

MERVE ESEN

← Adınızı soyadınızı giriniz

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak
Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya
(sol yandaki gibi) olacak .



DOKTORA TEZİ

← Tez, Yüksek Lisans'sa, YÜKSEK LİSANS TEZİ;
Doktora ise DOKTORA TEZİ ifadesi kalacak

İSTANBUL-2020

← Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

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

(DOKTORA TEZİ)

**BİYOSERAMİK ESASLI DENTAL MATERYALLERİN
GENOTOKSİSİTE VE BİYOAKTİVİTE ÖZELLİKLERİ
İLE ALKALEN FOSFATAZ AKTİVİTESİNİN
İNCELENMESİ**

MERVE ESEN

**DANIŞMAN
PROF. DR. ELİF BAHAR TUNA İNCE**

**PEDODONTİ ANABİLİM DALI
PEDODONTİ PROGRAMI**

İSTANBUL-2020

TEZ ONAYI

(Bu sayfa yerine, başarılı geçen Tez Sınavı sonrası sınav tutanağı ekinde yer alan Tez Onay sayfası gelecektir.)



BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Dt. Merve Esen



İTHAF

Her zaman yanımda olan *sevgili eşim ve aileme* ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca bilgi ve tecrübeleri ile gelişmemi sağlayan, her koşulda bana yol gösteren, akademik hayatımın yanı sıra her anlamda güleryüzü ve sabrı ile beni destekleyen danışman hocam Sayın **Prof. Dr. Elif Bahar Tuna İnce'ye**,

Tez çalışmamın oluşturulmasını ve laboratuvar aşamalarını gerçekleştirmemi sağlayan; bilgisi, enerjisi ve güleryüzü ile bu süreçte bana destek olan Yeni Yüzyıl Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın **Dr. Mehmet Fatih Seyhan'a**,

Tez çalışmamın olgunlaşmasında emeği geçen, bilgi ve tecrübesinden yararlandığım Tez İzleme Komitesi hocam Sayın **Prof. Dr. Handan Ersev'e**,

Doktora hayatım boyunca teorik ve pratik olarak bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen İ.Ü. Diş Hekimliği Fakültesi Pedodonti Anabilim Başkanı Sayın **Prof. Dr. Gamze Aren** ve öğretim üyesi hocalarım Sayın **Prof. Dr. Oya Aktören, Prof. Dr. Koray Gençay, Prof. Dr. Figen Seymen, Doç. Dr. Arzu Pınar Erdem, Doç. Dr. Yeliz Güven, Doç. Dr. Mine Koruyucu ve Dr. Yelda Kasımoğlu'na**,

Doktora eğitimim boyunca birlikte çalıştığım, güzel ve zorlu süreçleri birlikte paylaştığım dostlarım **Dt. Cansu Akay, Dt. Gülsevim Usta, Dt. Dilara Dinç ve Dt. Ceren İlisulu'ya**, beraber çalıştığım **sevgili asistan arkadaşlarıma ve Pedodonti Anabilim Dalı çalışanlarına**,

Doktora eğitim süresi boyunca sağladığı burs ile beni maddi olarak destekleyen **TÜBİTAK'a**,

Hayatım boyunca sevgi ve anlayışlarıyla yanımda olan, attığım adımlarda inançlarıyla beni destekleyen **Canım Aileme**,

Üniversite hazırlık sürecinden doktora sonuna kadar desteğini hep hissettiğim, inancı, güveni, sabrı ve sevgisiyle bu zorlu yolculukları benimle paylaşan sevgili eşim **Şafak Ahmet Esen'e**

sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: **30379**

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI.....	İİ
BEYAN	İİİ
İTHAF	İV
TEŞEKKÜR	V
İÇİNDEKİLER.....	VI
TABLolar LİSTESİ	X
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	Xİİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	XV
ÖZET	XVII
ABSTRACT	XVIII
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Dental anatomi: Kuron ve Kök.....	3
2.1.1. Kök gelişimi	3
2.1.1.1. Dentin	4
2.1.1.2. Pulpa	6
2.1.1.3. Sement	7
2.1.1.4. Periodontal Ligament.....	8
2.1.2. Alveol kemiği	9
2.1.3. Diş Gelişiminde Hücresel ve Moleküler Sinyalizasyon	10
2.2. Kök Gelişimini Tamamlamamış Dişlerde Endodontik Tedavi	12
2.2.1. Kök Gelişimini Tamamlamamış Dişlerde Derin Diş Çürüklerinin Etkisi.....	12
2.2.2. Kök Gelişimini Tamamlamamış Dişlerde Dental Travmaların Etkisi	12
2.3. Apeksifikasyon	13
2.3.1. Apeksifikasyon Tedavisinde Kullanılan Materyaller	14
2.3.1.1. Kalsiyum Hidroksit.....	14
2.3.1.2. Mineral Trioksit Agregat (MTA).....	15
2.3.1.3. Biodentine™	18
2.3.2. Apeksifikasyonda Başarıyı Etkileyen Faktörler	20
2.4. Biyouyumluluk	20
2.4.1. Biyouyumluluk ve Sitotoksikite.....	21

2.4.2. Biyouyumluluk ve Genotoksisite	22
2.4.2.1. <i>Salmonella</i> /Mikrozom Mikrozom Mutajenite (Ames) Testi	23
2.4.2.2. Comet Testi.....	24
2.4.2.3. Kromozom Anormallikleri (KA) Testi	25
2.4.2.4. Kardeş Kromatit Değişimi (KKD) Testi.....	25
2.4.2.5. Mikronükleus (MN) Testi.....	26
3. GEREÇ VE YÖNTEM	29
3.1. Gereç.....	30
3.1.1. Çalışmada Kullanılan Materyaller.....	30
3.1.2. Hücre Kültüründe Kullanılan Cihazlar, Aletler, Kimyasal ve Sarf Malzemeler	32
3.1.2.1. Cihaz ve Aletler	32
3.1.2.2. Kimyasal Malzemeler	32
3.1.2.3. Sarf Malzemeler.....	33
3.1.3. Genotoksisite İncelemesinde Kullanılan Cihazlar, Kimyasal ve Sarf Malzemeler	33
3.1.3.1. Cihazlar.....	33
3.1.3.2. Kimyasal Malzemeler	33
3.1.3.3. Sarf Malzemeler.....	34
3.1.4. Biyoaktivite İncelenmesinde Kullanılan Cihazlar ve Kitler	34
3.1.4.1. Cihazlar.....	34
3.1.4.2. Kitler	34
3.1.5. Alkalen Fosfataz Enzim Aktivitesinin İncelenmesinde Kullanılan Cihazlar ve Kitler	34
3.1.5.1. Cihazlar	34
3.1.5.2. Kitler	35
3.2. Yöntem	35
3.2.1. Deney Materyallerinin Örnek Gruplar Halinde Hazırlanması	35
3.2.2. Genotoksisite İncelenmesi	36
3.2.2.1. Kan örneklerinin alınması ve kültür edilmesi.....	36
3.2.2.2. Preparatların Hazırlanması ve Boyanması.....	38
3.2.3. İnsan Dental Pulpa Kök Hücrelerinin (hDPSC) Ekimi ve Çoğaltılması	41
3.2.4. Biyoaktivite İncelenmesi	42

3.2.4.1. ELİSA ile BMP-2 Düzeyi Tayini	43
3.2.4.2. ELİSA ile FGF-2 Düzeyi Tayini	44
3.2.4.3. ELİSA ile VEGF Düzeyi Tayini.....	45
3.2.5. ELİSA ile Alkalen Fosfataz Aktivitesinin Tayini	46
3.3. Verilerin İstatiksel Olarak İncelenmesi	47
4. BULGULAR	48
4.1. Genotoksisite Analizine Ait Bulgular	48
4.1.1. Materyallere Ait Salınım Sıvılarının Uygulandığı İnsan Periferal Lenfosit Hücrelerinin Mikroskobik Görüntüleri.....	48
4.1.2. Deney ve Kontrol Gruplarının İnsan Periferal Lenfosit Hücre Kültüründe Oluşturduğu Mikronükleus (MN) Değerleri.....	51
4.1.2.1. NeoMTA'nın Konsantrasyonlarına Bağlı Olarak Oluşan Mikronükleus (MN) Sayısı ve %MN Değerleri.....	51
4.1.2.2. Biodentine' in Konsantrasyonlarına Bağlı Olarak Oluşan Mikronükleus (MN) Sayısı ve %MN Değerleri.....	52
4.1.2.3. BioMTA'nın Konsantrasyonlarına Bağlı Olarak Oluşan Mikronükleus (MN) Sayısı ve %MN Değerleri.....	53
4.1.2.4. MTA CEM'in Konsantrasyonlarına Bağlı Olarak Oluşan Mikronükleus (MN) Sayısı ve %MN Değerleri.....	54
4.1.2.5. Pozitif Kontrol Grubunun Oluşturduğu Mikronükleus (MN) Sayısı ve %MN Değerleri	55
4.1.3. Deney ve Kontrol Gruplarının İnsan Periferal Lenfosit Hücrelerinin Nükleus Bölünmesi Üzerindeki Etkileri	58
4.1.3.1. NeoMTA'nın İnsan Periferal Lenfosit Hücrelerinin Nükleus Bölünmesi Üzerindeki Etkileri.....	59
4.1.3.2. Biodentine'in İnsan Periferal Lenfosit Hücrelerinin Nükleus Bölünmesi Üzerindeki Etkileri.....	60
4.1.3.3. BioMTA'nın İnsan Periferal Lenfosit Hücrelerinin Nükleus Bölünmesi Üzerindeki Etkileri.....	61
4.1.3.4. MTA CEM'in İnsan Periferal Lenfosit Hücrelerinin Nükleus Bölünmesi Üzerindeki Etkileri.....	62
4.1.3.5. Pozitif Kontrol Grubunun İnsan Periferal Lenfosit Hücrelerinin Nükleus Bölünmesi Üzerindeki Etkileri	63
4.2. Biyoaktivite İncelemelerine Ait Bulgular	66

4.2.1. BMP-2 Düzeyine İlişkin Analiz Sonuçları	66
4.2.1.1. BioMTA İçin BMP-2 Düzeyine İlişkin Bulguların Değerlendirilmesi	68
4.2.1.2. Biodentine İçin BMP-2 Düzeyine İlişkin Bulguların Değerlendirilmesi	68
4.2.1.3. MTA CEM İçin BMP-2 Düzeyine İlişkin Bulguların Değerlendirilmesi ...	69
4.2.1.3. NeoMTA İçin BMP-2 Düzeyine İlişkin Bulguların Değerlendirilmesi	70
4.2.2. FGF-2 Düzeyine İlişkin Analiz Sonuçları	72
4.2.2.1. BioMTA İçin FGF-2 Düzeyine İlişkin Bulguların Değerlendirilmesi	73
4.2.2.2. Biodentine İçin FGF-2 Düzeyine İlişkin Bulguların Değerlendirilmesi	74
4.2.2.3. MTA CEM İçin FGF-2 Düzeyine İlişkin Bulguların Değerlendirilmesi	74
4.2.2.4. NeoMTA İçin FGF-2 Düzeyine İlişkin Bulguların Değerlendirilmesi	75
4.2.3. VEGF Düzeyine İlişkin Analiz Sonuçları	77
4.2.3.1. BioMTA İçin VEGF Düzeyine İlişkin Bulguların Değerlendirilmesi	78
4.2.3.2. Biodentine İçin VEGF Düzeyine İlişkin Bulguların Değerlendirilmesi.....	79
4.2.3.3. MTA CEM İçin VEGF Düzeyine İlişkin Bulguların Değerlendirilmesi.....	80
4.2.3.4. NeoMTA İçin VEGF Düzeyine İlişkin Bulguların Değerlendirilmesi.....	80
4.3. Alkalen Fosfataz Aktivitesi Tayinine Ait Bulgular	82
4.3.1. BioMTA İçin ALP Düzeyine İlişkin Bulguların Değerlendirilmesi	84
4.3.2. Biodentine İçin ALP Düzeyine İlişkin Bulguların Değerlendirilmesi	85
4.3.3. MTA CEM İçin ALP Düzeyine İlişkin Bulguların Değerlendirilmesi	85
4.3.4. NeoMTA İçin ALP Düzeyine İlişkin Bulguların Değerlendirilmesi	86
5. TARTIŞMA.....	88
KAYNAKLAR.....	115
FORMLAR.....	147
GÖNÜLLÜ ONAY FORMU	150
ETİK KURUL KARARI.....	151
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI	152
ÖZGEÇMİŞ.....	153

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 3-1: Çalışmada kullanılan deney materyalleri, içerik ve üretici firmaya ait bilgiler.....	31
Tablo 3-2: Deney materyallerinin üretici firmaların önerileri doğrultusunda hazırlanmaları.....	35
Tablo 4-1: Pozitif kontrol ile biyoseramik esaslı dental materyallerin oluşturduğu % MN değerinin istatistiksel olarak karşılaştırılması.....	56
Tablo 4-2: Biyoseramik esaslı dental materyallerin oluşturduğu % MN değerinin aynı dozlar arasında ikili gruplar halinde istatistiksel olarak karşılaştırılması.....	57
Tablo 4-3: Kontrol ve deney gruplarının insan periferik lenfosit hücre kültüründe oluşturduğu MN sayıları ve % MN $\pm$ SEM değerleri.....	58
Tablo 4-4: Pozitif kontrol ile biyoseramik esaslı dental materyallerin oluşturduğu nükleer bölünme indeksi (NBI) değerlerinin istatistiksel olarak karşılaştırılması.....	63
Tablo 4-5: Biyoseramik esaslı dental materyallerin NBI değerlerinin aynı dozlar arasında ikili gruplar halinde istatistiksel olarak karşılaştırılması.....	64
Tablo 4-6: Pozitif kontrol ile deney grubu materyallerinin insan periferik lenfosit hücreleri ile etkileşimi sonucu nükleus sayısına göre hücrelerin dağılımı ve NBI değerleri.....	65
Tablo 4-7: BMP-2 için analiz sonuçları.....	66
Tablo 4-8: 1., 3. ve 7. günlerde BMP-2 değerlerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi.....	67
Tablo 4-9: BMP-2 için tanımlayıcı istatistikler.....	71
Tablo 4-10: FGF-2 için analiz sonuçları.....	72
Tablo 4-11: 1., 3. ve 7. günlerde FGF-2 değerlerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi.....	73
Tablo 4-12: FGF-2 için tanımlayıcı istatistikler.....	76
Tablo 4-13: VEGF için analiz sonuçları.....	77

Tablo 4-14: 1., 3. ve 7. günlerde VEGF değerlerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi.....	78
Tablo 4-15: VEGF için tanımlayıcı istatistikler.....	81
Tablo 4-16: ALP için analiz sonuçları.....	83
Tablo 4-17: 1., 3. ve 7. günlerde ALP değerlerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi.....	83
Tablo 4-18: ALP için tanımlayıcı istatistikler.....	87



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 3-1: Çalışmada kullanılan deney materyalleri.....	30
Şekil 3-2: Deney materyallerinin teflon kalıplarda diskler halinde hazırlanması.....	36
Şekil 3-3: Sertleşmesi tamamlanmış deney materyallerinin salınım sıvılarını elde etmek üzere medyum içerisinde 24 saat boyunca inkübe edilmesi.....	36
Şekil 3-4: Tek bir donörden alınan periferik kan örneklerinin kromozom medyumuna ekilmesi ve kültür edilmesi.....	37
Şekil 3-5: Deney materyallerine ait salınım sıvılarının üç ayrı doz halinde tüplere ekilmesi.....	38
Şekil 3-6: 44. Saatte kültür tüplerine sitokinezi durdurması amacıyla sitokinin B maddesinin ekilmesi.....	38
Şekil 3-7: Kültür süresinin bitiminde tüplerin santrifüj edilmesi ve hipotonik eriyikle muamele edilmesi.....	39
Şekil 3-8: Kültür tüplerinin 1. fiksatif ile 20 dakika boyunca muamele edilmesi ve süpernatantın uzaklaştırılması.....	39
Şekil 3-9: Kültür tüplerine 2. Fiksatifin ekilmesi ve bu aşamanın tekrarlanması sonucu tüpteki sıvıların berrak hale gelmesi.....	40
Şekil 3-10: Kültür tüplerindeki sıvının lamlar üzerine damlatılarak lam preparatlarının hazırlanması.....	40
Şekil 3-11: %80 konfluent hale gelen hDPSC hücrelerinin mikroskopik görüntüsü.....	41
Şekil 3-12: Konsantrasyonlara göre (%50 ve %100) materyal salınım sıvılarının uygulandığı hücre ekimi yapılmış plaklar.....	42
Şekil 3-13: 1., 3. ve 7. günde toplanmış üst sıvıların ependorflar içerisinde -80°C'de muhafaza edilmesi.....	42
Şekil 3-14: ELISA Kit for Human BMP-2 (Bone Morphogenetic Protein 2) (Elabscience, Houston, Texas, USA).....	43
Şekil 3-15: ELISA Kit for Human FGF (Fibroblast Growth Factor) (Elabscience, Houston, Texas, USA).....	44

Şekil 3-16: ELISA Kit for Human VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, MA, USA).....	45
Şekil 3-17: ELISA Kit for Alkaline Phosphatase, Liver/ Bone/ Kidney (ALPL) (Elabscience, Houston, Texas, USA).....	46
Şekil 4-1: Mononükleat hücre (A), binükleat hücre (B), trinükleat hücre (C) ve tetranükleat hücrelerin (D) mikroskopik görüntüleri (x400 büyütme).....	49
Şekil 4-2: Pozitif kontrol grubuna ait bir mikronükleus içeren mononükleat hücre (A), bir mikronükleus içeren binükleat hücrelerin (B ve C) mikroskopik görüntüleri (x400 büyütme).....	49
Şekil 4-3: MTA-CEM 1 µg/ml (A), MTA-CEM 10 µg/ml (B), MTA-CEM 50 µg/ml (C) gruplarına ait mikroskop görüntüleri (x400 büyütme).....	50
Şekil 4-4: NeoMTA 1 µg/ml (A), NeoMTA 10 µg/ml (B), NeoMTA 50 µg/ml (C) gruplarına ait mikroskop görüntüleri (x400 büyütme).....	50
Şekil 4-5: Biodentine 1 µg/ml (A), Biodentine 10 µg/ml (B), Biodentine 50 µg/ml (C) gruplarına ait mikroskop görüntüleri (x400 büyütme).....	50
Şekil 4-6: BioMTA 1 µg/ml (A), BioMTA 10 µg/ml (B), BioMTA 50 µg/ml (C) gruplarına ait mikroskop görüntüleri (x400 büyütme).....	50
Şekil 4-7: NeoMTA'nın üç ayrı konsantrasyonuna ait MN sayısı ve %MN değerleri.....	52
Şekil 4-8: Biodentine'in üç ayrı konsantrasyonuna ait MN sayısı ve %MN değerleri.....	53
Şekil 4-9: BioMTA'nın üç ayrı konsantrasyonuna ait MN sayısı ve %MN değerleri.....	54
Şekil 4-10: MTA CEM için üç ayrı konsantrasyonuna ait MN sayısı ve %MN değerleri.....	55
Şekil 4-11: Pozitif kontrol ve biyoseramik esaslı dental materyallerinin insan periferik lenfosit hücreleri üzerinde oluşturduğu %MN değerlerinin dozlara bağlı gösterilmesi.....	56

Şekil 4-12: NeoMTA'nın üç ayrı konsantrasyonuna ait nükleer bölünme indeksi (NBI) değerleri.....	59
Şekil 4-13: Biodentine'in üç ayrı konsantrasyonuna ait nükleer bölünme indeksi (NBI) değerleri.....	60
Şekil 4-14: BioMTA'nın üç ayrı konsantrasyonuna ait nükleer bölünme indeksi (NBI) değerleri.....	61
Şekil 4-15: MTA CEM'in üç ayrı konsantrasyonuna ait nükleer bölünme indeksi (NBI) değerleri.....	62
Şekil 4-16: Deney ve kontrol gruplarının insan periferik lenfosit hücreleri ile etkileşimi sonucu oluşan NBI değerleri.....	65
Şekil 4-17: Deney ve kontrol gruplarına ait BMP-2 değerlerinin ortalama ve standart sapma grafiği.....	67
Şekil 4-18: BMP-2 değerleri için ortalama grafiği.....	71
Şekil 4-19: Deney ve kontrol gruplarına ait FGF-2 değerlerinin ortalama ve standart sapma grafiği.....	73
Şekil 4-20: FGF-2 değerleri için ortalama grafiği.....	76
Şekil 4-21: Deney ve kontrol gruplarına ait VEGF değerlerinin ortalama ve standart sapma grafiği.....	78
Şekil 4-22: VEGF değerleri için ortalama grafiği.....	82
Şekil 4-23: Deney ve kontrol gruplarına ait ALP değerlerinin ortalama ve standart sapma grafiği.....	84
Şekil 4-24: ALP değerleri için ortalama grafiği.....	87

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

°C: Derece, Celcius

µl: Mikrolitre

ALP: Alkaline Phosphatase, Alkalen Fosfataz

BMP: Bone Morphogenic Protein, Kemik Morfogenik Protein

cm²: Santimetrekare

DMEM: Dulbecco'nun Modifiye Eagle Medyumu

DMSO: Dimetil Sülfoksit

DNA: Deoksiribonükleik Asit

DSPP: Dentin sialophosphoprotein, Dentin sialofosfoprotein

EDTA: Etilendiamintetraasetik asit

EGF: Epidermal Growth Factor, Epidermal Büyüme Faktörü

ELİSA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

FBS: Fetal Bovine Serum, Fötal Sığır Serumu

FGF: Fibroblast Growth Factor, Fibroblast Büyüme Faktörü

hDPSC: Human Dental Pulp Stem Cell (İnsan Dental Pulpa Kök Hücresi)

hPDLSC: Human Periodontal Ligament Stem Cell (İnsan Periodontal Ligament Kök Hücresi)

hTGSC: Human Tooth Germ Stem Cell, İnsan Diş Germi Kök Hücresi

HEPES: Hydroxyethyl piperazine ethanesulfonic acid (Hidroksietil piperazin ethanosülfonik asit)

HERS: Hertwig's epithelial root sheath, Hertwig epiteliyal kök kını

IRM: Intermediate Restorative Material, Geçici Restoratif Materyal

ISO: International Organization for Standardization (Uluslararası Standardizasyon Birliği)

KA: Kromozom Anormallikleri

KKD: Kardeş Kromatit Değişimi

MN: Mikronukleus

MTA: Mineral Trioksit Agregat

OECD: Organization for Economic Cooperation and Development (Ekonomik İşbirliği ve Kalkınma Örgütü)

PBS: Phosphate Buffered Saline, Fosfat Tampon Solüsyonu

PDL: Periodontal ligament

SHED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth, insan eksfoliye olmuş süt dişi kök hücreleri

SS: Standart Sapma

TGF: Transforming Growth Factor (Transforme Edici Büyüme Faktörü)

TNS: Tyrpsin Neutralizer Solution (Tripsin Nötralizasyon Solüsyonu)

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor (Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü)

WTN: Wingleless-related integration site, kanatsız ilişkili entegrasyon bölgesi

ÖZET

Esen M. Biyoseramik Esaslı Dental Materyallerin Genotoksisite Ve Biyoaktivite Özellikleri İle Alkalen Fosfataz Aktivitesinin İncelenmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Pedodonti ABD. Doktora Tezi. İstanbul. 2020.

Bu çalışmada biyoseramik esaslı dört materyalin (BioMTA, Biodentine, NeoMTA, MTA CEM) genotoksisitesi, biyoaktivite özellikleri ve alkalen fosfataz aktivitesinin karşılaştırmalı olarak incelenmesi amaçlanmıştır. Genotoksisite tayininde tek donörden elde edilen periferik kan lenfosit hücreleri ile materyallerin üç ayrı dozu kültür edilmiş ve hücreler mikronükleus (MN) testi ile değerlendirilmiştir. Bulgular MN sayısı, % MN ve nükleer bölünme indeksi (NBI) olarak sunulmuş ve GraphPad programı ile istatistiksel olarak analiz edilmiştir. Çalışmanın biyoaktivite değerlendirmesi için kemik morfogenezik protein (BMP-2), fibroblast büyüme faktörü (FGF-2) ve vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) seviyeleri ile alkalen fosfataz (ALP) aktivitesinin incelenmesinde ELİSA yöntemi kullanılmıştır. Bu incelemelerde insan dental pulpa kök hücre hattı (Lonza Grup, Basel, İsviçre) üçüncü pasajı, materyallere ait salınım sıvılarının %50 ve %100'lük formları ile 1., 3. ve 7. günlerde değerlendirilmiştir. Bulgular IBM SPSS V23 programı ile analiz edilmiştir. Veriler incelendiğinde, deney grupları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında insan periferik lenfosit hücreleri üzerinde MN oluşumunu indüklememiş, % MN anlamlı olarak düşük ve NBI değerleri anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p<0,05$). Tüm materyallerin BMP-2, FGF-2 ve VEGF düzeylerini zamana bağlı olarak çeşitli oranlarda artırdığı bulunmuştur. BMP-2 düzeyi en yüksek 7. gün Biodentine ve BioMTA grubundan elde edilmiştir. FGF-2 seviyesi, Biodentine ve NeoMTA grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak yükseltmiştir. VEGF'i en çok uyaran grup Biodentine olarak bulunmuştur. ALP aktivitesi, Biodentine için tüm günlerde, NeoMTA ve BioMTA için 7. gün anlamlı olarak artmıştır ($p<0,05$). Sonuç olarak, çalışmada kullanılan materyaller insan periferik lenfosit hücreleri üzerinde genotoksik etki oluşturmamış ve çeşitli oranlarda büyüme faktörlerini uyarak osteojenik ve anjiyojenik etki göstermişlerdir.

Anahtar Kelimeler: Genotoksisite, biyoaktivite, alkalen fosfataz, biyoseramikler, hücre kültürü

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 30379

ABSTRACT

Esen M. Evaluation of the genotoxicity, bioactivity and ALP activity of bioceramic based dental materials. Istanbul University, Institute of Health Science, Department of Pedodontics. PhD Thesis. İstanbul. 2020.

The aim of this study was to evaluate the genotoxicity, bioactivity and alkaline phosphatase activity of four bioceramic based materials (BioMTA, Biodentine, NeoMTA, MTA CEM) comparatively. Three separate doses of materials were cultured with peripheral blood lymphocytes from a single donor and micronucleus test (MN) was used to evaluate genotoxicity. The findings were presented as MN scoring, % MN, nuclear division index (NDI) and analyzed with GraphPad. The levels of bone morphogenic protein (BMP-2), fibroblast growth factor (FGF-2), vascular endothelial growth factor (VEGF) for bioactivity and alkaline phosphatase (ALP) activity were determined with ELISA. 3rd passage of commercially available human dental pulp stem cells were used with %50 and %100 forms of extracts on days 1, 3 and 7 for experiments. The data were analyzed with IBM SPSS V23. The materials didn't induce MN formation on human peripheral lymphocytes, % MN was significantly low and NDI values were significantly high compared with control group ($p<0.05$). All materials increased the levels of BMP-2, FGF-2 and VEGF at various rates depending on time. The highest levels of BMP-2 was found on the 7th day of Biodentine and BioMTA. The levels of FGF-2 were significantly increased in Biodentine and NeoMTA compared to the control group. Biodentine was found to be the most stimulating group of VEGF. ALP activity increased significantly on all days for Biodentine and on 7th day for NeoMTA and BioMTA ($p<0.05$). The materials didn't show genotoxic effect on human peripheral lymphocytes and showed osteogenic and angiogenic effects.

Key Words: Genotoxicity, bioactivity, alkaline phosphatase, bioceramics, cell culture

The present study was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No: 30379

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kuron ve kök pulpa dokusunun canlılığının sürdürülmesi ve buna bağlı olarak kök ucunun fizyolojik olarak kapanmasının sağlanması diş hekimliğinin temel tedavi prensiplerindendir. Travma, derin dentin çürüğü ya da diğer patolojik nedenlerle kök gelişimini tamamlayamayan dişlerde kök gelişimi durmakta ve kök ucu açık kalmaktadır. Bu şekilde nekroz olan ve immatür dişlerde apeksin mineralize bir tıkaç ile hermetik olarak kapatılmasını sağlayan tedavi yöntemi 'apeksifikasyon' olarak adlandırılmaktadır (27, 44, 102, 167, 309).

Apeksifikasyon tedavisinde uzun süredir kullanılan ve altın standart olarak da kabul edilen materyal kalsiyum hidroksittir. Kalsiyum hidroksit yüksek alkali pH, antimikrobiyal etki ve mineralize doku oluşumunu stimüle etme gibi birçok olumlu özelliğe sahiptir; ancak apeksifikasyon tedavi süresinin uzun olması, bu süreçte hasta takibinin zorlaşması, dentin duvarlarında kırılabilirliğin artması gibi olumsuzluklar da mevcuttur (14, 15, 167, 331).

Günümüzde kalsiyum hidroksitin olumsuz özellikleri nedeniyle, alternatif materyallerin arayışı hız ve önem kazanmıştır. Biyoseramik esaslı olan bu dental materyallerin tek seansta kök ucuna yerleştirilebilmeleri, sert doku oluşumunu indüklemeleri ve hermetik tıkama sağlama gibi pek çok avantajı bulunmaktadır (15, 27, 157, 260).

Mineral Trioksit Agregat (MTA) diş hekimliğine ilk kez 1993 yılında Mohmoud Taorabinejad tarafından tanıtılmış ve 1998 yılında Amerikan Gıda ve İlaç Yönetimi tarafından onaylanarak endodontik kullanım için uygunluğu kabul edilen biyoseramik dental materyal olarak sunulmuştur (287, 306, 328). 1999 yılında ise Torabinejad ve Chivian MTA'nın apeksifikasyon tedavisinde kullanımını önermiştir (331). MTA'nın mineralizasyon ve doku rejenerasyonu oluşturma kapasitesi (188), sementoblastları aktive edebilmesi, biyouyumlu oluşu ve PDL rejenerasyonu sağlaması (329) apeksifikasyon tedavisinde başarı ile kullanımını sağlamıştır. Bu avantajlarına rağmen renk değişikliğine neden olması, manipülasyon ve söküm zorlukları yeni materyal arayışlarına yol açmıştır (307).

Son yıllarda MTA'nın endike olduğu tedavi seçeneklerinde MTA ile benzer özellikleri taşıyan ancak klinik özellikleri geliştirilmiş silikat esaslı materyaller yaygınlaşmaya başlamıştır. Bu amaçla 2009 yılında piyasaya sürülen Biodentine™, kök perforasyonlarında, apeksifikasyonda, vital pulpa tedavilerinde, rezorpsiyon tamirinde kullanılmaktadır. Bu materyal MTA esaslı simanların özelliklerini taşımakla beraber fiziksel özelliklerin geliştirilmiş olması, sertleşme süresinin kısalmış olması (153) ve manipülasyon kolaylığı gibi olumlu özellikler içermektedir (192). Biodentine™'in biyouyumlu ve biyoaktif olması, dentin köprü oluşturması bu materyalin MTA'ya benzer şekilde kullanımı endodontik tedavilerdeki kullanımını yaygınlaştırmıştır (123, 185).

Bu biyomateryallerin iyi biyouyumluluk özellik gösterdiği çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Biyouyumluluk, endodontik materyaller için önemli gerekliliklerden biridir. Özellikle kuafaj ve apeksifikasyon çalışmalarında kullanılan bu materyaller, sitotoksisite ve mineralizasyon açısından yapılan deneylerde düşük sitotoksisite ve iyi sert doku oluşturma potansiyeli göstermiştir (147, 153, 244). Literatürde yapılmış *in vitro* çalışmalar sıklıkla sitotoksisite alanına yoğunlaşmıştır. Apeksifikasyon tedavisinde, biyoseramik esaslı materyaller, kök ucunda açık apikal foramen aracılığıyla periapikal dokularla ve bu bölgedeki hücrelerle uzun dönem temasta kalmaktadır. Bölgedeki hücreler ile uzun süre temasta bulunan bu materyallerin genotoksik potansiyel oluşturmaması önemlidir (29). Apeksifikasyonda, doku rejenerasyonu ve kemik oluşumunun sağlanmasında ise bazı anjiyojenik ve osteojenik büyüme faktörlerinin salınması gerekmektedir (255).

Bu tez çalışmasının amacı dört farklı biyoseramik esaslı dental materyalin insan lenfosit hücreleri üzerindeki genotoksik etkilerini mikronükleus testi ile değerlendirmesi ve bu materyallerin *in vitro* koşullarda insan dental pulpa kök hücreleri (hDPSC) üzerindeki biyoaktivite belirteçleri ile ALP aktivitesinin karşılaştırmalı olarak incelenmesidir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Dental anatomi: Kuron ve Kök

Dişler günlük yaşamda çiğneme, konuşma ve estetik gibi önemli fonksiyonları yerine getiren organlardır. Her bir diş iki ana parçadan oluşmaktadır. Bunlar; kuron ve köktür (174, 233).

Histolojik açıdan incelendiğinde kuron ve kök bazı farklılıklar içermektedir. Bir dişin kuronu en iç kısımda damar dokudan zengin olan pulpa ve onu saran dentin dokusu ile en dış yüzeyi saran mine dokusundan oluşmaktadır. Kök ise sement adı verilen bir doku ile örtülüdür. Kök sementi, alveolar kemiğine ile fibröz bir bağ dokusu olan periodontal ligament ile bağlıdır. Bu doku 0,1 ile 0,3 mm kalınlığında olup dişe gelen okluzal yükleri dengelemekle ve alveol kemiğine iletmekle görevlidir (136, 174).

2.1.1. Kök gelişimi

Diş gelişimi pek çok ektodermal organın gelişimine benzer şekilde epitelyal ve mezenkimal hücreler arasındaki bir dizi etkileşim ile gerçekleşmektedir (320). Oral epitelin kalınlaşması ve dental lamina adı verilen yapıyı oluşturmasıyla diş gelişim süreci başlamaktadır. Dental lamina, altındaki nöral krete doğru invajine olarak diş tomurcuğunu oluşturmaktadır (184, 203). Mezenkim, epitelyal diş tomurcuğunun etrafında yoğunlaşmakta ve transkripsiyon faktörleri ve sinyal moleküllerinin indüklenmesi aracılığı ile morfogeneze yeteneği kazanmaktadır. Çeşitli farklılaşmalar sonucu epitel hücreleri ameloblastlara, mezenkim hücreleri ise odontoblastlara farklılaşmaktadır. Ameloblastlar diş kuronunun en sert dış kısmı olan minenin oluşumunda görev almaktadırlar. Odontoblastlar ise pulpanın etrafını saran dentin matriks oluşumunda rol oynamaktadırlar (174, 320).

Sement, periodontal ligament ve alveolar kemik gibi tüm periodontal yapılar dental folikülden köken almaktadırlar. Kuron gelişimi tamamlanıp kök oluşumu başlayınca dental foliküldeki hücreler PDL fibroblastlarına, sementoblast ve osteoblastlara farklılaşmaktadır (95, 365).

Diş gelişiminin takke evresinde, mine organının apikal kenarları dişin apikal foramenini oluşturmaktadır. Diş germi büyümeye ve genişlemeye devam ettikçe apikal

foramen hem çene içerisinde derinleşerek hem de vestibular ve lingual olarak genişlemeye başlamaktadır. Bu aşamada odontoblastik farklılaşma gerçekleşmekte ve pulpa odasının dentin tabanı oluşmaya başlamaktadır (294). Bu süreç kök gelişiminin klasik teorisine göre, mine ve dentin formasyonu mine-sement birleşimine ulaştığında başlamaktadır. Diş kuronunun formasyonu tamamlandığında, iç ve dış mine epitel i iki tabakalı epitel duvarı olarak Hertwig epitel kök kınını (HERS) oluşturmak üzere birleşmektedirler (28, 259). Shaijla ve ark. HERS'in pulpa, folikül ve folikül çevresindeki ektomezenkimal dokular arasında çevresel bir band oluşturduğunu belirtmiştir. Kökün apikal gelişimi ektomezenkimal progenitör hücrelerin fibroblast ve presegmentoblastları uyarmasıyla gerçekleşmektedir (294). Kökte bulunan hücrelerin odontoblastlara farklılaşmasıyla ve ilk dentin tabakasının oluşmasıyla birlikte Hertwig epitel kök kınınının bir kısmı parçalanıp devamlılığını kaybetmekte ve bağımsız hücreler gelecekteki periodontal ligamentin bulunduğu bölgeye göç ederek Malassez artıklarını oluşturmaktadırlar (350, 377). Bu hücrelerin diğer bir kısmı da apoptoza uğramakta ya da mezekimal hücrelere dönüşebilmektedir (294).

Sementogenezis, hem HERS'e ait epitel hücrelerinin hem de dental folikül mezenkimal hücrelerinin gelişmekte olan kök yüzeyine yaklaşmasıyla başlamaktadır. Kök yüzeyindeki HERS hücreleri, kollajen 1 ve kemik sialoproteini gibi sementoblastları indükleyen biyolojik belirteçler salgılamaktadır (140).

Periodontal ligament, dental folikülden türeyen, HERS devamlılığını kaybettiğinde oluşmaya başlayan bir dokudur. HERS ile etkileşime girdikten sonra, fibroblast öncülleri hem kök yüzeyi hem de alveolar kemiğe göç etmektedirler. Kısa ve ince olan kolajen fiberler kök yüzeyine bağlanmakta ve periodontal boşlukta büyümektedirler. Sement içerisinde gömülü olan fiberler 'Sharpey lifleri' adını almaktadır. Kök gelişiminin erken safhalarında bu fiberler düzensizdir. Ancak daha ileriki aşamalarda dental folikül içerisindeki fibroblastlar, prefibroblastlar ve kök hücreler büyümeye, kalınlaşmaya ve organize olmaya başlamaktadırlar (70, 242, 319).

2.1.1.1. Dentin

Dentin, pulpayı saran ve dişin sert dokusunun en geniş kısmını oluşturan açık sarı renkli bir maddedir (140). Dentin fonksiyon olarak üzerinde yer alan mineyi desteklemekte ve çiğneme sırasında oluşan yüklere karşı korumaktadır. Aynı zamanda

pulpayı olası zararlı stimölasyonlardan ve etkilerden koruyarak pulpa dentin kompleksinin devamlılığını sağlamaktadır (162, 326).

Dentin, diş gelişiminin çan evresinde epitel ve ektomezekimal dokular arasındaki etkileşim sonucu ilk odontoblastların farklılaşması ile oluşmaya başlamaktadır. Farklılaşan odontoblastlar dentin proteinlerinin salgılanmasından sorumludur (207). Kök dentinin oluşumunda ise HERS'in rolü önem kazanmaktadır. HERS hücreleri transforne edici büyüme faktörü (TGF- β) salgılayarak dental papilla hücrelerinin odontoblastlara farklılaşmasını sağlamaktadır (231).

Mineralize bir bağ dokusu olan dentin, ağırlık olarak %70 inorganik ve mineral içerirken, % 20 organik bileşen ve kalan kısım ise su içermektedir. İnorganik yapı ağırlıklı olarak hidroksiapatit içerirken magnezyum, kalsiyum vb. elementler de içerebilmektedir. Organik yapının ana yoğunluğunu Tip 1 kollajen oluşturmakta, kalan kısmında ise proteoglikanlar, eser miktarda lipitler ve diğer proteinler ile büyüme faktörleri yer almaktadır (222, 324).

Dentin dokusu oluşumlarına ve yapılarına göre alt gruplara ayrılmaktadırlar: manto dentin, primer ve sekonder dentin, reperatif ve reaksiyoner tersiyer dentindir (326).

Manto dentin; dentinin en dışında kalan 5 ile 30 μ m kalınlığındaki tabakasıdır. Organik matriksi odontoblastların terminal farklılaşması sırası ve sonrasında oluşmaktadır. Yapısal olarak Tip 3 kollajen içermektedir, bu lifler von Korff lifleri olarak da adlandırılmaktadır (179, 314, 324).

Primer dentin; kök ve kuron dentinin ilk oluşum aşamasında üretilen dentindir. Primer dentinogenezden sonra oluşan ve yaşam boyu üretilen dentin ise *sekonder dentin*'dir. Sekonder dentin üretimi devam ettikçe yaşla beraber kök kanalları ve pulpa odası oblitere olmaktadır (270, 324).

Tersiyer dentin; kimyasal ya da mekanik iritanlara veya travmaya bağlı olarak üretilen dentin çeşididir (32). Mineralize dentin içerisindeki büyüme faktörleri ve diğer moleküllerin tersiyer dentin oluşumunu yönettiğine inanılmaktadır (301). *Reaksiyoner dentin* orijinal odontoblastlar tarafından üretilen ve sekonder dentine benzeyen bir yapıdadır. *Reperatif dentin* ise yeni farklılaşmış odontoblastlar tarafından üretilen ancak tübüler yapıdan fakir yapıdadır ve kalsifiye skar dokusu olarak da adlandırılabilir (32, 207, 325).

Kök dentini, kuron dentini ile yapısal olarak bazı farklılıklar taşımaktadır. Sement tabakasının altında yer alan dentin, ince kanallara sahip manto dentin yapısına benzemektedir. Kök dentinindeki zayıf kalsifiye kollajen liflerin esneme fonksiyonunu gerçekleştirdiğini ileri sürmüşlerdir (151). Kök dentini ve apikaldeki dentinin tübüler yoğunluğu kuron dentinine göre daha az olarak bildirilmiştir (208).

Dentin yapısındaki bir diğer bileşen ise tübüllerdir. Dentin tübülleri mine-dentin birleşim sınırından genişleyerek ve S şeklinde ilerleyerek pulpa-dentin sınırına ulaşmaktadır (375). Peritübüler ya da intratübüler dentin, dentin tübüllerinin duvarlarında yer alan ve sirküler yapıda ve yüksek oranda mineralize bir dokudur (324, 349). İntertübüler dentin ise, peritübüler dentin halkaları arasında yer almakta ve bu dentin yapısına göre daha az mineralize formdadır. Peritübüler dentinin heterojen yapıda olması ve tübüllerin dalları ile perfore olması dentin sıvısının hareketine olanak sağlamaktadır (326).

Dentin sıvısı, tübül duvarları ile odontoblast uzantılarının arasındaki boşlukta yer almaktadır. Dentin sıvısı, dentini destekleyerek çiğneme sırasındaki kuvvetleri absorbe etme, diş sert dokularının esnekliğini sağlama ve diş kırılmalarına karşı koruma gibi konularda önemli bir role sahiptir (162). Çürük dişlerde ise bu sıvının dentin tübülleri boyunca koruyucu özelliği olduğu vurgulanmaktadır (209).

2.1.1.2. Pulpa

Dental pulpa, odontoblastların ürettiği mineralize doku olan dentin ile çevrili mezenkimal bir dokudur (25, 228). Pulpanın içerdiği hücreler ve karmaşık morfolojik yapısı ile dişin canlılığını sağlayan rejenerasyon, mineralizasyon, beslenme, sinirsel iletim ve bağışıklık gibi pek çok önemli fonksiyonu yerine getirmektedir (18, 290).

Pulpa dokusu embriyolojik olarak nöral krestten köken alan ektomezenkimden oluşmaktadır. Pulpanın merkezde kalan kısmı fibroblastlar, kan ve lenfatik damarlar, sinirler ile gevşek bir dokuyu içermektedir. Pulpanın periferde kalan kısmı ise hücreden zengin tabaka, hücre içermeyen Weil tabakası ve sinir pleksusu (Raschkow pleksusu) olmak üzere üç kısımdan oluşmaktadır (222, 254, 290). Pulpa organı kural ve kök kanal pulpasını oluşturmak üzere bölünmektedir. Yapısal olarak incelendiğinde, bu iki pulpa dokusu bazı farklılıklar bulunmaktadır. Kök kanal pulpasının özü yoğun olarak kollajen içeren bağ dokusu içermektedir. Kök kanal duvarlarındaki pulpa ise odontoblastik tabakaya komşu olacak şekilde gevşek bağ dokusu içermektedir. Kök pulpası,

kuronaldeki pulpaya oranla daha az sayıda odontoblasta sahiptir. Bu hücrelerin şekli ise kök kanalında düz ya da kübik formda iken, kuronaldekiler prizmatiktir (18, 222). Odontoblastlar farklılaşma aşamasını gerçekleştirdikten ve organize olduktan sonra, organize matriksin mineralize olmasından ve dentin oluşumundan sorumludurlar (207).

Pulpada yer alan hücreler jelatinöz yapıdaki bir ekstrasellüler matrikste yer almaktadır. Bu matriks glikozaminoglikan, proteoglikan, fibronektin, kollajenöz proteinler ile çeşitli tiplerdeki kollajenlerden meydana gelmektedir (25, 178).

Dental pulpa, apikal bölgeden gelen kan damarları ve sinir ağlarını içermektedir. Merkezi pulpa arteri, subodontoblastik kapiller pleksusun bir dalı olup odontoblastların beslenmesinden sorumludur (168, 290). Pulpa damarları, apikal foramenden kök kanalı aracılığıyla kuronal pulpaya ilerlemekte ve Weil tabakasının altında bir sinir pleksusu oluşturmaktadır. Miyelinsiz nöronlar pulpadaki kan akışını düzenlerken, myelinli nöronlar somatik açıdan duyarlıdırlar. Lenfatik damarlar ise kan damarları ile beraber kuronal pulpaya girmekte ve apikal foramenden beraber seyrederek çıkmaktadırlar. (258). Bu yapılar sayesinde pulpaya bir uyarın geldiğinde vasküler, lenfatik ve lokal doku yanıtları oluşturularak olası hasarlardan korunma sağlanmaktadır (31, 218).

Pulpaya bir hasar geldiğinde rejeneratif yanıt kapasitesi sınırlı olsa da pulpa kök hücreleri pulpal rejenerasyonu sağlayabilmektedir (18). Dental pulpa kök hücreleri çeşitli hücre hatlarına farklılaşabilmekte ve klonojenik kapasite oluşturabilmektedir. Bu kök hücrelerin en sık farklılaştığı hücre grupları ise odontoblast benzeri hücreler, adipositler ve sinir hücreleridir. Odontoblast benzeri hücreler, rejenerasyon için önemli olan primer dentini üretebilmektedir (114, 115). Yapılan *in vitro* çalışmalarda dental pulpa kök hücrelerinin odontoblastik hücre hatlarına farklılaştığı, mineralize nodül oluşumuna katkı sağladığı (114, 138); *in vivo* çalışmalarda ise odontoblastik farklılaşmayı yöneten bazı genlerin salgıladığı ve pulpa benzeri doku oluşturabildiği gösterilmiştir (23, 67, 115).

2.1.1.3. Sement

Sement, kök dentin yüzeyini örten ve periodontal ligamentler aracılığıyla alveolar kemikle bağlantısı olan bir dokudur. Sement genellikle kemik dokusuna benzese de, vasküler yapıya sahip olmaması, remodeling gibi süreçlere dahil olmaması ve kalınlığının ömür boyu artması sebebiyle kemik dokusundan ayrılmaktadır. Sementin görevi, alveol kemiği ve fiberlerle beraber dişi desteklemek ve aynı zamanda ankoraj sağlamaktır (38, 150, 360).

Sement içerik olarak, çoğunluğunu hidroksiapatitin oluşturduğu ağırlıkça %65 inorganik madde, Tip 1 kolajenin çoğunlukta olduğu %23 organik madde ve kalan % 12'lik kısmı da sudan oluşmaktadır (26, 58).

Histolojik olarak incelendiğinde, kökün apikal 1/3'lük kısmında hücreli ve kalın sement bulunmakta, kalan kısımda ise hücresiz ve ince sement yer almaktadır (70, 360). Sement iki tip fiber içermektedir. Bunlar ekstrinsik lifler (Sharpey lifleri) ve intrinsik liflerdir. Sement sınıflandırmasında 3 ana tip ayırt edilmektedir (150, 285):

Asellüler ekstrinsik lifli sement, yoğun olarak ekstrinsik lifler içermekte ancak sementosit içermemektedir.

Sellüler intrinsik lifli sement, hem intrinsik lif hem de sementosit içermektedir.

Hücreli karışık katmanlı sement, intrinsik ile ekstrinsik lifleri içeren ve sementosit içeren genellikle kökler arası ve apikal bölgede bulunan bir dokudur.

Sement kemik gibi remodelling sürecine katılmasa da, yaşam boyunca kalınlığı artmaktadır (37). Kök rezorpsiyonunda ya da köke gelen mekanik stresin azaltılmasına karşı tamir sementi, kök dentin yüzeyine doğru salgılanabilmektedir (38).

2.1.1.4. Periodontal Ligament

Periodontal ligament, kök sementi ile alveol kemiği birbirine bağlayan fibröz bir doku olarak tanımlanmaktadır. Periodontal ligament mekanik kuvvetlere karşı dişi stabilize etmekle, çiğnemedi kaynaklanan ani bir yüke karşı dişi ve alveol kemiğini korumakla görevlidir. PDL aynı zamanda bir bariyer görevi görerek ağız boşluğundaki mikroorganizmaların penetrasyonunu engellemektedir (24, 65).

PDL histolojik olarak damar ve sinir ağı ile çeşitli hücreleri barındırmasıyla heterojen bir dokudur (221). PDL hücreleri arasında; kemik hücreleri, sement hücreleri, nöral hücreler, Malassez epitel artıkları bulunmakla beraber en baskın olan hücre tipi kollajen üretiminden sorumlu olan PDL fibroblastlarıdır (24, 172).

PDL'in yapısal dayanıklılığını kollajen fiberler oluşturmaktadır. Bu fiberler çoğunlukla Tip 1, daha az olarak da Tip 3 kollajen içermektedirler. Bu ana lifler yerleşimlerine göre üç alt gruba ayrılmaktadırlar. Bunlar; dentogingival, transseptal ve alveolodental liflerdir. PDL, bu lifler sayesinde çiğneme ve diğer hareketlere karşı dişi koruma ve destek görevini gerçekleştirmektedir (65, 221).

PDL'in devamlılığı, kollajen üretimi ile paralel olarak sağlanmaktadır. Sement tarafındaki kollajen, alveol kemiğindeki kıyasla daha olgundur. Bu durum kemik tarafındaki remodelling hızının daha gerçekleştiğini göstermektedir (180). Kemik ve sementi bağlayan lifler devamlı olarak remodelling sürecine katılmaktadırlar. Bu süreçte osteoblast, osteoklast ve sementoblast hücreleri aktif olarak rol oynamaktadır (24, 65). Melcher, PDL'in farklılaşmış bu hücreler için progenitor hücre kaynağı olabileceğini belirtmiştir (200). İlerleyen zamanlarda PDL rejenerasyonu için yapılan *in vitro* çalışmalarda bu progenitor hücrelerin kullanımı gerçekleştirilmiştir (65).

2.1.2. Alveol Kemiği

Alveol kemiği çiğneme sistemine ait üst ve alt çene kemiklerine özgü bulunan, dişlerin gelişmesiyle birlikte oluşan kemiktir (54, 242). Süt dişlerinin gelişimi başladığında alveol kemiğinin gelişim süreci de paralel olarak başlamaktadır. Kök gelişimi devam ederken dental foliküldeki mezenkimal hücreler sementoblast, osteoblast ve fibroblast gibi sementi, periodontal ligamenti ve soket duvarlarını oluşturmak üzere farklılaşmaktadırlar (28, 304). Diş sürmesine paralel olarak alveol kemiğin remodeling süreci devam etmekte ve diş oklüzal düzleme tam olarak ulaştığında da bu süreç dinamik olarak devam etmektedir (28, 54, 304). Diş kökü ile alveol kemiği arasında yer alan kollajen lif demetleri kökün etrafını takip ederek radyoopak bant şeklinde görülmektedir. Bu yapı, lamina dura olarak adlandırılmaktadır (133, 242).

Alveol kemiğin fonksiyonel ve metabolik ihtiyaçlarını karşılayan remodeling sürecinde, osteoblast ve osteoklast olmak üzere iki hücre görev almaktadır. Osteoblastlar kemik matriks ve mineralizasyonundan sorumludurlar; osteoklastlar ise matriks rezorpsiyonunda görev almaktadırlar (302). Osteositler ise alveol kemiği içinde yer alan ve diğer iki hücreyle iletişim kurarak remodeling sürecini yönlendiren mekanoreseptör olarak tanımlanabilmektedir (137, 302). Alveol kemiğinin %23'ünü oluşturan inorganik matriks; hidroksiapatit, kalsiyum, fosfor, magnezyum vb. elementleri içermektedir. %37'ini oluşturan organik matriks ise tip 1 kollajen, kollajen olmayan proteinler ve hücresel elementlerden oluşmaktadır. Kalan %40'ını ise su oluşturmaktadır (28, 302).

Alveolar proses; trabeküler kemik, bukkal, labial ve lingual kortikal kemik ile lamina dura gibi alveol kemiğini içermektedir. Kortikal kemik lamellar yapıda olup kemik dokunun canlılığını sağlayan Havers sistemini içermektedir. Trabeküler kemik ise

nörovasküler demet ve kemik iliğinden zengin bir içeriğe sahiptir. Kemik iliği osteojenik ve hematopoetik hücrelerin öncülerini de içermektedir (327).

2.1.3. Dış Gelişiminde Hücresel ve Moleküler Sinyalizasyon

Büyüme faktörleri, hücre reseptörlerine bağlanan, hücresel mekanizma ve aktiviteleri kontrol etmek üzere hücre dışına salgılanan proteinlerdir. Büyüme faktörleri kök hücrelerin aktivitesini kontrol edebilmektedir. Örneğin kök hücrelerin proliferasyon hızını düzenleyebilmekte, başka bir hücre tipine farklılaşmasını uyarabilmekte ya da mineralize olabilen matriksleri sentezlemek için hücreleri uyarabilmektedir (194, 310). Bu proteinlerin pikogram gibi çok düşük konsantrasyonlarda bile aktif olarak görev alabileceği bildirilmektedir (300).

Dış dokularının gelişiminde ve onarımındaki mekanizmalar tam olarak anlaşılmassa da büyüme faktörlerinin ve sinyal moleküllerinin önemli rol oynadığı bilinmektedir. Kök gelişiminin başlangıcında da bu şekilde büyüme ve transkripsiyon faktörlerinin salındığı savunulmakta ve bu faktörlerin dış gelişiminin çeşitli aşamalarında epitelial ve mezenkimal etkileşimleri düzenlediği düşünülmektedir (68).

Kemik morfogenezik proteinleri (BMP) ilk olarak kıkırdak ve kemik oluşumunda tanımlanan proteinlerdir (340). Transforme edici büyüme faktör ailesinde yer alan BMP'lerin, dişler dahil olmak üzere çeşitli organ ve dokuların embriyogenez ve morfogenezinde rol aldığı bildirilmiştir (155). Casagrande ve ark. SHED hücrelerinin odontoblastlara farklılaşması için BMP-2'nin gerekli olduğunu bildirmiştir (47). Ayrıca HERS hücreleri BMP, TGF- β ve mediyatörlerini salgılamaktadır (139, 174). Kök gelişiminde HERS hücrelerinin formasyonunda ve odontoblastların farklılaşmasında BMP sinyali aktif olarak rol oynamaktadır. Kök gelişiminin başlangıç aşamasında BMP 2, 3, 4 ve 7 salgılanmaktadır (174, 361). HERS hücrelerindeki BMP sinyalizasyonu aynı zamanda kök gelişim düzenini de kontrol etmektedir. BMP bağlarının (BMP 2, 3, 4, 7) ve BMP sinyalizasyonunun dental mezenkimde bulunmasının kök gelişim aşamalarının düzenlenmesinde önemli rol oynadığını göstermektedir (361). Özellikle BMP-2'nin eksikliğinde mezenkimal progenitör hücrelerin anormal odontoblastlara farklılaşması ve bunun sonucunda kısa kök oluşumu meydana geldiği bildirilmiştir (262).

TGF- β hem HERS, hem de dental mezenkim hücrelerinden salgılanmaktadır. Buna rağmen TGF- β sinyalizasyonu kök gelişimi sırasında mezenkimde daha ön planda

rol almaktadır; çünkü HERS'te bu sinyal moleküllerinin eksikliğinin kök formasyonunu etkilemediği halde, mezenkimdeki eksikliği kök gelişim defektlerine yol açtığı gösterilmiştir (173). Son yıllarda, TGF- β sinyalizasyonu ile dental mezenkimin indirekt olarak HERS hücrelerini regüle ederek dokular arası etkileşimle kök gelişimini kontrol ettiği bildirilmiştir. TGF- β sinyalizasyonunun eksikliği kök uzamasında eksiklik, kök dentin matriksinin yoğunluğunda eksiklik ve gecikmiş azı dişi sürmesine yol açabilmektedir (344).

WNT sinyal moleküllerinin kök gelişiminin erken safhalarında salgılandığı bilinmektedir. Standart WNT sinyal yolu gelişmekte olan azı dişlerinin köklerinde yüksek oranda faaliyet göstermektedir. Bu durum, odontoblast ve preodontoblastlarda Axin2'nin salgılanmasına bağlıdır (181). Buna ek olarak WNT10A sinyal molekülü dentin sialofosfoprotein (DSPP) salgılanmasını uyarmaktadır. DSPP geni, odontoblastların dentinogenezis süreciyle bağlantılıdır ve bu durum WNT aktivitesinin kök dentin oluşum sürecinde rol oynayabileceğini göstermektedir (362).

Fibroblast büyüme faktörü ailesine ait bazı üyeler, diş morfogenezile ilişkilendirilmiştir. FGF'ler organogenezde epitelyal ve mezenkimal arası etkileşimlere aracılık etmektedir. FGF'ler genel olarak diş morfogenezinin çeşitli aşamalarında dental mezenkim ve epitelde hücre bölünmesini ve proliferasyonunu stimüle eden moleküllerdir (149, 155). FGF-4, 8 ve 9 yalnızca dental epitel hücrelerden salgılanmaktadır (129, 149, 155). FGF-4 ve 8'in özellikle çan evresinde dental epitelde salgılandığı ve odontoblast ile ameloblastların terminal farklılaşmasıyla ilişkili olduğu belirtilmiştir (155). Dental mezenkimdeki FGF-10 molekülü, HERS formasyonunu uyarak diş gelişiminin kurondan köke geçiş sürecini kontrol etmektedir (368). FGF-2, gelişmekte olan dişlerin apikal bölgesinde farklılaşmakta olan odontoblastlarda, kökün furkasyon bölgesinde, periodontal ligamentdaki sementoblast ve fibroblastlarda salgılanmaktadır. Buna göre kökün çeşitli yönlerinde gelişimi uyardığı belirtilmektedir. (189).

Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), anjiyogenez sürecinde en önemli faktör olarak kabul edilmektedir. Bu büyüme faktörü vasküler geçirgenliği kontrol etmekte, endotel hücrelerinin proliferasyonunu ile göçünü desteklemekte ve anjiyoblast oluşumunu arttırmaktadır (93, 273). VEGF'in kemik oluşumu sırasında anjiyogenezin ana düzenleyicilerinden biri olduğu düşünülmektedir (105). VEGF aynı zamanda SHED hücrelerini vasküler endotelial hücrelere farklılaşmasını sağladığı bildirilmiştir (274).

Epidermal büyüme faktörü (EGF) diş morfogeneziyle ilişkilendirilen bir başka sinyal molekülüdür. Dental epitel ve mezenkimin her ikisinde de salgılanmakta ve doku etkileşimlerini düzenlemektedir (245).

2.2. Kök Gelişimini Tamamlamamış Dişlerde Endodontik Tedavi

Kök gelişiminin tamamlanması ve apeks bölgesinin tam olarak kapanması diş sürmesinden yaklaşık üç yıl sonra gerçekleşmektedir (28). Bu üç yıl içerisinde gerçekleşen dental travmalar ya da derin dentin çürükleri dişlerin canlılığını kaybetmesine ve kök gelişiminin tamamlanamamasına neden olmaktadır. Bu gibi durumlar immatüre dişlerde endodontik tedavi gereksinimine yol açmaktadır (259).

2.2.1. Kök Gelişimini Tamamlamamış Dişlerde Derin Diş Çürüklerinin Etkisi

Diş çürükleri pulpal ve periapikal hastalıkların en yaygın sebebi olarak bilinmektedir. Diş çürüğü dentin kanalları aracılığıyla pulpaya ulaştığında ve pulpa geri dönüşümsüz olarak enfekte olduğunda, diş nekroz hale gelmektedir. Nekroz pulpaya sahip bir diş, konağın doğuştan gelen, adaptif bağışıklık savunma mekanizmalarını kullanamamakta ve savunma yanıtı oluşturamamaktadır. İmmatür dişlerde bu durum dentin oluşumunun devam etmemesi, açık apeks, zayıf kök duvarları ve kısa kökler ile sonuçlanmaktadır (259, 279).

2.2.2. Kök Gelişimini Tamamlamamış Dişlerde Dental Travmaların Etkisi

Dental travmatik yaralanmalar gelişmekte olan dentisyona sahip çocukların %30'unu etkilemektedir (13). Genç sürekli dişlerde meydana gelen bu dental travmatik yaralanmalar sonucu pulpal inflamasyon ya da nekroz meydana gelebilmektedir. Hertwig epitel kök kını dişe gelen travmanın şiddetine göre çeşitli derecelerde hasara uğramaktadır. HERS'in tamamen harabiyete uğradığı travmatik yaralanmalarda odontoblastların farklılaşması kesilmektedir. Canlılığını kaybeden bir dişte farklılaşmamış hücre kaynağı kesilmesine bağlı olarak sert doku oluşumu gerçekleşmemekte ve normal kök gelişimi kesintiye uğramaktadır. Geri dönüşümü olmayan bu hasar sonucunda açık apeksli, kısa köklere sahip dişler meydana gelmektedir (13, 259, 334).

Dental travma ya da derin dentin çürüğü nedeniyle pulpanın etkilendiği dişlerde tedavi yaklaşımı dişin canlılığına göre iki çeşittir. Bunlar; apeksogenezis ve apeksifikasyondur. Apeksogenezis, kök gelişiminin ve formasyonun fiziksel olarak

devam ettirilmesine olanak sağlayan vital pulpa tedavisidir (7, 355). Webber RT'nin tanımladığı şekilde apeksogenezezin amacı, Hertwig epitel kök kınının canlılığını sürdürmesi ve kök ucunda dentin depolanmasının sağlanmasıdır (348).

Kök gelişimini tamamlamamış ve pulpa nekrozuna sahip olan dişler ise apeksifikasyon tedavisine gereksinim duymaktadırlar. Apeksifikasyon genel olarak açık apeksli ve nekrotik pulpaya sahip bir dişin kök ucunda kalsifik bir bariyer oluşturma yöntemi şeklinde tanımlanmaktadır (7).

2.3. Apeksifikasyon

Apeksifikasyon tedavisi, pulpa patolojisinin giderilmesi için nekrotik pulpanın çıkarılması, kök kanal sisteminin dezenfeksiyonu ile kök ucu tamamlanmamış apikal bölgede kalsifik bariyer indüklenmesini sağlayan bir tedavi protokolüdür (2, 76, 116, 227, 259).

Nekrotik pulpalı ve açık apeksli dişlerde endodontik tedavi doğal apikal tıkaçın bulunmaması ve kırılmaya eğilimli ince kök duvarları nedeniyle hekimler açısından zorluk teşkil etmektedir (45, 336). Kök kanal debrisinin temizlenmesi, nekrotik pulpanın çıkarılması ve mikroorganizmaların elimine edilmesi apeksifikasyon tedavisinde kritik bir öneme sahiptir (199). Bir diğer faktör ise, kök kanal sisteminin uygun materyal ile taşmadan dolmasını sağlamak üzere yapay bir apikal bariyerin oluşturulması ya da yerleştirilmesidir (336).

İmmatur dişlerde kök ucunda bariyer oluşmasını indükleyecek çeşitli yöntem ve materyaller kullanılmaktadır. Bunlar; herhangi bir girişim ya da tedavi yapılmaması (176), enfeksiyon kontrolü (63), periapikal bölgede kan pıhtısı oluşturulması (122), antibiyotik patları (21), kalsiyum hidroksit uygulaması (98) ve diğer biyoseramik esaslı materyallerin kök ucuna yerleştirilmesi olarak belirtilmiştir (355).

Açık apeksli dişlerin tedavisinde geleneksel yaklaşım, kalsiyum hidroksitin kanal içi medikament olarak kullanıldığı çok seanslı apeksifikasyon tedavisidir (291). Tek seans apeksifikasyon tedavisi ise, Mineral Trioksit Agregat (MTA) kullanılarak açık apeksli dişlerde yapay bir apikal bariyer oluşturulması işlemidir (225, 356).

2.3.1. Apeksifikasyon Tedavisinde Kullanılan Materyaller

2.3.1.1. Kalsiyum Hidroksit

Kalsiyum hidroksit ilk olarak 1920 yılında Hermann tarafından direk pulpa kaplama ajanı olarak endodontiye tanıtılmıştır (131). Beyaz ve kokusuz bir toz olan ve pH'sı yaklaşık 12,5-12,8 olan kalsiyum hidroksitin molekül ağırlığı 74,08'dir (86). Su içerisinde düşük çözünürlük gösterirken (25 °C'de 1,2 g/l), bu çözünürlük sıcaklık ile ters orantı göstermektedir. Materyal kalsiyum ve hidroksil iyonlarına ayrışmakta, antibakteriyel etki ve sert doku indüklemesi ile etkisini göstermektedir (298).

Kalsiyum hidroksit endodonti ve dental travmatoloji kapsamında pek çok tedavide kullanılmaktadır. Bunlar; direkt ya da indirekt kuafaj tedavisi, amputasyon tedavisi, apeksogenezis, apeksifikasyon, kök kanal tedavisinde kanal içi medikament uygulamasıdır (86, 211).

Kalsiyum hidroksit apeksifikasyon tedavisinde sıklıkla kullanılan bir materyaldir. 1959 yılında Granath kalsiyum hidroksit kullanımı ile apikal tıkanmanın sağlanacağını tarif eden ilk kişi olmuştur (111). Frank ise kalsiyum hidroksiti pat halinde kanalların içerisine yerleştirilmesini ve kök ucundaki açıklığın zaman içerisinde kapanacağını tarif ederek bir method oluşturmuştur (98). Frank methoduna göre, kalsiyum hidroksit her üç ayda bir kanal içerisinde yenilenmelidir. Apikalde kalsifik bariyer oluşması 5 ile 20 ay arasında değişen bir süreci kapsamaktadır (295). Bu süreç apikal açıklık, kanal içi medikament değişim sıklığı, hastanın yaşı ve periapikal radyolüsesiye bağlı olarak değişmektedir (94, 164, 187).

Kalsiyum hidroksitin etki mekanizmaları arasında antimikrobiyal etki, mineralizasyon etkisi gibi aktiviteler yer almaktadır (211). Antimikrobiyal etki, sıvı ortamda hidroksil iyonu salınımı ile gerçekleşmektedir ve bu durum bakteriler üzerinde sitoplazmik zar hasarı, protein denatürasyonu, DNA hasarına yol açmaktadır (298). Kalsiyum hidroksitin hidroksil iyonuna bağlı olan oluşturduğu yüksek alkali pH, bakteri sitoplazma membran geçirgenliğini değiştirmekte ve bu yolla organik bileşenler üzerinde kimyasal hasar oluşturmaktadır (81).

Kalsiyum hidroksitin hidroksil grubunun en önemli işlevi tamir ve kalsifikasyon oluşumunu sağlayan yüksek pH oluşturmaktır. Oluşan bu alkali pH sayesinde osteoklastların ürettiği laktik asidi nötralize edilmesi, alkalen fosfataz aktivitesinin artırılması ve dentinden mineral içeriklerinin ayrılmasının engellenmesi sağlanmaktadır

(80, 82). Alkalen fosfataz, kalsiyum ve fosfat iyonlarını etkileştirerek organik matriks üzerine kalsiyum fosfat çökmesini sağlamaktadır. Kalsiyum fosfat ise hidroksiapatitin moleküler birimidir (290).

Oluşan sert doku bariyeri Ghose ve ark. tarafından kaplama, köprü gibi terimlerle tanımlanmış ve sement, dentin, kemik ya da 'osteodentin' gibi içeriklerden oluştuğu belirtilmiştir (107). Oluşan osteodentinin apikaldeki bağ dokusu tarafından köken aldığı görülmektedir. Torneck ve ark., kök kanalının iç duvarlarında kemik benzeri bir materyalin depolandığını bildirmişlerdir (333). Steiner ve Van Hassel ise oluşan kalsifik köprü ile apikal kapanmanın gerçekleştiğini ve bu durumun histolojik kriterleri karşıladığını belirtmişlerdir (308).

Mitchell ve Shankwalker kalsiyum hidroksitin osteojenik potansiyelini araştırmak üzere sıçanların bağ dokusu üzerinde çalışmışlardır. Çalışmanın sonucunda, kalsiyum hidroksitin heterotopik kemik oluşumunu indüklediği sonucuna varmışlardır (205).

Yapılan tüm bu çalışmalara göre anti mikrobiyal etki ve sert doku uyarımını gerçekleştirmesi ile kalsiyum hidroksit uzun yıllardır apeksifikasyon tedavisinde kullanılmaktadır. Ancak buna rağmen kalsiyum hidroksit apeksifikasyonunun bazı dezavantajları bulunmaktadır. Yapılan laboratuvar gözlemleri sonucu uzun süreli kalsiyum hidroksit kullanımı ile kökün kırılma direncinde azalma görüldüğü bildirilmektedir (14, 15). Bunun yanı sıra kalsiyum hidroksit apeksifikasyonunun uzun bir periyoda yayılmış olması hastaların takip zorluğuna sebebiyet vermektedir (331). Tüm bu nedenlerle apeksifikasyonda kalsiyum hidroksit yerine kullanılabilecek alternatif materyal arayışı bulunmaktadır.

2.3.1.2. Mineral Trioksit Agregat (MTA)

Mineral Trioksit agregat diş hekimliğine ilk kez 1993 yılında Mohmoud Taorabinejad tarafından tanıtılmış ve 1998 yılında Amerikan Gıda ve İlaç Yönetimi tarafından onaylanarak endodontik kullanım için uygun bir materyal olarak sunulmuştur (287, 306). MTA'nın kimyasal bileşimi ağırlıkça %50-75 kalsiyum oksit ve %15-25 silikat oksit içeren bir kalsiyum silikat karışımıdır. Bu silikat karışımı trikalsiyum silikat, trikalsiyum aluminat, trikalsiyum oksit, silikat oksit ve diğer oksitlerden oluşmakta ve bu partiküller su varlığında hidrofilik özellik taşımaktadırlar (201). Kalsiyum silikatlar radyopak olmadıkları için bu özelliği sağlamak üzere bizmut oksit bu yapıya katılmıştır (328). MTA laboratuvar çalışmaları, hayvan çalışmaları ve klinik deneylerde olumlu

sonuçlar vermesiyle çocuk diş hekimliği ve endodontide yaygın bir kullanım alanının sahip olmuştur (119, 120, 121).

MTA piyasada renklerine bağlı olarak gri ve beyaz olmak üzere iki formda bulunmaktadır. Gri ve beyaz MTA'yı birbirinden ayıran ana özellik içerdikleri alüminyum oksit, magnezyum oksit ve demir oksit konsantrasyonlarının farklı olmasıdır (19).

Sluyk ve ark. (299), Torabinejad ve ark. (331) ve Schmitt ve ark. (284) MTA hazırlanırken toz su oranının 3:1 olması gerektiğini belirtmişlerdir. Sluyk ve ark. MTA hazırlanırken karıştırma süresinin 4 dakikadan az olmasını gerektiğini önermişlerdir (299). Torabinejad ve ark. MTA'nın sertleşme süresini 2 saat 45 dakika olarak bildirirken (330), Islam ve ark. 2006 yılında yaptıkları bir çalışmada 2 saat 55 dakika olarak belirtmişlerdir (146).

Torabinejad ve ark. MTA'nın fiziksel özelliklerini araştırdıkları bir çalışmada 24 saatteki basınç dayanımının 40,0 MPa iken 21. günde artarak 67,3 MPa'a ulaştığını bildirmişlerdir (330).

MTA karıştırıldığı andaki pH'ı 10,2 iken materyalin üç saatlik sertleşmesi tamamlandıktan sonraki pH'ı 12,5 olmaktadır. Bu pH ise kalsiyum hidroksite benzer düzeydedir (330). Sertleşmiş haldeki MTA çözünmezdir; ancak daha fazla su ile karıştırıldığında çözünürlüğünde artış görüldüğü bildirilmektedir (188). MTA'nın su ile temas halinde iken kalsiyum hidroksit saldıgını bildirilmiş ve bu durumun sementogenezi indükleyici bir özellik oluşturduğu belirtilmiştir (330).

MTA'nın kullanım alanları arasında süt ve sürekli dişlerde pulpa kaplaması (1, 287), pulpotomi (77), kök kanal dolgusu (239), nekroz ve açık apeksli dişlerde kök ucu açık dişlerde apikal bariyer olarak kullanımı (171, 197, 223), furkasyon perforasyon tamiri ve rezorpsiyon tamiri yer almaktadır (287).

Kettering ve Torabinejad 1995 yılında yaptıkları bir çalışmada MTA, Super EBA ve IRM materyallerini biyouyumlulukları açısından karşılaştırmış ve MTA'nın daha az sitotoksik olduğunu ve mutajenik olmadığını bildirmişlerdir (154). Pelliccioni ve ark. MTA ile osteoblast-benzeri hücrelerin etkileşimini değerlendirdikleri bir çalışmada, MTA'nın periapikal ve periradiküler dokularla iyi bir uyuma sahip olduğunu

göstermişlerdir (248). Koh ve ark. MTA'nın interlökün salınımı uyardığını ve kemik hücreleri için biyolojik aktif substrat sunduğunu bildirmiştir (166).

Bu özelliklerin yanı sıra MTA doku rejenerasyonu ve mineralizasyon özelliği ile de ön plana çıkmış bir materyaldir (188). Torabinejad ve ark. MTA'nın sementoblastları aktive etme özelliğinden dolayı sement üretme potansiyeline sahip olduğunu bildirmiştir. Ayrıca MTA'nın yüzeyinde PDL'in büyüdüğü sonucuna da ulaşmışlardır (329). Schwartz ve ark. kemik iyileşmesinde klinik semptomların giderilmesini sağlayarak MTA'nın potansiyel rejeneratif bir materyal olduğu sonucuna varmışlardır (287).

Myers ve ark., MTA ile kalsiyum hidroksitin benzer şekilde dentin köprüsü formasyonu oluşturduklarını bildirmişlerdir. Buna rağmen Faraco ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada MTA'nın oluşturduğu dentin köprüsünün kalsiyum hidroksitin oluşturduğuna göre daha iyi bir yapısal bütünlüğe sahip olduğunu belirtmişlerdir (85). Dominguez ve Tziafas'a göre MTA pulpa bütünlüğünü koruyacak şekilde reperatif dentin oluşumunu stimüle etmektedir (74, 339).

MTA insan dokuları ile doğrudan temas halinde olduğunda kalsiyum iyonlarını salacak şekilde kalsiyum hidroksit formasyonu sağlamaktadır. Salınan kalsiyum iyonları hücre bağlanması ve proliferasyonu sağlamakta, alkali pH ile antibakteriyel bir çevre oluşturmakta, sitokin çıkışını modüle etmekte, sert doku oluşturan hücrelerin diferansiyasyonu ve migrasyonunu stimüle etmektedir (43, 118, 316, 317). Ayrıca uygulandığı yüzeyde hidroksiapatit ve karbonat apatit oluşturarak biyolojik bir kapama sağlamaktadır (39, 264, 280).

İlk kez 1999 yılında Torabinejad ve Chivian apeksifikasyon tedavisinde kök ucunu kapatmaya yönelik bir materyal olarak mineral trioksit agregat (MTA)'ın kullanımını önermiştir (331). Bu şekilde yapılan apeksifikasyon tedavisinde ilk seansta kök kanalı prepare ve irige edilip kalsiyum hidroksit ile bir hafta bekletilir. İkinci seans ise MTA kök ucunda 3-4 mm'lik bir kalınlık oluşturacak şekilde yerleştirilir ve materyalin sertleşmesini sağlamak üzere nemli pamuk pelet ile bekletilir daha sonra kök kanalının geri kalanı guta perka ile doldurulup daimi restorasyon bitirilir (331).

Kalsiyum hidroksit ile karşılaştırıldığında MTA apeksifikasyonu benzer klinik ve radyografik başarı oranlara sahip olabilirken, MTA'nın kısa sürede uygulanması ve hasta takibinin daha kolay olması, daha iyi bir yapısal bütünlük sağlayarak kök ucunu etkili bir şekilde tıkaması MTA'yı daha başarılı kılmaktadır (177). Ayrıca kalsiyum hidroksite

kıyasla MTA apeksifikasyonun apikal sert doku bariyeri oluşumu ve lamina dura oluşumu daha hızlı gerçekleşmektedir (62). Uzun dönemli çalışmalarda MTA apeksifikasyonu uygulanan dişlerde kalsiyum hidroksite oranla kök kırığı oluşma riskinin azaldığı belirtilmiştir (35, 332). Buna rağmen dişlerde renk değişikliği, söküm güçlüğü ya da kök ucundan taşma gibi manipülasyon zorlukları, kök uzunluğunun artmaması ve yüksek maliyet MTA'nın klinik kullanımındaki dezavantajlardandır (307).

MTA'nın olumsuz avantajlarını gidermek üzere piyasaya kök onarım malzemeleri adı altında birçok biyoaktif endodontik siman çıkmıştır. Bu materyaller MTA ile biyoaktivite açısından benzer özellikte kalsiyum silikat bazlı yapılardır fakat MTA'nın olumsuz özelliklerini elimine edecek şekilde oldukları iddia edilmektedir (244).

2.3.1.3. Biodentine™

Son yıllarda MTA'nın endike olduğu ve uygulanabildiği koşullarda benzer özellikleri taşıyan kalsiyum silikat esaslı materyaller yaygınlaşmaya başlamıştır. Bu materyallerden ön plana çıkan Biodentine™ (Septodont, Saint-Maur-des-Fosses, Fransa) 2009 yılında piyasaya sürülmüştür. Biodentine, basınç dayanımı ve elastik modülü gibi fiziksel özellikleri dentine benzer olduğu için spesifik olarak 'dentin replasman materyali' olarak tanıtılmıştır; ancak bunun yanı sıra kök perforasyonlarında, apeksifikasyonda, rezorpsiyon tamirinde, retrograd dolgu materyali olarak kullanımı mevcuttur. Bu materyal MTA esaslı simanların özelliklerini taşır ancak bazı fiziksel özellikler ve manipülasyon gibi durumlarda geliştirmeler yapılmıştır (30, 153, 192).

Biodentine'in toz kısmının içeriğini trikalsiyum silikat, dikalsiyum silikat, kalsiyum karbonat ve zirkonyum oksit oluşturmaktadır. Trikalsiyum ve dikalsiyum silikat ana içerikler iken zirkonyum oksit materyalin radyoopasite özelliğini oluşturmaktadır. Materyalin likit kısmı ise akseleratör özellik taşıyan kalsiyum klorid içermektedir (30). Likit kısım toz kısmına eklenerek hazırlanan Biodentine amalgamatörde karıştırıldıktan sonra, kalsiyum silikat partikülleri su ile reaksiyona girmektedir. Açığa çıkan kalsiyum, hidroksil ve silikat iyonları yüksek bir pH ortamı sağlamaktadır. Bu aşamada oluşan yapı kalsiyum silikat jelidir. Materyalin sertleşme süresi sonrasında bu jel yapı tamamen katı bir forma dönüşmektedir (6, 240). Biodentine'in başlangıç sertleşme süresi üretici firma tarafından 9-12 dakika arasında değişmekte olduğu belirtilmiş (30), Grech ve ark.'nın yaptığı çalışmada tam sertleşme süresinin 45 dakika olduğu bildirilmiştir (113). Sertleşme süresinin kısa olması MTA'ya göre avantaj kabul edilmektedir (153).

Biodentine'in sertleşirken basınç dayanımı birinci saatte 100 MPa, 24. saatte 200 MPa ve zaman içerisinde 300 MPa'a ulaşmaktadır. Bu basınç dayanımı doğal dentin dokusunun basınç dayanımına benzemektedir (238, 280).

Yapılan çalışmalarda Biodentine'in biyouyumlu ve biyoaktif olması, mineralizasyonu indüklemesi, apatit kristal üretimini sağlaması ve dentin köprü oluşturmaya bu materyalin MTA'ya benzer şekilde kullanımını yaygınlaştırmıştır (123, 185).

Zhou ve ark. beyaz MTA, Biodentine ve cam iyonomer simanın insan dişeti fibroblastı üzerinde sitotoksik etkilerini araştırmış ve beyaz MTA ve Biodentine'in cam iyonomere göre daha az ve benzer sitotoksikiteye sahip olduğunu belirtmişlerdir (381).

Laurent ve ark. yaptıkları bir çalışmada Biodentine, MTA, kalsiyum hidroksit ve Xeno III adeziv rezinin reperatif dentin oluşturma kapasitelerini ve TGF- β 1 salgılatma potansiyellerini araştırmışlardır. Çalışmanın sonucunda Biodentine ve MTA'nın benzer şekilde erken odontoblastik farklılaşma sürecine katıldıkları ve bu şekilde mineralizasyon ve reperatif dentin oluşumunu sağladıkları bulunmuştur. Ayrıca diğer iki deney materyaline göre TGF- β 1 sekresyonu MTA ve Biodentine'de anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. TGF- β 1 ise anjiyogenezde, hücre farklılaşmasında ve mineralizasyonda rol oynayan önemli bir büyüme faktörüdür (170).

Luo ve ark., Biodentine'in insan dental pulpa kök hücresi (hDPSCs) üzerine etkilerini araştırdıkları bir çalışmada, Biodentine'in doğrudan pulpa üzerine uygulandığında kök hücrelerin proliferasyonunu, migrasyonunu ve adezyonunu arttırdığını bildirmişlerdir. Biodentine'in pulpa ile temas ettiğinde yoğun bir dentin köprüsü ve reaktif dentin oluşumunu stimüle edecek potansiyele sahip olduğu belirtilmiştir (185).

Zanini ve ark., Biodentine'in fare pulpa hücreleri üzerinde biyolojik etkilerini araştırdıkları bir çalışmada biyomoleküler marker analizi yapmışlardır. Analiz sonucunda Biodentine ile kültür edilen grupta proliferasyon ve biomineralizasyonun arttığı rapor edilmiştir (373).

Biodentine sağladığı yüksek pH nedeniyle mineralizasyonu uyarmakta ve dentin sement arayüzü boyunca minerallerin infiltre olduğu bir bölge yaratmaktadır. Caron ve ark., Biodentine'in MTA'ya kıyasla daha üstün sızdırmaz bir alan oluşturduğunu

bildirmişlerdir (46). Ravichandra ve ark. ise Biodentine’i yüksek adaptasyon ve sızdırmazlık özellikleri sayesinde diğer materyallere göre kök ucu dolgusu olarak daha başarılı bulmuşlardır (263).

2.3.2. Apeksifikasyonda Başarıyı Etkileyen Faktörler

İmmature ve non-vital dişlerin tedavisi, kuron-kök oranı, ince kök duvarları, kök ucuna yerleştirilecek materyalin taşmasına sebep olacak kadar geniş apeks açıklığı gibi gerekçelerle zorluklar teşkil etmektedir (76). Bu dişlerin tedavisinde uygulanan apeksifikasyon yönteminin ana hedefleri, ağrı ve perküsyon hassasiyeti gibi klinik semptomların giderilmesi, periapikal bölgedeki lezyonun iyileşmesinin sağlanması ve apekte kalsifik doku bariyerinin uyarılmasıdır (2). Bu hedefler doğrultusunda kanal içinin uygun bir şekilde dezenfeksiyonun yapılması, uygulanan materyalin mikrosızıntıyı engelleyecek nitelikte olması ve kök ucunda kalsifik bariyer oluşumun indüklenmesi, materyalin temas halinde olduğu dokularla biyouyumlu olması apeksifikasyonda başarıyı arttıran faktörler arasında yer almaktadır (2, 49, 130).

2.4. Biyouyumluluk

Williams 1987 yılında biyouyumluluğu bir materyalin spesifik bir uygulama sonucunda uygun konak yanıtı oluşturabilme yeteneği olarak tanımlamıştır (352). Williams 2008’de bu tanımın kapsamını genişleterek ‘bir biyomateryalin herhangi lokal ya da sistemik bir etki oluşturmada istenilen fonksiyonu yerine getirmesi ve aynı zamanda en uygun hücrel ve doku yanıtını oluşturabilme yeteneği’ olarak tanımlamıştır (353). Bu tanımlara göre biyouyumlu bir materyal canlı doku ile temas halinde iken sistemik ve lokal toksisite, karsinojite ve mutajenite, alerjik reaksiyonlar oluşturmamalıdır (214, 283).

Yeni geliştirilen bir materyal, kullanıma geçmeden önce çeşitli testlere tabii tutulmalıdır. Uluslararası Standardizasyon Organizasyonu (ISO), ISO 10993 ve ISO 7405 dökümanlarında dental materyallerin biyolojik değerlendirmelerine yönelik bazı standart uygulamalar önermiştir (142, 143). Basitten karmaşığa doğru hiyerarşik bir düzeni izleyen bu testler sırasıyla; başlangıç testleri (*in vitro* sitoksisite, mutajenite), ikincil testler (hayvan deneyleri, sensitizasyon, implantasyon, mukozal iritasyon) ve klinik kullanım çalışmalarıdır (127).

In vitro testler, kolay uygulanabilirliği, ucuz ve kontrol edilebilirliğinin olması ve standardize edilebilmesi gibi avantajlarıyla ilk tercih edilen testlerdir (257).

2.4.1. Biyouyumluluk ve Sitotoksosite

Materyallerin biyouyumluluğunu değerlendirmekte kullanılan en önemli parametrelerden biri o materyalin hücre sağ kalımı üzerindeki etkisidir. Bu bağlamda kullanılan bir terim olan sitotoksosite, makromolekül sentezini bozulması sonucu meydana gelen hücresel, yapısal ya da işlevsel hasarlar olarak tanımlanmaktadır (4).

Canlı organizmanın dışında, petri kabının ya da deney tüpü içerisinde gerçekleştirilen *in vitro* testler, sitotoksosite testlerinde en sık kullanılan yöntemlerden biridir (347). *In vitro* testler, hücre sistemleri üzerinde materyal bileşenlerinin salınımını ve etkilerini inceleme olanağı sunmaktadır (175, 250). Ayrıca bu testler sonucunda materyalle temas sonrasında canlı ve ölü hücre sayısı, hücre büyüme oranları ya da hücresel fonksiyon gibi değerlendirmeler yapılabilmektedir (347).

In vitro sitotoksosite testlerinde sıklıkla hücre kültürleri kullanılmaktadır. Hücre kültürleri canlı bir organizmadan alınmış dokuların uygun laboratuvar koşullarında yaşatılıp çoğaltılması ile oluşan biyolojik sistemlerdir (338). Hücre kültürlerinde kullanılan hücreler primer ya da devamlı hücre soyu olmak üzere iki çeşittir. Primer hücre kültürü canlı organizmadan alınan doku ya da örneklerin uygun ortamda 24 saatten daha uzun süre kültür edilmesiyle oluşmaktadır. Primer hücre kültürüne örnek olarak diş eti ve pulpa fibroblastları verilebilir (99, 338). Primer hücre hatlarının tekrarlanan pasajlar sonrasında oluşan ve süresiz çoğalabilme yeteneğine sahip olan hücreler ise devamlı hücre hatlarını oluşturmaktadır. Devamlı hücre hatlarına örnek olarak 3T3 ve L929 gibi kodlarla isimlendirilen fare fibroblast hücreleri, HeLa hücreleri gösterilebilir (127).

Dental materyallerin klinik olarak kullanımından önce doku canlılığının mümkün olduğunca korunması ve sitotoksik reaksiyonların önlenmesi gerekmektedir (214). ISO 10993-5 dökümanında *in vitro* sitotoksosite testleri için klinik protokoller sunulmuştur. Bu protokolde yer alan testler şunlardır (143, 214):

- 1) Direkt hücre kültürü
 - a) Direkt temas testi
 - b) Ekstrat testi

- 2) Agar difüzyon testi
- 3) Filtre difüzyon testi
- 4) Dentin bariyer testi

Sitotoksisite testlerinin değerlendirilmesi hücre sayılması, hücre boyanması, metabolik bozulma ve membran geçirgenliği gibi parametreler kullanılmaktadır. ISO 10993 ve ISO 7405 protokollerinin önerdiği sitotoksisite değerlendirme yöntemleri şunlardır (142, 143, 214):

- 1) Hücre canlılığını değerlendiren testler
- 2) Yaşamı değerlendiren testler
- 3) Hücre proliferasyonunu değerlendiren testler
- 4) Hücre metabolizmasını değerlendiren testler

Dental materyallerin sitoksisitesinin değerlendirilmesinin yanı sıra genotoksisitesini değerlendirmek de önem taşımaktadır. Bu şekilde materyal doku etkileşimi uyumu açısından daha güvenilir sonuçlar elde edilebilir (127).

2.4.2. Biyouyumluluk ve Genotoksisite

Biyoyumluluk çalışmalarında bir ilacın ya da tedavide kullanılacak bir materyalin genetik açıdan toksisitesinin değerlendirilmesi önemli bir parametredir. Genetik toksikoloji organizmaya ulaşan fiziksel, kimyasal ya da biyolojik etkenlere bağlı olarak DNA’da yarattığı hasarlar ve sonuçlarla ilgilenen bir bilim dalıdır (53, 313, 369).

Genotoksisite; herhangi bir etkenle meydana gelen DNA, kromozom ya da çekirdekteki hasarlar ile genomun devamlılığının bozulmasını ifade eden bir terimdir (16, 313). Mutajenite ise hücre ya da organizmaların genetik materyalinde kalıcı değişikliklerin indüklenmesini ifade eden bir terimdir. Bu değişiklikler tek bir geni ya da kromozom segmenti gibi bir gen bloğunu kapsayabilmektedir (16, 40). Bu bağlamda olası toksik bir materyalin genotoksisite ya da mutajenite açısından değerlendirilmesi önem kazanmaktadır. Bu testlerde; nokta mutasyonlar, kromozom sayısında ve yapısındaki kopma, silinme ya da yeniden düzenlenmesi gibi değişiklikler göz önünde bulundurulmalıdır (16, 277). Bu testler, kanser öncesi ya da erken neoplastik süreçlerle sonuçlanabilecek hücre bölünme fonksiyonundaki bozuklukları gösterebilmektedir.

Ayrıca genotoksik potansiyel, germ ya da somatik hücrelerde mutasyonlara yol açarak malformasyon, hastalık ya da diğer sağlık problemlerine yol açabilmektedir (224).

Karsinogenez süreci temelde başlangıç, tanıma ve ilerleme gibi üç aşama ile gerçekleşmektedir. Başlangıç aşamasında, hücreler UV, aflatoksin, X ışınları ya da kimyasal gibi pek çok ajana maruz kalmaktadırlar. Bu aşamada bu ajanlar mutasyona yol açabileceği gibi, tek başına neoplastik bir oluşuma yol açmamaktadır. Mutasyona sahip fakat hücresel fonksiyonu normal olan hücreler apoptoz mekanizmaları ile elimine olmaktadır. Diğer seçenekler ise hücrelerin bölünmeye başlaması ya da bölünmeyen evreye girmesidir. İkinci aşamada, tümör uyarıcısı olduğu düşünülen ajanların hücrelerde DNA sentezi ve mitotik aktiviteyi arttırması gerçekleşmektedir. Uyarının devam etmesi, hücrelerin bölünmeye devam etmesine sebep olmaktadır. Üçüncü aşamada ise iyi ya da kötü huylu neoplazmalar oluşmaya başlamaktadır. Genotoksik olaylara yol açan maddelere maruz kalan hücrelerde kromozomal ayrılmalar ve translokasyonlar ile DNA hasarları meydana gelmektedir. Bu aşamayı ise malinite takip edebilmektedir (103).

Kanser başlangıcı hem genotoksik hem de genotoksik olmayan mekanizmalarla ilişkilendirilebilmektedir (124, 125). Tanımlanan çoğu karsinojen, DNA mutasyonuna sebep olan ve kromozomal sapmayı tetikleyen genotoksik karsinojenlerdir (132). Bu açıdan kanserin önlenmesi adına, yeni bir kimyasalın ya da ilacın karsinojenik potansiyelinin belirlenebilmesi kritik önem taşımaktadır (351).

Ekonomik İşbirliği ve Kalkınma Örgütü (OECD), Ulusal Kanser Enstitüsü (NCI), Dünya Sağlık Örgütü (WHO) gibi önemli kuruluşlar, yeni bir ilaç ya da kimyasal ürünün kullanıma geçilmesinden önce çeşitli güvenlik testlerine tabi tutulmasını gerekli kılmıştır. Bir kimyasalın genotoksik potansiyelini belirlemek üzere çeşitli *in vitro* ve *in vivo* testlerle değerlendirilmesi önerilmektedir. Bu testler hiyerarşik bir düzende olmamakla beraber birbirlerini tamamlayıcı niteliktedir (16, 96, 293). Başlangıç karsinojeniteyi temsil eden genotoksik değerlendirilmelerde en sık kullanılan testler; Ames testi, Comet testi, Mikronükleus testi, Kromozom anormallikleri testi ve Kardeş kromatit değişimi testleridir (215, 313).

2.4.2.1. *Salmonella*/Mikrozom Mikrozom Mutajenite (Ames) Testi

21. yüzyılda bakteriyel genetik konusundaki bilgi düzeyinin artması sonucunda çeşitli genotoksinlere hassas özel bakteri suşlarının üretilmesi sağlanmıştır. *Escherichia coli* ve *Salmonella typhimurium* suşlarındaki mutasyonlar iyi tanımlanmıştır. Bu nedenle

mutajenite testlerinde bu özel bakteri suşları kullanılmaktadır. Bu testler ilk olarak 1972 yılında Bruce Ames tarafından geliştirilen hızlı, ucuz ve güvenilir testlerdir (8, 9, 313).

Bu test kapsamında, büyüme ve koloni kurmaları için gerekli aminoasit olan histidin'i sentezleyememesine sebep olan mutasyona sahip Salmonella suşu kullanılmaktadır. Bu suşlar, test edilecek bileşenle karşılaştığında var olan mutasyon bölgesinde yeni mutasyon gelişebilmekte ve gen fonksiyonunu onararak histidin sentez edebilme yeteneklerini kazanabilmektedir. Bu şekilde bakterilerin histidin varlığında büyüme ve koloni oluşturabilmeleri sağlanmaktadır. Bu nedenle bu testler 'tersine çevirme deneyi (reversion assay)' olarak da anılmaktadır. Sonuç olarak genotoksik olduğu şüpheli edilen bir bileşen varlığında, bakteri sayısı geri mutasyonla çoğalarak anlamlı olarak artmaktadır (193, 213, 313, 318).

2.4.2.2. Comet Testi

Comet testinin ya da diğer adıyla tek hücre jel elektroforezinin temeli ilk olarak 1984 yılında Ostling ve Johanson'un DNA fragmanlarının nötr koşullarda çekirdeğe doğru göç etmesini göstermesiyle atılmıştır (237). Bu tekniği Singh ve ark. geliştirerek, deneyin alkali bir ortamda yapıldığında özgünlüğünü ve tekrar edilebilir olduğunu göstermişlerdir (297). Standart hücre hattı (çin hamster yumurtalık hücresi vb.) ya da primer hücreler (İnsan lenfosit hücreleri vb.) ile gerçekleştirilebilen Comet testi ile tek ve çift sarmallı DNA kırılmaları, alkali kararsız bölgeleri, DNA onarım bozuklukları, DNA tek iplikçik kopması gibi DNA hasarlarını hassas bir biçimde tayin edebilmektedir (292, 322).

Testin prensibi, elektrik alanı altında, nükleoid gövdesinde ayrılan DNA parçalarının göç etmesi ve agaroz jel içerisinde bir DNA lekesi (kuyruklu yıldız kuyruğu) görüntüsü oluşturmaktır. DNA hasarı bu şekilde elektroforez tarafından oluşturulmuş ve çekirdekten dışarı doğru göç eden kuyruklu yıldızların uzunluğu, momentleri ya da kuyruktaki DNA miktarı saptanıp analiz edilmesiyle belirlenebilmektedir (71, 183). Diğer genotoksikite testlerine göre Comet testinin avantajları arasında düşük seviyelerde DNA hasarını belirleyebilmesi, örnek başına gereken hücre miktarının az olması, düşük maliyeti, kısa uygulama süresi ve uygulama kolaylığı sayılabilmektedir (72, 322).

2.4.2.3. Kromozom Anormallikleri (KA) Testi

Kromozom anormallikleri testi çevresel mutajen ve karsinojenleri belirlemek adına kullanılan hassas yöntemlerden birisidir (145). Bunun yanı sıra kromozom değişiklikleri neoplastik hücrelerin tipik özelliklerinden birisidir ve bu nedene bağlı olarak belirli kanser tiplerinin belirlenmesinde bu test yaygın olarak kullanılmaktadır (206, 371). İnsanlardaki genetik hastalıkların birçoğunda kromozomal sapmalar ve hasarlar temel neden olarak bilinmektedir. *In vitro* kromozom anormallik testinin amacı kültür edilmiş memeli hücrelerinde bu anomaliye neden olan bileşeni tespit etmektir (83, 144).

In vitro test kapsamında memeli hücre kültürü 1,5 hücre döngüsü süresi boyunca test edilecek maddeye maruz bırakılmaktadır. Kromozom morfolojisi metafaz aşamasında en belirgin olarak tespit edilebildiği için, kültür üzerine hücre bölünmesini metafaz aşamasında durduran bir madde (kolsişin, kolsemid vb.) uygulanmaktadır. Metafaz hücreleri, kromozom sapmaları ve anormallikleri bakımından mikroskopik olarak incelenerek analiz edilmektedir (84, 97, 234).

2.4.2.4. Kardeş Kromatit Değişimi (KKD) Testi

Kardeş kromatit değişimi testi, mitoz sırasında kardeş kromatitler arasında değiştirilen genetik materyalin fiziksel olarak ölçülmesine olanak sağlayan hassas özellikte bir genetik toksisite testidir (220, 276). Kardeş kromatit değişimi (KKD) genel anlamıyla yeni sentezlenen DNA zincirinde, iki kardeş kromatitin kopmuş kromozomlarındaki iplikçiklerin fiziksel olarak yer değiştirmesi ve yeniden birleşme sürecini kapsamaktadır. Potansiyel genotoksinler ya da mutajenler sebebiyle oluşan DNA hasarı ise kromatit değişimini indüklemektedir (17, 57, 354).

1938 yılında McClintock tarafından keşfedilen KKD olgusu (198), 1970'lerde timidin analogu gibi davranan BrdU'nun kromatitler arasında renk farklılığını göstermesiyle test haline getirildi (286). KKD test methoduna göre, BrdU varlığında hücre ilk replikasyon döngüsüne bırakılmaktadır. Bu döngüden sonra yeni sentezlenen DNA ipliği, BrdU içeren nükleotidden oluştuğu için ultraviyole altında farklı renkte gözükme ve böylelikle kardeş kromatit değişimi tespit edilebilmektedir (249, 313, 357).

2.4.2.5. Mikronükleus (MN) Testi

Mikronukleuslar, hücre bölünmesinin telofaz aşamasında ana çekirdeğe dahil edilmeyen kromatit ya da kromozom parçacıklarından temel alan küçük yapılar olarak tanımlanmaktadır. Çekirdek membranı tarafından sarılan bu yapılar ana çekirdeğe benzese de boyut olarak daha küçüktürler (91, 289). İlk olarak 19. yüzyılda Howell-Jolly cisimleri olarak kırmızı kan hücrelerinde tanımlanan mikronükleus (288), 20. yüzyılın ortalarında farklı patolojik koşullar altındaki kemik iliği hücrelerinde de keşfedilmiştir (64). İlerleyen zamanlarda MN oluşumunun diğer hücrelerde, özellikle lenfositlerde tanımlanmasıyla MN testinin toksik ajanların neden olduğu kromozomal hasarların ölçülmesinde kullanılabilecek bir yöntem olması önerilmiştir (87). MN oluşumunun genotoksite tayininde belirteç olarak kabul edilmesiyle hücre kültürlerini, skorlama yöntemlerini ve doz seviyelerini belirten protokoller önerilmiştir (128).

MN, kanser başlangıcının belirlenmesinde kromozomal anormallikler, kardeş kromatit değişimi ve anöploidi ile birlikte değerlendirilen dört ana belirteçten birisidir (337). MN ile kanser gelişimi arasındaki korelasyonun gösterildiği bazı çalışmalar yapılmıştır. Iarmarcovai ve ark., tedavi edilmemiş kanser hastalarının lenfositlerindeki MN'lerin anlamlı bir şekilde arttığını göstermiştir (141). Guler ve ark. akciğer kanseri hastalarında yüksek oranda spontan MN saptadıklarını bildirmiştir (117). Karaman ve ark., adenokarsinom hastalarında (152), Bolognesi ve ark. malign mezoteliyoma hastalarında MN frekansının yüksek olduğunu bildirmişlerdir (33). Genotoksik ajanların neden olduğu MN formasyonu ve oluşum mekanizmalarının anlaşılması bu nedenle kanserin tanı ve tedavisi için büyük bir öneme sahiptir. Bu mekanizmaların manipülasyonu ile MN oluşumunun önlenmesi ya da terapötik amaçla MN indüksiyonu sağlanabilme fikri doğmuştur (186).

Mikronukleus testi kimyasallar, ilaçlar, böcek ilaçları gibi çeşitli bileşenler ile X-ray radyasyonu, elektromanyetik alan gibi tehlikeli maruz kalımların mutajenitesini belirlemek üzere kullanılan *in vitro* ya da *in vivo* olarak kullanılabilen kolay ve yaygın bir testtir (247). MN testi *in vivo* olarak fare, balık ve semender larvası gibi hayvanlarda yapılabildiği gibi, *in vitro* olarak hücre kültürlerinde gerçekleştirilebilmektedir (87, 135, 247). *In vitro* mikronükleus testinde en sık kullanılan hücre ise insan periferik kan lenfositleridir (247, 313). Lenfosit hücreleri uzun bir hücre yaşamına sahip, dolaşıma katılan ve toksik bir madde tarafından hedef alınan hücreler olması nedeniyle

kullanılmaktadır (48). Bu durumun diğerk bir önemli sebebi ise, kanser hastalarının kanından elde edilen lenfositlerdeki MN artışı ile, kanserli dokudaki MN artışının paralel seyretmesi ve bu bulguyu en iyi şekilde yansıtmasıdır (52, 53, 75, 158, 159, 342).

Fenech ve ark.'na göre MN oluşum mekanizması kromozom malsegregasyonundan kaynaklanmaktadır. Bu durumu, hücre bölünmesindeki sentrometrik ya da parasentrometrik bölgelerdeki hipometilasyonlar, kinetokor hataları, işlevsiz iğler ve anafazda rol alan genlerdeki mutasyonlar ile açıklamaktadırlar. MN içeren kromozom ya da kromatitler ise DNA kırılmalarının tamir edilmemesiyle ya da eksik tamiriyle meydana gelmektedirler (91).

In vitro MN deneyi interfaz aşamasında hücre sitoplazmasında mikronükleus oluşumunu indükleyen kimyasalların tespitinde kullanılan bir sistemdir. Hücrelerin mitoz sırasında bir bölünme geçirmiş çekirdeklerin binükleat olarak tespit edilmesine olanak sağlamak üzere, aktin polimerizasyon inhibitörü olan sitokalsin B eklenmesiyle sitokinez blok yöntemi OECD 487'de tanımlanmış bir genotoksisite testi olarak kullanılmaktadır (88, 159). Buna göre test yönteminde periferik kan örneklerinden elde edilen hücreler kültür tüplerinde inkübe edildikten sonra, 24. saatte genotoksik potansiyeli incelenmek istenen maddenin ilavesi gerçekleştirilmektedir. İnkübasyon başlangıcının 44. saatinde ise sitokinezi bloke etmesi amacıyla sitokalsin-B maddesi eklenmektedir. Binükleatlı hücre aşamasında iken hücre bölünmesinin engellenmesinin amacı tam bu aşamada kromozom kayıp ve kırılmalarının tanımlanmasının mümkün olmasıdır (321). Süre sonunda santrifüj ve hipotonik eriyikle muamele edilmekte olup, tüplerdeki sıvı lamaların üzerine damlatılmaktadır. Giemsa tampon boyası ile boyanan lam preparatlar ışık mikroskobu altında incelenmektedir (89, 160, 272).

MN skorunun hesaplanmasında ise her bir preparatta 2000 hücre sayılmakta ve MN taşıyan hücre sayısı toplam hücre sayısına oranlanması ise yüzde olarak MN tespit edilebilmektedir (89, 323).

Fenech ve ark., MN skorlaması için çeşitli kriterler sunmuştur:

1. Hücreler binükleatlı olmalıdır.
2. Binükleat hücrelerdeki her iki çekirdek de aynı membrana sahip olmalı ve aynı sitoplazmik sınırlar içerisinde yer almalıdır.

3. İnsan lenfosit hücrelerinde gözlemlenen MN çapı ana çekirdeğin çapının 1/6'sı ile 1/3'ü arasında olmalıdır.
4. Mikronükleuslar yuvarlak ya da oval şekle sahip olmalıdırlar.
5. Mikronükleuslar ana çekirdeğe bağlı olmamalıdırlar.
6. Mikronükleuslar boyandığında, ana çekirdek ile aynı renk yoğunluğuna sahip olabilirler; bazen daha koyu olarak da boyanabilmektedirler (90).

Bonassi ve ark., Decordier ve ark. ve Elhajouji ve ark., *in vitro* MN testinin avantajlarını tartışmış ve testin çok hedefli, kanser için öngörü potansiyeli yüksek, otomasyona uygun bir genotoksik test olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca MN oluşumu *in vitro* ve *in vivo* olarak kolaylıkla ölçülebilmektedir (34, 66, 78). Potansiyel mutajen ve karsinojenlerin tespit edilmesinde ve tehlike ile risk değerlendirmesinde *in vitro* mikronükleus testlerinin kullanımı önerilmektedir (161).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma *in vitro* koşullarda İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi Yaşam Bilimleri ve Teknolojileri Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi. Çalışmanın genotoksisite incelemeleri için 18-35 yaş aralığında, akut ya da sistemik bir hastalığı bulunmayan, ilaç ya da radyasyon tedavisi görmeyen, sigara kullanmayan bireyden alınan kandan elde edilen lenfosit hücreleri kullanıldı. Çalışmanın biyoaktivite ve alkalen fosfataz aktivitesinin incelenmesi için insan dental pulpa kök hücreleri (hDPSC) kullanıldı.

Bu tez çalışması için; İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan onay alındı (Dosya No: 2018/28). Çalışmaya katılan gönüllüler için hazırlanmış olan ve çalışmanın amacını, kapsamını, risk ve yararlarını belirten 'Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu' okutuldu ve imzalı onayları alındı (Ek 1. Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu).

Bu tez çalışmasında kullanılan deney materyallerinin hazırlanması, sertleşme reaksiyonlarının tamamlanması ve örnek gruplar haline getirilmesi işlemleri İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Pedodonti Anabilim Dalı'nda gerçekleştirildi. Genotoksisite incelemeleri için mikronükleus testi, biyoaktivite ve alkalen fosfataz aktivitesinin incelemeleri için ELİSA işlemleri ise İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi Yaşam Bilimleri ve Teknolojileri Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi.

3.1. Gereç

3.1.1. Çalışmada Kullanılan Materyaller

Çalışmada kullanılan deney materyalleri (Şekil 3-1), içerik bilgileri ve üretici firmalara ait bilgiler (Tablo 3-1)'de gösterilmektedir.



Şekil 3-1: Çalışmadan kullanılan deney materyalleri

A) Biodentine™ B) NeoMTA C) BioMTA+ D) MTA CEM

Tablo 3-1: Çalışmada kullanılan deney materyalleri, içerik ve üretici firmaya ait bilgiler

Deney Materyali	İçerik	Üretici Firma
Biodentine™	<u>Toz:</u> trikalsiyum silikat, dikalsiyum silikat, kalsiyum karbonat, zirkonyum oksit <u>Likit:</u> su, kalsiyum klorit, modifiye polikarbosilat	Septodont, Saint-Maur des-Fosses, France
NeoMTA	<u>Toz:</u> trikalsiyum silikat, dikalsiyum silikat, kalsiyum sülfat, tantalit, silika <u>Likit:</u> su bazlı jel (minor oranlarda silikon dioksit, karbondioksit, karbonmonoksit)	NuSmile, Houston, Texas, USA
BioMTA+	<u>Toz:</u> kalsiyum oksit, hidroksiapatit, silikon oksit, demir oksit, alüminyum oksit, sodyum oksit, potasyum oksit, bizmut oksit, magnezyum oksit, kalsiyum fosfat <u>Likit:</u> saf su, kalsiyum katalist	Cerkamed, Poland
MTA CEM	<u>Toz:</u> trikalsiyum silikat, dikalsiyum silikat, trikalsiyum alüminat, bizmut oksit (MTA içeriği) <u>Likit:</u> distile su	Nexobio, Korea

3.1.2. Hücre Kültüründe Kullanılan Cihazlar, Aletler, Kimyasal ve Sarf Malzemeler

3.1.2.1. Cihaz ve Aletler

- Laminar akım (Laminar flow) hücre kültür kabini (Nüve, Ankara, Türkiye)
- CO₂'li inkübatör (Nüve, Ankara, Türkiye)
- Işık Mikroskobu (Zeiss Axio Observer, Germany)
- Invert mikroskop (Nikon Eclipse, Tokyo, Japan)
- Derin dondurucu (-80° C) (Nüve, Ankara, Türkiye)
- Santrifüj Cihazı (Nüve, Ankara, Türkiye)
- Buzdolabı (Hotpoint, Ariston, Marche, Italy)
- Otomatik pipet (10, 100, 1000'lik) (Axygen, Corning, NY, USA)
- Su banyosu (Weewell, Germany)
- Dijital fotoğraf makinası (Nikon J1)

3.1.2.2. Kimyasal Malzemeler

- L-Glutamin Solüsyonu (Thermo Fisher Scientific 25030024, MA, USA)
- Tripsin EDTA (Thermo Fisher Scientific 25300054, MA, USA)
- DMSO (Sigma-Aldrich D8418, St. Louis, MO, USA)
- Penisilin/Streptomisin (Thermo Fisher Scientific 15140122, MA, USA)
- Fosfat tamponu (PBS, Thermo Fisher Scientific 70011036, MA, USA)
- Fötal sığır serumu (FBS, Thermo Fisher Scientific 10270106, MA, USA)
- DMEM (Thermo Fisher Scientific 31885023, MA, USA)
- HEPES/ TNS/ Tripsin EDTA (Lonza Pharma& Biotech, Basel, Switzerland)
- İnsan Dental Pulpa Kök Hücresi (Lonza Group, Basel, Switzerland)
- Human Dental Pulp Stem Cells Bullet Kit PT-3005 (Lonza Pharma& Biotech, Basel, Switzerland)

3.1.2.3. Sarf Malzemeler

- Tek kullanımlık, 25 cm² steril hücre kültür flaskı
- Tek kullanımlık, 75 cm² steril hücre kültür flaskı
- 15 ml'lik steril falkon tüp
- 50 ml'lik steril falkon tüp
- 5 ml'lik Serolojik pipet
- 10 ml'lik serolojik pipet
- 6 kuyulu steril hücre kültür plağı
- 12 kuyulu steril hücre kültür plağı
- 24 kuyulu steril hücre kültür plağı
- Cryovial
- 0.22 mikrometre steril süzme filtresi

3.1.3. Genotoksisite İncelemesinde Kullanılan Cihazlar, Kimyasal ve Sarf Malzemeler

3.1.3.1. Cihazlar

- Invert mikroskop (Nikon Eclipse, Tokyo, Japan)
- Laminar akım (Laminar flow) hücre kültür kabini (Nüve, Ankara, Türkiye)
- CO₂'li inkübatör (Nüve, Ankara, Türkiye)
- Hassas terazi (Desis, İstanbul, Türkiye)

3.1.3.2. Kimyasal Malzemeler

- Kromozom Medyumu
- % 0.4 KCl hipotonik eriyiğı
- Sitokalsin B (Sigma-Aldrich C6762, St. Louis, MO, USA)
- 1:5:6 Glasiyal asetik asit/Metanol/NaCl
- 1:5 Glasiyal asetik asit/Metanol

- Giemsa boyası (Sigma-Aldrich G5637, St. Louis, MO, USA)
- Sorenson Tamponu
- İmmersiyon yağı
- Tetrakonazol

3.1.3.3. Sarf Malzemeler

- 15 ml'lik steril falkon tüp
- Lam ve lamel
- Filtre kağıdı
- Pasteur pipeti

3.1.4. Biyoaktivite İncelenmesinde Kullanılan Cihazlar ve Kitler

3.1.4.1. Cihazlar

- ELISA mikro plaka okuyucusu (Thermo Scientific, Massachusetts, USA)

3.1.4.2. Kitler

- ELISA Kit for Human BMP-2 (Bone Morphogenetic Protein 2) (Elabscience, Houston, Texas, USA)
- ELISA Kit for Human FGF (Fibroblast Growth Factor) (Elabscience, Houston, Texas, USA)
- ELISA Kit for Human VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, MA, USA)

3.1.5. Alkalen Fosfataz Enzim Aktivitesinin İncelenmesinde Kullanılan Cihazlar ve Kitler

3.1.5.1. Cihazlar

- ELISA mikro plaka okuyucusu (Thermo Scientific, Massachusetts, USA)

3.1.5.2. Kitler

- ELISA Kit for Alkaline Phosphatase, Liver/ Bone/ Kidney (ALPL) (Elabscience, Houston, Texas, USA)

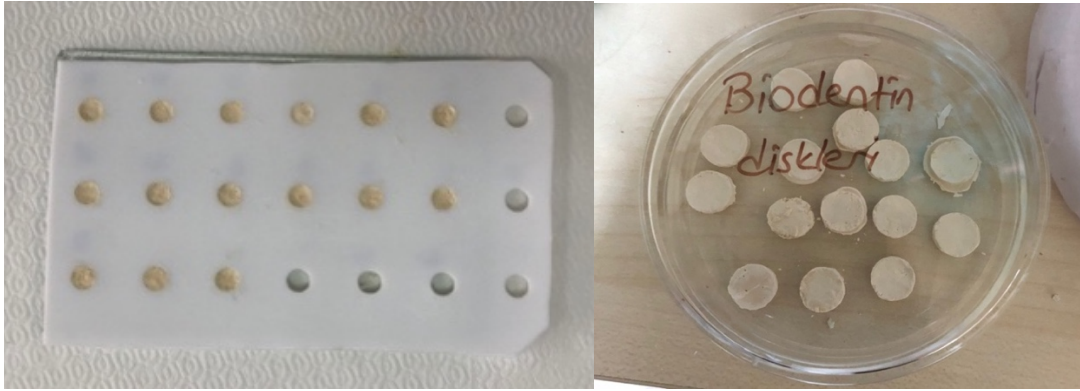
3.2. Yöntem

3.2.1. Deney Materyallerinin Örnek Gruplar Halinde Hazırlanması

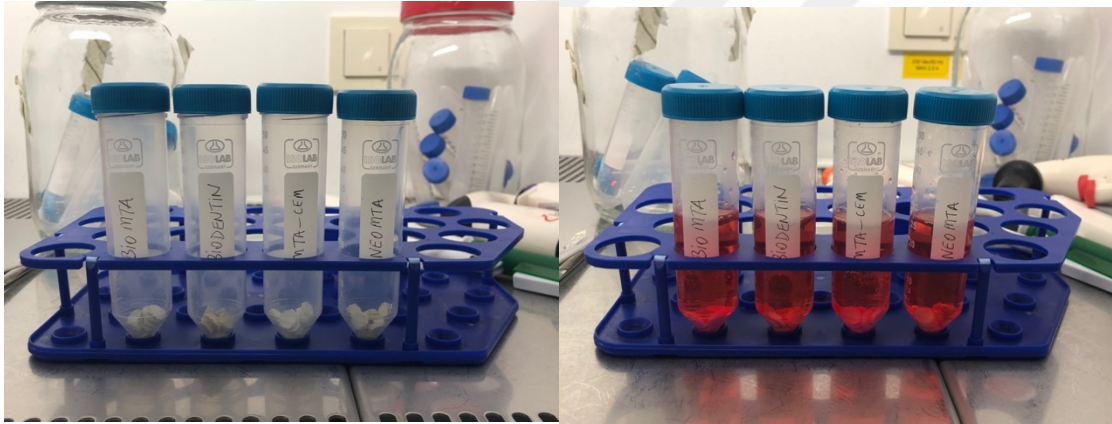
Bu çalışmada dört adet biyoseramik esaslı dental materyalin (NeoMTA, Biodentine™, MTA CEM, BioMTA) genotoksik etkileri, biyoaktiviteleri ve alkalen fosfataz aktivitesi karşılaştırmalı olarak incelendi. Deney gruplarını oluşturmak üzere kullanılan materyal örnekleri üretici firmaların talimatı doğrultusunda karıştırılarak hazırlandı (Tablo 3-2). Katı formdaki materyallerin salınım (ekstrat) sıvıları elde edilmek üzere ekstrat yolu ile direkt temas yöntemi kullanıldı. Bu yöntemde göre ISO 10993-5 standartlarında belirtildiği üzere 0.5-6cm²/ml yüzey/besiyeri özelliğini karşılayacak şekilde 8 mm genişliğe, 2 mm derinliğe sahip olan teflon kalıplar kullanıldı (Şekil 3-2). Her bir materyalden 15 adet disk şeklinde örnek steril koşullar altında hazırlandı ve sertleşme reaksiyonlarını tamamlamaları için 4 saat bekletildi. Sertleşmesi tamamlanan örnekler bakteri, mantar ve maya kontaminasyonunun önlenmesi amacıyla 30 dakika ultraviyole (UV) altında bekletildi. Bu işlemde sonra örnek diskler 4 adet 50'lik falkon tüplerine alındı ve üzerlerine DMEM eklenerek 24 saat boyunca 37±2°C'de bekletilerek salınım (ekstraksiyon sıvıları) elde edildi (Şekil 3-3). Elde edilen salınım sıvı örnekleri 1500 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüj edildi. Bu işlemde sonra kontaminasyon riskini önlemek amacıyla sıvı örnekleri 0,22 mikronluk steril süzme filtresinden geçirildi. Elde edilen son örnekler deney gününe kadar -20°C' de muhafaza edildi.

Tablo 3-2: Deney materyallerinin üretici firmaların önerileri doğrultusunda hazırlanmaları

Biodentine™	Biodentine™ içeren kapsül içerisine likitten 5 damla ilave edililerek amalgamatörde 30 saniye karıştırılarak hazırlandı.
NeoMTA	1 kaşık toz (0.1 gram), 1-2 damla likit ile karıştırılarak hazırlandı.
BioMTA+	1 paket toz (0.14 gram), 1-2 damla likit ile karıştırılarak hazırlandı.
MTA CEM	1 paket toz (0.14 gram), 1-2 damla likit ile karıştırılarak hazırlandı.



Şekil 3-2: Deney materyallerinin teflon kalıplarda diskler halinde hazırlanması



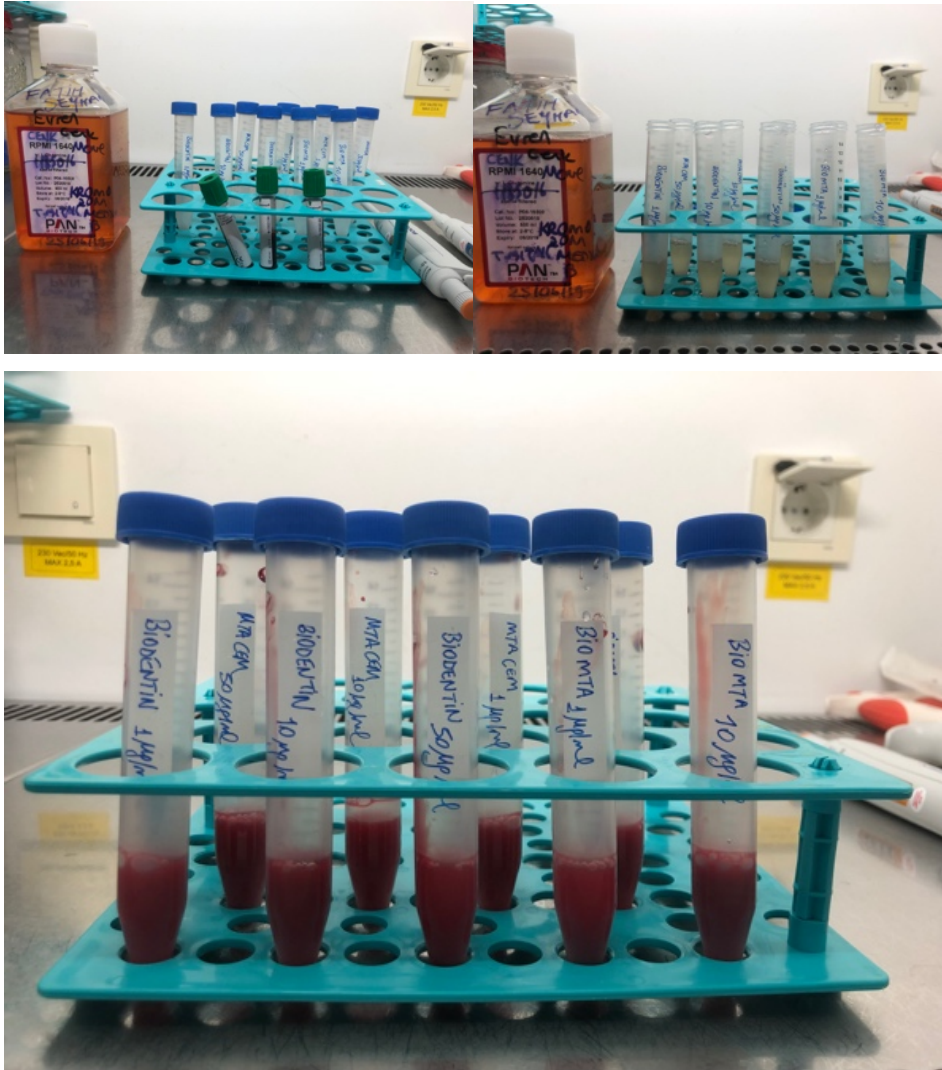
Şekil 3-3: Sertleşmesi tamamlanmış deney materyallerinin salınım sıvılarını elde etmek üzere medyum içerisinde 24 saat boyunca inkübe edilmesi

3.2.2. Genotoksisite İncelenmesi

3.2.2.1. Kan örneklerinin alınması ve kültür edilmesi

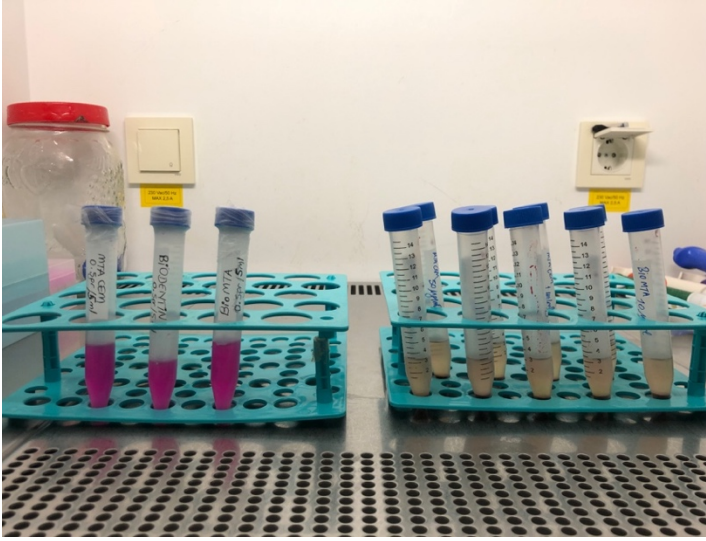
Çalışmanın genetik toksisite testi için insan periferik kan lenfosit hücreleri kullanıldı. Bu amaçla; sigara içmeyen, kronik bir hastalığı bulunmayan ve ilaç kullanılmayan bir bireyden bilgilendirilmiş gönüllü onam formu imzalatılarak 1/10 oranında heparinize kan örneği alındı. Lenfositlerin çoğalması için uygun besin ve mitojen (PHA) içeren Kromozom medyumları hazırlandı. Hazırlanan besiyerinden 2.5 ml olacak şekilde steril tüplere aktarıldı. Alınan periferik kan örnekleri steril ortamda her bir

tüpe 300 µl olacak şekilde ekildi ve toplamda 72 saat süreyle $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de inkübasyona bırakıldı (Şekil 3-4).



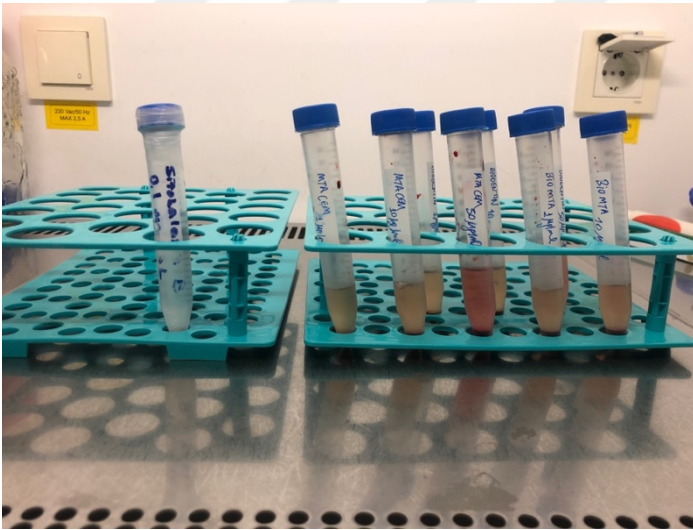
Şekil 3-4: Tek bir donörden alınan periferik kan örneklerinin kromozom medyumuna içerisine ekilmesi ve kültür edilmesi

MN testi için her bir deney materyalinin stok halinde hazırlanmış üst sıvılarının 1, 10 ve 50 µg/ml'lik üç ayrı dozu ve pozitif kontrol grubu olarak tetrakonazol maddesi kullanıldı. İnkübasyonun 24. saatinde test edilmesi planlanan dozlar, tüplere eklendi ve yeniden inkübatöre alındı (Şekil 3-5).



Şekil 3-5: Deney materyallerine ait salınım sıvılarının üç ayrı doz halinde tüplere eklenmesi

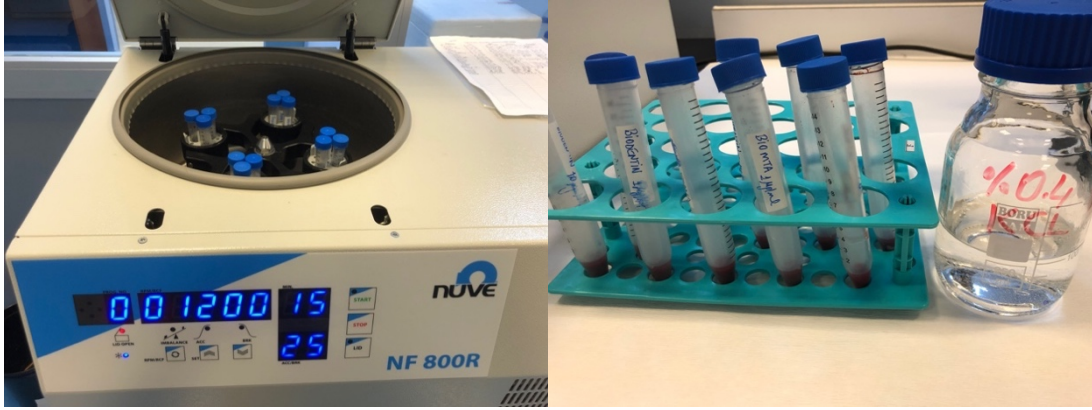
Sitokinezi durdurması ve iki çekirdekli hücre oluşumunu sağlaması amacıyla inkübasyonun 44. saatinde tüm kültür tüplerine 8 µg/ml olacak şekilde sitokalsin B maddesi eklendi. Kültür süresinin bitimi olan 72. saatte tüm tüpler 1200 rpm’de 15 dakika santrifüj edildi (Şekil 3-6).



Şekil 3-6: 44. saatte kültür tüplerine sitokinezi durdurması amacıyla sitokalsin B maddesinin eklenmesi

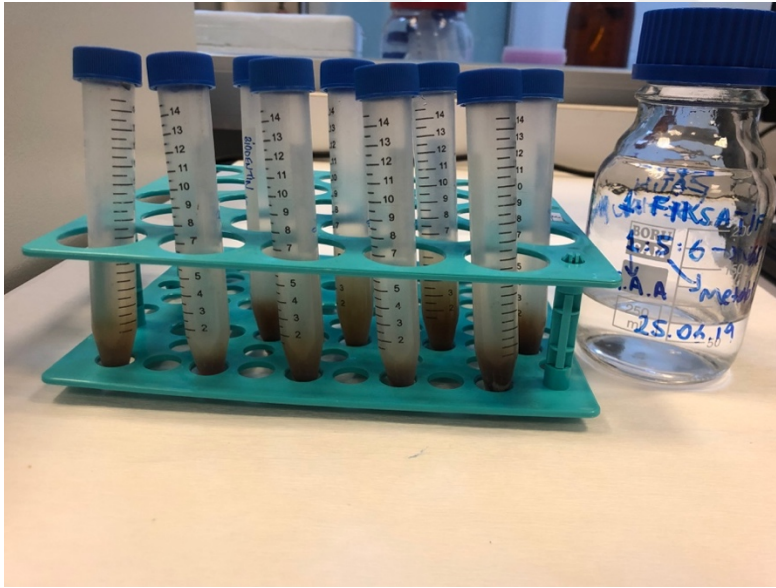
3.2.2.2. Preparatların Hazırlanması ve Boyanması

Santrifüj edilen tüplerden süpernatant atıldı ve 37°C’de ısıtılmış %0,4’lük 5 ml KCl içeren hipotonik eriyik tüplere yavaşça ve damlalar halinde eklendi. Yeniden santrifüj işlemi gerçekleştirildi ve süpernatant uzaklaştırıldı (Şekil 3-7).



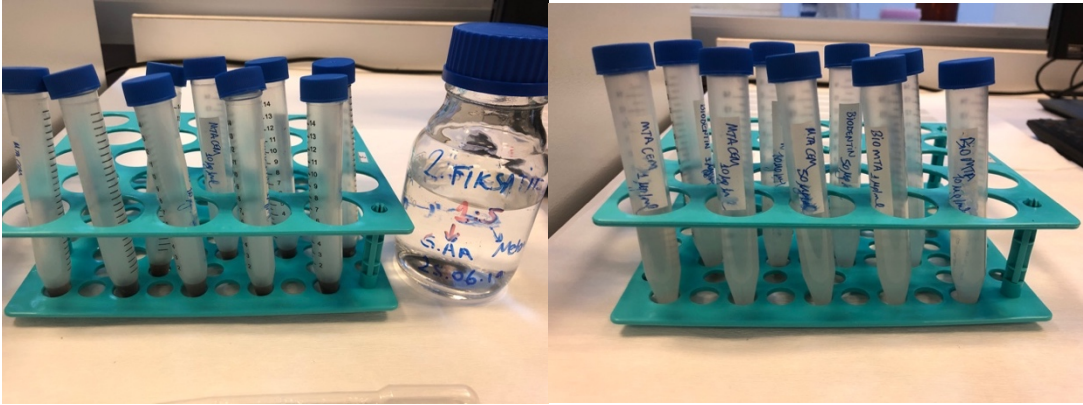
Şekil 3-7: Kültür süresinin bitiminde tüplerin santrifüj edilmesi ve hipotonik eriyikle muamele edilmesi

Bu aşamadan sonra tüpte kalan sıvıların birinci fiksatif ile etkileşimi gerçekleştirildi. Bunun için 1/5/6 oranında hazırlanmış glasiyal asetik asit/ metanol/ %0.9 NaCl buzdolabında soğutulduktan sonra, damlalar halinde tüplere eklendi. 20 dakikalık etkileşimden sonra santrifüj edildi ve süpernatant atıldı (Şekil 3-8).



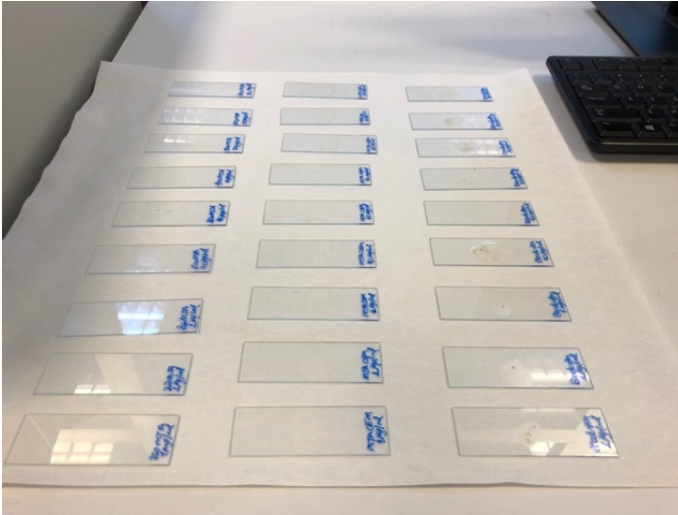
Şekil 3-8: Kültür tüplerinin 1. fiksatif ile 20 dakika boyunca muamele edilmesi ve süpernatantın uzaklaştırılması

Tüplere 1/5 oranında hazırlanmış asetik asit/metanol içeren ikinci fiksatif tüplerde kalan sıvının üzerine yine soğuk olarak ve damlalar halinde ilave edildi. Oda sıcaklığında 20 dakikalık etkileşimden sonra santrifüj işlemi gerçekleştirildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Tüpteki sıvılar berrak görüntü verene kadar ikinci fiksasyon işleminin tekrarı yapıldı (Şekil 3-9).



Şekil 3-9: Kültür tüplerine 2. fiksatifin eklenmesi ve bu aşamanın tekrarlanması sonucu tüpteki sıvıların berrak hale gelmesi

Son süpernatant uzaklaştırması tamamlandıktan sonra tüpteki sıvılar yeniden pastör pipeti yardımıyla süspanse edildi. Alkol ile temizlenmiş ve soğuk bir ortamda alkolde bekletilmiş lamaların üzerine tüplerin içindeki bu sıvı damlatılarak preparatların hazırlanması sağlandı (Şekil 3-10). 24 saatlik sürenin ardından preparatların kuruması tamamlandıncı lamalar, taze % 5'lik Giemsa eriyiği ile 14 dakika boyunca boyandı. Boyaların fazlası distile su ile uzaklaştırılarak hazırlanan preparatlar kurutulmaya bırakıldı. Daimi şekilde hazırlanmış preparatlar invert mikroskopta 400x büyütmede incelendi ve fotoğraf çekilerek sayım işlemleri gerçekleştirildi.

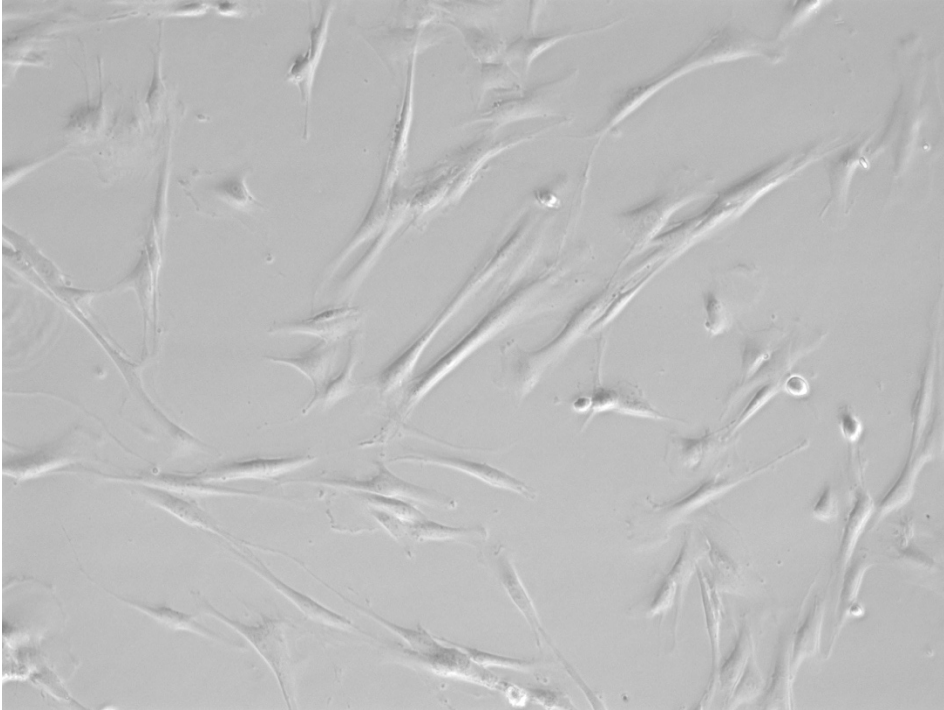


Şekil 3-10: Kültür tüplerindeki sıvının lamalar üzerine damlatılarak lam preparatlarının hazırlanması

3.2.3. İnsan Dental Pulpa Kök Hücrelerinin (hDPSC) Ekimi ve Çoğaltılması

Çalışmanın biyoaktivite ve alkalen fosfataz aktivitesinin incelenmesi için ticari olarak bulunan insan dental pulpa kök hücre hattı (hDPSC) (Lonza Group, Basel, İsviçre) kullanıldı. Deney gününe kadar azot tankında saklanan hücreler, ekim işlemi için su banyosunda çözdürüldü ve oda sıcaklığına getirildi. Hücrelerin ekimi ve çoğaltılması için gerekli ortam olan besiyeri üretici firmanın önerdiği şekilde hazırlandı. Hücreler, laminar akımlı kabin içerisinde besiyeri içeren 75 cm²'lik kültür flaskının içerisine yerleştirildi ve 37°C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde bekletildi. 5 gün sonunda %80 konfluent hale gelen hücreler alt kültürleme işlemine alındı (Şekil 3-11).

Pasajlama işleminde, hücre kültür flasklarından besiyeri uzaklaştırıldıktan sonra, önce 4 ml HEPES ile yıkandı, daha sonra 2 ml tripsin EDTA solüsyonu eklenerek inkübatörde bekletildi. Bu işlem ile hücrelerin flask tabanından ayrılması sağlandı. Kültür flaskları 4 ml TNS ile yıkandıktan sonra ise hücreler yeni steril falkon tüplerine alındı. Tüpler 5 dakika 1500 rpm'de santrifüj edildi ve yeni kültür flaskına ekimi gerçekleştirildi. Aynı işlemler tekrar edilerek elde edilmiş olan üçüncü pasaj hücreler deneylerde kullanıldı.



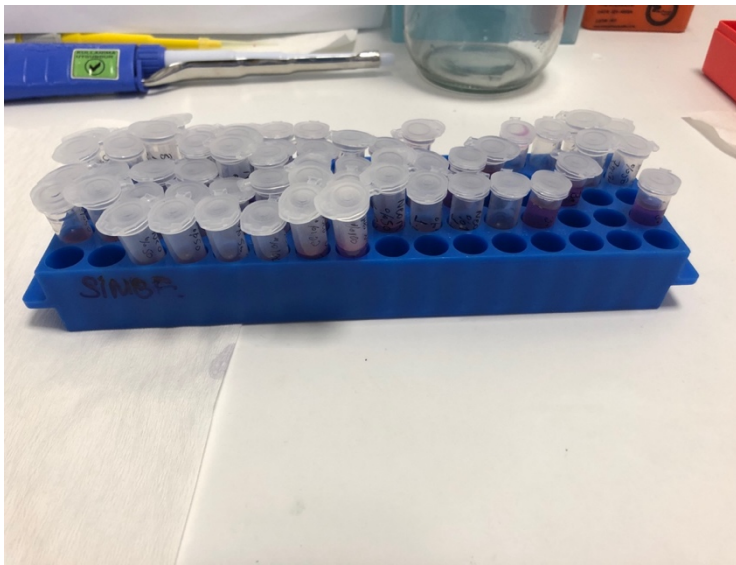
Şekil 3-11: %80 konfluent hale gelen hDPSC hücrelerinin mikroskopik görüntüsü

3.2.4. Biyoaktivite İncelenmesi

Biyoaktivite incelemeleri (VEGF, FGF ve BMP ELİSA testleri) için 12 kuyucuklu plaklara 1×10^5 hücre/kuyu olacak şekilde ekildi. Önceden toplanmış olan salınım sıvıları oda sıcaklığına getirilerek %50 ve %100'lük formlarında üç ayrı plakaya eklendi (Şekil 3-12). 1., 3. ve 7. günde üst sıvılar ependorflara alındı (Şekil 3-13) ve ELİSA işlemlerine kadar -80°C 'de muhafaza edildi.



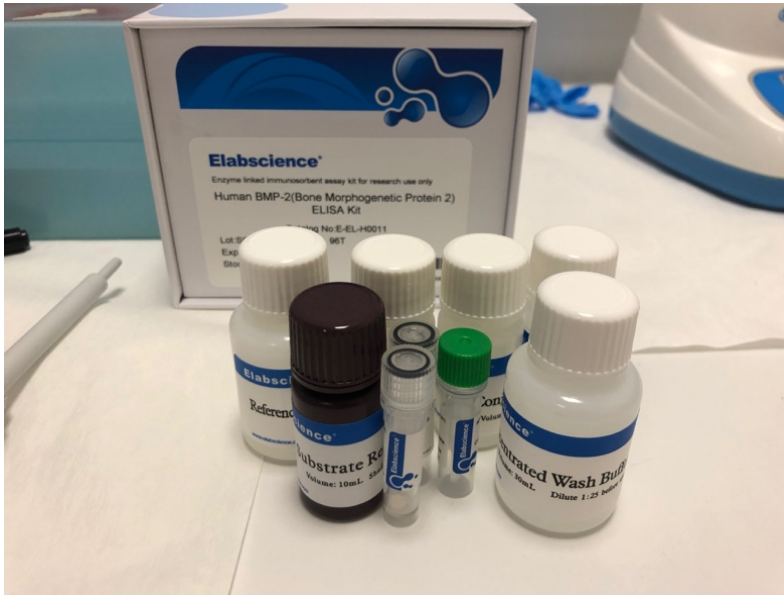
Şekil 3-12: Konsantrasyonlara göre (%50 ve %100) materyal salınım sıvılarının uygulandığı hücre ekimi yapılmış plaklar



Şekil 3-13: 1., 3. ve 7. günde toplanmış üst sıvıların ependorflar içerisinde -80°C 'de muhafaza edilmesi

3.2.4.1. ELİSA ile BMP-2 Düzeyi Tayini

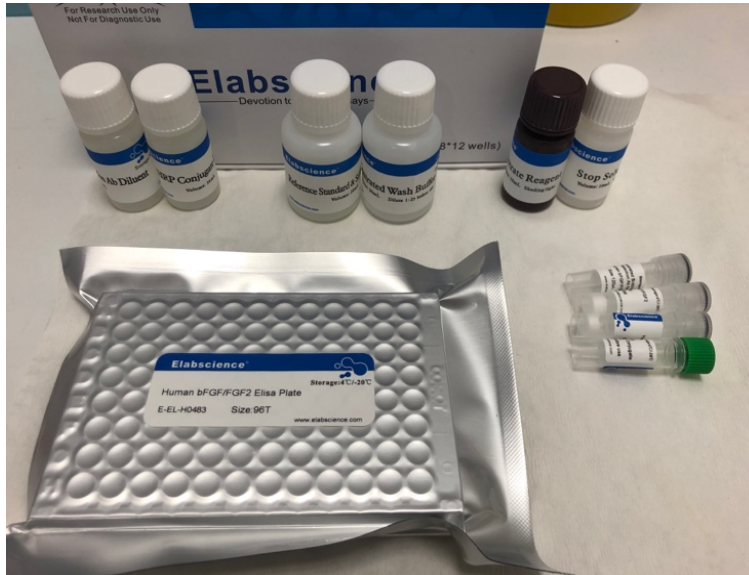
1., 3. ve 7. günde toplanan her iki konsantrasyondaki salınım sıvıları ve herhangi bir deney materyali ile muamele edilmemiş kontrol grubu örnekleri -80°C 'den alınarak oda sıcaklığına getirildi. Bu yöntemde BMP-2'ye özgü antikor ile kaplanmış olan 96 kuyucuklu BMP-2 ELİSA kiti kullanıldı (Şekil 3-14). Teste ait olan standartlar, reaktifler ve solüsyonlar üretici firmanın talimatları doğrultusunda hazırlandı. Standart kuyucuklarına iki tekrarlı olacak şekilde 100'er μl standart solüsyonu ve kalan kuyucuklara 100 μl deney gruplarına ait salınım sıvısı örnekleri üç tekrarlı olacak şekilde ilave edilerek 37°C 'de 90 dakika boyunca inkübe edildi. İnkübasyon bitiminde kuyucuklardaki sıvılar aspire edilerek tüm kuyulara 100 μl Biotinylated Detection Ab eklendi ve 37°C 'de 1 saat inkübasyona bırakıldı. Kuyucuklardan sıvılar aspire edildi ve 3 kez yıkama çözeltisi ile yıkandı. Kuyulara 100 μl HRP Konjugat eklendi ve 30 dakika 37°C 'de inkübe edildi. Kuyular yıkama çözeltisi ile 5 kez yıkandı. 90 μl Substrat Reagent eklenerek 15 dakika 37°C 'de inkübe edildi. Renk değişikliği gözlemlendiğinde 50 μl durdurma çözeltisi eklendi ve hemen ardından 450 nm dalga boyunda okundu. BMP-2 konsantrasyonları, standart örneklerinin konsantrasyonları baz alınarak çizilen standart eğrisiyle karşılaştırılarak hesaplandı. Sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildi.



Şekil 3-14: ELISA Kit for Human BMP-2 (Bone Morphogenetic Protein 2) (Elabsience, Houston, Texas, USA)

3.2.4.2. ELİSA ile FGF-2 Düzeyi Tayini

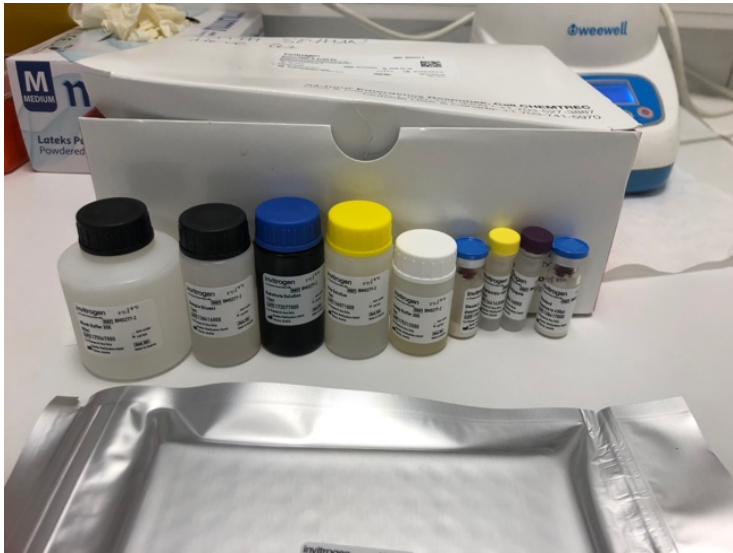
1., 3. ve 7. günde toplanan her iki konsantrasyondaki salınım sıvıları ve kontrol grubu örnekleri -80°C'den alınarak oda sıcaklığına getirildi. Bu yöntemde FGF-2'ye özgü antikor ile kaplanmış olan 96 kuyucuklu FGF-2 ELİSA kiti kullanıldı (Şekil 3-15). Teste ait olan standartlar, reaktifler ve solüsyonlar üretici firmanın talimatları doğrultusunda hazırlandı. Standart kuyucuklarına iki tekrarlı olacak şekilde 100'er µl standart solüsyonu ve kalan kuyucuklara 100 µl deney gruplarına ait salınım sıvısı örnekleri üç tekrarlı olacak şekilde ilave edilerek 37°C'de 90 dakika boyunca inkübe edildi. İnkübasyon bitiminde kuyucuklardaki sıvılar aspire edilerek tüm kuyulara 100 µl Biotinylated Detection Ab eklendi ve 37°C'de 1 saat inkübasyona bırakıldı. Kuyucuklardan sıvılar aspire edildi ve 3 kez yıkama çözeltisi ile yıkandı. Kuyulara 100 µl HRP Konjugat eklendi ve 30 dakika 37°C'de inkübe edildi. Kuyular yıkama çözeltisi ile 5 kez yıkandı. 90 µl Substrat Reagent eklenerek 15 dakika 37°C'de inkübe edildi. Renk değişikliği gözlemlendiğinde 50 µl durdurma çözeltisi eklendi ve hemen ardından 450 nm dalga boyunda okundu. FGF-2 konsantrasyonları, standart örneklerinin konsantrasyonları baz alınarak çizilen standart eğrisiyle karşılaştırılarak hesaplandı. Sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildi.



Şekil 3-15: ELISA Kit for Human FGF (Fibroblast Growth Factor) (Elabsience, Houston, Texas, USA)

3.2.4.3. ELİSA ile VEGF Düzeyi Tayini

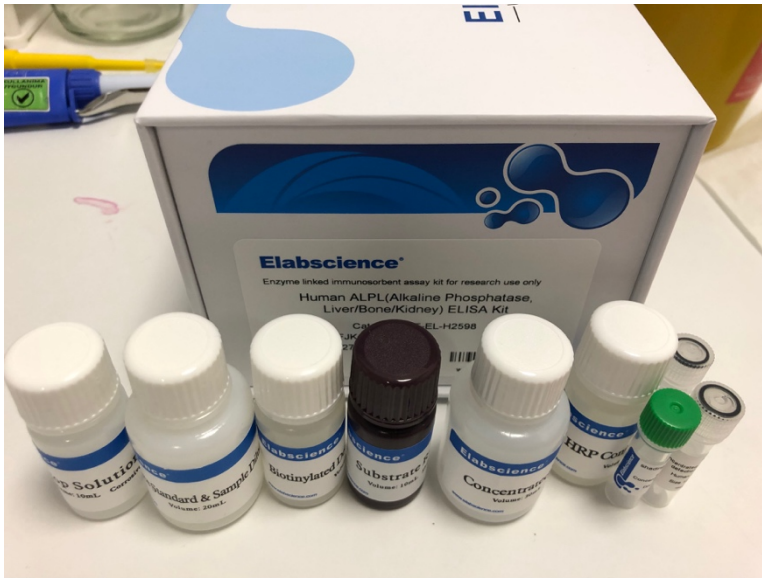
1., 3. ve 7. günde toplanan her iki konsantrasyondaki salınım sıvıları ve kontrol grubu örnekleri -80°C'den alınarak oda sıcaklığına getirildi. Bu yöntemde VEGF'e özgü antikor ile kaplanmış olan 96 kuyucuklu VEGF ELİSA kiti kullanıldı (Şekil 3-16). Teste ait olan standartlar, reaktifler ve solüsyonlar üretici firmanın talimatları doğrultusunda hazırlandı. Standart kuyucuklarına iki tekrarlı olacak şekilde 100'er µl standart solüsyonu ve kalan kuyucuklara 100 µl deney gruplarına ait salınım sıvısı örnekleri üç tekrarlı olacak şekilde ilave edildi. 96 kuyucuklu plaka 2 saat boyunca 37°C'de inkübasyona bırakıldı. Kuyucukların içi aspire edildi ve 6 kez yıkama çözeltisi ile yıkandı. 100 µl Biotin-Konjugatı eklendi ve 1 saat 37°C'de inkübe edildi. Kuyucukların içi aspire edildi ve yeniden 6 kez yıkama çözeltisi ile yıkandı. 100 µl Streptavidin-HRP tüm kuyulara eklenerek 1 saat 37°C'de inkübe edildi. Kuyucuklar 6 kez yıkama çözeltisi ile yıkandıktan sonra 100 µl TMB substrat solüsyonu eklendi ve karanlık bir film ile örtülerek 30 dakika boyunca inkübe edildi. Renk değişikliği gerçekleştiğinde 100 µl durdurma çözeltisi ilave edildi ve hemen ardından 450 nm dalga boyunda okundu. VEGF konsantrasyonları, standart örneklerinin konsantrasyonları baz alınarak çizilen standart eğrisiyle karşılaştırılarak hesaplandı. Sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildi.



Şekil 3-16: ELISA Kit for Human VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, MA, USA)

3.2.5. ELİSA ile Alkalen Fosfataz Aktivitesinin Tayini

1., 3. ve 7. günde toplanan her iki konsantrasyondaki salınım sıvıları ve kontrol grubu örnekleri -80°C'den alınarak oda sıcaklığına getirildi. Bu yöntemde ALP'ye özgü antikor ile kaplanmış olan 96 kuyucuklu ALP için ELİSA kiti kullanıldı (Şekil 3-17). Teste ait olan standartlar, reaktifler ve solüsyonlar üretici firmanın talimatları doğrultusunda hazırlandı. Standart kuyucuklarına duplikat olacak şekilde 100'er µl standart solüsyonu ve kalan kuyucuklara 100 µl deney gruplarına ait salınım sıvısı örnekleri ilave edilerek 37°C'de 90 dakika boyunca inkübe edildi. İnkübasyon bitiminde kuyucuklardaki sıvılar aspire edilerek tüm kuyulara 100 µl Biotinylated Detection Ab eklendi ve 37°C'de 1 saat inkübasyona bırakıldı. Kuyucuklardan sıvılar aspire edildi ve 3 kez yıkama çözeltisi ile yıkandı. Kuyulara 100 µl HRP Konjugat eklendi ve 30 dakika 37°C'de inkübe edildi. Kuyular yıkama çözeltisi ile 5 kez yıkandı. 90 µl Substrat Reagent eklenerek 15 dakika 37°C'de inkübe edildi. Renk değişikliği gözlemlendiğinde 50 µl durdurma çözeltisi eklendi ve hemen ardından 450 nm dalga boyunda okundu. ALP konsantrasyonları, standart örneklerinin konsantrasyonları baz alınarak çizilen standart eğrisiyle karşılaştırılarak hesaplandı. Sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildi.



Şekil 3-17: ELISA Kit for Alkaline Phosphatase, Liver/ Bone/ Kidney (ALPL) (Elabscience, Houston, Texas, USA)

3.3. Verilerin İstatiksel Olarak İncelenmesi

Çalışmanın genotoksisite incelenmesinde elde edilen bulguların değerlendirilmesinde veriler, GraphPad Prism 6 programı ile analiz edildi. Veriler Tek Yönlü Anova testi ile analiz edildi ve post hoc doğrulama testi olarak Dunnet testi ile Sidak testi kullanıldı. Anlamlılık düzeyi $p<0,05$ olarak alındı.

Çalışmanın biyoaktivite ve ALP aktivitesi değerlendirmesinde elde edilen ELİSA bulgularının değerlendirilmesinde veriler IBM SPSS V23 programı ile analiz edildi. Grup ve zaman ana etkilerinin ve etkileşimlerinin ALP, BMP-2, FGF-2 ve VEGF üzerindeki etkisinin incelenmesi geliştirilmiş lineer modeller yöntemi ile gerçekleştirildi ve ortalamaların karşılaştırılmasında Wald Chi-Square testi kullanıldı. Aynı şekilde grup, konsantrasyon ve zaman ana etkilerinin ve etkileşimlerinin ALP, BMP-2, FGF-2 ve VEGF üzerindeki etkisinin incelenmesi geliştirilmiş lineer modeller yöntemi ile gerçekleştirildi ve ortalamaların karşılaştırılmasında Wald Chi-Square testi kullanıldı. Analiz sonuçları nicel veriler için ortalama ve standart sapma olarak sunuldu. Anlamlılık düzeyi $p<0,05$ olarak alındı.

4. BULGULAR

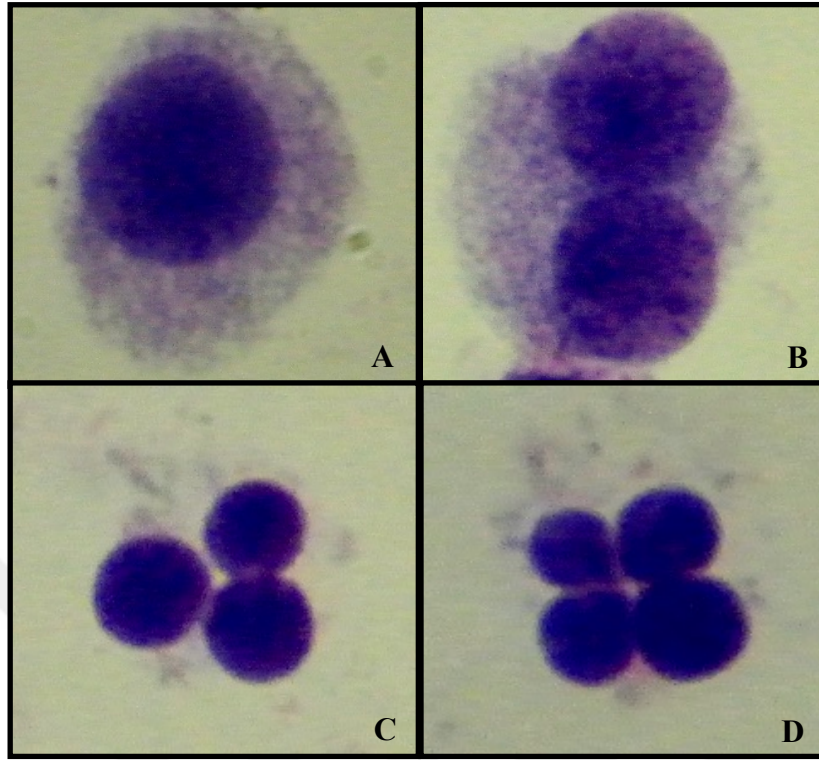
4.1. Genotoksisite Analizine Ait Bulgular

4.1.1. Materyallere Ait Salınım Sıvılarının Uygulandığı İnsan Periferal Lenfosit Hücrelerinin Mikroskopik Görüntüleri

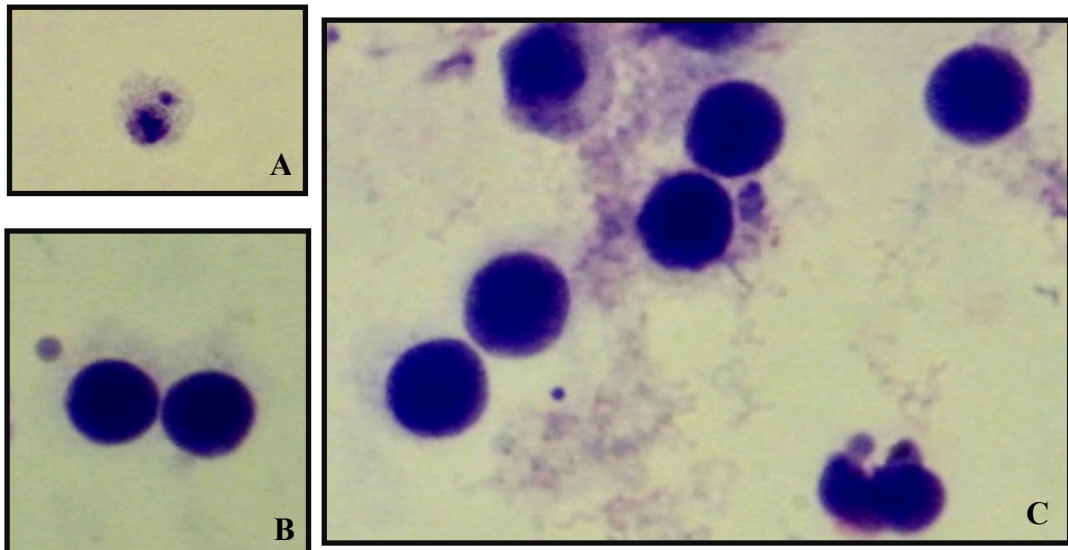
Materyal salınım sıvıları içeren deney ve pozitif kontrol grubu, periferal kan içeren tüplerde 48 saat boyunca inkübe edilmiştir. Sitokinezin bloke edilmesiyle oluşan binükleat hücreler ile mononükleat, trinükleat, tetranükleat hücrelere ait invert mikroskop görüntüleri Şekil 4-1’de gösterilmektedir.

Binükleat hücreler, eklenen sitokalsin B maddesi nedeniyle, çekirdek bölünmesini gerçekleştirmiş ancak sitoplazma bölünmesi gerçekleşmemiş hücrelerdir. Mikroskopik görüntülere göre binükleat hücrelerin oval ya da yuvarlak morfolojik özellik gösterdiği görülmektedir. Binükleat hücrelerde oluşumu gözlenen mikronükleuslar ise aynı şekilde boyanmış oval ya da yuvarlak özellik göstermekte, ana çekirdekten sınırları belirgin bir biçimde ayrılmış olup ana çekirdeğin 1/3’ü ya da daha küçük oranlarda çaplara sahip olduğu görülmektedir. Pozitif kontrol grubunda sayı olarak ve yaygın dağılım gösteren mikronükleus içeren binükleat hücreler Şekil 4-2’de görülmektedir.

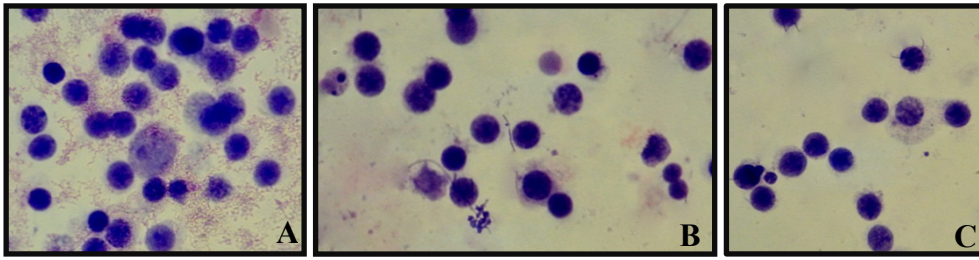
Deney gruplarında ise mikronükleus içeren binükleat hücre sayısı ve yüzdesi kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde daha az olarak görülmektedir (Şekil 4-3, Şekil 4-4, Şekil 4-5 ve Şekil 4-6).



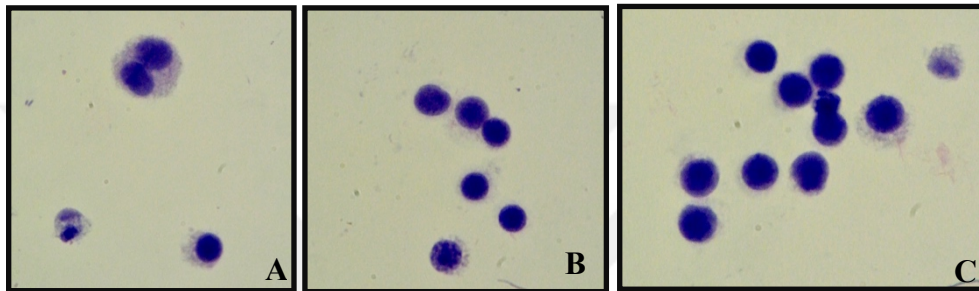
Şekil 4-1: Mononükleat hücre (A), binükleat hücre (B), trinükleat hücre (C) ve tetranükleat hücrelerin (D) mikroskopik görüntüleri (x400 büyütme)



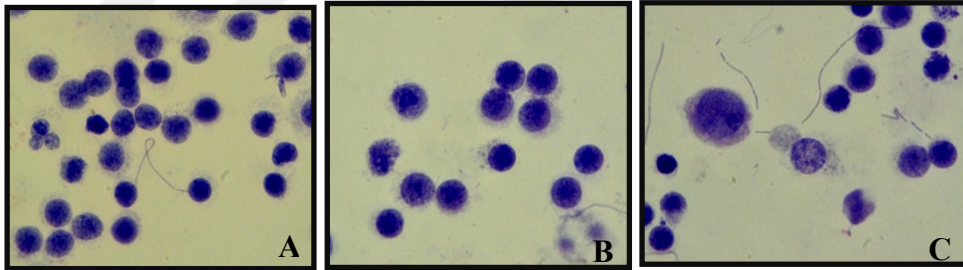
Şekil 4-2: Pozitif kontrol grubuna ait bir mikronükleus içeren mononükleat hücre (A), bir mikronükleus içeren binükleat hücrelerin (B ve C) mikroskopik görüntüleri (x400 büyütme)



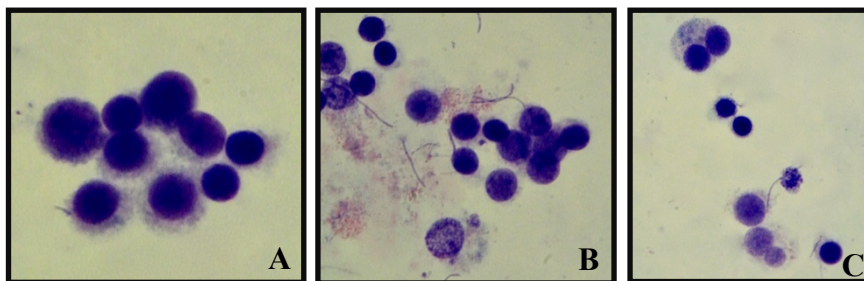
Şekil 4-3: MTA-CEM 1 µg/ml (A), MTA-CEM 10 µg/ml (B), MTA-CEM 50 µg/ml (C) gruplarına ait mikroskop görüntüleri (x400 büyütme)



Şekil 4-4: NeoMTA 1 µg/ml (A), NeoMTA 10 µg/ml (B), NeoMTA 50 µg/ml (C) gruplarına ait mikroskop görüntüleri (x400 büyütme)



Şekil 4-5: Biodentine 1 µg/ml (A), Biodentine 10 µg/ml (B), Biodentine 50 µg/ml (C) gruplarına ait mikroskop görüntüleri (x400 büyütme)



Şekil 4-6: BioMTA 1 µg/ml (A), BioMTA 10 µg/ml (B), BioMTA 50 µg/ml (C) gruplarına ait mikroskop görüntüleri (x400 büyütme)

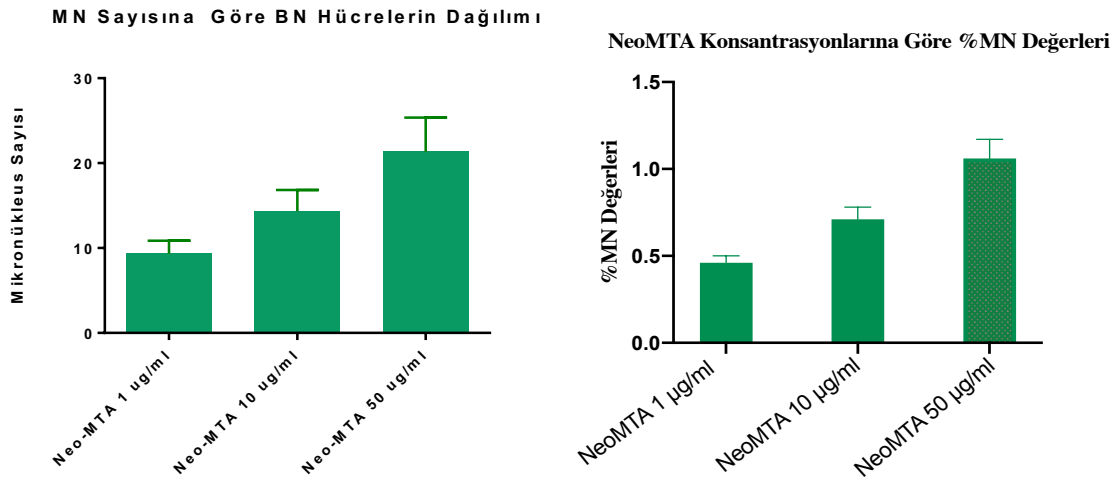
4.1.2. Deney ve Kontrol Gruplarının İnsan Periferik Lenfosit Hücre Kültüründe Oluşturduğu Mikronükleus (MN) Değerleri

Literatürde tavsiye edildiği üzere kültüre edilen insan periferik lenfosit hücrelerine 24. saatte deney gruplarındaki materyaller belirlenen dozlarda uygulandı. Pozitif kontrol olarak seçilen tetrakonazol maddesi 1 µg/ml dozlarda; biyoseramik esaslı deney grubu materyalleri ise 1, 10 ve 50 µg/ml dozlarda uygulandı. Tüm deney grupları üç bağımsız tekrarlar halinde gerçekleştirildi. Deney sonunda her bir preparatta toplam 2000 adet binükleatlı hücre sayıldı. Binükleatlı hücrelerde oluşan mikronükleus içeren hücrelerin sayısı belirlendi. MN içeren binükleatlı hücre sayısının, toplam binükleat hücre sayısına oranı ile % MN değeri elde edildi.

4.1.2.1. NeoMTA'nın Konsantrasyonlarına Bağlı Olarak Oluşan Mikronükleus (MN) Sayısı ve %MN Değerleri

NeoMTA materyali 1, 10, 50 µg/ml'lik dozlarda insan periferik lenfosit hücrelerine uygulandı. Deney sonunda yapılan mikroskopik incelemelerde 1 µg/ml NeoMTA materyali binükleatlı periferik lenfosit hücrelerinde 9 tane bir adet mikronükleus, 1 tane 2 adet mikronükleus oluşmasına neden oldu. Yapılan mikroskopik incelemelerde 3 adet mikronükleus içeren binükleatlı hücre gözlenmedi. İnsan periferik lenfosit hücrelerinde 1 µg/ml NeoMTA materyalinin oluşturduğu %MN değeri $0,46 \pm 0,04$ (%MN $\pm$ SEM) olarak hesaplandı. 10 µg/ml NeoMTA materyali, binükleatlı periferik lenfosit hücrelerinde 10 tane bir adet mikronükleus, 1 tane 2 adet mikronükleus hücre gözlenmiş olup, 3 mikronükleuslu hücre tespit edilmedi. 10 µg/ml NeoMTA materyali için hesaplanan % MN değeri $0,71 \pm 0,07$ (%MN $\pm$ SEM) bulundu. 50 µg/ml NeoMTA materyali ise, binükleatlı periferik lenfosit hücrelerinde 20 tane bir adet mikronükleus, 1 tane 2 adet mikronükleus hücre oluşmasına neden olmakla birlikte, 3 mikronükleuslu hücre oluşumu saptanmadı. 50 µg/ml NeoMTA materyali için hesaplanan % MN değeri $1,06 \pm 0,11$ (%MN $\pm$ SEM) bulundu (Şekil 4-7).

İnsan periferik lenfosit hücrelerinde 1, 10 ve 50 µg/ml dozlarda uygulanan NeoMTA materyalinin hücrelerde oluşturduğu % MN değeri ve sayılan toplam mikronükleus sayısı uygulanan doz miktarı arttıkça yükselmekte olmasına rağmen, istatistiksel olarak karşılaştırıldığında doza bağlı MN sayısı ya da %MN değerinde herhangi bir anlamlılık saptanmadı ($p>0,05$).

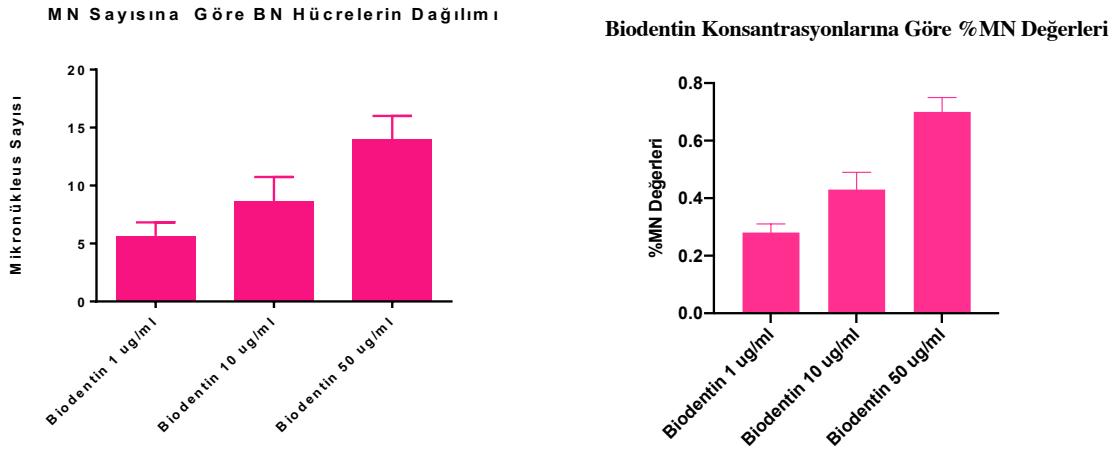


Şekil 4-7: NeoMTA'nın üç ayrı konsantrasyonuna ait MN sayısı ve %MN değerleri

4.1.2.2. Biodentine' in Konsantrasyonlarına Bağlı Olarak Oluşan Mikronükleus (MN) Sayısı ve %MN Değerleri

Biodentine materyalinin 1, 10 ve 50 µg/ml dozlarında insan periferik lenfosit hücreleri ile etkileşimi sonucunda oluşan mikronükleus içeren binükleat hücreler sayıldı. 1 µg/ml Biodentine dozu sonucu binükleat hücrelerde 5 tane 1 mikronükleus içeren hücre sayılmış olup, 2 ve 3 adet mikronükleus içeren binükleat hücre gözlenmedi. 1 µg/ml Biodentine'in oluşturduğu % MN değeri $0,28 \pm 0,03$ (%MN $\pm$ SEM) olarak hesaplandı. 10 µg/ml'lik Biodentine dozu ise, 7 tane 1 mikronükleus, 1'er adet 2 ve 3 mikronükleus içeren hücre tespit edildi. Buna göre 10 µg/ml Biodentine dozu için %MN $0,43 \pm 0,06$ (%MN $\pm$ SEM) olarak bulundu. 50 µg/ml Biodentine materyali ise, binükleatlı periferik lenfosit hücrelerinde 12 tane 1 mikronükleus ve 1 tane 3 mikronükleus oluşumuna neden olurken, 2 mikronükleuslu hücre oluşumuna sebep olmadı. 50 µg/ml Biodentine materyali için hesaplanan %MN değeri $0,7 \pm 0,05$ (%MN $\pm$ SEM) oldu (Şekil 4-8).

Yapılan incelemeler sonucunda Biodentine için doz artışına bağlı olarak binükleat hücrelerde sayılan MN sayısı ve hesaplanan %MN değeri artış göstermesine rağmen, dozdaki artış ile MN sayısı ve %MN değeri arasında anlamlı bir ilişki bulunmadı ($p > 0,05$).

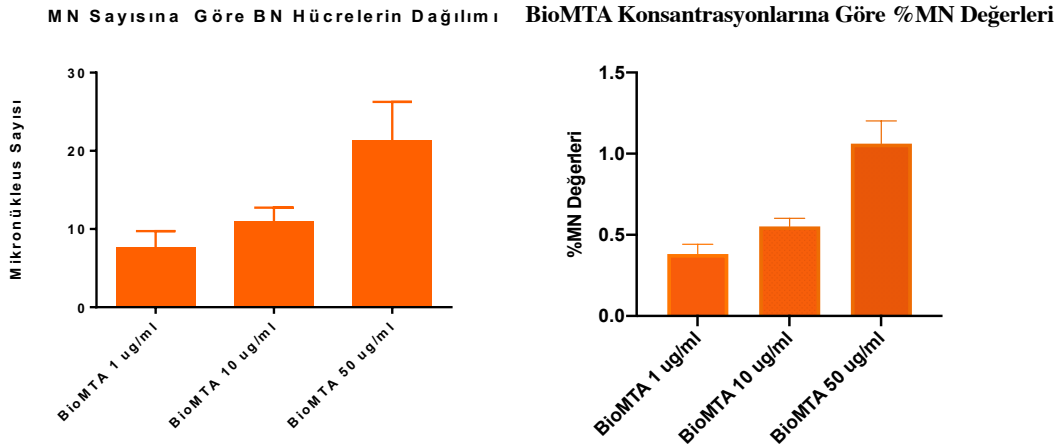


Şekil 4-8: Biodentine'in üç ayrı konsantrasyonuna ait MN sayısı ve %MN değerleri

4.1.2.3. BioMTA'nın Konsantrasyonlarına Bağlı Olarak Oluşan Mikronükleus (MN) Sayısı ve %MN Değerleri

BioMTA materyalinin 1 µg/ml dozu için 7 adet 1 mikronükleus ve 1'er adet 2 ve 3 mikronükleus içeren binükleat hücre sayıldı. 1 µg/ml BioMTA için hesaplanan %MN değeri $0,38 \pm 0,06$ (%MN $\pm$ SEM) olarak bulundu. 10 µg/ml içeren BioMTA dozu 9 adet 1 mikronükleus ve 1'er adet 2 ve 3 mikronükleus oluşumuna sebep oldu. Bu doz için %MN değeri $0,55 \pm 0,05$ (%MN $\pm$ SEM) olarak hesaplandı. En yüksek doz olan 50 µg/ml'lik BioMTA dozu ise 19 tane 1 mikronükleus ve 1'er adet 2 ve 3 mikronükleus içeren hücre oluşumuna neden oldu. 50 µg/ml BioMTA dozu için %MN değeri $1,06 \pm 0,14$ (%MN $\pm$ SEM) olarak tespit edildi (Şekil 4-9).

Yapılan incelemeler sonrasında doz artışına bağlı olarak %MN değerleri artış gösterse de, doz artışı ile %MN arasındaki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p > 0,05$). BioMTA için uygulanan doz miktarı arttıkça MN sayısı da yükseldi. Bu artış istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, 1 µg/ml BioMTA dozunun oluşturduğu MN sayısı, 50 µg/ml BioMTA dozu ile Sidak çoklu karşılaştırma testinin sonucuna göre karşılaştırıldığında anlamlı bir artış gösterdi ($p < 0,05$). Diğer dozların artışı ile MN sayısı arasındaki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p > 0,05$).

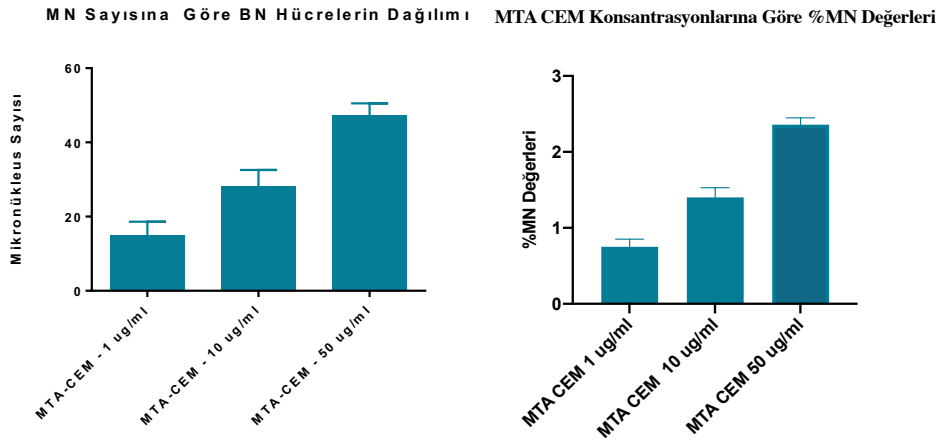


Şekil 4-9: BioMTA'nın üç ayrı konsantrasyonuna ait MN sayısı ve %MN değerleri

4.1.2.4. MTA CEM'in Konsantrasyonlarına Bağlı Olarak Oluşan Mikronükleus (MN) Sayısı ve %MN Değerleri

MTA CEM materyali 1 µg/ml'lik doz olarak uygulandığında insan periferik lenfosit hücrelerinde 12 tane 1 mikronükleus, 2 tane 2 mikronükleus içeren hücre gözlemlenirken, 3 mikronükleus içeren hücre tespit edilmedi. 1 µg/ml'lik doz için MTA CEM materyalinin oluşturduğu %MN değeri $0,75 \pm 0,10$ (%MN $\pm$ SEM) olarak bulundu. 10 µg/ml MTA CEM materyali binükleat hücrelerde 26 tane 1 mikronükleuslu ve 1 tane 2 mikronükleuslu hücre oluşumuna neden olurken, 3 mikronükleuslu hücre oluşumu gözlemlenmedi. 10 µg/ml MTA CEM için %MN değeri $1,4 \pm 0,13$ (%MN $\pm$ SEM) olarak hesaplandı. 50 µg/ml MTA CEM dozunda ise 45 adet 1 mikronükleus, 2 adet 2 mikronükleus ve 1 adet 3 mikronükleus sayımı yapıldı. Buna göre 50 µg/ml MTA CEM dozu için %MN değeri $2,36 \pm 0,09$ (%MN $\pm$ SEM) olarak tespit edildi (Şekil 4-10).

Yapılan incelemeler sonucunda 1, 10, 50 µg/ml'lik dozlar karşılaştırıldığında, doz artışına bağlı olarak %MN değerleri artış gösterse de, bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p > 0,05$). MTA CEM için tüm dozlar arasında, dozdaki artışa bağlı olarak MN sayısının artışı ise istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0,05$).

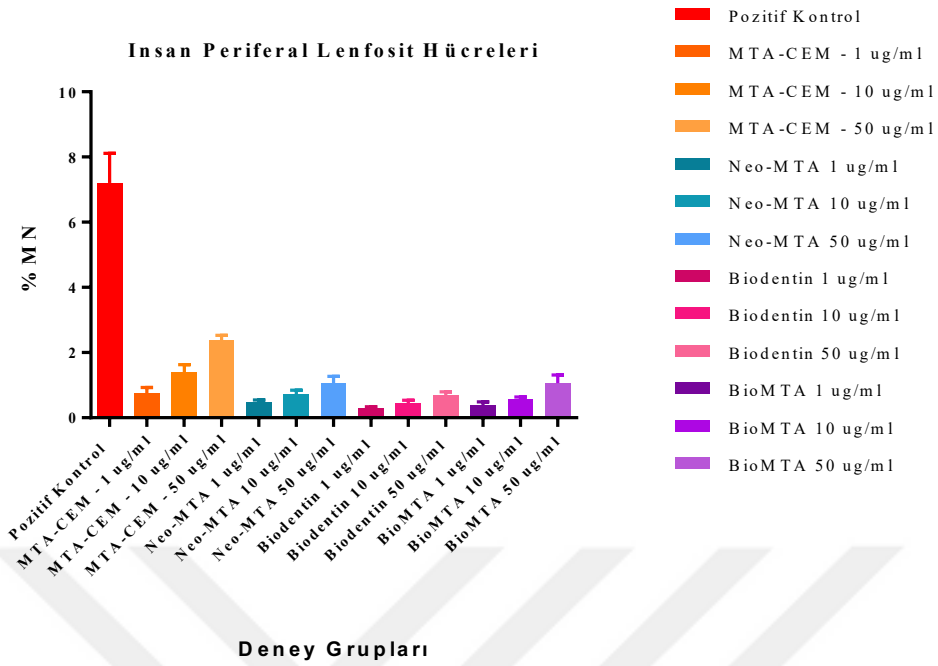


Şekil 4-10: MTA CEM için üç ayrı konsantrasyonuna ait MN sayısı ve %MN değerleri

4.1.2.5. Pozitif Kontrol Grubunun Oluşturduğu Mikronükleus (MN) Sayısı ve %MN Değerleri

Pozitif kontrol olarak uygulanan tetrakonazol maddesi binükleatlı periferallenfosit hücrelerinde 125 tane bir adet mikronükleus, 14 tane 2 adet mikronükleus, 4 tane 3 adet mikronükleus oluşmasına neden oldu. Pozitif kontrole ait %MN değeri $7,2 \pm 0,52$ (%MN $\pm$ SEM) olarak hesaplandı. Pozitif kontrolün insan periferallenfosit hücrelerdeki oluşturduğu %MN değeri ile biyoseramik esaslı materyallerin aynı hücrelerde meydana getirdiği %MN değerleri istatistiksel olarak karşılaştırıldığında tüm materyallerin, tüm dozlarında istatistiksel olarak anlamlılık saptandı ($p < 0,05$) (Tablo 4-1). Deney gruplarına ait hiçbir biyoseramik esaslı dental materyal genotoksik özellik göstermedi (Şekil 4-11).

Deney gruplarında ise; aynı dozlar için gruplar arası karşılaştırma yapıldığında lenfosit hücrelerinde meydana getirdikleri % MN açısından istatistiksel olarak bir anlamlılık saptanmadı ($p > 0,05$) (Tablo 4-2). Kontrol ve deney gruplarının insan periferallenfosit hücrelerinde oluşan MN sayıları ve %MN $\pm$ SEM değerleri ise Tablo 4-3’de görülmektedir.



Şekil 4-11: Pozitif kontrol ve biyoseramik esash dental materyallerinin insan periferik lenfosit hücreleri üzerinde oluşturduğu %MN değerlerinin dozlara bağlı olarak gösterilmesi

Tablo 4-1: Pozitif kontrol ile biyoseramik esash dental materyallerin oluşturduğu %MN değerinin istatistiksel olarak karşılaştırılması

	% MN	
	Ortalama fark	P değeri
Kontrol vs. Neo MTA 1 ug/ml	6,733	0,0240*
Kontrol vs. Neo MTA 10 ug/ml	6,483	0,0180*
Kontrol vs. Neo MTA 50 ug/ml	6,133	0,0347*
Kontrol vs. Biodentine 1 ug/ml	6,917	0,0182*
Kontrol vs. Biodentine 10 ug/ml	6,767	0,0190*
Kontrol vs. Biodentine 50 ug/ml	6,500	0,0219*
Kontrol vs. BioMTA 1 ug/ml	6,817	0,0246*
Kontrol vs. BioMTA 10 ug/ml	6,650	0,0235*
Kontrol vs. BioMTA 50 ug/ml	6,133	0,0179*
Kontrol vs. MTA CEM 1 ug/ml	6,450	0,0313*
Kontrol vs. MTA CEM 10ug/ml	5,800	0,0278*
Kontrol vs. MTA CEM 50 ug/ml	4,833	0,0346*
One Way Anova, Dunnet Testi		* $p < 0,05$

Tablo 4-2: Biyoseramik esaslı dental materyallerin oluşturduğu %MN değerinin aynı dozlar arasında ikili gruplar halinde istatistiksel olarak karşılaştırılması

	% MN	
	Ortalama fark	P değeri
MTA-CEM 1 ug/ml vs. Neo-MTA 1 ug/ml	0,2833	p>0,9999
MTA-CEM 1 ug/ml vs. Biodentin 1ug/ml	0,4667	p>0,9999
MTA-CEM 1 ug/ml vs. BioMTA 1ug/ml	0,3667	p>0,9999
MTA-CEM 10 ug/ml vs. Neo-MTA 10 ug/ml	0,6833	p>0,9999
MTA-CEM 10 ug/ml vs. Biodentin 10 ug/ml	0,9667	p>0,9999
MTA-CEM 10 ug/ml vs. BioMTA 10 ug/ml	0,85	p>0,9999
MTA-CEM 50 ug/ml vs. Neo-MTA 50 ug/ml	1,3	p>0,9999
MTA-CEM 50 ug/ml vs. Biodentin 50 ug/ml	1,667	p>0,9999
MTA-CEM 50 ug/ml vs. BioMTA 50 ug/ml	1,3	p>0,9999
Neo-MTA 1 ug/ml vs. Biodentin 1 ug/ml	0,1833	p>0,9999
Neo-MTA 1 ug/ml vs. BioMTA 1 ug/ml	0,083	p>0,9999
Neo-MTA 10 ug/ml vs. Biodentin 10 ug/ml	0,2833	p>0,9999
Neo-MTA 10 ug/ml vs. BioMTA 10 ug/ml	0,1667	p>0,9999
Neo-MTA 50 ug/ml vs. Biodentin 50 ug/ml	0,3667	p>0,9999
Neo-MTA 50 ug/ml vs. BioMTA 50 ug/ml	1,987	p>0,9999
Biodentin 1 ug/ml vs. BioMTA 1 ug/ml	-0,1	p>0,9999
Biodentin 10 ug/ml vs. BioMTA 10 ug/ml	-0,1167	p>0,9999
Biodentin 50 ug/ml vs. BioMTA 50 ug/ml	-0,3667	p>0,9999
<i>One Way Anova, Sidak Testi</i>		<i>* p<0,05</i>

Tablo 4-3: Kontrol ve deney gruplarının insan periferik lenfosit hücre kültüründe oluşturduğu MN sayıları ve %MN $\pm$ SEM değerleri

DENEY MATERYALİ	ETKİLEŞİM SÜRESİ	DOZ	1MN	2 MN	3 MN	MN % $\pm$ SEM
POZİTİF KONTROL*	48 saat	1 ug/ml	125	14	4	7,2$\pm$0,52
NEOMTA	48 saat	1 ug/ml	9	1	0	0,46$\pm$0,04
NEOMTA	48 saat	10ug/ml	14	1	0	0,71$\pm$0,07
NEOMTA	48 saat	50 ug/ml	20	1	0	1,06$\pm$0,11
BİODENTİNE	48 saat	1 ug/ml	5	0	0	0,28$\pm$0,03
BİODENTİNE	48 saat	10 ug/ml	7	1	1	0,43$\pm$0,06
BİODENTİNE	48 saat	50 ug/ml	12	0	1	0,7$\pm$0,05
BİOMTA	48 saat	1 ug/ml	7	1	1	0,38$\pm$0,06
BİOMTA	48 saat	10 ug/ml	9	1	1	0,55$\pm$0,05
BİOMTA	48 saat	50 ug/ml	19	1	1	1,06$\pm$0,14
MTA CEM	48 saat	1 ug/ml	12	2	0	0,75$\pm$0,10
MTA CEM	48 saat	10 ug/ml	26	1	0	1,4$\pm$0,13
MTA CEM	48 saat	50 ug/ml	45	2	1	2,36$\pm$0,09

(*Pozitif Kontrol Grubu: Tetrakonazol)

4.1.3. Deney ve Kontrol Gruplarının İnsan Periferik Lenfosit Hücrelerinin Nükleus Bölünmesi Üzerindeki Etkileri

Deney gruplarında yer alan biyoseramik esaslı dental materyallerin ve kontrol grubu olarak tetrakonazol maddesinin nükleer bölünmeye etkisini değerlendirmek üzere hazırlanan preparatlarda mononükleat, binükleat, trinükleat ve tetranükleat hücrelerin sayımı gerçekleştirildi. Nükleer bölünme indeksi aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı:

$$NBI = (MI + MII + MIII + MIV) / N$$

(NBI: Nükleer Bölünme İndeksi, MI: mononükleat hücreler, MII: binükleat hücreler, MIII: trinükleat hücreler, MIV: tetranükleat hücreler, N: Sayılan toplam hücre)

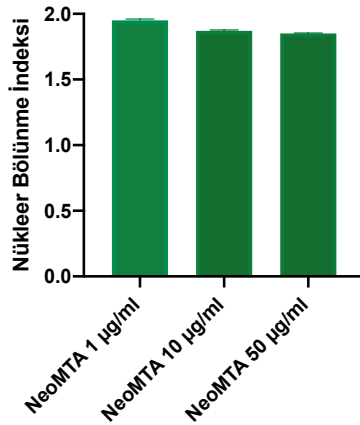
Tüm deneyler her grup ve her doz için bağımsız üç tekrar halinde gerçekleştirildi.

4.1.3.1. NeoMTA'nın İnsan Periferal Lenfosit Hücrelerinin Nükleus Bölünmesi Üzerindeki Etkileri

NeoMTA 1 µg/ml'lik dozu 48 saat boyunca insan periferal lenfosit hücreleriyle etkileşime bırakıldığında, 1162 adet bir nükleuslu, 2162 adet iki nükleuslu, 355 adet üç nükleuslu ve 320 adet dört nükleuslu hücre oluşumuna sebep olmuştur. 1 µg/ml NeoMTA dozu için nükleer bölünme indeksi $1,95 \pm 0,01$ (NBI $\pm$ SEM) olarak hesaplandı. Uygulanan doz 10 µg/ml olduğunda ise, 1324 adet mononükleat hücre, 2103 adet binükleat hücre, 327 adet trinükleat hücre ve 245 adet tetranükleat hücre sayıldı. Bu sayımlara göre elde edilen nükleer bölünme indeksi $1,87 \pm 0,008$ (NBI $\pm$ SEM) olarak gerçekleşti. En yüksek doz olan 50 µg/ml NeoMTA için sayılan hücreler 1402 adet bir nükleuslu, 2029 adet iki nükleuslu, 311 adet üç nükleuslu ve 257 adet dört nükleuslu olarak sayıldı. Hesaplanan NBI ise $1,85 \pm 0,004$ (NBI $\pm$ SEM) olarak bulundu (Şekil 4-12).

İnsan periferal lenfosit hücrelerinde 1, 10 ve 50 µg/ml dozlarda uygulanan NeoMTA materyalinin nükleer bölünme üzerine etkisini gösteren NBI değeri doz artışına bağlı olarak azalmakla beraber, istatistiksel olarak karşılaştırıldığında da NBI değerlerindeki azalma anlamlı olarak bulundu ($p < 0,05$).

NeoMTA Konstanrasyonlarına Göre NBI Değerleri



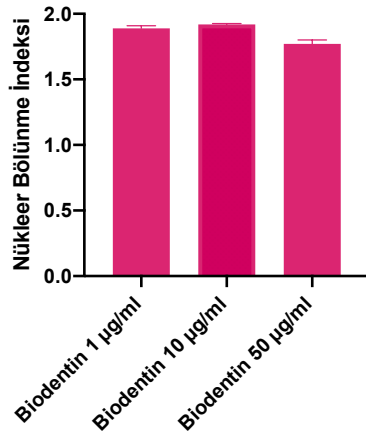
Şekil 4-12: NeoMTA'nın üç ayrı konsantrasyonuna ait nükleer bölünme indeksi (NBI) değerleri

4.1.3.2. Biodentine'in İnsan Periferal Lenfosit Hücrelerinin Nükleus Bölünmesi Üzerindeki Etkileri

1 µg/ml Biodentine insan periferal lenfosit hücreleri ile 48 saat etkileşim sonucunda 1175 adet mononükleat, 2270 adet binükleat, 364 adet trinükleat ve 190 adet tetranükleat hücre oluşumu gözlemlendi. 1 µg/ml Biodentine için nükleer bölünme indeksi $1,89 \pm 0,02$ (NBI $\pm$ SEM) olarak hesaplandı. Uygulanan doz 10 µg/ml olduğunda 1239 adet mononükleat, 2107 adet binükleat, 374 adet trinükleat ve 278 adet tetranükleat hücre sayımı yapıldı. Bu değerlere göre hesaplanan değer $1,92 \pm 0,006$ (NBI $\pm$ SEM) oldu. En yüksek doz olan 50 µg/ml için ise sayılan mononükleat hücre 1429, binükleat hücre 2091, trinükleat hücre 322 ve tetranükleat hücre 156 olarak bulunurken, NBI değeri $1,77 \pm 0,03$ (NBI $\pm$ SEM) olarak hesaplandı (Şekil 4-13).

Biodentine 1 µg/ml ve 10 µg/ml'lik dozları arasında, doz arttıkça NBI değeri artmasına rağmen bu artış istatistiksel olarak anlamlılık göstermedi ($p > 0,05$). Biodentine 1 µg/ml ve 50 µg/ml dozları ile Biodentine 10 µg/ml ve 50 µg/ml dozları istatistiksel olarak karşılaştırıldıklarında, doz arttıkça azalan NBI değeri anlamlı olarak bulundu ($p < 0,05$).

Biodentin Konstanrasyonlarına Göre NBI Değerleri



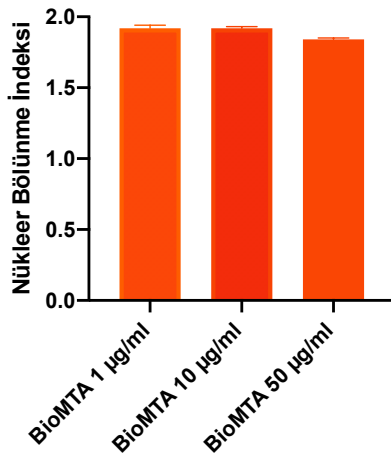
Şekil 4-13: Biodentine'in üç ayrı konsantrasyonuna ait nükleer bölünme indeksi (NBI) değerleri

4.1.3.3. BioMTA'nın İnsan Periferal Lenfosit Hücrelerinin Nükleus Bölünmesi Üzerindeki Etkileri

BioMTA materyalinin 1 µg/ml'lik dozu insan periferal lenfosit hücreleri ile etkileşime girdiğinde 1097 adet mononükleat hücre, 2437 adet binükleat hücre, 266 adet trinükleat hücre ve 233 adet tetranükleat hücre sayımı yapıldı. Bu sayıma göre 1 µg/ml BioMTA için nükleer bölünme indeksi $1,92 \pm 0,02$ (NBI $\pm$ SEM) olarak hesaplandı. 10 µg/ml'lik BioMTA dozu için mononükleat hücre 1180 adet, binükleat hücre 2142 adet, trinükleat hücre 426 adet ve tetranükleat hücre 238 adet olarak sayıldı. NBI değeri ise $1,92 \pm 0,01$ (NBI $\pm$ SEM) olarak bulundu. 50 µg/ml BioMTA için 1281 adet mononükleat hücre, 2276 adet binükleat hücre, 245 adet trinükleat hücre ve 206 adet tetranükleat hücre sayıldı. Bu doz için NBI değeri $1,84 \pm 0,01$ (NBI $\pm$ SEM) olarak hesaplandı (Şekil 4-14).

BioMTA 1 ve 10 µg/ml'lik dozları arasında, doz arttıkça NBI değeri azalma istatistiksel olarak anlamlılık göstermedi ($p > 0,05$). BioMTA 10 µg/ml ve 50 µg/ml'lik doz artışında görülen NBI değeri azalışı ise istatistiksel açıdan anlamlı bir azalma gösterdi ($p < 0,05$).

BioMTA Konstanrasyonlarına Göre NBI Değerleri



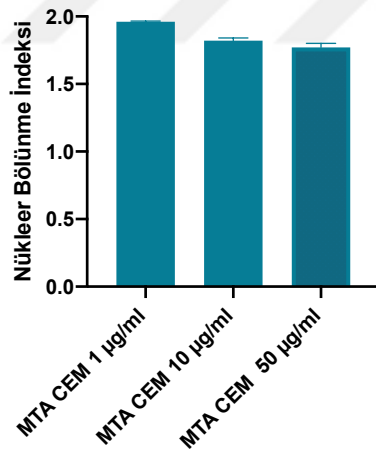
Şekil 4-14: BioMTA'nın üç ayrı konsantrasyonuna ait nükleer bölünme indeksi (NBI) değerleri

4.1.3.4. MTA CEM'in İnsan Periferal Lenfosit Hücrelerinin Nükleus Bölünmesi Üzerindeki Etkileri

1 µg/ml'lik MTA CEM için oluşan mononükleat hücre sayısı 1117, binükleat hücre 2269, trinükleat 245 ve tetranükleat hücre sayısı 368 adet olarak hesaplandı. 1 µg/ml MTA CEM için NBI değeri $1,96 \pm 0,006$ (NBI $\pm$ SEM) olarak hesaplandı. 10 µg/ml MTA CEM için yapılan mikroskopik incelemelerde 1243 adet mononükleat hücre, 2262 adet binükleat, 330 adet trinükleat ve 163 adet tetranükleat hücre sayıldı. Hesaplanan NBI değeri ise $1,82 \pm 0,02$ (NBI $\pm$ SEM) olarak bulundu. En yüksek doz olan 50 µg/ml MTA CEM için 1445 adet mononükleat, 2108 adet binükleat, 252 adet trinükleat ve 173 adet tetranükleat hücre sayıldı. 50 µg/ml MTA CEM için NBI değeri $1,77 \pm 0,03$ (NBI $\pm$ SEM) olarak hesaplandı (Şekil 4-15).

Dozlar arası karşılaştırma yapıldığında insan periferal lenfosit hücrelerinde 1, 10 ve 50 µg/ml dozlarda uygulanan MTA CEM materyalinin dozu arttıkça, NBI değerindeki azalma anlamlı olarak bulundu ($p < 0,05$).

MTA CEM Konstanrasyonlarına Göre NBI Değerleri



Şekil 4-15: MTA CEM'in üç ayrı konsantrasyonuna ait nükleer bölünme indeksi (NBI) değerleri

4.1.3.5. Pozitif Kontrol Grubunun İnsan Periferik Lenfosit Hücrelerinin Nükleus Bölünmesi Üzerindeki Etkileri

Pozitif kontrol olarak uygulanan tetrakonazol maddesi insan periferik lenfosit hücreleri ile 48 saat etkileşim sonucunda 2104 adet mononükleat hücre, 1537 adet binükleat, 184 adet trinükleat ve 173 adet tetranükleatlı hücre oluşumuna sebep oldu. Pozitif kontrol grubuna ait nükleer bölünme indeksini gösteren değer $1,60 \pm 0,01$ (NBI $\pm$ SEM) olarak hesaplandı. Pozitif kontrol grubuna ait NBI değeri biyoseramik esaslı dental materyallere ait NBI değerleri ile karşılaştırıldığında 50 µg/ml Biodentine ve 50 µg/ml MTA CEM haricindeki tüm materyal ve dozlarda istatistiksel olarak anlamlılık saptandı (One way Anova, post hoc testi, Dunnet testi ($p < 0,05$)). (Tablo 4-4, 4-6), (Şekil 4-16).

Tablo 4-4: Pozitif kontrol ile biyoseramik esaslı dental materyallerin oluşturduğu Nükleer Bölünme İndeksi (NBI) değerlerinin istatistiksel olarak karşılaştırılması

	NBI	
	Ortalama fark	P değeri
Kontrol vs. Neo-MTA 1 µg/ml	-0,3515	0,0041*
Kontrol vs. Neo-MTA 10 µg/ml	-0,2667	0,0007*
Kontrol vs. Neo-MTA 50 µg/ml	-0,2493	0,0119*
Kontrol vs. Biodentine 1 µg/ml	-0,2859	0,0206*
Kontrol vs. Biodentine 10 µg/ml	-0,3160	0,0049*
Kontrol vs. Biodentine 50 µg/ml	-0,1696	0,1702
Kontrol vs. BioMTA 1 µg/ml	-0,3189	0,0413*
Kontrol vs. BioMTA 10 µg/ml	-0,3179	0,0116*
Kontrol vs. BioMTA 50 µg/ml	-0,2428	0,0454*
Kontrol vs. MTA CEM 1 µg/ml	-0,3597	0,0058*
Kontrol vs. MTA CEM 10µg/ml	-0,2218	0,0458*
Kontrol vs. MTA CEM 50 µg/ml	-0,1717	0,1063

One Way Anova, Dunnet Testi

* $p < 0,05$

Deney grupları kendi aralarında ikili olarak karşılaştırıldıklarında NeoMTA ve MTA CEM 10 µg/ml dozunun nükleer bölünme üzerindeki etkisi, aynı doz BioMTA ve Biodentine grubuna göre anlamlı derecede az olarak bulunmuştur ($p < 0,05$). MTA CEM ve NeoMTA'nın bu dozu için NBI değerindeki azalmalar, hücre üzerinde toksik potansiyele sahip olduğunu gösteren bir parametre olmakla beraber, kontrol grubunun neden olduğu azalma ile kıyaslandığında anlamlı bir fark bulunmadı ($p > 0,05$) (Tablo 4-5).

Tablo 4-5: Biyoseramik esaslı dental materyallerin NBI değerlerinin aynı dozlar arasında ikili gruplar halinde istatistiksel olarak karşılaştırılması

	NBI	
	Ortalama fark	P değeri
MTA-CEM 1 ug/ml vs. Neo-MTA 1 ug/ml	0,583905	p>0,05
MTA-CEM 1 ug/ml vs. Biodentin 1ug/ml	0,058555	p>0,05
MTA-CEM 1 ug/ml vs. BioMTA 1ug/ml	0,220152	p>0,05
MTA-CEM 10 ug/ml vs. Neo-MTA 10 ug/ml	0,212342	p>0,05
MTA-CEM 10 ug/ml vs. Biodentin 10 ug/ml	0,034329	p<0,05*
MTA-CEM 10 ug/ml vs. BioMTA 10 ug/ml	0,040835	p<0,05*
MTA-CEM 50 ug/ml vs. Neo-MTA 50 ug/ml	0,117924	p>0,05
MTA-CEM 50 ug/ml vs. Biodentin 50 ug/ml	0,968421	p>0,05
MTA-CEM 50 ug/ml vs. BioMTA 50 ug/ml	0,173267	p>0,05
Neo-MTA 1 ug/ml vs. Biodentin 1 ug/ml	0,092178	p>0,05
Neo-MTA 1 ug/ml vs. BioMTA 1 ug/ml	0,334531	p>0,05
Neo-MTA 10 ug/ml vs. Biodentin 10 ug/ml	0,010687	p<0,05*
Neo-MTA 10 ug/ml vs. BioMTA 10 ug/ml	0,035482	p<0,05*
Neo-MTA 50 ug/ml vs. Biodentin 50 ug/ml	0,061849	p>0,05
Neo-MTA 50 ug/ml vs. BioMTA 50 ug/ml	0,750803	p>0,05
Biodentin 1 ug/ml vs. BioMTA 1 ug/ml	0,439969	p>0,05
Biodentin 10 ug/ml vs. BioMTA 10 ug/ml	0,910264	p>0,05
Biodentin 50 ug/ml vs. BioMTA 50 ug/ml	0,110205	p>0,05

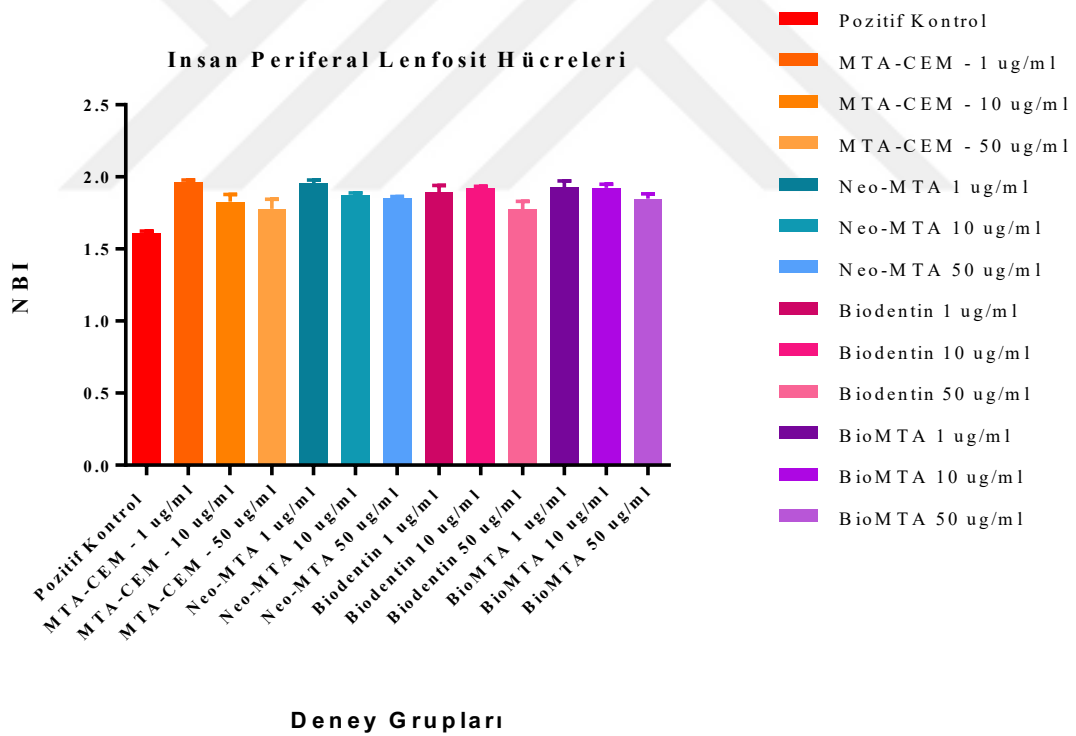
One Way Anova, Sidak Testi

* p<0,05

Tablo 4-6: Pozitif kontrol ile deney grubu materyallerin insan periferik lenfosit hücreleri ile etkileşimi sonucu nükleus sayısına göre hücrelerin dağılımı ve NBI değerleri

DENEY GRUBU	SÜRE	DOZ	1 NÜK.	2 NÜK.	3 NÜK.	4 NÜK.	NBI± SEM
POZİTİF KONTROL*	48 saat	1 ug/ml	2104	1537	184	173	1,60±0,01
NEOMTA	48 saat	1 ug/ml	1162	2162	355	320	1,95±0,01
NEOMTA	48 saat	10 ug/ml	1324	2103	327	245	1,87±0,008
NEOMTA	48 saat	50 ug/ml	1402	2029	311	257	1,85±0,004
BİODENTİNE	48 saat	1 ug/ml	1175	2270	364	190	1,89±0,02
BİODENTİNE	48 saat	10 ug/ml	1239	2107	374	278	1,92±0,006
BİODENTİNE	48 saat	50 ug/ml	1429	2091	322	156	1,77±0,03
BİOMTA	48 saat	1 ug/ml	1097	2437	266	233	1,92±0,02
BİOMTA	48 saat	10 ug/ml	1180	2142	426	238	1,92±0,01
BİOMTA	48 saat	50 ug/ml	1281	2276	245	206	1,84±0,01
MTA CEM	48 saat	1 ug/ml	1117	2269	245	368	1,96±0,006
MTA CEM	48 saat	10 ug/ml	1243	2262	330	163	1,82±0,02
MTA CEM	48 saat	50 ug/ml	1445	2108	252	173	1,77±0,03

(*Pozitif Kontrol Grubu: Tetrakonazol)



Şekil 4-16: Deney ve kontrol gruplarının insan periferik lenfosit hücreleri ile etkileşimi sonucu oluşan NBI değerleri

4.2. Biyoaktivite İncelemelerine Ait Bulgular

Deney gruplarına ait materyal salınım sıvıları örnekleri 1., 3. ve 7. günlerde toplanarak BMP-2, FGF-2 ve VEGF düzeyleri ELİSA yöntemiyle değerlendirildi. Her bir kit için oluşan renk değişiklikleri 450 nm dalga boyunda okundu ve istatistiksel açıdan değerlendirildi.

4.2.1. BMP-2 Düzeyine İlişkin Analiz Sonuçları

Grup ana etkisi BMP-2 değerleri üzerinde istatistiksel olarak değerlendirildiğinde anlamlı bulundu ($p<0,001$). En yüksek BMP-2 ortalaması Biodentine grubundan elde edilirken, en düşük BMP-2 ortalaması MTA CEM grubundan elde edildi. Zaman ana etkisi tek başına değerlendirildiğinde BMP-2 değerleri üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir etki oluşturdu ($p<0,001$). En yüksek BMP-2 ortalaması yedinci günde elde edildi. Konsantrasyon ana etkisi BMP-2 değerleri üzerinde incelendiğinde istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,001$). Konsantrasyona göre BMP-2 değerlerinin ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulundu. En yüksek BMP-2 ortalaması %50'lik konsantrasyonda elde edildi. Grup ve zaman etkileşimi birlikte değerlendirildiğinde BMP-2 değerleri üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,001$). Grup ve konsantrasyon etkileşimi birlikte değerlendirildiğinde BMP-2 değerleri üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,001$). Zaman ve konsantrasyon etkileşimi değerlendirildiğinde BMP-2 değerleri istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,001$). Grup, zaman ve konsantrasyon etkileşimi birlikte değerlendirildiğinde BMP-2 değerleri üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir etki bulundu ($p<0,001$) (Tablo 4-7).

Tablo 4-7: BMP-2 için analiz sonuçları

		Sd	p
Grup	258,991	3	<0,001
Zaman	2275,778	2	<0,001
Konsantrasyon	742,488	1	<0,001
Grup * zaman	111,215	6	<0,001
Grup * Konsantrasyon	92,264	3	<0,001
Zaman * Konsantrasyon	689,208	2	<0,001
Grup * zaman * Konsantrasyon	39,08	6	<0,001

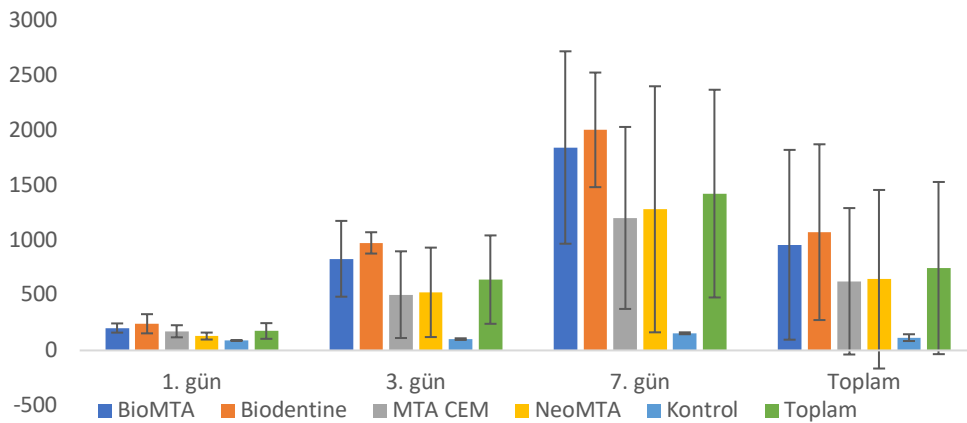
Sd: Serbestlik derecesi, *Wald Ki-kare test istatistiği

Biyoseramik esaslı dental materyalleri içeren deney grupları ve kontrol grupları BMP-2 seviyeleri açısından karşılaştırıldığında; 1. gün için deney grupları ile kontrol grubu arasında istatistiksel bir farklılık bulunmadı. 3. gün için BMP-2 seviyeleri artış gösterse de bu artış kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bulunmadı. 7. gün değerlendirildiğinde Biodentine ve BioMTA grubu, kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir artış gösterirken ($p<0,001$), diğer gruplar için kontrol grubu ile anlamlı bir farklılık bulunmadı. Toplam grup ortalamaları karşılaştırıldığında BioMTA, Biodentine ve NeoMTA grubu BMP-2 seviyesini kontrol grubuna göre anlamlı olarak yükseltirken ($p<0,001$), MTA CEM grubu ile kontrol grubu ortalamaları arasında istatistiksel bir farklılık bulunmadı (Tablo 4-8, Şekil 4-17).

Tablo 4-8: 1., 3. ve 7. günlerde BMP-2 değerlerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi

	BioMTA	Biodentine	MTA CEM	NeoMTA	Kontrol	Toplam
1. gün	203,9 $\pm$ 41,8 ^A	242,6 $\pm$ 87,3 ^A	174,2 $\pm$ 55,1 ^A	130,8 $\pm$ 31,7 ^A	90,3 $\pm$ 4,5 ^{AC}	177 $\pm$ 71,4 ^a
3. gün	833,8 $\pm$ 344,9 ^{AB}	978,5 $\pm$ 97 ^{ABE}	507,4 $\pm$ 394,5 ^{AB}	528,6 $\pm$ 407 ^{AB}	103 $\pm$ 7,4 ^{AC}	644,4 $\pm$ 402,2 ^b
7. gün	1846,4 $\pm$ 875,5 ^{ED}	2007,2 $\pm$ 521,4 ^D	1205,6 $\pm$ 828 ^{BCD}	1284,2 $\pm$ 1119,5 ^{BD}	156 $\pm$ 8,6 ^{AB}	1427 $\pm$ 945,1 ^c
Toplam	961,3 $\pm$ 863,5 ^b	1076,1 $\pm$ 799,7 ^b	629,1 $\pm$ 666,2 ^{ab}	647,8 $\pm$ 812,4 ^b	116,4 $\pm$ 30,8 ^a	749,5 $\pm$ 783,4

a-c: Aynı harfe sahip gruplar ve zamanlar arasında fark yoktur, A-E: Aynı harfe sahip etkileşimler arasında fark yoktur



Şekil 4-17: Deney ve kontrol gruplarına ait BMP-2 değerlerinin ortalama ve standart sapma grafiği

4.2.1.1. BioMTA İçin BMP-2 Düzeyine İlişkin Bulguların Değerlendirilmesi

BioMTA %50 1. gün; kendi grubu ve aynı doz için günler açısından karşılaştırma yapıldığında 3. ve 7. güne oranla anlamlı düzeyde düşük bulundu. BioMTA %50 3. gün; aynı doz için 1. güne oranla anlamlı derecede yüksek, 7. günden ise anlamlı derecede düşük bulundu. Bu sonuçlara göre, BioMTA %50'lik doza sahip olan gruplar arasında zamana ait karşılaştırma yapıldığında materyal ile etkileşim süresi uzadıkça BMP-2 düzeyinin de anlamlı düzeyde arttığı sonucuna ulaşıldı.

BioMTA %100 1. gün; BioMTA %100 3. gün ile benzer olup, BioMTA %100 7. güne oranla düşük bulundu. BioMTA için %100'lük doza sahip olan gruplar arasında da zamana ait karşılaştırma yapıldığında materyal ile etkileşim süresi uzadıkça BMP-2 düzeyinin de anlamlı düzeyde arttığı sonucuna ulaşıldı.

BioMTA için aynı gün farklı dozlar açısından karşılaştırma yapıldığında; BioMTA %50 3. gün, BioMTA %100 3. güne oranla anlamlı düzeyde yüksek bulundu. BioMTA %50 7. gün ise; BioMTA %100 7. günden yüksek bulundu. BioMTA 1. gün için farklı doz arasında ise istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık bulunmadı. 1. gün hariç, 3. ve 7. günlerde materyalin dozuna ait karşılaştırma yapıldığında, doz arttıkça BMP-2 düzeyinin azaldığı sonucuna ulaşıldı.

Gruplararası karşılaştırma yapıldığında; BioMTA %50 1. gün; aynı gün ve konsantrasyonlar için deney materyalleri arasında anlamlı bir farklılık bulunmadı. BioMTA %50 3. günde ise yine aynı şekilde aynı doz ve güne sahip gruplar arasında farklılık bulunmadı. BioMTA %50 7. gün, aynı doz ve güne sahip Biodentine ve NeoMTA grubu ile benzer olup, MTA CEM %50 7. günden yüksek bulundu.

BioMTA %100 1. ve 3. gün için; gün ve konsantrasyonlar arasında karşılaştırma yapıldığında, deney materyalleri arasında anlamlı bir farklılık bulunmadı. BioMTA %100 7. gün; Biodentine %100 7. günden anlamlı derecede düşük, MTA CEM %100 7. günden ve NeoMTA %100 7. günden anlamlı derecede yüksek bulundu (Şekil 4-18, Tablo 4-9).

4.2.1.2. Biodentine İçin BMP-2 Düzeyine İlişkin Bulguların Değerlendirilmesi

Biodentine %50'lik doz için 1. gün 3. güne kıyasla ve 3. gün ise 7. güne göre anlamlı düzeyde daha düşük bulundu. Biodentine %50'lik doza sahip olan gruplar arasında zamana ait karşılaştırma yapıldığında materyal ile etkileşim süresi uzadıkça BMP-2 düzeyinin de anlamlı düzeyde arttığı sonucuna ulaşıldı.

Biodentine %100'lük doz için; BMP-2 düzeyleri 1. gün ile 3. gün benzer bulunup ve 7. güne doğru gidildiğinde sırasıyla arttığı gözlemlendi. Biodentine %100'lük doza sahip olan gruplar arasında zamana ilişkin karşılaştırma yapıldığında materyal ile etkileşim süresi uzadıkça BMP-2 düzeyinin de anlamlı düzeyde arttığı sonucuna ulaşıldı.

Biodentine için aynı gün farklı dozlar açısından karşılaştırma yapıldığında; 1. ve 3. gün için dozlar arasında anlamlı bir farklılık bulunmadı. 7. gün için Biodentine grubunun %50'lik formu, %100'lük forma kıyasla anlamlı düzeyde daha fazla BMP-2 düzeyinin olduğu bulundu.

Gruplararası karşılaştırma yapıldığında; Biodentine %50 1. ve 3. gün ile diğer deney materyalleri arasında aynı gün ve doz için anlamlı bir farklılık bulunmadı. Biodentine %50 7. gün; aynı doz ve güne sahip BioMTA ve NeoMTA grubu ile benzer olup, MTA CEM %50 7. günden yüksek bulundu.

Biodentine %100 1. gün; aynı doz ve güne sahip diğer gruplarla anlamlı bir farklılık bulunmadı. Biodentine %100 3. gün; aynı doz ve güne sahip BioMTA ile benzer olup, diğer gruplardan anlamlı olarak yüksek bulundu. Biodentine %100 7. gün aynı doz ve güne sahip diğer tüm gruplardan anlamlı olarak yüksek bulundu (Şekil 4-18, Tablo 4-9).

4.2.1.3. MTA CEM İçin BMP-2 Düzeyine İlişkin Bulguların Değerlendirilmesi

MTA CEM %50 1. gün 3. güne oranla daha düşük, 3. gün de 7. günden anlamlı olarak daha düşük BMP-2 düzeyi bulundu. MTA CEM için %50'lik doza sahip olan gruplar arasında zamana ait karşılaştırma yapıldığında materyal ile etkileşim süresi uzadıkça BMP-2 düzeyinin de anlamlı düzeyde arttığı sonucuna ulaşıldı.

MTA CEM %100 1. gün, aynı doz için diğer günler arasında anlamlı bir farklılık bulunmadı.

MTA CEM aynı gün farklı dozlar açısından karşılaştırma yapıldığında; MTA CEM %50 3. gün, %100 3. günden yüksek bulundu. MTA CEM %50 7. gün, %100 7. günden yüksek bulundu. 1. gün hariç, 3. ve 7. günlerde materyalin dozuna ait karşılaştırma yapıldığında, doz arttıkça BMP-2 düzeyinin azaldığı sonucuna ulaşıldı.

Gruplararası karşılaştırma yapıldığında; MTA CEM %50 1. ve 3. gün ile diğer deney materyalleri arasında aynı gün ve doz için anlamlı bir farklılık bulunmadı. MTA CEM %50 7. gün NeoMTA %50 7. gün ile benzer, diğer deney gruplarından ise anlamlı olarak düşük bulundu.

MTA CEM %100 1. gün ile diğer deney materyalleri arasında aynı gün ve doz için anlamlı bir farklılık bulunmadı. MTA CEM %100 3. gün; Biodentine %100 3. günden anlamlı olarak düşük bulunurken, NeoMTA ve BioMTA %100 3. gün ile benzer bulundu. MTA CEM %100 7. gün; NeoMTA %100 7. gün ile benzer bulunurken diğer iki gruptan ise anlamlı olarak düşük bulundu (Şekil 4-18, Tablo 4-9).

4.2.1.3. NeoMTA İçin BMP-2 Düzeyine İlişkin Bulguların Değerlendirilmesi

NeoMTA %50 1. gün; aynı doz için 3. günden düşük, 3. gün de benzer şekilde 7. günden düşük bulundu. NeoMTA için %50'lik doza sahip olan gruplar arasında zamana ait karşılaştırma yapıldığında materyal ile etkileşim süresi uzadıkça BMP-2 düzeyinin de anlamlı düzeyde arttığı sonucuna ulaşıldı. NeoMTA %100 için günler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı.

NeoMTA için aynı gün farklı dozlar açısından karşılaştırma yapıldığında; NeoMTA %50 ile %100'lük 1. günler arasında anlamlı bir farklılık bulunmadı. NeoMTA 3. gün için %50'lik doz, %100'lük doza oranla anlamlı derecede daha fazla BMP-2 oluşturduğu bulundu. NeoMTA 7. gün için %50'lik dozun, %100'lük doza oranla daha anlamlı derecede daha yüksek olarak BMP-2 oluşturduğu bulundu. 1. gün hariç, 3. ve 7. günlerde materyalin dozuna ait karşılaştırma yapıldığında, doz arttıkça BMP-2 düzeyinin azaldığı sonucuna ulaşıldı.

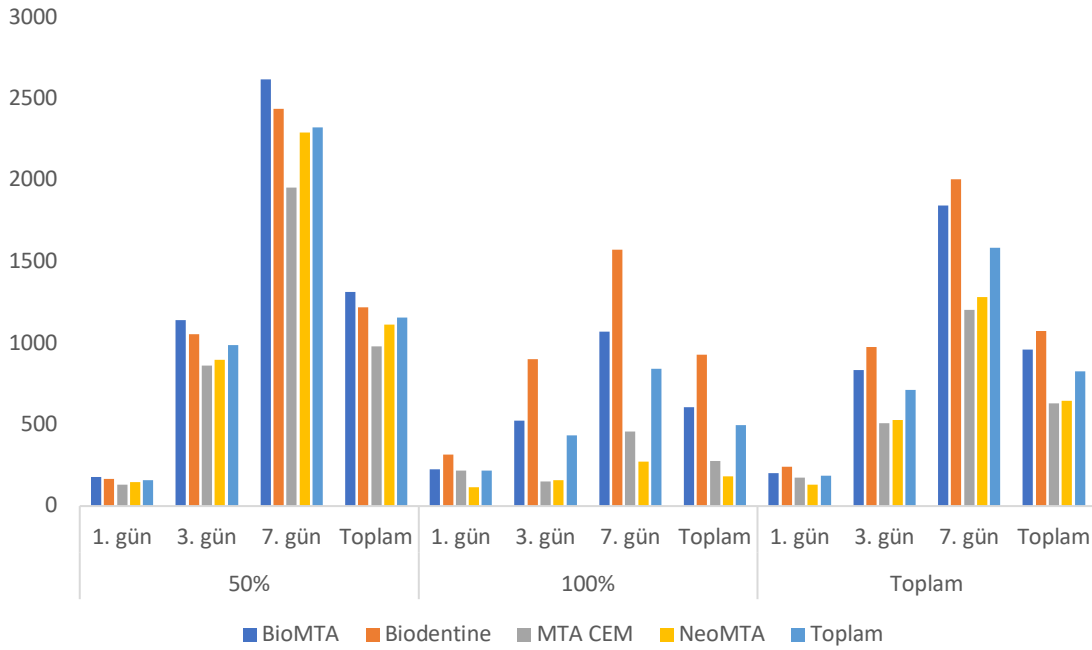
Gruplar arası karşılaştırma yapıldığında; NeoMTA %50'lik doz tüm günlerde, diğer deney materyalleri arasında aynı gün ve doz için anlamlı bir farklılık bulunmadı.

NeoMTA %100 1. gün ile; aynı doz ve güne sahip diğer deney grupları arasında anlamlı bir farklılık bulunmadı. NeoMTA %100 3. gün; MTA CEM ve BioMTA %100 3. gün ile benzer, Biodentine grubundan ise anlamlı olarak düşük bulundu. NeoMTA %100 7. gün, MTA CEM %100 7. gün ile benzer, diğer iki gruptan ise istatistiksel olarak düşük bulundu (Şekil 4-18, Tablo 4-9).

Tablo 4-9: BMP-2 için tanımlayıcı istatistikler

Konst.	Zaman	BioMTA	Biodentine	MTA CEM	NeoMTA	Toplam
50%	1. gün	180,1 ± 21,1 ^{AB}	168,8 ± 31,9 ^{AB}	132,4 ± 4,1 ^{AB}	147,4 ± 16,9 ^{AB}	157,2 ± 26,3 ^E
	3. gün	1142,5 ± 101,9 ^D	1055,3 ± 46,1 ^D	861,6 ± 112,1 ^{CD}	898,5 ± 58 ^{CD}	989,5 ± 139,5 ^D
	7. gün	2620,2 ± 320,1 ^G	2438,3 ± 215,7 ^G	1954,8 ± 118,8 ^{EF}	2295,6 ± 241,5 ^{FG}	2327,2 ± 324,2 ^B
	Toplam	1314,2 ± 1077,7 ^F	1220,8 ± 996,8 ^{DF}	982,9 ± 798,6 ^{BC}	1113,8 ± 952,3 ^{BD}	1158 ± 928
100%	1. gün	227,7 ± 47,2 ^{AB}	316,3 ± 41,5 ^{AB}	216,1 ± 48,2 ^{AB}	114,2 ± 37,4 ^A	218,6 ± 83,6 ^E
	3. gün	525,1 ± 33,2 ^{BC}	901,7 ± 60,7 ^{CD}	153,1 ± 2,1 ^{AB}	158,6 ± 7,8 ^{AB}	434,6 ± 324 ^C
	7. gün	1072,5 ± 131,3 ^D	1576,2 ± 275 ^E	456,4 ± 125 ^{AB}	272,8 ± 77,6 ^{AB}	844,5 ± 557,9 ^A
	Toplam	608,4 ± 378 ^E	931,4 ± 564,2 ^C	275,2 ± 153,9 ^A	181,9 ± 83 ^A	499,2 ± 449,8
Toplam	1. gün	203,9 ± 41,8 ^C	242,6 ± 87,3 ^C	174,2 ± 55,1 ^C	130,8 ± 31,7 ^C	187,9 ± 68,3 ^a
	3. gün	833,8 ± 344,9 ^E	978,5 ± 97 ^E	507,4 ± 394,5 ^B	528,6 ± 407 ^B	712,1 ± 373,9 ^b
	7. gün	1846,4 ± 875,5 ^D	2007,2 ± 521,4 ^D	1205,6 ± 828 ^A	1284,2 ± 1119,5 ^A	1585,8 ± 879 ^c
	Toplam	961,3 ± 863,5 ^c	1076,1 ± 799,7 ^b	629,1 ± 666,2 ^a	647,8 ± 812,4 ^a	828,6 ± 796,4

a-c: Aynı harfe sahip gruplar ve zamanlar arasında fark yoktur, A-G: Aynı harfe sahip etkileşimler arasında fark yoktur



Şekil 4-18: BMP-2 değerleri için ortalama grafiği (pg/ml)

4.2.2. FGF-2 Düzeyine İlişkin Analiz Sonuçları

Grup ana etkisi FGF-2 değerleri üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,001$). En yüksek FGF-2 ortalaması Biodentine grubundan elde edilirken, en düşük FGF-2 ortalaması MTA CEM grubundan elde edildi. Zaman ana etkisi FGF-2 değerleri üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,001$). En yüksek FGF-2 ortalaması yedinci günde elde edildi. Konsantrasyon ana etkisi FGF-2 değerleri üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,001$). Konsantrasyona göre FGF-2 değerlerinin ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlılık bulundu. En yüksek FGF-2 ortalaması %50'lik konsantrasyonda elde edildi. Grup ve zaman etkileşimi birlikte değerlendirildiğinde FGF-2 değerleri üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,001$). Grup ve konsantrasyon etkileşimi birlikte değerlendirildiğinde FGF-2 değerleri üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir etkisi vardır ($p<0,001$). Zaman ve konsantrasyon etkileşimi incelendiğinde FGF-2 değerleri üzerinde istatistiksel olarak anlamlılık bulundu ($p<0,001$). Grup, zaman ve konsantrasyon etkileşimi birlikte değerlendirildiğinde FGF-2 değerleri üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir etkisi olduğu bulundu ($p<0,001$) (Tablo 4-10).

Tablo 4-10: FGF-2 için analiz sonuçları

		Sd	p
Grup	84,044	3	<0,001
Zaman	894,431	2	<0,001
Konsantrasyon	454,529	1	<0,001
Grup * zaman	99,375	6	<0,001
Grup * Konsantrasyon	74,931	3	<0,001
Zaman * Konsantrasyon	326,262	2	<0,001
Grup * zaman * Konsantrasyon	98,845	6	<0,001

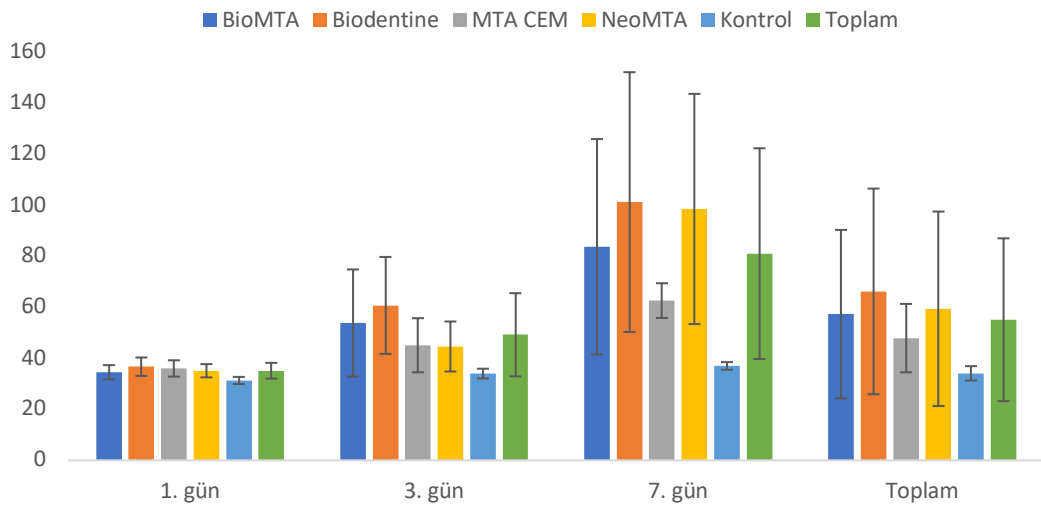
Sd: Serbestlik derecesi, *Wald Ki-kare test istatistiği

Biyoseramik esaslı deney grupları ortalamaları günler açısından karşılaştırıldığında 1., 3. ve 7. günlerde FGF-2 seviyeleri artış gösterse de bu artış kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p: 0,079$). Toplam ortalamalar açısından ise Biodentine ve NeoMTA grubuna ait FGF-2 düzeyleri, kontrol grubuna kıyasla artış gösterirken ($p<0,001$), MTA CEM ve BioMTA grupları ile kontrol grup ortalamaları arasında istatistiksel bir farklılık bulunmadı (Tablo 4-11, Şekil 4-19).

Tablo 4-11: 1., 3. ve 7. günlerde FGF-2 değerlerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi

	BioMTA	Biodentine	MTA CEM	NeoMTA	Kontrol	Toplam
1. gün	34,5 ± 2,8	36,7 ± 3,6	36 ± 3,2	35,1 ± 2,6	31,3 ± 1,4	35,1 ± 3,1 ^a
3. gün	53,8 ± 21	60,7 ± 19	45,1 ± 10,6	44,6 ± 9,8	34 ± 1,9	49,2 ± 16,3 ^a
7. gün	83,7 ± 42,2	101,2 ± 50,9	62,6 ± 6,8	98,5 ± 45,1	37 ± 1,5	81 ± 41,3 ^b
Toplam	57,3 ± 33 ^{ab}	66,2 ± 40,3 ^a	47,9 ± 13,4 ^{ab}	59,4 ± 38,1 ^a	34,1 ± 2,8 ^b	55,1 ± 31,9

a-b: Aynı harfe sahip gruplar ve zamanlar arasında fark yoktur

**Şekil 4-19: Deney ve kontrol gruplarına ait FGF-2 değerlerinin ortalama ve standart sapma grafiği**

4.2.2.1. BioMTA İçin FGF-2 Düzeyine İlişkin Bulguların Değerlendirilmesi

BioMTA %50'lik doz için ölçülen FGF-2 düzeyi en düşük 1. gün olup, 3. gün 1. günden, 7. gün ise 3. günden anlamlı derecede yüksek bulundu. BioMTA için %50'lik doza sahip olan gruplar arasında zamana ait karşılaştırma yapıldığında materyal ile etkileşim süresi uzadıkça FGF-2 düzeyinin de anlamlı derecede arttığı sonucuna ulaşıldı. BioMTA %100'lük form için ise günler arasında istatistiksel bir farklılık bulunmadı.

BioMTA için aynı gün farklı dozlar açısından karşılaştırma yapıldığında; 1. gün için istatistiksel açıdan bir farklılık bulunmazken, 3. ve 7. günlerde BioMTA %50, %100'lük konsantrasyona kıyasla anlamlı olarak daha yüksek FGF-2 düzeyi oluşmasını sağladı. BioMTA için 1. gün hariç, 3. ve 7. günlerde materyalin dozuna ait karşılaştırma yapıldığında, doz arttıkça FGF-2 düzeyinin azaldığı sonucuna ulaşıldı.

Deney grupları arasında karşılaştırma yapıldığında; BioMTA %50 1. ve 3. günler ile aynı doz ve güne sahip diğer gruplar arasında istatistiksel bir farklılık bulunmadı. BioMTA %50 7. gün; aynı gün ve doz açısından karşılaştırıldığında Biodentine'den anlamlı olarak düşük, MTA CEM'den anlamlı olarak yüksek ve NeoMTA ile benzer bulundu.

BioMTA %100'lük konsantrasyona 1., 3. ve 7. günler için aynı doz ve günlere sahip diğer gruplar arasında istatistiksel bir farklılık bulunmadı (Tablo 4-12, Şekil 4-20).

4.2.2.2. Biodentine İçin FGF-2 Düzeyine İlişkin Bulguların Değerlendirilmesi

Biodentine %50'lik doz için 1. gün 3. güne kıyasla ve 3. gün ise 7. güne göre FGF-2 düzeyi anlamlı olarak daha düşük bulundu. Biodentine %50'lik doza sahip olan gruplar arasında zamana ait karşılaştırma yapıldığında materyal ile etkileşim süresi uzadıkça FGF-2 düzeyinin de anlamlı düzeyde arttığı sonucuna ulaşıldı. Biodentine %100'lük form için ise günler arasında istatistiksel bir farklılık bulunmadı.

Biodentine için aynı gün farklı dozlar açısından karşılaştırma yapıldığında; 1. gün için istatistiksel açıdan bir farklılık bulunmadı. 3. ve 7. günlerde ise; Biodentine %50'lik formda, %100'lük forma kıyasla istatistiksel olarak daha yüksek FGF-2 düzeyi bulundu. Biodentine için 1. gün hariç, 3. ve 7. günlerde materyalin dozuna ait karşılaştırma yapıldığında, doz arttıkça FGF-2 düzeyinin azaldığı sonucuna ulaşıldı.

Gruplar arası karşılaştırma yapıldığında Biodentine %50 1. gün ile aynı doz ve güne sahip diğer gruplar arasında istatistiksel bir farklılık bulunmadı. Biodentine %50 3. gün, aynı doz ve güne sahip diğer gruplar arasında MTA CEM ve BioMTA ile benzer, NeoMTA grubundan anlamlı olarak yüksek FGF-2 düzeyi oluşturduğu bulundu. Biodentine %50 7. gün; aynı doz ve güne sahip BioMTA ve MTA CEM grubundan anlamlı olarak yüksek FGF-2 düzeyine sahip olduğu ve NeoMTA ile benzer olduğu bulundu.

Biodentine %100'lük doza sahip 1., 3. ve 7. günler için aynı doz ve günlere sahip diğer gruplar arasında istatistiksel bir farklılık bulunmadı (Tablo 4-12, Şekil 4-20).

4.2.2.3. MTA CEM İçin FGF-2 Düzeyine İlişkin Bulguların Değerlendirilmesi

MTA CEM %50 1. gün; aynı doza sahip 3. gün ile benzer olup, 7. günden anlamlı olarak düşük bulundu. MTA CEM %100'lük form için ise günler arasında istatistiksel bir farklılık bulunmadı.

MTA CEM için aynı gün farklı dozlar açısından karşılaştırma yapıldığında; tüm günlerde dozlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı.

Gruplar arası karşılaştırma yapıldığında; MTA CEM %50 1. ve 3. günlerde, aynı doz ve güne sahip diğer gruplar arasında istatistiksel bir farklılık bulunmadı. MTA CEM %50 7. gün ise aynı doz ve güne sahip diğer tüm gruplardan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük FGF-2 düzeyine sahip olduğu bulundu.

MTA CEM %100'lük doza sahip 1., 3. ve 7. günler için aynı doz ve günlere sahip diğer gruplar arasında istatistiksel bir farklılık bulunmadı (Tablo 4-12, Şekil 4-20).

4.2.2.4. NeoMTA İçin FGF-2 Düzeyine İlişkin Bulguların Değerlendirilmesi

NeoMTA %50 1. gün; aynı doz için 3. gün ile benzer olup, 7. günden ise istatistiksel olarak düşük bulundu. NeoMTA için %50'lik doza sahip olan gruplar arasında zamana ait karşılaştırma yapıldığında materyal ile etkileşim süresi uzadıkça FGF-2 düzeyinin de anlamlı düzeyde arttığı sonucuna ulaşıldı. NeoMTA %100'lük konsantrasyon için günler arasında herhangi bir istatistiksel farklılık bulunmadı.

NeoMTA için aynı gün farklı dozlar açısından karşılaştırma yapıldığında; 1. ve 3. günler için %50 ve %100'lük dozlar arasında istatistiksel bir farklılık bulunmadı. NeoMTA 7. güne ait %50'lik doz, %100'lük doza kıyasla anlamlı düzeyde daha yüksek FGF-2 düzeyine sahip olduğu saptandı.

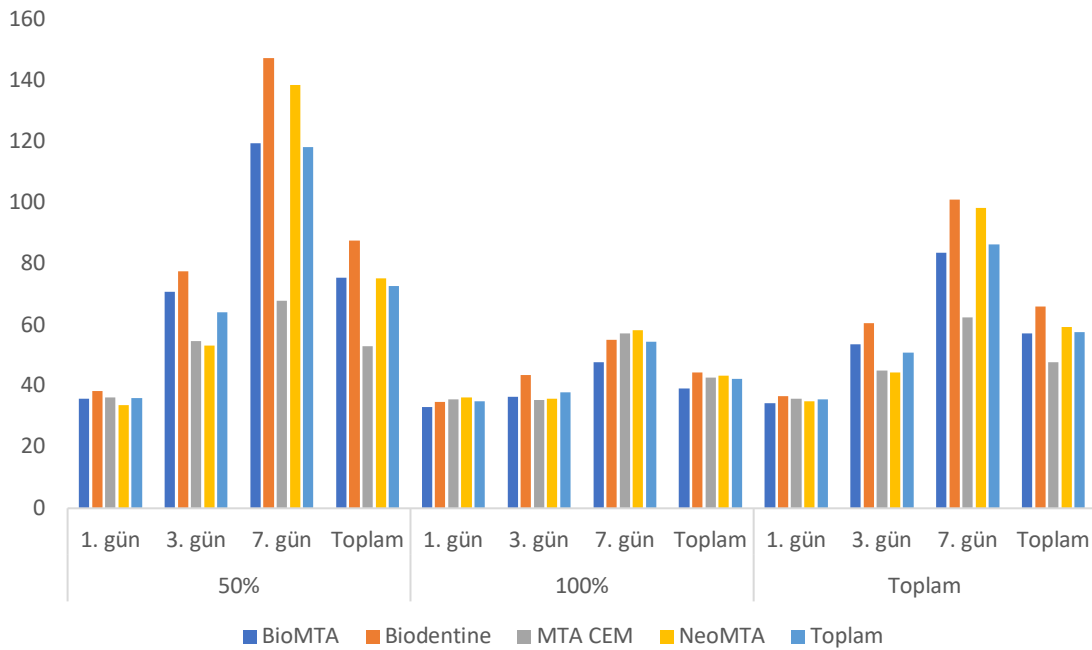
Gruplar arası karşılaştırma yapıldığında; NeoMTA %50 1. gün ile aynı doz ve güne sahip diğer gruplar arasında istatistiksel bir farklılık bulunmadı. NeoMTA %50 3. gün, MTA CEM ve BioMTA %50 3. gün ile benzer, Biodentine grubundan ise anlamlı düzeyde düşük bulundu. NeoMTA %50 7. gün; aynı gün ve doz için BioMTA ve Biodentine grubu ile benzer, MTA CEM grubundan ise anlamlı olarak yüksek bulundu.

NeoMTA %100'lük doza sahip 1., 3. ve 7. günler için aynı doz ve günlere sahip diğer gruplar arasında istatistiksel bir farklılık bulunmadı (Tablo 4-12, Şekil 4-20).

Tablo 4-12: FGF-2 için tanımlayıcı istatistikler

Konst.	Zaman	BioMTA	Biodentine	MTA CEM	NeoMTA	Toplam
50%	1. gün	35,8 ± 1,6 ^{ABC}	38,5 ± 4,3 ^{ABC}	36,3 ± 3,9 ^{ABC}	33,8 ± 2,2 ^A	36,1 ± 3,2 ^C
	3. gün	71 ± 13,7 ^{DE}	77,7 ± 5,1 ^E	54,8 ± 0,9 ^{ABCDE}	53,4 ± 0,9 ^{ABCD}	64,2 ± 12,5 ^D
	7. gün	119,5 ± 23,6 ^F	147,4 ± 8,2 ^G	68 ± 5,3 ^{DE}	138,6 ± 16 ^{FG}	118,4 ± 34,6 ^B
	Toplam	75,5 ± 38,9 ^B	87,8 ± 48,1 ^D	53 ± 14,2 ^C	75,3 ± 48,9 ^B	72,9 ± 40,3
100%	1. gün	33,2 ± 3,3 ^A	34,9 ± 1,9 ^{AB}	35,7 ± 3,1 ^{ABC}	36,3 ± 2,6 ^{ABC}	35 ± 2,7 ^C
	3. gün	36,6 ± 5,1 ^{ABC}	43,7 ± 4,2 ^{ABC}	35,5 ± 1 ^{ABC}	35,8 ± 2 ^{ABC}	37,9 ± 4,6 ^C
	7. gün	47,8 ± 7,1 ^{ABCD}	55,1 ± 4 ^{ABCDE}	57,3 ± 0,9 ^{BCDE}	58,3 ± 2,7 ^{CDE}	54,6 ± 5,6 ^A
	Toplam	39,2 ± 8,1 ^A	44,6 ± 9,3 ^{AC}	42,8 ± 11 ^A	43,5 ± 11,3 ^A	42,5 ± 9,8
Toplam	1. gün	34,5 ± 2,8 ^B	36,7 ± 3,6 ^B	36 ± 3,2 ^B	35,1 ± 2,6 ^B	35,6 ± 3 ^a
	3. gün	53,8 ± 21 ^{CE}	60,7 ± 19 ^C	45,1 ± 10,6 ^{BE}	44,6 ± 9,8 ^{BE}	51,1 ± 16,3 ^b
	7. gün	83,7 ± 42,2 ^D	101,2 ± 50,9 ^A	62,6 ± 6,8 ^C	98,5 ± 45,1 ^A	86,5 ± 40,6 ^c
	Toplam	57,3 ± 33 ^a	66,2 ± 40,3 ^c	47,9 ± 13,4 ^b	59,4 ± 38,1 ^a	57,7 ± 32,9

a-c: Aynı harfe sahip gruplar ve zamanlar arasında fark yoktur, A-G: Aynı harfe sahip etkileşimler arasında fark yoktur



Şekil 4-20: FGF-2 değerleri için ortalama grafiği (pg/ml)

4.2.3. VEGF Düzeyine İlişkin Analiz Sonuçları

Grup ana etkisi VEGF değerleri üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,001$). En yüksek VEGF ortalaması Biodentine grubundan elde edilirken, en düşük VEGF ortalaması NeoMTA grubundan elde edildi. Zaman ana etkisi değerlendirildiğinde VEGF değerleri üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,001$). En yüksek VEGF ortalaması yedinci günde elde edildi. Konsantrasyon ana etkisi VEGF değerleri üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,001$). Konsantrasyona göre VEGF değerlerinin ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulundu. En yüksek VEGF ortalaması %50'lik konsantrasyonda elde edildi. Grup ve zaman etkileşimi değerlendirildiğinde VEGF değerleri üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,001$). Grup ve konsantrasyon etkileşimi birlikte incelendiğinde VEGF değerleri üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir etkisi olduğu bulundu ($p<0,001$). Zaman ve konsantrasyon etkileşimi değerlendirildiğinde VEGF değerleri üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,001$). Grup, zaman ve konsantrasyon etkileşimi beraber değerlendirildiğinde VEGF değerleri üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir etkisi olduğu bulundu ($p<0,001$) (Tablo 4-13).

Tablo 4-13: VEGF için analiz sonuçları

		Sd	p
Grup	715,111	3	<0,001
Zaman	790,511	2	<0,001
Konsantrasyon	106,446	1	<0,001
Grup * zaman	734,655	6	<0,001
Grup * Konsantrasyon	257,079	3	<0,001
Zaman * Konsantrasyon	113,37	2	<0,001
Grup * zaman * Konsantrasyon	385,847	6	<0,001

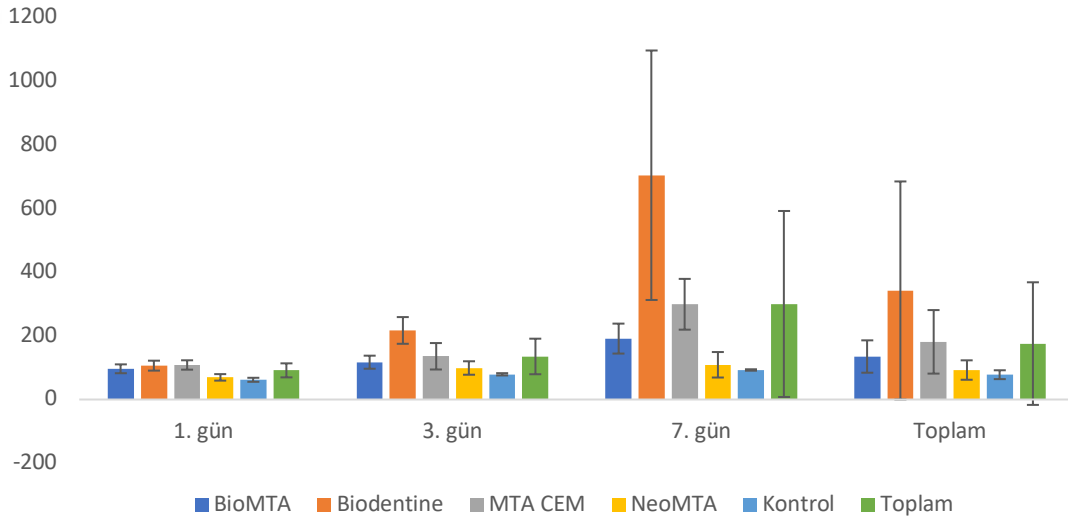
Sd: Serbestlik derecesi, *Wald Ki-kare test istatistiği

Biyoseramik esaslı dental materyallere ait VEGF düzeyleri, 1. gün için kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel bir farklılık bulunmadı. 3. gün deney gruplarına ait VEGF düzeyleri artış göstermesine rağmen, bu artış kontrol grubu ile anlamlı bir farklılık oluşturmadi. 7. gün yalnızca Biodentine grubunun hem kontrol grubuna hem de diğer deney gruplarına kıyasla anlamlı olarak VEGF düzeyini arttırdığı bulundu ($p<0,001$). Toplam grup ortalamaları değerlendirildiğinde yalnızca Biodentine grubu kontrol grubuna göre anlamlı bir yükselme gösterdi ($p<0,001$) (Tablo 4-14, Şekil 4-21).

Tablo 4-14: 1., 3. ve 7. günlerde VEGF değerlerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi

	BioMTA	Biodentine	MTA CEM	NeoMTA	Kontrol	Toplam
1. gün	96,4 ± 13,9 ^{AB}	106,3 ± 15,6 ^{AB}	108,4 ± 14,7 ^{AB}	69,5 ± 10,2 ^A	61,9 ± 6,3 ^{AB}	91,5 ± 22 ^a
3. gün	117,1 ± 20,5 ^{AB}	216,8 ± 41,9 ^{AB}	135,7 ± 41,5 ^{AB}	98,9 ± 21,1 ^{AB}	79,1 ± 3,6 ^{AB}	135,1 ± 55,8 ^a
7. gün	191,2 ± 47 ^{AB}	703,9 ± 391,5 ^C	298,9 ± 79,7 ^B	109 ± 40 ^{AB}	92,7 ± 2,2 ^{AB}	299,8 ± 291,9 ^b
Toplam	134,9 ± 50,8 ^a	342,3 ± 342,1 ^b	181 ± 99,7 ^a	92,5 ± 30,5 ^a	77,9 ± 13,9 ^a	175,5 ± 192,4

a-b: Aynı harfe sahip gruplar ve zamanlar arasında fark yoktur, A-C: Aynı harfe sahip etkileşimler arasında fark yoktur.

**Şekil 4-21: Deney ve kontrol gruplarına ait VEGF değerlerinin ortalama ve standart sapma grafiği**

4.2.3.1. BioMTA İçin VEGF Düzeyine İlişkin Bulguların Değerlendirilmesi

BioMTA %50'lik doz için ölçülen VEGF düzeyleri 1., 3. ve 7. günler arasında istatistiksel olarak farklılık oluşturmadi. BioMTA %100'lük konsantrasyon için ölçülen VEGF düzeyleri 1. ve 3. günler arasında istatistiksel açıdan benzer, 7. günde ölçülen VEGF düzeyi 1. günden anlamlı olarak yüksek, 3. gün ile benzer bulundu.

BioMTA için aynı gün farklı dozlar açısından karşılaştırma yapıldığında; 1., 3. ve 7. günlerde dozlar arasında anlamlı bir farklılık bulunmadı.

Gruplar arası karşılaştırma yapıldığında; BioMTA %50 1. gün ile aynı doz ve güne sahip diğer gruplar arasında istatistiksel bir farklılık bulunmadı. BioMTA %50 3.

gün; aynı doz ve güne sahip Biodentine grubuna göre anlamlı olarak daha düşük bulunurken, diğer gruplarla arasında ise istatistiksel bir fark bulunmadı. BioMTA %50 7. gün; NeoMTA %50 7. gün ile benzer olup, Biodentine ve MTA CEM %50 7. güne kıyasla anlamlı olarak daha düşük bulundu.

BioMTA %100 1. ve 3. günler ile aynı doz ve güne sahip diğer gruplar arasında istatistiksel bir farklılık bulunmadı. BioMTA %100 7. gün; Biodentine %100 7. günden anlamlı olarak düşük bulundu ve diğer iki grupla arasında istatistiksel bir farklılık bulunmadı (Tablo 4-15, Şekil 4-22).

4.2.3.2. Biodentine İçin VEGF Düzeyine İlişkin Bulguların Değerlendirilmesi

Biodentine %50'lik form için günler arası karşılaştırma yapıldığında; 1. gün 3. günden, 3. gün ise 7. günden istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük bulundu. Biodentine %100'lük konsantrasyon için ölçülen VEGF düzeyi 1. gün ile 3. gün benzer olup, 7. güne kıyasla anlamlı olarak düşük bulundu. Biodentine %50 ve %100'lük dozlar için zamana ait karşılaştırma yapıldığında materyal ile etkileşim süresi uzadıkça VEGF düzeyinin de anlamlı düzeyde arttığı sonucuna ulaşıldı.

Biodentine için aynı gün farklı dozlar açısından karşılaştırma yapıldığında; 1. ve 3. günler için dozlar arasında anlamlı bir farklılık bulunmadı. VEGF düzeyleri; 7. gün için %50'lik dozda %100'den anlamlı olarak yüksek bulundu.

Gruplar arası karşılaştırma yapıldığında; Biodentine %50 1. gün ile aynı doz ve güne sahip diğer gruplar arasında istatistiksel bir farklılık bulunmadı. Biodentine %50 3. gün, aynı doz ve güne sahip MTA CEM grubu ile benzer olup, BioMTA ve NeoMTA gruplarından anlamlı olarak yüksek bulundu. Biodentine %50 7. gün; aynı doz ve güne sahip diğer gruplarla karşılaştırıldığında, tüm gruplardan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu.

Biodentine %100 1. ve 3. günler ile aynı doz ve güne sahip diğer gruplar arasında istatistiksel bir farklılık bulunmadı. Biodentine %100 7. gün; aynı doz ve güne sahip diğer gruplara kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu (Tablo 4-15, Şekil 4-22).

4.2.3.3. MTA CEM İçin VEGF Düzeyine İlişkin Bulguların Değerlendirilmesi

MTA CEM %50 konsantrasyonda ölçülen VEGF düzeyleri; 1. gün ile 3. gün benzer olup, bu günler 7. günden istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulundu. MTA CEM %50 doz için zamana ait karşılaştırma yapıldığında materyal ile etkileşim süresi uzadıkça VEGF düzeyinin de anlamlı olarak arttığı sonucuna ulaşıldı. MTA CEM %100'lük doz için VEGF düzeyleri; 1. ve 3. gün arasında istatistiksel bir farklılık olmadığı, ancak 3. günün 7. güne oranla anlamlı derecede düşük olduğu bulundu.

MTA CEM için aynı gün farklı dozlar açısından karşılaştırma yapıldığında; 1. ve 3. günler için dozlar arasında anlamlı bir farklılık bulunmadı. 7. gün ölçülen VEGF düzeyleri; MTA CEM %50'lik formda %100'lüğe kıyasla anlamlı olarak daha yüksek bulundu.

Gruplar arası karşılaştırma yapıldığında; MTA CEM %50 1. gün ile aynı doz ve güne sahip diğer gruplar arasında istatistiksel bir farklılık bulunmadı. MTA CEM %50 3. gün; aynı doz ve güne sahip Biodentine grubundan anlamlı olarak düşük, diğer gruplar ile benzer bulundu. MTA CEM %50 7. gün ise; Biodentine %50 7. güne kıyasla anlamlı olarak düşük, diğer gruplardan anlamlı olarak yüksek bulundu.

MTA CEM %100 1. ve 3. günler için aynı doz ve güne sahip diğer gruplar arasında istatistiksel bir farklılık bulunmadı. MTA CEM %100 7. gün aynı gün ve doza sahip Biodentine grubuna kıyasla anlamlı olarak düşük bulundu ve diğer gruplar ile arasında istatistiksel bir farklılık bulunmadı (Tablo 4-15, Şekil 4-22).

4.2.3.4. NeoMTA İçin VEGF Düzeyine İlişkin Bulguların Değerlendirilmesi

NeoMTA %50'lik doz için VEGF düzeyleri günler açısından karşılaştırıldığında; 1., 3. ve 7. günler arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık bulunmadı. NeoMTA %100'lük doz için VEGF düzeyleri de; günler arasında anlamlı bir farklılık oluşturmadığı bulundu.

NeoMTA için aynı gün farklı dozlar açısından karşılaştırma yapıldığında; tüm günler için dozlar arasında anlamlı bir farklılık bulunmadı.

Gruplar arası karşılaştırma yapıldığında; NeoMTA %50 1. gün ile aynı doz ve güne sahip diğer gruplar arasında istatistiksel bir farklılık bulunmadı. NeoMTA %50 3. gün; aynı doz ve güne sahip Biodentine grubundan anlamlı olarak düşük bulunurken, diğer gruplarla arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı. NeoMTA

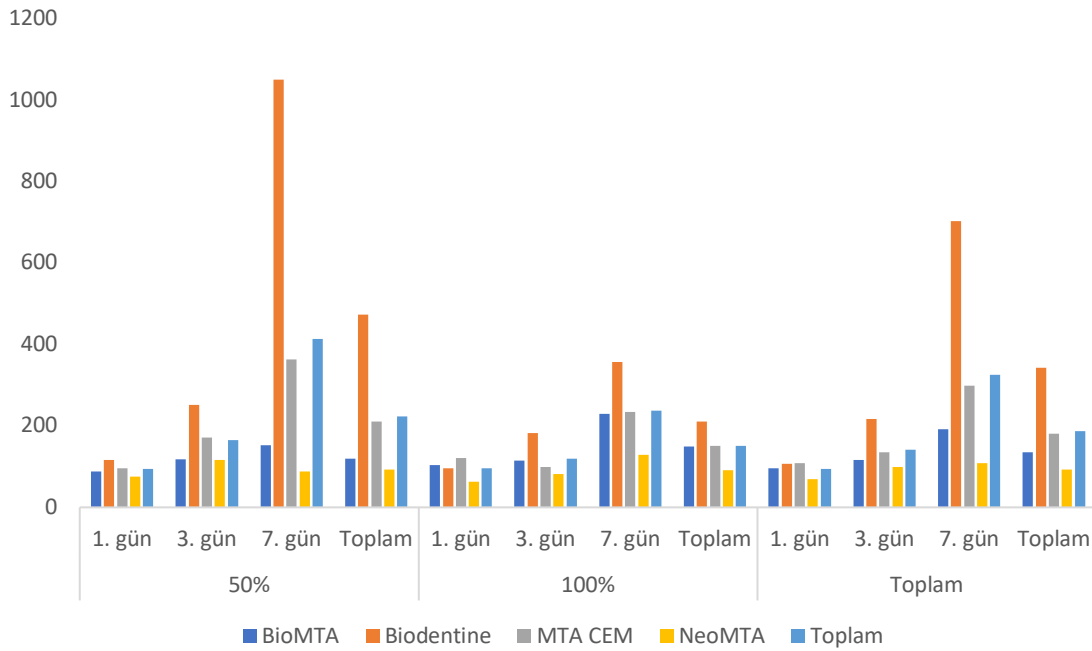
%50 7. gün; aynı doz ve güne sahip BioMTA grubu ile benzer olup, Biodentine ve MTA CEM grubundan anlamlı olarak düşük bulundu.

NeoMTA %100 1. ve 3. günler ile aynı doz ve güne sahip diğer gruplar arasında istatistiksel bir farklılık bulunmadı. NeoMTA %100 7. gün de benzer şekilde; Biodentine %100 7. günden anlamlı düzeyde düşük bulundu ve diğer gruplarla anlamlı bir farklılık oluşturmadı (Tablo 4-15, Şekil 4-22).

Tablo 4-15: VEGF için tanımlayıcı istatistikler

Konst.	Zaman	BioMTA	Biodentine	MTA CEM	NeoMTA	Toplam
50%	1. gün	88,3 ± 16,6 ^{AB}	117 ± 10,8 ^{ABC}	96 ± 3,5 ^{AB}	75,4 ± 1,7 ^{AB}	94,2 ± 18 ^C
	3. gün	118,6 ± 6,6 ^{ABC}	251,6 ± 27,3 ^{EF}	172,3 ± 9,5 ^{ABCDE}	115,9 ± 14,9 ^{ABC}	164,6 ± 59,2 ^D
	7. gün	152,4 ± 10,6 ^{ABCDE}	1050,9 ± 147,6 ^G	363 ± 56,7 ^F	88,8 ± 46,9 ^{AB}	413,8 ± 404,7 ^B
	Toplam	119,8 ± 29,7 ^{AB}	473,2 ± 443,6 ^D	210,4 ± 122,5 ^C	93,4 ± 30,4 ^A	224,2 ± 268,4
100%	1. gün	104,5 ± 3,2 ^{AB}	95,7 ± 12,2 ^{AB}	120,8 ± 8 ^{ABCD}	63,6 ± 12,4 ^A	96,1 ± 23,3 ^C
	3. gün	115,5 ± 31,6 ^{ABC}	182,1 ± 4,4 ^{BCDE}	99,1 ± 14,2 ^{AB}	81,9 ± 4,1 ^{AB}	119,6 ± 42,4 ^C
	7. gün	229,9 ± 30,1 ^{CDE}	356,8 ± 13,3 ^F	234,9 ± 18,6 ^{DE}	129,2 ± 24,2 ^{ABCD}	237,7 ± 86,4 ^A
	Toplam	150 ± 64 ^B	211,5 ± 115,6 ^C	151,6 ± 64,4 ^B	91,6 ± 32,4 ^A	151,2 ± 83,8
Toplam	1. gün	96,4 ± 13,9 ^{CA}	106,3 ± 15,6 ^{CA}	108,4 ± 14,7 ^{CA}	69,5 ± 10,2 ^A	95,2 ± 20,4 ^a
	3. gün	117,1 ± 20,5 ^{CA}	216,8 ± 41,9 ^E	135,7 ± 41,5 ^{CF}	98,9 ± 21,1 ^{AC}	142,1 ± 55,3 ^b
	7. gün	191,2 ± 47 ^{EF}	703,9 ± 391,5 ^D	298,9 ± 79,7 ^B	109 ± 40 ^{AC}	325,7 ± 300 ^c
	Toplam	134,9 ± 50,8 ^a	342,3 ± 342,1 ^b	181 ± 99,7 ^c	92,5 ± 30,5 ^d	187,7 ± 200,8

a-c: Aynı harfe sahip gruplar ve zamanlar arasında fark yoktur, A-G: Aynı harfe sahip etkileşimler arasında fark yoktur



Şekil 4-22: VEGF değerleri için ortalama grafiği (pg/ml)

4.3. Alkalen Fosfataz Aktivitesi Tayinine Ait Bulgular

Grup ana etkisi ALP değerleri üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,001$). En yüksek ALP ortalaması Biodentine grubundan elde edilirken, en düşük ALP ortalaması MTA CEM grubundan elde edildi. Zaman ana etkisi ALP değerleri üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,001$). En yüksek ALP ortalaması yedinci günde elde edildi. Konsantrasyon ana etkisi ALP değerleri üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,001$). Konsantrasyona göre ALP değerlerinin ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulundu. En yüksek ALP ortalaması %50'lik konsantrasyonda elde edildi. Grup ve zaman etkileşimi birlikte değerlendirildiğinde ALP değerleri üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,001$). Grup ve konsantrasyon etkileşimi incelendiğinde ALP değerleri üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir etkisi olduğu bulundu ($p=0,001$). Zaman ve konsantrasyon etkileşimi ALP değerleri üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,001$). Grup, zaman ve konsantrasyon etkileşimi birlikte değerlendirildiğinde ALP değerleri üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir etkisi olduğu bulundu ($p<0,001$) (Tablo 4-16).

Tablo 4-16: ALP için analiz sonuçları

		Sd	p
Grup	216,593	3	<0,001
Zaman	283,306	2	<0,001
Konsantrasyon	286,19	1	<0,001
Grup * zaman	81,02	6	<0,001
Grup * konsantrasyon	17,514	3	0,001
Zaman * Konsantrasyon	72,734	2	<0,001
Grup * zaman * Konsantrasyon	39,342	6	<0,001

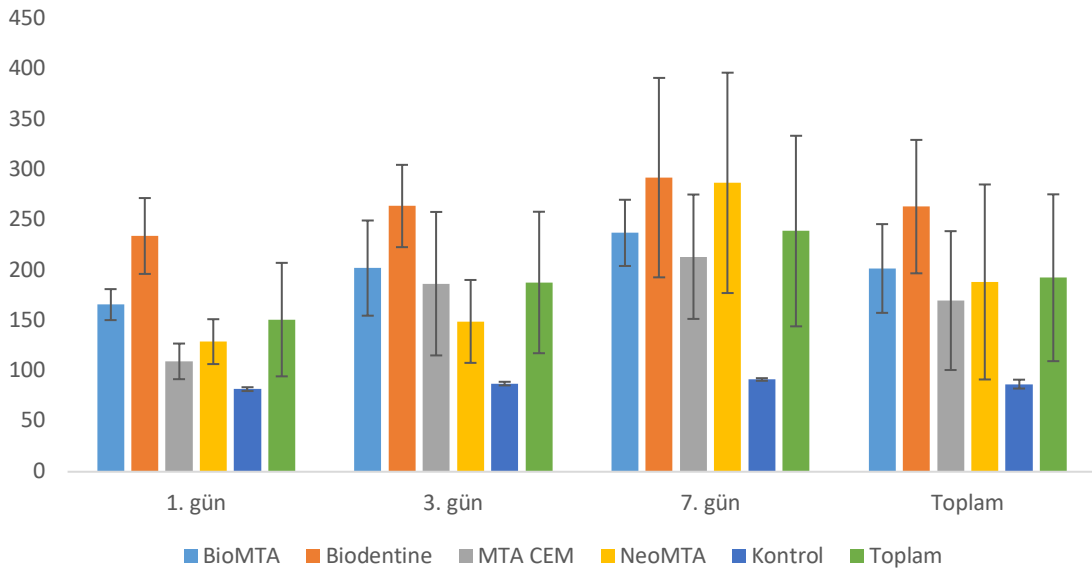
Sd: Serbestlik derecesi, *Wald Ki-kare test istatistiği

Biyoseramik esaslı dental materyaller ALP düzeyleri açısından karşılaştırıldığında 1. ve 3. günlerde Biodentine grubu, kontrol grubuna kıyasla ALP düzeyini anlamlı şekilde arttırırken ($p<0,001$), bu günlerde diğer deney grupları ile kontrol grubu arasında istatistiksel bir farklılık bulunmadı. 7. gün BioMTA, Biodentine ve NeoMTA grubu kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir artış sağlarken MTA CEM grubuna ait ALP düzeyleri kontrol grubu ile istatistiksel bir farklılık oluşturmadi. Toplam grup ortalamaları değerlendirildiğinde, tüm deney gruplarının ALP düzeylerini kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak arttırdığı bulundu ($p<0,001$) (Tablo 4-17, Şekil 4-23).

Tablo 4-17: 1., 3. ve 7. günlerde ALP değerlerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi

	BioMTA	Biodentine	MTA CEM	NeoMTA	Kontrol	Toplam
1. gün	166,1 ± 15,4 ^{ADC}	234,3 ± 37,7 ^{DB}	109,7 ± 17,7 ^A	129,3 ± 22,3 ^{AC}	82,1 ± 1,9 ^A	151,2 ± 56,4 ^a
3. gün	202,4 ± 47,3 ^{AB}	264,1 ± 40,9 ^{DB}	186,9 ± 71,3 ^{ACD}	149,4 ± 41,2 ^{AC}	87,6 ± 1,8 ^A	188,1 ± 70,3 ^b
7. gün	237,4 ± 32,9 ^{DB}	292,3 ± 99,1 ^B	213,7 ± 61,8 ^{BC}	287,1 ± 109,5 ^B	91,7 ± 1,3 ^{AC}	239,2 ± 94,7 ^c
Toplam	202 ± 44,1 ^b	263,5 ± 66,3 ^c	170,1 ± 69 ^b	188,6 ± 96,9 ^b	87,1 ± 4,4 ^a	192,8 ± 82,9

a-c: Aynı harfe sahip gruplar ve zamanlar arasında fark yoktur, A-D: Aynı harfe sahip etkileşimler arasında fark yoktur



Şekil 4-23: Deney ve kontrol gruplarına ait ALP değerlerinin ortalama ve standart sapma grafiği

4.3.1. BioMTA İçin ALP Düzeyine İlişkin Bulguların Değerlendirilmesi

BioMTA %50 1. gün için ölçülen ALP düzeyleri, aynı konsantrasyon için 3. gün ile benzer olup, 7. günden anlamlı düzeyde düşük bulundu. BioMTA %100 1. güne ait ALP düzeyleri de benzer şekilde 3. ve 7. günlerle karşılaştırıldığında artış olsa da bu artış istatistiksel açıdan anlamlı bulunmadı ($p>0,05$).

BioMTA için aynı gün farklı dozlar açısından karşılaştırma yapıldığında; her üç gün için dozlar arası ikili karşılaştırmalarda anlamlı bir farklılık bulunmadı.

Gruplar arası karşılaştırma yapıldığında; BioMTA %50 1. gün için ölçülen ALP düzeyi, aynı gün ve doz içeren diğer gruplar için ölçülen ALP düzeyleri ile karşılaştırıldığında Biodentine grubundan anlamlı olarak düşük bulunurken, diğer gruplarla istatistiksel açıdan bir farklılık bulunmadı. BioMTA %50 3. gün için ölçülen ALP düzeyi, diğer gruplarla karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık oluşturmadı. BioMTA %50 7. gün, aynı gün ve doza sahip Biodentine ve NeoMTA grubundan anlamlı olarak düşük bulunurken, MTA CEM grubu ile anlamlı bir farklılık oluşturmadı.

BioMTA %100 1., 3. ve 7. günler için ölçülen ALP düzeyi, aynı gün ve doz içeren diğer gruplarla karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık bulunmadı. (Tablo 4-18, Şekil 4-24).

4.3.2. Biodentine İçin ALP Düzeyine İlişkin Bulguların Değerlendirilmesi

Biodentine %50 1. gün için ölçülen ölçülen ALP düzeyleri; aynı doz için diğer günlerle karşılaştırıldığında 3. gün ile istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermezken, 7. günden anlamlı düzeyde düşük bulundu. Biodentine %100'lük doz için günler arasında anlamlı bir farklılık bulunmadı.

Biodentine için aynı günlerde dozlar arası ikili karşılaştırmalarda, 1. ve 3. günlerde herhangi bir istatistiksel anlamlılık bulunmadı. 7. günde Biodentine %50'lik gruptaki ALP düzeyi, %100'lük gruba göre anlamlı olarak yüksek bulundu.

Deney grupları arasında karşılaştırma yapıldığında, Biodentine %50 1. gün, aynı doz ve güne sahip diğer gruplardan anlamlı düzeyde yüksek bulundu. Biodentine %50 3. güne ait ALP düzeyi, NeoMTA grubundan anlamlı olarak yüksek bulunurken, aynı gün ve doza sahip diğer iki grupla anlamlı bir farklılık bulunmadı. Biodentine %50 7. gün, aynı parametreler içinde NeoMTA ile benzer bulunurken, diğer gruplardan anlamlı düzeyde yüksek bulundu.

Biodentine %100 1. gün için ölçülen ALP düzeyi, aynı gün ve doza sahip diğer gruplar için ölçülen ALP düzeyi ile karşılaştırıldığında BioMTA grubu ile benzer bulunurken, diğer iki gruptan anlamlı olarak yüksek bulundu. Biodentine %100 3. gün, BioMTA %100 3. gün ile benzer bulunurken, MTA CEM ve NeoMTA grubundan anlamlı olarak yüksek bulundu. Biodentine %100 7. gün için ikili karşılaştırmalarda istatistiksel bir farklılık bulunmadı (Tablo 4-18, Şekil 4-24).

4.3.3. MTA CEM İçin ALP Düzeyine İlişkin Bulguların Değerlendirilmesi

MTA CEM %50 1. gün için ölçülen ölçülen ALP düzeyleri; aynı doz için 3. ve 7. günlerden anlamlı düzeyde düşük bulundu. MTA CEM için %100'lük dozlara sahip günler arasında da istatistiksel açıdan bir farklılık bulunmadı.

MTA CEM 1. gün için ölçülen ALP düzeyi, %50'lik doz için %100'lük doz ile karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık bulunmadı. 3. ve 7. günlerde dozlar arttıkça ALP düzeyi anlamlı düzeyde azaldı.

MTA CEM %50 1. gün için aynı doz ve güne sahip diğer gruplar arasında karşılaştırma yapıldığında Biodentine grubundan anlamlı olarak düşük bulunurken, diğer gruplarla istatistiksel bir farklılık bulunmadı. MTA CEM %50 3. gün, aynı parametreler içinde değerlendirildiğinde gruplar arasında istatistiksel bir farklılık bulunmadı. MTA

CEM %50 7. gün aynı doz ve güne sahip BioMTA ile benzer bulunurken, Biodentine ve NeoMTA'ya kıyasla anlamlı olarak düşük bulundu.

MTA CEM %100 1. ve 3. günlerde okunan ALP düzeyi; aynı gün ve doz içeren diğer gruplarla karşılaştırıldığında yalnızca Biodentine grubundan anlamlı olarak düşük bulundu. MTA CEM %100 7. gün ile diğer gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunmadı (Tablo 4-18, Şekil 4-24).

4.3.4. NeoMTA İçin ALP Düzeyine İlişkin Bulguların Değerlendirilmesi

NeoMTA %50 1. gün için ölçülen ALP düzeyi, aynı doz için 3. gün ile karşılaştırıldığında benzer bulunurken, 1. gün 7. güne ve 3. gün 7. güne kıyasla anlamlı olarak düşük bulundu. NeoMTA %100 1. gün, aynı doz için günler arasında anlamlı bir farklılık bulunmadı.

NeoMTA 1. ve 3. günlerde ölçülen ALP düzeyi, dozlar arasında anlamlı bir farklılık göstermedi. NeoMTA 7. gün için %50'lik doz, %100'lük doz ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak yüksek bulundu.

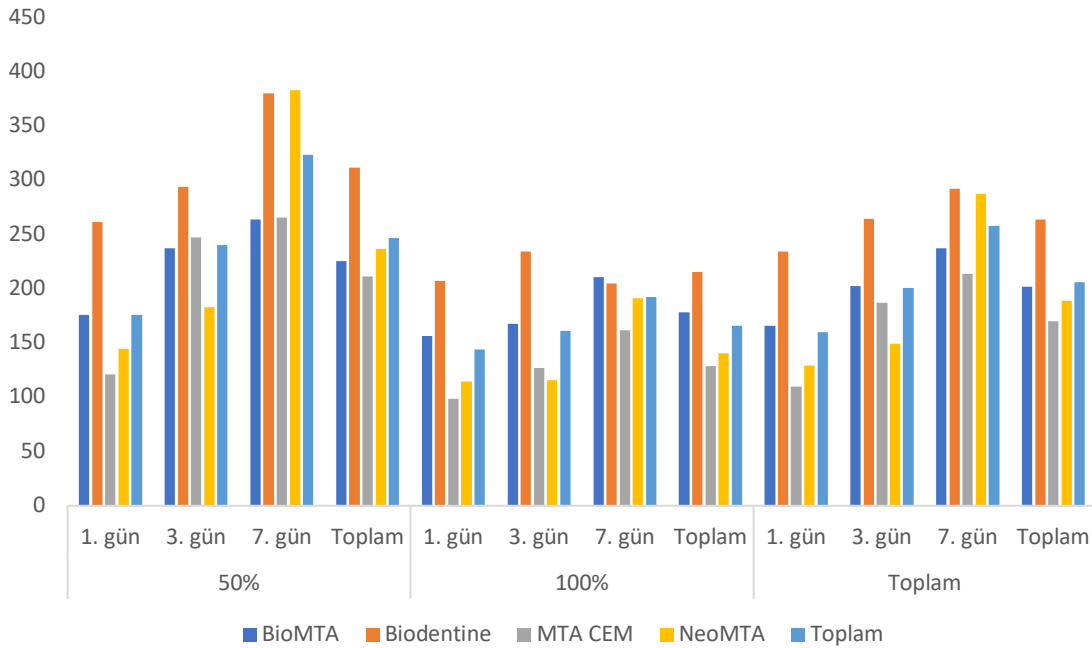
Gruplar arası karşılaştırmalarda; NeoMTA %50 1. gün, Biodentine grubundan anlamlı düzeyde düşük bulunurken, diğer gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık bulunmadı. NeoMTA %50 3. gün aynı doz ve güne sahip yalnızca Biodentine grubundan anlamlı olarak düşük bulunurken, diğer gruplar ile benzer bulundu. NeoMTA %50 7. gün ise aynı parametrelerle karşılaştırma yapıldığında, Biodentine grubu ile benzer olup, diğer gruplara oranla anlamlı olarak yüksek ALP düzeyine sahip olarak bulundu.

NeoMTA %100 1. ve 3. günlerde ölçülen ALP düzeyi; Biodentine grubundan anlamlı olarak düşük bulunurken, aynı gün ve doz içeren diğer gruplarla karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık bulunmadı. NeoMTA %100 7. gün ile diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı (Tablo 4-18, Şekil 4-24).

Tablo 4-18: ALP için tanımlayıcı istatistikler

Konst.	Zaman	BioMTA	Biodentine	MTA CEM	NeoMTA	Toplam
50%	1. gün	175,8 ± 4,4 ^{ABCDEF}	261,3 ± 26,8 ^{GH}	121,2 ± 16,2 ^{AB}	144,3 ± 21,6 ^{ABCD}	175,6 ± 57,8 ^{EA}
	3. gün	237,4 ± 16,8 ^{EFGH}	293,6 ± 22 ^H	247,1 ± 28,4 ^{FGH}	183 ± 17,2 ^{BCDEF}	240,3 ± 45 ^D
	7. gün	263,9 ± 23,4 ^{GH}	380,1 ± 22,9 ^I	265,8 ± 10,7 ^{GH}	382,9 ± 35,1 ^I	323,2 ± 64,4 ^B
	Toplam	225,7 ± 41,8 ^{BD}	311,7 ± 57,1 ^C	211,4 ± 70,3 ^B	236,7 ± 113,1 ^B	246,4 ± 82,1
100%	1. gün	156,4 ± 17,1 ^{ABCD}	207,3 ± 25,3 ^{DEFG}	98,3 ± 11,4 ^A	114,3 ± 10,1 ^{AB}	144,1 ± 46,4 ^C
	3. gün	167,4 ± 40,6 ^{ABCDE}	234,5 ± 32,9 ^{EFGH}	126,8 ± 32,5 ^{ABC}	115,7 ± 23,7 ^{AB}	161,1 ± 56,1 ^{CE}
	7. gün	210,9 ± 6,7 ^{DEFG}	204,5 ± 29,8 ^{CDEFG}	161,5 ± 35,7 ^{ABCDE}	191,4 ± 35,3 ^{BCDEFG}	192,1 ± 32 ^A
	Toplam	178,2 ± 33,5 ^D	215,4 ± 29,3 ^B	128,9 ± 37 ^A	140,5 ± 44 ^A	165,7 ± 48,9
Toplam	1. gün	166,1 ± 15,4 ^{BDH}	234,3 ± 37,7 ^{FG}	109,7 ± 17,7 ^E	129,3 ± 22,3 ^{BE}	159,8 ± 53,8 ^a
	3. gün	202,4 ± 47,3 ^{CGH}	264,1 ± 40,9 ^{AF}	186,9 ± 71,3 ^{CD}	149,4 ± 41,2 ^{BD}	200,7 ± 64,1 ^b
	7. gün	237,4 ± 32,9 ^{FG}	292,3 ± 99,1 ^A	213,7 ± 61,8 ^{CF}	287,1 ± 109,5 ^A	257,6 ± 83,4 ^c
	Toplam	202 ± 44,1 ^a	263,5 ± 66,3 ^c	170,1 ± 69 ^b	188,6 ± 96,9 ^a	206,1 ± 78,4

a-c: Aynı harfe sahip gruplar ve zamanlar arasında fark yoktur, A-I: Aynı harfe sahip etkileşimler arasında fark yoktur



Şekil 4-24: ALP değerleri için ortalama grafiği (pg/ml)

5. TARTIŞMA

Kök gelişimi, HERS ve çevresindeki farklılaşmamış progenitör hücrelerin uyarılması ve dentin ile sementin devamlı olarak depolanma sürecini tanımlamaktadır (13). HERS, dental papillayı apikal foramen haricinde çevrelemektedir (104). Bu yapının sert doku indüklenmesini sağlayan farklılaşmamış hücrelerin kaynağı olduğu ve kök gelişiminin durmasına neden olabilecek etkenlere karşı koruma sağlayabileceği düşünülmektedir (28). Hertwig kök kınının dişlerde meydana gelebilecek travmaya karşı hassas olduğu bilinmektedir (259). Kök gelişiminin kesintiye uğramasının nedenleri derin dentin çürüğü ya da travmadır. Çocukların %30'unu etkileyen bu travmatik yaralanmalar genellikle kök gelişimi tamamlanmadan meydana gelmekte ve inflamasyon ile nekroz gibi durumlara yol açabilmektedir (11, 259). Nekroz ve kök gelişimini tamamlayamamış dişlerdeki tedavi yöntemi ise dişin apikal kısmında mineral doku formasyonunu indüklemekle tanımlanan apeksifikasyon tedavisidir (7, 212, 259, 305).

Apeksifikasyon tedavisindeki başarı pek çok faktöre bağlıdır; ancak bu faktörlerin en önemlileri; doğru tanının konulması, vaka seçiminin doğruluğu ve mevcut duruma dahil olan biyolojik süreçlerin anlaşılmasıdır (305). Apeksifikasyon tedavisinde, kök gelişimi uygun materyallerin kök kanalı vasıtası ile apikal bölgeye yerleştirilmesi ile sağlanabilmektedir (191). Bu açıdan, kök gelişimi ve sert dokuların oluşması için gereken biyolojik süreçlerin anlaşılması apeksifikasyon tedavisinin başarılı olmasında önemlidir. Apeksifikasyon, perforasyon tamiri ya da apikal cerrahi gibi tedavilerde periodontal ligament, sement, kemik ve periodonsiyum gibi dokuların yenilenmesi, iyileşme için gereklidir (22). Bu tedavilerde kullanılan biyoseramik simanların başarıdaki kritik rolü; biyoyumlu olmaları ve komşu dokuların rejeneratif potansiyelini indüklemektir (148).

Bilim ve mühendisliğin yaygınlaşması sonucu geliştirilen materyallerin biyolojik uyumluluğunun ve yanıtının *in vitro* ve *in vivo* olarak değerlendirilmesi için bir takım testlere ihtiyaç duyulmaktadır (10). ISO 10993 standartı ve içerisinde yer alan 20 bölüm, geliştirilmekte olan bir materyalin, tıbbi cihaz ya da ilacın biyoyumluluk ve biyolojik yanıtını test etmek için oluşturulmuş uluslararası bir standarttır (10, 143). Buna göre yeni geliştirilmiş bir materyalin klinik kullanıma geçmeden önce sırasıyla başlangıç testleri (sitotoksosite, genotoksosite, mutajenite vb.), ikincil testler (duyarlılık, mukozal iritasyon vb.) ve kullanım testlerine tabi tutulması gerekmektedir (127, 142).

In vitro toksisite testleri, korunması gereken türler için çeşitli başlangıç test modelleri barındırmaktadır. Uygun testler ile *in vivo* ortamda gerçekleştirilecek olayları *in vitro* hücre sistemleri ile taklit etmek mümkündür (269). Sitotoksikite testleri, yeni bir materyal ya da medikal cihazın hücre üzerindeki büyüme, çoğalma ve morfolojik değişiklikleri gözlemleyebilmek adına gerçekleştirilen ve pilot test olarak kabul edilen testlerdir. Bu testlerin basit olması, hızlı gerçekleşmesi, ucuz olması ve hayvanları koruması sıklıkla tercih edilmelerini sağlamıştır (175).

Genetik toksisite testleri ise bir materyalin güvenlik değerlendirmesi kapsamında diğer toksikolojik testlerle beraber kullanılan yöntemlerden bir tanesidir (253). Genotoksikite testleri bir maddenin ya da içeriğin genetik materyal üzerinde yarattığı hasarın *in vitro* ve *in vivo* olarak tanımlamak üzere kullanılmaktadır (56). Bu testler, test edilen bileşenin genotoksikite ve karsinojenite potansiyelini öngörmek adına önemli bir rol oynamaktadırlar (293).

Genetik materyal hasarı, genotoksik etken ile DNA yapısı ya da sekansı arasındaki etkileşim sonucu meydana gelmektedir. Bu etkileşim sonucunda DNA üzerinde kırılmalar, silinmeler, füzyon ya da ayrılmalar izlenebilmekte ve bu durum hasar ya da mutasyon ile sonuçlanabilmektedir (275). Ökaryotik organizmaların somatik hücrelerinde gerçekleşen bu hasar malinite ya da kansere yol açabilirken, üreme hücrelerinde ise kalıtsal problemlere sebep olabilmektedir (275, 281). Bu açıdan, genotoksikite testleri ve çalışmaları, bir materyal, bileşen ya da yeni geliştirilen bir ilacın erken evrelerde oluşturabileceği hasarların belirlenmesi, genotoksik ajanların tanımlanması ve mutasyona sebebiyet veren mekanizmaların anlaşılması adına önemli bir rol oynamaktadır (275).

Günümüzde sıklıkla kullanılan *in vitro* genotoksikite testleri arasında Comet testi, kromozom anormallikleri testi, kardeş kromatit değişimi testi ve mikronükleus testidir (313). *In vitro* MN testinin kolay ve hızlı skorlanabilir olması, kültür işlemlerinin karmaşık olmaması, anlamlı sonuçlar vermesi nedeniyle (69, 159, 311, 342) çalışmamızın genotoksikite tayininde bu test tercih edilmiştir. MN testi mitoz geçirebilen pek çok hücre ve organizma tipi için kullanılabilir (69, 313, 367). OECD *in vitro* MN test protokolünde kullanılabilecek hücre hatlarını CHL/IU, CHO, SHE, V79 , L5178Y vb. şeklinde belirtmiştir (108, 195, 235, 343). Ayrıca insanlarda genotoksikiteyi belirlemek için periferik kan lenfositleri de kullanılmaktadır (235, 313). Bunun en önemli sebebi ise

yapılan çalışmalarda kanser içeren dokudaki MN artışı ile kanser hastasının lenfositlerindeki MN artışının paralel seyretmesinin tespiti (52, 53, 75, 159, 342). Bu nedenle çalışmamızdaki MN testi için tek bir donörden alınan periferik kan lenfositlerinin kullanımı tercih edilmiştir. MN insidansı arttırmamak üzere, seçilen donörün 18-35 yaşları arasında olmasına, sigara içmemesine, hastalığa ya da genotoksik herhangi bir ajana maruz kalmamış olmasına dikkat edilmiştir (235).

MN testinde, genotoksitesi araştırılan dental materyaller ile lenfosit hücreleri arasında temasın sağlanması gerekmektedir. Bu temas ISO 10993 standartında belirtildiği üzere direkt, salınım sıvısı ile direkt temas ya da indirekt temas yöntemleriyle sağlanabilmektedir. Çalışmamızda kullanılan deney materyalleri katı formda olduğu için salınım sıvısı örnekleri alınmıştır. OECD protokolünde önerildiği şekilde üç ayrı doz için deneyler gerçekleştirilmiştir.

İnsan periferik kan lenfositleri için, hücrelerin çoğalmasını sağlamak adına PHA gibi bir mitojen içeren besiyerinde muamele edilmiş ve 37°C’de 72 saat inkübasyona bırakılmıştır. 24. saatin sonunda test edilmek istenilen materyallerin salınım sıvılarına maruz bırakılmıştır. 44. saat sonunda sitokinezin durdurulmasını sağlayan bir ajan olan sitokalsin-B eklenmiş ve kültür süresinin sonunda MN oluşumu gözlenen binükleat hücrelerin değerlendirilmesi yapılmıştır.

Literatürde biyoseramik esaslı dental materyallerin genetik toksisitesi alanındaki çalışmalar oldukça sınırlı sayıdadır.

Ribeiro ve ark. retrograd dolun materyali olan gri ve beyaz MTA’nın potansiyel karsinojenitesi ve sitotoksitesini L5178Y fare lenfoma hücreleri üzerinde incelemişlerdir. Araştırmacılar, yaptıkları çalışmada, 1, 10, 100 ve 1000 µg/ml olmak üzere dört ayrı konsantrasyonda hazırlanan MTA grupları için genotoksite tayini Comet testi ile değerlendirilmiştir. DNA ipliklerinin hasarı ve bunun ölçümünü değerlendiren Comet testinin sonucunda, her iki MTA grubu ve tüm konsantrasyonlar için DNA hasarı ve dolayısıyla genotoksik potansiyel tespit edilmemiştir. Sonuç olarak, daha önceki araştırmaları destekler nitelikte beyaz ve gri MTA’nın iyi bir biyouyumluluğa sahip olduğunu ve genotoksik olmadıklarını bildirmişlerdir (265). Bizim çalışmamızda genotoksik potansiyeli belirlemek üzere mikronükleus testi 1, 10 ve 50 µg/ml olacak şekilde benzer üç ayrı konsantrasyonda ve insan periferik kan lenfosit hücrelerinde gerçekleştirilmiştir. MTA’nın farklı piyasa isimleriyle yer alan NeoMTA, BioMTA ve

MTA CEM grupları üç ayrı konsantrasyonda da doz arttıkça %MN değerini arttırmış olsa da, bu korelasyon istatistiksel olarak anlamlı bulunmamış ve her üç madde tüm dozlar için genotoksik özellik göstermemişlerdir. Çalışma sonucunda elde ettiğimiz materyallerin genotoksisite potansiyeli göstermemesi Ribeiro ve ark.'nın sonuçlarıyla benzerlik göstermektedir. Bu da kök ucunda kullanılabilecek MTA ve benzer biyoseramik esaslı materyallerin genetik açıdan da biyouyumlu olabileceğini düşündürmektedir.

Ribeiro ve ark. yaptıkları bir başka çalışmada MTA ve Portland simanlarının çin hamster yumurtalık hücreleri (CHO) üzerinde genotoksisite ve sitotoksisiteni *in vitro* olarak araştırmışlardır. 1 ile 1000 µg/ml arasında artan dozlara maruz bırakılan hücreler üzerinde, bu materyallerin herhangi genotoksik özellik göstermediği ve hücresel ölümü indüklediği bildirilmiştir. Araştırmacılar, MTA'nın Portland simanı ile aynı kimyasal içeriğe sahip olduğunu, genotoksisite açısından benzer sonuçların elde edilmesinin sebebinin aynı ham madde kökeni olabileceğini bildirmişlerdir (266).

Braz ve ark. MTA ve Portland simanının genotoksisitesini insan periferik lenfosit hücreleri üzerinde incelemişlerdir. 10 sağlıklı donörden alınan kan örneklerinden lenfosit hücreleri kültür edilmiş ve materyallerin 1, 10, 100 ve 1000 µg/ml dozlarına maruz bırakılmıştır. Genetik hasarın tespiti için DNA kuyruk momenti değerlendirilmiştir. Çalışma sonucunda yalnızca pozitif kontrol grubunda DNA hasarı bulunduğu, deney gruplarının değişen dozlarında ise DNA hasarına ait bir bulgu bulunmadığı bildirilmiştir (41). Genetik hasar, çeşitli kimyasalların hedeflenen hücrelerin DNA'sı üzerinde hasar oluşturmasıyla başlamaktadır. Bu hasar, hücreler tarafından onarılabilir ya da onarılamayabilir. Tümör gelişimi ise yalnızca DNA hasarına veya onarımına bağlı değildir; reaktif metabolitlerin üretimi, dağılımı ve bu metabolitlerin hücre proliferasyonu üzerine etkilerine de bağlıdır. Bu nedenle, tek bir genotoksisite testinin her zaman karsinojeniteyi yansıtmayacağı, direkt ya da indirekt mekanizmalarla genetik hasara neden olan test bileşenlerinin tespitinin birden fazla test ile belirlenmesi gerekmektedir (282). Braz ve ark. bu bağlamda MTA ve Portland simanının genotoksisitesini belirlemek üzere daha fazla *in vitro* ve *in vivo* test yapılmasını önermişlerdir. Bu çalışmada kullanılan yöntem farklı olmasına karşın kan örneklerinden elde edilen lenfosit hücreleri kullanılmıştır. Çalışmamızda MTA deney grupları ve Biodentine grubu lenfosit hücreleri

üzerinde mikronükleus oluşumunu indüklememiştir. Bu durum, Braz ve ark.'nın çalışmasını desteklemektedir.

Camargo ve ark. 2009 yılında yaptıkları bir çalışmada yeni hint yağı fasulyesi simanı (COB) ile karşılaştırmalı olarak pulpa kuafaj materyallerinin (kalsiyum hidroksit, gri MTA, beyaz MTA) sitotoksitesini ve genotoksitesini değerlendirmişlerdir. Araştırmacılar genetik toksisiteyi, seçilen materyallere ait örnek dilüsyonların V79 Çin hamster fibroblast hücreleri üzerinde mikronükleus testi ile incelemişlerdir. İnceleme sonucunda pozitif kontrol grubu olarak kullanılan etil metansülfonatin (EMS) mikronükleus sayısını arttırdığı ve karşılaştırılan dört gruba ait dilüsyonlarda mikronükleus sayısında yükseliş bulunmadığı belirtilmiştir. Çalışmada referans grubu olarak seçilen Vitrebond'un ise istatistiksel olarak anlamlı şekilde mikronükleus sayısını arttırdığı bildirilmiştir (42).

Ding ve ark. ProRoot MTA ile kalsiyum silikat simanın (içerik: silisyum dioksit, kalsiyum oksit, alüminyum oksit, magnezyum oksit, çinko oksit ve demir oksit) insan osteosarkom hücre hattı (MG63) üzerindeki genetik toksisitesini incelemişlerdir. Her iki materyale ait örnekler 10, 30 ve 50 mg/ml olarak ve pozitif kontrol grubu ise DMSO olarak seçilmiştir. DNA Precipitation testi sonucunda MTA ve kalsiyum silikat simanına ait gruplarda düşük oranda DNA hasarı meydana geldiğini ve kontrol grubu ile kıyaslandığında bu hasarın istatistiksel açıdan anlamlı olmadığını bildirmişlerdir (73). Bu çalışmada kullanılan yöntem ve hücre tipi farklı tercih edilmesine karşılık deney gruplarına ait dozlar çalışmamız ile benzer şekilde tercih edilmiştir. Çalışmamızın MTA gruplarına ait 1, 10 ve 50 mg/ml'lik dozlar lenfosit hücreleri üzerinde kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak düşük MN oluşumuna sebep olmuşlardır. Bu durum Ding ve ark.'nın çalışmasının sonuçları ile benzerlik taşımaktadır.

Naghavi ve ark. MTA ve kalsiyumdan zenginleştirilmiş karışım olan CEM'in 0 ile 1000 µg/ml arasında yükselerek değişen konsantrasyonlarındaki sitotoksitesini ve genotoksitesini incelemişlerdir. MTT testi ile belirlenen sitotoksitesini açısından MTA ve CEM materyalinin herhangi bir dozunda anlamlı bir farklılık bulunmadığı, yalnızca en yüksek konsantrasyonda CEM için hücre canlılığının MTA'dan anlamlı olarak yüksek bulunduğu bildirilmiştir. Fare fibroblast hücreleri üzerinde gerçekleştirilen Comet testi sonucunda CEM'in genotoksik etkilerinin 15.6 ve 250 µg/ml'lik dozlarda daha belirgin ancak MTA 500 ve 1000 µg/ml'lik dozlardan daha az olduğu bildirilmiştir (217). Bu

çalışmada 1, 10 ve 50 µg/ml şeklinde üç doz belirlenmiş olup, MTA ve Biodentine gruplarında doz arttıkça MN sayısı ve % MN değeri artmış olsa da , bu artışlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Bu farklılığın kullanılan hücre tipi ya da metod farklılığından kaynaklanabileceğini düşünmekteyiz.

Zakerzadeh ve ark. insan dental pulpa fibroblast hücreleri üzerinde üç vital pulpa tedavi ajanı olan Biodentine, TheraCal LC ve ProRoot MTA'nın sitotoksitesite ve genotoksitesini değerlendirdikleri bir çalışmada, 0-1000 µg/ml arasında artan dozlarla her üç materyalin genotoksitesite Comet testi ile analiz etmişlerdir. Materyallerin tüm dozlarına ilişkin olarak sitotoksitesite ve genotoksitesiteye ilişkin anlamlı bir sonuç bulunmamıştır, ve bu materyallerin vital pulpa tedavisinde kullanılabilecek biyoyumlu materyal olduklarını belirtmişlerdir (372). Bu bulgu, bizim çalışmamızda Biodentine için belirlenen dozlarda genotoksik özellik göstermediği sonucuyla örtüşmektedir.

Da Silva ve ark. gri ve beyaz MTA'nın insan periferik lenfosit hücreleri üzerinde genotoksitesini değerlendirdikleri bir çalışma yapmışlardır. İnsan lenfosit hücrelerinin tercih edilmesinin sebebi olarak; bu hücrelerin karyotipik olarak normal insan hücreleri olması ve aynı zamanda maruz kalınan faktörlerin sistemik olarak iyi bir belirteci olması olarak belirtilmiştir (61, 256). Ayrıca bu çalışmanın gri ve beyaz MTA'nın genotoksitesini ilk kez primer insan hücreleri üzerinde gerçekleştiren bir çalışma olduğu bildirilmiştir. 10 gönüllüden kan örneğini alınarak yapılan bu çalışmada insan periferik lenfosit hücreleri, 1-1000 µg/ml arasında değişen dozlarda 1 saat boyunca materyallerle etkileşime bırakılmıştır. DNA hasarı Comet testi ile değerlendirilmiş olup, MTA'nın herhangi bir doz için DNA hasarını indüklemeyeceği bildirilmiştir. DNA hasarının karsinogenezin başlangıç aşaması olduğu ve bu çalışmanın gri ve beyaz MTA'ya maruz bırakılmasıyla karşılaşılabilecek potansiyel risklerin değerlendirilmesine katkı sunduğu ancak ek çalışmalara ihtiyaç olduğu belirtilmiştir (61).

Zeferino ve ark. 2010 yılında yaptıkları bir çalışmada beyaz MTA ile % 15'lik bizmut oksit içeren Portland simanının fare fibroblast hücreleri (3T3-L1) üzerindeki genetik hasar derecesini ve sitotoksik etkilerini incelemişlerdir. Genetik hasar, kullanılan materyallerin 10 ile 1000 µg/ml olacak şekilde değişen dozları seçilen hücre hattı üzerinde Comet testi ile değerlendirilmiş ve MTA ile % 15'lik bizmut oksit içeren Portland simanının üç ayrı dozunda da DNA ipliğinde kırılmalara yol açmadığı ve genetik hasara neden olmadığı bildirilmiştir. Test edilen materyallerin sitotoksitesite ise tripan

mavisi yöntemi kullanılarak değerlendirilmiş ve sitotoksik etki ile doza bağlı anlamlı bir farklılık bulunmadığı bildirilmiştir (376).

Loison-Robert ve ark. iki farklı kalsiyum silikat esaslı materyalin (Biodentine ve BioRoot) insan dental pulpa kök hücreleri üzerindeki biyolojik etkilerini *in vitro* olarak incelemişlerdir. Sitotoksikite incelenmesinde MTT testi ve hücre apoptoz ile ölüm değerlendirmesinde Annexin V yöntemi kullanılmıştır. Çalışmanın genotoksikite aşamasında ise deney materyalleriyle 7 gün boyunca kontakta kalan hücreler H2AX yöntemiyle değerlendirilmiştir. Bu incelemeler sonucunda her iki deney grubuna ait materyalin biyouyumlu olduğu ve genotoksik bir hasara yol açmadığı bildirilmiştir. Çalışmada inflamasyonla ilgili sinyal molekülleri ve oksidatif stres RT-PCR yöntemiyle değerlendirilmiştir. Her iki grubun da IL-1 β ve MM9 gibi bağ dokusundaki inflamasyonla ilişkili molekülü uyarmadığı ve oksidatif stres oluşturmadağı sonucuna varılmıştır (182). Bu çalışma, Loison-Robert ve ark.'nın yaptığı çalışmanın sonucunu desteklemektedir. Biodentine farklı hücre tiplerinde ve farklı metodlarda genotoksik etki göstermemiştir.

Bu çalışmada elde edilen sonuçlar, yapılan diğer çalışmalarda kullanılan hücre tipleri ve metodları farklı olabilmesine karşın, literatürdeki çalışmaları desteklemektedir. Çalışmamızda bulunan üç ticari MTA materyali (NeoMTA, BioMTA, MTA CEM) ve Biodentine materyalinin insan periferik lenfosit hücrelerinde oluşturdukları MN sayıları ve % MN değerleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında bu değerler, materyal gruplarına ait tüm dozlar için anlamlı olarak düşük bulunmuştur. Bu sonuç, henüz literatürde araştırması yapılmamış olan NeoMTA, BioMTA ve MTA CEM gibi üç farklı ticari markanın insan periferik lenfosit hücreleri üzerinde genotoksik etkisi olmadığını göstermiştir. Farklı ticari isimlerle anılsalar da, her markaya ait MTA grubunun içeriklerinin benzer olması nedeni ile bu sonuçların birbirleriyle örtüşükleri görüşündeyiz. Biodentine grubunun da literatürdeki çalışmaları destekler şekilde genetik hasara yol açmadığı yapılan deneyler sonucunda elde edilmiştir. Yaptığımız çalışmada deney gruplarının ve kontrol grubunun lenfosit hücreleri üzerindeki nükleer bölünme indeksini de karşılaştırılmıştır. Literatürde kalsiyum silikat esaslı materyallerin genotoksikitesini inceleyen araştırmalarda bu değerin karşılaştırıldığı bir adet çalışmaya rastlanmıştır.

Ko ve ark. 2017 yılında yayınladıkları bir çalışmada kalsiyum silikat esaslı simanların (Vitapex, Calcipex, ProRoot MTA, Endocem MTA) ve formokrezolün

sitotoksitesini ile genotoksitesini incelemişlerdir. Her bir test materyalinin 1, 10 ve 100 µg/ml olacak şekilde üç doz halinde CHO-K1 hücre kültürü üzerindeki sitotoksitesini MTT testi ile, genotoksitesini ise MN testi, Comet testi ve γ -H2AX testi ile değerlendirmişlerdir. Araştırmacılar, hücre canlılığının kalsiyum silikat esaslı siman içeren gruplarda yüksek olduğunu, ancak formokrezolun en düşük hücre canlılık oranına neden olduğunu bildirmişlerdir. MN, Comet ve γ -H2AX testinin sonucunda formokrezolun diğer simanlara oranla istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek DNA hasarına yol açtığı bildirilmiştir. ProRoot MTA'nın genetik hasara sebep olmadığı, Endocem MTA'nın iyi biyouyumluluk gösterdiği ve her iki simanın da yüksek nükleer bölünme indeks değeri oluşturduğu gösterilmiştir. Ko ve ark. mitotik aktivitenin genotoksik ya da sitotoksik bir ortamda baskılanmasının muhtemel olduğunu belirtmişlerdir. Buna göre yüksek nükleer bölünme indeksi, mitotik aktivitenin artmış olduğunu ve bu da genotoksik ya da sitotoksik bir ortamın bulunmadığı göstermektedir. Bizim çalışmamızda, dört farklı kalsiyum silikat esaslı simanın oluşturduğu NBI değerleri, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı derecede yüksek olarak bulunmuştur. Bu sonuç, Ko ve ark.'nın yaptığı çalışmayla benzer şekilde kalsiyum silikat esaslı simanların genotoksik bir etkisi bulunmadığı sonucunu desteklemektedir (165). Ko ve ark.'nın yaptığı bu çalışmada ProRoot MTA ve Endocem MTA'nın NBI değerleri yüksek bulunmuştur. Bizim çalışmamızda ise; 50 µg/ml Biodentine ve MTA CEM grubu hariç tüm dozlardaki materyallerin lenfosit hücrelerindeki nükleer bölünme indeksi kontrol grubuna göre anlamlı bulunmuştur. NBI değerinin yüksek olması mitotik aktivitenin herhangi bir toksik ajan tarafından engellenmediği ve bu aktivitenin devamlılığını göstermektedir. Bu bağlamda, araştırdığımız materyaller için lenfosit hücrelerin mitotik aktivitesinin ve çekirdek bölünmesinin devamlılığının sağlandığı gözlenmiş ve elde edilen verilerin değerlendirilmesi sonucunda hücreler için toksik bir kaynak oluşturmadığı sonucuna varılmıştır. 50 µg/ml Biodentine ve MTA CEM'in neden olduğu NBI değerlerinin düşük olması sonucunu seçtiğimiz en yüksek doz nedenli olduğu düşünülse de, bu değerler için MN sayısı ve % MN değeri düşük bulunmuştur. Bu karşıt sonuçların mikroskopik sayımın görsel olarak ve objektif yapılması nedeniyle olabileceği kanısındayız. Fenech ve ark. MN ve hücre skorlamasında görsel olarak değişkenliklerin var olabileceğini, bu değişkenlikleri ortadan kaldırmak üzere otomatik skorlama yöntemlerinin geliştirilmesinin (akım sitometri, görüntü analizi vb.) önemini vurgulamıştır (90).

Biyoseramik esaslı bu materyallerin endodontik kullanımda biyoyoumlu olması kadar biyoaktif olması da aranan bir özelliktir (148). Bir biyoyoumlu materyalin, lokal ya da sistemik bir yan etki sunmadan uygun doku rejenarasyonu için moleküler ve mekanik sinyalleri oluşturmaları beklenmektedir (353). Biyoaktif bir materyalin ise, biyolojik süreçleri taklit ederek konakta uygun bir doku yanıtını indüklemesi beklenmektedir (79, 251). Bir başka tanım olarak biyoaktivite, bir materyalin dentin duvarları ve kendi yüzeyi arasında kalsiyum iyonlarını salması, kalsiyum hidroksit üretmesi ve apatit kristallerinin bu yüzey üzerinde toplanmasını sağlama kabiliyetini yansıtmaktadır (332).

Doku yenilenmesinde ve doğal biyolojik süreçlerde büyüme faktörlerinin rol aldığı bilinmektedir. Büyüme faktörleri, konak dokunun savunma ve yenilenme süreçlerinde etkili olan moleküllerdir (112). Apeksifikasyon tedavisindeki biyolojik süreç kök ucunda gerçekleşmektedir. Kök ucuna uygun materyal yerleştirildikten sonra; farklılaşmamış mezenkimal hücreler, fibroblastlar ve benzeri hücreler, periodontal ligament hücreleri kök ucundaki bölgeye göç ederek burada yara iyileşme sürecine katkı sunmaktadırlar (60, 126).

Kemik morfogenezik proteinleri (BMP), transforme edici büyüme faktörleri ailesinde yer almakta ve kemik gelişimi, kırık tamiri, doğum sonrası kemik büyümesi gibi biyolojik süreçlerde rol oynamaktadır (271). Bu ailede yer alan BMP-2 ise iskelet sisteminin erken gelişim döneminde ve doku inşasına aktif olarak katılmaktadır (341). BMP-2'nin osteoblastlarının farklılaşmasını indüklediği ve bu hücreler tarafından matris üretimine katkıda bulunduğu bildirilmiştir (51). Osteogenezisin yanı sıra, BMP-2'nin odontoblastlar tarafından da üretildiği, kendileri ve komşu odontoblast farklılaşmasını uyardıkları ve dentin oluşumunu uyardıkları bildirilmiştir (345, 364). BMP-2'nin dental pulpa kök hücrelerinin odontojenik ve osteojenik farklılaşmasını indükleyen biyoaktif bir molekül olduğu rapor edilmiştir (346, 379, 380). Bu çalışmada incelenen biyoseramik esaslı dört dental materyalin insan dental pulpa hücrelerinde çeşitli oranlarda BMP-2 indüklemesini arttırdığı sonucuna ulaşılmıştır. Deney gruplarında 7. günde elde edilen BMP-2 düzeyleri, en yüksek düzeyde bulunmuş olup, bu artış BioMTA ve Biodentine grubu için kontrol grubuna göre anlamlıdır.

Doku rejenarasyonu ve kemik gelişimi ile tamirinde rol alan bir diğer önemli protein olan vasküler endotelial büyüme faktörü (VEFG), önemli anjiyojenik faktörlerden birisidir (134, 378). VEGF, anjiyogenezde temel rol oynayarak yeni oluşan

dokulardaki hücelere gerekli besin maddelerinin ulaştırılmasını sağlamaktadır (216). Aynı zamanda VEGF; endotelyal hücelerin canlılığını, proliferasyonunu, farklılaşmasını kontrol etmekte (92, 163, 219) ve endotelyal hücelerin kemotaksisini sağlamaktadır (156, 196, 359). Anjiyogenezin gerçekleşemediği durumlarda, yeterli kan desteği sağlanamamakta ve bunun sonucu olarak nekrotik ya da skar dokusu meydana gelmektedir (190). VEGF'ün odontoblastlar ve subodontoblastik tabakada üretildiği ve dentinogenezisde rol aldığı bildirilmektedir (374). Dentin matriksinde VEGF salınımı ise revaskularizasyon ve anostomoz süreçlerini başlatabilmektedir (267). Bu çalışmada incelenen materyallerinin insan dental pulpa hücelerinden VEGF salgılanmasını hafif düzeyde arttıkları bulunmuştur. VEGF salgılanmasını en belirgin düzeyde ve kontrol grubuna göre anlamlı olarak uyaran deney grubu 7. günde Biodentine grubu olmuştur. Diğer MTA gruplarında zamana bağlı artışlar bulunmuştur, fakat bu artışlar kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak bulunmamıştır.

Temel fibroblast büyüme faktörü (bFGF, FGF-2), dokuların devamlılığı, gelişmesi ve onarımı açısından sinyal molekül ailesinin önemli bir üyesidir. FGF'in görevleri arasında farklılaşma, proliferasyon ve göç gibi hücresel süreçleri düzenlemek ve kök hücelerin devamlılığını sağlamak yer almaktadır (229, 236). FGF aynı zamanda mezenkimal kök hücelerin kondrojenik ve adipojenik farklılaşma potansiyellerini kontrol etmektedir (226, 303). FGF sinyalizasyonun odontoblast ve osteoblast hücre hatlarında üretildiği ve mineralizasyonda önemli bir potansiyel olduğu ve böylece osteogenezis ile dentinogenezisde rol oynadığı rapor edilmiştir (59, 189, 204, 267). Yapılan alışmalarda, FGF-2'inin diğer endotelyal büyüme faktörleri ile beraber periodontal ligament hücelerinde yara iyileşmesi, rejenerasyon, ekstrasellüler matriks üretimi gibi süreçlere dahil olduğu bildirilmiştir (296, 363). Bu çalışmada insan dental pulpa hüceleri ile etkileşimde olan deney materyallerinin %50'lik doz için FGF-2 seviyesini arttırdığı, etkileşim süresine bağlı olarak FGF-2 seviyesinin arttığı sonucu tespit edilmiştir. Bu artışlar hafif düzeyde olup, günlere bağlı deney gruplarındaki artış kontrol grubuna karşı istatistiksel bir farklılık taşımazken, toplam grup ortalamaları değerlendirildiğinde FGF-2 düzeyini anlamlı olarak artıran gruplar Biodentine ve NeoMTA olmuştur. En yüksek FGF-2 seviyesi Biodentine grubunda ve 7. günde elde edilmiştir.

Alkalen fosfataz, dental dokuların mineralizasyonunda ve çeşitli kök hücrelerin osteojenik ya da odontojenik farklılaşmasının uyarılmasında görev alan spesifik bir enzimdir (115, 261). Kemik ve kıkırdak gibi sert dokuların kalsifikasyonunda osteoblastik farklılaşma çeşitli genler tarafından kontrol edilmektedir. ALP bu sürecin erken dönemlerinde salgılanmakta iken, geç dönemlerinde osteokalsin, osteonektin gibi genler eksprese edilmekte ve ALP bu aşamada azalma göstermektedir (110). ALP, inorganik pirofosfatın çözülmesine ve fosfat gruplarının salınmasını kontrol etmektedir (169). ALP aktivitesi ise, bu enzimlerin aktivitesini ölçen bir test ve odontoblastik ve osteoblastik aktivitenin erken dönem belirteci olarak tanımlanmaktadır (202). ALP aktivitesi, yeni kemik oluşumu ile bağlantılı olduğu için test edilmek istenen materyallerin kemik ya da sert doku üretiminin ve mineralizasyonun ölçülmesinde biyolojik bir belirteç olarak kullanılmaktadır (110, 202, 230). Bu çalışmada insan dental pulpa kök hücreleri ile etkileşimde olan biyoseramik esaslı materyallerin ALP aktivitesini 1. ve 3. günlerde yalnızca Biodentine grubunun, 7. günde ise MTA CEM hariç tüm grupların kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak artırdığı bulunmuştur. MTA CEM grubunda günlere bağlı ALP aktivitesinde artışlar olsa da istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. ALP aktivitesi en yüksek 7. günde Biodentine ve NeoMTA grubunda elde edilmiş olup sert doku oluşumunu arttırdıkları gösterilmiştir.

Açık apeksli immatür bir dişte dokuların rejenerasyonu için gereken kök hücreler; pulpa, apikal papilla, periodontal ligament ya da alveol kemiğinden gelebilmektedir. Kök hücreler, büyüme faktörleri ile beraber dokuları rejenere etme potansiyeli *in vitro* ya da *in vivo* olarak gösterilmiştir (100). Bu çalışmanın ikinci ve üçüncü aşamasında, dört farklı materyalin biyoaktivitelerini incelemek ve karşılaştırmak amacıyla BMP-2, FGF-2, VEGF ve ALP aktivitelerinin tayini *in vitro* olarak gerçekleştirilmiştir.

Bu çalışmanın biyoaktivite ve ALP aktivitesi deney aşaması *in vitro* olarak hücre kültüründe gerçekleşmiştir. Hücre kültür tipleri genel anlamda primer ve devamlı hücre hatları olmak üzere iki tiptir. Primer hücre kültürü, canlı organizmadan doku alınarak hazırlanan kültürlerdir. Devamlı hücre hatları ise, sabit bir fenotip gösteren, bölünme yeteneği sınırsız olan kültürlerdir (99). Dental pulpa kök hücreleri (DPSC), odontoblastlara, adipositlere, osteojenik ve sinir benzeri hücelere farklılaşma kapasitesi bulunan devamlı hücre hatlarıdır (114, 115, 315). Mezenkimal kök hücrelerin bir tipi olan DPSC'lerin yüksek klonojenik ve proliferatif özellik gösterdikleri için rejeneratif tıp ve

doku mühendisliğindeki kullanımı yaygınlaşmıştır (101). Her iki kültür tipinin birbirine göre avantaj ve dezavantajları bulunabilmektedir. Primer hücre kültüründe; hazırlanmasının ve izolasyonunun zor olması, üretilen hücrenin o dokuya ait olduğunun belirlenmesinin zorluğu, kontaminasyona duyarlı olması, etik problemler gibi dezavantajlar mevcuttur. Devamlı hücre hatlarında ise kolay pasajlanabilirlik, hızlı hücre çoğalmasının sağlanabilmesi, etik problemlerin bulunmaması gibi olumlu özellikler bulunmaktadır (214, 366). Bu çalışmada; primer hücre kültüründeki dezavantajlar gözetilerek, devamlı hücre hatlarının kolay proliferasyonu olması, etik problemler bulunmaması ile odontoblast ve osteojenik farklılaşma kapasitesi bulundurması nedeniyle insan dental pulpa kök hücreleri tercih edilmiştir.

Hücre kültüründe yapılan *in vitro* biyoaktivite deneylerinde, kullanılan deney materyalleri ile hücrelerin temas durumunun sağlanması gerekmektedir. Bu çalışmada kullanılan deney materyalleri katı formda olduğu için, salınım sıvılarının kullanılması uygun bulunmuştur (143). ISO 10993 standartının önerdiği üzere, sertleşmesi tamamlanan katı disk formundaki deney materyalleri, hücre kültür besiyeri içerisinde 37°C'de 24 saat bekletilmiş ve salınım sıvısı ana stok halinde hazırlanmıştır. Bu çalışmada literatürlerdeki farklı süreler ve dozlar göz önüne alınarak, biyoaktivite ve ALP testleri, 1., 3. ve 7. günlerde %50 ve %100'lük iki ayrı doz kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Biyoseramik esaslı dental materyallerin biyoaktivite incelemelerinde odontojenik, osteojenik ya da anjiyojenik enzim ya da genlerin ekspresyonu ve miktarı incelenmektedir. En sıklıkla kullanılan yöntem RT-PCR, ALP enzim aktivite testleri ve Alizarin Kırmızı ile boyamadır. Diğer yöntemler ise ELİSA, micro-CT, SEM, ATR-FTIR'dır (278). ELİSA testleri, enzim aktivitesini değerlendirmek üzere çeşitli antikor-antijen birleşmesiyle gerçekleşen testlerdir. ELİSA testleri diagnostik çalışmalarda hızlı, kolay, çoklu işlemlerin aynı anda gerçekleştirilmesi gibi kolaylıklar sunmaktadır (312). Çalışmamızda bu koşullar gözetilerek biyoaktivite ve ALP aktivitesi tayininde ELİSA yöntemi tercih edilmiştir.

Literatürde kalsiyum silikat esaslı materyallerin sert doku oluşumu ve iyileşme süreçlerine katılan biyolojik belirteçleri inceleyen çeşitli çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmada da, apeksifikasyon tedavisinde kullanılabilecek dört farklı biyoseramik esaslı dental siman olarak Biodentine™, NeoMTA, BioMTA ve MTA CEM'in insan dental

pulpa kök hücresi üzerindeki BMP, VEGF, FGF ve ALP aktivitesi karşılaştırmalı olarak incelenmesi amaçlanmıştır.

Guven ve ark. 2007 yılında yaptıkları bir araştırmada MTA'nın iki farklı ticari ürünü olan ProRoot MTA ve MTA Angelus'un insan gingival fibroblast hücreleri ile etkileşimleri sonucu üretilen TGF- β 1 ve BMP-2 seviyelerini karşılaştırmışlardır. Çalışmada kullanılan hücreler, ortodontik amaçlarla çekilmiş küçük azı dişlerine bağlı dişetinden elde edilmiştir. Her iki deney grubuna ait salınım sıvı örnekleri 24. ve 72. saatte toplanmış olup TGF- β 1 ve BMP-2 miktarları ELİSA kitleri ile 490 nm'de okunmuştur. Çalışmanın sonucunda her iki grubun 72. saatte TGF- β 1 seviyesini arttırdığı, 24. ve 72. saatler için MTA Angelus grubunun hem kontrol hem de ProRoot MTA grubuna kıyasla daha yüksek oranda TGF- β 1 oluşturduğu bildirilmiştir. BMP-2 seviyesi için ise, 24. saatte ProRoot MTA grubunun MTA Angelus grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunduğu ve zamanla beraber her iki grubun da BMP-2 seviyelerini arttırdığı tespit edilmiştir. Araştırmacılar bu bulguların, MTA ürünlerinin insan gingival fibroblastlarında BMP-2 üretimini uyardığını savunmuşlardır (118). Bu çalışmada dört farklı biyoseramik esaslı dental materyalin insan dental pulpa kök hücreleri ile etkileşimi sonucu BMP-2 seviyeleri ELİSA yöntemiyle belirlenmiştir. Tüm materyallerin BMP-2 seviyesini arttırdıkları, %50'lik doz için gün etkileşimi arttıkça bu seviyenin yükseldiği sonucuna ulaşılmıştır. 7. günde BMP-2 seviyelerinin Biodentine ve BioMTA grubunda, kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttırdığı ve osteojenik potansiyeli olduğu bulunmuştur. Güven ve ark. çalışmasında kullanılan hücre tipi farklı olmasına karşın, deney materyallerinin içerikleri benzer olup, kullanılan method aynıdır. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar, Güven ve ark.'ı destekler niteliktedir ve araştırılan materyallerin zamana bağlı olarak artan osteojenik potansiyeli olduğunu göstermiştir.

Ajlan ve ark. 2015 yılında yaptıkları bir çalışmada; MTA, EMD ve trombositen türetilmiş büyüme faktörünün (PDGF) dental pulpa kök hücreleri (DPSC) üzerindeki osteojenik farklılaşmalarını Alizarin kırmızısı boyama ve spektrofotometrik yöntemle incelemişlerdir. EMD'nin diğer gruplarla karşılaştırıldığında, ALP ekspresyonunu ve mineralizasyonunu arttırdığı ve osteojenik kapasiteye sahip olduğu bildirilmiş, MTA'nın farklı parametrelerde hafif düzeyde mineralizasyonu arttırdığı, PDGF'nin ise farklılaşma üzerinde anlamlı bir sonuç oluşturmadığı bildirilmiştir (3). Bu çalışmada üç farklı MTA materyali ve Biodentine'in ALP aktivitesi ELİSA yöntemiyle incelenmiş, Biodentine

grubu tüm günlerde kontrol grubuna göre anlamlı olarak ALP aktivitesini arttırırken, 7. günde MTA CEM haricinde diğer grupların anlamlı olarak ALP aktivitesini arttırdığı tespit edilmiştir. MTA CEM grubunda ise zamana bağlı artış görülmüş ancak bu artış anlamlı olarak bulunmamıştır. Bu sonuçlara göre yöntemler farklı olmasına rağmen MTA gruplarının ve Biodentine'in ALP aktivitesini zamana bağlı olarak arttırdığı, sert doku oluşumunu zamana bağlı olarak uyardığı sonucuna ulaşılmış ve Ajlan ve ark.'ın sonuçlarıyla benzerlik taşıdığı görülmektedir.

Paula ve ark., kalsiyum hidroksit (Life®), mineral trioksit agregat (White ProRoot® MTA) ve kalsiyum silikat esaslı bir materyalin (Biodentine™) MDPC-23 hücre hattı üzerindeki sitotoksitesini MTT testi ile, alkalen fosfataz aktivitesini ise PCR yöntemiyle incelemişlerdir. %50'lik konsantrasyona sahip olan Life® ALP gen oluşumunun anlamlı derecede azalmasına sebep vermiştir. Biodentine™'nin % 6.25 ve %50'lik konsantrasyonu kontrol grubuna oranla anlamlı derecede ALP ekspresyonunu arttırdığı, White ProRoot® MTA'nın ise %6.25 konsantrasyonda ALP ekspresyonunu anlamlı derecede arttırdığı, %50'lik düzeyde ise anlamlı düzeyde azalttığı bildirilmiştir. Çalışmanın sonucunda Biodentine™ 'in mineral trioksit agregat simanlara oranla daha yüksek alkalen fosfataz gen ekspresyonu sağladığı ve daha üstün mineralizasyon performansı sağladığı bildirilmiştir (246). Bu çalışmada deney gruplarındaki materyallerin ALP aktivitesi Biodentine için tüm günlerde, MTA CEM hariç diğer gruplar için 7. günde anlamlı olarak artmıştır. Konsantrasyonlar arası karşılaştırma yapıldığında, en yüksek ALP ortalamaları %50'lik formda elde edilmiştir. Doz artışına bağlı olarak ALP aktivitesinin azaldığı tespit edilmiştir. En yüksek ALP aktivitesi Biodentine grubunda elde edilmiş olup, bu durum Paula ve ark.'nın çalışmasıyla yöntem farklılığına rağmen örtüşmektedir.

Ghasemi ve ark., beyaz MTA, kalsiyumdan zenginleştirilmiş karışım (CEM) ve disodyum hidrojen fosfat içeren MTA'nın insan gingival fibroblast hücreleri üzerindeki canlılığını ve BMP-2 üretimini incelemişlerdir. BMP-2 seviyeleri ELİSA yöntemiyle değerlendirilmiştir. DHSP içeren beyaz MTA grubunun diğer gruplara oranla anlamlı derecede düşük düzeyde BMP-2 proteini ürettiği ve bunun başlangıç toksisitesi ile ilgili olabileceği bildirilmiştir. MTA'nın kalsiyum iyonu salması ve bu salınının BMP-2 üretimini indüklemesine bağlı olarak osteogenezis/sementogenezis için hücresel fonksiyonları regüle ettiği savunulmaktadır. İnsan gingival fibroblastların periodontal

ligament fibroblastlarına benzer şekilde davranarak sementogenezis ve osteogenezis sürecine katıldığı gösterilmiştir (106). Bu çalışmada Biodentine ve BioMTA gruplarının insan dental pulpa kök hücrelerinde BMP-2 seviyelerini arttırdığı ve bu hücrelerde osteojenik potansiyeli artırması, Ghasemi ve ark.'nın çalışmasıyla örtüşmektedir. Her iki çalışmada kullanılan hücre tipleri farklı olmasına karşın, elde edilen benzer sonuçların MTA içeriklerinin benzer olması ve kalsiyum iyonu salması ile açıklanabileceğini düşünmekteyiz.

Bortoluzzi ve ark. Biodentine, TheraCal LC ve MTA Angelus'un çekilmiş dişlerden edilen insan dental pulpa kök hücreleri üzerindeki canlılığını ve osteojenik farklılaşmasını incelemişlerdir. Osteojenik ve dentinojenik farklılaşmayı değerlendirmek için RT-PCR yöntemiyle ALP, osteokalsin, kemik sialoprotein, RUNX 2, dentin sialofosfoprotein gibi biyolojik belirteçler belirlenmiştir. ALP enzim aktivitesi ise 14. günde ELİSA yöntemiyle değerlendirilmiştir. MTA Angelus ve Biodentine grubunun DSPP, DMP-1, kemik sialoprotein ve osteokalsin gibi odontoblastik ve osteoblastik belirteçleri arttırdığı, TheraCal grubunun ise bu belirteçleri belirgin şekilde arttırmadığını belirtmişlerdir. ALP aktivitesinin sırasıyla en yüksek Biodentine grubunda, daha sonra MTA Angelus ve ThereCal grubunda olduğu ve tüm grupların pozitif kontrol grubuna (çinko oksit öjenol esaslı siman) kıyasla anlamlı olarak yüksek ALP aktivitesi ve mineralizasyon gösterdiği bildirilmiştir (36). Bu çalışmada MTA grupları ve Biodentine'in insan dental pulpa hücreleri üzerindeki ALP enzim aktivitesi 1., 3. ve 7. günlerde ELİSA yöntemiyle incelenmiştir. 1. ve 3. günlerde Biodentine grubu hariç MTA gruplarında ALP aktivitesi artış göstermesine karşın, kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. Bortoluzzi ve ark.'nın çalışmasındaki bu farklılığın ALP aktivitesinin değerlendirildiği günlerin farklı olması ve buna bağlı olarak çalışmamızdaki deney gruplarının ilk günlerinde hücrelerin odontoblastik aşamalarının erken safhalarında olmasından kaynaklanabileceği şeklinde yorumlamaktayız. En yüksek ALP aktivitesi ortalamasının Biodentine grubunda elde edilmiş olması ise Bortoluzzi ve ark.'nın çalışmasıyla benzerlik taşımaktadır.

Rodrigues ve ark. MTA (Angelus, Brazil) ve MTA Plus (Avalon Biomed, USA)'ın sitotoksitesini ve osteojenik biyoaktivitesini insan üçüncü molar dişinden elde edilen insan dental pulpa kök hücreleri üzerinde incelemişlerdir. Araştırmacılar sitotoksitesi MTT yöntemi ile, ALP aktivitesini ELİSA yöntemiyle, BMP-2, OC ve

ALP gen ekspresyonlarını ise real-time PCR yöntemi ile değerlendirmişlerdir. Çalışmanın sonucunda her iki materyalin apoptoza neden olmadığı ve sitotoksik özellik taşımadığı bildirilmiştir. MTA Plus'ın MTA ve kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak ALP aktivitesini arttırdığı sonucuna varılmıştır. BMP-2 ve OC gen ekspresyonları ise 1. gün için MTA grubunda daha yüksek, 3. gün içinse MTA P grubunda daha yüksek olarak bildirilmiştir. Her iki materyalinde *in vitro* olarak sert doku oluşum sürecine katkı sağladığı ve osteojenik faktörlerin salınımını uyardığı sonucuna varmışlardır (268). Bizim çalışmamızda BMP-2 düzeyi ELİSA yöntemi ile değerlendirildiğinde üç farklı MTA grubu ve Biodentine grubunun 1. gün BMP-2 faktörünü arttırdığı ancak kontrol grubuna kıyasla anlamlı olmadığı bulunmuştur. %50'lik dozda etkileşim süresi arttıkça bu büyüme faktörünün daha çok üretildiği sonucuna ulaşılmıştır. En yüksek osteojenik aktivite 7. gün için tespit edilmiş olup, bu aktivitenin en yoğun olduğu gruplar Biodentine ve BioMTA grubu olmuştur. ALP aktivitesinde ise deney gruplarındaki materyallerin MTA CEM grubu hariç 7. günde ALP aktivitesini anlamlı olarak arttırdığı bulunmuştur. Bu materyallerin etkileşim süresine bağlı olarak sert doku oluşumu ve osteojenik aktiviteyi arttırdığı gösterilmiştir.

Youssef ve ark. ProRoot MTA, kalsiyum hidroksit , Biodentine ve Emdogain olmak üzere dört farklı materyalin insan üçüncü büyük azı dışından elde edilen dental pulpa kök hücreleri üzerindeki hücre canlılığını MTT testi ile, alkalen fosfataz ve osteopontin gibi osteojenik belirteçleri, dentin sialofosfoproteini ve anjiyojenik bir faktör olan VEGF'i real-time PCR ile 7. ve 14. günde değerlendirmişlerdir. Çalışma sonucunda; tüm materyallerin osteojenik ve odontojenik faktörleri yükselttiği, anjiyojenik faktörü ise kalsiyum hidroksit hariç tüm test edilen materyallerin arttırdığı sonucuna varılmıştır (370). Bu çalışmada ise MTA gruplarının ve Biodentine'in zamanla beraber VEGF düzeyini arttırdığı, ancak bu artışların 1. ve 3. günler için kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir artış olmadığı bulunmuştur. Ölçülen en yüksek VEGF seviyesinin ise 7. günde %50'lik formda olan Biodentine grubuna ait olduğu ve kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek olduğu sonucuna ulaşılmıştır. ALP aktivitesinin en yüksek olduğu gün ise gruplar için yedinci gün olarak tespit edilmiştir. Çalışmamız sonucunda sert doku oluşumu ve anjiyojenik potansiyelin en belirgin olduğu grup Biodentine olarak tespit edilmiştir.

Peters ve ark. ProRoot MTA ve Biodentine'in apikal papilla kök hücreleri (SCAP) üzerindeki hücre canlılığını XTT yöntemi ile, VEGF ve ANGPT1 gibi anjiyojenik faktörlerin salınmasını ELİSA yöntemi ile ve diğer anjiyojenik ve inflamatuvar yanıt oluşturan gen ölçümlerini PCR yöntemi ile değerlendirmişlerdir. 3. günde salınan VEGF düzeyleri her iki deney grubu için istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yükselmiştir. 1. gün için deney grupları ve kontrol grubu arasında istatistiksel bir farklılık bulunmamıştır. (252). Bizim çalışmamızda hem MTA grupları, hem de Biodentine grubu için etkileşim süresi açısından 1. ile 3. gün arasında kıyaslama yapıldığında, ölçülen VEGF düzeyinin arttığı ancak kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir artış bulunmadığı, anlamlı artışın 7. günde Biodentine grubunda bulunduğu tespit edilmiştir. Peters ve ark. çalışmasında PCR yöntemiyle MTA ve Biodentine gruplarının VEGF A ve FGIF değerlerinin yükseldiğini, ANGPT1 ve FGF-2 değerlerinin ise azaldığı sonucuna varmışlardır. Bizim çalışmamızda ise, hem MTA grupları hem de Biodentine grubu FGF-2 salınımını %50'lik doz için günlere bağlı olarak arttırırken, Biodentine ve NeoMTA grupları gün etkileşimi bakılmaksızın FGF-2 seviyesini, kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttırmıştır. 1., 3. ve 7. günlerdeki artışlar ise kontrol grubu ile farklılık göstermemiştir. Peters ve ark.'nın çalışmasının sonucu ile karşıt olan bu sonucun; kullanılan hücre tipinin farklı olması, direkt ya da indirekt etkileşim farklılığı ya da büyüme faktörlerinin ölçülme yöntemlerinin farklı olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Giraud ve ark. Biodentine, TheraCal ve Xeno III'ün lipoteikoik asit stimüle ya da fiziksel olarak hasara uğratılmış fibroblastlar üzerindeki inflamasyon ve iyileşme sürecindeki etkilerini inceledikleri *in vitro* bir çalışma yapmışlardır. Çalışmada inflamasyon etkilerini incelemek üzere IL-6 ve VEGF, rejenerasyonu incelemek üzere TGF- β 1 ve FGF-2 sekresyonu 4., 24. ve 48. saatlerde ELİSA yöntemiyle değerlendirilmiştir. Çalışmanın sonucunda tüm deney gruplarında IL-6 sekresyonunun anlamlı bir şekilde arttığı; ancak bu artışın Biodentine grubu için diğer gruplara kıyasla en az olduğu belirtilmiştir. VEGF salınımının tüm gruplarda zamanla arttığı, fakat bu artışın rezin içeren gruplarda daha yüksek olduğu bildirilmiştir. Biodentine'in TGF- β 1'in salınımını 24. ve 48. saatlerden sonra anlamlı bir şekilde arttırdığı, FGF-2 sekresyonunun ise 4. saatten sonra tüm deney gruplarında arttığı gözlemlenmiştir. Giraud ve ark. yaptıkları bu araştırmaya göre Biodentine'in inflamasyonu azaltırken iyileşme sürecine dahil olan büyüme faktörlerini uyardığı sonucuna varmışlardır (109). Bu çalışmada Biodentine ve diğer grupların VEGF'in zamana bağlı olarak arttırdığı, bu artışın en

yüksek ve anlamlı olarak 7. günde Biodentine grubunda olduğu ve bu sonucun Giraud ve ark.'nın sonucuyla benzerlik içerdiği görülmektedir. FGF-2 ise zamana bağlı artış göstermiş olsa da, kontrol grubu ile bir farklılık oluşturmamıştır.

Önay ve ark. ProRoot MTA ile Micro-Mega MTA isimli iki farklı ticari kalsiyum silikat esaslı materyalin primer insan dental pulpa kök hücreleri üzerindeki odontojenik farklılaşma özelliklerini karşılaştırmalı olarak incelemişlerdir. 7. ve 14. günlerde materyallerle etkileşen hücrelerin odontoblastik farklılaşmaları ALP aktivitesi testi spektrofotometrik yöntemle microplate yardımı ile okunmuştur. RUNX2, ALPL, BMP-2, DSPP ve DLX3 gibi faktörler ise RT-PCR yöntemiyle belirlenmiştir. ALP aktivitesini her iki materyalin arttırdığı sonucuna varılmış olup, en yoğun ALP aktivitesinin 14. günde MM-MTA grubuna ait olduğu belirtilmiştir. Ancak negatif kontrol grubu ile deney grupları arasında ALP aktivitesi açısından anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. Gen ekspresyon analizinde ise MM-MTA grubunun diğer MTA grubuna kıyasla her üç gün için de daha yüksek BMP-2 ekspresyonu sağladığı bildirilmiştir. Bu çalışmada ELİSA yöntemiyle belirlenen BMP-2 seviyeleri değerlendirildiğinde, ilk günlerde anlamlı bir artış sağlayamasa da yedinci gün BioMTA ve Biodentine grubunun osteojenik potansiyeli anlamlı olarak artmıştır. Gruplar arası karşılaştırmalarda ise Biodentine'in daha yüksek BMP-2 salgılanmasını sağladığı bulunmuştur. Önay ve ark.'nın çalışmasında her iki deney grubuna ait ALPL, RUNX2, DSPP ve DLX3 ekspresyonları benzer olup, farklılık bulunmamıştır. Araştırmacılar, her iki ticari MTA grubunun insan dental pulpa kök hücreleri üzerinde benzer osteojenik ve odontojenik farklılaşma gösterdiklerini ve osteogenezis/dentinogenezis ile ilgili gen mekanizmalarını uyardığını, MM-MTA'nın potansiyel bir alternatif olduğunu savunmuşlardır (241). Araştırmacılar ALP aktivitesinin negatif kontrol grubu ile farklılık oluşturmamasını, hücreler ile materyaller arasındaki indirekt etkileşimde oluşan içeriklerin bir bariyer gibi davranmasına ve dental pulpa hücrelerinin aktivitesini muhtemelen azaltmasına bağlamışlardır (243). Bizim çalışmamızda ALP aktivitesi tüm deney gruplarında günlere bağlı artış göstermiş, ancak bu artışlar MTA grupları için 1. ve 3. günlerde anlamlı bulunmamıştır. Biodentine grubu incelenen üç gün için ALP aktivitesini anlamlı olarak arttırken, MTA CEM grubu hariç diğer MTA grupları ALP aktivitesinin 7. günde anlamlı olarak yükselmesini sağlamıştır. Deney gruplarının gün geçtikçe sert doku oluşumunu uyardığı ve 7. gün gruplar arasında anlamlı bir farklılık olmadığı sonucuna ulaşılmıştır.

Chang ve ark. Biodentine, Ortho MTA, MTA Angelus ile geçici restoratif materyalin (IRM) biyouyumluluk, inflamatuvar yanıt ve odontoblastik farklılaşmasını insan dental pulpa kök hücreleri üzerinde karşılaştırmalı olarak araştırmışlardır. Materyallerin sitotoksikite incelemesinde MTT yöntemi kullanılmış ve kalsiyum silikat esaslı materyallerle kültür edilen hücreler benzer canlılık oranı göstermiştir. IRM grubu ise diğer gruplarla kıyaslandığında anlamlı derecede daha az canlılığa sahip bulunmuştur. ALP aktivitesi ve mineralize nodül oluşumu Angelus MTA ve Biodentine ile artış göstermesine karşın, IRM ile azalmıştır. ALP aktivitesi en yüksek olarak Ortho MTA grubunun 14. gününde bulunmuştur. Dentin sialofosfoprotein, osteonektin, osteopontin, kemik sialoprotein gibi odontojenik belirteçlerin belirlenmesinde RT-PCR yöntemi kullanılmış, 14. günde kalsiyum silikat esaslı üç materyalin de bu belirteçleri arttırdığı ancak üç materyal arasında herhangi bir farklılık bulunmadığı bildirilmiştir (50). Bu çalışmada kullanılan biyoseramik esaslı materyaller ALP aktivitesini ve dolayısıyla sert doku oluşum sürecini yedinci günde belirgin bir şekilde arttırmış, ve aynı gün için değerlendirme yapıldığında gruplar arası bir farklılık bulunmamıştır. ALP aktivitesi Chang ve ark. çalışmasında 14. günde, bu çalışmada ise 7. günde dolayısıyla hücre materyal etkileşim süresinin uzadığı günlerde bulunmuştur. Bu durumun hücrelerin odontoblastik farklılaşmayı bu zaman dilimlerinde gerçekleştirdiğinden kaynaklı olabileceğini düşünmekteyiz.

Asgary ve ark. 2014 yılında yaptıkları bir araştırmada ProRoot MTA ve kalsiyumdan zengin karışımın (CEM), çekilmiş üçüncü büyük azı dışından elde edilmiş insan dental pulpa kök hücreleri üzerindeki osteojenik ve odontojenik farklılaşma etkilerini incelemek üzere TGF- β 1, BMP-2, BMP-4 ve FGF-4 gibi belirteçleri ELİSA yöntemi ile değerlendirmiştir. Dentin sialofosfoprotein, dentin matriks protein 1 gibi sitokinleri ise RT-PCR yöntemi ile incelemişlerdir. ELİSA sonuçlarına göre 1. günden 7. güne FGF-4'ün tüm gruplarda azaldığı; ancak 7. günden sonra arttığı bildirilmiştir. BMP-2 konsantrasyonunun MTA haricindeki diğer gruplarda 1-3. günler arasında azaldığı; ancak 4 ile 14. günler arasında tüm gruplarda arttığı sonucuna ulaşılmıştır. TGF- β 1'in üçüncü güne kadar tüm gruplarda arttığı, 3 ile 7. günler arasında azaldığı, MTA grubunun en yüksek konsantrasyona sahip olduğu belirtilmiştir. PCR sonuçlarına göre, FGF-4 ve BMP-2 genleri CEM grubunda diğer gruplara kıyasla anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur. TGF- β 1 geni ise en yüksek MTA grubunda bulunmuştur. DSPP ve DMP 1

gibi odontojenik genler için gruplar arasında bir farklılık bulunmamış; ancak büyüme medyumunu içeren grupta anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur. ALP geni ise MTA ve CEM için benzer olarak bulunmuştur. Araştırmacılar farklı sonuçların, MTA ve CEM'in kimyasal içeriklerinin farklı olmasından kaynaklanabileceğini ancak her iki materyalin de DPKH'lerle biyolojik olarak uyumlu olduğunu ve osteo/odontojenik farklılaşmayı çeşitli derecelerde uyardıklarını bildirmişlerdir (20). Bu çalışmada ELİSA yöntemi ile belirlenen her deney grubu için BMP-2 konsantrasyonları 1. gün ile 7. gün arasında değerlendirildiğinde anlamlı olarak yükselmiştir. Grup ortalamaları karşılaştırıldığında MTA CEM hariç diğer tüm gruplar kontrol grubuna kıyasla BMP-2 konsantrasyonunu anlamlı olarak arttırmıştır. En belirgin artış yedinci gün için Biodentine ve BioMTA grubunda bulunmuştur. ALP aktivitesinde en belirgin artış sağlayan grubun ise Biodentine grubu olduğu belirlenmiştir.

Chung ve ark. ProRoot MTA, Retro MTA ve Endocem Zr isimli üç ticari kalsiyum silikat esaslı materyalin, ortodontik nedenlerle çekilmiş küçük azı dişlerinden elde edilen pulpa hücreleri üzerindeki hücre canlılığını XTT testi ile ve anjiyojenik faktör salınımını (VEGF, anjiyogenin ve FGF-2) ise ELİSA yöntemi ile değerlendirmişlerdir. Hücre canlılığı ProRoot MTA ile Retro MTA için benzer bulunmuş olup, Endocem Zr için 3 günlük kültür sonrasında sitotoksik bulgular bulunsa da bu başlangıç sitotoksitesisi geçici olarak görülmüştür. ELİSA sonuçlarında ölçülen VEGF seviyeleri her bir test edilen materyalin ve zaman etkileşimine göre istatistiksel açıdan farklılık göstermiştir. Endocem Zr grubu, diğer iki MTA grubuna kıyasla istatistiksel açıdan daha düşük VEGF konsantrasyonuna sahip bulunmuştur. Anjiyogenin ve VEGF arasında pozitif korelasyon bulunduğu bildirilmiştir. Araştırmacılar, VEGF düzeylerini 24. ve 72. saatte ölçmelerinin nedenini, dental pulpa hücrelerinin bu anjiyojenik faktörleri travmadan hemen sonra salma eğilimi ile açıklamışlardır (335). FGF-2 düzeyi için ise tüm gruplar için görece düşük ve gruplar arasında istatistiksel açıdan bir farklılık bulunmamıştır (55). Bu çalışmada deney gruplarına ait FGF-2 düzeyi etkileşim süresi uzadıkça artmıştır. Bu artışlar minimal düzeyde olup grup ve zaman etkileşimleri birlikte değerlendirildiğinde kontrol grubu ile benzer bulunurken, toplam grup ortalamaları değerlendirildiğinde en yüksek FGF-2 seviyesi Biodentine ve daha sonra NeoMTA grubunda olup, kontrol grubu ortalamasına göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. VEGF miktarı ise anlamlı olarak yedinci gün Biodentine grubunda elde edilmiş olup, diğer MTA grupları için gruplar arasında ve kontrol grubu ile anlamlı bir farklılık bulunmamıştır.

Ali ve ark. beyaz MTA Angelus, Biodentine ve TotalFill BC RRM PUTTY adlı üç farklı ticari trikalsiyum silikat simanın insan kemik iliği mezenkimal kök hücreleri üzerinde osteojenik ve anjiyojenik etkilerini inceledikleri *in vitro* bir çalışma yapmışlardır. ALP, osteoprotegrin, osteokalsin, kolajen 1A gibi osteojenik faktörler ve VEGF A ve FGF-1 anjiyojenik faktörlerin seviyelerini RT-PCR yöntemiyle, VEGF A ve ALP seviyelerini ise ELİSA yöntemiyle değerlendirmişlerdir. PCR sonuçlarına göre gen ekspresyonları her madde için farklılık taşısa da, Biodentine ve TotalFill grubu gen seviyelerindeki erken değişimlere neden olan gruplar olmuştur. ELİSA ile okunan VEGF A seviyeleri 3. günden 7. güne doğru artmış ve en yüksek VEGF A düzeyi Biodentine grubu için okunmuştur. ALP aktivitesi için trikalsiyum silikat esaslı materyallerin kontrol grubuna kıyasla azalmaya yol açtığı sonucuna varılmış ve materyal grupları arasında istatistiksel bir farklılık bulunmamıştır. Araştırmacılar, TotalFill materyalinin de MTA ve Biodentine gibi benzer kimyasal içeriğe sahip olduğunu ve kalsiyum silikat bileşimindeki kalsiyum iyonlarının salınımından sorumlu olduğunu vurgulamışlardır. Silikanın kemik rezorpsiyonu ve osteoklast oluşumunu inhibe etmesi nedeniyle trikalsiyum silikat esaslı materyallerin osteojenik potansiyelinin olabileceği bildirilmiştir (210). Ali ve ark., deney ve inkübasyon sürelerini sınırlı olarak tutmuşlardır; buna karşılık daha uzun süreli deneylerin hücre canlılığı, metabolizma etkileri, gen ve protein salınım miktarları gibi sonuçları değiştirebileceğini vurgulamışlardır (5). Bu çalışmada ALP aktivitesinin en erken Biodentine grubunda anlamlı olarak artış göstermesi ve VEGF düzeyini 7. günde anlamlı bir şekilde arttırması Ali ve ark.'nın çalışmasını destekler niteliktedir.

Wongwatanasanti ve ark. ProRoot MTA, RetroMTA ve Biodentine'in apikal papilla kök hücreleri üzerindeki odontoblastik farklılaşmasını 1., 3., 7., 14. ve 21. günlerde Alizarin kırmızısı boyama ve RT-PCR yöntemiyle değerlendirmişlerdir. Alizarin kırmızı boyama yöntemiyle kalsifiye nodül oluşumları belirlenmiş ve Biodentine ile pozitif kontrol grubunun 7., 14. ve 21. günlerde mineralizasyon bulguları pozitif olarak bulunmuştur. ProRoot MTA ve RetroMTA gruplarında ise mineralizasyon boyanması negatif bulunmuştur. RT-PCR yöntemiyle incelenen dentin matriks fosfoprotein 1, dentin sialofosfoprotein, matriks ekstrasellüler fosfoglikoprotein gibi osteojenik/odontojenik genler en yüksek olarak 21. gün Biodentine grubunda bulunmuştur. Retro MTA grubunun odontoblastik belirteçler açısından en düşük grup olduğu ve bu durumun diğer çalışmalarla benzer olduğu bildirilmiştir (358). Bizim çalışmamızda sert doku

oluşumunun belirteci olan ALP aktivitesi tüm günlerde Biodentine için anlamlı olarak artış gösterirken, yedinci günde NeoMTA ve BioMTA bu belirteç anlamlı artış göstermiştir. En yüksek ALP aktivitesinin ve dolayısıyla osteojenik potansiyelin Biodentine grubunda elde edilmiş olması, Wongwatanasanti ve ark.'nın çalışması ile benzerlik göstermektedir.

Olçay ve ark. ProRoot MTA, Biodentine ve Well-Root ST isimli biyoseramik esaslı bir kök kanal sealer materyalinin insan dental pulpa kök hücreleri, insan periodontal ligament hücreleri (hPDLSC) ve insan diş germi kök hücreleri (hTGSc) üzerindeki sitotoksitelerini ve anjiyojenik potansiyellerini incelemişlerdir. MTS yöntemiyle belirlenen sitotoksite değerlendirmesinde, hiçbir trikalsiyum silikat esaslı materyal sitotoksik bulunmamıştır. Anjiyojenik potansiyeli belirlemek üzere 1., 7. ve 14. günlerde platelet kökenli büyüme faktörü (PDGF), VEGF ve FGF-2 miktarları ELİSA yöntemiyle değerlendirilmiştir. ELİSA testlerinin sonucunda, her üç hücre grubu ve zamanı için FGF-2, VEGF ve PDGF açısından anlamlı bir farklılık bulunmamasına rağmen 1. ve 7. günlerde Well-Root ST ile kültür edilmiş hTGSC diğer deney ve kontrol gruplarına kıyasla daha yüksek VEGF seviyesi saptanmıştır. 14. günde ise ProRoot MTA ve Biodentine grubundaki VEGF seviyesi diğer gruplara oranla daha yüksek bulunmuştur. hPDLSC grubunda 1. ve 7. günlerde Biodentine ve Well-Root ST grubu daha yüksek oranda VEGF gösterirken, 14. günde ise ProRoot MTA daha yüksek oranda VEGF saptanmıştır. Tüm bu farklılıklar ise anlamlı olarak bulunmamıştır. FGF-2 seviyesi hTGSC için Biodentine grubunda en yüksek ve hDPSC için Well-Root ST ve ProRoot MTA da en yüksek bulunsa da, bu durum anlamlı bir farklılık göstermemiştir. Araştırmacılar anjiyojenik potansiyeli sağlayan büyüme faktörleri için deney grupları arasında anlamlı farklılık bulunmamasının olası sebebi olarak materyallerin statik koşullarda hazırlanması ancak ekstrat sıvılarının kullanılması şeklinde yorumlamışlardır. Bu nedenle büyüme faktörü miktarlarının benzer ve az olduğu şeklinde bir sonuca ulaşmışlardır. Araştırmacılar, Peters ve ark. nın yaptığı çalışmayla (252) uyumlu olarak ProRoot MTA ve Biodentine'in benzer şekilde VEGF salınım miktarı ve paternine sahip olduğunu bildirmişlerdir (232). Bu çalışmada ELİSA yöntemiyle değerlendirilen büyüme faktörlerinden FGF-2 grup ve zaman birlikte değerlendirildiğinde anlamlı farklılık göstermemiştir ve bu durum Olçay ve ark.'nın çalışmasındaki bulgu ile benzerlik göstermektedir.

Bizim çalışmamızda biyoaktivite değerlendirmek üzere Biodentine, BioMTA, NeoMTA ve MTA CEM'in insan dental pulpa kök hücrelerinde uyardığı BMP-2, FGF-2 ve VEGF düzeyleri ELİSA yöntemiyle değerlendirilmiştir. İncelenen her dört materyalin insan dental pulpa kök hücreleri üzerinde belirtilen büyüme faktörlerini çeşitli miktarlarda arttırdığı bulunmuştur. Bu artışlar etkileşim süresi ile artarken, doz miktarı iki katına çıktığında ise azalmıştır. Literatürde yapılan çalışmalarda kullanılan hücre tipleri ve büyüme faktörlerinin ölçüldüğü yöntemler farklı olsa da, literatürde farklı kalsiyum silikat esaslı materyalin bu faktörleri farklı düzeylerde salgıladığı sonucu, bizim çalışmamızdaki benzer sonuçlarla örtüşmektedir. Literatürde henüz araştırması yapılmamış olan NeoMTA, MTA CEM ve BioMTA'nın temel olarak MTA ile benzer içeriklere sahip olması, bu sonuçları destekler niteliktedir.

Çalışmamızda bu dört materyalin biyoaktivitelerini karşılaştırmalı olarak incelediğimizde doz ve gün açısından farklı sonuçlar elde edilmiştir. BMP-2 düzeyi gruplar arası karşılaştırıldığında, her grup için materyal ile etkileşim süresi arttığında salgılanan BMP-2 düzeyi istatistiksel olarak anlamlı şekilde artmaktadır. Doz açısından karşılaştırma yapıldığında, tüm gruplar için %50'lik doz materyallerle etkileşime giren hücreler, %100'lük doza kıyasla anlamlı olarak daha yüksek oranda bu faktörlerin salınımını uyarmışlardır. Bu durum dozun artması nedeni ile materyallerin hücreler üzerinde toksik bir etki oluşturabileceğini ya da metabolizmasını yavaşlatabileceğini ve dolayısıyla uyarılan faktörlerin daha az olabileceğini düşündürmektedir. Materyaller arası doz ve günler dahil olmak üzere toplam ortalamalar üzerinden karşılaştırma yapıldığında en yüksek BMP-2 miktarı Biodentine, BioMTA ve NeoMTA grubunda bulunmuş ve kontrol grubu ortalamalarından istatistiksel olarak yüksek bulunmuştur. MTA CEM grubu ise gruplar içinde en düşük BMP-2 miktarına ve dolayısıyla en düşük osteojenik potansiyele sahip olan grup olarak tespit edilmiştir.

Çalışmamızda karşılaştırdığımız materyal grupları FGF-2 miktarları açısından değerlendirildiğinde tüm materyaller için doz arttıkça FGF-2 seviyesi anlamlı olarak azalmaktadır. Buna karşılık materyallerle olan etkileşim süresi 1. günden 7. güne doğru FGF-2 düzeyi istatistiksel olarak anlamlı şekilde yükselmektedir. Grup ve zaman etkileşimi birlikte değerlendirildiğinde FGF-2 seviyeleri deney grupları ve kontrol grupları için benzer bulunmuştur. Bu durum Olcay ve ark.'nın belirttiği gibi materyallerin salınım sıvılarının kullanılması ancak , bu durumun katı formdaki materyallerin FGF-2

üzerindeki etkisini tam olarak yansıtamamasından kaynaklanabileceğini (232) düşünmekteyiz.

Çalışmamızın biyoaktivite aşamasında değerlendirilen son biyolojik belirteç olan VEGF düzeyleri, 1. ve 3. günlerde deney grupları arasında ve kontrol grubu ile anlamlı bir farklılık oluşturmazken, 7. günde Biodentine grubunda anlamlı olarak yükselmiştir. Gruplar için konsantrasyon arttıkça VEGF miktarı azalmıştır. MTA gruplarındaki artış ise anlamlı bulunmamıştır. Biodentine grubu %50'lik doz 7. gününde anjiyojenik uyarım en belirgin olarak tespit edilmiştir. Bizim çalışmamızdaki etkileşim süresi/VEGF düzeyi ilişkisi ile en yüksek VEGF düzeyinin Biodentine grubunda bulunması literatürdeki diğer çalışmaların sonucu ile örtüşmektedir.

Bu çalışmada ALP aktivitesi deney grupları arasında değerlendirildiğinde, Biodentine grubunun ALP aktivitesini her üç gün için de kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttırdığı, etkileşim süresi arttıkça ALP enzim aktivitesinin anlamlı olarak yükseldiği bulunmuştur. MTA gruplarının 1. ve 3. günlerindeki artışı anlamlı bulunmazken, 7. günde BioMTA ve NeoMTA anlamlı olarak ALP aktivitesini arttırmıştır. Literatürde ALP aktivitesi konusunda yapılan çalışmalarda farklılık gösteren sonuçlar bulunmakta ve bu durum kullanılan hücre tipi, materyallerin hazırlanışı, salınım sıvılarının elde edilme koşulları ve ALP aktivitesini ölçen yöntemin farklı olmasından kaynaklanabilmektedir. Çalışmamızda kullandığımız MTA gruplarının ALP aktivitesini ilk günlerde indüklememesini iki şekilde yorumlamaktayız. İlk olarak, hücrelerin odontoblastik farklılaşmasının erken aşamasında olması ve ALP aktivitesini henüz uymamasından kaynaklı olabileceğini düşünülmüştür. İkinci olarak ise, Paranjpe'nin belirtmiş olduğu gibi; hücreler ile materyaller arasındaki etkileşimin bariyer görevi görerek hücrelerin metabolik aktivitesini ve dolayısıyla ALP aktivitesini azalttığı şeklinde yorumlanmıştır (243).

ISO 10993-5 ve OECD 487 *in vitro* çalışmalara çeşitli standartlar ve methodlar getirmektedir. Bu standartlara ait basamaklar tam olarak gerçekleştirilse bile, optimal standardizasyon sağlanması her çalışma için gerçekleştirebilmektedir. Çalışmamızdaki sonuçlar literatürdeki bazı çalışmalarla örtüşmekte ve paralellik göstermekte iken, bazılarıyla ise farklılık gösterebilmektedir. Bu duruma, çalışmalarda kullanılan hücre tiplerinin primer ya da sekonder oluşu, hücrelerin farklı soyları, materyallerin hazırlanma koşulları, salınım sıvılarının alınması, materyal ile hücre

temasının direkt ya da indirekt oluşu, doz farklılığı, değerlendirme methodları ve analiz yöntemleri gibi farklılıkların neden olabileceği düşünülmektedir.



6. SONUÇLAR

Apeksifikasyon tedavilerinde kullanılan Biodentine, Neo MTA, BioMTA ve MTA CEM isimli dört biyoseramik esaslı dental materyalin genotoksisite, biyoaktivite ve alkalen fosfataz aktivitesine ilişkin karşılaştırmalı olarak incelendiği bu çalışmada şu sonuçlar elde edilmiştir:

- Çalışmamızdaki deney grubuna ait tüm biyoseramik esaslı materyallerde doz arttıkça MN sayısı ve % MN oranı artmış; ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.
- Çalışmamızdaki deney gruplarındaki % MN oranı tüm dozlar için, kontrol grubunun oluşturduğu % MN oranına göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur. Bu durum deney grubunda kullanılan biyoseramik esaslı materyallerin insan periferik lenfosit hücreleri üzerinde MN oluşumunu indüklediğini ve genotoksik etkiye sahip olmadıklarını göstermektedir.
- Çalışmamızın deney gruplarının insan periferik lenfosit hücreleri üzerinde oluşturduğu NBI değeri (MTA CEM ve Biodentine 50 µg/ml hariç), kontrol grubu ile karşılaştırıldığında tüm gruplarda anlamlı olarak düşük bulunmuştur.
- Çalışmamızın biyoaktivitesinin değerlendirildiği ELİSA deneylerinde tüm biyoseramik esaslı dental materyallerin, BMP-2, FGF-2 ve VEGF seviyelerini çeşitli oranlarda arttırdığı bulunmuştur.
- Grup ortalamaları karşılaştırıldığında MTA CEM grubu dışında tüm deney grupları, kontrol grubuna göre anlamlı olarak BMP-2 seviyesini arttırmıştır.
- Tüm gruplar için materyal/etkileşim süresi uzadıkça, insan dental pulpa kök hücrelerinden salgılanan BMP-2 seviyesinin arttığı bulunmuştur.
- BMP-2 seviyelerinin; deney gruplarındaki %50 ile %100'lik dozlar arasında karşılaştırma yapıldığında doz arttıkça azaldığı bulunmuştur.
- Gruplar arası karşılaştırma yapıldığında BMP-2 seviyesi en yüksek 7. günde %50'lik doza sahip Biodentine grubunda bulunmuştur.

- FGF-2 seviyeleri tüm deney grupları için minimal düzeyde ve benzer artış göstermiş olup, grup ve zaman etkileşimi birlikte değerlendirildiğinde anlamlı bir farklılık oluşturmadığı bulunmuştur.
- Toplam grup ortalamaları karşılaştırıldığında Biodentine ve NeoMTA grubu, kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak FGF-2 miktarını arttırmıştır.
- FGF-2 seviyeleri değerlendirildiğinde %50'lik dozda tüm gruplar için materyallerle etkileşim süresi arttıkça, FGF-2'nin arttığı bulunmuştur.
- FGF-2 seviyelerinin, deney gruplarındaki doz artışına bağlı olarak azaldığı bulunmuştur.
- Gruplar arası karşılaştırma yapıldığında FGF-2 seviyesi en yüksek 7. günde %50'lik doza sahip Biodentine grubunda bulunmuştur.
- VEGF seviyeleri 1. ve 3. günler için deney grupları için benzer olup, kontrol grubu ile de anlamlı bir farklılık oluşturmamıştır. Yalnızca 7. günde Biodentine grubu ile etkileşimde olan insan dental pulpa kök hücrelerinden salgılanan VEGF miktarı, kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak yüksek bulunmuştur.
- VEGF seviyeleri zamanla beraber artarken, doz ile ters orantıda bir ilişki göstermektedir.
- Gruplar arası karşılaştırma yapıldığında VEGF seviyesi, 7. günde %50'lik doza sahip Biodentine grubunda en yüksek olarak bulunmuştur.
- ALP aktivitesi değerlendirildiğinde, Biodentine belirlenen üç gün için kontrol grubuna kıyasla enzim aktivitesini arttırken, BioMTA ve NeoMTA yedinci gün kontrol grubuna kıyasla bu aktiviteyi arttırmıştır.
- Toplam grup ortalamaları karşılaştırıldığında tüm deney grupları ALP aktivitesini kontrol grubuna kıyasla arttırmıştır.
- ALP enzim aktivitesi doz arttıkça azalmış, süre uzadıkça artmıştır.
- En yüksek ALP enzim aktivitesi ortalaması yedinci gün için Biodentine ve daha sonra aynı gün için NeoMTA grubundan elde edilmiştir.
- Büyüme faktörleri seviyeleri ve ALP enzim aktivitesi en düşük olan deney grubu MTA CEM olarak bulunmuştur.

KAYNAKLAR

1. Accorinte ML, Holland R, Reis A, Bortoluzzi MC, Murata SS, Dezan E Jr, *et al.* Evaluation of mineral trioxide aggregate and calcium hydroxide cement as pulp-capping agents in human teeth. *J Endod* 2008; **34**: 1-6.
2. Agraftoti A, Giannakoulas DG, Filippatos CG, Kontakiotis EG. Analysis of clinical studies related to apexification techniques. *Eur J Paediatr Dent* 2017; **18**(4): 273-284.
3. Ajlan SA, Ashri NY, Aldahmash AM, Alnbaheen MS. Osteogenic differentiation of dental pulp stem cells under the influence of three different materials. *BMC Oral Health* 2015; **15**(1): 132-141.
4. Aldridge WN. The biochemical principles of toxicology. *Exp Toxicol* 1993; **5**: 56-78.
5. Ali MRW, Mustafa M, Bårdsen A, Bletsa A. Tricalcium silicate cements: osteogenic and angiogenic responses of human bone marrow stem cells. *Eur J Oral Sci* 2019; **127**(3): 261–268.
6. Allen AJ, Thomas JJ, Jennings HM. Composition and density of nanoscale calcium silicate hydrate in cement. *Dent Mater* 2007; **6**(4): 311-316.
7. American Association of Endodontists. Glossary of Endodontic Terms. 7th edition. Chicago, 2003.
8. Ames BN. The detection of chemical mutagens with enteric bacteria. *Chemical Mutagens*. Boston: Springer; 1971. pp. 267–282.
9. Ames BN, McCann J, Yamasaki E. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella*/mammalian microsome mutagenicity test. *Mutat Res* 1975; **31**: 347-364.
10. Anderson JM. Future challenges in the *in vitro* and *in vivo* evaluation of biomaterial biocompatibility. *Regen Biomater* 2016; **3**(2): 73–77.
11. Andreasen JO, Ravn JJ. Epidemiology of traumatic dental injuries to primary and permanent teeth in a Danish population sample. *Int J Oral Surg* 1972; **1**: 235–239.
12. Andreasen JO, Borum MK, Andreasen FM. Replantation of 400 avulsed permanent incisors. *Endod Dent Traumatol* 1992; **8**: 45-55.
13. Andreasen JO, Andreasen FM. Textbook and color atlas of traumatic injuries to the teeth. 3rd edition. Copenhagen, 1994.

14. Andreasen JO, Farik B, Munksgaard EC. Long term calcium hydroxide as a root canal dressing may increase risk of root fracture. *Dent Traumatol* 2002; **18**: 134-137.
15. Andreasen JO, Munksgaard EC, Bakland LK. Comparison of fracture resistance in root canals of immature sheep teeth after filling with calcium hydroxide or MTA. *Dent Traumatol* 2006; **22**: 154-156.
16. Araujo SD, Benko-Iseppon AM, Brasileiro-Vidal AC. Genotoxicity and mutagenicity assays for selection of chemical compounds with therapeutic potential: a short commentary. *Biochem Anal Biochem* 2015; **4**(4): 208-211.
17. Aristei, C, Stracci, F, Guerrieri P, Anselmo P, Armellini R, Ulli, A, Barberini F, Latini P, Menghini AR. Frequency of sister chromatid exchanges and micronuclei monitored over time in patients with early-stage breast cancer: results of an observational study. *Cancer Genet Cytogenet* 2009; **192**: 24-29.
18. Arnold WH, Naumova EA, Goulioumis V. Pulp Biology of Deciduous and Permanent Teeth. *Management of Dental Emergencies in Children and Adolescents*. Wiley & Sons Ltd. Publishing; 2019. pp. 13–22.
19. Asgary S, Parirokh M, Egbbal MJ, Brink F. Chemical differences between white and gray mineral trioxide aggregate. *J Endod* 2005; **31**: 101-103.
20. Asgary S, Nazarian H, Khojasteh A, Shokouhinejad N. Gene expression and cytokine release during odontogenic differentiation of human dental pulp stem cells induced by 2 endodontic biomaterials. *J Endod* 2014; **40**(3): 387–392.
21. Ball J. Apical root formation in a nonvital immature permanent incisor. *Brit Dent J* 1964; **116**: 166-167.
22. Bashutski JD, Wang HL. Periodontal and endodontic regeneration. *J Endod* 2009; **35**: 321-328.
23. Batouli S, Miura M, Brahim J, Tsutsui TW, Fisher LW, Gronthos S, et al. Comparison of stem-cell mediated osteogenesis and dentinogenesis. *J Dent Res* 2003; **82**: 976–981.
24. Beertsen W, McCulloch CA, Sodek J. The periodontal ligament: a unique, multifunctional connective tissue. *Periodontol 2000* 1997; **13**(1): 20-40.

25. Bergenholtz, G, Mjor IA, Cotton WR, Hanks CT, Kim S, Torneck CD, Trowbridge HO. The biology of dentin and pulp. Consensus report. *J Dent Res* 1985; **64**: 631–633.
26. Berkovitz BKB, Holland GR, Moxham BJ. *Oral Anatomy, Histology and Embryology*. Edinburgh: Mosby; 2009.
27. Bezgin T, Sönmez H. Apeksifikasyon Tedavisinde Güncel Yaklaşımlar. *Türkiye Klinikleri J Dental Sci* 2012; **18**(3): 304-311.
28. Bhaskar SN. Orban's oral histology and embryology. 11th edition. St. Louis: Mosby-Year Book; 1991.
29. Bin CV, Valera MC, Camargo SE, Rabelo SB, Silva GO, Balducci I, Camargo CH. Cytotoxicity and genotoxicity of root canal sealers based on mineral trioxide aggregate. *J Endod* 2012; **38**(4): 495-500.
30. *Biodentine Active Biosilicate Technology Scientific File*, Septodont, France; 2009.
31. Bjørndal L, Mjor IA. Dental caries--Characteristics of lesions and pulpal reactions. *Pulp-dentin biology in restorative dentistry*. Quintessence Int 2001; **32**(9): 717–736.
32. Bjørndal L. The caries process and its effect on the pulp: the science is changing and so is our understanding. *J Endod* 2008; **34**: 2–5.
33. Bolognesi, C, Filiberti R, Neri M, Perrone E, Landini E, Canessa PA, et al. High frequency of micronuclei in peripheral blood lymphocytes as index of susceptibility to pleural malignant mesothelioma. *Cancer Res* 2002; **62**: 5418–5419.
34. Bonassi S, El-Zein R, Barale R, Fenech M. Associations of micronucleus frequency with cancer risk. *Mutagenesis* 2010; **26**: 93-100.
35. Bonte E, Beslot A, Boukpepsi T, Lasfargues JJ. MTA versus Ca(OH)₂ in apexification of non-vital immature permanent teeth: A randomized clinical trial comparison. *Clin Oral Investig* 2015; **19**: 1381–1388.
36. Bortoluzzi EA, Niu L, Palani CD, El-Awady AR, Hammond BD, Pei D, Tay FR. Cytotoxicity and osteogenic potential of silicate calcium cements as potential protective materials for pulpal revascularization. *Dent Mater J* 2015; **31**(12): 1510–1522.
37. Bosshardt DD, Selvig KA. Dental cementum: the dynamic tissue covering of the root. *Periodontol 2000* 1997; **13**: 41-75.

38. Bosshardt, DD, Degen T, Lang NP. Sequence of protein expression of bone sialo protein and osteopontin at the developing interface between repair cementum and dentin in human deciduous teeth. *Cell Tissue Res* 2005; **320**: 399–407.
39. Bozeman TB, Lemon RR, Eleazer PD. Elemental analysis of crystal precipitate from gray and white MTA. *J Endod* 2006; **32**: 425–428.
40. Bragio S, Corsi M, Feriani A, Fontana S, Marocchio L, et al. Discovery Toxicology in lead Optimisation. İçinde Devis A, Ward SE. *The Handbook of Medicinal Chemistry: Principles and Practice*. Cambrigde: RSC Publishing; 2014. pp. 364-406.
41. Braz MG, Camargo EA, Salvadori DMF, Marques MEA, Ribeiro DA. Evaluation Of Genetic Damage in Human Peripheral Lymphocytes Exposed To Mineral Trioxide Aggregate and Portland Cements. *J Oral Rehabil* 2006; **33**(3): 234–239.
42. Camargo SEA, Camargo CHR, Hiller KA, Rode SM, Schweikl H, Schmalz G. Cytotoxicity and genotoxicity of pulp capping materials in two cell lines. *Int Endod J* 2009; **42**(3): 227–237.
43. Camilleri J. Characterization of hydration products of mineral trioxide aggregate. *Int Endod J* 2008; **41**: 408–417.
44. Camp JH, Fuks AB. Pediatric endodontics: endodontic treatment for the primary and young permanent dentition. In: Cohen S, Hargreaves KM, eds. *Pathways of the Pulp*. Chapter 22. 9th edition. St Louis: Mosby; 2006. pp. 822-881.
45. Camp JH. Diagnosis dilemmas in vital pulp therapy: Treatment for the toothache is changing, especially in young, immature teeth. *Pediatr Dent* 2008; **30**: 197-205.
46. Caron G, Azerad J, Faure MO, Machtou P, Yves B. Use of a new retrograde filling material (Biodentine) for endodontic surgery: two case reports. *Int J Oral Sci* 2014; **6**(4): 250–253.
47. Casagrande L, Demarco FF, Zhang Z, Araujo FB, Shi, S, Nör, JE. Dentin-derived BMP-2 and odontoblast differentiation. *J Dent Res* 2010; **89**(6): 603–608.
48. Cavallo D, Ursini CL, Rondinone B et al. Evaluation of a suitable DNA damage biomarker for human biomonitoring of exposed workers. *Environ Mol Mutagen* 2009; **50**(9): 781–790.
49. Chala S, Abouqal R, Rida S. Apexification of immature teeth with calcium hydroxide or mineral trioxide aggregate: systematic review and meta-analysis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2011; **112**: 36-42.

50. Chang SW, Lee SY, Ann HJ, Kum KY, Kim EC. Effects of calcium silicate endodontic cements on biocompatibility and mineralization-inducing potentials in human dental pulp cells. *J Endod* 2014; **40**(8): 1194–1200.
51. Chatakun P, Núñez-Toldrà R, Díaz López EJ et al. The effect of five proteins on stem cells used for osteoblast differentiation and proliferation: A current review of the literature. *Cell Mol Life Sci* 2014; **71**(1): 113–142.
52. Cheng TJ, Christiani DC, Xu X, Wain JC, Wiencke JK, Kelsey KT. Increased micronucleus frequency in lymphocytes from smokers with lung cancer. *Mutat Res* 1996; **349**: 43-50.
53. Choy WN. Genetic toxicology and cancer risk assessment. Marcel Dekker Inc New York 2001: 29-187.
54. Chu TMG, Liu SSY, Babler WJ. Chapter 11: Craniofacial biology, orthodontics, and implants. İçinde Burr DB, Allen MR, editors. *Basic and applied bone biology*. San Diego: Academic Press; 2014. pp. 225–242.
55. Chung CJ, Kim E, Song M, Park JW, Shin SJ. Effects of two fast-setting calcium-silicate cements on cell viability and angiogenic factor release in human pulp-derived cells. *Odontology* 2015; **104**(2): 143–151.
56. Cimino MC. Comparative overview of current international strategies and guidelines for genetic toxicology testing for regulatory purposes. *Environ Mol Mutagen* 2006; **47**(5): 362-390.
57. Conrad S, Künzel J, Löbrich M. Sister chromatid exchanges occur in G2-irradiated cells. *Cell Cycle* 2011; **10**: 222-228.
58. Consolaro A, Consolaro RB, Francischone LA. Cementum, Apical Morphology and Hypercementosis: A Probable Adaptive Response of the Periodontal Support Tissues and Potential Orthodontic Implications. *Dental Press J Orthod* 2012; **17**: 21–30.
59. Cooper PR, Takahashi Y, Graham LW, Simon S, Imazato S, Smith AJ. Inflammation-regeneration interplay in the dentine-pulp complex. *J Dent* 2010; **38**(9): 687–697.
60. Corcoran JF, Sieraski SM, Ellison RL. Osseous healing kinetics after apicoectomy in monkeys. II. A quantitative histologic appraisal. *J Endod* 1985; **11**: 269-274.

61. da Silva, Glenda N. et al. Genotoxicity in primary human peripheral lymphocytes after exposure to regular and white mineral trioxide aggregate. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006; **102**(5): 50-54.
62. Damle SG, Bhattal H, Loomba A. Apexification of anterior teeth: A comparative evaluation of mineral trioxide aggregate and calcium hydroxide paste. *J Clin Pediatr Dent* 2012; **36**: 263–268.
63. Das S. Apexification in a nonvital tooth by control of infection. *J Am Dent Assoc* 1980; **100**: 880-881.
64. Dawson DW, Bury HP. The significance of Howell–Jolly bodies and giant metamyelocytes in marrow smears. *J Clin Pathol* 1961; **14**: 374–380.
65. De Jong T, Bakker AD, Everts V, Smit TH. The intricate anatomy of the periodontal ligament and its development: Lessons for periodontal regeneration. *J Periodontal Res* 2017; **52**(6): 965–974.
66. Decordier I, Papine A, Vande Loock K, Plas G, Soussaline F, Kirsch-Volders M. Automated image analysis of MN by IMSTAR for biomonitoring. *Mutagenesis* 2010; **26**(1): 163-168.
67. Demarco FF, Casagrande L, Zhang Z, Dong Z, Tarquinio SB, Zeitlin BD, et al. Effects of morphogen and scaffold porogen on the differentiation of dental pulp stem cells. *J Endod* 2010; **36**: 1805–1811.
68. Demarco FF, Conde MCM, Cavalcanti BN, Casagrande L, Sakai VT, Nör JE. Dental pulp tissue engineering. *Braz Dent J* 2011; **22**(1): 3–13.
69. Demirel S, Zamani A. MN tekniği ve kullanım alanları. *Genel Tıp Dergisi* 2002; **12**(3): 123-127.
70. Diekwisch TG. The developmental biology of cementum. *Int J Dev Biol* 2001; **45**: 695-706.
71. Dikilitaş M, Koçyiğit A. Canlılarda ‘tek hücre jel elektroforez yöntemi’ ile DNA hasar analizi: comet analiz yöntemi. *HR. Ü.Z.F. Dergisi* 2010; **14**(2): 77-89.
72. Dinçer Y, Kankaya S. DNA hasarının belirlenmesinde Comet assay. *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 2010; **30**(4): 1365-1373.
73. Ding SJ, Kao CT, Chen CL, Shie MY, Huang TH. Evaluation of human osteosarcoma cell line genotoxicity effects of mineral trioxide aggregate and calcium silicate cements. *J Endod* 2010; **36**(7): 1158–1162.

74. Dominguez MS, Witherspoon DE, Gutmann JL, Opperman LA. Histological and scanning electron microscopy assessment of various vital pulp-therapy materials. *J Endod* 2003; **29**: 324-333.
75. Duffaud F, Orsiere T, Villani P, Pelissier AL, Volot F, Favre R et al. Comparison between micronucleated lymphocytes rates observed in healthy subject and cancer patients. *Mutagenesis* 1997; **12**: 227-231.
76. Duggal M, Tong HJ, Al-Ansary M, Twati W, Day PF. Interventions for the endodontic management of non-vital traumatised immature permanent anterior teeth in children and adolescents: a systematic review of the evidence and guidelines of the Europeans Academy of Paediatric Dentistry. *Eur Arch Paediatr Dent* 2017; **18**: 139-151.
77. Ebrahim J, Mohammad RS, Neda A. Histopathologic responses of dog's dental pulp to mineral trioxide aggregate, bio active glass, formocresol, hydroxyapatite. *Dent Res J* 2007; **4**: 83-87.
78. Elhajouji A, Cammerer Z, Lukamowicz M, Kirsch-Volders M. Potential thresholds for genotoxic effects by MN scoring. *Mutagenesis* 2010; **26**: 199-204.
79. Enkel B, Dupas C, Armengol V, Apke Adou J, Bosco J, Daculsi G, Jean A, Laboux O, LeGeros RZ, Weiss P. Bioactive materials in endodontics. *Expert Rev Med Devices* 2008; **5**: 475-494.
80. Estrela C, Sydney GB, Bammann LL, Felipe O Jr. Mechanism of action of calcium and hydroxyl ions of calcium hydroxide on tissue and bacteria. *Braz Dent J* 1995; **6**: 85-90.
81. Estrela C, Bammann LL. Medicac. İçinde Estrela C, Figueiredo JAP (Eds). *Endodontia – principios biológicos e mecánicos*. Sao Paulo: Artes Medicas; 1999. pp. 722-731.
82. Estrela C, Holland R. Calcium hydroxide. İçinde Estrela C (Eds). *Endodontic science*. Sao Paulo: Artes Medicas; 2009. pp. 744-821.
83. Evans HJ. Cytological Methods for Detecting Chemical Mutagens. İçinde Hollaender A (Eds). *Chemical Mutagens, Principles and Methods for their Detection*. Boston: Springer; 1976. pp. 1-29.
84. Evans HJ. Human peripheral blood lymphocytes for the analysis of chromosome aberrations in mutagen tests. İçinde Kilbey BJ, Legator M, Nichols W, Ramel C

- (Eds). *Handbook of Mutagenicity Test Procedures*. Amsterdam: Elsevier Science; 1984. pp. 405–427.
85. Faraco IM Jr, Holland R. Response of the pulp of dogs to capping with mineral trioxide aggregate or a calcium hydroxide cement. *Dent Traumatol* 2001; **17**: 163–166.
 86. Farhad A, Mohammadi Z. Calcium hydroxide: a review. *Int Dent J* 2005; **55**: 293–301.
 87. Fenech M, Morley AA. Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutat Res* 1985; **147**: 29–36.
 88. Fenech M, Morley AA. Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of in-vivo ageing and low dose X-irradiation. *Mutat Res* 1986; **161**: 193–198.
 89. Fenech M. The *in vitro* micronucleus technique. *Mutat Res* 2000; **455**: 81–95.
 90. Fenech M, Chang WP, Kirsch-Volders M, Holland N, Bonassi S, Zeiger E. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutat Res-Gen Tox En* 2003; **534**(1-2): 65–75.
 91. Fenech M, Kirsch-Volders M, Natarajan AT, Surralles J, Crott JW, Parry J, et al. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis* 2011; **26**: 125–132.
 92. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003; **9**(6): 669–676.
 93. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev* 2004; **25**(4): 581–611.
 94. Finucane D, Kinirons MJ. Non-vital immature permanent incisors: factors that may influence treatment outcome. *Dent Traumatol* 1999; **15**: 273–277.
 95. Fleischmannova J, Matalova E, Sharpe PT, Misek I, Radlanski RJ. Formation of the tooth-bone interface. *J Dent Res* 2010; **89**: 108–115.
 96. Food and Drug Administration. HHS International Conference on Harmonisation; guidance on S2(R1) Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals intended for Human Use; availability. *Fed Regist* 2012; **77**: 33748–33749.

97. Ford CE, Hamerton JLA. Colchicine, hypotonic citrate, squash sequence for mammalian chromosomes. *Stain Technol* 1956; **3**: 247–251.
98. Frank AL. Therapy for the divergent pulpless tooth by continued apical formation. *J Am Dent Assoc* 1966; **72**(1): 87-93.
99. Freshney RI. Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique. ed 5. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons; 2005. pp. 1-216.
100. Friedlander LT, Cullinan MP, Love RM. Dental stem cells and their potential role in apexogenesis and apexification. *Int Endod J* 2009; **42**: 955–962.
101. Fuji Y, Kawase-Koga Y, Hojo H, Yano F, Sato M, Chung U, Ohba S, Chikazu D. Bone regeneration by human dental pulp stem cells using a helioxanthin derivative and cell-sheet technology. *Stem Cell Res Ther* 2018; **9**(24): 1-12.
102. Fuks AB, Heling I. Pulp therapy in young permanent teeth. İçinde Pinkham JR, Casamassimo PS, McTigue DJ, Fields HW, AJ Nowak AJ (Eds). Translator ed: Tortop T, Tulunoğlu Ö. *Çocuk Diş Hekimliği Bebeklikten Ergenliğe*. Ankara: Atlas Publishing; 2009. p.57
103. Gad SC, Spainhour CB, Gad SE. Carcinogenicity and Genotoxicity. İçinde Mohamed AD (Ed). *Mammalian Toxicology*. USA: Wiley& Sons; 2015. pp. 1-720.
104. Gaitonde P, Bishop K. Apexification with mineral trioxide aggregate: an overview of the material and technique. *Eur J Prosthodont Restor Dent* 2007; **15**(1): 41-45.
105. Gerstenfeld LC, Cullinane DM, Barnes GL, et al. Fracture healing as a post-natal developmental process: molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. *J Cell Biochem* 2003; **88**: 873–884.
106. Ghasemi N, Rahimi S, Lotfi M, Solaimanirad J, Shahi SH, Shafaie H, Salem Milani A, Shakuie S, Zand V, Abdolrahimi M. Effect of Mineral Trioxide Aggregate, Calcium Enriched Mixture and Mineral Trioxide Aggregate with Disodium Hydrogen Phosphate on BMP-2 Production. *Iran Endod J* 2014; **9**(3): 220-224.
107. Ghose LJ, Bagdady VS, Hikmat BYM. Apexification of immature apices of pulpless permanent anterior teeth with calcium hydroxide. *J Endod* 1987; **9**: 257-260.
108. Gibson DP, Brauninger R, Shaffi HS, Kerckaert GA, LeBoeuf RA, Isfort RJ, Aardema MJ. Induction of micronuclei in Syrian hamster embryo cells:

- comparison to results in the SHE cell transformation assay for National Toxicology Program test chemicals. *Mutat Res* 1997; **392**: 61-70.
109. Giraud T, Jeanneau C, Bergmann M, Laurent P, About I. Tricalcium silicate capping materials modulate pulp healing and inflammatory activity in vitro. *J Endod* 2018; **44**(11): 1686–1691.
 110. Golub EE, Boesze-Battaglia K. The role of alkaline phosphatase in mineralization. *Curr Opin Orthop* 2007; **18**(5): 444–448.
 111. Granath LE. Some notes on the treatment of traumatized incisors in children. *Odontol Rev* 1959; **10**: 272-286.
 112. Graves DT, Cochran DL. Periodontal regeneration with polypeptide growth factors. *Curr Opin Periodontol* 1994; **1**: 178-186.
 113. Grech L, Mallia B, Camilleri J. Investigation of the physical properties of tricalcium silicate cement-based root-end filling materials. *Dent Mater* 2013; **29**(2): 20-28.
 114. Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci* 2000; **97**(25): 13625–13630.
 115. Gronthos S, Brahimi J, Li W, Fisher L, Cherman N, Boyde A. et al. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res* 2002; **81**(8): 531–535.
 116. Guerrero F, Mendoza A, Ribas D, Aspiazú K. Apexification: A systematic review. *J Conserv Dent* 2018; **21**(5): 462-465.
 117. Guler E, Orta T, Gunebakan S, Utkusavas A, Kolusayin Ozar MO. Can micronucleus technique predict the risk of lung cancer in smokers? *Tuberk Toraks* 2005; **53**: 225-230.
 118. Guven G, Cehreli ZC, Ural A, Serdar MA, Basak F. Effect of mineral trioxide aggregate cements on transforming growth factor beta 1 and bone morphogenetic protein production by human fibroblasts in vitro. *J Endod* 2007; **33**: 447–450.
 119. Ha WN, Duckmanton P, Kahler B, Walsh LJ. A survey of various endodontic procedures related to mineral trioxide aggregate usage by members of the Australian Society of Endodontology. *Aust Endod J* 2016; **42**: 132–138.
 120. Ha WN, Kahler B, Walsh LJ. Dental material choices for pulp therapy in paediatric dentistry. *Eur Endod J* 2017; **2**: 1–7.

121. Ha WN, Nicholson T, Kahler B, Walsh LJ. Mineral Trioxide Aggregate-a review of properties and testing methodologies. *Materials* 2017; **10**(11): 1261.
122. Ham JW, Patterson SS, Mitchell DF. Induced apical closure of immature pulpless teeth in monkeys. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1972; **33**: 438-449.
123. Han L, Okiji T. Bioactivity evaluation of three calcium silicate based endodontic materials. *Int Endod J* 2013; **46**(9): 804-814.
124. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; **100**(1): 57–70.
125. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; **144**(5): 646–674.
126. Harrison JW, Jurosky KA. Wound healing in the tissues of the periodontium following periradicular surgery. III. The osseous excisional wound. *J Endod* 1992; **18**: 76-81.
127. Hauman CHJ, Love RM. Biocompatibility of dental materials used in contemporary endodontic therapy: a review. Part 1. Intracanal drugs and substances. *Int Endod J* 2003; **36**: 75-85.
128. Heddle JA, Hite M, Kirkhart B, Mavournin K, MacGregor JT, Newell GW, et al. The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat Res* 1983; **123**: 61–118.
129. Heikinheimo M, Lawshe A, Shackleford GM, Wilson DB, MacArthur CA. Fgf-8 expression in the post-gastrulation mouse suggests roles in the development of the face, limbs and central nervous system. *Mech Dev* 1994; **48**: 129–138.
130. Heling I, Gorfil C, Slutzky H, Kopolovic K, Zalkind M, Slutzky-Goldberg I. Endodontic failure caused by inadequate restorative procedures: review and treatment recommendations. *J Prosthet Dent* 2002; **87**: 674-678.
131. Hermann BW. Calcium hydroxid als Mittelzurn, Behandeln und Fullen von Wurzelkanalen. PhD Thesis. Wurzburg. 1920.
132. Hernandez LG, van Steeg H, Luijten M, van Benthem J. Mechanisms of non-genotoxic carcinogens and importance of a weight of evidence approach. *Mutat Res* 2009; **682**(2-3): 94–109.
133. Hildebolt CF, Zerbolio DJ, Shrout MK, Ritzi S, Gravier MJ. Radiometric classification of alveolar bone health. *J Dent Res* 1992; **71**(9): 1594–1597.

- 134.Hoeben A, Landuyt B, Highley MS, Wildiers H, Van Oosterom AT, De Bruijn EA. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. *Pharmacol Rev* 2004; **56**: 549-580.
- 135.Hogstedt B. Micronuclei in lymphocytes with preserved cytoplasm, a method for assessment of cytogenetic damage in man. *Mutat Res* 1984; **130**: 63-72.
- 136.Hohmann A, Kober C, Young P, Dorow C, Geiger M, Boryor A. et al. Influence of different modelling strategies for the periodontal ligament on finite element simulation results. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2011; **139**(6): 775–783.
- 137.Holtrop ME, King GJ. The ultrastructure of the osteoclast and its functional implications. *Clin Orthop Relat Res* 1977; **123**: 177-196.
- 138.Huang GT, Gronthos S, Shi S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *J Dent Res* 2009; **88**: 792–806.
- 139.Huang X, Bringas P, Slavkin HC, Chai Y. Fate of HERS during tooth root development. *Dev Biol* 2009; **334**(1): 22-30.
- 140.Huang XF, Chai Y. Molecular regulatory mechanism of tooth root development. *Int J Oral Sci* 2012; **4**: 177-181.
- 141.Iarmarcovai G, Ceppi M, Botta A, Orsiere T, Bonassi S. Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes of cancer patients: a meta-analysis. *Mutat Res* 2008; **659**: 274–283.
- 142.International Organization for Standardization. Dentistry- Preclinical evaluation of biocompatibility of medical devices used in dentistry. Test methods for dental materials. ISO 7405: 1996.
- 143.International Organization for Standardization. Dentistry- Biological evaluation of medical devices. Tests for in vitro cytotoxicity. ISO 10993-5: 2009.
- 144.Ishidate M Jr, Sofuni T. The *In Vitro* Chromosomal Aberration Test Using Chinese Hamster Lung (CHL) Fibroblast Cells in Culture. *Mutat Res* 1985; **5**: 427-432.
- 145.Ishidate M Jr, Miura KF, Sofuni T. Chromosome aberration assays in genetic toxicology testing in vitro. *Mutat Res-Fund Mol M* 1998; **404**(1-2): 167-172.
- 146.Islam I, Chang HK, Yap AU. Comparison of the physical and mechanical properties of MTA and portland cement. *J Endod* 2006; **32**(3): 193-197.

- 147.Jain PRM. The rise of bioceramics in endodontics: A review. *Int. J Pharm Biol Sci* 2015; **6**: 416–422.
- 148.Jeong Y, Yang W, Ko H, Kim M. The effects of bone morphogenetic protein-2 and enamel matrix derivative on the bioactivity of mineral trioxide aggregate in MC3T3-E1 cells. *Restor Dent Endod* 2014; **39**(3): 187-194.
- 149.Jernvall, J. Mammalian molar cusp patterns: developmental mechanisms of diversity. *Acta Zool Fenn* 1995; **198**: 1–61.
- 150.Jones SJ. Cement. İçinde Osborn JW (Ed). *Dental anatomy and embryology*. Oxford: Blackwell; 1981. pp. 193-205.
- 151.Kagayama M, Sasano Y, Tsuchiya M, Watanabe M, Mizoguchi I, Kamakura S, Motegi K. Confocal microscopy of Tomes' granular layer in dog premolar teeth. *Anat Embryol (Berl)* 2000; **201**(2): 131–137.
- 152.Karaman A, Binici DN, Kabalar ME, Calikusu Z. Micronucleus analysis in patients with colorectal adenocarcinoma and colorectal polyps. *World J Gastroenterol* 2008; **14**: 6835–6839.
- 153.Kaur M, Singh H, Dhillon JS, Batra M, Saini M. MTA versus Biodentine: Review of Literature with a Comparative Analysis. *J Clin Diagn Res* 2017; **11**(8): 1-5.
- 154.Kettering JD, Torabinejad M. Investigation of mutagenicity of mineral trioxide aggregate and other commonly used root-end filling materials. *J Endod* 1995; **21**: 537-542.
- 155.Kettunen P, Thesleff I. Expression and function of FGF-4, -8 and -9 suggest functional redundancy and repetitive use as epithelial signals during tooth morphogenesis. *Dev Dyn* 1998; **211**(3): 256-268.
- 156.Kim JY, Xin X, Moili EK, Chung J, Lee CH, Chen M, et al. Regeneration of dental-pulp-like tissue by chemotaxis-induced cell homing. *Tissue Eng Part A* 2010; **16**(10): 3023-3031.
- 157.Kim M, Yang W, Kim H, Ko H, Comparison of the biological properties of ProRoot MTA, OrthoMTA, and endocem MTA cements. *J Endod* 2014; **40**: 1649-1653.
- 158.Kirsch-Volders, M. Towards a validation of the micronuclei test. *Mutat Res* 1994; **392**: 1-4.
- 159.Kirsch-Volders M, Elhajouji A, Cundari E, Van Hummelen P. The *in vitro* micronucleus test: a multi-endpoint assay to detect simultaneously mitotic delay,

- apoptosis, chromosome breakage, chromosome loss and non-disjunction. *Mutat Res* 1997; **392**(1-2): 19-30.
160. Kirsch-Volders M, Sofuni T, Aardemac M, Albertini S, Eastmond D, Fenech M et al. Report from the *in vitro* micronucleus assay working group. *Mutat Res* 2003; **540**: 153-163.
161. Kirsch-Volders M, Decordier I, Elhajouji A, Plas G, Aardema MJ, Fenech M. *In vitro* genotoxicity testing using the micronucleus assay in cell lines, human lymphocytes and 3D human skin models, *Mutagenesis* 2011; **26**(1): 177–184.
162. Kishen A, Vedantam S. Hydromechanics in dentine: role of dentinal tubules and hydrostatic pressure on mechanical stress-strain distribution. *Dent Mater* 2007; **23**: 1296–1306.
163. Klagsbrun M, D'Amore PA. Vascular endothelial growth factor and its receptors. *Cytokine Growth F R* 1996; **7**(3): 259-270.
164. Kleier DJ, Barr ES. A study of endodontically apexified teeth. *Dent Traumatol* 1991; **7**: 112-117.
165. Ko H, Jeong Y, Kim M. Cytotoxicities and genotoxicities of cements based on calcium silicate and of dental formocresol. *Mutat Res-Gen Tox En* 2017; **815**: 28–34.
166. Koh ET, Ford TR, Kariyawasam SP, Chen NN, Torabinejad M. Prophylactic treatment of dens evaginatus using mineral trioxide aggregate. *J Endod* 2001; **27**: 540-542.
167. Kontakiotis EG, Filippatos CG, Agrafioti A. Levels of evidence for the outcome of regenerative endodontic therapy. *J Endod* 2014; **40**: 1045-1053.
168. Kramer IR. The vascular architecture of the human dental pulp. *Arch Oral Biol* 1960; **2**: 177–189.
169. Kulterer B, Friedl G, Jandrositz A, Sanchez-Cabo F, Prokesch A, Paar C, Scheideler M, Windhager R, Preisegger KH, Trajanoski Z. Gene expression profiling of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow during expansion and osteoblast differentiation. *BMC Genom* 2007; **8**: 70-84.
170. Laurent P, Camps J, About I. Biodentine™ induces TGF- β 1 release from human pulp cells and early dental pulp mineralization. *Int Endod J* 2012; **45**(5): 439-448.

171. Lawley GR, Schindler WG, Walker WA 3rd, Kolodrubetz D. Evaluation of ultrasonically placed MTA and fracture resistance with Intracanal composite resin in a model of apexification. *J Endod* 2004; **30**: 167-172.
172. Lekic P, McCulloch C. Periodontal ligament cell population: the central role of fibroblasts in creating a unique tissue. *Anat Rec* 1996; **245**: 327-341.
173. Li J, Feng J, Liu Y, Ho TV, Grimes W, Ho HA, Park S, Wang S, Chai Y. BMP-SHH signaling network controls epithelial stem cell fate via regulation of its niche in developing tooth. *Dev Cell* 2015; **33**: 125-135.
174. Li J, Parada C, Chai Y. Cellular and molecular mechanisms of tooth root development. *Development* 2017; **144**(3): 374-384.
175. Li W, Zhou J, Xu Y. Study of the *in vitro* cytotoxicity testing of medical devices (Review). *Biomed Rep* 2015; **3**(5): 617-620.
176. Lieberman J, Trowbridge H. Apical closure of nonvital permanent incisor teeth where no treatment was performed: Case report. *J Endod* 1983; **9**(6): 257-260.
177. Lin JC, Lu JX, Zeng Q, Zhao W, Li WQ, Ling JQ. Comparison of mineral trioxide aggregate and calcium hydroxide for apexification of immature permanent teeth: A systematic review and meta-analysis. *J Formos Med Assoc* 2016; **115**: 523–530.
178. Linde A. The extracellular matrix of the dental pulp and dentin. *J Dental Res* 1985; **64**(Spec. No.): 523-529.
179. Linde A, Goldberg M. Dentinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med* 1993; **4**: 679-728.
180. Lindhe J, Thorkild K, Bosshardt DD, Araújo M. The anatomy of periodontal tissues. İçinde Lindhe J (Ed). *Clinical Periodontology and Implant Dentistry*. Oxford: Blackwell Publishing Ltd; 2003. pp. 40-41.
181. Lohi M, Tucker AS, Sharpe PT. Expression of Axin 2 indicates a role of for canonical Wnt signaling in development of the crown and root during pre and postnatal tooth development. *Dev Dyn* 2010; **239**: 160-167.
182. Loison-Robert LS, Tassin M, Bonte E, Berbar T, Isaac J, Berdal A, Simon S, Fournier BPJ. In vitro effects of two silicate-based materials, Biodentine and BioRoot RCS, on dental pulp stem cells in models of reactionary and reparative dentinogenesis. *PLoS One* 2018; **13**(1): 1-29.
183. Lu Y, Liu Y, Yang C. Evaluating *In Vitro* DNA Damage Using Comet Assay. *J Vis Exp* 2017; **128**: 1-6.

- 184.Lumsden AG. Spatial organization of the epithelium and the role of neural crest cells in the initiation of the mammalian tooth germ. *Dev Suppl* 1988; **103**: 155-169.
- 185.Luo Z, Li D, Kohli MR, Yu Q, Kim S, He WX. Effect of Biodentine on the proliferation, migration and adhesion of human dental pulp stem cells. *J Dent* 2014; **42**(4): 490-497.
- 186.Luzhna L, Kathiria P, Kovalchuk O. Micronuclei in genotoxicity assessment: from genetics to epigenetics and beyond. *Front Genet* 2013; **4**: 1-17.
- 187.Mackie IC, Bentley EM, Worthington HV. The closure of open apices in non-vital immature incisor teeth. *Br Dent J* 1988; **165**: 169-173.
- 188.Macwan C, Deshpande A. Mineral trioxide aggregate (MTA) in dentistry: A review of literature. *J Oral Res Rev* 2014; **6**: 71-74.
- 189.Madan AK, Kramer B. Immunolocalization of fibroblast growth factor-2 (FGF-2) in the developing root and supporting structures of the murine tooth. *J Mol Histol* 2005; **36**: 171-178.
- 190.Madeddu P. Therapeutic angiogenesis and vasculogenesis for tissue regeneration. *Exp Physiol* 2005; **90**: 315-326.
- 191.Mahajan N, Chawla R. Continued root-end growth and apexification using a calcium hydroxide and iodoform paste. *J Dent Herald* 2014; **4**(1): 33-35.
- 192.Malkondou O, Kazandag Karapinar M, Kazazoglu E. A Review on Biodentine, a Contemporary Dentine Replacement and Repair Material. *BioMed Res Int* 2014; 1-10.
- 193.Maron DM, Ames BN. Revised methods for the mutagenicity test. *Mutat Res* 1983; **113**: 173-215.
- 194.Martin I, Padera RF, Vunjak-Novakovic G, Freed LE. In vitro differentiation of chick embryo bone marrow stromal cells into cartilaginous and bone-like tissues. *J Orthop Res* 1998; **16**: 181-189.
- 195.Matsushima T, Hayashi M, Matsuoka A, Ishidate M Jr., Miura KF, Shimizu H, Suzuki Y, Morimoto K, Ogura H, Mure K, Koshi K, Sofuni T. Validation study of the in vitro micronucleus test in a Chinese hamster lung cell line (CHL/IU). *Mutagenesis* 1999; **14**: 569-580.
- 196.Matsushita K, Motani R, Sakuta T, Yamaguchi N, Koga T, Matsuo K, et al. The role of vascular endothelial growth factor in human dental pulp cells: induction of

- chemotaxis, proliferation, and differentiation and activation of the AP-1-dependent signaling pathway. *J Dent Res* 2000; **79**(8): 1596-1603.
197. Matt GD, Thorpe JR, Strother JM, McClanahan SB. Comparative study of white and grey mineral trioxide aggregate (MTA) simulating a one or two step apical barrier technique. *J Endod* 2004; **30**: 876-879.
198. McClintock B. The production of homozygous deficient tissues with mutant characteristics by means of the aberrant mitotic behaviour of ring-shaped chromosomes. *Genetics* 1938; **23**: 315-376.
199. McCormick JE, Weine FS, Maggio JD. Tissue pH of developing periapical lesions in dogs. *J Endod* 1983; **9**: 47-51.
200. Melcher AH. On the repair potential of periodontal tissues. *J Periodontol* 1976; **47**: 256-260.
201. Meshack RA, Velkrishna K, Chakravarthy P, Nerali J. Overview of root ending filling materials. *Int J Clin Dent Sci* 2012; **3**: 63-69.
202. Min KS, Lee YM, Hong SO, Kim EC. Simvastatin promotes odontoblastic differentiation and expression of angiogenic factors via heme oxygenase-1 in primary cultured human dental pulp cells. *J Endod* 2010; **36**(3): 447-452.
203. Mina M, Kollar EJ. The induction of odontogenesis in non-dental mesenchyme combined with early murine mandibular arch epithelium. *Arch Oral Biol* 1987; **32**(2): 123-127.
204. Miraoui H, Marie PJ. Fibroblast growth factor receptor signaling crosstalk in skeletogenesis. *Sci Signal* 2010; **3**(146): 1-5.
205. Mitchell DF, Shankwalker GB. Osteogenic potential of calcium hydroxide and other materials in soft tissue and bone wounds. *J Dent Res* 1958; **37**: 1157-1163.
206. Mitelman F. Recurrent chromosome aberrations in cancer. *Mutat Res* 2000; **462**: 247-253.
207. Mitsiadis TA, Graf D. Cell fate determination during tooth development and regeneration. *Birth Defects Res C Embryo Today* 2009; **87**: 199-211.
208. Mjör IA, Smith MR, Ferrari M, Mannocci F. The structure of dentine in the apical region of human teeth. *Int Endod J* 2001; **34**: 346-353.
209. Mjör IA. Dentin permeability: the basis for understanding pulp reactions and adhesive technology. *Braz Dent J* 2009; **20**: 3-16.

210. Mladenovic Z, Johansson A, Willman B, Shahabi K, Bjorn E, Ransjo M. Soluble silica inhibits osteoclast formation and bone resorption in vitro. *Acta Biomater* 2014; **10**: 406-418.
211. Mohammadi Z, Dummer PMH. Properties and applications of calcium hydroxide in endodontics and dental traumatology. *Int Endod J* 2011; **44**: 697-730.
212. Morse DR, Larnie J, Yesilsoy C. Apexification: review of the literature, *Quintessence Int* 1990; **21**(7): 589-598.
213. Mortelmans K, Zeiger E. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. *Mutat Res* 2000; **455**: 29-60.
214. Murray PE, García-Godoy C, García-Godoy F. How is the biocompatibility of dental biomaterials evaluated? *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2007; **12**: 258-266.
215. Müller L, Kikuchi Y, Probst G, Schechtman L, Shimada H, Sofuni T, Tweats D. ICH-harmonised guidances on genotoxicity testing of pharmaceuticals: evolution, reasoning and impact. *Mutat Res* 1999; **436**(3):195–225.
216. Nabeshima CK, Valdivia JE, Caballero-Flores H, Arana-Chavez VE, Machado MEL. Immunohistological study of the effect of vascular Endothelial Growth Factor on the angiogenesis of mature root canals in rat molars. *J Appl Oral Sci* 2018; **26**: 1-7.
217. Naghavi N, Ghoddusi J, Sadeghnia HR, Asadpour E, Asgary S. Genotoxicity and cytotoxicity of mineral trioxide aggregate and calcium enriched mixture cements on L929 mouse fibroblast cells. *Dent Mater J* 2014; **33**(1): 64-69.
218. Nakashima M, Akamine A. The application of tissue engineering to regeneration of pulp and dentin in endodontics. *J Endod* 2005; **31**: 711–718.
219. Nakanishi Y, Izumi K, Yoshizawa M, Saito C, Kawano Y, Maeda T. The expression and production of vascular endothelial growth factor in oral mucosa equivalents. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2007; **36**: 928-933.
220. Nakanishi Y, Schneider EL. In vivo sister-chromatid exchange: a sensitive measure of DNA damage. *Mutat Res-Fund Mol M* 1979; **60**(3): 329–337.
221. Nanci A, Bosshardt DD. Structure of periodontal tissues in health and disease. *Periodontol* 2000 2006; **40**: 11-28.
222. Nanci A. Dentin-pulp complex. İçinde Nanci A. *Ten Cate's Oral Histology*. 7th edn. Mosby Elsevier; 2008. pp. 191-238.

223. Nandini S, Ballal S, Kandaswamy D. Influence of glass ionomer cement on the interface and setting reaction of mineral trioxide aggregate when used as a furcal repair material using laser Raman spectroscopic analysis. *J Endod* 2007; **33**: 167-172.
224. National Research Council. Genotoxicity and Carcinogenicity. Fluoride in Drinking Water: A Scientific Review of EPA's Standarts. Washington: The National Academic Press; 2006.
225. Nayar S, Bishop K, Alani A. A report on the clinical and radiographic outcomes of 38 cases of apexification with mineral trioxide aggregate. *Eur J Prosthodont Restor Dent* 2009; **17**: 150-156.
226. Neubauer M, Fischbach C, Bauer-Kreisel P, Lieb E, Hacker M, Tessmar J, Schulz MB, Goepferich A, Blunk T. Basic fibroblast growth factor enhances PPARgamma ligand-induced adipogenesis of mesenchymal stem cells. *FEBS Lett* 2004; **577**(1-2): 277-283.
227. Nicoloso GF, Pötter IG, Rocha RO, Montagner F, Casagrande L. A comparative evaluation of endodontic treatments for immature necrotic permanent teeth based on clinical and radiographic outcomes: a systematic review and meta-analysis. *Int J Paediatr Dent* 2017; **27**(3): 217-227.
228. Nor JE. Tooth regeneration in operative dentistry. *Oper Dent* 2006; **31**: 633–642.
229. Nowwarote N, Sukarawan W, Pavasant P, Osathanon T. Basic fibroblast growth factor regulates REX1 expression via IL-6 in stem cells isolated from human exfoliated deciduous teeth. *J Cell Biochem* 2017; **118**: 1480–1488.
230. Ogata H, Hayashi M, Tsuda H, Suzuki N, Maeno M, Sugawara A, Ogiso B. Effects of a calcium phosphate cement on mineralized nodule formation compared with endodontic cements. *Dent Mater J* 2012; **31**: 92–97.
231. Oka S, Oka K, Xu X, Sasaki T, Birngas P Jr, Chai Y. Cell autonomous requirement for TGF-beta signaling during odontoblast differentiation and dentin matrix formation. *Mech Dev* 2007; **124**(6): 409-415.
232. Olcay K, Taşlı PN, Guven EP, Ülker GMY, Ögüt EE, Çiftçioğlu E, Kiratli B, Şahin F. Effet of a novel bioceramic root canal sealer on the angiogenesis-enhancing potential of assorted human odontogenic stem cells compared with principal tricalcium silicate-based cements. *J Appl Oral Sci* 2020; **28**:1-9.
233. Orban BJ. Orban's Oral Histology and embryology. St. Louis: Mosby; 1980.

234. Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD). In vitro Mammalian Chromosome Aberration Test. Test No: 473. OECD Publishing, Paris, 1997.
235. Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD). In Vitro Mammalian Micronucleus Test. Test No: 487. OECD Publishing, Paris, 2004.
236. Osathanon T, Nowwarote N, Pavasant P. Basic fibroblast growth factor inhibits mineralization but induces neuronal differentiation by human dental pulp stem cells through a FGFR and PLCgamma signaling pathway. *J Cell Biochem* 2011; **112**: 1807-1816.
237. Ostling O, Johanson KJ. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1984; **123**(1): 291-298.
238. O'Brien WJ. Dental Materials and their Selection. Quintessence Publishing; 2008.
239. O'Sullivan SM, Hartwell GR. Obturation of a retained primary mandibular second molar using mineral trioxide aggregate: A case report. *J Endod* 2001; **27**: 703-705.
240. Ozbay G, Kitiki B, Peker S, Kargul B. Apical sealing ability of a novel material: analysis by fluid filtration technique. *Acta Stomatol Croat* 2014; **48**(2): 132–139.
241. Önay EO, Yurtcu E, Terzi YK, Üngör M, Oguz Y, Şahin FI. Odontogenic effects of two calcium silicate-based biomaterials in human dental pulp cells. *Adv Clin Exp Med* 2018; **27**(11): 1541–1547.
242. Palmer RM, Lumsden AG. Development of periodontal ligament and alveolar bone in homografted recombination's of enamel organs and papillary, pulpal, and follicular mesenchyme in the Mouse. *Arch Oral Biol* 1987; **32**(4): 281-289.
243. Paranjpe A, Smoot T, Zhang H, Johnson JD. Direct contact with mineral trioxide aggregate activates and differentiates human dental pulp cells. *J Endod* 2011; **37**(12): 1691–1695.
244. Parirokh M, Torabinejad M, Dummer PMH. Mineral trioxide aggregate and other bioactive endodontic cements: An updated overview—Part I: Vital pulp therapy. *Int Endod J* 2018; **51**: 177–205.
245. Partanen AM, Thesleff I. Localization and quantitation of ¹²⁵I-epidermal growth factor binding in mouse embryonic tooth and other embryonic tissues at different developmental stages. *Dev Biol* 1987; **120**: 186–197.

246. Paula A, Laranjo M, Marto CM, Abrantes AM, Casalta-Lopes J, Sarmento-Ribeiro AB, Ferreira MM, Botelho MF, Carrilho E. Biodentine™ Boosts, WhiteProRoot® MTA Increases and Life® Suppresses Odontoblast Activity. *Materials (Basel)* 2019; **12**(7): 1184-1213.
247. Pawitan JA. The Micronucleus Test: A method used in mutagenicity testing. *Med J Indones* 1995; **4**(2): 65-71.
248. Pelliccioni GA, Ciapetti G, Cenni E, Granchi D, Nanni M, Pagani S, Giunti A. Evaluation of osteoblast-like cell response to Proroot MTA (mineral trioxide aggregate) cement. *J Mater Sci Mater Med* 2004; **15**(2): 167-173.
249. Perry PE, Thompson EJ. The methodology of sister chromatid exchanges. İçinde Kilbey BJ, Legator M, Nichols W, Ramel C (Eds). *Handbook of mutagenicity test procedures*. Amsterdam: Elsevier Science; 1984. pp. 495–529.
250. Pertot WJ, Sindres V, Szekeres G, Proust JP. Model for quantitative immunohistochemical assessment of pulpal response to biomaterials. *J Biomed Mater Res* 1997; **15**: 457-462.
251. Peters OA. Research that matters-Biocompatibility and cytotoxicity screening. *Int Endod J* 2013; **46**: 195–197.
252. Peters OA, Galicia J, Arias A, Tolar M, Ng E, Shin SJ. Effects of two calcium silicate cements on cell viability, angiogenic growth factor release and related gene expression in stem cells from the apical papilla. *Int Endod J* 2016; **49**(12): 1132–1140.
253. Philomena G. Concerns regarding the safety and toxicity of medicinal plants -An overview. *J Appl Pharm Sci* 2011; **1**(6): 40-44.
254. Pischinger A, Stockinger L. The nerves of the human dental pulp [German]. *Z Zellforsch Mikros Anat* 1968; **89**(1): 44–61.
255. Pitaru S, Pritzki A, Bar-Kana I, Grosskopf A, Savion N, Narayanan AS. Bone morphogenic protein 2 induces the expression of cementum attachment protein in human periodontal ligament clones. *Connect Tissue Res* 2002; **43**: 257-264.
256. Pool-Zobel BL, Dornacher I, Lambertz R, Knoll M, Seitz HK. Genetic damage and repair in human rectal cells for biomonitoring: sex differences, effects of alcohol exposure, and susceptibilities in comparison to peripheral blood lymphocytes. *Mutat Res* 2004; **551**: 127-134.

257. Powers JM, Sakaguchi RL. Craig's restorative dental materials. 12th ed. St. Louis: Mosby Elsevier; 2006. pp. 97-125.
258. Radlanski RJ. *Orale Struktur- und Entwicklungsbiologie*. Berlin: Quintessenz; 2011.
259. Rafter M. Apexification: a review. *Dent Traumatol* 2005; **21**: 1-8.
260. Raghavendra SS, Jadhav GR, Gathani KM, Kotadia P. Bioceramics in endodontics—A review. *J Istanbul Univ Fac Dent* 2017; **51**: 128-137.
261. Rahimi S, Salarinasab S, Ghasemi N, Rahbarghazi R, Shahi S, Milani AS, Divband B, Davoudi P. In vitro induction of odontogenic activity of human dental pulp stem cells by white Portland cement enriched with zirconium oxide and zinc oxide components. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospects* 2019; **13**(1): 3–10.
262. Rakian A, Yang WC, Gluhak-Heinrich J, Cui Y, Harris MA, Villarreal D, Feng JQ, MacDougall M, Harris SE. Bone morphogenetic protein-2 gene controls tooth root development in coordination with formation of periodontium. *Int J Oral Sci* 2013; **5**: 75-84.
263. Ravichandra PV, Vemisetty H, Deepthi K, Reddy J, Ramkiran D, Krishna JN, Malathi G. Comparative evaluation of marginal adaptation of Biodentine™ and other commonly used root end filling materials- an in vitro study. *J Clin Diagn Res* 2014; **8**(3): 243-245.
264. Reyes-Carmona JF, Felipe MS, Felipe WT. Biomineralization ability and interaction of mineral trioxide aggregate and white portland cement with dentin in a phosphate-containing fluid. *J Endod* 2009; **35**: 731–736.
265. Ribeiro DA, Matsumoto MA, Duarte MA, Marques ME, Salvadori DMF. In vitro biocompatibility tests of two commercial types of mineral trioxide aggregate. *Braz Oral Res* 2005; **19**(3): 183-187.
266. Ribeiro DA, Sugui MM, Matsumoto MA, Duarte MAH, Marques MEA, Salvadori DMF. Genotoxicity and cytotoxicity of mineral trioxide aggregate and regular and White Portland cements on Chinese hamster ovary (CHO) cells in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006; **101**(2): 258-261.
267. Roberts-Clark DJ, Smith AJ. Angiogenic growth factors in human dentine matrix. *Arch Oral Biol* 2000; **45**: 1013-1016.
268. Rodrigues EM, Cornélio ALG, Mestieri LB, Fuentes ASC, Salles LP, Rossa-Junior C, Faria G, Guerreiro-Tanomaru JM, Tanomaru-Filho M. Human dental

- pulp cells response to mineral trioxide aggregate (MTA) and MTA Plus: cytotoxicity and gene expression analysis. *Int Endod J* 2017; **50**(8): 780–789.
269. Roggen EL. In vitro Toxicity Testing in the Twenty-First Century. *Front Pharmacol* 2011; **2**(3): 1-3.
270. Romagnoli P, Mancini G, Galeotti F, Francini F, Pierleoni P. The crown odontoblasts of rat molars from primary dentinogenesis to complete eruption. *J Dent Res* 1990; **69**: 1857–1862.
271. Rosen V. BMP-2 signaling in bone development and repair. *Cytokine Growth F R* 2009; **20**(5-6): 475–480.
272. Rothfuss A, Schutz P, Bochum S, Volm T, Eberhardt E, Kreienberg R, Vogel W, Speit G. Induced micronucleus frequencies in peripheral lymphocytes as a screening test for carriers of a BRCA1 mutation in breast cancer families. *Cancer Res* 2000; **60**(2): 390-394.
273. Roy H, Bhardwaj S, Ylä-Herttuala S. Biology of vascular endothelial growth factors. *FEBS Lett* 2006; **580**: 2879–2887.
274. Sakai VT, Zhang Z, Dong Z, Neiva KG, Machado MA, Shi S, Santos CF, Nör JE. SHED differentiate into functional odontoblasts and endothelium. *J Dent Res* 2010; **89**(8): 791–796.
275. Saks M, Upreti S, Rajendra SV, Dand R. Genotoxicity: mechanisms, testing guidelines and methods. *Glob J Pharmaceu Sci* 2017; **1**(5): 1-6.
276. Salawu A, Wright K, Al-Kathiri A, Wyld L, Reed M, Sisley K. Sister chromatid exchange and genomic instability in soft tissue sarcomas: potential implications for response to dna-damaging treatments. *Sarcoma* 2018: 1–8.
277. Salvador A, Chisvert A. *Analysis of Cosmetics Products*. Oxford: Elsevier; 2011.p. 475.
278. Sanz JL, Rodriguez-Lozano FJ, Llena C, Sauro S, Forner L. Bioactivity of bioceramic materials used in the dentin-pulp complex therapy: A Systematic Review. *Materials* 2019; **12**: 1-30.
279. Saoud TMA, Ricucci D, Lin LM, Gaengler P. Regeneration and repair in endodontics-a special issue of the regenerative endodontics-A new era in clinical endodontics. *Dent J (Basel)* 2016; **4**(1): 1-15.

280. Sarkar NK, Caicedo R, Ritwik P, Moiseyeva R, Kawashima I. Physicochemical basis of the biologic properties of mineral trioxide aggregate. *J Endod* 2005; **31**: 97–100.
281. Savage JR. Classification and relationships of induced chromosomal structural changes. *J Med Genet* 1976; **13**(2): 103-122.
282. Sasaki YF, Kawaguchi S, Karmaya A, Ohshita M, Kabasawa K, Iwama K, Taniguchi K, Tsuda S. The comet assay with 8 mouse organs: results with 39 currently used food additives. *Mutat Res* 2002; **519**: 103–119.
283. Schmalz G. Concepts in biocompatibility testing of dental restorative materials. *Clin Oral Investig* 1997; **1**(4): 154-162.
284. Schmitt D, Lee J, Bogen G. Multifaceted use of ProRoot MTA root canal repair material. *Pediatr Dent* 2001; **23**: 326-330.
285. Schroeder HE. Human cellular mixed stratified cementum: a tissue with alternating layers of acellular extrinsic and cellular intrinsic fiber cementum. *Schweiz Monatsschr Zahnmed* 1993; **103**: 550-560.
286. Schvartzman JB, Cortes F. Sister chromatid exchanges in *Allium cepa*. *Chromosoma* 1977; **62**: 119-131.
287. Schwartz RS, Mauger M, Clement DJ, Walker WA 3rd. Mineral trioxide aggregate: A new material for endodontics. *J Am Dent Assoc* 1999; **130**: 967-975.
288. Sears DA, Udden MM. Howell–Jolly bodies: a brief historical review. *Am J Med Sci* 2011; **343**: 407–409.
289. Sedelnikova OA, Nakamura A, Kovalchuk O, Koturbash I, Mitchell SA, Marino SA, Brenner DJ, Bonner WM. DNA double-strand breaks form in bystander cells after microbeam irradiation of three- dimensional human tissue models. *Cancer Res* 2007; **67**(9): 4295–4302.
290. Seltzer S, Bender IB. *The dental pulp, 2nd edn*. Philadelphia, PA: JB Lippincott Publishing; 1975. pp. 260.
291. Seltzer S. The root apex. İçinde Seltzer S, Krasner P (Eds). *Endodontology: Biologic Considerations in Endodontic Procedures*. Malvern, PA: Lea & Febiger; 1988. pp. 1-30.
292. Shah AJ, Lakkad BC, Rao MV. Genotoxicity in lead treated human lymphocytes evaluated by micronucleus and comet assays. *Indian J Exp Biol* 2016; **54**(8): 502-508.

293. Shah S. Importance of genotoxicity & S2a guidelines for genotoxicity testing for pharmaceuticals. *IOSR J Pharm Biol Sci* 2012; **1**(2): 43-54.
294. Shailja C. Cementogenesis and its significance. *Ann Dent Res* 2012; **2**(2): 51-56.
295. Sheehy EC, Roberts GJ. Use of calcium hydroxide for apical barrier formation and healing in non-vital immature permanent teeth: a review. *Br Dent J* 1997; **183**: 241-246.
296. Shimabukuro Y, Terashima H, Takedachi M, Maeda K, Nakamura T, Sawada K, Kobashi M, Awata T, Oohara H, Kawahara T, et al. Fibroblast growth factor-2 stimulates directed migration of periodontal ligament cells via PI3K/AKT signaling and CD44/hyaluronan interaction. *J Cell Physiol* 2011; **226**: 809- 821.
297. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 1988; **175**(1): 184-191.
298. Siqueira JF, Lopes HP. Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: a critical review. *Int Endod J* 1999; **32**: 361-369.
299. Sluyk SR, Moon PC, Hartwell GR. Evaluation of setting properties and retention characteristics of Mineral Trioxide Aggregate when used as a furcation perforation repair material. *J Endod* 1998; **24**: 768-771.
300. Smith AJ. Vitality of the dentin-pulp complex in health and disease: growth factors as key mediators. *J Dent Educ* 2003; **67**: 678–689.
301. Smith AJ, Scheven BA, Takahashi Y, Ferracane JL, Shelton RM, Cooper PR. Dentine as a bioactive extracellular matrix. *Arch Oral Biol* 2012; **57**: 109-121.
302. Sodek J, McKee MD. Molecular and cellular biology of alveolar bone. *Periodontol 2000* 2000; **24**: 99-126.
303. Solchaga LA, Penick K, Porter JD, Goldberg VM, Caplan AI, Welter JF. FGF-2 enhances the mitotic and chondrogenic potentials of human adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol* 2005; **203**: 398-409.
304. Som PM, Naidich TP. Illustrated review of the embryology and development of the facial region, part 2: Late development of the fetal face and changes in the face from the newborn to adulthood. *Am J Neuroradiol* 2014; **35**(1): 10–18.
305. Sridhar N, Tandon S. Continued root-end growth and apexification using a calcium hydroxide and iodoform paste (metapex®): Three case reports. *J Contemp Dent Pract* 2010; **11**(5): 63–70.

- 306.Srinivasan V, Waterhouse P, Whitworth J. Mineral trioxide aggregate in paediatric dentistry. *Int J Pediatr Dent* 2009; **19**: 34-47.
- 307.Staffoli S, Plotino G, Torrijos BGN, Grande NM, Bossù M, Gambarini G, Polimeni A. Regenerative Endodontic Procedures Using Contemporary Materials. *Materials* 2019; **12**(6): 1-28.
- 308.Steiner JC, Van Hassel HJ. Experimental root apexification in primates. *Oral Surg* 1971; **31**: 409-415.
- 309.Steinig TH, Regan JD, Gutmann JL. The use and predictable placement of Mineral Trioxide Aggregate in one-visit apexification cases. *Aust Endod J* 2003; **29**(1): 34-42.
- 310.Stevens MM, Marini RP, Schaefer D, Aronson J, Langer R, Shastri VP. In vivo engineering of organs: the bone bioreactor. *Proc Natl Acad Sci* 2005; **102**: 11450-11455.
- 311.Stopper H, Müller OS. Micronuclei as a biological endpoint for genotoxicity: A Minireview. *Toxicol In Vitro* 1997; **11**: 661-667.
- 312.Syedbasha M, Linnik J, Santer D, et al. An ELISA Based Binding and Competition Method to Rapidly Determine Ligand-receptor Interactions. *J Vis Exp* 2016; **109**: 1-10.
- 313.Şekeroğlu ZA, Şekeroğlu V. Genetik toksisite testleri. *Tubav Bilim Dergisi* 2011; **4**(3): 221-229.
- 314.Takano Y, Sakai H, Baba O, Terashima T. Differential involvement of matrix vesicles during the initial and appositional mineralization processes in bone, dentin, and cementum. *Bone* 2000; **26**(4): 333–339.
- 315.Tamaki Y, Nakahara T, Ishikawa H, Sato S. In vitro analysis of mesenchymal stem cells derived from human teeth and bone marrow. *Odontology* 2013; **101**(2): 121–132.
- 316.Tanomaru-Filho M, Tanomaru JM, Barros DB, Watanabe E, Ito IY. In vitro antimicrobial activity of endodontic sealers, MTA-based cements and Portland cement. *J Oral Sci* 2007; **49**: 41-45.
- 317.Tecles O, Laurent P, Aubut V, About I. Human tooth culture: A study model for reparative dentinogenesis and direct pulp capping materials biocompatibility. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2008; **85**: 180–187.

318. Tejs S. The Ames test: a methodological short review. *Environ Biotechnol* 2008; **4**(1): 7-14.
319. Ten Cate AR. A fine structural study of coronal and root dentinogenesis in the mouse: observations of the so called 'von Korff fibres' and their contribution to mantle dentine. *J Anat* 1978; **125**(1): 183-197.
320. Thesleff I, Sharpe P. Signalling networks regulating dental development. *Mech Dev* 1977; **67**: 111-123.
321. Thomas P, Umegaki K, Fenech M. Nucleoplasmic bridges are a sensitive measure of chromosome rearrangement in the cytokinesis-block micronucleus assay. *Mutagenesis* 2003; **18**: 187-194.
322. Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC, Sasaki YF.. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen* 2000; **35**(3): 206-221.
323. Titenko-Holland N, Windham G, Kolachana P, Reinisch F, Parvatham S, Osorio AM et al. Genotoxicity of malathion in human lymphocytes assessed using the micronucleus assay *in vitro* and *in vivo*: a study of malathion-exposed workers. *Mutat Res* 1997; **388**(1): 85-95.
324. Tjäderhane L, Carrilho MR, Breschi L, Tay FR, Pashley DH. Dentin basic structure and composition-an overview. *Endod Topics* 2009; **20**: 3-29.
325. Tjäderhane, L, Haapasalo M. The dentin–pulp border: a dynamic interface between hard and soft tissues. *Endod Topics* 2009; **20**: 52-84.
326. Tjäderhane L, Paju S. Dentin-pulp and periodontal anatomy and physiology. *Essential Endodontology: Prevention and Treatment of Apical Periodontitis*, 3rd edition. Wiley&Sons Ltd; 2019. pp. 11–58.
327. Tompkins KA. The osteoimmunology of alveolar bone loss. *Connect Tissue Res* 2016; **57**(2): 69–90.
328. Torabinejad M, White DJ. Tooth Filling Material and Method of Use. No:94/24955 (PCT) WIPO Patent. 1994.
329. Torabinejad M, Hong CU, Lee SJ, Monsef M, Pitt Ford TR. Investigation of mineral trioxide aggregate for root-end-filling in dogs. *J Endod* 1995; **21**: 603-608.
330. Torabinejad M, Hong CU, McDonald F, Pitt Ford TR. Physical and chemical properties of a new root-end filling material. *J Endod* 1995; **21**: 349-353.

331. Torabinejad M, Chivian N. Clinical applications of mineral trioxide aggregate. *J Endod* 1999; **25**: 197-205.
332. Torabinejad M, Parirokh M, Dummer PMH. Mineral trioxide aggregate and other bioactive endodontic cements: An updated overview—part II: Other clinical applications and complications. *Int Endod J* 2018; **51**: 284–317.
333. Torneck CD, Smith JS, Grindall P. Biological effects of endodontic procedures on developing incisor teeth. IV. Effect of debridement procedures and calcium hydroxide-camphorated parachlorophenol paste in the treatment of experimentally induced pulp and periapical disease. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1973; **35**(4): 541-554.
334. Torneck CD. Effects of trauma to the developing permanent dentition. *Dent Clin N Am* 1982; **26**: 481-504.
335. Tran-Hung L, Laurent P, Camps J, About I. Quantification of angiogenic growth factors released by human dental cells after injury. *Arch Oral Biol* 2008; **53**(1): 9-13.
336. Trope M. Treatment of immature teeth with non-vital pulps and apical periodontitis. *Endod Topics* 2006; **14**: 51-59.
337. Tucker JD, Preston RJ. Chromosome aberrations, micronuclei, aneuploidy, sister chromatid exchanges, and cancer risk assessment. *Mutat Res* 1996; **365**: 147-159.
338. Tuncer S, Demirci M. Dental materyallerde biyoyumluluk değerdirmesi. *Atatürk Üniv Diş Hek Fak Derg* 2011; **21**(2): 141-149.
339. Tziafas D, Pantelidou O, Alvanou A, Belibasakis G, Papadimitriou S. The dentinogenic effect of mineral trioxide aggregate (MTA) in short-term capping experiments. *Int Endod J* 2002; **35**: 245-254.
340. Urist MR. Bone formation by autoinduction. *Science* 1965; **150**: 893-899.
341. Van Lieshout EM, Alt V. Bone graft substitutes and bone morphogenetic proteins for osteoporotic fractures: what is the evidence? *Injury* 2016; **47**(1): 43-46.
342. Vanparys P, Vermeiren F, Sysmans M, Temmerman R. The micronucleus assay as a test for the detection of aneugenic activity. *Mutat Res* 1990; **244**: 95-103.
343. von der Hude W, Kalweit S, Engelhardt G, McKiernan S, Kasper P, Slacik-Erben R, Miltenburger HG, Honarvar N, Fahrig R, Gorlitz B, Albertini S, Kirchner S, Utesch D, Potter- Locher F, Stopper H, Madle S. In vitro micronucleus assay with

- Chinese hamster V79 cells - results of a collaborative study with in situ exposure to 26 chemical substances. *Mutat Res* 2000; **468**: 137- 163.
344. Wang Y, Cox MK, Coricor G, MacDougall M, Serra R. Inactivation of TGF β 2 in Osterix-Creexpressing dental mesenchyme disrupts molar root formation. *Dev Biol* 2013; **382**: 27-37.
345. Wang Y, Li L, Zheng Y, Yuan G, Yang G, He F and Chen Y. BMP activity is required for tooth development from the lamina to bud stage. *J Dent Res* 2012; **91**: 690-695.
346. Wang W, Dang M, Zhang Z, Hu J, Eyster TW, Ni L, Ma PX. Dentin regeneration by stem cells of apical papilla on injectable nanofibrous microspheres and stimulated by controlled BMP-2 release. *Acta Biomater* 2016; **36**: 63-72.
347. Wataha JC. Principles of biocompatibility for dental practitioners. *J Prosthet Dent* 2001; **86**(2): 203-209.
348. Webber RT. Apexogenesis versus apexification. *Dent Clin N Am* 1984; **28**: 669-697.
349. Weiner S, Veis A, Beniash E, Arad T, Dillon JW, Sabsay B, Siddiqui F. Peritubular dentin formation: crystal organization and the macromolecular constituents in human teeth. *J Struct Biol* 1999; **126**: 27–41.
350. Wentz FM, Weinmann JP, Schour I. The prevalence, distribution and morphological changes of the epithelial remnants in the molar regions of the rat. *J Dent Res* 1950; **29**: 637-646.
351. Wilde EC, Chapman KE, Stannard LM, Seager AL, Brüsehafer K, Shah UK, Tonkin JA, Brown MR, Verma JR, Doherty AT, Johnson GE, Doak SH, Jenkins GJS. A novel, integrated in vitro carcinogenicity test to identify genotoxic and non-genotoxic carcinogens using human lymphoblastoid cells. *Arch Toxicol* 2017; **92**(2): 935–951.
352. Williams DF. *Definitions in Biomaterials*. Oxford: Elsevier; 1987.
353. Williams DF. On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials* 2008; **29**(20): 2941-2953.
354. Wilson DM, Thompson LH. Molecular mechanisms of sister-chromatid exchange. *Mutat Res-Fund Mol M* 2007; **616**(1-2): 11-23.

355. Witherspoon DE, Ham K. One-Visit apexification: technique for inducing root end barrier formation in apical closures. *Pract Proced Aesthet Dent* 2001; **13**(6): 455-460.
356. Witherspoon DE, Small JC, Regan JD, Nunn M. Retrospective analysis of open apex teeth obturated with mineral trioxide aggregate. *J Endod* 2008; **34**: 1171-1176.
357. Wolff S, Perry P. Differential giemsa staining of sister chromatids and the study of sister chromatid exchanges without autoradiography. *Chromosoma* 1974; **48**: 341-353.
358. Wongwatanasanti N, Jantararat J, Sritanaudomchai H, Hargreaves KM. Effect of Bioceramic Materials on Proliferation and Odontoblast Differentiation of Human Stem Cells from the Apical Papilla. *J Endod* 2018; **44**(8): 1270-1275.
359. Yadlapati M, Biguetti C, Cavalla F, Nieves F, Bessey C, Bohluli P, et al. Characterization of a vascular endothelial growth factor- loaded bioresorbable delivery system for pulp regeneration. *J Endod* 2017; **43**(1): 77-83.
360. Yamamoto T, Hasegawa T, Yamamoto T, Hongo H, Amizuka N. Histology of human cementum: Its structure, function, and development. *Jpn Dent Sci Rev* 2016; **52**(3): 63-74.
361. Yamashiro T, Tummers M, Thesieff I. Expression of bone morphogenetic proteins and Msx genes during root formation. *J Dent Res* 2003; **82**: 172-176.
362. Yamashiro T, Zheng L, Shitaku Y, Saito M, Tsubakimoto T, Takada K, Takano-Yamamoto T, Thesleff I. Wnt10a regulates dentin sialophosphoprotein mRNA expression and possibly links odontoblast differentiation and tooth morphogenesis. *Differentiation* 2007; **75**: 452-462.
363. Yanagita M, Kojima Y, Kubota M, Mori K, Yamashita M, Yamada S, Kitamura M, Murakami S. Cooperative effects of FGF-2 and VEGF-A in periodontal ligament cells. *J Dent Res* 2014; **93**: 89-95.
364. Yang W, Harris MA, Cui Y, Mishina Y, Harris SE and Gluhak-Heinrich J. Bmp 2 is required for odontoblast differentiation and pulp vasculogenesis. *J Dent Res* 2012; **91**: 58-64.
365. Yao S, Pan F, Prpic V, Wise GE. Differentiation of stem cells in the dental follicle. *J Dent Res* 2008; **87**(8): 767-771.

366. Yıldırım ZS, Bakır EP, Bakır Ş, Aydın MS. Diş hekimliğinde biyouyumluluk ve değerlendirme yöntemleri. *Selcuk Dent J* 2017; 4: 162-169.
367. Yırtıcı Ü. Tartrazinin *Cyprinus Carpio*'daki Genotoksik Etkisinin MN Yöntemi ile Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Kayseri. 2007.
368. Yokohama-Tamaki T, Ohshima H, Fujiwara N, Takada Y, Ichimori Y, Wakisaka S, Ohuchi H, Harada H. Cessation of Fgf10 signaling, resulting in a defective dental epithelial stem cell compartment, leads to the transition from crown to root formation. *Development* 2006; **133**(7): 1359-1366.
369. Young RR. Genetic toxicology: web resources. *Toxicology* 2002; **173**(1-2): 103-121.
370. Youssef AR, Emara R, Taher MM, Al-Allaf FA, Almalki M, Almasri MA, Siddiqui SS. Effects of mineral trioxide aggregate, calcium hydroxide, biodentine and Emdogain on osteogenesis, Odontogenesis, angiogenesis and cell viability of dental pulp stem cells. *BMC Oral Health*. 2019; **19**(1): 133-141.
371. Yunis JJ. The chromosomal basis of human neoplasia, *Science* 1983; **201**: 227-36.
372. Zakerzadeh A, Esnaashari E, Dadfar S. In vitro comparison of cytotoxicity and genotoxicity of three vital pulp capping materials. *Iran Endod J* 2017; **12**(4): 419-425.
373. Zanini M, Sautier JM, Berdal A, Simon S. Biodentine induces immortalized murine pulp cell differentiation into odontoblast-like cells and stimulates biomineralization. *J Endod* 2012; **38**(9): 1220-1226.
374. Zarei M, Jafarian AH, Harandi A, Javidi M, Gharechahi M. Evaluation of the expression of VIII factor and VEGF in the regeneration of non-vital teeth in dogs using propolis. *Iran J Basic Med Sci* 2017; **20**: 172-177.
375. Zaslansky P, Zabler S, Fratzl P. 3D variations in human crown dentin tubule orientation: a phase-contrast microtomography study. *Dent Mater* 2010; **26**: 1-10.
376. Zeferino EG, Bueno CES, Oyama LM, Ribeiro DA. Ex vivo assessment of genotoxicity and cytotoxicity in murine fibroblasts exposed to white MTA or white Portland cement with 15% bismuth oxide. *Int Endod J* 2010; **43**(10): 843-848.

377. Zeichner-David M, Oishi K, Su Z, Zakartchenko V, Chen L, Arzate H, Bringas P. Role of Hertwig's Epithelial Root Sheath cells in tooth root development. *Dev Dyn* 2003; **228**: 651-663.
378. Zelzer E, McLean W, Ng YS, Fulkai N, Reginato AM, Lovejoy S, D'Amore PA, Olsen BR. Skeletal defects in VEGF (120/120) mice reveal multiple roles for VEGF in skeletogenesis. *Development* 2002; **129**(8): 1893-1904.
379. Zhang W, Zhang X, Ling J, Liu W, Zhang X, Ma J, Zheng J. Proliferation and odontogenic differentiation of BMP 2 gene-transfected stem cells from human tooth apical papilla: an in vitro study. *Int J Mol Med* 2014; **34**(4): 1004–1012.
380. Zhang W, Zhang X, Ling J, Wei X, Jian Y. Osteo-/odontogenic differentiation of BMP-2 and VEGF gene-co- transfected human stem cells from apical papilla. *Mol Med Rep* 2016; **13**(5): 3747–3754.
381. Zhou H, Shen Y, Wang Z, Li L, Zheng Y, Hakkinen L, Haapasalo M. In vitro cytotoxicity evaluation of a novel root repair material. *J Endod* 2013; **39**(4):478-483.

FORMLAR

EK 1. Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu ve Gönüllü Onay Formu

Çalışmanın Adı: Biyoseramik Esaslı Dental Materyallerin Genotoksisite ve Biyoaktivite Özellikleri ile Alkalen Fosfataz Aktivitesinin İncelenmesi

Amaç: Genç sürekli dişler travma, derin çürük veya diğer pulpa patolojileri nedeniyle kök gelişimlerini tamamlayamadan kanal tedavisi gereksinimi duyabilmektedirler. Bu amaçla kök ucunu tıkamaya yönelik biyoseramik esaslı materyaller mevcuttur. Kök ucunu kapatma amacıyla yapılan bu tedavilerde kullanılan materyaller genellikle biyouyumlu olarak tanımlanmaktadır. Ağız içerisinde uzun dönem canlı dokularla temas eden bir materyalin hücreler üzerinde olumsuz bir etki meydana getirmemesi beklenmektedir. Bu doktora tezi çalışmasında kök ucu kapatma tedavisinde kullanılabilecek dört farklı biyoseramik esaslı materyalin genetik hasar oluşturup oluşturmadığı, sert doku oluşturma potansiyeli ve biyoaktiviteleri laboratuvar ortamında incelenecektir.

Çalışmanın Kapsamı: Çalışmamız kapsamında sistemik hastalığı bulunmayan, 18-35 yaş arası, sigara kullanmayan ve radyasyon/ilâç tedavisi görmeyen **tek bir (1)** donörden alınan kan dokusundan akyuvar hücreleri elde edilip çoğaltılacak ve materyal ile teması laboratuvar aşamasında sağlanacaktır. Materyalin hücreler üzerinde oluşturduğu hasar, hücre kültür ortamında tespit edilecektir. Materyallerin sert doku oluşturma potansiyelleri ve kemik ve damar oluşturma potansiyeli ise hazır hücreler üzerinde laboratuvar ortamında gerçekleştirilecektir. Çalışma için sizden maddi olarak bir talepte bulunulmayacak ve karşılığında size de ödeme yapılmayacaktır.

İstenmeyen Etki ve Riskler: Araştırma kapsamında steril malzemeler kullanılarak hemşire tarafından tek bir donörden kan alınacaktır. Kan dokusundan alyuvar hücreleri elde edilecektir. Bu aşamadan sonra deneylerin gönüllü ile ilişkisi olmayacaktır ve deneyler laboratuvar ortamında gerçekleştirilecektir. Herhangi girişimsel bir deney

yapılmayacaktır. Bu aşamalarda gönüllü donörü etkileyebilecek istenmeyen etki ya da risk bulunmamaktadır.

Çalışmanın Getireceği Faydalar: Çalışmanın sonunda elde edilecek veriler doğrultusunda kök ucu kapatma tedavisinde kullanılabilecek, genetik hasara sebep olmayan, uzun dönemde sert doku oluşumuna katkı sağlayarak kök ucunda tıkama sağlayan ve biyoaktivitesi en yüksek (kemik ve damar oluşturma potansiyeli fazla) olan en uygun materyalin belirlenmesi ve tedavilerde kullanılması beklenen yararlar arasındadır.

Yasal Haklarınız: Bu formu imzalamakla yasal haklarınızdan vazgeçmiyorsunuz. Formu imzalamanız, yapılacak çalışmayı okuyup anladığınızı ve çalışmada yer almak istediğinizi göstermektedir. Formun bir kopyası size verilecektir.

Reddetme Hakkı: Çalışmadaki tüm katılımcılar gönüllü olarak yer almaktadır. Çalışmaya katılmama hakkına sahiptir. İstedığınız zaman çalışmaya katıldıktan sonra da vazgeçebilirsiniz. Katılımınız tamamen sizin isteğinizle gerçekleştirilmektedir. Katılmamanız sizin bu fakülteden sağlık hizmeti almanızı etkilemeyecektir.

Güvenilirlik: Çalışmada elde edilecek tüm veriler bilimsel yayın ve eğitim amaçlı kullanılacaktır. Kimlikler gizli tutulacak, herhangi bir şekilde kimseyle paylaşılmayacaktır.

İletişim: Çalışmada yer alan araştırmacı sizin tüm sorularınıza yanıt vermeye çalışacaktır. Sorunuz olduğunda Dt. Merve Bayraklı'yı 0212 414 20 20 ve 30317 dahili numaradan arayabilirsiniz.

Katılımcının/Hastanın Beyanı

Sayın Dt. Merve Bayraklı tarafından İstanbul Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi Pedodonti Anabilim Dalı'nda tıbbi bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı. Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya "katılımcı" (denek) olarak davet edildim. Eğer bu araştırmaya katılırsam hekim ile

aramda kalması gereken bana ait bilgilerin gizliliğine bu araştırma sırasında da büyük özen ve saygı ile yaklaşılabacağına inanıyorum. Araştırma sonuçlarının eğitim ve bilimsel amaçlarla kullanımı sırasında kişisel bilgilerimin ihtimamla korunacağı konusunda bana yeterli güven verildi.

Projenin yürütülmesi sırasında herhangi bir sebep göstermeden araştırmadan çekilebilirim. (Ancak araştırmacıları zor durumda bırakmamak için araştırmadan çekileceğimi önceden bildirmemim uygun olacağının bilincindeyim) Ayrıca tıbbi durumuma herhangi bir zarar verilmemesi koşuluyla araştırmacı tarafından araştırma dışı da tutulabilirim.

Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmiyorum. Bana da bir ödeme yapılmayacaktır.

İster doğrudan, ister dolaylı olsun araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerle meydana gelebilecek herhangi bir sağlık sorunumun ortaya çıkması halinde, her türlü tıbbi müdahalenin sağlanacağı konusunda gerekli güvence verildi. (Bu tıbbi müdahalelerle ilgili olarak da parasal bir yük altına girmeyeceğim).

Araştırma sırasında bir sağlık sorunu ile karşılaştığımda; herhangi bir saatte, Dt. Merve Bayraklı'yı İstanbul Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi Pedodonti Anabilim Dalı 0212 414 20 20/30317'den arayabileceğimi biliyorum.

Bu araştırmaya katılmak zorunda değilim ve katılmayabilirim. Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmış değilim. Eğer katılmayı reddedersem, bu durumun tıbbi bakımına ve hekim ile olan ilişkiye herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum.

Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Kendi başıma belli bir düşünme süresi sonunda adı geçen bu araştırma projesinde “katılımcı” (denek) olarak yer alma kararını aldım. Bu konuda yapılan daveti büyük bir memnuniyet ve gönüllülük içerisinde kabul ediyorum. İmzalı bu form kağıdının bir kopyası bana verilecektir.

GÖNÜLLÜ ONAY FORMU

Yukarıda gönüllüye araştırmadan önce verilmesi gereken bilgileri gösteren metni okudum. Bunlar hakkında bana yazılı ve sözlü açıklamalar yapıldı. Bu koşullarla söz konusu klinik araştırmaya kendi rızamla hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.

Gönüllünün Adı-soyadı/ İmzası/Tarih/ Adresi (varsa telefon no., faks no,...)

**Araştırma ekibinde yer alan ve yetkin bir araştırmacının
Adı-soyadı/ İmzası/ Tarih**

Gerekiyorsa olur işlemine tanık olan kişinin Adı-soyadı/ İmzası/Tarih/ Adresi (varsa telefon no., faks no,...)

Gerekiyorsa yasal temsilcisinin Adı-soyadı/ İmzası/Tarih/ Adresi (varsa telefon no., faks no,...)

ETİK KURUL KARARI

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU



Sayı :267

12.04.2018

Konu : Prof.Dr.Elif Bahar Tuna İnce

Sayın Prof.Dr.Elif Bahar Tuna İnce
Pedodonti Anabilim Dalı

İlgi: İÜ Diş Hekimliği Fakültesi Pedodonti Anabilim Dalı'nın 10/04/2018 gün ve 135211 sayılı yazısı

Sorumlu araştırmacılığını üstlendiğiniz 2018/28 dosya nolu "Biyoseramik Esaslı Dental Materyallerin Genotoksisite ve Biyoaktivite Özellikleri ile Alkalen Fosfataz Aktivitesinin İncelenmesi " başlıklı çalışma kurulumuzun 12/04/2018 tarih ve 68 sayılı toplantısında görüşülerek etik yönden uygun bulunmuş olup, tutanaklar ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi rica ederim.

Prof.Dr. Faruk Haznedaroğlu
İ.Ü. Diş Hekimliği Fakültesi Klinik
Araştırmalar Etik Kurul Başkanı

Eki: I.Ü. Diş Hekimliği Fakültesi Klinik Araştırmaları Etik Kurulu Karar Formu

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

BİYOSERAMİK ESASLI DENTAL MATERYALLERİN GENOTOKSİSİTE VE BİYOAKTİVİTE ÖZELLİKLERİ İLE ALKALEN FOSFATAZ AKTİVİTESİNİN İNCELENMESİ

ORIJİNALLIK RAPORU

%5	%2	%2	%4
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	%1
2	www.selcukkoksal.com İnternet Kaynağı	<%1
3	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<%1
4	www.diclemedj.org İnternet Kaynağı	<%1
5	earsiv.odu.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<%1
6	Erkan ÜNSAL, Fahreddin ACAR, Zeynep KAYAARASI ÖZTÜRKER, Kadir ELTUTAR. "The Effect of Cataract on Retina Nerve Fiber Layer Thickness in Eyes with or without Glaucoma Assessed by Optical Coherence Tomography", Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences, 2013	<%1

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	MERVE	Soyadı	ESEN
Doğ.Yeri	İSTANBUL	Doğ.Tar.	04.04.1991
Email	mbayrakli91@gmail.com	Uyruğu	T.C.

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora	İstanbul Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi Pedodonti AD	
Yük.Lis.	İstanbul Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi	2015
Lisans	İstanbul Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi	2015
Lise	Terakki Vakfı Okulları Özel Şişli Terakki Lisesi	2010

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.			-
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	Çok iyi	Orta	İyi	65.00	
Almanca	Orta	Orta	Orta		

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı		87.78168	
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
MS Office (Word, Powerpoint, Excel)	İyi

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

Ulusal Bildiriler:

1. Tabakcılar D, **Bayraklı M**, Yılmaz DÖ, Koruyucu M, Tuna-İnce EB, Seymen F, Gençay K. Seckel Sendromu: 3 Olgu Sunumu. Türk Pedodonti Derneği 23. Bilimsel Kongresi, 24-28 Eylül 2016, Yunanistan. (Poster bildirisi)
2. Kasımoğlu Y, Kocaaydın S, **Bayraklı M**, Karşı E, Tuna-İnce EB. Dental anksiyetede robotların kullanımı. Türk Pedodonti Derneği 24. Bilimsel Kongresi, 19-22 Ekim 2017, Antalya/Türkiye. (Sözlü bildirisi)

Uluslararası Bildiriler:

1. **Bayraklı M**, Koruyucu M, Seymen F, Gençay K, Tuna-Ince EB. Cherubism in siblings: A case report. European Academy of Paediatric Dentistry Interim Seminar, 20-22 April 2017, Turin/Italy. (Oral Poster Presentation with Discussion-OPD)
2. **Bayraklı M**, Bozkurt OD, Kasımoğlu Y, Tuna-Ince EB. Evaluation of knowledge levels of dentists about trauma and protective methods in sports dentistry. Turkish Dental Association 23. International Dental Congress, 21-24 September 2017, Istanbul/Turkey. (Poster)
3. Kasımoğlu Y, Balota A, **Bayraklı M**, Tabakcılar D, Tuna EB. An investigation of dentists' attitudes towards children with dental anxiety. 14th EAPD Congress, 20-23 June 2018, Lugano/Switzerland. (Poster with discussion)
4. **Bayraklı M**, Guney N, Tuna-Ince EB. Evaluation of knowledge and attitude of parents about bruxism in children and young adults. 25th Congress of Turkish Society of Pediatric Dentistry, 12-14 October 2018, Istanbul/Turkey. (Poster)

Yayınlar:

1. **Bayraklı M**, Bozkurt O, Kasımoğlu Y, Tabakçılar D, Tuna-İnce EB. Diş Hekimlerinin Spor Diş Hekimliğinde Travma ve Koruyucu Yöntemler Konusunda Bilgi Düzeylerinin Değerlendirilmesi. Ata Diş Hek Fak Derg 2019; 1-1.
2. **Bayraklı M**, Yazan E, Tuna İnce EB. Dudak Damak Yarıklı Çocuk Hastalarda Ağız-Diş Sağlığına Multidisipliner Yaklaşım. Çocuk Diş Hekimliği: Multidisipliner Yaklaşımlar. 1. Baskı. Ankara: Türkiye Klinikleri; 2019. p.13-7.
3. Kasımoğlu Y, Kocaaydin S, Karslı E, **Esen M**, Bektas I, Ince G, Tuna EB. Robotic Approach to the Reduction of Dental Anxiety in Children. Acta Odontologica Scandinavica. (Under review)
4. Kasımoğlu Y, **Esen M**, Fırat N, Tuna EB. Ebeveynlerin Çocuk ve Genç Erişkinlerde Bruksizm ile İlgili Bilgi ve Tutumlarının Değerlendirilmesi. Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Dergisi. (Under review)
5. Maden G, Kasımoğlu Y, **Esen M**, Tuna EB. Diyet Faktörleri ile Maloklüzyon Arasındaki İlişkinin Değerlendirilmesi. Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi. (Under review)