın osteo-/odontojenik belirteç genler olan OSX, DMP-1, RUNX-2, ALP, COL1, BMP-2 ve BMP-4' n ekspresyonunu tetikleyerek tersiyer

dentin oluşumunu indüklediğini bildirmişlerdir (Limjeerajarus, Osathanon, ve ark., 2014). Limjeerajarus ve ark., İloprost'un alkalen fosfataz (ALP) aktivitesini artırdığı ve mineralize nodül oluşumunu belirgin şekilde teşvik ettiğini göstermişlerdir (Limjeerajarus, Chanarattanubol, ve ark., 2014). Bu iki çalışmada elde edilen bulgular bir araya alındığında, İloprost'un insan dental pulpa hücrelerinin osteo-/odontoblastik hücre türlerine farklılaşmasını destekleme potansiyeline sahip olduğu sonucuna varılmıştır

Von Willebrand faktörü (vWF), endotel hücrelerinin yüzeyinde bulunan bir glikoprotein olup, aynı zamanda anjiyogenezi düzenlemektedir. VEGF'nin endotel hücrelerinde vWF'yi yukarı regüle ettiği bildirilmiştir. vWF, doku kesitlerinde mikrodamarları tanımlamak için rutin olarak kullanılır (Zanetta ve ark., 2000).

Anjiyogenezi, yara iyileşmesinin sonraki evresinde kolajen liflerinin oluşumunu ve olgunlaşmasını da kontrol eder. vWF, trombin oluşumu sürecinde, vasküler hasar bölgesinde açığa çıkan kolajene bağlanarak koagülasyonun düzenlenmesinde önemli rol oynar. Seang ve arkadaşlarının 2018 yılında gerçekleştirdiği çalışmada, İloprost uygulamasının VEGF mRNA ekspresyonunu artırdığı ve bu artışla birlikte von Willebrand faktörü (vWF) ifadesinin de indüklendiği rapor edilmiştir. Bununla ilişkili olarak COL1 ifadesinde artış gözlemlenmiştir. Damarlar etrafında vWF ve kolajenin ko-lokalizasyonu, anjiyogenezin yeni kolajen liflerinin sentezi ile ilişkili olduğunu göstermektedir. İloprost'un vWF ve COL1'in yukarı regülasyonu sonrasında anjiyogenezi, yara iyileşmesini ve doku yeniden şekillendirmeyi artırmada olası rolünü göstermektedir (Seang ve ark., 2018).

Yeni damar oluşumu ve mezenkimal kök hücrelerinin kök kanalına yönelmesi sonrasında, hücre proliferasyonunun düzenlenmesi ve ekstraselüler matris üretimiyle doku onarımı ve rejenerasyonu gerçekleşebilmektedir (Han ve ark., 2014). COL1, yeni kılcal damarların büyümesini destekleyerek, hücrelerin ekstraselüler matrise bağlanmasını teşvik ederek ve hücre kemotaksisini artırarak iyileşme ve rejenerasyonda önemli roller oynamaktadır (Chiang ve ark., 1978; Han ve ark., 2014). Bu süreçte lifleri depo ederek, yönlendirerek ve organize ederek doku rejenerasyonunu düzenler. İloprost'un dental pulpa kök hücrelerindeki COL1 gen ekspresyonu üzerindeki etkisi bir çok çalışmada incelenmiştir.

Seang ve ark, yaptıkları çalışmada İloprost, Masson'un trikrom boyaması ve COL1 immüno Floresan boyaması ile gösterildiği üzere kolajen birikimini indüklediği gösterilmiştir. (Seang ve ark., 2018). Limjeerajarus ve ark, yaptığı çalışmada 10^{-6} M konsantrasyon İloprost uygulandığı zaman COL1 mRNA ekspresyon düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu görülmüştür (Limjeerajarus, Chanarattanubol, ve ark., 2014). Jearanaiphaisarn ve ark yaptıkları çalışmada İloprost'un COL1 mRNA ifadesini indüklediğini göstermişlerdir ve COL1 protein sentezine olan indükleyici etkisi, immüno Floresan boyama ile sitoplazmada kollajen ekspresyonunun varlığıyla doğrulanmıştır. (Jearanaiphaisarn ve ark., 2018). Ancak Seang ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise 10^{-6} M konsantrasyon İloprost uygulandığı zaman COL1 gen ekspresyonunda bir değişim görülmemiştir (Seang ve ark., 2019).

PGI₂, IP (Prostasiklin reseptörü) reseptörlerini aktive ederek ve PKA yolunu başlatarak etkisini göstermektedir (Dorris ve Peebles, 2012). PGI₂, PKA sinyal yolları aracılığıyla endotel hücrelerinde laminin bazal membranı üzerinde endotelin yeniden şekillendirmesini (remodeling) düzenlemektedir (Yun ve ark., 2016). Ayrıca, VEGF, endotel hücrelerinde PLC- γ -PKA sinyal iletimi yoluyla vWF ifadesini düzenlemektedir (Xiong ve ark., 2009). Seang ve ark. yaptığı çalışmada, bir PKA inhibitörün eklendiği zaman İloprost tarafından indüklenen vWF/COL1 ekspresyonunun diş pulpası dokusunda azaldığını göstermişlerdir. Bu sonuçlar, insan pulpa dokusunda İloprost'un vWF/COL1 ifadesinin ekspresyonunun artışının PKA sinyal yolları aracılığıyla meydana geldiğini doğrulamıştır. İloprost inkübasyonundan önce PKA inhibitörü ile tedavi edilen dişlerden alınan kesitlerde, İloprost ile tedavi edilen gruba oranla daha az sayıda vWF-pozitif hücre ve daha düşük COL1 ifadesi gözlemlendiği bildirilmiştir (Seang ve ark., 2018). Jearanaiphaisarn ve ark., prostasiklin analogu olan İloprost'un insan periodontal ligament hücreleri (hPDL'ler) üzerindeki etkilerini in vitro ortamda değerlendirdikleri çalışmada elde edilen bulgulara göre, hPDL hücrelerinin IP reseptör antagonisti olan CAY10449 ile ön muamele edilmesi, 10^{-6} M İloprost ile tedavi edilen grupta 1 ve 24 saatlik sürelerde gözlemlenen VEGF mRNA ekspresyonundaki artışı anlamlı düzeyde baskılamıştır (Jearanaiphaisarn ve ark., 2018). Limjeerajarus ve ark., gerçekleştirdikleri çalışmada, İloprost'un dental pulpa revaskülarizasyonu üzerindeki gen ekspresyonu üzerindeki etkilerini daha ayrıntılı incelemek amacıyla bir IP reseptör antagonisti olan CAY10449 kullanılmışlardır. İnsan dental pulpa kök hücreleri CAY10449 ile ön muamele edildiği zaman İloprost tarafından indüklenen VEGF, FGF-2 ve PDGF

mRNA ekspresyonunu inhibe etmiştir. Bu bulgu, İloprost'un bu genlerin regülasyonuna doğrudan etkisi olduğunu doğrulamaktadır. Ayrıca, 24 ve 72 saatlik inkübasyon sürelerinde gözlemlenen hücre proliferasyonu üzerindeki İloprost etkisi de CAY10449 tarafından baskılanmıştır (Limjeerajarus, Osathanon, ve ark., 2014). Bu çalışmaların sonuçları İloprost'un IP reseptörlerini aktive ederek PKA yolunu başlattığını doğrulamaktadır.

PGI₂ (prostasiklin), endotel hücrelerinde ve makrofajlarda bulunur ve hücre migrasyonunu desteklemektedir (Page-McCaw ve ark., 2007). MMP-9'un hücre migrasyonundaki rolü, çeşitli çalışmalarla ortaya konmuştur. In vivo ortamlarda MMP-9 ekspresyonunun bozulması, yalnızca yeniden epitelizasyon sürecinin aksamasına ve düzensiz kollajen fibrilojenezine neden olmakla kalmayıp, aynı zamanda hücre migrasyonunun da belirgin şekilde bozulmasına yol açmaktadır. Jonkman ve ark. PKA inhibitörünün eklenmesinin hem hücre migrasyonundaki hızlandırıcı etkiyi hem de MMP-9 ekspresyonunu azalttığını ortaya koymuştur (Jonkman ve ark., 2014). Benzer şekilde Seang ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada da PKA inhibitörü İloprost ile indüklenen MMP-9 ekspresyonunu baskılamış ve bu durum MMP-9 ekspresyonunun PKA yolu aracılığıyla düzenlendiğini doğrulamıştır (Seang ve ark., 2019). Bu çalışmaların sonuçlarına göre İloprost'un dental pulpada rejenerasyon amacıyla kullanılabileceğini doğrulamaktadır. Tüm bu çalışmaların sonuçlarına dayanarak bu çalışmada da İloprost dental pulpa kök hücrelerine uygulanarak etkilerinin değerlendirilmesine karar verilmiştir.

Seang ve ark, 2019 yılında yaptıkları çalışmada eksojen bir prostasiklin (PGI₂) olan İloprost'un dental pulpa kök hücrelerinin migrasyonunu artırıcı etkisini ve bu etkinin altında yatan mekanizmayı araştırmışlardır. İnsan dental pulpa kök hücrelerinde migrasyonu, yara iyileşmesinde in-vitro model olarak kullanılan Scratch Assay testi kullanılarak analiz edilmiştir. İnsan dental pulpa kök hücreleri 24 ile 72 saat boyunca İloprost varlığında kültürlenmiştir. Matriks metalloproteinaz 9 (MMP-9) için immüno Floresan boyama, kantitatif PCR (qPCR) ile gen ekspresyon analizi, jelatin zimo grafi ve MMP-9 ekspresyonuna yönelik ELISA testleri uygulanmıştır. IP reseptörünü, PKA sinyal yolunu ve MMP-9 aktivitesini engellemek için sırasıyla bir PGI₂ (IP) antagonisti, protein kinaz A (PKA) inhibitörü ve MMP-9 inhibitörü kullanılmıştır. İnsan dental pulpa kök hücreleri kültürlerinde mekanik olarak oluşturulan çizik, İloprost varlığında daha hızlı kapanmıştır. Bu sonuç, artan MMP-9 mRNA ve protein ekspresyonu ile daha yüksek jelatinaz

aktivitesiyle paralellik göstermiştir. İloprost ile artan bu etkiler, bir IP reseptör antagonisti ya da PKA inhibitörü ile baskılanmıştır. PKA aktivatörü olan forskolin, migrasyonda artışla birlikte MMP-9 ekspresyonunu da arttırmıştır. Seçici bir MMP-9 inhibitörünün uygulanması İloprost ile indüklenen migrasyonda azalmaya neden olmuştur (Seang ve ark., 2019).

Limjeerajarus ve ark, 2014 yılında yaptıkları çalışmada İloprost'un in vivo olarak dental pulpadaki kan akışı üzerindeki etkisini araştırmak için sıçan molar dişlerinde mekanik pulpa ekspozisyonu modeli kullanılmış ve 10^{-6} , 10^{-7} veya 10^{-8} M konsantrasyonlarında İloprost uygulamıştır. İloprost'a maruz kalan gruplar, Ca(OH)_2 ile karşılaştırıldığında, hasardan hemen sonra ve 24 saat sonrasında yapılan ölçümlerde PBF açısından anlamlı bir fark tespit edilmemesine karşın 72 saat sonra pulpa kan akışında (PBF) doza bağımlı olarak anlamlı bir artış gözlemlenmiştir (Limjeerajarus, Osathanon ve ark., 2014).

Limjeerajarus ve ark.(2014), In vivo çalışmada ise, pulpa ekspozisyonu sonrası 10^{-6} , 10^{-7} , veya 10^{-8} mol/L konsantrasyonlarında İloprost ve kalsiyum hidroksit uyguladıktan 24 ve 72 saat sonra her bir örneğin kan akış hızı, lazer Doppler flowmetresi kullanılarak 5 dakika boyunca ölçülmüştür. İn vivo çalışmada ise uygulamadan 72 saat sonra İloprost ile tedavi edilen gruplar, kalsiyum hidroksit uygulanan grupla karşılaştırıldığında, doza bağlı olarak pulpal kan akışında anlamlı bir artış gözlemlenmiştir. Ancak, İloprost uygulamasının hemen ardından ve 24 saat sonra yapılan ölçümlerde, pulpal kan akışı açısından anlamlı bir fark saptanmamıştır (Limjeerajarus, Osathanon ve ark., 2014).

Bir ilaç ya da biyomolekülün terapötik düzeylere ulaşmasını sağlamak amacıyla salımının kontrol edilmesi, klinik açıdan büyük önem taşımaktadır (Limjeerajarus ve ark., 2020). Bu nedenle, ilacın hedef bölgeye yönlendirilmesini sağlayan, terapötik düzeyleri uzun süre boyunca sürdürebilen ve yan etkileri azaltan ilaç taşıma sistemlerinin geliştirilmesi büyük önem taşımaktadır. İloprost'un dental pulpa iyileşmesini teşvik eden umut verici bir terapötik ajan olduğu gösterilmiş olmasına rağmen (Limjeerajarus, Chanarattanubol, ve ark., 2014) vücut içindeki yarı ömrü yalnızca 30 dakikadır (Stitham ve ark., 2011). Bu nedenle, yavaş ve sürekli salım sağlayan kontrollü bir ilaç taşıma sistemine ihtiyaç duyulmaktadır (Rescignano ve ark., 2014; Seang ve ark., 2019). Ayrıca, ticari olarak mevcut prostasiklin analogları genellikle aerosol veya çözelti formülasyonları şeklinde bulunmaktadır; bu durum, bunların diş kavitesine uygulanmasını zorlaştırmaktadır. (Limjeerajarus ve ark., 2019). İloprost'un klinik kullanıma yönelik bir dental biyomalzeme olarak potansiyelini

daha kapsamlı şekilde araştırabilmek için, optimal bir taşıma sisteminin geliştirilmesi gereklidir. Jearanaiphaisarn ve ark.,'ları da İloprost'un dental pulpa kök hücrelerine olan etkisini değerlendirdikleri çalışmada İloprost'un kök kanalına etkin şekilde uygulanabilmesi için, klinik uygulamalarda kullanılmaya uygun, optimum bir taşıyıcı sistemi geliştirmesi gerektiğini ileri sürmüşlerdir (Almeshari ve ark., 2022).

Daha önce İloprost'u taşıma amacıyla Limjeerajarus ve ark., yaptıkları çalışmada enjekte edilebilir bir PF127 hidrojel geliştirmişler ve in vitro ortamda 5 güne kadar uzayan kontrollü bir salım profili elde etmişlerdir (Limjeerajarus ve ark., 2020). Aynı amaçla Limjeerajarus ve ark., yaptığı bir diğer çalışmada, İloprost/PLGA mikroküre taşıma sistemi geliştirilmiştir. İloprost içeren PLGA mikroküre salım sistemi, sıçan dişini ekspoz ederek pulpaya uygulandığı modelde dental pulpa kan akışını anlamlı ve uzun süreli şekilde artırmış; aynı zamanda tersiyer dentin oluşumunu da teşvik etmiştir (Limjeerajarus ve ark., 2019).

Farklı bileşimlerde formüle edilebilen hidrojeller, sahip oldukları geniş adaptasyon kabiliyeti ve özellikle kök kanalı gibi dar alanlara uygulanabilme yetenekleri sayesinde, enjekte edilebilir sistemler olarak ön plana çıkmaktadır (Chang ve ark., 2017). Bu özelliklerinden dolayı birçok çalışma, kök kanalına yönelik ilaç taşıma sistemlerinde hidrojel bazlı sistemleri tercih etmiş ve bu sistemlerin pulpa kuafajı, kök kanalı dezenfeksiyonu ile pulpa rejenerasyonu gibi klinik uygulamalardaki potansiyelini araştırmıştır (Matoug-Elwerfelli ve ark., 2021).

Komabayashi ve ark., direk pulpa kuafjında kullanılmak amacıyla kalsiyum hidroksiti ışıkla sertleştirilen PEGMC hidrojele yüklemişlerdir. Hidroksit ile yüklenmiş PEGMC hidrojel üzerine yapılan çalışmalarda sürekli ve kontrol edilebilir kalsiyum iyonu salımı sağlanmıştır (Komabayashi, Wadajkar, ve ark., 2016). Osmond ve ark., ekspoz olmuş dental pulpanın vitalitesinin korunmasında kalsiyum fosfat nanopartiküllerinin rolünü araştırmak için kalsiyum fosfat nanopartikülleri içeren karboksimetil-kitosan ve diglisidil eter bazlı enjekte edilebilir bir hidrojel kullanmışlardır. Yapılan çalışmanın sonunda hidrojel sisteminin biyouyumlu olduğunu ve dental pulpa kök hücrelerinin çoğalmasını ve farklılaşmasını teşvik edici bir etkiye sahip olduğunu göstermişlerdir (Osmond ve Krebs, 2021). Wu ve ark., VEGF'nin sürekli salımını sağlamak, dental pulpa kök hücrelerinin odontojenik farklılaşmasını teşvik etmek ve pulpotomi sonrası pulpa kaplama uygulamasında olası faydalarını araştırmak için kitosan/beta-gliserofosfat (CS/ β -GP) içine VEGF yükleyerek,

VEGF'nin sürekli ve kontrollü salımını gerçekleştirmişlerdir (S. Wu ve ark., 2019). Bu amaçla bu çalışmada da İloprost'u taşımak amacıyla sıcaklığa duyarlı enjekte edilebilir bir hidrojel tasarlanmasına karar verilmiştir. Sıcaklığa duyarlı hidrojel kullanma amacımızdaki hedef oda sıcaklığında sıvı olup pulpa odası sıcaklığında jelleşerek kontrollü ilaç salımını sağlayabilmektir. Etken maddeyi dar olan kök kanallarına uygulayabilmek için de enjekte edilebilir özellikte olması tercih edilmiştir.

Poloksamerler sıcaklığa duyarlı enjekte edilebilir hidrojellerdir (Jeong ve ark., 2012; Morariu ve Nita, 2011). Lokal tedavilerde poloksamer enjeksiyonu yapıldığında, uygulama yerinde yavaş ve sürekli ilaç salımı sağlayan bir depo oluşturur ve hedef organa ilacı iletir. Bu özelliklere dayanarak, FDA onaylı biyoyumludurlar ve ilaç taşıma sistemleri için uygun bir taşıyıcı olarak görülmektedir (Cui ve ark., 2022). Poloksamer 407 (P407), ayarlanabilir olan sıcaklık değişimiyle sol-jel geçiş yapabilme özelliği, çok düşük toksisite ve iritasyon profili, yüksek suda çözünürlük, iyi ilaç salım özellikleri ve diğer kimyasal maddelerle yüksek geçimlilik gösteren bir ABA tipi triblok kopolimerdir. Yapısında hidrofilik polietilen oksit (PEO) ve hidrofobik polipropilen oksit (PPO) blokları bulunmaktadır (J. Chen ve ark., 2013). P407'nin sıcaklıkla jelleşme özelliği tersinirdir; düşük sıcaklıklarda polimer, akışkan viskoz bir sıvı gibi davranırken, sıcaklık artışıyla birlikte kararlı yarı-katı bir jel ağına dönüşmektedir (Y. Chen ve ark., 2021). Sıcaklık yükseldikçe, P407 kopolimer molekülleri misel yapıları oluşturacak şekilde bir araya gellmektedir. Jelleşme sürecinin ilk basamağı olan miselizasyon, hidrofobik polipropilen oksit bloklarının dehidrasyonu sonucu meydana gelir. Yeterli konsantrasyondaki örneklerde bu miselizasyon sürecini jelleşme izlemektedir (Shinde ve ark., 2008). Son yıllarda, P407, fizyolojik sıcaklıkta termo-tersinir özellikleri nedeniyle özellikle mukozal ilaç dağıtımında yaygın olarak kullanılmaktadır. P407, sol-jel geçiş sıcaklığını modüle etmek için genellikle diğer poloksamerlerle, özellikle P188 ile birlikte kullanılmaktadır (Hirun ve ark., 2022). Poloxamer 188 yaklaşık olarak %80 POE ve %20 POP birimleridir. Poloksamer 407'ye benzer bir emülgatör, çözüldürücü, dağıtıcı ve ıslatıcı ajan olarak kullanılır. P188 ve P407, ters termosensitivite gösterir; bu nedenle düşük sıcaklıkta sulu çözeltilerde çözünürler, ancak daha yüksek sıcaklıkta jelleşirler (Akkari ve ark., 2016). FDA tarafından birçok oral solüsyon, süspansiyon, inhaler formülasyonlar, intravenöz formülasyonlar, oftalmik formülasyonlar ve topikal formülasyonlarda yardımcı madde olarak onaylanmıştır (Devi ve ark., 2013).

Saleem ve ark. 2024 yılında yaptıkları çalışmada, Regorafenib (RG) kolorektal kanser (CRC) tedavisinde kullanımında etkinliğini artırmak amacıyla alternatif uygulama yollarının araştırılması amacıyla biyoyararlanımı artırılmış ve toksisitesi azaltılmış P407, P188 ve yüzey aktif madde olarak Tween® 80 (T80) saf suyla birleştirilerek RG yüklü sıvı supozituar formülasyonu geliştirmişlerdir. Caco-2 ve HCT 116 hücre hatları üzerinde in vitro hücresel çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Farklı konsantrasyonlarda (0.5–100 µg/mL) RG yüklü sıvı supozituar, fizyolojik salin (normal tuzlu su) ve RG süspansiyonu uygulanarak 24 saat inkübasyon gerçekleştirilmesinin ardından MTT analizi yapılarak sitotoksitesi değerlendirilmiştir ve her iki hücre hattında da hücre canlılığı doza bağımlı olarak azalmıştır. RG yüklü sıvı supozituar formülasyonu; hedefe yönelik kolorektal kanser tedavisinde geliştirilmiş doku lokalizasyonu, artırılmış biyoyararlanım ve uygulama bölgesinde toksik etki oluşturmaması sayesinde umut vadeden bir alternatif tedavi stratejisi sunmaktadır (Saleem ve ark., 2024).

Chung ve ark (2020), yaptığı çalışmada termosensitif Poloksamer 407 hidrojeller, CTLA-4 (Sitozolik T-lenfosit ilişkili protein 4) tedavisini optimize etmek amacıyla yavaş salım sistemi olarak değerlendirilmiştir. D1DC'ler (immatür fare dendritik hücre hattı) ve MC-38 (fare kolon kanseri hücre hattı) ler P407'nin farklı konsantrasyonları ile birlikte kültüre edilmiş ve 24., 48. ve 72. saatlerde MTS analizi gerçekleştirilmiştir. Hem D1 hücrelerinde hem de MC-38 hücrelerinde uygulanan herhangi bir konsantrasyonda hücre canlılığında zamanla bir azalma gözlemlenmemiştir. Elde edilen verilerle P407'nin biyoyoumlu olduğunu gözlenmlemişlerdir (Chung ve ark., 2020).

Yap ve ark. (2016), fibroblast hücrelerini (L-929) kapsüllemek amacıyla Poloksamer 407, karboksimetil hekzanoyl kitosan (CA) ve glutaraldehit (GA) içeren yeni bir hidrojel sistemi geliştirmişlerdir. Hücreler basit karıştırma yöntemi ile hidrojelde kapsüllenmiş, hücre canlılığı alamar blue testi ile değerlendirilmiş. In vitro hücre kültürü çalışmaları, bu hidrojel sisteminin sitotoksik olmadığını göstermiştir. Ayrıca, kapsüllenen L-929 hücrelerinin 5 günlük inkübasyon sonrası canlılık oranı %106 olarak bulunmuştur (Yap ve ark., 2016).

Wang ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, rahim ağzı kanseri cerrahisi sonrası yerel tümör nüksünü önlemek amacıyla karboplatin yüklü sıcaklığa duyarlı hidrojellerin uygulanabilirliğini incelemişlerdir. 27% poloksamer 407 hidrojelinin in vivo vajinal ilaç taşıma için uygun bir formülasyon olduğunu göstermişlerdir (X. Wang ve ark., 2016).

Chaudhary ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada Poloksamer 188 ve Poloksamer 407 polimerleri kullanılarak elde edilen formülasyon acyclovir taşıma amacıyla elde edilmiştir ve formülasyonların etkin maddeleri uzun süre salım yaptığı belirtilmiştir (Chaudhary ve Verma, 2014). Choi ve arkadaşları yaptıkları çalışmada vücut sıcaklığında jelleşen ve mukoadhezyon özelliklerine sahip bir asetaminofen sıvı fitil geliştirmek amacıyla değişen yüzdelerde poloksamer 407 yi, poloksamer 188 (P188) ile birleştirerek, 30-36°C'de jel haline gelen uzun süreli salımının elde edilebildiği formülasyon geliştirmişlerdir (Choi ve ark., 1998). Yapılan bu çalışmalarda poloksamerlerin farklı hücre tipleriyle biyouyumlu olduğu ve etken maddelerin kontrollü salınımını olumlu etkilediği görülmüştür. Bu çalışmada da, sıcaklıkla jelleşen yapısı, kontrollü ilaç salımı, enjekte edilebilir olması ve oral kullanımları popüler hale gelmesi sebebiyle termorevers hidrojellerinin kullanılmasına karar verilmiştir ve bu amaçla biyobozunur ve biyouyumlu yapısı ile hidrojel formunda kolayca üretilmesi nedeniyle ilaç taşıyıcı sistem materyali olarak P407 kullanılmıştır. P407'nin fiziksel özelliklerini modüle etmek amacıyla P188 ile birleştirerek pulpa rejenerasyonu için enjekte edilebilir bir hidrojel taşıyıcı tasarlamaya karar verilmiştir.

Yeni bir formülasyon geliştirilirken kullanılacak etken maddenin fizikokimyasal özelliklerin karakterize edilmesi önemlidir. Bu şekilde elde edilen bilgiler sayesinde hızlı ve başarılı bir ilaç geliştirilebilmektedir (Ahirwar ve ark., 2023). Bu tez çalışmasında ilk olarak, ön formülasyonda kullanılacak malzemelerin daha sonra çıkarabileceği problemleri engelleyebilmek için fizikokimyasal özellikleri incelenmiştir ve bu amaçla yapılan çalışmalarda İloprost etken maddesinin etanol içinde berrak viskoz olmayan bir yapıya sahip olup suda çözünmediği ve pH değeri nin 5.35 olduğu bulunmuştur. Bu değerler formülasyon hazırlarken çözücü ortamın seçilmesi ve istenilen pH değerinin elde edilmesi için çalışmaya yardımcı olmuştur. Bu sonuçlar taşıyıcı olarak hidrojel kullanabileceğini doğrulamıştır. Su içinde seyreltilmiş İloprost'un maksimum absorpsiyon değeri olan λ_{max} 'ı belirlemek için UV-vis spektrofotometre analizi yapılmıştır ve bu değer ileriki aşamalarda ilaç miktar tayinini ölçmek amacıyla gereken denklemi elde etmek için de kullanılmıştır. 50,

25, 12,5, 6,25, 3.125, 1.56, 0.78, 0.39 ug/ml konsantrasyonlarında İloprost'un absorban değerleri uv-vis spektrofotometre ile ölçülerek kalibrasyon doğrusu grafiği elde edilmiştir (Şekil eklenecek). Bu kalibrasyon doğrusuna göre hesaplanan determinasyon katsayısı (R^2) 0.9759 olarak hesaplanmıştır; bu değer tahmin edilen ve gözlemlenen değerler arasında yüksek düzeyde korelasyon olduğunu göstermektedir. R^2 değerinin 1'e oldukça yakın olması, bağımlı değişkende gözlenen varyansın yaklaşık %97.59'unun, elde edilen doğrusal regresyon modeli ($y = 0.0098x - 0.0083$) ile açıklandığını göstermektedir. Bu yüksek R^2 değeri, modelin hem veriye yüksek uyum sağladığını, hem de tahmin gücünün ve güvenilirliğinin yüksek olduğunu ifade etmektedir.

Bir etken maddenin çözünürlüğünün değerlendirilmesi, ilacın biyoyararlanımı, formülasyon stabilitesi ve etkinliği açısından kritik bir öneme sahiptir. Çözünürlük, ilacın vücutta emilimini ve dolayısıyla terapötik etkisini doğrudan etkileyen bir faktördür. Bu çalışmada da etken madde suda çözünür olarak bulunmasının etken maddenin tasarladığımız hidrojelde kolayca çözünebilmesini, hedef bölgeye daha kolay dağılmasını ve etkinliğinin artmasını sağlayacağı düşünülmüştür.

FTIR spektroskopisi, fonksiyonel grupları ve kimyasal bileşimleri tanımlamak için kullanılmaktadır. Kolay, hassas ve tahribatsız bir yöntem olduğu bildirilmiştir. Uyumluluğu incelemek için, spektrumun ana piklerindeki değişiklik, yeni fonksiyonel gruplar ve bileşikler olduğu anlamına gelmektedir. Bu çalışmada da etken maddenin polimerlerle kimyasal stabilitesi ve uyumluluğunun tespit etmek için yapılan FTIR analiz sonuçlarına göre, spektrumda herhangi bir değişiklik olmadığı saptanmış ayrıca etken maddenin eksipyanlarla etkileşime girmediği ve aynı saf formda formülasyonda bulunduğunun sonucuna varılmıştır. Ön formülasyon çalışmaları, formülasyona eklenecek olan etken maddenin ve yardımcı maddelerinin fizikokimyasal, biyofarmasötik ve stabilite özelliklerinin belirlenerek en uygun farmasötik formülasyonun geliştirilmesi için yapılan temel araştırmalardır. Bu amaçla bu çalışmada P 407 ve P188 belirlendiği gibi % 0.5 -%20 aralığındaki konsantrasyonlarda soğuk yöntem kullanılarak oda sıcaklığında (24 ± 2 °C). 0.5, 1, 2, 3, 6, 12, ve 24 saat boyunca manyetik karıştırıcıda karıştırarak hazırlanmıştır. Soğuk yöntem ve magnetik karıştırıcıyla şeffaf çözelti elde edilmesi yaygın kullanılan bir yöntemdir. Chaudbury ve ark., asikloviri taşımak amacıyla in sitü jel formülasyonu hazırlarken soğuk yöntem kullanarak polimerleri birleştirmişlerdir (Chaudhary ve Verma,

2014). Limjeerajarus ve ark., İloprost'un taşınmasını sağlamak için geliştirdikleri enjekte edilebilir bir hidrojel olarak Pluronic F127 (PF127) hazırlarken soğuk yöntem kullanmışlardır (Limjeerajarus ve ark., 2020). Hirun ve ark., da metronidazole taşımak için geliştirdikleri termosensitiv hidrojeli hazırlarken P407 ve P188'i soğuk yöntem ile birleştirmişler ve şeffaf bir çözelti elde edilene kadar manyetik karıştırıcı ile karıştırılması yoluyla hazırlanmıştır (Hirun ve ark., 2022). Bu çalışmada da in situ jel ön formülasyonları hazırlarken soğuk yöntem ve magnetik karıştırıcı kullanılmıştır. Ön formülasyonlar görsel olarak incelendiği zaman homojen, berrek ve şeffaf jellerin elde edildiği görülmüştür.

Bu yöntem kullanılarak hedeflenen ürünün kalitesi ilacın tasarım aşamasında belirlenerek kontrol altına alınmıştır. Bu anlamda Uluslararası Uyumlaştırma Konferansı (ICH) tarafından yayınlanan ICH Q8 Kılavuzuna ve ABD Gıda ve İlaç İdaresi tarafından yayınlanan QbD Geliştirme Dokümanları referans olarak alınmaktadır(yerleştir).

Tasarımla Kalite (QbD) yaklaşımı, formülasyon araştırmalarından üretim süreçlerinin optimizasyonuna kadar uzanan geniş bir yelpazede, ilaç geliştirme süreçlerinin ayrılmaz bir parçası haline gelmiştir. QbD'nin temel amacı, ürün kalitesini etkileyen formülasyon bileşenlerinin ve süreç parametrelerinin sistematik bir şekilde anlaşılması ve bu doğrultuda çeşitli istatistiksel ve deneysel araçlar kullanılarak optimum formülasyon tasarımlarının oluşturulmasıdır. Deneysel tasarımı (DoE), QbD prensiplerinin uygulanmasında kullanılan çeşitli öğeleri analiz etmek için etkin ve sistematik bir istatistiksel araçtır. DoE, minimum sayıda deneysel çalışma ile maksimum düzeyde bilgi sağlayarak, formülasyonda yer alan bileşenlerin kompozisyonlarının ve etkileşimlerinin optimizasyonunu kolaylaştırır. QbD yaklaşımının etkin bir şekilde uygulanabilmesi için en önemli adımlardan biri Tasarım Alanını oluşturmaktır. Tasarım Alanı'nı oluşturulmasında ilk adım, Deneysel Tasarım (DoE) yönteminin uygulanmasıdır. Doğru ve etkili bir deneysel tasarımın (DoE) yapılabilmesi için, öncelikle Kalite Hedefli Ürün Profili (QTPP); nihai formülasyonun güvenliğini ve etkinliğini sağlamak amacıyla seçilen çeşitli parametrelerden oluşturulmuştur. Kritik Kalite Özellikleri (CQAs) ve Kritik Proses Parametreleri (CPPs) nin belirlenmesi gerekmektedir. Geleneksel formülasyon optimizasyon yöntemleriyle karşılaştırıldığında, QbD yaklaşımı süreci daha ekonomik ve daha verimli hale getirmiştir. Bu çalışmada da farklı faktörler arasındaki olası ilişkileri minimum sayıda deneyle belirleyebilen Tasarımla Kalite (QbD) yaklaşımı, formülasyon optimizasyonu için kullanılmıştır.

Ban ve ark., P407, P188 ve polietilen glikol 400'ün bileşimleriyle uygun bir topikal formülasyon oluşturmayı hedefledikleri çalışmada sıcaklığa duyarlı poloksamer jel sisteminin optimizasyonunu sağlamak için deneysel tasarım temelli (DoE) Kalite ile Tasarım (QbD) prensipleri doğrultusunda formülasyonun optimizasyonunu elde etmişlerdir ve deneysel tasarım ve analiz işlemleri, Minitab® 16 yazılımı (Minitab Inc., PA, ABD) kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Ban ve ark., 2017).

Rahman ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, Hepatit C virüs enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan doğrudan etkili bir antiviral ajandır olan Ledipasvir'i taşımak amacıyla poloksamer 188, poloksamer 407, HPC ve HPMC polimerlerin içeren formülasyonu hazırlarken Tasarımla Kalite (QbD) prensiplerini uygulayarak geliştirmişlerdir. Formülasyon için deneysel tasarım, D-optimal tasarım yöntemi kullanılarak oluşturulmuştur. Tasarım ve elde edilen sonuçlar, Design Expert® yazılımı (sürüm 13) kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirilmiştir (Rahman ve ark., 2023)

Wang ve arkadaşları IgY ve IgY ve LL37 yüklü katı lipid nanoparçacıklar ile yüklenmiş sıcaklığa duyarlı hidrojel formülasyonu, Tasarımla Kalite (QbD) yaklaşımı benimsenerek geliştirilmiştir. Bu doğrultuda, ürün başarısızlığına yol açabilecek risk faktörlerinin neden-sonuç ilişkisini ortaya koymak amacıyla, Ishikawa balık kılçığı diyagramı kullanılmıştır. Ardından, formülasyonlar iki faktörlü, üç seviyeli tam faktöriyel deney tasarımı kullanılarak, Design-Expert® yazılımı (sürüm 12.0, Stat-Ease Inc., Minneapolis, ABD) aracılığıyla optimize edilmiştir (F. Wang ve ark., 2023). Bu çalışmada da formülasyonu optimize etmeden önce risk faktörlerini değerlendirilirken Ishikawa balık kılçığı diyagramı kullanılmıştır

Hirun ve ark., metronidazol taşımak için P407 ve P188'i birleştirerek termosensitiv bir hidrojel geliştirirken farklı bileşimlerdeki polimerik karışımların hazırlanmasını tasarlamak amacıyla Box–Behnken deneysel tasarımı uygulamışlardır. İstatistiksel değerlendirilmede ise Design-Expert® yazılımı kullanmışlardır (Hirun ve ark., 2022).

Rapalli ve ark., yaptıkları çalışmada, Tasarımla Kalite (QbD) yaklaşımı kullanılarak, ketokonazol yüklü kuboizomlar içeren topikal bir hidrojel geliştirdikleri çalışmada son ürün kalitesini diğerlerinden daha fazla etkileyebilecek olası faktörleri belirlemek amacıyla başlangıç risk değerlendirme çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu doğrultuda, çeşitli malzeme özellikleri (MA) ve proses parametreleri (PP) seçilmiştir. Neden-sonuç ilişkisini ortaya

koymak amacıyla, ürün başarısızlığına yol açabilecek risk faktörlerini tanımlamak için Ishikawa balık kılçığı diyagramı hazırlanmıştır. Formülasyon süreci üzerindeki risk düzeyine göre faktörlerin önceliklendirilmesi, niteliksel değerlendirmeye dayalı olarak Risk Tahmin Matrisi (REM) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Daha sonra formülasyonların 3² faktöriyel tasarım ile taranması ve optimize edilmesi, Design-Expert® yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Rapalli ve ark., 2021). Bu çalışmada da Ishikawa balık kılçığı diyagramı hazırlanmıştır ve başlangıç risk değerlendirmesi için Risk Tahmin Matrisi kullanılarak formülasyon süreci üzerinde etkili olabilecek risk faktörlerinin düzeyleri belirlenmiştir.

Bu çalışmada tasarımla kalite yaklaşımı uygulanarak Tasarım Alanı oluşturulmuştur. Tasarım Alanını oluşturabilmek için ilk adım olarak Deneysel Tasarım (DoE) oluşturulmuştur. Doğru ve etkili bir DoE tasarımı yapılabilmesi için hedef ürün kalite profili (QTPP) ve kritik kalite özellikleri (CQA) tanımlanmıştır. QbD (Quality by Design) yaklaşımı, ürün kalitesinin yalnızca nihai testlerle değerlendirilmesinden ziyade, risk faktörlerinin önceden öngörülmesi ve kontrol altına alınması yoluyla planlı bir şekilde inşa edilmesini esas almaktadır (Javed ve ark., 2018). Bu çalışmada ön değerlendirme çalışmaları kapsamında, sıcaklığa duyarlı enjekte edilebilir hidrojel geliştirme süreci için Ishikawa balık kılçığı diyagramı çizilerek, çeşitli hammadde özellikleri ve formülasyon parametreleri arasındaki neden-sonuç ilişkisi ortaya konmuştur. Bu parametreler REM (Risk Etki Matrisi) analizine göre niteliksel olarak değerlendirilmiş ve potansiyel risklerine göre sınıflandırılmıştır. Analiz sonucunda, jelleşme sıcaklığı ve vizkozite yüksek riskli parametreler olarak belirlenmiştir. Buna karşılık, orta ve düşük risk düzeyine sahip parametreler, çalışma boyunca optimum seviyelerde sabit tutularak kontrol altına alınmıştır. Formülasyonun optimizasyonu için MODDE Pro® yazılımı kullanılmıştır. Bu yazılım yapılan çalışmalar arasında en ideali bulan bir programdır. Bu çalışmada kullanılan MODDE Pro programı daha önceden belirlenen CQA, CMA ve CPP'lere göre program tam faktöriyel (full factorial) tasarım ile 12 farklı formülasyon önermiştir.

Bu değişkenlerin istatistiksel olarak optimize edilebilmesi amacıyla, in situ jel formülasyonuna yönelik deneysel tasarım matrisi tam faktöriyel (full factorial) tasarım yaklaşımı kullanılarak yapılandırılmıştır. Bu yaklaşım, faktörler ve seviyelerine ait tüm olası kombinasyonların sistematik olarak değerlendirilmesine olanak tanıyarak, hem ana

etkilerin hem de etkileşim etkilerinin istatistiksel olarak analiz edilmesini mümkün kılmaktadır.

Bu önerilen fomülasyonların jelleşme sıcaklığı, 25 derecedeki vizkozite ve 37 derecedeki vizkozite değerleri ölçülmüştür. Deneme serisinden alınan yanıtlar tekrar MODDE® programına tanıtıldıktan sonra programın ürettiği R^2 , düzeltilmiş R^2 ve Q^2 değerlerine dayandırılarak yanıtlara ilişkin modeller sunulmuştur. Programa yüklenen girdilerin anlamlı olup olmadığı, önem derecesi, sayısal büyüklüğü, faktör ve etkileşimleri ile modelin korelasyon değeri hesaplanarak belirlenmiştir. R^2 değeri bulgularına göre değerlendirmeler aşağıdaki gibidir.

$R^2 \geq 0,70$ iyi kalitede,

$0,50 \leq R^2 \leq 0,70$ dikkat gerektiren ama anlamlı,

$R^2 \leq 0,50$ modelin kalitesiz olduğunu gösterir (Aksu ve ark., 2014).

Bu çalışmada $R^2 \geq 0,70$ iyi kalitede, olacak şekilde sonuç elde edilmiştir ve bu çalışmaların sonucunda tasarım alanı elde edilmiştir. Tasarım alanından elde edilen optimum formülü hazırlanıp ve test edilmiştir, beklenen kalitede in sitü jel formülasyon başarıyla hazırlanmıştır.

Modde yazılımından elde ettiğimiz optimum formülasyona göre %18 Poloksamer 407, %5 Poloxamer 188 ve Benzoik asit, soğuk yöntem ve magnetik karıştırıcı kullanılarak su içinde çözündürülerek optimum formülasyon hazırlanmıştır Sonrasında İloprost 10^{-6} M konsantrasyonuna sahip olacak şekilde bu hidrojelde seyreltilmiştir. Daha önce yapılan çalışmalarda İloprost, 10^{-6} M, 10^{-7} M, 10^{-8} M. ve 10^{-9} M konsantrasyonlarında kullanılmıştır (Limjeerajarus, Osathanon, ve ark., 2014) (Limjeerajarus, Chanarattanubol, ve ark., 2014) (Seang ve ark., 2018), (Limjeerajarus ve ark., 2020), (Almeshari ve ark., 2022), (Wahyudi ve ark., 2023). Bu çalışmalarda; 10^{-6} M konsantrasyonda İloprost uyguladığında anjiyogenezis ile ilgili genlerin mRNA düzeylerinin, pulpa kan akışının ve tersiyel dentin onarım ile ilgili genlerin mRNA düzeylerinin doza bağlı ve istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı, en yüksek artışın 10^{-6} M konsantrasyonda İloprost grubunda meydana geldiği görülmüştür (Limjeerajarus, Osathanon, ve ark., 2014),(Limjeerajarus, Chanarattanubol, ve ark., 2014) (Seang ve ark., 2018), (Almeshari ve ark., 2021; Limjeerajarus ve ark., 2020;

Seang ve ark., 2018). Bu nedenle, mevcut çalışmada optimum formülasyon hazırlanırken İloprost' un çalışma konsantrasyonu 10^{-6} mol/L tercih edilmiştir.

Optimum formülasyon hazırlandıktan sonra karakterize edilmesi için çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Vital pulpa tedavilerinde kullanılmak üzere hazırlanan formülasyonun pulpa da istenilen terapötik etkiyi oluşturabilmesi için uygun pH değerine sahip olması gerekmektedir. Optimum formülasyonların pH değerlerinin tayin edilmesinde pH değeri 7.3 ± 0.1 (N=3) olarak belirlenmiştir. Kanın normal pH değerleri 7.35-7.45 olduğu için bu değer uygun bulunmuştur. Bu çalışmada İloprost yüklü Poloksamer 407 in situ jelin mikroyapısal özelliklerini değerlendirmek amacıyla taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanılmıştır. SEM mikrografı dondurarak kurutma işlemi sonrası termosensitif hidrojel sistemlerine özgü, yüksek derecede gözenekli ve süngersi bir morfoloji ortaya koymuştur. Gözenekler birbiriyle bağlantılı ve düzensiz şekilde dağılmış olup, bu yapının su alımını kolaylaştırabilecek ve ilacın kontrollü salımını destekleyebilecek sağlam bir 3 boyutlu ağ yapısı olduğu düşünülmektedir.

Optimum formülasyonun SEM ve FTIR sonuçları birlikte değerlendirildiğinde, kontrollü salım için uygun mikroyapısal özelliklere sahip termosensitif bir in situ jel oluşumunun başarıyla gerçekleştiği doğrulanmıştır. SEM analizlerinde gözlenen gözenekli morfoloji, kontrollü difüzyon için uygun bir yapı olduğunu desteklerken; FTIR verileri, İloprost ile poloksamer matriksi arasında uyumlu bir fiziksel etkileşim olduğunu göstermektedir. Bu bulgular birlikte değerlendirildiğinde, sıcaklığa duyarlı enjekte edilebilir hidrojel, İloprost'u etkili bir şekilde tutabileceği ve kontrollü olarak salılabileceği, böylece vital pulpa tedavi amacıyla kullanımında kontrollü salım sağlanabileceği potansiyelini taşıdığı sonucuna varılabilmektedir.

Viskozite, maddenin yayılabilirliğini, yapısal özelliklerini ve etken madde salımını etkilediği için jelleri karakterize ederken önemli bir parametredir (Shankar ve ark., 2010). Bu çalışmada optimum formülasyonun viskozitesi 25 °C'de 1.5 rpm'de 1 mPa·s olarak belirlenmiş ve bu değer, düşük sıcaklıkta formülasyonun akışkan (sol) formda olduğunu göstermiştir. Buna karşılık, vücut sıcaklığına yakın olan 37 °C'de ölçülen viskozite değeri 338.960 mPa·s olarak bulunmuştur. Bu anlamlı artış, formülasyonun sıcaklıkla jelleştiğini (sol-jel geçişi) ve bu sıcaklıkta yarı katı bir yapı kazandığını açıkça ortaya koymaktadır. Elde edilen bu sonuç, formülasyonun enjeksiyon yoluyla kök kanalına kolayca

ulaştırılabileceğini ancak uygulama sonrasında pulpa odasının sıcaklığıyla jel yapıya geçerek mukozal yüzeyde kalıcılığı ve etkin madde salımını optimize edebileceğini göstermektedir.

Yayılabilirlik, bir maddenin kolayca yayılabilme veya dağıtılabilmeye yeteneğidir. Yayılan formülasyonlar, yer değiştirmek için daha az kuvvet gerektirir. Daha düşük yayılabilirlik değerleri, yayılmanın daha kolay gerçekleştiğini gösterir. Bu çalışmada optimum formülasyonun yayılabilirlik değeri $619,18 \pm 2,13$ olarak bulunmuştur. Bu değer, formülasyonun homojen bir şekilde yayılabilir olduğunu ve uygulama sırasında fazla kuvvet gerektirmediğini göstermektedir. Daha kolay yayılan formülasyonlar, dişi koniden yer değiştirmek için daha az kuvvet gerektirir. Daha küçük sayılar, yayılabilirliğin daha kolay olduğunu göstermektedir.

Adeziflik, bir jelin yüzeyi ile prob yüzeyi arasındaki çekim kuvvetlerinin üstesinden gelmek için gereken iş miktarı olarak tanımlanır. Bu özellik, özellikle mukozal uygulamalar açısından kritik olup, jelin uygulama bölgesinde yeterli süre kalabilmesi ve etkin maddenin kontrollü şekilde salınabilmesi için gereklidir. Jel tasarımında yüksek adezivlik değeri, formülasyonun dokuya güçlü bir şekilde tutunmasını sağlamakta bu da formülasyonun yerinde kalıcılığını artıran önemli bir avantajdır. Bu çalışmada, geliştirilen optimum formülasyonun adezyon değeri $1086,39 \pm 9,33$ gram-saniye olarak bulunmuştur. Bu yüksek ve istikrarlı değer, formülasyonun in situ uygulamalar için uygun olduğunu ve mukozal yüzeyde yeterli tutunma gücüne sahip olduğunu göstermektedir. Elde edilen bu sonuç, jelin uygulama sonrasında yüzeye başarılı şekilde yapışacağını ve terapötik etkinin sürekliliği açısından avantaj sağlayacağını ortaya koymaktadır.

Koheziflik, bir jelin iç yapısının bozulmaya karşı gösterdiği direnci temsil eder ve genellikle probun uyguladığı baskıdan sonra jelin eski formuna dönme kabiliyetiyle ölçülür. Bu özellik, jel formülasyonunun uygulandığı bölgede bütünlüğünü koruyarak uzun süre kalabilmesi açısından oldukça önemlidir. Özellikle mukozal uygulamalarda, kohezifliği yüksek olan jeller mukozal yüzeye daha iyi tutunur ve kolay dağılmadan ya da akmadan etkin maddenin kontrollü salımını sürdürebilir. Bu çalışmada, geliştirilen optimum formülasyonun koheziflik değeri $-1156,69 \pm 6,23$ g·s olarak belirlenmiştir. Elde edilen bu negatif ve yüksek mutlak değer, jelin yapısal bütünlüğünün kuvvetli olduğunu ve dışarıdan gelen mekanik kuvvetlere karşı iç yapısını koruyabildiğini göstermektedir.

Ağız içi sıcaklık 35.8–37.3 °C aralığındadır. Normal pulpa sıcaklığının ise 34–35 °C arasında olduğu bildirilmektedir (Daronch ve ark., 2007). Bu çalışmada, jelleşme sıcaklığının fizyolojik koşullara uygun olacak şekilde bu aralıkta olması hedeflenmiştir. Bu amaçla, %18 oranında kullanılan Poloksamer 407'ye ek olarak %5 oranında Poloksamer 188 ilave edilerek jelleşme sıcaklığı optimize edilmeye çalışılmıştır. Yapılan reolojik analizler sonucunda, jelleşme sıcaklığı 26 °C olarak belirlenmiştir. Bu değer, uygulama bölgesindeki fizyolojik sıcaklıkların altında kalsa da, jelin oda sıcaklığında akışkan (sol) formda olması ve vücut sıcaklığına ulaştığında jelleşerek yarı katı forma geçmesi açısından avantaj sağlamaktadır. Böylece, formülasyonun enjeksiyon ya da topikal uygulama esnasında rahatlıkla uygulanabilirken, uygulama sonrası hedef bölgede jel fazına geçerek etkinliğini sürdürme potansiyeli taşıdığı söylenebilir. Ancak, jelleşme sıcaklığının hedef sıcaklığa biraz daha yaklaştırılması, uygulama sonrası yerinde jelleşmeyi daha etkin kılmak açısından faydalı olabilir.

Bu çalışmada in situ jel formülasyonunun reolojik davranışı, sıcaklık arttırma testi ile değerlendirilmiş ve elde edilen sonuçlar yaklaşık 5 °C ile 45 °C arasında sıcaklık arttıkça depolama modülü (G') ve kayıp modülü (G'') değerlerindeki değişim görülmüştür. Kayıp modülü (G''), materyalin viskoz ya da sıvı benzeri davranışını temsil eder; her deformasyon döngüsünde ısı olarak dağıtılan enerjiyi ölçer. Buna karşılık, depolama modülü (G'), materyalin elastik ya da katı benzeri davranışını ifade eder; bu da bir döngüde ne kadar enerjinin depolanıp geri kazanıldığını, yani bir yay gibi enerji biriktirme yetisini gösterir. Düşük sıcaklıklarda (~26 °C altı), hem G' hem de G'' değerleri oldukça düşüktür ve bu durum formülasyonun akışkan (sol) fazda olduğunu, yani belirgin bir jel ağı yapısının oluşmadığını göstermektedir. Bu sıcaklık aralığında zayıf moleküller arası etkileşimler nedeniyle sistem serbestçe akan bir çözelti gibi davranır. Bu durum, özellikle enjeksiyon ya da sıvı hâlde uygulama gerektiren sistemlerde uygulama kolaylığı açısından kritik öneme sahiptir. Sıcaklık ~26 °C'nin üzerine çıktığında, G' değerinde ani ve belirgin bir artış gözlenirken, G'' değeri görece sabit kalır. Bu durum, sistemin sol-jel faz geçişine uğradığını gösterir. Polimerik bileşenler, sıcaklığın artmasıyla birlikte ısı olarak indüklenen etkileşimlerle üç boyutlu bir jel ağı oluşturmaya başlar. G' değerindeki bu keskin artış, sistemin elastik özellik kazandığını ve yapısal bir viskoelastik jel haline geldiğini gösterir. G' değerinin G'' değerini aşması ise sistemde katı benzeri davranışın sıvı benzeri davranışa baskın geldiğini ve kararlı bir jel matrisi oluştuğunu doğrular. Bu faz geçiş sıcaklığı (~26–28 °C), fizyolojik sıcaklığa

oldukça yakın olup, formülasyonun vücut sıcaklığında jelleşen bir in situ ilaç taşıma sistemi olarak kullanılabilme potansiyelini desteklemektedir. Formülasyon, oda sıcaklığında sol hâlde kalarak uygulama kolaylığı sağlar, fizyolojik koşullara maruz kaldığında ise hızla jelleşir. Bu özellik, lokal ve kontrollü ilaç salımı sağlayarak dozlama sıklığını azaltır ve hasta uyumunu artırır. Bu çalışmada da yapılan reolojik analiz, formülasyonun sıcaklığa duyarlı jel yapısını doğrulamaktadır. Özellikle vücut sıcaklığına yakın değerlerde depolama modülünde gözlenen ani artış, başarılı bir termal jelleşmeyi ve bu sistemin sıcaklıkla tetiklenen ilaç salımı için uygun olduğunu göstermektedir.

Stabilite testinin amacı, uygun saklama koşullarının yanı sıra etkin madde için yeniden test süresi veya ilaç ürünü için bir raf ömrü oluşturmaktır. Aynı zamanda bir etken maddenin veya ürünün kalitesinin sıcaklık ve nem gibi çeşitli çevresel faktörlerin etkisi altında geçirilen zaman içinde nasıl değiştiğine dair ipuçlarını da içermeyi amaçlamaktadır. Stabilite çalışmalarının sonuçlarına göre optimum formülasyon stabilite kabininde fiziksel görünümünde herhangi bir değişiklik gözlemlenmemiş olup pH, vizkozite, adezyon ve yayılabilirlik test sonuçlarında önemli bir değişiklik kaydedilmemiştir.

Biyouyumluluk, bir materyalin canlı dokularla temas halindeyken lokal ya da sistemik toksisite göstermemesi olarak tanımlanmaktadır. Vital pulpa tedavilerinde kullanılan materyallerin dokularla doğrudan veya dolaylı temas etmesi nedeniyle biyouyumlu olmaları büyük önem taşımaktadır (Moharamzadeh ve ark., 2009). Günümüzde, yeni ve güncel materyallerin biyouyumluluğunu belirlemek amacıyla in vitro testler, hayvan deneyleri ve in vivo testler gerçekleştirilmektedir. Diş hekimliğinde kullanılan materyallerin biyouyumluluğunun değerlendirilmesinde tercih edilen in vitro sitotoksisite testleri, uluslararası standartlara (ISO 10993-5) göre tanımlanmıştır (Gruber ve Nickel, 2023).

Sitotoksisiteyi belirlemede en sık kullanılan yöntemlerden biri olan hücre kültürü testleri kolay uygulanabilir olmaları, farklı materyallerin karşılaştırılmasına olanak tanımları, tekrarlanabilirlik sunmaları ve standardize çalışma koşulları sağlamaları nedeniyle yaygın olarak tercih edilmektedir (Khalef ve ark., 2024). Bu testlerden biri olan in vitro direkt hücre-materyal temas testi, materyalin in vivo ortamda hücrelerle temas biçimini taklit etmeyi amaçlamaktadır (Strojny-Cieślak ve ark., 2023). Bu çalışmada da kullanılan İloprost, Poloksamer 407 ve Poloksamer 188 gibi materyallerin hücre kültür besisi yerinde çözünürlüğünün uygun olması nedeni ile direkt temas yöntemi tercih edilmiştir.

Hücre kültürü çalışmalarında, toksisitesi değerlendirilecek materyalin kullanım alanı ile ilişkili uygun hücre tipinin seçilmesi büyük önem taşımaktadır. Diş hekimliğinde geliştirilen yeni materyallerin biyolojik etkilerinin değerlendirilmesinde, farklılaşma potansiyeli yüksek olan ve dentin tamirinde aktif rol oynayan dental pulpa kökenli kök hücreler sıklıkla tercih edilmektedir. Bu hücrelerin esas görevi hasar görmüş dişlerde kendini yenileme özelliğini kullanarak bulunduğu dokuyu onarmak ve doku devamlılığını sağlamaktır.

İlk olarak 2000 yılında Gronthos ve arkadaşları tarafından üçüncü büyük azı dişinden izole edilmiş olan insan dental pulpa kök hücreleri in vitro ortamda osteoblastik ve kondrositik hücrelere, in vivo ortamda ise odontoblastik hücrelere dönüştüğü belirtilmiştir (Gronthos ve ark., 2002). Dental pulpa kök hücrelerinin elde edilmesinin kolay olması, etik açıdan problem yaratmaması, tekrar kullanılmasının mümkün olması gibi avantajları mevcuttur. Üçüncü molar dişlerden elde edilen insan dental pulpa mezenkimal kök hücrelerinin dentin oluşturan odontoblastlara, osteoblastlara, yağ hücrelerine, iskelet/düz kas hücrelerine, endotel hücrelerine, kıkırdak hücrelerine ve sinir hücrelerine farklılaşabildiği kanıtlanmıştır. Ayrıca, bu hücreler osteoblastlara özgü karakteristik özellikler de sergilemiştir, bu da kemik yapımı ve doku mühendisliği açısından önemli bir potansiyele sahip olduklarını göstermektedir (Ebadi ve ark., 2023). Bu çalışmada da kullandığımız materyellerin kullanım alanı olarak vital pulpa tedavileri olarak düşünüldüğü için sitotoksosite çalışmalarında dental pulpa mezenkimal kök hücrelerini kullanmaya karar verilmiştir.

Sitotoksosite, uygulanan materyalin dozuna ve maruziyet süresine bağlı olarak hücrenin yapısında ve fonksiyonunda meydana gelen hasar olarak tanımlanmaktadır. Bir materyalin sebep olduğu hücre ölümü, materyale maruz kalmadan önceki ve sonraki hücre sayısı ölçülerek değerlendirilmektedir (Khalef ve ark., 2024). Hızlı ve ucuz olmaları, hayvan kullanımı gerekmemesi açısından etik olmaları gibi nedenler ile tercih edilmektedirler. Hücre canlılığı ve sitotoksosite analizleri, hücre zarı geçirgenliği, enzim aktivitesi, hücre yapışması, ATP üretimi, koenzim üretimi ve nükleotid alım aktivitesi gibi çeşitli hücre işlevlerine dayanmaktadır. Sitotoksosite testleri hücre canlılığı, ölümü, organelleri, bölünmesi, membranı ve protein veya DNA sentezi, hakkında detaylı bilgiler verir (Vidal ve ark., 2017). Bu testler dört ana başlık altında toplanabilir; canlılığı değerlendiren testler (nötral kırmızı testi, tripan mavisi testi, floresan metodu), hücre çoğalmasını değerlendiren testler (bromodeoksiuridin immunohistokimyasal teknik, 3H-timidin test), metabolik

sitotoksiste değerlendirme testleri (MTT testi, alamar mavisi testi, LDH testi) ve yaşamı değerlendiren testler (düşük hücre yoğunluğunda koloni oluşturma düzeyinin belirlenmesi) (Niu ve ark., 2001).

Mosmann tarafından ilk kez 1983 yılında uygulanan MTT testi, sitotoksitenin değerlendirilmesi için diş hekimliğinde sık kullanılan pratik bir yöntemdir. Mitokondri fonksiyonu hasar görmemiş canlı hücrelerin boyanma esasına dayanan MTT testinin temelinde mitokondriyal dehidrogenaz enziminin canlı hücrelerde sarı renkli suda çözünebilir bir maddeyi, koyu mavi renkli formazan kristallerine dönüştürme söz konusudur. Basit ve kolay ulaşılabilir bir test yöntemi olan MTT analizinde oluşan formazan kristallerinin miktarı, canlı hücre miktarıyla doğrudan orantılıdır (Vidal ve ark., 2017). MTT yöntemi biyoyumluluk testleri içinde hassas olmasının yanı sıra hızlı sonuç elde edilmesi, çok düşük düzeydeki toksisite değerlendirilmelerine imkân tanınması, tekrarlanabilir olması ve farklı çalışmalar arasında karşılaştırma yapılmasına olanak sağlaması gibi avantajları ile günümüzde dental materyallerin sitotoksiste değerlendirmesinde en çok tercih edilen yöntemler arasındadır (Khalef ve ark., 2024). MTT test yöntemi sitotoksiste çalışmalarında oldukça güvenilir, etkili ve ekonomik olmasından dolayı bu çalışmada da İloprost ve hazırlanan sıcaklığa duyarlı hidrojelin hücresel dental pulpa mezenkimal kök hücrelerine inkübasyonu sonrası sitotoksiste düzeylerinin belirlenmesinde ve hücre canlılığı üzerine olan etkilerinin değerlendirilmesinde tercih edilmiştir.

Limjeerajarus ve ark, yaptıkları çalışmalarda İloprost'un dental pulpa revaskülarizasyonu üzerindeki etkisini değerlendirmeyi hedefledikleri çalışmada hücre tipi olarak dental pulpa kök hücrelerini tercih etmişlerdir (Limjeerajarus, Osathanon, ve ark., 2014). Limjeerajarus ve ark, İloprost'un dentin onarımı üzerindeki etkisini incelemek amacıyla gerçekleştirdikleri in vitro çalışmalarında dental pulpa mezenkimal kök hücrelerini, in vivo çalışmalarında ise sıçan molar dişlerini ekspoz ederek direk pulpaya uygulayarak etkilerini incelemişlerdir (Limjeerajarus, Chanarattanubol ve ark., 2014). Seang ve ark., anjiyojenik bir ajan olan İloprost'un pulpa anjiyogenezini nasıl etkileyeceğini göstermek için 3 boyutlu kültür sistemlerinden olan dişin dilimlenmesiyle elde edilen diş dilimi organ kültürü sistemini kullanmışlardır (Seang ve ark., 2018). Seang ve ark., İloprost'un pulpa onarımı sürecinde hücre migrasyonunu nasıl etkileyeceğini incelemek istedikleri çalışmada hücre tipi olarak insan dental pulpa mezenkimal kök hücrelerini seçmişlerdir (Seang ve ark., 2019).

Limjeerajarus ve ark, İloprost'un kontrollü salımını elde etmek için tasarladıkları poli (laktik-ko-glikolik) asit (PLGA) mikrokürelerinden salımının dental pulpa iyileşmesi üzerine olan etkisini incelemek için yaptıkları in vitro çalışmalarda insan dental pulpa mezenkimal kök hücrelerini, in vivo çalışmalarda ise sıçan molar dişini ekspoz ederek ortaya çıkan pulpa dokusuna uygulamışlardır (Limjeerajarus ve ark., 2019). Benzer şekilde Limjeerajarus ve ark, İloprost'un kök kanallarına uygulanmasını kolaylaştırmak amacıyla enjekte edilebilir sıcaklığa duyarlı bir hidrojel geliştirmişlerdir ve bu hidrojel'in ve İloprost'un pulpa anjiyogenezine olan etkisini incelemek için dental pulpa kök hücrelerini kullanmışlardır (Limjeerajarus ve ark., 2020). Almeshari ve ark, İloprost ve MTA'nın birlikte kullanımının, pulpal inflamasyon ve tersiyer dentin oluşumu üzerine olan etkisini değerlendirmeyi hedefledikleri çalışmada, uygulama alanı olarak sıçan molar dişlerini ekspoz edip pulpa dokusuna uygulayarak etkisini incelemişlerdir (Almeshari ve ark., 2021). Almeshari ve ark, İloprost'un anjiyojenik ve odontojenik etkilerinin Mineral trioxide aggregate (MTA) ile birleştirilmesiyle hücre canlılığı, hücre göçü ve farklılaşmayı nasıl etkileyeceğini incelemek için insan kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücre hattı kullanılmıştır (Almeshari ve ark., 2022). Wahyudi ve ark, İloprost'un anti-inflamatuvar etkisi aracılığıyla inflamasyonla ilişkili gen ve protein ekspresyonlarını nasıl etkileyeceğini değerlendirmeyi amaçladıkları çalışmada hücre türü olarak dental pulpa mezenkimal kök hücrelerini seçmişlerdir (Wahyudi ve ark., 2023). Tüm bu çalışmaları örnek olarak bu çalışmada da İloprost'un vital pulpa tedavisinde kullanılması planlandığı için elde edilmesinin kolay olması, etik sorun yaratmaması, yüksek proliferasyon ve plastisite yeteneği, biyomateryaller ile dokuların yeniden yapılandırılmasında kullanımlarının mümkün olması ve uzun yaşam süreleri gibi nitelikleri dolayısıyla insan dental pulpa kök hücreleri kullanılmıştır.

Hücreler izole edildikten sonra pasajlama aşamasına geçilmiştir. Pasaj sayısındaki artma hücrelerin tutunmada azalma gibi karakteristik özelliklerinde büyük oranda değişim meydana getirmektedir. Bu nedenle hücre kültür çalışmalarında üçten fazla pasajlama önerilmemektedir. Daha önce yapılan İloprost'un dental pulpa kök hücrelerine uygulandıkları çalışmalarda 3. veya 5. pasajlar kullanılmıştır (Limjeerajarus, Osathanon ve ark., 2014) (Limjeerajarus, Chanarattanubol ve ark., 2014). Bu çalışmada da 3. pasaja getirilen hücreler kullanılmış olup artan pasaj sayısının hücrelerde stres oluşturup sitogenetik bozukluklar meydana getireceği düşünülmüştür.

Limjeerajarus ve ark, İloprost'un dental pulpa kök hücrelerinin canlılığına olan etkisini değerlendirmek için çeşitli dozlarda İloprost (10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} M) ile 24 saat inkübe edildikten sonra hücre canlılığına olan etkisini değerlendirmek için MTT analizi uygulamışlardır. İloprost uygulanan gruplarda, hücre sayısında anlamlı ve doza bağlı bir artış gözlemlenmiştir. 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} M İloprost grupları kontrol grubuyla karşılaştırıldığı zaman istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde hücre artışı olduğu görülmüştür. (Limjeerajarus, Osathanon, ve ark., 2014). Bu çalışmada da 10^{-6} M İloprost grubunda 24.saatın sonunda kontrol grubuyla karşılaştırıldığı zaman hücre sayısında anlamlı bir artış meydana geldiği gözlemlenmiştir.

Jearanaiphaisarn ve ark., İloprost'un periodontal limament kök hücrelerinin canlılığına olan etkisini değerlendirmek için kök hücreleri farklı konsantrasyonlarında İloprost (10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} M) ile 24, 48 ve 72 saat süreyle inkübe ettikten sonra MTT analizi gerçekleştirmişlerdir. 24 saatlik inkübasyonun ardından, kontrol ve İloprost uygulanan gruplardaki hPDL hücreleri, periodontal ligament fibroblastlarına özgü tipik iğsi morfoloji sergilemiştir 48 ve 72. saatlerde de hücre morfolojisi benzer bulunmuştur. Yapılan MTT analizi, 10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} veya 10^{-6} M konsantrasyonlarında uygulanan İloprost'un, hPDL hücre proliferasyonunu anlamlı düzeyde değiştirmedeği gösterilmiştir (Jearanaiphaisarn ve ark., 2018).

Limjeerajarus ve ark. (2014) ve Jearanaiphaisarn ve ark. (2018) 'ın yaptıkları çalışmalara göre 10^{-6} M İloprost'un hücre canlılığını olumlu etkilediği görülmüştür ((Limjeerajarus, Osathanon, ve ark., 2014),(Jearanaiphaisarn ve ark., 2018)). Bu çalışmada da 10^{-6} M İloprost'un dental pulpa mezenkimal kök hücreleri üzerindeki hücre canlılığını anlamlı bir şekilde arttırdığı görülmüştür.

Limjeerajarus ve ark. (2019), İloprost'un kontrollü salımının elde etmek için Jelatin-PLGA mikrokürelerine İloprost'u yükleyerek dental pulpa kök hücrelerine uygulandığı zaman anjiyojenik etkisini araştırmayı amaçlamışlardır. Dört deney grubu oluşturulmuştur:1. Boş (kontrol), 2. PLGA, 3. İloprost (10^{-6} M), 4. İloprost/PLGA (5 mg). PLGA ve İloprost/PLGA gruplarındaki mikroküreleri insan dental pulpa kök hücrelerinden ayırmak amacıyla, İloprost içeren 5 mg mikroküreler, 0.45 μ m gözenek çapına sahip bir membrane-üzerine yerleştirilerek 6 kuyucuklu plakların üstüne konulmuştur. Tüm gruplar 24 ve 72 saat süreyle inkübe edilmiştir. Tüm iloprost gruplarında hücre proliferasyonda bir artış saptanmıştır.

Proliferasyon testinde, kontrol grubuyla karşılaştırıldığı zaman hücre çoğalmasındaki artış İloprost grubunda 24. saatte istatistiksel olarak anlamlı bir artış bulunurken, İloprost/PLGA grubunda bu artış 72. Saatte istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Limjeerajarus ve ark., 2019).

Limjeerajarus ve ark (2020), dental pulpa rejenerasyonunu indüklemek amacıyla İloprost'un kontrollü salımını sağlamak amacıyla P407 kullanılarak sıcaklığa duyarlı enjekte edilebilir bir hidrojel hazırlamışlardır. Hücreler, İloprost içermeyen jellerin ortamı (kontrol grubu) ve İloprost yüklü PF jellerin ortamı ile inkübe edilmiştir. Kontrol koşulu olarak 24 saatlik inkübasyonun ardından, kültür ortamı ekstraksiyon ortamı ile değiştirilmiştir. Hücreler, bu ekstraksiyon ortamında 24, 48 ve 72 saat süreyle kültüre edilmiştir. İloprost içeren PF127 hidrojelinin sitotoksitesisi hücre canlılığına göre değerlendirilmiştir MTT testi, İloprost içeren hidrojellerin ekstraksiyon ortamında 24, 48 ve 72 saat kültüre edilen insan dental pulpa kök hücrelerinin metabolik aktivitesini ölçmek amacıyla kullanılmıştır. %15–30 (a/a) PF127 oranlarına sahip ve İloprost içeren hidrojellerle muamele edilen insan dental pulpa kök hücrelerin canlılığı, tedavi uygulanmamış kontrol grubuyla benzer bulunmuştur. Bu sonuçlar, hazırlanan hidrojinin insan dental pulpa kök hücreleri üzerinden toksik etkisinin olmadığını göstermektedir (Limjeerajarus ve ark., 2020).

Limjeerajarus ve arkadaşlarının 2019 ve 2020 yıllarında gerçekleştirdikleri çalışmalar sonucunda, İloprost'un kontrollü salımını sağlamak amacıyla geliştirilen hidrojellerin hücre canlılığını olumlu yönde etkilediği rapor edilmiştir (Limjeerajarus ve ark., 2019). (Limjeerajarus ve ark., 2020). Bu çalışmada ise, benzer şekilde İloprostun kontrollü salımı amacıyla hazırlanan sıcaklığa duyarlı hidrojinin hücre canlılığı üzerindeki etkisi değerlendirilmiş; ancak elde edilen bulgular, hidrojinin hücre canlılığını olumsuz yönde etkilediğini ortaya koymuştur. Bu durumun olası nedenleri arasında, kullanılan hidrojinin seyreltmeden uygulanmış olması ya da önceki çalışmalarda kullanılan formülasyonların ekstraksiyonlarının (hidrojelden elde edilen çözeltilerin) değerlendirilmemiş olması gösterilebilir.

Silva ve ark., 2023 yılında yaptıkları çalışmada parfümeri endüstrisinde yaygın olarak kullanılan bisiklik bir monoterpen olan 3-carene (3CR) bazı *Leishmania* türlerine karşı aktivite göstermektedir. Ancak, 3CR'nin yüksek hidrofobikliği, terapötik uygulamalarını önemli ölçüde kısıtlamaktadır. Bu çalışmada, 3CR'nin *Leishmania braziliensis*'e karşı

etkinliğini artırmak amacıyla, poloksamer P407'nin tek başına veya P188, P123 ya da L81 ile kombinasyon halinde kullanıldığı bir dizi micellar sistem geliştirilmiştir. 3CR, P407/L81-3CR (%5/0.3) ve P407/L81 (%5/0.3) formülasyonlarının sitotoksitesisi MTT testi (Sigma-Aldrich) kullanılarak değerlendirilmiştir. Deneyde J774A.1 makrofaj hücre hattı (5×10^5 hücre/mL) kullanılmıştır. Hücre kültür ortamına 31.25–500 µg/mL arasında değişen konsantrasyonlarda formülasyonlar uygulanarak hücreler aynı koşullarda 24 saat daha inkübe edilmiştir. 3CR'nin tek başına uygulandığında makrofajlar için parazitlerden daha toksik olduğu görülmüştür. Ancak 3CR'nin P407/L81-3CR sistemi içerisinde verilmesi, parazite karşı daha toksik ancak memeli hücrelere karşı daha az toksik bir sistem oluşturmuştur. CC_{50} değerlerine bakıldığında, 3CR içermeyen misel sistemin, 3CR'ye kıyasla memeli hücreler için 1.8 kat daha toksik olduğu; 3CR içeren misel sistemin ise 3CR'den 1.6 kat daha toksik olduğu belirlenmiştir. Buna karşın, IC_{50} değerleri göz önüne alındığında, bu ikili sistemin parazite karşı 3.3 kat daha yüksek toksisite gösterdiği görülmüş. Bu sonuçlar, antifungal özellikteki 3CR'nin taşıyıcı micellar sistemler aracılığıyla güvenli ve düşük maliyetli bir leishmaniasis tedavi alternatifi olarak potansiyelini doğrulamaktadır (Silva ve ark., 2023).

Zeng ve ark., (2015), bukkal uygulama için özel olarak geliştirdikleri salbutamol sülfat (SS)-Poloksamer bazlı biyoadeziv bir hidrojelin TR146 insan bukkal epitel hücreleri üzerindeki hücresel toksisite değerlendirmek için çalışmalar yapmışlardır. Hücre canlılığı (MTT, Alamar Blue), hücre zarı bütünlüğü (Neutral Red) ve apoptoz düzeyinin belirlenmesine yönelik (Hoechst 33342) analizler gerçekleştirilmiş ve bu veriler Dijital Holografik Mikroskopi (DHM) ile desteklenmiştir. Tekli uygulamada, aynı hücreler yalnızca bir kez örneğe maruz bırakılmış ve bu maruziyet 37 °C'de 2 saat sürmüştür. Salbutamol sülfat (SS) içeren beş farklı formülasyon, hücrelere yedi farklı hacimde (20–100 µL) uygulanmıştır. Ayrıca, SS içermeyen ve pH değeri yaklaşık 6.8 olan boş (vehicle) formülasyonlar da test edilmiştir. SS içermeyen ve pH değeri yaklaşık 6.8 olan hidrojel formülasyonları için, yapılan testlerin hiçbirisi, Poloksamer ve Satiaxane bazlı hidrojellerin hücre canlılığı üzerinde olumsuz bir etkisi olduğunu göstermemiştir. Hücre canlılığı tüm gruplarda %80'in üzerinde kalmıştır. MTT testi sonuçlarına göre, jel hacminin artırılması hücre canlılığı üzerinde anlamlı bir etki oluşturmamıştır (Zeng ve ark., 2015).

Fathalla ve ark. (2017), ketorolak trometaminin (KT) sürekli oküler uygulaması için P407 ve P188 karışımına dayanan in situ jel formülasyonlarının hazırlanmasını, karakterize edilmesini amaçladıkları çalışmalarında, P407 (%23) - P188(%10) ve P407 (%23) – p188 (%15). Fathalla ve arkadaşlarının. formülasyonlarını kullanarak, primer insan kornea epitel hücreleri üzerine 4 ve 24 saatlik MTT testi uygulamaları neticesinde zaman ilerledikçe iki formülasyonun da sitotoksik etkisi artış göstermiş ve P188 oranı yüksek olan formülasyon diğerine göre canlılığı daha fazla azaltmıştır(M.A. Fathalla ve ark., 2017). Bu çalışmada da P407/P188 içeren gruplarda 72.saatte, 24.saate göre hücre canlılığında anlamlı bir azalış gözlemlenmiştir.

Costa ve ark. (2023), Leishmaniasis tedavisinde kullanılması amacıyla doğal bir bileşik olan karkavrolü antileishmanial ajan olarak kullanımını mümkün kılmak amacıyla P407 ve P188'in birleştirilmesiyle ısıya duyarlı hidrojel geliştirilmiştir. Geliştirilen hidrojellerin ve karkavrolün *Leishmania amazonensis* promastigot ve hücre içi amastigot formlarına karşı antiparaziter etkileri ile memeli hücreler üzerindeki sitotoksitesiteleri değerlendirilmiştir. *Leishmania* spp. zorunlu olarak makrofajları enfekte etse de, kutanoz leishmaniasis sırasında gelişen cilt ve/veya mukozal lezyonlarda fibroblastların da önemli düzeyde hasara uğradığı bildirilmiştir. Bu nedenle, çalışmada L929 fibroblast hücre hattında sitotoksitesite değerlendirmesi yapılmıştır. Hücreler, daha önce tanımlanan koşullar altında, 6.25, 12.5, 25, 50 ve 100 µg/mL konsantrasyonlarında karkavrol, hidrojel ve karkavrol içeren hidrojel ile 24 saat süreyle muamele edilmiştir. Hücresel aktivite ve/veya canlılık, MTT analiz ile gerçekleştirilmiştir. HG407/188CA ve HG407CA hidrojelleri, karkavrolün sitotoksitesitesini azaltmış; yüksek hücre canlılığı sağlamıştır. İnert yapıda olan HG407IN ve HG407/188IN hidrojelleri ise herhangi bir sitotoksitesite göstermemiş, yaklaşık %90 hücre canlılığı sağlamıştır. Sonuç olarak, elde edilen bu ikili hidrojel formülasyonu, karkavrolün etkili ve daha güvenli bir antileishmanial ajan olarak kullanımını mümkün kılacak potansiyele sahiptir (Costa ve ark., 2023).

Zhang ve ark. (2022), farklı oranlarda P 188 ve P 407 kullanarak kurkumin yüklü termosensitif hidrojel hazırlanmış, karakterizasyonları yapılmış ve yara iyileşmesi üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Hidrojellerin yara iyileşmesi üzerindeki etkisi hem in vitro hem de in vivo koşullarda incelenmiştir. %24 P 407 ve %1 P188 içeren formülasyon, kurkumin yüklü termosensitif hidrojel hazırlanması için uygun bulunmuştur. Farklı

konsantrasyonlarda kurkumin içeren hidrojelilerin, insan deri fibroblastları (HSF) ile 24, 48 ve 72 saat süreyle birlikte kültürlenmesi sonrası yapılan MTT analizinde, kurkumin yüklü hidrojel ekstrelerinin toksik olmadığını ve HSF proliferasyonunu desteklediğini göstermiştir. Biyouyumluluğun daha ileri düzeyde değerlendirilmesi amacıyla canlı/ölü hücre boyama yöntemiyle yapılan değerlendirmede, floresan mikroskop altında hücre ölümünün minimal düzeyde olduğu gözlemlenmiştir. 48 saatlik birlikte kültür sonrası elde edilen mikroskopi görüntüleri, farklı konsantrasyonlardaki kurkumin yüklü hidrojellerin sitotoksik etki göstermediğini ve iyi düzeyde hücre uyumluluğu (sitouyumluluk) sergilediğini doğrulamıştır. Ayrıca, kurkumin yüklü termosensitif hidrojellerin S fazındaki fibroblast oranını artırarak yara iyileşmesini desteklediği belirlenmiştir. Kurkumin yüklü P407/P188 termosensitif hidrojinin yara iyileşmesini hızlandırıcı etkisi olduğu görülmüştür. Bu bulgular, hidrojellerin toksik olmadığını ve hücrelerle olumlu bir etkileşim içinde olduğunu doğrulamaktadır (Z. Zhang ve ark., 2022).

Bu çalışmada, İloprost'un 10^{-6} M ve 2×10^{-6} M konsantrasyonlarında uygulanması sonucunda, doz artışıyla uyumlu olarak hücre canlılığında anlamlı bir artış gözlemlenmiştir. Ancak, uygulama süresine bağlı olarak hücre canlılığında belirgin bir azalma meydana gelmiştir. Bu durum, iloprostun kısa yarı ömrüne bağlı olarak biyolojik etkinliğinin zamanla azalması şeklinde yorumlanabilir. Öte yandan, poloksamer içeren gruplarda hücre canlılığı düzeylerinde belirgin bir azalma saptanmıştır. Bu düşüşün, hidrojel formülasyonlarının seyreltmeden uygulanmış olması nedeniyle hücrelerin yaşamasını engellemiş olabileceği düşünülmektedir.

Anjiyogenez, doku onarımı ve rejenerasyonunda gerçekleşen temel bir fizyolojik süreçtir (Tonnesen ve ark., 2000). Damar sistemi, dentin-pulpa kompleksinde inflamasyon kontrolü ve rejeneratif süreçlerin düzenlenmesinde önemli bir rol üstlenmektedir (Rombouts ve ark., 2017). Yeni damar ağlarının oluşumunu teşvik eden anjiyojenik sinyaller, doku büyümesi ve homeostazın sürdürülmesi için gerekli oksijen ve besin desteğinin sağlanabilmesi açısından hayati öneme sahiptir. Bu süreçte, vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), başlıca anjiyojenik sinyal sağlayan büyüme faktörlerinden biri olarak öne çıkmaktadır.

VEGF, FGF-2 ve PDGF, hasar görmüş veya travmaya uğramış dokularda anjiyogenez sürecinin erken evresinde endotelial hücrelerin hayatta kalmasını destekleyerek ve neovaskülarizasyonu indükleyerek önemli bir biyolojik rol üstlenmektedir (Webber ve ark.,

2011).Bu büyüme faktörlerinin diş pulpa dokusu ve dentin matriksinde bulunduğu gösterilmiş olup, pulpa hücrelerinde kemotaksis, hücre proliferasyonu ve hücre farklılaşmasını artırarak dental pulpa dokusunda anjiyogenezi destekleyebilecekleri düşünülmektedir. (Mullane ve ark., 2008).

İloprost cAMP üretimini artırarak VEGF ekspresyonunu yükseltebilmektedir(Zhu ve ark., 2010). Daha önce yapılan çalışmalarda İloprost uygulanan dental pulpa kök hücrelerinde VEGF mRNA ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir (Limjeerajarus, Chanarattanubol ve ark 2014; Limjeerajarus ve ark., 2020; Limjeerajarus, Osathanon ve ark., 2014; Seang ve ark., 2018). Buna rağmen, İloprost'un dental ve oral dokular üzerindeki etkileriyle ilgili bilgiler literatürde oldukça sınırlıdır.

Daha önce yapılan çalışmalarda İloprost'un dental pulpa kök hücreşeri üzerindeki VEGF mRNA ekspresyon düzeyini nasıl etkilediğini değerlendirmek için RT-PCR analizi kullanılmış olması nedeni ile (Limjeerajarus, Osathanon ve ark., 2014) (Limjeerajarus, Chanarattanubol ve ark., 2014) (Jearanaiphaisarn ve ark., 2018). (Limjeerajarus ve ark., 2019), bu çalışmada da RT-PCR analizi kullanılmasına karar verilmiştir.

Limjeerajarus ve ark. (2014), İloprost'un insan dental pulpa kök hücrelerinin revaskülarizasyonu üzerindeki etkisini değerlendirmek amacıyla; 10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} ve 10^{-6} M konsantrasyonlarındaki İloprost'u dental pulpa kök hücrelerine uyguladıktan 24 saat sonra; VEGF, FGF-2 ve PDGF nin mRNA ekspresyonu üzerine olan etkisini belirlemek için RT-PCR yöntemi kullanılmıştır. İloprost uyguladıktan 24 saat sonra, VEGF, FGF-2 ve PDGF mRNA düzeylerini doza bağlı ve istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı, en yüksek artışın 10^{-6} M konsantrasyonda meydana geldiği görülmüştür. Aynı şekilde, İloprost uygulamasından 1 saat sonra bile bu genlerin ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu ortaya koyulmuştur. Ayrıca yapılan ELİSA çalışmasında VEGF protein düzeyleri de doza bağlı olarak anlamlı artış göstermiş ve bu artış, mRNA ekspresyon paternleriyle uyumlu bulunmuştur (Limjeerajarus, Osathanon ve ark., 2014). Bu çalışmada da 10^{-6} M konsantrasyonundaki İloprost'un insan dental pulpa kök hücrelerine uygulandığı zaman VEGF mRNA ekspresyonunun kontrol grubuyla karşılaştırıldığı zaman 24. saatin sonunda istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı görülmüştür.

Limjeerajarus ve ark, (2014) İloprost'un dentin onarımı üzerindeki etkisini, in vitro ve in vivo ortamlarda incelemişlerdir. PGI₂ analogu olan İloprost'un, in vitro ortamda insan dental pulpa hücrelerinin osteo-/odontojenik farklılaşması ve VEGF ekspresyonunu, in vivo ortamda ise pulpası ekspozite edilen sıçan molar modeli üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Yapılan in vitro çalışmalarda İloprost 10⁻⁹, 10⁻⁸, 10⁻⁷, ve 10⁻⁶ mol/L konsantrasyonlarında kullanılmış ve çalışma sonucuna göre sadece 10⁻⁶ M İloprost uygulanan grupta VEGF mRNA ekspresyonunu kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artırmıştır. En yüksek ekspresyon 10⁻⁶ grubunda görülmüştür. Ayrıca, immünohistokimyasal boyama ile yapılan analizlerde, İloprost uygulanan grupta dental pulpa dokusunda VEGF protein ekspresyonunun arttığı belirlenmiştir (Limjeerajarus, Chanarattanubol ve ark., 2014). Bu çalışmada da 10⁻⁶ M konsantrasyonundaki VEGF mRNA düzeyi kontrol grubuyla karşılaştırıldığı zaman 24 saat sonunda istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı görülmüştür.

Jearanaiphaisarn ve arkadaşları 2016 yılında yaptıkları çalışmada İloprost'un insan periodontal ligament hücrelerinde (hPDL'ler) in vitro koşullarda anjiyogenezle ilişkili genler olan VEGF, COL1 ve bFGF mRNA ekspresyonlarını yarı kantitatif PCR ve gerçek zamanlı PCR yöntemiyle değerlendirmişlerdir. Salgılanan VEGF protein düzeylerini nicel olarak belirlemek amacıyla ELISA kiti kullanılarak analiz gerçekleştirilmiştir. COL1 protein ekspresyonu için immünofloresan boyama gerçekleştirilmiştir. Sinyal yolunun doğrulanması amacıyla bir prostasiklin reseptör (IP) antagonisti de kullanılmıştır. hPDL'ler, 10⁻⁹, 10⁻⁸, 10⁻⁷ VE 10⁻⁶ M konsantrasyonlarındaki İloprost solüsyonlarına 1, 6 ve 24 saat boyunca maruz bırakılmıştır. PCR sonuçlarına göre VEGF mRNA düzeyleri 1 ve 6. saatlerde 10⁻⁶ M İloprost grubunda ve 24. saatte 10⁻⁹, 10⁻⁸, VE 10⁻⁶ M konsantrasyon gruplarında istatistiksel olarak anlamlı şekilde artmıştır ancak bu artış doz bağımlı değildir. ELISA ile yapılan analizlere göre, İloprost grubunda VEGF protein salımı 1. ve 24. saatlerde anlamlı şekilde artış göstermiştir (Jearanaiphaisarn ve ark., 2018). Bu çalışmada ise Jearanaiphaisarn ve arkadaşlarının çalışmasından farklı olarak dental pulpa mezenkimal kök hücreleri üzerine uygulama yapılmıştır ama RT-PCR sonuçlarına olan etkisine baktığımız zaman 10⁻⁶ M konsantrasyonunun 24. Saatte VEGF mRNA ekspresyonunda meydana getirdiği artış Jearanaiphaisarn ve arkadaşlarının çalışmasına benzer olarak istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

Seang ve ark. 2018 yılında insan diş kesitlerini içeren bir üç boyutlu organ kültür sistemi kullanarak gerçekleştirildikleri çalışmada İloprost'un dental pulpa anjiyogenezini indükleyici etkisini araştırmışlardır. Diş kesitleri, 1 veya 3 gün boyunca 10^{-6} mol/L konsantrasyondaki İloprost ile kültüre edilmiştir. Mikrodamar yoğunluğu ve VEGF ekspresyonu, immünohistokimyasal boyama ile belirlenmiştir. Anti-vWF ile yapılan immünofloresan boyama, İloprost ile tedavi edilen grupta mikrodamar yoğunluğunda, tedavi edilmeyen kontrol grubuna oranla hem 1. hem de 3. günde anlamlı bir artış göstermiştir. İloprost, 1 ve 3. günlerde VEGF pozitif hücre sayısındaki artışla VEGF protein ifadesini anlamlı bir şekilde artırmış ve bu etki zamana bağlı olarak anlamlı bir şekilde artışa neden olmuştur (Seang ve ark., 2018). Bu çalışmada da İloprost'un 3.gün sonunda VEGF mRNA ekspresyonunun nasıl etkilendiğini görmek için yapılan RT-PCR analizinde 3.günün sonunda 10^{-6} grubunda kontrol grubuyla karşılaştırıldığı zaman istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu görülmüştür.

Limjeerajarus ve ark, prostasiklin analogu olan İloprost'un uzatılmış kontrollü salımının dental pulpa mezenkimal kök hücrelerinde anjiyogenezize olan etkisini in vitro olarak araştırdıkları çalışmalarda İloprost' un ve İloprost yüklü poli (laktik-ko-glikolik) asit (PLGA) mikrokürelerinin inkübasyonda 24 ve 72 saat sonra VEGF mRNA ekspresyonuna olan etkisi incelenmiştir. VEGF mRNA ekspresyonu Real-time PCR yöntemi ile analiz edilmiştir. Tüm İloprost uygulanan gruplarda Real-time PCR analizi sonucuna göre VEGF mRNA ekspresyonu anlamlı düzeyde artmıştır. İloprost uygulanan gruplarda 24. ve 72. saatleri arasındaki ikili karşılaştırmada 72.saatte VEGF mRNA ekspresyonunda anlamlı düzeyde azalış olduğu görülmüştür. Ancak VEGF mRNA ekspresyonundaki artış İloprost/PLGA grubunda 72 saate kadar devam etmiş ve kontrollü salımın biyolojik etki süresini uzattığı gösterilmiştir. (Limjeerajarus ve ark., 2019). Limjeerajarus ve ark.(Limjeerajarus ve ark., 2019), yaptığı çalışmayla uyumlu olarak bu çalışmada da 10^{-6} M İloprost kontrol grubuyla karşılaştırıldığı zaman VEGF mRNA ekspresyonu 24. ve 72. saatte istatistiksel olarak anlamlı bir artış göstermiştir Aynı şekilde bu çalışmada da 10^{-6} M İloprost kontrol grubunun 24. ve 72. saatler deki VEGF mRNA ekspresyonlarının ikili karşılaştırılmasında da 72.saatteki azalış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Click or tap here to enter text.İki çalışmanın 72. saatteki sonuçları dikkate alındığı zaman İloprost'un kontrollü salımı yapıldığı zaman mRNA ekspresyonunda artışın devam ettiği görülmüştür.

Bu nedenle bu çalışmada taşıyıcı olarak kullanılabilecek bir sıcaklığa duyarlı enjekte edilebilir hidrojel tasarlanmasına karar verilmiştir.

Limjeerajarus ve ark, yaptıkları çalışmada dental pulpa rejenerasyonunu indüklemek üzere İloprost taşıyıcısı olarak kullanılabilecek, Poloksamer 407 (PF127) temelli sıcaklığa duyarlı, enjekte edilebilir bir hidrojel hazırlamışlardır. İloprost (10^{-6} M) yüklü PF hidrojel, soğuk yöntem kullanılarak hazırlanmıştır. Hidrojelden salınan İloprost'un anjiyogenezis ile ilişkili gen olan VEGF mRNA ekspresyonunu nasıl etkilediği araştırılmıştır. 24. saatte hem kontrol grubunda hem de PF-İloprost grubunda VEGF mRNA ekspresyonunda artış gözlenmezken, doğrudan İloprost eklenen grupta VEGF mRNA ekspresyonu anlamlı şekilde artmıştır. Ancak 72. saatte, PF-İloprost grubunda VEGF mRNA ekspresyonu diğer gruplara kıyasla anlamlı düzeyde artış göstermiştir. Bu sonuçlar, PF127 içindeki kümülatif İloprost salımının, doğrudan uygulanan İloprost'a göre insan dental pulpa kök hücrelerinde VEGF gen ekspresyonunu daha etkili biçimde artırdığını ancak bu etkinin gecikmeli olduğunu göstermektedir (Limjeerajarus ve ark., 2020).

Bu çalışmanın RT-PCR analizi bulgularına bakıldığı zaman, İloprost 2×10^{-6} M ve 10^{-6} M konsantrasyonlarının insan dental pulpa kök hücrelerinde mRNA ekspresyon düzeyine olan etkisi incelendiğinde 10^{-6} M konsantrasyonuna sahip İloprost grubunda 24. ve 72. saatlerde literatürdeki çalışmalarla benzer sonuçlar elde edildiği görülmüştür. Daha önce literatürde etkisine bakılmayan 2×10^{-6} M konsantrasyonda İloprost'un VEGF mRNA düzeyini nasıl etkilediğini değerlendirerek literatüre katkıda bulunulması düşünülmüştür. Sonuçlar incelendiğinde 2×10^{-6} M konsantrasyonda İloprost'un kontrol grubuyla karşılaştırılmasında 24. ve 72. saatte istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir. 10^{-6} M İloprost grubuyla karşılaştırıldığı zaman ise her iki zaman diliminde de 2×10^{-6} M İloprost grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalış görülmüştür.

Bu çalışmada aşağıdaki sonuçlara ulaşılmıştır:

- a. %18 P407 ve %5 P188'in birleştirilmesiyle elde edilen formülasyonun karakterize edilmesiyle elde edilen sonuçlara göre İloprost'un kontrollü salımını sağlayabileceğini düşünmekteyiz.

- b. MTT sitotoksisite sonuçlarına göre, hazırladığımız formülasyonun %100 dilasyonunda hücre canlılığı çok düşük bulunmuştur. Bu formülasyonun seyreltilerek kullanılması gerektiğini düşünmekteyiz.
- c. MTT sitotoksisite sonuçlarına göre İloprost 24. saatte 10^{-6} ve 2×10^{-6} M konsantrasyonlarında toksik olmadığı görülmüştür. Ancak 72. saatte her 2 dozda da hücre canlılığında azalma görülmektedir.
- d. Hem MTT sitotoksisite testinde hem Real Time PCR analizinde angiyojenezle ilişkili VEGF mRNA ekspresyonu sonuçlarına baktığımız zaman 10^{-6} M İloprost grubunda artış görülürken ve 2×10^{-6} M İloprost grubunda azalış meydana gelmiştir.
- e. Prostatiklin analogu olan İloprost'un, dental pulpadaki damar oluşumu (vaskülarizasyon) ve hücre proliferasyonu arasında yer alan bir sinyal ağına dahil olduğunu ve bu etkiyi VEGF ekspresyonunun artırılması yoluyla gerçekleştirdiğini düşünmekteyiz.

REFERANSLAR

- Abbass, M. M. S., El-Rashidy, A. A., Sadek, K. M., Moshay, S. El, Radwan, I. A., Rady, D., Dörfer, C. E., & Fawzy El-Sayed, K. M. (2020). Hydrogels and dentin–pulp complex regeneration: From the benchtop to clinical translation. In *Polymers* (Vol. 12, Issue 12, pp. 1–65). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/polym12122935>
- About, I. (2018). Recent Trends in Tricalcium Silicates for Vital Pulp Therapy. *Current Oral Health Reports*, 5(3), 178–185. <https://doi.org/10.1007/S40496-018-0186-Y/FIGURES/1>
- Aguilar, P., & Linsuwanont, P. (2011). Vital pulp therapy in vital permanent teeth with cariously exposed pulp: a systematic review. *Journal of Endodontics*, 37(5), 581–587. <https://doi.org/10.1016/J.JOEN.2010.12.004>
- Ahangari, Z., Naseri, M., Jalili, M., Mansouri, Y., Mashhadiabbas, F., & Torkaman, A. (2011). Effect of Propolis on Dentin Regeneration and the Potential Role of Dental Pulp Stem Cell in Guinea Pigs. *Cell Journal (Yakhteh)*, 13(4), 223. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3584482/>
- Ahirwar, K., Shukla, R., Ahirwar, K., & Shukla, R. (2023). Preformulation Studies: A Versatile Tool in Formulation Design. *Drug Formulation Design*. <https://doi.org/10.5772/INTECHOPEN.110346>
- Akkari, A. C. S., Papini, J. Z. B., Garcia, G. K., Franco, M. K. K. D., Cavalcanti, L. P., Gasperini, A., Alkschbirs, M. I., Yokaichyia, F., De Paula, E., Tófoli, G. R., & De Araujo, D. R. (2016). Poloxamer 407/188 binary thermosensitive hydrogels as delivery systems for infiltrative local anesthesia: Physico-chemical characterization and pharmacological evaluation. *Materials Science and Engineering: C*, 68, 299–307. <https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2016.05.088>
- Aksel, H., & Huang, G. T. J. (2017). Combined Effects of Vascular Endothelial Growth Factor and Bone Morphogenetic Protein 2 on Odonto/Osteogenic Differentiation of Human Dental Pulp Stem Cells In Vitro. *Journal of Endodontics*, 43(6), 930–935. <https://doi.org/10.1016/J.JOEN.2017.01.036>

- Aksu, B., & Mesut, B. (2015). Quality by design (QbD) for pharmaceutical area. In *Istanbul Ecz. Fak. Derg. / J. Fac. Pharm. Istanbul* (Vol. 45, Issue 2).
- Aksu, B., Yegen, G., Purisa, S., Cevher, E., & Ozsoy, Y. (2014). Optimisation of Ondansetron Orally Disintegrating Tablets Using Artificial Neural Networks. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 13(9), 1374–1383.
<https://doi.org/10.4314/TJPR.V13I9.1>
- Alavi, S. E., Panah, N., Page, F., Gholami, M., Dastfal, A., Sharma, L. A., & Ebrahimi Shahmabadi, H. (2022). Hydrogel-based therapeutic coatings for dental implants. *European Polymer Journal*, 181, 111652.
<https://doi.org/10.1016/J.EURPOLYMJ.2022.111652>
- Alexandridis, P., & Hatton, T. A. (1995). COLLOIDS AND Surfaces SURFACES ELSEVIER Poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly (ethylene oxide) block copolymer surfactants in aqueous solutions and at interfaces: thermodynamics, structure, dynamics, and modeling. *A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 96, 46.
- Almeida, M., Magalhães, M., Veiga, F., & Figueiras, A. (2018). Poloxamers, poloxamines and polymeric micelles: Definition, structure and therapeutic applications in cancer. *Journal of Polymer Research*, 25(1). <https://doi.org/10.1007/S10965-017-1426-X>
- Almeshari, A., Elsafadi, M., Almadhari, R., Mahmood, A., Alsubait, S., & Aksel, H. (2022). The additive effect of iloprost on the biological properties of Mineral trioxide aggregate on mesenchymal stem cells. *Journal of Dental Sciences*, 17(1), 225–232.
<https://doi.org/10.1016/j.jds.2021.03.018>
- Almeshari, A., Khounganian, R., Mahdi, W., Aljarbou, F., Bhandi, S., & Alsubait, S. (2021). Pulpal response to the combined use of mineral trioxide aggregate and iloprost for direct pulp capping. *Applied Sciences (Switzerland)*, 11(8).
<https://doi.org/10.3390/app11083702>
- Alonso-Español, A., Bravo, E., Ribeiro-Vidal, H., Virto, L., Herrera, D., Alonso, B., & Sanz, M. (2023). The Antimicrobial Activity of Curcumin and Xanthohumol on Bacterial Biofilms Developed over Dental Implant Surfaces. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(3). <https://doi.org/10.3390/IJMS24032335>

- Al-Shaher, A., Wallace, J., Agarwal, S., Bretz, W., & Baugh, D. (2004). Effect of propolis on human fibroblasts from the pulp and periodontal ligament. *Journal of Endodontics*, 30(5), 359–361. <https://doi.org/10.1097/00004770-200405000-00012>
- Amoli, M. S., Ezeldeen, M., Jacobs, R., & Bloemen, V. (2022). Materials for Dentoalveolar Bioprinting: Current State of the Art. In *Biomedicines* (Vol. 10, Issue 1). MDPI. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10010071>
- Amorim, K. de S., Franz-Montan, M., Groppo, F. C., Muniz, B. V., Araújo, J. S. M. de, Santana, J. V. F., Dantas, A. C. G. C., de Paula, E., & Souza, L. M. de A. (2020). Palatal needle-free anesthesia for upper molars extraction. A randomized clinical trial. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*, 48(8), 815–819. <https://doi.org/10.1016/J.JCMS.2020.05.001>
- Arandi, N. Z., & Rabi, T. (2018). TheraCal LC: From Biochemical and Bioactive Properties to Clinical Applications. *International Journal of Dentistry*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/3484653>
- Arandi, N. Z., & Thabet, M. (2021). Minimal Intervention in Dentistry: A Literature Review on Biodentine as a Bioactive Pulp Capping Material. *BioMed Research International*, 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/5569313>
- Astudillo-Ortiz, E., Babo, P. S., Sunde, P. T., Galler, K. M., Gomez-Florit, M., & Gomes, M. E. (2023). Endodontic Tissue Regeneration: A Review for Tissue Engineers and Dentists. In *Tissue Engineering - Part B: Reviews* (Vol. 29, Issue 5, pp. 491–513). Mary Ann Liebert Inc. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2022.0211>
- Bae, H., Puranik, A. S., Gauvin, R., Edalat, F., Carrillo-Conde, B., Peppas, N. A., & Khademhosseini, A. (2012). Building vascular networks. *Science Translational Medicine*, 4(160). <https://doi.org/10.1126/SCITRANSLMED.3003688>
- Ba-Hattab, R., Al-Jamie, M., Aldreib, H., Alessa, L., Alonazi, M., Ba-Hattab, R., Al-Jamie, M., Aldreib, H., Alessa, L., & Alonazi, M. (2016). Calcium Hydroxide in Endodontics: An Overview. *Open Journal of Stomatology*, 6(12), 274–289. <https://doi.org/10.4236/OJST.2016.612033>
- Ballikaya, E., & Çelebi-Saltik, B. (2023). Approaches to vital pulp therapies. *Australian Endodontic Journal*, 49(3), 735–749. <https://doi.org/10.1111/AEJ.12772>

- Ban, E., Jang, D. J., Kim, S. J., Park, M., & Kim, A. (2017). Optimization of thermoreversible poloxamer gel system using QbD principle. *Pharmaceutical Development and Technology*, 22(7), 939–945.
<https://doi.org/10.1080/10837450.2016.1219371>
- Basnet, P., & Skalko-Basnet, N. (2011). Curcumin: an anti-inflammatory molecule from a curry spice on the path to cancer treatment. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 16(6), 4567–4598. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES16064567>
- Beg, S., Swain, S., Rahman, M., Hasnain, M. S., & Imam, S. S. (2019). Application of Design of Experiments (DoE) in Pharmaceutical Product and Process Optimization. *Pharmaceutical Quality by Design: Principles and Applications*, 43–64.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815799-2.00003-4>
- Bell, C. L., & Peppas, N. A. (1995). Measurement of the swelling force in ionic polymer networks. III. Swelling force of interpolymer complexes. *Journal of Controlled Release*, 37(3), 277–280. [https://doi.org/10.1016/0168-3659\(95\)00085-2](https://doi.org/10.1016/0168-3659(95)00085-2)
- BERGSTROEM, S., & SAMUELSSON, B. (1965). PROSTAGLANDINS. *Annual Review of Biochemistry*, 34(Volume 34, 1965), 101–108.
<https://doi.org/10.1146/ANNUREV.BI.34.070165.000533/CITE/REFWORKS>
- Bhavana, V., Chaitanya, K. P., Gandi, P., Patil, J., Dola, B., & Reddy, R. B. (2015). Evaluation of antibacterial and antifungal activity of new calcium-based cement (Biodentine) compared to MTA and glass ionomer cement. *Journal of Conservative Dentistry : JCD*, 18(1), 44–46. <https://doi.org/10.4103/0972-0707.148892>
- Bjørndal, L., Fransson, H., Bruun, G., Markvart, M., Kjældgaard, M., Näsman, P., Hedenbjörk-Lager, A., Dige, I., & Thordrup, M. (2017). Randomized Clinical Trials on Deep Carious Lesions: 5-Year Follow-up.
<https://doi.org/10.1177/0022034517702620>, 96(7), 747–753.
<https://doi.org/10.1177/0022034517702620>
- Bleicher, F. (2014). Odontoblast physiology. *Experimental Cell Research*, 325(2), 65–71.
<https://doi.org/10.1016/J.YEXCR.2013.12.012>
- Bogović, A., Nižetić, J., Galić, N., Želježić, D., Micek, V., & Mladinić, M. (2011). The effects of hyaluronic acid, calcium hydroxide, and dentin adhesive on rat odontoblasts

- and fibroblasts. *Arhiv Za Higijenu Rada i Toksikologiju*, 62(2), 155–161.
<https://doi.org/10.2478/10004-1254-62-2011-2076>
- Bölgen, N., Aguilar, M. R., Fernández, M. D. M., Gonzalo-Flores, S., Villar-Rodil, S., San Román, J., & Pişkin, E. (2015). Thermoresponsive biodegradable HEMA-lactate-Dextran-co-NIPA cryogels for controlled release of simvastatin. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 43(1), 40–49.
<https://doi.org/10.3109/21691401.2013.837475>
- Boonlai, W., Tantishaiyakul, V., Hirun, N., Sangfai, T., & Suknuntha, K. (2018). Thermosensitive Poloxamer 407/Poly(Acrylic Acid) Hydrogels with Potential Application as Injectable Drug Delivery System. *AAPS PharmSciTech*, 19(5), 2103–2117. <https://doi.org/10.1208/S12249-018-1010-7/FIGURES/11>
- Boyer, K. R., & Nguyen, J. T. (2023). An Update on Vital Pulp Therapy. *Journal of the California Dental Association*, 51(1).
<https://doi.org/10.1080/19424396.2023.2244707>
- Burger, Alfred., & Wolff, M. E. . (2012). *Quality by design : A holistic concept of building quality in pharmaceuticals*. 656.
- Buwalda, S. J., Boere, K. W. M., Dijkstra, P. J., Feijen, J., Vermonden, T., & Hennink, W. E. (2014). *Hydrogels in a historical perspective: From simple networks to smart materials*. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.03.052>
- Camilleri, J. (2008). Characterization of hydration products of mineral trioxide aggregate. *International Endodontic Journal*, 41(5), 408–417. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2591.2007.01370.X>
- Carvalho, N. C., Guedes, S. A. G., Albuquerque-Júnior, R. L. C., de Albuquerque, D. S., de Souza Araújo, A. A., Paranhos, L. R., Camargo, S. E. A., & Ribeiro, M. A. G. (2018). Analysis of Aloe vera cytotoxicity and genotoxicity associated with endodontic medication and laser photobiomodulation. *Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology*, 178, 348–354.
<https://doi.org/10.1016/J.JPHOTOBIO.2017.11.027>
- Chang, B., Ahuja, N., Ma, C., & Liu, X. (2017). Injectable scaffolds: Preparation and application in dental and craniofacial regeneration. *Materials Science & Engineering*.

R, Reports : A Review Journal, 111, 1–26.

<https://doi.org/10.1016/J.MSER.2016.11.001>

Chaudhary, B., & Verma, S. (2014). Preparation and evaluation of novel in situ gels containing acyclovir for the treatment of oral herpes simplex virus infections.

TheScientificWorldJournal, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/280928>

Chen, A., Deng, S., Lai, J., Li, J., Chen, W., Varma, S. N., Zhang, J., Lei, C., Liu, C., & Huang, L. (2023). Hydrogels for Oral Tissue Engineering: Challenges and Opportunities. *Molecules*, 28(9). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES28093946>

Chen, J., Zhou, R., Li, L., Li, B., Zhang, X., & Su, J. (2013). Mechanical, Rheological and Release Behaviors of a Poloxamer 407/Poloxamer 188/Carbopol 940 Thermosensitive Composite Hydrogel. *Molecules*, 18(10), 12415.

<https://doi.org/10.3390/MOLECULES181012415>

Chen, L., & Suh, B. I. (2017). Cytotoxicity and biocompatibility of resin-free and resin-modified direct pulp capping materials: A state-of-the-art review. *Dental Materials Journal*, 36(1), 1–7. <https://doi.org/10.4012/DMJ.2016-107>

Chen, W., Zhang, C., Peng, S., Lin, Y., & Ye, Z. (2024). Hydrogels in Dental Medicine. In *Advanced Therapeutics* (Vol. 7, Issue 1). John Wiley and Sons Inc.

<https://doi.org/10.1002/adtp.202300128>

Chen, Y., Lee, J. H., Meng, M., Cui, N., Dai, C. Y., Jia, Q., Lee, E. S., & Jiang, H. B. (2021). An overview on thermosensitive oral gel based on poloxamer 407. In *Materials* (Vol. 14, Issue 16). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ma14164522>

Chiang, T. M., Postlethwaite, A. E., Beachey, E. H., Seyer, J. M., & Kang, A. H. (1978). Binding of chemotactic collagen-derived peptides to fibroblasts. The relationship to fibroblast chemotaxis. *The Journal of Clinical Investigation*, 62(5), 916–922.

<https://doi.org/10.1172/JCI109219>

Chmielewsky, F., About, I., & Chung, S. H. (2016). Pulp Fibroblasts Control Nerve Regeneration through Complement Activation. *Journal of Dental Research*, 95(8), 913–922. <https://doi.org/10.1177/0022034516643065>

Choi, H. G., Jung, J. H., Ryu, J. M., Yoon, S. J., Oh, Y. K., & Kim, C. K. (1998). Development of in situ-gelling and mucoadhesive acetaminophen liquid suppository.

International Journal of Pharmaceutics, 165(1), 33–44.

[https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(97\)00386-4](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(97)00386-4)

Christodoulou, I., Goulielmaki, M., Devetzi, M., Panagiotidis, M., Koliakos, G., & Zoumpourlis, V. (2018). Mesenchymal stem cells in preclinical cancer cytotherapy: a systematic review. *Stem Cell Research & Therapy* 2018 9:1, 9(1), 1–38.
<https://doi.org/10.1186/S13287-018-1078-8>

Chung, C. K., Fransen, M. F., van der Maaden, K., Campos, Y., García-Couce, J., Kralisch, D., Chan, A., Ossendorp, F., & Cruz, L. J. (2020). Thermosensitive hydrogels as sustained drug delivery system for CTLA-4 checkpoint blocking antibodies. *Journal of Controlled Release : Official Journal of the Controlled Release Society*, 323, 1–11. <https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2020.03.050>

Cicero, D. O., Nijakowski, K., Ortarzewska, M., Jankowski, J., Lehmann, A., & Surdacka, A. (2023). *Academic Editors: Greta Petrella and The Role of Cellular Metabolism in Maintaining the Function of the Dentine-Pulp Complex: A Narrative Review*.
<https://doi.org/10.3390/metabo13040520>

Clarkin, C. E., Emery, R. J., Pitsillides, A. A., & Wheeler-Jones, C. P. D. (2008). Evaluation of VEGF-mediated signaling in primary human cells reveals a paracrine action for VEGF in osteoblast-mediated crosstalk to endothelial cells. *Journal of Cellular Physiology*, 214(2), 537–544. <https://doi.org/10.1002/JCP.21234>

Costa, A. M. B., Silva, A. R. S. T., Santos, A. de J., Galvão, J. G., Andrade-Neto, V. V., Torres-Santos, E. C., Ueki, M. M., Almeida, L. E., Sarmiento, V. H. V., Dolabella, S. S., Scher, R., Lira, A. A. M., & Nunes, R. de S. (2023). Thermosensitive system formed by poloxamers containing carvacrol: An effective carrier system against *Leishmania amazonensis*. *Acta Tropica*, 237, 106744.
<https://doi.org/10.1016/J.ACTATROPICA.2022.106744>

Cross, M. J., & Claesson-Welsh, L. (2001). FGF and VEGF function in angiogenesis: signalling pathways, biological responses and therapeutic inhibition. *Trends in Pharmacological Sciences*, 22(4), 201–207. [https://doi.org/10.1016/S0165-6147\(00\)01676-X](https://doi.org/10.1016/S0165-6147(00)01676-X)

- Cui, N., Dai, C. Y., Mao, X., Lv, X., Gu, Y., Lee, E. S., Jiang, H. B., & Sun, Y. (2022). Poloxamer-Based Scaffolds for Tissue Engineering Applications: A Review. In *Gels* (Vol. 8, Issue 6). MDPI. <https://doi.org/10.3390/gels8060360>
- Cusicanqui Méndez, D. A., Gutierrez, E., José Dionisio, E., Afonso Rabelo Buzalaf, M., Cardoso Oliveira, R., Andrade Moreira Machado, M. A., & Cruvinel, T. (2018). Curcumin-mediated antimicrobial photodynamic therapy reduces the viability and vitality of infected dentin caries microcosms. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 24, 102–108. <https://doi.org/10.1016/J.PDPDT.2018.09.007>
- da Rosa, W. L. O., Cocco, A. R., Silva, T. M. da, Mesquita, L. C., Galarça, A. D., Silva, A. F. da, & Piva, E. (2018). Current trends and future perspectives of dental pulp capping materials: A systematic review. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 106(3), 1358–1368. <https://doi.org/10.1002/JBM.B.33934>
- Damas, B. A., Wheeler, M. A., Bringas, J. S., & Hoen, M. M. (2011). Cytotoxicity comparison of mineral trioxide aggregates and EndoSequence bioceramic root repair materials. *Journal of Endodontics*, 37(3), 372–375. <https://doi.org/10.1016/J.JOEN.2010.11.027>
- Dammaschke, T. (2008). The history of direct pulp capping. In *Article in Journal of the History of Dentistry*. <https://www.researchgate.net/publication/5276458>
- Dammaschke, T., Leidinger, J., & Schäfer, E. (2010). Long-term evaluation of direct pulp capping-treatment outcomes over an average period of 6.1 years. *Clinical Oral Investigations*, 14(5), 559–567. <https://doi.org/10.1007/S00784-009-0326-9>
- Dang, L. H., Huynh, N. T., Pham, N. O., Nguyen, C. T., Vu, M. T., Dinh, V. T., Le, V. T., & Tran, N. Q. (2019). Injectable nanocurcumin-dispersed gelatin-pluronic nanocomposite hydrogel platform for burn wound treatment. *Bulletin of Materials Science*, 42(2), 1–10. <https://doi.org/10.1007/S12034-019-1745-0/FIGURES/10>
- Daronch, M., Rueggeberg, F. A., Hall, G., & De Goes, M. F. (2007). Effect of composite temperature on in vitro intrapulpal temperature rise. *Dental Materials : Official Publication of the Academy of Dental Materials*, 23(10), 1283–1288. <https://doi.org/10.1016/J.DENTAL.2006.11.024>

- Davaie, S., Hooshmand, T., & Ansarifard, S. (2021). Different types of bioceramics as dental pulp capping materials: A systematic review. *Ceramics International*, 47(15), 20781–20792. <https://doi.org/10.1016/J.CERAMINT.2021.04.193>
- Demirci, M., & TUNCER, S. (2011). Dental materyallerde biyouyumluluk değerdendirmeleri. *Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi*, 21(2), 141–149. <http://search/yayin/detay/125626>
- Devi, D., Sandhya, P., & Hari, B. V. (2013). *Poloxamer: A Novel Functional Molecule For Drug Delivery And Gene Therapy*.
- Dorris, S. L., & Peebles, R. S. (2012). PGI 2 as a Regulator of Inflammatory Diseases. *Mediators of Inflammation*, 2012(1), 926968. <https://doi.org/10.1155/2012/926968>
- Duncan, H. F., El-Karim, I., H Dummer, P. M., Whitworth, J., Nagendrababu, V., & Henry Duncan, C. F. (2022). *Factors that influence the outcome of pulpotomy in permanent teeth*. <https://doi.org/10.1111/iej.13866>
- Duncan, H. F., Galler, K. M., Tomson, P. L., Simon, S., El-Karim, I., Kundzina, R., Krastl, G., Dammaschke, T., Fransson, H., Markvart, M., Zehnder, M., & Bjørndal, L. (2019). European Society of Endodontology position statement: Management of deep caries and the exposed pulp. *International Endodontic Journal*, 52(7), 923–934. <https://doi.org/10.1111/IEJ.13080>
- Duncan, H. F., & C. F. (2022). Present status and future directions-Vital pulp treatment and pulp preservation strategies. *Int Endod J*, 55, 497–511. <https://doi.org/10.1111/iej.13688>
- Dutta, A., & Saunders, W. P. (2017). Calcium silicate materials in endodontics. <https://doi.org/10.12968/Denu.2014.41.8.708>, 41(8), 708–722. <https://doi.org/10.12968/DENU.2014.41.8.708>
- Ebadi, M., Miresmaeili, A., Shojaei, S., Farhadi, S., & Rajabi, S. (2023). Isolation and characterization of apical papilla cells from root end of human third molar and their differentiation into cementoblast cells: an in vitro study. *Biological Procedures Online*, 25(1). <https://doi.org/10.1186/S12575-023-00190-6>
- Erceg, I., Ivkošić, I., Fureš, R., Cosić, V., Mikelin, N., Bulić, L., Dobranić, D., Brlek, P., & Primorac, D. (2023). *Personalized Medicine*

Unlocking the Potential of Mesenchymal Stem Cells in Gynecology: Where Are We Now? <https://doi.org/10.3390/jpm13081253>

- Erthal, L. C. S., Gobbo, O. L., & Ruiz-Hernandez, E. (2021). Biocompatible copolymer formulations to treat glioblastoma multiforme. *Acta Biomaterialia*, 121, 89–102. <https://doi.org/10.1016/J.ACTBIO.2020.11.030>
- Fakhari, A., Corcoran, M., & Schwarz, A. (2017). Thermogelling properties of purified poloxamer 407. *Heliyon*, 3(8), 390. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2017.e00390>
- Fan, R., Cheng, Y., Wang, R., Zhang, T., Zhang, H., Li, J., Song, S., & Zheng, A. (2022). Thermosensitive Hydrogels and Advances in Their Application in Disease Therapy. *Polymers* 2022, Vol. 14, Page 2379, 14(12), 2379. <https://doi.org/10.3390/POLYM14122379>
- Farges, J. C., Alliot-Licht, B., Renard, E., Ducret, M., Gaudin, A., Smith, A. J., & Cooper, P. R. (2015). Dental Pulp Defence and Repair Mechanisms in Dental Caries. *Mediators of Inflammation*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/230251>
- Fawzy El-Sayed, K. M., Elsalawy, R., Ibrahim, N., Gadalla, M., Albargasy, H., Zahra, N., Mokhtar, S., El Nahhas, N., El Kaliouby, Y., & Dörfer, C. E. (2019). The Dental Pulp Stem/Progenitor Cells-Mediated Inflammatory-Regenerative Axis. *https://Home.Liebertpub.Com/Teb*, 25(5), 445–460. <https://doi.org/10.1089/TEN.TEB.2019.0106>
- Feng, Q., Zhao, Y., Li, H., Zhang, Y., Xia, X., & Yan, Q. (2017). Frontal polymerization and characterization of interpenetrating polymer networks composed of poly(N-isopropylacrylamide) and polyvinylpyrrolidone. *Colloid and Polymer Science*, 296(1), 165–172. <https://doi.org/10.1007/S00396-017-4215-5>
- Fitzgerald, M., Chieg~ Jr, D. J., & Heys', D. R. (1990). AUTORADIOGRAPHIC ANALYSIS OF ODONTOBLAST REP'LACEMENT FOLLOWING PULP EXPOSURE IN PRIMATE TEETH. In *Archs oral Bid* (Vol. 35, Issue 9).
- Fotakis, G., & Timbrell, J. A. (2006). In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicology Letters*, 160(2), 171–177. <https://doi.org/10.1016/J.TOXLET.2005.07.001>

- Freshney, R. Ian. (2005). *Culture of animal cells : a manual of basic technique*. 642.
<https://www.wiley.com/en-ae/Culture+of+Animal+Cells%3A+A+Manual+of+Basic+Technique%2C+5th+Edition-p-9780471747598>
- Fu, C., Ren, F., Zhang, Q., Lao, G., & Zhang, L. M. (2015). Effects of collagen incorporation on thermogelation and hydrogel characteristics of aqueous Pluronic F127 copolymer system. *Colloid and Polymer Science*, 8(293), 2191–2200.
<https://doi.org/10.1007/S00396-015-3573-0>
- Gala-García, A., Teixeira, K. I. R., Mendes, L. L., Sobrinho, A. P. R., Santos, V. R., & Cortes, M. E. (2008). Effect of Aloe vera on rat pulp tissue. *Pharmaceutical Biology*, 46(5), 302–308. <https://doi.org/10.1080/13880200801887138>
- Galler, K. M., Weber, M., Korkmaz, Y., Widbiller, M., & Feuerer, M. (2021). Molecular Sciences Inflammatory Response Mechanisms of the Dentine-Pulp Complex and the Periapical Tissues. *Int. J. Mol. Sci*, 22, 1480. <https://doi.org/10.3390/ijms22031480>
- Gandolfi, M. G., Siboni, F., & Prati, C. (2012). Chemical–physical properties of TheraCal, a novel light-curable MTA-like material for pulp capping. *International Endodontic Journal*, 45(6), 571–579. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2591.2012.02013.X>
- Gittens, S. A., & Uludag, H. (2001). Growth Factor Delivery for Bone Tissue Engineering. *Journal of Drug Targeting*, 9(6), 407–429.
<https://doi.org/10.3109/10611860108998776>
- Goga, R., Chandler, N. P., & Oginni, A. O. (2008). Pulp stones: a review. *International Endodontic Journal*, 41, 457–468. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2008.01374.x>
- Gökçek, M., & Bodrumlu, E. H. (2015). VİTAL PULPA TEDAVİLERİNDE GÜNCEL YAKLAŞIMLAR. *Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi*, 25(1).
<https://doi.org/10.17567/DFD.50801>
- Goldberg, M., & Smith, A. J. (2004). CELLS AND EXTRACELLULAR MATRICES OF DENTIN AND PULP: A BIOLOGICAL BASIS FOR REPAIR AND TISSUE ENGINEERING. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine : An Official Publication of the American Association of Oral Biologists*, 15(1), 13–27.
<https://doi.org/10.1177/154411130401500103>

- Gronthos, S., Brahimi, J., Li, W., Fisher, L. W., Cherman, N., Boyde, A., DenBesten, P., Robey, P. G., & Shi, S. (2002). Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *Journal of Dental Research*, 81(8), 531–535.
<https://doi.org/10.1177/154405910208100806>
- Gronthos, S., Mankani, M., Brahimi, J., Robey, P. G., & Shi, S. (2000). Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(25), 13625–13630.
<https://doi.org/10.1073/PNAS.240309797>
- Gruber, S., & Nickel, A. (2023). Toxic or not toxic? The specifications of the standard ISO 10993-5 are not explicit enough to yield comparable results in the cytotoxicity assessment of an identical medical device. *Frontiers in Medical Technology*, 5, 1195529. <https://doi.org/10.3389/FMEDT.2023.1195529/BIBTEX>
- Gundogdu, E., Demir, E. S., Özgenç, E., Yeğen, G., & Aksu, B. (2020). Applying Quality by Design Principles in the Development and Preparation of a New Radiopharmaceutical: Technetium-99m-Imatinib Mesylate. *ACS Omega*, 5(10), 5297–5305. <https://doi.org/10.1021/ACSOMEGA.9B04327>
- Guo, W., Chen, L., Gong, K., Ding, B., Duan, Y., & Jin, Y. (2012). Heterogeneous dental follicle cells and the regeneration of complex periodontal tissues. *Tissue Engineering. Part A*, 18(5–6), 459–470. <https://doi.org/10.1089/TEN.TEA.2011.0261>
- Hadzik, J., Kubasiewicz-Ross, P., Simka, W., Gębarowski, T., Barg, E., Cieśla-Niechwiadowicz, A., Szajna, A. T., Szajna, E., Gedrange, T., Kozakiewicz, M., Dominiak, M., & Jurczyszyn, K. (2022). Fractal Dimension and Texture Analysis in the Assessment of Experimental Laser-Induced Periodic Surface Structures (LIPSS) Dental Implant Surface—In Vitro Study Preliminary Report. *Materials* 2022, Vol. 15, Page 2713, 15(8), 2713. <https://doi.org/10.3390/MA15082713>
- Hamidi, M., Azadi, A., & Rafiei, P. (2008). Hydrogel nanoparticles in drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60(15), 1638–1649.
<https://doi.org/10.1016/J.ADDR.2008.08.002>

- Han, J., Menicanin, D., Gronthos, S., & Bartold, P. M. (2014). Stem cells, tissue engineering and periodontal regeneration. *Australian Dental Journal*, 59 Suppl 1(SUPPL. 1), 117–130. <https://doi.org/10.1111/ADJ.12100>
- Hanks, C. T., Wataha, J. C., & Sun, Z. (1996). In vitro models of biocompatibility: a review. *Dental Materials : Official Publication of the Academy of Dental Materials*, 12(3), 186–193. [https://doi.org/10.1016/S0109-5641\(96\)80020-0](https://doi.org/10.1016/S0109-5641(96)80020-0)
- Hanna, S. N., Alfayate, R. P., & Prichard, J. (2020). Vital pulp therapy an insight over the available literature and future expectations. *European Endodontic Journal*, 5(3), 46–53. <https://doi.org/10.14744/eej.2019.44154>
- Hargreaves, K. M., Berman, L. H., Rotstein, I., & Cohen, S. (2021). *Cohen's Pathways of the Pulp, 12th Edition*. 979. <https://www.nobelkitabevi.com.tr/endodonti/7959-cohen-s-pathways-of-the-pulp-12th-edition-9780323749671.html>
- Hassoun, P. M. (2009). Therapies for scleroderma-related pulmonary arterial hypertension. *Expert Review of Respiratory Medicine*, 3(2), 187. <https://doi.org/10.1586/ERS.09.5>
- Heller, J. (1980). Controlled release of biologically active compounds from bioerodible polymers. *Biomaterials*, 1(1), 51–57. [https://doi.org/10.1016/0142-9612\(80\)90060-5](https://doi.org/10.1016/0142-9612(80)90060-5)
- Hennink, W. E., & Van Nostrum, C. F. (2002). Novel crosslinking methods to design hydrogels. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54(1), 13–36. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(01\)00240-X](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(01)00240-X)
- Hewlings, S. J., & Kalman, D. S. (2017). Curcumin: A Review of Its' Effects on Human Health. *Foods*, 6(10), 92. <https://doi.org/10.3390/FOODS6100092>
- Hilton, T. J. (2009). Keys to clinical success with pulp capping: a review of the literature. *Operative Dentistry*, 34(5), 615–625. <https://doi.org/10.2341/09-132-0>
- Hirun, N., Kraisit, P., & Tantishaiyakul, V. (2022). Thermosensitive Polymer Blend Composed of Poloxamer 407, Poloxamer 188 and Polycarbophil for the Use as Mucoadhesive In Situ Gel. *Polymers*, 14(9). <https://doi.org/10.3390/POLYM14091836>

- Ho, Y. C., Huang, F. M., & Chang, Y. C. (2006). Mechanisms of cytotoxicity of eugenol in human osteoblastic cells in vitro. *International Endodontic Journal*, 39(5), 389–393. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2591.2006.01091.X>
- Hoeben, A., Landuyt, B., Highley, M. S., Wildiers, H., Van Oosterom, A. T., & De Bruijn, E. A. (2004). Vascular Endothelial Growth Factor and Angiogenesis. *Pharmacological Reviews*, 56(4), 549–580. <https://doi.org/10.1124/PR.56.4.3>
- Huang, G. T. J. (2009). Pulp and dentin tissue engineering and regeneration: current progress. *Regenerative Medicine*, 4(5), 697–707. <https://doi.org/10.2217/RME.09.45>
- Huang, G. T. J., Yamaza, T., Shea, L. D., Djouad, F., Kuhn, N. Z., Tuan, R. S., & Shi, S. (2010). Stem/progenitor cell-mediated de novo regeneration of dental pulp with newly deposited continuous layer of dentin in an in vivo model. *Tissue Engineering. Part A*, 16(2), 605–615. <https://doi.org/10.1089/TEN.TEA.2009.0518>
- Huang, L., Shen, M., Li, R., Zhang, X., Sun, Y., Gao, P., Fu, H., Liu, H., He, Y., Du, Y., Cao, J., & Duan, Y. (2016). Thermo-sensitive composite hydrogels based on poloxamer 407 and alginate and their therapeutic effect in embolization in rabbit VX2 liver tumors. *Oncotarget*, 7(45), 73280–73291. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.11789>
- Huang, Y., Guo, W., Zhang, J., Peng, X., Li, G., Zhang, L. M., & Yang, L. (2020). Thermosensitive hydrogels based on methylcellulose derivatives for prevention of postoperative adhesion. *Cellulose*, 27(3), 1555–1571. <https://doi.org/10.1007/S10570-019-02857-4>
- Hung, C. H., Chu, Y. T., Suen, J. L., Lee, M. S., Chang, H. W., Lo, Y. C., & Jong, Y. J. (2009). Regulation of cytokine expression in human plasmacytoid dendritic cells by prostaglandin I₂ analogues. *European Respiratory Journal*, 33(2), 405–410. <https://doi.org/10.1183/09031936.00070008>
- Imran Farooq, by, Ali, S., Anderson, P., Shabbir, J., Farooq, I., Mohammed, F., Bugshan, A., Ali Khurram, S., & Khan, E. (2021). *An Illustrated Guide to Oral Histology, First Edition. Edited.*
- Inami, C., Endoh, C., Ichinohe, H., & Itsuno, S. (2019). Effect of Direct Pulp Capping with a Novel Chemically Curable Mineral Trioxide Aggregate Material using Tri-

- Butylborane as a Polymerization Initiator. *Journal of Hard Tissue Biology*, 28(4), 383–390. <https://doi.org/10.2485/JHTB.28.383>
- Islam, R., Islam, M. R. R., Tanaka, T., Alam, M. K., Ahmed, H. M. A., & Sano, H. (2023). Direct pulp capping procedures – Evidence and practice. *The Japanese Dental Science Review*, 59, 48. <https://doi.org/10.1016/J.JDSR.2023.02.002>
- ISO 10993-5:2009 - *Biological evaluation of medical devices — Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity*. (n.d.). Retrieved February 3, 2025, from <https://www.iso.org/standard/36406.html>
- Iwata, T., Yamato, M., Zhang, Z., Mukobata, S., Washio, K., Ando, T., Feijen, J., Okano, T., & Ishikawa, I. (2010). Validation of human periodontal ligament-derived cells as a reliable source for cytotherapeutic use. *Journal of Clinical Periodontology*, 37(12), 1088–1099. <https://doi.org/10.1111/J.1600-051X.2010.01597.X>
- Jäger, M., Zilkens, C., Bittersohl, B., Matheney, T., Kozina, G., Blondin, D., & Krauspe, R. (2011). Efficiency of iloprost treatment for osseous malperfusion. *International Orthopaedics*, 35(5), 761–765. <https://doi.org/10.1007/S00264-010-0998-4/FIGURES/4>
- Jarak, I., Varela, C. L., Tavares da Silva, E., Roleira, F. F. M., Veiga, F., & Figueiras, A. (2020). Pluronic-based nanovehicles: Recent advances in anticancer therapeutic applications. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 206, 112526–112526. <https://doi.org/10.1016/J.EJMECH.2020.112526>
- Javed, M. N., Kohli, K., & Amin, S. (2018). Risk Assessment Integrated QbD Approach for Development of Optimized Bicontinuous Mucoadhesive Limbicubes for Oral Delivery of Rosuvastatin. *AAPS PharmSciTech*, 19(3), 1377–1391. <https://doi.org/10.1208/S12249-018-0951-1>
- Jearanaiphaisarn, T., Sanharati, T., Pavasant, P., & Nakalekha Limjeerajarus, C. (2018). The effect of iloprost on cell proliferation and angiogenesis-related gene expression in human periodontal ligament cells. *Odontology*, 106(1), 11–18. <https://doi.org/10.1007/s10266-017-0307-4>
- Jenkins, N. (1999). Animal Cell Biotechnology. *Animal Cell Biotechnology*. <https://doi.org/10.1385/0896035476>

- Jeong, B., Kim, S. W., & Bae, Y. H. (2012). Thermosensitive sol–gel reversible hydrogels. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64(SUPPL.), 154–162.
<https://doi.org/10.1016/J.ADDR.2012.09.012>
- Johnston, T. P., & Palmer, W. K. (1993). Mechanism of poloxamer 407-induced hypertriglyceridemia in the rat. *Biochemical Pharmacology*, 46(6), 1037–1042.
[https://doi.org/10.1016/0006-2952\(93\)90668-M](https://doi.org/10.1016/0006-2952(93)90668-M)
- Jonkman, J. E. N., Cathcart, J. A., Xu, F., Bartolini, M. E., Amon, J. E., Stevens, K. M., & Colarusso, P. (2014). An introduction to the wound healing assay using live-cell microscopy. *Cell Adhesion & Migration*, 8(5), 440–451.
<https://doi.org/10.4161/CAM.36224>
- Kamio, K., Sato, T., Liu, X., Sugiura, H., Togo, S., Kobayashi, T., Kawasaki, S., Wang, X., Mao, L., Ahn, Y., Holz, O., Magnussen, H., & Rennard, S. I. (2008). Prostacyclin analogs stimulate VEGF production from human lung fibroblasts in culture. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, 294(6).
<https://doi.org/10.1152/AJPLUNG.00129.2007>
- Kawabe, J. ichi, Ushikubi, F., & Hasebe, N. (2010). Prostacyclin in vascular diseases. - Recent insights and future perspectives -. *Circulation Journal : Official Journal of the Japanese Circulation Society*, 74(5), 836–843. <https://doi.org/10.1253/CIRCJ.CJ-10-0195>
- Kawashima, N., & Okiji, T. (2016a). Odontoblasts: Specialized hard-tissue-forming cells in the dentin-pulp complex. *Congenital Anomalies*, 56(4), 144–153.
<https://doi.org/10.1111/CGA.12169>
- Khalef, L., Lydia, R., Filicia, K., & Moussa, B. (2024). Cell viability and cytotoxicity assays: Biochemical elements and cellular compartments. *Cell Biochemistry and Function*, 42(3), e4007. <https://doi.org/10.1002/CBF.4007>
- Khan, B., Arbab, A., Khan, S., Fatima, H., Bibi, I., Chowdhry, N. P., Ansari, A. Q., Ursani, A. A., Kumar, S., Hussain, J., & Abdullah, S. (2023). Recent progress in thermosensitive hydrogels and their applications in drug delivery area. *MedComm - Biomaterials and Applications*, 2(3). <https://doi.org/10.1002/MBA2.55>

- Khan, B., Kumar, S., Sanbhal, N., Abdullah, S., Hussain, J., Chowdhry, N. P., Ansari, A. Q., & Surahio, M. M. (2023). Synthesis and Characterization of Cyclodextrin-Based Scaffold Incorporating Ciprofloxacin Antibacterial Agent for Skin Infection Prevention. *Biomedical Materials and Devices*, 1(1), 492–503. <https://doi.org/10.1007/S44174-022-00014-3>
- Kim, J. J., Kim, S. J., Kim, Y. S., Kim, S. Y., Park, S. H., & Kim, E. C. (2012). The Role of SIRT1 on Angiogenic and Odontogenic Potential in Human Dental Pulp Cells. *Journal of Endodontics*, 38(7), 899–906. <https://doi.org/10.1016/J.JOEN.2012.04.006>
- Kim, J. M., Ha, T. H., Park, J. S., & Kim, H. G. (2016). Effect of laser surface treatment on the corrosion behavior of FeCrAl-coated TZM alloy. *Metals*, 6(2). <https://doi.org/10.3390/MET6020029>
- Kitagawa, M., Maeda, T., & Hotta, A. (2018). PEG-based nanocomposite hydrogel: Thermo-responsive sol-gel transition and degradation behavior controlled by the LA/GA ratio of PLGA-PEG-PLGA. *Polymer Degradation and Stability*, 147, 222–228. <https://doi.org/10.1016/J.POLYMDEGRADSTAB.2017.11.024>
- Kitasako, Y., Shibata, S., Cox, C. F., & Tagami, J. (2002). Location, arrangement and possible function of interodontoblastic collagen fibres in association with calcium hydroxide-induced hard tissue bridges. *International Endodontic Journal*, 35(12), 996–1004. <https://doi.org/10.1046/J.1365-2591.2002.00606.X>
- Komabayashi, T., Wadajkar, A., Santimano, S., Ahn, C., Zhu, Q., Opperman, L. A., Bellinger, L. L., Yang, J., & Nguyen, K. T. (2016). Preliminary study of light-cured hydrogel for endodontic drug delivery vehicle. *Journal of Investigative and Clinical Dentistry*, 7(1), 87–92. <https://doi.org/10.1111/JICD.12118>
- Komabayashi, T., Zhu, Q., Eberhart, R., & Imai, Y. (2016). Current status of direct pulp-capping materials for permanent teeth. *Dental Materials Journal*, 35(1), 1–12. <https://doi.org/10.4012/DMJ.2015-013>
- Kondiah, P. J., Choonara, Y. E., Kondiah, P. P. D., Marimuthu, T., Kumar, P., Du Toit, L. C., & Pillay, V. (2016). A Review of Injectable Polymeric Hydrogel Systems for Application in Bone Tissue Engineering. *Molecules*, 21(11). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES21111580>

- Konstantinov, I. E. (2000). In search of Alexander A. Maximow: the man behind the unitarian theory of hematopoiesis. *Perspectives in Biology and Medicine*, 43(2), 269–276. <https://doi.org/10.1353/PBM.2000.0006>
- Kristl, J., Pečar, S., Šmid-Korbar, J., & Schara, M. (1991). Molecular motion of drugs in hydrocolloids measured by electron paramagnetic resonance. *Pharmaceutical Research*, 8(4), 505–507. <https://doi.org/10.1023/A:1015859429980>
- Kumari, A., Yadav, S. K., & Yadav, S. C. (2010). Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces*, 75(1), 1–18. <https://doi.org/10.1016/J.COLSURFB.2009.09.001>
- Lambrichta, L., De Berdt, P., Vanacker, J., Leprince, J., Diogenes, A., Goldansaz, H., Bouzin, C., Pr  at, V., Dupont-Gillain, C., & Des Rieux, A. (2014). The type and composition of alginate and hyaluronic-based hydrogels influence the viability of stem cells of the apical papilla. *Dental Materials : Official Publication of the Academy of Dental Materials*, 30(12), e349–e361. <https://doi.org/10.1016/J.DENTAL.2014.08.369>
- Langer, R., & Peppas, N. (1983). Chemical and Physical Structure of Polymers as Carriers for Controlled Release of Bioactive Agents: A Review. *Journal of Macromolecular Science - Reviews in Macromolecular Chemistry and Physics*, 23(1), 61–126. <https://doi.org/10.1080/07366578308079439>
- Li, J., Stachowski, M., & Zhang, Z. (2015). Application of responsive polymers in implantable medical devices and biosensors. *Switchable and Responsive Surfaces and Materials for Biomedical Applications*, 259–298. <https://doi.org/10.1016/B978-0-85709-713-2.00011-0>
- Li, Z., Cao, L., Fan, M., & Xu, Q. (2015). Direct Pulp Capping with Calcium Hydroxide or Mineral Trioxide Aggregate: A Meta-analysis. *Journal of Endodontics*, 41(9), 1412–1417. <https://doi.org/10.1016/J.JOEN.2015.04.012>
- Limjeerajarus, C. N., Chanarattanubol, T., Trongkij, P., Rujiwanichkul, M., & Pavasant, P. (2014). Iloprost induces tertiary dentin formation. *Journal of Endodontics*, 40(11), 1784–1790. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2014.07.002>

- Limjeerajarus, C. N., Kreua-Ongarjnukool, N., Seang, S., Pavasant, P., & Niyomthai, S. T. (2020). Characterization of a thermo-sensitive injectable hydrogel as an iloprost delivery system for dental use. *Key Engineering Materials*, 856 KEM, 391–398. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/KEM.856.391>
- Limjeerajarus, C. N., Osathanon, T., Manokawinchoke, J., & Pavasant, P. (2014). Iloprost up-regulates vascular endothelial growth factor expression in human dental pulp cells in vitro and enhances pulpal blood flow in vivo. *Journal of Endodontics*, 40(7), 925–930. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2013.10.025>
- Limjeerajarus, C. N., Sonntana, S., Pajaree, L., Kansurang, C., Pitt, S., Saowapa, T., & Prasit, P. (2019). Prolonged release of iloprost enhances pulpal blood flow and dentin bridge formation in a rat model of mechanical tooth pulp exposure. *Journal of Oral Science*, 61(1), 73–81. <https://doi.org/10.2334/josnuds.17-0368>
- Lin, L. M., Ricucci, D., Saoud, T. M., Sigurdsson, A., & Kahler, B. (2020). Vital pulp therapy of mature permanent teeth with irreversible pulpitis from the perspective of pulp biology. *Australian Endodontic Journal : The Journal of the Australian Society of Endodontology Inc*, 46(1), 154–166. <https://doi.org/10.1111/AEJ.12392>
- Lin, L. M., Ricucci, D., Saoud, T. M., Sigurdsson, A., Kahler, B., & Louis Lin, C. M. (2019). Vital pulp therapy of mature permanent teeth with irreversible pulpitis from the perspective of pulp biology. <https://doi.org/10.1111/aej.12392>
- Linu, S., Lekshmi, M. S., Varunkumar, V. S., & Sam Joseph, V. G. (2017). Treatment Outcome Following Direct Pulp Capping Using Bioceramic Materials in Mature Permanent Teeth with Carious Exposure: A Pilot Retrospective Study. *Journal of Endodontics*, 43(10), 1635–1639. <https://doi.org/10.1016/J.JOEN.2017.06.017>
- Lipski, M., Nowicka, A., Kot, K., Postek-Stefańska, L., Wysoczańska-Jankowicz, I., Borkowski, L., Andersz, P., Jarząbek, A., Grocholewicz, K., Sobolewska, E., Woźniak, K., & Drożdżik, A. (2018). Factors affecting the outcomes of direct pulp capping using Biodentine. *Clinical Oral Investigations*, 22(5), 2021–2029. <https://doi.org/10.1007/S00784-017-2296-7/FIGURES/1>

- Liu, L., Wu, D., Tu, H., Cao, M., Li, M., Peng, L., & Yang, J. (2023). Applications of Hydrogels in Drug Delivery for Oral and Maxillofacial Diseases. In *Gels* (Vol. 9, Issue 2). MDPI. <https://doi.org/10.3390/gels9020146>
- Loureiro, M. J., Cotrim, C., Simões, O., Miranda, R., Cordeiro, P., & Carrageta, M. (2007). Acute hemodynamic effect of inhaled iloprost in pulmonary artery hypertension evaluated with echocardiography. *Cardiovascular Ultrasound*, 5. <https://doi.org/10.1186/1476-7120-5-41>
- Luan, X., Ito, Y., Dangaria, S., & Diekwisch, T. G. H. (2006). Dental follicle progenitor cell heterogeneity in the developing mouse periodontium. *Stem Cells and Development*, 15(4), 595–608. <https://doi.org/10.1089/SCD.2006.15.595>
- M.A. Fathalla, Z., Vangala, A., Longman, M., Khaled, K. A., Hussein, A. K., El-Garhy, O. H., & Alany, R. G. (2017). Poloxamer-based thermoresponsive ketorolac tromethamine in situ gel preparations: Design, characterisation, toxicity and transcorneal permeation studies. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics : Official Journal of Arbeitsgemeinschaft Fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V*, 114, 119–134. <https://doi.org/10.1016/J.EJPB.2017.01.008>
- Ma, S., Zheng, H., Chen, Y., Zou, J., Zhang, C., & Wang, Y. (2020). Nanocomposite Polymer Hydrogels Reinforced by Carbon Dots and Hectorite Clay. *Journal Wuhan University of Technology, Materials Science Edition*, 35(2), 287–292. <https://doi.org/10.1007/S11595-020-2255-Z/METRICS>
- Maciej Serda, Becker, F. G., Cleary, M., Team, R. M., Holtermann, H., The, D., Agenda, N., Science, P., Sk, S. K., Hinnebusch, R., Hinnebusch A, R., Rabinovich, I., Olmert, Y., Uld, D. Q. G. L. Q., Ri, W. K. H. U., Lq, V., Frxqwu, W. K. H., Zklfk, E., Edvhg, L. V, ... ح, فاطمی. (2015). Quality by design (QbD) for pharmaceutical area. *ISTANBUL JOURNAL OF PHARMACY*, 45(2), 343–354. <https://doi.org/10.2/JQUERY.MIN.JS>
- Maciej Serda, Becker, F. G., Cleary, M., Team, R. M., Holtermann, H., The, D., Agenda, N., Science, P., Sk, S. K., Hinnebusch, R., Hinnebusch A, R., Rabinovich, I., Olmert, Y., Uld, D. Q. G. L. Q., Ri, W. K. H. U., Lq, V., Frxqwu, W. K. H., Zklfk, E., Edvhg, L. V, ... ح, فاطمی. (2021). Current in vitro cytotoxicity tests Güncel In Vitro

- Sitotoksisite Testleri. *Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy*, 41(1), 343–354. <https://doi.org/10.2/JQUERY.MIN.JS>
- Maraldi, T., Riccio, M., Pisciotta, A., Zavatti, M., Carnevale, G., Beretti, F., La Sala, G. B., Motta, A., & De Pol, A. (2013). Human amniotic fluid-derived and dental pulp-derived stem cells seeded into collagen scaffold repair critical-size bone defects promoting vascularization. *Stem Cell Research & Therapy*, 4(3), 53. <https://doi.org/10.1186/SCRT203>
- Matoug-Elwerfelli, M., Nazzal, H., Duggal, M., & El-Gendy, R. (n.d.). WhAt the future holds for regenerAtive endodontiCs: novel AntimiCrobiAls And regenerAtive strAtegies. *European Cells and Materials*, 41, 811–833. <https://doi.org/10.22203/eCM.v041a51>
- Matoug-Elwerfelli, M., Nazzal, H., Duggal, M., & El-Gendy, R. (2021). What the future holds for regenerative endodontics: novel antimicrobials and regenerative strategies. *European Cells & Materials*, 41, 811–833. <https://doi.org/10.22203/ECM.V041A51>
- Matsuura, T., Ziauddin, S. M., Kawata-Matsuura, V. K. S., Sugimoto, K., Yamada, S., & Yoshimura, A. (2021). Long-term clinical and radiographic evaluation of the effectiveness of direct pulp capping materials: A meta-analysis. *Dental Materials Journal*, 40(1), 1–7. <https://doi.org/10.4012/DMJ.2020-043>
- McHugh, N. J., Csuka, M., Watson, H., Belcher, G., Amadi, A., Ring, E. F. J., Black, C. M., & Maddison, P. J. (1988). Infusion of iloprost, a prostacyclin analogue, for treatment of Raynaud's phenomenon in systemic sclerosis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 47(1), 43–47. <https://doi.org/10.1136/ARD.47.1.43>
- McLain, V. C. (2008). Safety assessment of poloxamers 101, 105, 108, 122, 123, 124, 181, 182, 183, 184, 185, 188, 212, 215, 217, 231, 234, 235, 237, 238, 282, 284, 288, 331, 333, 334, 335, 338, 401, 402, 403, and 407, poloxamer 105 benzoate, and poloxamer 182 dibenzoate as used in cosmetics. In *International Journal of Toxicology* (Vol. 27, Issue SUPPL. 2, pp. 93–128). <https://doi.org/10.1080/10915810802244595>
- Melgosa, M. T., Ricci, G. L., García-Pagan, J. C., Blanco, I., Escribano, P., Abrales, J. G., Roca, J., Bosch, J., & Barberà, J. A. (2010). Acute and long-term effects of inhaled

- iloprost in portopulmonary hypertension. *Liver Transplantation*, 16(3), 348–356.
<https://doi.org/10.1002/LT.21997>
- Min, J. H., Ko, S. Y., Cho, Y. B., Ryu, C. J., & Jang, Y. J. (2011). Dentinogenic potential of human adult dental pulp cells during the extended primary culture. *Human Cell*, 24(1), 43–50. <https://doi.org/10.1007/S13577-011-0010-7/FIGURES/5>
- Mitsiadis, T. A., Woloszyk, A., & Jiménez-Rojo, L. (2012). Nanodentistry: combining nanostructured materials and stem cells for dental tissue regeneration. *Nanomedicine (London, England)*, 7(11), 1743–1753. <https://doi.org/10.2217/NNM.12.146>
- Modena, K. C. da S., Casas-Apayco, L. C., Atta, M. T., Costa, C. A. de S., Hebling, J., Sipert, C. R., Navarro, M. F. de L., & Santos, C. F. (2009). Cytotoxicity and biocompatibility of direct and indirect pulp capping materials. *Journal of Applied Oral Science : Revista FOB*, 17(6), 544–554. <https://doi.org/10.1590/S1678-77572009000600002>
- Moharamzadeh, K., Brooki, I. M., & Van Noort, R. (2009). Biocompatibility of Resin-based Dental Materials. *Materials*, 2(2), 514. <https://doi.org/10.3390/MA2020514>
- Moncada, S., Gryglewski, R., Bunting, S., & Vane, J. R. (1976). An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature*, 263(5579), 663–665. <https://doi.org/10.1038/263663A0>
- Moncada, S., & Vane, J. R. (1978). Pharmacology and endogenous roles of prostaglandin endoperoxides, thromboxane A₂, and prostacyclin. *Pharmacological Reviews*, 30(3), 293–331.
- Moore, K. A., & Lemischka, I. R. (2006). Stem cells and their niches. *Science (New York, N.Y.)*, 311(5769), 1880–1885. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1110542>
- Morariu, S., & Nita, L. E. (2011). Temperature Responsive Gels Based on Pluronic F127 and Poly(vinyl alcohol). *Industrial & Engineering Chemistry Research*.
https://www.academia.edu/22787620/Temperature_Responsive_Gels_Based_on_Pluronic_F127_and_Poly_vinyl_alcohol_
- Mullane, E. M., Dong, Z., Sedgley, C. M., Hu, J. C. C., Botero, T. M., Holland, G. R., & Nör, J. E. (2008). Effects of VEGF and FGF2 on the revascularization of severed

- human dental pulps. *Journal of Dental Research*, 87(12), 1144–1148.
<https://doi.org/10.1177/154405910808701204>
- Müller, T., Dürk, T., Blumenthal, B., Herouy, Y., Sorichter, S., Grimm, M., Panther, E., Cicko, S., Norgauer, J., & Idzko, M. (2010). Iloprost has potent anti-inflammatory properties on human monocyte-derived dendritic cells. *Clinical and Experimental Allergy : Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, 40(8), 1214–1221. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2222.2010.03558.X>
- Murray, P. E., Garcia-Godoy, F., & Hargreaves, K. M. (2007). Regenerative endodontics: a review of current status and a call for action. *Journal of Endodontics*, 33(4), 377–390. <https://doi.org/10.1016/J.JOEN.2006.09.013>
- Murray, P. E., Godoy, C. G., & Godoy, F. G. (n.d.-a). *How is the biocompatibility of dental biomaterials evaluated?*
- Murray, P. E., Godoy, C. G., & Godoy, F. G. (n.d.-b). *How is the biocompatibility of dental biomaterials evaluated?*
- Nakalekha, C., Yokoyama, C., Miura, H., Alles, N., Aoki, K., Ohya, K., & Morita, I. (2010). Increased bone mass in adult prostacyclin-deficient mice. *The Journal of Endocrinology*, 204(2), 125–133. <https://doi.org/10.1677/JOE-09-0376>
- Nakashima, M., & Iohara, K. (2011). Regeneration of dental pulp by stem cells. *Advances in Dental Research*, 23(3), 313–319. <https://doi.org/10.1177/0022034511405323>
- Nasseri-Sina, P., Fawthrop, D. J., Wilson, J., Boobis, A. R., & Davies, D. S. (1992). Cytoprotection by iloprost against paracetamol-induced toxicity in hamster isolated hepatocytes. *British Journal of Pharmacology*, 105(2), 417–423.
<https://doi.org/10.1111/J.1476-5381.1992.TB14268.X>
- Nicholson, J. W. (2002). The Chemistry of Medical and Dental Materials. *The Chemistry of Medical and Dental Materials*. <https://doi.org/10.1039/9781847552051>
- Nie, S., Hsiao, W. W., Pan, W., & Yang, Z. (2011). Thermoreversible Pluronic® F127-based hydrogel containing liposomes for the controlled delivery of paclitaxel: in vitro drug release, cell cytotoxicity, and uptake studies. *International Journal of Nanomedicine*, 6(1), 151. <https://doi.org/10.2147/IJN.S15057>

- Nigmatullin, R., Gabrielli, V., Muñoz-García, J. C., Lewandowska, A. E., Harniman, R., Khimyak, Y. Z., Angulo, J., & Eichhorn, S. J. (2019). Thermosensitive supramolecular and colloidal hydrogels via self-assembly modulated by hydrophobized cellulose nanocrystals. *Cellulose*, 26(1), 529–542.
<https://doi.org/10.1007/S10570-018-02225-8/FIGURES/7>
- Niles, A. L., Moravec, R. A., & Riss, T. L. (2009). In vitro viability and cytotoxicity testing and same-well multi-parametric combinations for high throughput screening. *Current Chemical Genomics*, 3(1), 33–41.
<https://doi.org/10.2174/1875397300903010033>
- Niu, Q. X., Zhao, C. Y., & Jing, Z. A. (2001). An evaluation of the colorimetric assays based on enzymatic reactions used in the measurement of human natural cytotoxicity. *Journal of Immunological Methods*, 251(1–2), 11–19. [https://doi.org/10.1016/S0022-1759\(01\)00314-3](https://doi.org/10.1016/S0022-1759(01)00314-3)
- Norouzi, M., Nazari, B., & Miller, D. W. (2016). Injectable hydrogel-based drug delivery systems for local cancer therapy. *Drug Discovery Today*, 21(11), 1835–1849.
<https://doi.org/10.1016/J.DRUDIS.2016.07.006>
- Öcal, F., & Dayı, B. (2022). *DİŞ PULPA KUAFASI TEDAVİSİNDE KULLANILAN VE KULLANIM POTANSİYELİNE SAHİP MATERYALLER: DERLEME*.
<https://doi.org/10.48623/APERTA.263083>
- Okiji, T., Morita, I., Sunada, I., & Murota, S. (1989). Involvement of arachidonic acid metabolites in increases in vascular permeability in experimental dental pulpal inflammation in the rat. *Archives of Oral Biology*, 34(7), 523–528.
[https://doi.org/10.1016/0003-9969\(89\)90090-3](https://doi.org/10.1016/0003-9969(89)90090-3)
- Okiji, T., & Yoshida, K. (2009). Reparative Dentinogenesis Induced by Mineral Trioxide Aggregate: A Review from the Biological and Physicochemical Points of View. *International Journal of Dentistry*, 2009(1), 464280.
<https://doi.org/10.1155/2009/464280>
- Osmond, M. J., & Krebs, M. D. (2021). *Tunable chitosan-calcium phosphate composites as cell-instructive dental pulp capping agents*.
<https://doi.org/10.1080/09205063.2021.1925390>

- Outhwaite, W. C., Mckenzie, D. M., & Pashley, D. H. (1974). A versatile split-chamber device for studying dentin permeability. *Journal of Dental Research*, 53(6), 1503. <https://doi.org/10.1177/00220345740530064101>
- Öztürk, K., Eroğlu, H., & Çalış, S. (2018). Novel advances in targeted drug delivery. *Journal of Drug Targeting*, 26(8), 633–642. <https://doi.org/10.1080/1061186X.2017.1401076>
- Pagano, C., Giovagnoli, S., Perioli, L., Tiralti, M. C., & Ricci, M. (2020). Development and characterization of mucoadhesive-thermoresponsive gels for the treatment of oral mucosa diseases. *European Journal of Pharmaceutical Sciences : Official Journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, 142. <https://doi.org/10.1016/J.EJPS.2019.105125>
- Page-McCaw, A., Ewald, A. J., & Werb, Z. (2007). Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 8(3), 221–233. <https://doi.org/10.1038/NRM2125>
- Patel, N., Ji, N., Wang, Y., Li, X., Langley, N., & Tan, C. (2021). Subcutaneous Delivery of Albumin: Impact of Thermosensitive Hydrogels. *AAPS PharmSciTech*, 22(3). <https://doi.org/10.1208/S12249-021-01982-3>
- Peskersoy, C., Lukarcanin, J., & Turkun, M. (2021). Efficacy of different calcium silicate materials as pulp-capping agents: Randomized clinical trial. *Journal of Dental Sciences*, 16(2), 723–731. <https://doi.org/10.1016/J.JDS.2020.08.016>
- Pizzoferrato, A., Ciapetti, G., Stea, S., Cenni, E., Arciola, C. R., Granchi, D., & Lucia. (1994). Cell culture methods for testing biocompatibility. *Clinical Materials*, 15(3). [https://doi.org/10.1016/0267-6605\(94\)90081-7](https://doi.org/10.1016/0267-6605(94)90081-7)
- Poggio, C., Arciola, C. R., Beltrami, R., Monaco, A., Dagna, A., Lombardini, M., & Visai, L. (2014). Cytocompatibility and antibacterial properties of capping materials. *TheScientificWorldJournal*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/181945>
- Qiao, N., Zhang, Y., Fang, Y., Deng, H., Zhang, D., Lin, H., Chen, Y., Yong, K. T., & Xiong, J. (2022). Silk Fabric Decorated with Thermo-Sensitive Hydrogel for Sustained Release of Paracetamol. *Macromolecular Bioscience*, 22(8). <https://doi.org/10.1002/MABI.202200029>

- Rademaker, M., Cooke, E. D., Almond, N. E., Beacham, J. A., Smith, R. E., Mant, T. G. K., & Kirby, J. D. (1989). Comparison of intravenous infusions of iloprost and oral nifedipine in treatment of Raynaud's phenomenon in patients with systemic sclerosis: a double blind randomised study. *British Medical Journal*, 298(6673), 561–564. <https://doi.org/10.1136/BMJ.298.6673.561>
- Rahimnejad, M., & Zhong, W. (2017). Mussel-inspired hydrogel tissue adhesives for wound closure. *RSC Advances*, 7(75), 47380–47396. <https://doi.org/10.1039/C7RA06743G>
- Rahman, M. R., Shill, D. K., Kumar, U., Monjur, A. S. M., Hossain, A., Chandra Bachar, S., Shara, A., & Rouf, S. (2023). Formulation and Evaluation of Ledipasvir Nano-suspension Through QbD Approach. *Dhaka University Journal of Pharmaceutical Sciences*, 22(2), 173–188. <https://doi.org/10.3329/DUJPS.V22I2.69324>
- Ramalho-Santos, M., & Willenbring, H. (2007). On the origin of the term “stem cell.” *Cell Stem Cell*, 1(1), 35–38. <https://doi.org/10.1016/J.STEM.2007.05.013>
- Rapalli, V. K., Banerjee, S., Khan, S., Jha, P. N., Gupta, G., Dua, K., Hasnain, M. S., Nayak, A. K., Dubey, S. K., & Singhvi, G. (2021). QbD-driven formulation development and evaluation of topical hydrogel containing ketoconazole loaded cubosomes. *Materials Science & Engineering. C, Materials for Biological Applications*, 119. <https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2020.111548>
- Raspini, G., Wolff, J., Helminen, M., Raspini, G., Raspini, M., & Sándor, G. K. (2018). Dental Stem Cells Harvested from Third Molars Combined with Bioactive Glass Can Induce Signs of Bone Formation In Vitro. *Journal of Oral & Maxillofacial Research*, 9(1), e2. <https://doi.org/10.5037/JOMR.2018.9102>
- Rescignano, N., Fortunati, E., Montesano, S., Emiliani, C., Kenny, J. M., Martino, S., & Armentano, I. (2014). PVA bio-nanocomposites: a new take-off using cellulose nanocrystals and PLGA nanoparticles. *Carbohydrate Polymers*, 99, 47–58. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2013.08.061>
- Reyes-Carmona, J. F., Santos, A. S., Figueiredo, C. P., Baggio, C. H., Felipe, M. C. S., Felipe, W. T., & Cordeiro, M. M. (2010). Host–Mineral Trioxide Aggregate

- Inflammatory Molecular Signaling and Biomineralization Ability. *Journal of Endodontics*, 36(8), 1347–1353. <https://doi.org/10.1016/J.JOEN.2010.04.029>
- Ricucci, D., Siqueira, J. F., Li, Y., & Tay, F. R. (2019). Vital pulp therapy: histopathology and histobacteriology-based guidelines to treat teeth with deep caries and pulp exposure. *Journal of Dentistry*, 86, 41–52. <https://doi.org/10.1016/J.JDENT.2019.05.022>
- Roberts-Clark, D. J., & Smith, A. J. (2000). Angiogenic growth factors in human dentine matrix. *Archives of Oral Biology*, 45(11), 1013–1016. [https://doi.org/10.1016/S0003-9969\(00\)00075-3](https://doi.org/10.1016/S0003-9969(00)00075-3)
- Rombouts, C., Giraud, T., Jeanneau, C., & About, I. (2017). Pulp Vascularization during Tooth Development, Regeneration, and Therapy. *Journal of Dental Research*, 96(2), 137–144. <https://doi.org/10.1177/0022034516671688>
- Rosa, V., Xie, H., Dubey, N., Madanagopal, T. T., Rajan, S. S., Morin, J. L. P., Islam, I., & Castro Neto, A. H. (2016). Graphene oxide-based substrate: physical and surface characterization, cytocompatibility and differentiation potential of dental pulp stem cells. *Dental Materials : Official Publication of the Academy of Dental Materials*, 32(8), 1019–1025. <https://doi.org/10.1016/J.DENTAL.2016.05.008>
- Russo, E., & Villa, C. (2019). Poloxamer hydrogels for biomedical applications. In *Pharmaceutics* (Vol. 11, Issue 12). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11120671>
- Saghiri, M. A., Asatourian, A., Sorenson, C. M., & Sheibani, N. (2015). Role of Angiogenesis in Endodontics: Contributions of Stem Cells and Proangiogenic and Antiangiogenic Factors to Dental Pulp Regeneration. *Journal of Endodontics*, 41(6), 797–803. <https://doi.org/10.1016/J.JOEN.2014.12.019>
- Sakaguchi, R., & Powers, J. (2012). Craig's Restorative Dental Materials. In *Craig's Restorative Dental Materials*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/C2010-0-65754-3>
- Saleem, A., Din, F. ud, Ali, Z., Zahid, F., Alamri, A. H., Lahiq, A. A., Alqahtani, T., & Alharbi, H. M. (2024). Development and evaluation of regorafenib loaded liquid suppository for rectal delivery: In vitro, in vivo analyses. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 91, 105239. <https://doi.org/10.1016/J.JDDST.2023.105239>

- Samiei, M., Fathi, M., Barar, J., Fathi, N., Amiryaghoubi, N., & Omid, Y. (2021). Bioactive hydrogel-based scaffolds for the regeneration of dental pulp tissue. In *Journal of Drug Delivery Science and Technology* (Vol. 64). Editions de Sante. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2021.102600>
- Sarkar, N. K., Caicedo, R., Ritwik, P., Moiseyeva, R., & Kawashima, I. (2005). Physicochemical Basis of the Biologic Properties of Mineral Trioxide Aggregate. *Journal of Endodontics*, 31(2), 97–100. <https://doi.org/10.1097/01.DON.0000133155.04468.41>
- Sasaki, T., & Kawamata-Kido, H. (1995). Providing an environment for reparative dentine induction in amputated rat molar pulp by high molecular-weight hyaluronic acid. *Archives of Oral Biology*, 40(3), 209–219. [https://doi.org/10.1016/0003-9969\(95\)98810-L](https://doi.org/10.1016/0003-9969(95)98810-L)
- Schillinger, E., Kraiss, T., Lehmann, M., & Stock, G. (1986). Iloprost. *Cardiovascular Drug Reviews*, 4(1), 209–231. <https://doi.org/10.1111/J.1527-3466.1986.TB00495.X>
- Schmalz, G. (2006). Thermo- and pH-responsive polymers in drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58(15), 1655–1670. <https://doi.org/10.1016/J.ADDR.2006.09.020>
- Schmalz, G. (1994). Use of cell cultures for toxicity testing of dental materials--advantages and limitations. *Journal of Dentistry*, 22 Suppl 2(SUPPL. 2), S6. [https://doi.org/10.1016/0300-5712\(94\)90032-9](https://doi.org/10.1016/0300-5712(94)90032-9)
- Schmalz, G. (1997). Concepts in biocompatibility testing of dental restorative materials. *Clinical Oral Investigations*, 1(4), 154–162. <https://doi.org/10.1007/S007840050027>
- Schmalz, G., & Smith, A. J. (2014). Pulp development, repair, and regeneration: challenges of the transition from traditional dentistry to biologically based therapies. *Journal of Endodontics*, 40(4 Suppl). <https://doi.org/10.1016/J.JOEN.2014.01.018>
- Schmalz, G., Widbiller, M., & Galler, K. M. (2020). Clinical Perspectives of Pulp Regeneration. *Journal of Endodontics*, 46(9), S161–S174. <https://doi.org/10.1016/J.JOEN.2020.06.037>

- Schnell, C. N., Galván, M. V., Zanuttini, M. A., & Mocchiutti, P. (2020). Hydrogels from xylan/chitosan complexes for the controlled release of diclofenac sodium. *Cellulose*, 27(3), 1465–1481. <https://doi.org/10.1007/S10570-019-02850-X>
- Schröder, U. (1985). Effects of calcium hydroxide-containing pulp-capping agents on pulp cell migration, proliferation, and differentiation. *Journal of Dental Research*, 64 Spec No, 541–548. <https://doi.org/10.1177/002203458506400407>
- Schwendicke, F., Brouwer, F., Schwendicke, A., & Paris, S. (2016). Different materials for direct pulp capping: systematic review and meta-analysis and trial sequential analysis. *Clinical Oral Investigations*, 20(6), 1121–1132. <https://doi.org/10.1007/S00784-016-1802-7/TABLES/3>
- Schwendicke, F., Dörfer, C. E., & Paris, S. (2013). Incomplete caries removal: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Dental Research*, 92(4), 306–314. <https://doi.org/10.1177/0022034513477425>
- Schwendicke, F., Frencken, J. E., Bjørndal, L., Maltz, M., Manton, D. J., Ricketts, D., Van Landuyt, K., Banerjee, A., Campus, G., Doméjean, S., Fontana, M., Leal, S., Lo, E., Machiulskiene, V., Schulte, A., Splieth, C., Zandona, A. F., & Innes, N. P. T. (2016). Managing Carious Lesions. *Http://Dx.Doi.Org/10.1177/0022034516639271*, 28(2), 58–67. <https://doi.org/10.1177/0022034516639271>
- Seang, S., Pavasant, P., Everts, V., & Limjeearajarus, C. N. (2019). Prostacyclin Analog Promotes Human Dental Pulp Cell Migration via a Matrix Metalloproteinase 9–related Pathway. *Journal of Endodontics*, 45(7), 873–881. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2019.03.020>
- Seang, S., Pavasant, P., & Limjeearajarus, C. N. (2018). Iloprost Induces Dental Pulp Angiogenesis in a Growth Factor–free 3-Dimensional Organ Culture System. *Journal of Endodontics*, 44(5), 759–764.e2. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2018.02.001>
- Shabbir, J., Farooq, I., Ali, S., Mohammed, F., Bugshan, A., Khurram, S. A., & Khan, E. (2021). Dental Pulp. *An Illustrated Guide to Oral Histology*, 69–79. <https://doi.org/10.1002/9781119669616.CH5>
- Shankar, N. B., Kumar, R. P., Kumar, N. U., & Brata, B. B. (2010). Development and Characterization of Bioadhesive Gel of Microencapsulated Metronidazole for Vaginal

- Use. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research : IJPR*, 9(3), 209.
<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3863435/>
- Sharma, L. A., & Love, R. M. (2019). Scaffolds for regeneration of the pulp-dentine complex. *Handbook of Tissue Engineering Scaffolds: Volume One*, 459–478.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102563-5.00022-8>
- Silva, A. R. S. T., Costa, A. M. B., Jain, S., Severino, P., Scher, R., Nunes, R. S., Souto, E. B., & Dolabella, S. S. (2023). 3-Carene-loaded poloxamer micelles against Leishmania: Development, characterization and in vitro proof-of-concept. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 82, 104376.
<https://doi.org/10.1016/J.JDDST.2023.104376>
- Sinjari, B., Pizzicannella, J., D'Aurora, M., Zappacosta, R., Gatta, V., Fontana, A., Trubiani, O., & Diomedea, F. (2019). Curcumin/Liposome Nanotechnology as Delivery Platform for Anti-inflammatory Activities via NFκB/ERK/pERK Pathway in Human Dental Pulp Treated With 2-HydroxyEthyl MethAcrylate (HEMA). *Frontiers in Physiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/FPHYS.2019.00633>
- Składanowski, M., Golinska, P., Rudnicka, K., Dahm, H., & Rai, M. (2016). Evaluation of cytotoxicity, immune compatibility and antibacterial activity of biogenic silver nanoparticles. *Medical Microbiology and Immunology*, 205(6), 603–613.
<https://doi.org/10.1007/S00430-016-0477-7>
- Stetsyshyn, Y., Raczowska, J., Harhay, K., Gajos, K., Melnyk, Y., Dąbczyński, P., Shevtsova, T., & Budkowski, A. (2020). Temperature-responsive and multi-responsive grafted polymer brushes with transitions based on critical solution temperature: synthesis, properties, and applications. *Colloid and Polymer Science* 2020 299:3, 299(3), 363–383. <https://doi.org/10.1007/S00396-020-04750-0>
- Stitham, J., Midgett, C., Martin, K. A., & Hwa, J. (2011). Prostacyclin: An Inflammatory Paradox. *Frontiers in Pharmacology*, 2. <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2011.00024>
- Strojny-Cieślak, B., Jaworski, S., Wierzbicki, M., Pruchniewski, M., Sosnowska-Ławnicka, M., Szczepaniak, J., Lange, A., Koczoń, P., Zielińska-Górska, M., & Chwalibóg, E. S. (2023). The cytocompatibility of graphene oxide as a platform to enhance the effectiveness and safety of silver nanoparticles through in vitro studies.

- Environmental Science and Pollution Research*, 31(60), 67317–67338.
<https://doi.org/10.1007/S11356-023-30151-1/FIGURES/17>
- Stuart, K. G., Miller, C. H., Brown, C. E., & Newton, C. W. (1991). The comparative antimicrobial effect of calcium hydroxide. *Oral Surgery, Oral Medicine, and Oral Pathology*, 72(1), 101–104. [https://doi.org/10.1016/0030-4220\(91\)90198-L](https://doi.org/10.1016/0030-4220(91)90198-L)
- Sugiaman, V. K., Jeffrey, Naliani, S., Pranata, N., Djuanda, R., & Saputri, R. I. (2023). Polymeric Scaffolds Used in Dental Pulp Regeneration by Tissue Engineering Approach. *Polymers* 2023, Vol. 15, Page 1082, 15(5), 1082.
<https://doi.org/10.3390/POLYM15051082>
- Sui, B., Wu, D., Xiang, L., Fu, Y., Kou, X., & Shi, S. (2020). Dental Pulp Stem Cells: From Discovery to Clinical Application. *Journal of Endodontics*, 46(9S), S46–S55.
<https://doi.org/10.1016/J.JOEN.2020.06.027>
- Szymanska, M., & Blitek, A. (2023). Diverse effects of prostacyclin on angiogenesis-related processes in the porcine endometrium. *Scientific Reports* 2023 13:1, 13(1), 1–17. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-41197-z>
- Tavelli, L., McGuire, M. K., Zucchelli, G., Rasperini, G., Feinberg, S. E., Wang, H. L., & Giannobile, W. V. (2020). Extracellular matrix-based scaffolding technologies for periodontal and peri-implant soft tissue regeneration. *Journal of Periodontology*, 91(1), 17–25. <https://doi.org/10.1002/JPER.19-0351>
- Tentor, F. R., de Oliveira, J. H., Scariot, D. B., Lazarin-Bidóia, D., Bonafé, E. G., Nakamura, C. V., Venter, S. A. S., Monteiro, J. P., Muniz, E. C., & Martins, A. F. (2017). Scaffolds based on chitosan/pectin thermosensitive hydrogels containing gold nanoparticles. *International Journal of Biological Macromolecules*, 102, 1186–1194.
<https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2017.04.106>
- Thumsing, S., Israsena, N., Boonkrai, C., & Supaphol, P. (2014). Preparation of bioactive glycosylated glial cell-line derived neurotrophic factor-loaded microspheres for medical applications. *Journal of Applied Polymer Science*, 131(8).
<https://doi.org/10.1002/APP.40168>
- Tinazzi, E., Dolcino, M., Puccetti, A., Rigo, A., Beri, R., Valenti, M. T., Corrocher, R., & Lunardi, C. (2010). Gene expression profiling in circulating endothelial cells from

- systemic sclerosis patients shows an altered control of apoptosis and angiogenesis that is modified by iloprost infusion. *Arthritis Research and Therapy*, 12(4), 1–15.
<https://doi.org/10.1186/AR3069/FIGURES/2>
- Tonnesen, M. G., Feng, X., & Clark, R. A. F. (2000). Angiogenesis in Wound Healing. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*, 5(1), 40–46.
<https://doi.org/10.1046/J.1087-0024.2000.00014.X>
- Tran, X. V., Salehi, H., Truong, M. T., Sandra, M., Sadoine, J., Jacquot, B., Cuisinier, F., Chaussain, C., & Boukpepsi, T. (2019). Reparative Mineralized Tissue Characterization after Direct Pulp Capping with Calcium-Silicate-Based Cements. *Materials*, 12(13). <https://doi.org/10.3390/MA12132102>
- Tran-Hung, L., Mathieu, S., & About, I. (2006). Role of Human Pulp Fibroblasts in Angiogenesis. *Http://Dx.Doi.Org/10.1177/154405910608500908*, 85(9), 819–823.
<https://doi.org/10.1177/154405910608500908>
- Tsutsui, T. W. (2020). Dental Pulp Stem Cells: Advances to Applications. *Stem Cells and Cloning : Advances and Applications*, 13, 33–42.
<https://doi.org/10.2147/SCCAA.S166759>
- Tziafas, D., Kalyva, M., & Papadimitriou, S. (2002). Experimental dentin-based approaches to tissue regeneration in vital pulp therapy. *Connective Tissue Research*, 43(2–3), 391–395. <https://doi.org/10.1080/03008200290001014>
- Uhrich, K. E., Cannizzaro, S. M., Langer, R. S., & Shakesheff, K. M. (1999). Polymeric systems for controlled drug release. *Chemical Reviews*, 99(11), 3181–3198.
<https://doi.org/10.1021/CR940351U>
- Velázquez, N. S., Turino, L. N., Luna, J. A., & Mengatto, L. N. (2019). Progesterone loaded thermosensitive hydrogel for vaginal application: Formulation and in vitro comparison with commercial product. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 27(8), 1096–1106. <https://doi.org/10.1016/J.JSPS.2019.09.006>
- Vidal, M. N. P., Granjeiro, J. M., Vidal, M. N. P., & Granjeiro, J. M. (2017). Cytotoxicity Tests for Evaluating Medical Devices: An Alert for the Development of Biotechnology Health Products. *Journal of Biomedical Science and Engineering*, 10(9), 431–443. <https://doi.org/10.4236/JBISE.2017.109033>

- Wahyudi, R., Seang, S., Everts, V., Osathanon, T., & Limjeerajarus, C. N. (2023). Anti-inflammatory effects of the prostacyclin analogue iloprost in an in vitro model of inflamed human dental pulp cells. *Australian Endodontic Journal*, 49(S1), 330–338. <https://doi.org/10.1111/aej.12736>
- Wang, F., Li, Z., Gan, X. yue, Lu, X. ling, Jiao, B. hua, & Shen, M. hua. (2023). Quality by design driven development and evaluation of thermosensitive hydrogel loaded with IgY and LL37-SLNs to combat experimental periodontitis. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 185, 106444. <https://doi.org/10.1016/J.EJPS.2023.106444>
- Wang, M. T., Honn, K. V., & Nie, D. (2007). Cyclooxygenases, prostanoids, and tumor progression. *Cancer Metastasis Reviews*, 26(3–4), 525–534. <https://doi.org/10.1007/S10555-007-9096-5>
- Wang, Q., Zuo, Z., Cheung, C. K. C., & Leung, S. S. Y. (2019). Updates on thermosensitive hydrogel for nasal, ocular and cutaneous delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 559, 86–101. <https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2019.01.030>
- Wang, R., Li, N., Jiang, B., Li, J., Hong, W., & Jiao, T. (2021). Facile preparation of agar/polyvinyl alcohol-based triple-network composite hydrogels with excellent mechanical performances. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 615, 126270. <https://doi.org/10.1016/J.COLSURFA.2021.126270>
- Wang, X., Wang, J., Wu, W., & Li, H. (2016). Vaginal delivery of carboplatin-loaded thermosensitive hydrogel to prevent local cervical cancer recurrence in mice. *Drug Delivery*, 23(9), 3544–3551. <https://doi.org/10.1080/10717544.2016.1205158>
- Wataha, J. C. (2001). Principles of biocompatibility for dental practitioners. *The Journal of Prosthetic Dentistry*, 86(2), 203–209. <https://doi.org/10.1067/MPR.2001.117056>
- Wataha, J. C., Rueggeberg, F. A., Lapp, C. A., Lewis, J. B., Lockwood, P. E., Ergle, J. W., & Mettenberg, D. J. (1999). In vitro cytotoxicity of resin-containing restorative materials after aging in artificial saliva. *Clinical Oral Investigations*, 3(3), 144–149. <https://doi.org/10.1007/S007840050093>

- Webber, M. J., Tongers, J., Newcomb, C. J., Marquardt, K. T., Bauersachs, J., Losordo, D. W., & Stupp, S. I. (2011). Supramolecular nanostructures that mimic VEGF as a strategy for ischemic tissue repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(33), 13438–13443.
<https://doi.org/10.1073/PNAS.1016546108>
- Wennberg, A., Mjör, I. A., & Hensten-Pettersen, A. (1983). Biological evaluation of dental restorative materials—a comparison of different test methods. *Journal of Biomedical Materials Research*, 17(1), 23–36. <https://doi.org/10.1002/JBM.820170103>
- Whitehouse, L. L. E., Thomson, N. H., Do, T., & Feichtinger, G. A. (2021). BIOACTIVE MOLECULES FOR REGENERATIVE PULP CAPPING. In *European Cells and Materials* (Vol. 42, pp. 415–437). AO Research Institute Davos.
<https://doi.org/10.22203/eCM.v042a26>
- Wichterle, O., & Lim, D. (1960). Hydrophilic Gels for Biological Use. *Nature* 1960 185:4706, 185(4706), 117–118. <https://doi.org/10.1038/185117a0>
- Widbiller, M., & Schmalz, G. (2021). Endodontic regeneration: hard shell, soft core. In *Odontology* (Vol. 109, Issue 2, pp. 303–312). Springer Japan.
<https://doi.org/10.1007/s10266-020-00573-1>
- Wu, K. K., & Liou, J. Y. (2005). Cellular and molecular biology of prostacyclin synthase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 338(1), 45–52.
<https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2005.08.021>
- Wu, S., Zhou, Y., Yu, Y., Zhou, X., Du, W., Wan, M., Fan, Y., Zhou, X., Xu, X., Zheng, L., & Yu, J. (2019). *Evaluation of Chitosan Hydrogel for Sustained Delivery of VEGF for Odontogenic Differentiation of Dental Pulp Stem Cells*.
<https://doi.org/10.1155/2019/1515040>
- Xiong, Y., Huo, Y., Chen, C., Zeng, H., Lu, X., Wei, C., Ruan, C., Zhang, X., Hu, Z., Shibuya, M., & Luo, J. (2009). Vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor-2 tyrosine 1175 signaling controls VEGF-induced von Willebrand factor release from endothelial cells via phospholipase C-gamma 1- and protein kinase A-dependent pathways. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(35), 23217–23224.
<https://doi.org/10.1074/JBC.M109.019679>

- Xu, S., Du, J., Jia, B., Huang, M., Huang, Y., Liu, H., Tang, Z., Chen, Y., & Huang, Z. (2022). Hydrogels for the treatment of oral and maxillofacial diseases: current research, challenges, and future directions *Biomaterials Science REVIEW Hydrogels for the treatment of oral and maxillofacial diseases: current research, challenges, and future directions. Cite This: Biomater. Sci*, 10, 6413. <https://doi.org/10.1039/d2bm01036d>
- Xu, W. K., Tang, J. Y., Yuan, Z., Cai, C. Y., Chen, X. Bin, Cui, S. Q., Liu, P., Yu, L., Cai, K. Y., & Ding, J. D. (2019). Accelerated Cutaneous Wound Healing Using an Injectable Teicoplanin-loaded PLGA-PEG-PLGA Thermogel Dressing. *Chinese Journal of Polymer Science (English Edition)*, 37(6), 548–559. <https://doi.org/10.1007/S10118-019-2212-5/METRICS>
- Xu, Z., Han, S., Gu, Z., & Wu, J. (2020). Advances and Impact of Antioxidant Hydrogel in Chronic Wound Healing. *Advanced Healthcare Materials*, 9(5), 1901502. <https://doi.org/10.1002/ADHM.201901502>
- Yang, J., Liu, F., Zhou, C., Li, H., Yang, G., Fang, S., Lee, I. S., Liu, Y., Bai, H., & Chen, C. (2023). 3D printed porous titanium filled with mineralized UV-responsive chitosan hydrogel promotes cell proliferation and osteogenesis in vitro. *Journal of Materials Science & Technology*, 142, 34–44. <https://doi.org/10.1016/J.JMST.2022.10.008>
- Yang, Y., Zhu, H., Tsai, Y. T., Bai, L., & Deng, J. (2016). Study on the Thermal Stability of Thermosensitive Hydrogel. *Procedia Engineering*, 135, 501–509. <https://doi.org/10.1016/J.PROENG.2016.01.162>
- Yigitaslan, S., & Sirmagul, B. (2012). Relation of Bosentan, Iloprost, and Sildenafil with Growth Factor Levels in Monocrotaline-Induced Pulmonary Hypertension. *Clinical and Experimental Hypertension*, 34(3), 222–229. <https://doi.org/10.3109/10641963.2011.631652>
- Yıldırım, Z. S., Pınar Bakır, E., Bakır, Ş., & Aydın, S. (n.d.). *Diş hekimliğinde biyouyumluluk ve değerlendirme yöntemleri*. <https://doi.org/10.15311/selcukdentj>
- Yong, D., & Cathro, P. (2021). *Conservative pulp therapy in the management of reversible and irreversible pulpitis*. <https://doi.org/10.1111/adj.12841>

- Yu, L. X., Amidon, G., Khan, M. A., Hoag, S. W., Polli, J., Raju, G. K., & Woodcock, J. (2014). Understanding pharmaceutical quality by design. *The AAPS Journal*, 16(4), 771–783. <https://doi.org/10.1208/S12248-014-9598-3>
- Yu, L., Zhang, Z., Zhang, H., & Ding, J. (2009). Mixing a sol and a precipitate of block copolymers with different block ratios leads to an injectable hydrogel. *Biomacromolecules*, 10(6), 1547–1553. <https://doi.org/10.1021/BM900145G>
- Yun, S., Budatha, M., Dahlman, J. E., Coon, B. G., Cameron, R. T., Langer, R., Anderson, D. G., Baillie, G., & Schwartz, M. A. (2016). Interaction between integrin $\alpha 5$ and PDE4D regulates endothelial inflammatory signalling. *Nature Cell Biology* 2016 18:10, 18(10), 1043–1053. <https://doi.org/10.1038/ncb3405>
- Zakrzewski, W., Dobrzyński, M., Szymonowicz, M., & Rybak, Z. (2019). Stem cells: Past, present, and future. *Stem Cell Research and Therapy*, 10(1), 1–22. <https://doi.org/10.1186/S13287-019-1165-5/FIGURES/8>
- Zanetta, L., Marcus, S. G., Vasile, J., Dobryansky, M., Cohen, H., Eng, K., Shamamian, P., & Mignatti, P. (2000). Expression of von Willebrand factor, an endothelial cell marker, is up-regulated by angiogenesis factors: A potential method for objective assessment of tumor angiogenesis. *International Journal of Cancer*, 85(2), 281–288. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0215\(20000115\)85:2<281::AID-IJC21>3.0.CO;2-3](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0215(20000115)85:2<281::AID-IJC21>3.0.CO;2-3)
- Zarrintaj, P., Ramsey, J. D., Samadi, A., Atoufi, Z., Yazdi, M. K., Ganjali, M. R., Amirabad, L. M., Zangene, E., Farokhi, M., Formela, K., Saeb, M. R., Mozafari, M., & Thomas, S. (2020). Poloxamer: A versatile tri-block copolymer for biomedical applications. *Acta Biomaterialia*, 110, 37–67. <https://doi.org/10.1016/J.ACTBIO.2020.04.028>
- Zeng, N., Mignet, N., Dumortier, G., Olivier, E., Seguin, J., Maury, M., Scherman, D., Rat, P., & Boudy, V. (2015). Poloxamer bioadhesive hydrogel for buccal drug delivery: Cytotoxicity and trans-epithelial permeability evaluations using TR146 human buccal epithelial cell line. *International Journal of Pharmaceutics*, 495(2), 1028–1037. <https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2015.09.045>

- Zhang, S., Yang, X., & Fan, M. (2013). BioAggregate and iRoot BP Plus optimize the proliferation and mineralization ability of human dental pulp cells. *International Endodontic Journal*, 46(10), 923–929. <https://doi.org/10.1111/IEJ.12082>
- Zhang, W., Frank Walboomers, X., van Kuppevelt, T. H., Daamen, W. F., Bian, Z., & Jansen, J. A. (2006). The performance of human dental pulp stem cells on different three-dimensional scaffold materials. *Biomaterials*, 27(33), 5658–5668. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2006.07.013>
- Zhang, Z., Chen, H., Shen, W., Deng, J., Bai, C., Xiao, Y., & Lyu, L. (2022). Localized delivery of curcumin by thermosensitive hydrogels for promoting wound healing. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 21(10), 5081–5091. <https://doi.org/10.1111/JOCD.14967>
- Zhou, W., Hashimoto, K., Goleniewska, K., O’Neal, J. F., Ji, S., Blackwell, T. S., FitzGerald, G. A., Egan, K. M., Geraci, M. W., & Peebles, R. S. (2007). Prostaglandin I2 analogs inhibit proinflammatory cytokine production and T cell stimulatory function of dendritic cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 178(2), 702–710. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.178.2.702>
- Zhu, L., Yang, J., Zhang, J., & Peng, B. (2014). A Comparative Study of BioAggregate and ProRoot MTA on Adhesion, Migration, and Attachment of Human Dental Pulp Cells. *Journal of Endodontics*, 40(8), 1118–1123. <https://doi.org/10.1016/J.JOEN.2013.12.028>
- Zhu, Y., Liu, Y., Zhou, W., Xiang, R., Jiang, L., Huang, K., Xiao, Y., Guo, Z., & Gao, J. (2010). A prostacyclin analogue, iloprost, protects from bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Respiratory Research*, 11(1), 1–12. https://doi.org/10.1186/1465-9921-11-34/FIGURES/7_877

EK A

ETİK KURUL KARAR YAZISI

Evrak Tarih ve Sayısı: 20.08.2024-73176

ALTINBAŞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ BİLİMSEL ARAŞTIRMA ETİK KURULU

Sayı: 20

Tarih: 09.08.2024

Konu: Prof. Dr. Figen Seymen

Sayın Prof. Dr. Figen Seymen
Altınbaş Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi

İlgi: Altınbaş Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Çocuk Diş Hekimliği ABD Başkanlığının 22.07.2024 tarihli yazısı ile Altınbaş Üniversitesi Sağlık Bilimleri Bilimsel Araştırma Etik Kurulunun 2024/24 sayılı yazısı.

Sorumlu araştırmacılığını üstlendiğiniz ve yardımcı araştırmacılığını Dt. Feyza Işık'ın yaptığı 2024/24 dosya numaralı "Tasarım alan yolu ile oluşturulan iloprost-termosensitif jelin dental pulpa kök hücreleri üzerindeki etkilerinin in-vitro incelenmesi" başlıklı çalışma, kurumumuzun 08 Ağustos 2024 tarih ve 1 sayılı toplantısında görüşülerek etik yönden uygun bulunmuş olup, tutanaklar ekte sunulmuştur.

Bilgilerinize sunarım.

Prof. Dr. Mustafa Aydın BARLAS

Sağlık Bilimleri Bilimsel Araştırma

Etik Kurul Başkanı

E-İmzalıdır

Eki: Altınbaş Üniversitesi Sağlık Bilimleri Bilimsel Araştırma Etik Kurulu Karar Formu

Bu belge, 5070 sayılı Elektronik İmza Kanununa göre Güvenli Elektronik İmza ile imzalanmıştır.
Evrak sorgulaması: <https://www.turkiye.gov.tr/altinbas-universitesi-ebys?eD=BSC3M2CSVZ&eS=73176> adresinden yapılabilir.

ALTINBAŞ ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ BİLİMSEL ARAŞTIRMA ETİK KURULU KARAR FORMU

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	"Tasarım alan yolu ile oluşturulan İoprost-termosensitif jelin dental pulpa kök hücreleri üzerindeki etkilerinin in-vitro incelenmesi"		
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU	2024/24		
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof. Dr. Figen Seymen (Dt. Feyza Işık)		
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Çocuk Diş Hekimliği		
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Altınbaş Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi		
	ARAŞTIRMANIN TÜRÜ	Anket ☐ Bilimsel araştırma ☒ Diğer ise belirtiniz: TEZ		
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☐	ÇOK MERKEZLİ ☒	ULUSAL ☒

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER			
1	İNDEKS	☒	DİĞER:
2	AKADEMİK KURUL / KURUM KARARI	☒	
3	OLGU RAPOR FORMU	☐	
4	BAŞVURU FORMU	☒	
5	HASTA TAKİP FORMU ÖRNEĞİ	☐	
6	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU ÖRNEĞİ	☐	
7	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☒	
8	DESTEKLEYEN KURULUŞ	☐	
9	LİTERATÜR ÖRNEĞİ	☒	
10	TAAHHÜTNAME	☒	
11	İZİN BELGELERİ	☐	
12	ÖZGEÇMİŞLER	☒	

KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 1	Tarih: 08.08.2024
	Yukarıda bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan Sağlık Bilimleri Bilimsel Araştırma Etik Kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.	

ALTINBAŞ ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ BİLİMSEL ARAŞTIRMA ETİK KURULU

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	Araştırma ile ilişki *	Katılım **	İmza
Prof. Dr. Mustafa Aydın BARLAS (ETİK KURUL BAŞKANI)	Farmakoloji	Altınbaş Üniversitesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	e-imzalıdır
Prof. Dr. Hatun Hanzade DOĞAN	Tıp Etiği	Altınbaş Üniversitesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	e-imzalıdır
Prof. Dr. Nuray Yılmaz Altınbaş	Ağız Diş ve Çene Cerrahisi	Altınbaş Üniversitesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	e-imzalıdır
Prof. Dr. Mehmet Soy	İç Hastalıkları	Altınbaş Üniversitesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	e-imzalıdır
Doç. Dr. Şükriye Karadayı	Adli Bilimler	Altınbaş Üniversitesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	e-imzalıdır
Dr. Öğr. Üyesi Gaye HAFEZ	Farmakoloji	Altınbaş Üniversitesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	e-imzalıdır
Dr. Öğr. Üyesi Emir RUŞEN	Nöroloji	Altınbaş Üniversitesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	e-imzalıdır
Dr. Öğr. Üyesi Arzu Temizyürek	Fizyoloji	Altınbaş Üniversitesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	e-imzalıdır

* :Araştırma ile ilişki

** :Toplantıda Bulunma