

T.C
AFYONKARAHİSAR SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ PEDODONTİ ANABİLİM DALI

BİYOSERAMİK İÇERİKLİ KÖK KANAL TAMİR
MATERYALLERİNİN PERİODONTAL LİGAMENT HÜCRELERİ
ÜZERİNDEKİ SİTOTOKSİK ETKİSİ

Hazırlayan

Melikşah URAL

Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Özgür DOĞAN

2.Danışman Prof.Dr.Korhan ALTUNBAŞ

Tez no: 48

2024 – AFYONKARAHİSAR

T.C
AFYONKARAHİSAR SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ PEDODONTİ ANABİLİM DALI

BİYOSERAMİK İÇERİKLİ KÖK KANAL TAMİR
MATERYALLERİNİN PERİODONTAL LİGAMENT HÜCRELERİ
ÜZERİNDEKİ SİTOTOKSİK ETKİSİ

Hazırlayan
Melikşah URAL
DİŞ HEKİMLİĞİNDE UZMANLIK TEZİ

Danışman
Dr. Öğr. Üyesi Özgür DOĞAN
2.Danışman Prof.Dr.Korhan ALTUNBAŞ

Bu çalışma; Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi BAP Komisyonu
tarafından 23.DUS.004 proje numarası ile desteklenmiştir.

2024 – AFYONKARAHİSAR

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK SAYFASI

Çalışmamızın etik kurul onayı Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurul Başkanlığı'ndan alınmıştır (07.04.2023 tarihli 2023/221 sayılı karar). (EK-1)



TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca her konuda yoluma ışık tutan, akademik bilgisi ve klinik tecrübesini her daim benimle paylaşan, emeğini ve desteğini her zaman hissettiğim ve hissedeceğime inandığım kıymetli tez danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Özgür DOĞAN’a,

Uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve tecrübelerini her daim benimle paylaşan değerli hocalarım Doç. Dr. Burcu GÜÇYETMEZ TOPAL, Dr. Öğr. Üyesi İsmail Haktan ÇELİK, Dr. Öğr. Üyesi Mehmet ÜNAL ve Dr. Öğr. Üyesi Hatice TÜRKOĞLU’na,

Tezimin deney aşamasında bilgi ve tecrübeleriyle bana destek olan hocalarım Prof. Dr. Korhan ALTUNBAŞ, Doç. Dr. Özlem ÖZDEN AKKAYA, Doç. Dr. Fatma FIRAT ve veteriner hekim Zeynep Nur ÇİNKAYA’ ya

Eğitimim boyunca birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum, her zaman desteklerini hissettiğim değerli asistan arkadaşlarım Esma ATIŞ, Esra Nur AKGÜL, Esra AKÇAY, Sümeyye Tuğçe KURAL, İlayda Naz BİLDİK, ve Pedodonti Anabilim Dalı’ndaki tüm asistan arkadaşlarıma ve yardımcı sağlık personeline,

Ve canım eşim Buse URAL’ a sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Melikşah URAL

Afyonkarahisar

Kasım, 2024

BİYOSERAMİK İÇERİKLİ KÖK KANAL TAMİR MATERYALLERİNİN PERİODONTAL LİGAMENT HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ SİTOTOKSİK ETKİSİ

Melikşah URAL

Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi

Pedodonti Anabilim Dalı Diş Hekimliğinde Uzmanlık Tezi

Kasım 2024

Danışman Dr. Öğretim Üyesi Özgür DOĞAN

ÖZET

Amaç: Çalışmamızın amacı, Çocuk Diş Hekimliği'nde endodontik tedavi prosedürlerinde sıklıkla kullanılan dört farklı biyoseramik içerikli kök kanal tamir materyalinin insan periodontal ligament hücrelerine olan sitotoksik etkisini karşılaştırmaktır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmamızda çekilmiş birinci küçük azı dışından elde edilen periodontal ligament fibroblast hücresi kullanıldı. Hücreler NeoMTA® 2, NeoPUTTY®, Biodentine™ ve MTAFlow™ White'a lamel üzerinde direkt ve indirekt temas ettirilerek MTT sitotoksosite testi yapıldı. Real Time PCR yöntemi ile 24. ve 48. Saat apoptozis gen ifadeleri düzeyleri tespit edildi. Çalışmada elde edilen bulguların istatistiksel değerlendirilmesinde, IBM SPSS istatistiksel paket yazılım programı kullanıldı.

Bulgular: MTT sitotoksosite sonuçlarına göre MTAFlow™ White grubunda direkt temasta istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük hücre canlılık aktivitesi saptanmıştır ($p \leq 0.05$). 48. Saatte NeoMTA® 2 dışında tüm materyallerde direkt temasta kontrole göre hücre canlılık aktivitesinin daha az olduğu bulunmuştur. NeoMTA® 2 hem direkt hem indirekt temasta hücre canlılık aktivitesi kontrol grubuna göre yüksek olan tek materyal olmuştur. NeoMTA® 2 grubunda direkt temas 48. Saatte proapoptotik belirteçlerden caspase-3 gen ifadesi kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşüktü ($p \leq 0.01$).

Sonuç: NeoMTA® 2 hem MTT sitotoksosite testinde hem Real Time PCR apoptozis gen belirteçlerine göre en az sitotoksosite gösteren materyal olmuştur. NeoMTA® 2, NeoPUTTY®, Biodentine™ ve MTAFlow™ White biyouyumlu materyaller olup daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: Biyoseramik, Real Time PCR, Sitotoksosite, Periodontal Ligament Hücresi, MTA

CYTOTOXIC EFFECT OF BIOCERAMIC ROOT CANAL REPAIR MATERIALS ON PERIODONTAL LIGAMENT CELLS

Melikşah URAL

Afyonkarahisar Health Science University

Faculty of Dentistry Department of Pediatric Dentistry Specialization Thesis

November 2024

Supervisor: Assist.Prof. Özgür DOĞAN

ABSTRACT

Objective: Our study aimed to compare the cytotoxic effect of four different bioceramic root canal repair materials commonly used in endodontic treatment procedures in Pediatric Dentistry on human periodontal ligament cells.

Materials and Methods: Periodontal ligament cells obtained from extracted first premolars were used in the study. MTT cytotoxicity test was performed by direct and indirect contact of cells with NeoMTA[®] 2, NeoPUTTY[®], Biodentine[™] and MTAFlow[™] White on coverslips. Apoptosis gene expression levels at 24th and 48th hours were determined by Real Time PCR method. IBM SPSS statistical package software program was used for statistical evaluation of the findings obtained in the study.

Results: Statistically significantly lower cell viability was detected in the MTAFlow White group in direct contact ($p \leq 0.05$). According to MTT cytotoxicity results, cell viability activity was found to be less than the control in direct contact in all materials except NeoMTA[®] 2 at 48 hours. NeoMTA[®] 2 was the only material with higher cell viability activity in both direct and indirect contact compared to the control group. In NeoMTA[®] 2 group, caspase-3 gene expression, one of the proapoptotic markers, was statistically significantly lower than the control at 48 hours of direct contact ($p \leq 0.01$).

Conclusion: NeoMTA[®] 2 showed the least cytotoxicity according to both MTT cytotoxicity test and Real Time PCR apoptosis gene markers. NeoMTA[®] 2, NeoPUTTY[®], Biodentine[™] and MTAFlow[™] White are biocompatible materials and longer-term studies are needed.

Keywords: Bioseramic, Cytotoxicity, Periodontal Ligament Cell, MTA

İÇİNDEKİLER

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK SAYFASI.....	ii
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT	v
KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ	ix
TABLolar DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
1.GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Periodonsiyum ve İşlevi	3
2.1.1. Periodontal Ligament	3
2.1.2. Periodontal Ligament Fibroblast Hücreleri.....	4
2.2. Kök Hücre	4
2.2.1. Farklılaşma Kapasitesine Göre Kök Hücreler.....	5
2.2.1.1. Totipotent Kök Hücreler	5
2.2.1.2. Pluripotent Kök Hücreler	5
2.2.1.3. Multipotent Kök Hücreler	5
2.2.1.4. Oligopotent Kök Hücreler.....	5
2.2.1.5. Unipotent Kök Hücreler	6
2.2.2. Kökenlerine Göre Kök Hücre Tipleri.....	6
2.2.2.1. Embriyonik Kök Hücreler.....	6
2.2.2.2.Yetişkin kök hücreler	6
2.2.3. Dental Dokulardan İzole Edilen Kök Hücreler	7
2.2.3.1. Dental Apikal Papilla Kökenli Kök Hücreler	7
2.2.3.2. Dental Folikül Kök Hücreleri	8
2.2.3.3. Eksfoliye Süt Dişlerinden İzole Edilen Kök Hücreler	8
2.2.3.4. Dental Pulpa Kaynaklı Kök Hücreler	8
2.2.3.5. Periodontal Ligament Kök Hücreleri:.....	9
2.2.3.6. Dental Dokulardan Elde Edilen Kök Hücrelerin Önemi.....	9
2.3. Biyoseramik İçerikli Kök Kanal Tamir Materyalleri.....	10
2.3.1. Mineral Trioksit Aggregat.....	11
2.3.2. NeoMTA® 2	13
2.3.3. NeoPUTTY®	14
2.3.4. Biodentine™	16
2.3.5. MTAFlow™ White	17

2.4. Biyouyumluluk ve Sitotoksosite	18
2.4.1. In Vitro Testler	18
2.4.2. Hücre Kültürü.....	19
2.4.3. Sitotoksosite testleri	19
2.4.4. Sitotoksosite Testlerinin Değerlendirilmesinde Kullanılan Yöntemler	20
2.4.5. Metabolizma Değerlendirme Testleri.....	20
2.4.6. MTT Testi	20
2.5. Apoptozis	21
2.5.1. Apoptozisde Caspaselarin Rolü	22
2.5.2. Apoptozisde Mitokondri ve Sitokrom-c İlişkisi.....	22
2.5.3. Bcl-2 Ailesi	24
2.5.4. p53'ün Rolü.....	24
2.6. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR).....	25
3. GEREÇ VE YÖNTEM	26
3.1. Gereçler	26
3.1.1. Çalışmada Kullanılan Biyoseramik İçerikli Materyaller ve İçerikleri	26
3.1.2. Hücre Kültür Çalışmasında Kullanılan Cihazlar, Sarf Malzemeler ve Kimyasallar	28
3.1.2.1. Cihazlar	28
3.1.2.2. Sarf Malzeme ve Kimyasallar	32
3.2. Yöntem	33
3.2.1. Çalışmada Kullanılan Biyoseramik İçerikli Kök Kanal Tamir Materyallerinin Hazırlanması	33
3.2.2. Periodontal Ligament Dokularının Elde Edilmesi	35
3.2.3. Kök Hücre İzolasyonu ve Kültürü	37
3.2.4. Hücrelerin Pasajlanması	38
3.2.5. Biyoseramik İçerikli Kök Kanal Tamir Materyallerinin Hücre Kültürüne Yerleştirilmesi	39
3.2.6. MTT Testi	40
3.2.7. RNA İzolasyonu İçin Örneklerin Hazırlanması	41
3.2.8. Real-Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) için RNA İzolasyonu	42
3.2.9. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi	43
3.2.10. Real-Time PCR Analizi	46
4. BULGULAR	49
4.1. Periodontal ligament hücre morfolojisi	49

4.1.1. P1'e Göre P2, P3 ve P4'te Periodontal Ligament Hücrelerinde Mezenkimal Kök Hücre Belirteçlerinin Gen İfadeleri	49
4.2. MTT Testi	52
4.3. Real Time PCR Bulguları	53
4.3.1. Periodontal Ligament Hücrelerinin Biyomateryallere İndirekt Olarak 24 ve 48 Saat Süreyle Maruz Bırakıldığında Apoptozis ile İlgili Belirteçlerin Gen İfadelerindeki Kat Değişimlerinin İstatistiksel Olarak Karşılaştırılması	53
4.3.1.1. Biyomateryallerin 24. Saat İndirekt Etkisinde Apoptozis Gen Belirteçleri	53
4.3.1.2. Biyomateryallerin 48. Saat İndirekt Etkisinde Apoptozis Gen Belirteçleri	57
4.3.2. Periodontal Ligament Hücrelerinin Biyomateryallere Direkt Olarak 24 ve 48 Saat Süreyle Maruz Bırakıldığında Apoptozis ile İlgili Belirteçlerin Gen İfadelerindeki Kat Değişimlerinin İstatistiksel Olarak Karşılaştırılması	60
4.3.2.1. Biyomateryallerin 24. Saat Direkt Etkisinde Apoptozis Gen Belirteçleri.....	60
4.3.2.2. Biyomateryallerin 48. Saat Direkt Etkisinde Apoptozis Gen Belirteçleri.....	63
4.4. NeoMTA® 2 İndirekt ve Direkt 24. ve 48. Saat Apoptozis Gen Belirteçleri	66
4.5. NeoPUTTY® İndirekt ve Direkt 24. ve 48. Saat Apoptozis Gen Belirteçleri	68
4.6. Biodentine™ İndirekt ve Direkt 24. ve 48. Saat Apoptozis Gen Belirteçleri.....	70
4.7. MTAFlow™ White İndirekt ve Direkt 24. ve 48. Saat Apoptozis Gen Belirteçleri	73
5. TARTIŞMA	76
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	92
7.KAYNAKLAR	93
EKLER.....	105

KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ

APAF-1	Apoptotik proteaz aktive edici faktör 1
Bax	Bcl-2-associated X protein
Bcl-2	B-cell lymphoma gene-2
CD	Clusters of Differentiation
CO ₂	Karbondioksit
cDNA	Kompleментар Deoksiribonükleik Asit
PDL	Periodontal Ligament
MEM	Minimum Essential Medium
MKH	Mezenkimal Kök Hücre
mL	mililitre
MTA	Mineral Trioksid Agregat
MTT	3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)-2,5-Difeniltetrazolyum bromür
®	Tescilli
°C	Santigrat derece
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
TNF- α	Tümer Nekroz Faktör-alfa
UV	Ultraviyole
μ L	mikrolitre
g	Gravite (Göreceli Santrifüj Kuvveti)
GAPDH	Gliseraldehid 3-Fosfat Dehidrogenaz
qPCR	Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 3.1. Kullanılan biyoseramik materyaller; içeriği, tipi/uygulama şekli ve üretici firmaları.

Tablo 3.2. Kullanılan cihazlar

Tablo 3.3. Kullanılan sarf malzeme ve kimyasallar

Tablo 3.4. cDNA sentezinde kullanılan kimyasallar ve miktarları

Tablo 3.5. Kullanılan primerler ve özellikleri

Tablo 3.6. RT-PCR reaksiyon bileşenleri ve miktarları

Tablo 3.7. RT-PCR analiz aşamaları

Tablo 4.1. P1'e göre P2, P3 ve P4'te ki Periodontal hücrelerinde mezenkimal kök hücre belirteçlerinin gen ifadelerinin istatistiksel olarak karşılaştırılması

Tablo 4.2. İndirekt ve direkt uygulamalarda MTT analiz sonuçlarının grup içinde karşılaştırılması.

Tablo 4.3. İndirekt uygulamalarda MTT analiz sonuçlarının gruplar arasında karşılaştırılması.

Tablo 4.4. Direkt uygulamalarda MTT analiz sonuçlarının gruplar arasında karşılaştırılması.

Tablo 4.5. Periodontal ligament hücrelerinin biyomateryallere indirekt olarak 24 saat süreyle maruz bırakıldığında apoptozis belirteçlerin gen ifadelerindeki kat değişimlerinin istatistiksel olarak karşılaştırılması

Tablo 4.6. Periodontal ligament hücrelerinin biyomateryallere indirekt olarak 48 saat süreyle maruz bırakıldığında apoptozis belirteçlerin gen ifadelerindeki kat değişimlerinin istatistiksel olarak karşılaştırılması

Tablo 4.7. Periodontal ligament hücrelerinin biyomateryallere direkt olarak 24 saat süreyle maruz bırakıldığında apoptozis ile ilgili belirteçlerin gen ifadelerindeki kat değişimlerinin istatistiksel olarak karşılaştırılması

Tablo 4.8. Periodontal ligament hücrelerinin biyomateryallere direkt olarak 48 saat süreyle maruz bırakıldığında apoptozis ile ilgili belirteçlerin gen ifadelerindeki kat değişimlerinin istatistiksel olarak karşılaştırılması

Tablo 4.9. Periodontal ligament hücrelerinin NeoMTA[®] 2'ye direkt ve indirekt olarak 24 ve 48 saat süreyle maruz bırakıldığında apoptozis ile ilgili belirteçlerin gen ifadelerindeki kat değişimlerinin istatistiksel olarak karşılaştırılması

Tablo 4.10. Periodontal ligament hücrelerinin NeoPUTTY[®]'e direkt ve indirekt olarak 24 ve 48 saat süreyle maruz bırakıldığında apoptozis ile ilgili belirteçlerin gen ifadelerindeki kat değişimlerinin istatistiksel olarak karşılaştırılması

Tablo 4.11. Periodontal ligament hücrelerinin Biodentine[™]'e direkt ve indirekt olarak 24 ve 48 saat süreyle maruz bırakıldığında apoptozis ile ilgili belirteçlerin gen ifadelerindeki kat değişimlerinin istatistiksel olarak karşılaştırılması

Tablo 4.12. Periodontal ligament hücrelerinin MTAFlow[™] White'a direkt ve indirekt olarak 24 ve 48 saat süreyle maruz bırakıldığında apoptozis ile ilgili belirteçlerin gen ifadelerindeki kat değişimlerinin istatistiksel olarak karşılaştırılması

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Periodontal Ligament

Şekil 2.2. NeoMTA® 2

Şekil 2.3. NeoPUTTY®

Şekil 2.4. Biodentine™

Şekil 2.5. MTAFlow™ White

Şekil 2.6. Apoptozis diyagramı

Şekil 3.1. Çalışmada kullanılan biyoseramik içerikli kök kanal tamir materyalleri: Biodentine™, NeoPUTTY®, NeoMTA® 2 ve MTAFlow™ White

Şekil 3.2. Karbondioksitli inkübatör

Şekil 3.3. Santrifüj cihazı

Şekil 3.4. Mikrosantrifüj cihazı

Şekil 3.5. Çalkalamalı su banyosu

Şekil 3.6. Laminer akışlı kabin

Şekil 3.7. Mikroskop

Şekil 3.8. A) NeoMTA® 2 toz ve likit formunda karıştırılmaya hazır, B) Plastik doku gömme kalıbı içerisine konulmuş NeoMTA® 2

Şekil 3.9. Önceden karıştırılmış hazır formda bulunan NeoPUTTY®

Şekil 3.10. Biodentine™ kapsülünün içerisine likidi eklendikten sonra amalgamatörle karıştırılıp plastik doku gömme kalıbı içerisine yerleştirildi

Şekil 3.11. A) MTAFlow™ White üretici talimatlarına göre hazırlanması, B) MTAFlow™ White sertleşmesi için plastik disk içerisine yerleştirilmesi

Şekil 3.12. A) Ortodontik amaçla çekilen küçük azı dişinin gingival ve apikal üçlüsündeki dokular kontaminasyonun olmaması için uzaklaştırılmıştır, B) PDL dokusunun bistüri ile kazınması

Şekil 3.13. Taşıma solüsyonu içerisindeki PDL dokusunun görüntüsü

Şekil 3.14. A) PDL dokularının taşıma solüsyonu içerisinden pipet ile çekilmesi, B) Dokuların 6 well plate besiyerine alınması

Şekil 3.15. Dokuların inkübatöre yerleştirilmeden önceki görüntüsü

Şekil 3.16. MTAFlow™ White 6 well plate içerisine hücre lamelleriyle birlikte yerleştirildi.

Şekil 3.17. Biodentine™ 6 well plate içerisine hücre lamelleriyle birlikte yerleştirildi

Şekil 3.18. 96 kuyucuklu plakanın mikropilaka okuyucu öncesi hazırlanması

Şekil 3.19. A) 2 faz halinde altta DNA üstte RNA içeren ve ortada beyaz katman içeren yapı, B) RNA'ların spin kolona aktarılması, C) Spin kolonda altta kalan sıvının uzaklaştırılması

Şekil 3.20. Gradient PCR primer görüntüleri

Şekil 4.1. PDL fibroblast hücrelerinin mikroskop görüntüsü

BİYOSERAMİK İÇERİKLİ KÖK KANAL TAMİR MATERYALLERİNİN PERİODONTAL LİGAMENT HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ SİTOTOKSİK ETKİSİ

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Biyoseramik materyaller dokuların onarımı ve yenilenmesi için tasarlanmış olup, günümüzde diş hekimliği tedavi protokollerinin birçoğunda kullanılmaktadır. Biyoaktif, biyouyumlu, üstün fizikokimyasal özellikler gösteren biyoseramik dental materyallerin; süt ve sürekli dişlerin vital pulpa tedavilerinde, apeksifikasyon tedavisinde, kök kanal obtürasyonunda, rejeneratif endodontide, furkasyon ve kök perforasyonu onarımlarında uygulandığında başarılı sonuçlar ortaya çıkması ile günümüzde çocuk diş hekimliğinde kullanımı yaygınlaşmıştır (1,2).

Biyoseramik içerikli kök kanal tamir materyalleri kimyasal olarak kalsiyum silikat ve kalsiyum fosfat içerikleri bir araya getirilerek kullanıma sunulmuştur. Bu materyaller içerisinde ilk olarak tanıtılan ve hidrolik kalsiyum silikat içerikli olan Mineral Trioksit Aggregate (MTA), 1990'lı yılların başında diş hekimliği uygulamalarına dahil olmuştur ve günümüzde özellikle endodonti ve pedodonti pratiğinde rutin kullanıma sahip bir materyaldir. Yüksek biyouyumluluk göstermesi, sızdırmazlık özelliğinin iyi olması, pulpa ve periradiküler dokularda rejenerasyon potansiyelini artırması MTA'nın dental tedavilerde altın standart olarak kabul edilmesini sağlamıştır (3). Bu avantajlarının dışında kromda renk değişikliğine sebep olması, manipülasyon zorluğu ve hedef bölgeye yerleştirme zorlukları yeni materyal arayışlarına yol açmıştır.

Son zamanlarda çok sayıda MTA içerikli kök kanal tamir materyali piyasaya sürülmüştür. Yeni materyallerde; manipülasyon zorluğunu ve heterojen karışma ihtimalini gidermek amacıyla önceden karıştırılmış macun formu olan materyaller üretilmiştir. Toz-likit formunda olan materyallerde de farklı toz-likit oranlarında karıştırarak ve materyalin kıvamını değiştirerek uygulama uçlarında farklılıklarla endikasyona göre yerleştirme kolaylığı sağlamak hedeflenmiştir (4).

NeoMTA Plus®'tan daha sonra piyasaya sunulan NeoMTA® 2 üretici firmaya göre geliştirilmiş formülü kolay manipülasyonuna ve yerleştirilmesine olanak

sağlamaktadır. Krona renklenmeye sebebiyet veren bizmut oksit yerine radyoopasite verici olarak tantalum oksit içerir. Değişen toz likit oranına göre farklı kıvamlarda hazırlanabildiği için farklı endikasyonlarda da kullanımı mümkündür (5). NeoMTA® 2 piyasaya yeni sürülen bir materyal olduğu için hakkındaki literatür bilgisi henüz sınırlıdır.

NeoPUTTY® trikalsiyum silikat esaslı önceden karıştırılmış macun kıvamında klinik uygulamaya hazır bir materyaldir. Kalsiyum silikat içerikli hidrofilik simanların karıştırılması esnasında heterojen kıvam oluşması dezavantajının ortadan kaldırılması amacı ile üretilmiştir (6).

Biodentine™ 2009 yılında MTA'nın dezavantajlarını gidermek üzere piyasaya dentin yerine geçen materyal olarak sunulmuş olup vital pulpa tedavileri, furkal ve kök perforasyon onarımı gibi çeşitli diş hekimliği uygulamalarında başarıyla kullanılmaktadır (7). Literatür incelendiğinde Biodentine™'in tedavilerdeki başarısı, yüksek biyouyumluluğu ve sert doku oluşumunu indüklemesi sebebiyle yeni geliştirilen biyoseramik içerikli materyallerle birlikte yürütülen çoğu çalışmada yer aldığı görülmüştür (8).

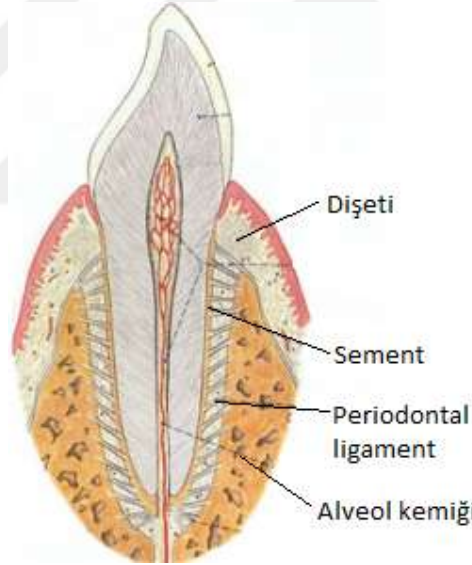
MTAFlow™ White kalsiyum silikat esaslı su bazlı bir jel ile karıştırılan yeni bir malzemedir. Önceki versiyonuna göre potansiyel renk değişikliğinin önüne geçmek için üretilmiştir. Malzemenin hidrasyonu için kullanılan su bazlı jel, malzemenin 'ince', 'kalın' ve 'macun' olmak üzere üç kıvamda kullanılabilme fırsatını sunmuştur (4).

Çalışmamızın amacı, Çocuk Diş Hekimliği'nde endodontik tedavi prosedürlerinde sıklıkla kullanılan dört farklı biyoseramik içerikli kök kanal tamir materyalinin insan periodontal ligament hücrelerine olan sitotoksik etkisini karşılaştırmaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Periodonsiyum ve İşlevi

Periodonsiyum; diş eti, periodontal ligament (PDL), sement ve alveoler kemikten oluşan bir yapıdır. Dişeti, alveoler kemiği çevreleyerek dişleri mine-sement bağlantısından saran bir destek dokudur ve diğer periodonsiyum dokularını korumakla görevlidir. PDL diş kökünü alveol kemiğine bağlayan çok sayıda damar ve hücre içeren bir dokudur. PDL dişlerin üzerine gelen çiğneme kuvvetlerinin kemiğe iletilmesini, dişin kemiğe bağlanmasını, tamir sürecini, beslenme ve duyu iletimini sağlamaktadır. Sement kök yüzeyini çevreleyen kalsifiye mezenşimal kökenli bir dokudur. Alveol kemiği, maksiller ve mandibular kemiğin diş soketlerini oluşturan ve dişleri destekleyen bölümüdür (9).



Şekil 2.1: Periodonsiyum

2.1.1. Periodontal Ligament

PDL diş köklerini çevreleyen damar ve hücrelerden zengin bir bağ dokusudur. Sement ve alveoler kemik arasında bulunur. PDL dişi alveol soketine bağlar. Destekleyici, bağlayıcı ve duysal işlevleriyle birlikte tamir ve rejenerasyon görevleri de bulunmaktadır. Aynı zamanda dişlerin alveol kemiğindeki konumunda sürmesini sağlayan hücreler, damarsal elemanlar, glikozaminoglikanların ve proteinlerin hücre dışı elemanları ile fizyolojik dengeyi sağlamaktadır (10).

PDL özelleşmiş heterojen hücreler içerir. Bu hücreler; kemiğe yakın yüzeyde osteoblast ve osteoklastlardan oluşur. Bağ dokusu içindeyse fibroblast, Hertwig epitelyal kök kınından köken alan Malessez epitel hücre artıkları, makrofajlar, farklılaşmamış mezenşimal hücreler, nöral elemanlar ve endotelial hücrelerden oluşurken diş kökü yüzeyinde ise sementoblastlardan oluşmaktadır (11).

PDL, ektomezenkimal hücrelerden oluşan kranyal nöral kretten orijin almaktadır. Kranyal nöral kretten oluşan dental folikül hücreleri, PDL hücrelerine farklılaşır. Ayrıca, sementoblast ve osteoblastlara farklılaşan progenitör hücreleri içerdiği de düşünülmektedir (12,13).

2.1.2. Periodontal Ligament Fibroblast Hücreleri

PDL fibroblastları iğ şeklindeki bağ dokusu hücreleridir. Fibroblastlar, PDL dokusunun devamlılığı, tamiri ve rejenerasyonunda önemli rol üstlenen temel ve baskın hücreleridir. Ayrıca PDL ile gingiva arasındaki bağ dokusu matriksinin ve periodonsiyumun oluşumunda rol aldıkları belirtilmiştir (14).

PDL mezenkimal kök hücrelerinin farklılaşması sonucu sement ve kemik benzeri dokular oluşturma potansiyellerinin olduğu bildirilmiştir (15,16). PDL kök hücreleri çekilmiş dişlerin kök yüzeylerinden elde edilerek periodonsiyum benzeri doku ve hücrelere farklılaşabilirler. PDL kaynaklı progenitör hücrelerin nöral krest orjinlerinden dolayı, adiposit ve nöral diferansiyasyon kazandıkları ve periodontal rejenerasyonun dışında hücresel tedavilerde kullanılabileceği tahmin edilmektedir (17,18).

2.2. Kök Hücre

Tekrar tekrar bölünebilme ve hücrenin temel karakteristik özelliklerini taşıyan hücreler oluşturabilme özelliğine sahip hücre grubuna kök hücre denilmektedir (19,20). Hücreler arası sinyalizasyonla, birden fazla hücre grubuna farklılaşıp, dönüşebilmektedir (21). Kök hücreler gerekli olan hücrelere doku ve organların hasarı veya ölümü durumunda dönüşebilir, özelleşebilir ve bu özelliklerine sahip olmasından dolayı tedavi seçeneği olarak büyük bir araştırma alanı oluşturmaktadır (22–25).

Kök hücreler laboratuvarında tanınmalarını sağlayan bazı karakteristik özelliklere sahiptirler. Kök hücrelere özgün olarak bazı hücre yüzey belirteçleri vardır. Farklılaşma kümeleri ya da Clusters of Differentiation (CD) belirteçleri olarak bilinir. Bazı enzimler kök hücrelerde normal hücrelerden daha fazla miktarlarda sentezlenmektedir. Örneğin

alkalen fosfataz ve telomeraz gibi enzimler kök hücrelerde daha aktiftir. Kök hücreler bazı transkripsiyon faktörlerini devamlı çoğalabilme potansiyellerini koruyabilmek amacıyla daha fazla eksprese ederler. In vitro ortamda uyarılarak kök hücrelerin farklı hücre tiplerine dönüşebildikleri belirlenebilir (26–28).

2.2.1. Farklılaşma Kapasitesine Göre Kök Hücreler

Kök hücreler, farklılaşma derecelerine göre; totipotent, pluripotent, multipotent, oligopotent ve unipotent olmak üzere beş grupta sınıflandırılmaktadır (29).

2.2.1.1. Totipotent Kök Hücreler

Zigotun ilk birkaç bölünmesi ile oluşan, tüm vücut hücrelerine farklılaşabilme potansiyeline sahip ve sınırsız farklılaşma yeteneği olan kök hücrelerdir. Totipotent kök hücreler; embriyo, embriyo sonrası tüm doku ve organlar ile embriyo-dışı membran ve organları oluşturabilen kök hücreler olarak bilinmektedir (30).

2.2.1.2. Pluripotent Kök Hücreler

Totipotent hücrelerin devamıdır. Embriyonik kök hücreler ve embriyonik kök hücre farklılaşmasının başlangıç aşamalarında oluşan mezoderm, endoderm ve ektoderm tabakalarından oluşan kök hücrelerdir.

Tüm hücre tiplerine farklılaşabilmektedir (29).

2.2.1.3. Multipotent Kök Hücreler

Kemik iliği, kas, göz, sinir, karaciğer ve deri gibi dokularda bulunur. Elde edildikleri doku ve organa dönüşebilme yeteneğine sahip olan kök hücre topluluğudur (31). Multipotent kök hücreler; ölen ya da hasar gören hücreleri yenileme özelliğine sahip, yetişkinlerde farklılaşmış dokularda bulunan farklılaşmamış kök hücrelerdir. Bölünebilme ve kendini yenileyebilme özellikleri vardır (32).

2.2.1.4. Oligopotent Kök Hücreler

Mevcut olduğu doku içerisinde birkaç hücre grubuna farklılaşma özelliği olan kök hücrelerdir. Örnek olarak yetişkin lenfoid veya miyeloid kök hücreler bu grupta sayılabilir (29).

2.2.1.5. Unipotent Kök Hücreler

Sadece kendi türünde hücreler üretebilen bu hücreler, kendini yenileyebilme özelliği sayesinde unipotent kök hücre olarak adlandırılmaktadır. Yetişkin kas hücreleri unipotent kök hücrelerdir (29).

2.2.2. Kökenlerine Göre Kök Hücre Tipleri

2.2.2.1. Embriyonik Kök Hücreler

Mezodermal, ektodermal ve endodermal kökenli herhangi bir vücut hücresine farklılaşabilen, sınırsız bölünme yeteneğine sahip, 'ölümsüz' olarak da tabir edilen hücrelerdir. Embriyonik kök hücreler pluripotent kök hücre grubundadır (33).

2.2.2.2. Yetişkin kök hücreler

Yetişkin kök hücreler, ölmekte olan hücreleri yenilemek ve hasarlı dokuları tamir etmek için hücre bölünmesiyle çoğalan, farklılaşmamış totipotent veya multipotent hücrelerdir. Yetişkin kök hücrelerin canlı organizmadaki birincil rolleri, bulundukları dokuyu korumak ve onarmaktır (34).

Yerleşim ve farklılaşma özelliklerine göre hematopoetik kök hücreler ve mezenkimal kök hücreler olarak iki alt gruba ayrılmaktadır.

Hematopoetik kök hücreler: Bütün kan hücrelerine farklılaşabilme özelliği olan hematopoetik kök hücreler, yetişkin kök hücre grubunda yer almaktadır. Hematopoetik kök hücreler embriyonik dönemde oluşur ve doğumdan sonra kemik iliğine yerleşmektedir. Çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılan hematopoetik kök hücrelerin transplantasyonu için sıklıkla kemik iliği, periferik kan tercih edilirken kordon kanı da üçüncü bir seçenek olarak kullanılmaktadır (35).

Mezenkimal kök hücreler: Erişkin kök hücre çalışmalarında Mezenkimal Kök Hücreler (MKH) öne çıkmıştır. Hematopoetik olmayan ve kemik iliğinden köken alan kök hücreler mezenkimal dokulara farklılaşabildiğinden mezenkimal kök hücreler olarak anılmaktadır (36,37).

MKH başta kemik iliği olmak üzere, periost, trabeküler kemik, yağ, kıkırdak, iskelet kası, akciğer ve diş kaynaklı dokulardan da elde edilebilmektedir (38). MKH morfolojik olarak fibroblastlara benzerler, iğ şeklinde, simetrik çekirdekli hücrelerdir (39). Mezenkimal kök hücrelerin tanımlaması; kültür kabına adhezyon gösterme,

multipotent farklılaşma kapasitesi, spesifik yüzey antijenlerinin ekspresyonu ile yapılmaktadır (39).

Multipotent mezenkimal kök hücreler tıp alanındaki terapötik potansiyelleri ve çeşitli rejeneratif prosedürlerdeki başarıları nedeni ile her geçen gün ilgi görmektedirler. Bu alanda kaydedilen aşamalar ile birlikte çalışma sonuçlarını karşılaştırmak ve standardizasyonu sağlamak amacıyla Uluslararası Hücresel Tedavi Derneği, MKH'leri tanımlamak için minimal kriterler önermiştir (39). Bunlar;

- 1) Standart kültür koşullarında MKH'ler plastik yüzeye yapışabilmeli
- 2) CD105, CD73 ve CD90 gibi spesifik yüzey antijen ekspresyonu sağlayabilmeli
- 3) İn vitro ortamda osteoblast, adiposit ve kondroblastlara farklılaşabilmelidir (39).

Dental dokulardan elde edilen birçok kök hücrenin multipotent özellikte MKH karakterinde olduğu bildirilmiştir (40). MKH'lerin tanımlanmasında çeşitli belirteçler dikkat çekmektedir. Farklı dental doku ve gelişim dönemlerinde elde edilen dental kök hücreler, kemik iliği MKH belirteçleri olan CD13, CD29, CD44, CD59, CD73, CD90, CD105, CD146 ve STRO-1'i ekspres ederken, hematopoetik belirteçler olan CD14, CD24, CD34, CD45, CD19 ve HLA-DR'yi ekspres etmemektedir (41,42).

2.2.3. Dental Dokulardan İzole Edilen Kök Hücreler

Dental dokulardan izole edilen kök hücreler multipotent özellikte MKH karakterindedir. Dental dokulardan izole edilen Dental Apikal Papilla Kökenli Kök Hücreler, Dental Folikül Kök Hücreleri, Eksfoliyeye Süt Dişlerindeki Kök Hücreler, Dental Pulpa Kök Hücreleri ve Periodontal Ligament Kök Hücreleri bu gruba dahildir (43). Dental kaynaklı MKH'ler multipotenttir, bölünebilir ve kendini yenileyebilirler. Osteojenik, kondrojenik, adipojenik, miyojenik ve nörojenik farklılaşma potansiyeline sahip olup pulpa kaynaklı olan kök hücreler odontoblastlara da farklılaşabilir (42).

2.2.3.1. Dental Apikal Papilla Kökenli Kök Hücreler

Kök gelişimi tamamlanmamış genç dişlerde apikal papilla bulunmakta ve pulpaya gevşek bir bağ dokusu ile bağlanmaktadır. İlk olarak 2006 yılında izole edilen dental apikal papilla kökenli kök hücreler, doku mühendisliği alanında yapay diş kökü oluşturmak amacıyla kullanılmıştır (44). Kök gelişimi tamamlanmamış genç dişlerde kök

gelişiminin tamamlanması sırasında yoğun proliferasyon ve farklılaşma olayları meydana gelmektedir. Apikal papilla dokusundan kök hücre izolasyonu sadece gelişimin erken evresindeki dişlerde çekim endikasyonu bulunması durumunda mümkündür. Çünkü kök gelişiminin tamamlanmasıyla apikal papilla ortadan kalkar (45,46). Dental apikal papilla kökenli kök hücrelerin kök dentininin formasyonunda yer alan primer odontoblast kaynağı olduğu, formasyon tamamlandığında ortadan kalktığı ve gelişim sonrası hayat boyu üretilen dentinden ise dental pulpa kök hücrelerinin sorumlu olduğu düşünülmektedir (47). Dental pulpa kök hücrelerine kıyasla daha fazla dentin oluşturabilme özelliği gösterdikleri bildirilmiştir (48).

2.2.3.2. Dental Folikül Kök Hücreleri

Dental folikül, gelişmekte olan üçüncü büyük azı dişi çekimi sırasında izole edilebilen diş germi dokusudur (49). Gevşek bir bağ dokusu yapısında olan ve gelişmekte olan dişleri çevreleyen dental folikül, osteogenezis ve osteoklastogenezisi düzenleyerek diş sürmesinde önemli bir rol oynamaktadır (50). Sement, kemik ve periodontal bağ dokularının dental folikülden oluşması folikülde bulunan kök hücreler hakkında fikir vermektedir. Periodontal dokunun öncülü olan dental folikül kök hücrelerinin, periodontal rejenerasyon için iyi bir kaynak olabileceği düşünülmektedir (51). Dental folikül kök hücrelerinin kemik iliği kök hücrelerine göre daha yüksek proliferasyon hızına ve osteojenik farklılaşma potansiyeline sahip olduğu belirtilmiştir (52).

2.2.3.3. Eksfoliye Süt Dişlerinden İzole Edilen Kök Hücreler

Süt dişlerinde pulpa dokusu bol damarlıdır ve zengin bir erişkin kök hücre kaynağıdır. Eksfoliye süt dişlerinden izole edilen kök hücreler, yetişkinlerin dental pulpasından elde edilen kök hücrelerle karşılaştırıldığında daha yüksek proliferatif aktiviteye sahiptirler. Bu özellikleri sayesinde daha fazla odontojenik ve osteojenik farklılaşma gösterirler. Elde edilmesi ve kültürü nispeten daha kolay olan Eksfoliye süt dişlerinden izole edilen kök hücreler, rejeneratif özelliklerini, kriyoterapi ile dondurulduktan iki yıl sonrasına kadar korurlar (53).

2.2.3.4. Dental Pulpa Kaynaklı Kök Hücreler

Pulpanın perivasküler bölgesinde yer alan dental pulpa kaynaklı kök hücreler, 2000'li yıllarda Gronthos ve arkadaşları tarafından 3. molar dişlerden izole edilmiştir (41). Morfolojik olarak incelendiğinde fibroblast benzeri yapı göstermektedir (54). Yetişkin dental pulpasında çeşitli progenitör hücre popülasyonu bulunmaktadır ve

hücreler yüksek plastisiteye sahip multipotent özelliktedirler (55). Dental pulpa kök hücreleri odontojenik, osteojenik, kondrojenik, adipojenik, vasküler ve nörojenik hücrelere farklılaşabilme yeteneğine sahiptirler (56). Dental pulpa kök hücrelerinin tedavide kullanılmasının avantajları ise; kolay elde edilebilmeleri, etik bir sorun yaşanmaması, yaşam sürelerinin uzun olması, farklılaşma yeteneklerinin yüksek olması, kültür ortamında kolay çoğaltılabilmesi ve elde edilen kök hücre ekstraksiyonlarının yüksek verimli olması olarak sıralanabilir (57). Yaşlanma ile birlikte dental pulpa kök hücrelerinin boyutlarında artış gözlenirken, proliferasyon ve osteojenik diferansiyon yeteneklerinde azalma gözlemlendiği literatürde yapılan çalışmalarla belirlenmiştir (58,59).

2.2.3.5. Periodontal Ligament Kök Hücreleri:

Temel olarak fibroblastlardan oluşan periodontal ligament kök hücreleri (PDL-KH), periodontal rejenerasyonda önemli rol oynar (11).

PDL-KH, çekilmiş dişlerin kök yüzeylerinden elde edilebilen hücrelerdir. PDL-KH, ilk defa 2004 yılında tanımlanmıştır ve bu hücrelerin de kök hücre özelliği taşıdığı, 2004 yılında Seo ve ark., tarafından rapor edilmiştir. Aynı zamanda PDL-KH'lerin sementoblast benzeri yapılara, adipositlere, kollajen üreten hücrelere farklılaşabileceği bildirilmiştir (60). Periodontal doku rejenerasyonunda yer alan başlıca kök hücre tiplerindendir, çünkü sadece in vivo olarak sement ve PDL benzeri dokuları yenilemekle kalmaz, aynı zamanda morfoloji ve yapı bakımından da diğer kök hücre tiplerine oranla periodonsiyumda daha iyi organizasyon gösterirler (60). PDL-KH'lerin rejeneratif kapasitesi ile ilgili yapılan araştırmalarda rejeneratif kapasitesinin kemik iliği ve pulpa kaynaklı kök hücrelerden fazla olduğu belirtilmiştir (61–63).

2.2.3.6. Dental Dokulardan Elde Edilen Kök Hücrelerin Önemi

Multipotent, dental kökenli MKH'lerin farklılaşma kapasiteleri genel anlamda kemik iliğinden izole edilen kök hücrelere benzer, farklı olarak odontojenik farklılaşma özelliğine sahip tek kök hücre tipi dental kaynaklı MKH'lerdir (60).

MKH'ler ile ilgili yapılan araştırmalar, bu hücre gruplarının rejeneratif hücre yenilenmesi, doku onarımı ve yara iyileşmesine katkıda bulunduklarını ve tıp alanındaki tedavi ve araştırmalar için güvenli bir kaynak oluşturduklarını ortaya koymaktadır (64,65).

2.3. Biyoseramik İçerikli Kök Kanal Tamir Materyalleri

Biyoseramik materyaller biyoaktif özelliktedir (66). Bir materyalin biyoaktif olarak değerlendirilebilmesi için olumlu konak cevabı, uygulandığı dokuda biyolojik bir cevap oluşturabilmesi ve doku ile materyal arasında bağ oluşumunu teşvik edebilmesi gerektiği belirtilmektedir (67). Biyoaktif materyaller kalsiyum silikat, kalsiyum fosfat, cam seramik, hidroksiapatit içermektedirler. Biyoaktif materyaller biyouyumlu olmaları, üstün kimyasal ve boyutsal özelliklere sahip olmaları sebebiyle diş hekimliği alanında tercih edilebilirliği artmaktadır (68).

Biyoaktif materyallerle canlı doku ile arasında stabil bir bağ oluşmakta; bu durum hücre farklılaşması, doku onarımı, osteogenez ve sementogenezde pozitif rol oynamaktadır (69,70). Biyoaktif materyallerin; biyolojik ortamda bazı önemli biyolojik cevapları, biyokimyasal ve biyofiziksel reaksiyonları uyardıkları; yüzeylerinde hidroksiapatit benzeri kristaller oluşturarak vre dokularla bütünlük sağladıkları bildirilmektedir (71). Bu kristallerin materyallerin yüzeyinde, materyal dentin ara yüzeyinde ve dentin tübülleri içerisinde oluştuğu; bu sayede materyallerin iyi bir adezyon ve tıkama özelliği gösterdikleri belirtilmektedir (71,72).

Biyoseramiklerin diş hekimliğinde kullanılmasının iki önemli avantajı vardır;

1. Biyoseramikler dokular için toksik değildir ve biyouyumludur. Büzülme göstermeyen ve biyolojik ortamlarda stabil kalabilen materyallerdir. Aynı zamanda sertleşme esnasında yüksek pH sayesinde güçlü antibakteriyel etki gösterir (73).

2. Biyoseramikler, biyolojik hidroksiapatit ile benzerliklerinden dolayı mükemmel biyouyumluluğa sahiptir bu nedenle işlem sırasında oluşan taşkın dolumlarda ya da tedavi sırasında enflamatuar doku cevabı meydana getirmezler (73).

Biyoseramik içerikli kök kanal tamir materyalleri ile ilgili araştırmalar son 20 yılda hız kazanmıştır. Farklı içerik ve formülasyonlarda toz/likit ya da önceden karıştırılmış pat formlarında çeşitli biyoseramik içerikli endodontik materyaller geliştirilmiştir (74).

İlk tanıtıldığında kök ucu dolgu materyali olarak belirtilen biyoseramik içerikli kalsiyum silikat esaslı materyal MTA özellikle tamir materyali olmak üzere çeşitli uygulamalar için fiziksel, kimyasal, biyolojik özellikleri göz önüne alındığında altın standart olarak kabul grmştir (75).

2.3.1. Mineral Trioksit Agregat

Klinik başarısı yüksek olan ve günümüze kadar hem klinik hem deneysel anlamda en çok kullanılan biyoseramik materyallerden biri olan MTA, 1993 yılında Mahmud Torabinejad ve ark. tarafından Loma Linda Üniversitesi'nde geliştirilip diş hekimliği literatürüne girmiştir. 1998 yılında Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) onayını almış olup ProRoot MTA® (Tulsa Dental Products, Tulsa, OK, ABD) adı ile piyasaya sürülmüştür (76).

Piyasaya ilk çıktığı dönemde lateral kök perforasyon tamiri ve kök ucu dolgu materyali olarak tanıtılmıştır. Günümüzde ise süt ve daimi dişlerin pulpa kuafajı, pulpotomi tedavileri, daimi diş germi olmayan süt dişlerinin ve daimi dişlerin kök kanal dolgusu, internal ve eksternal rezorpsiyonların tamiri, iatrojenik perforasyonların tamiri, apeksogenezis, apeksifikasyon, rejeneratif endodontik tedavi ve apikal cerrahi gibi çeşitli tedavi prosedürlerinde kullanılmaktadır (75).

Portland simanı, MTA'nın temel bileşenini oluşturur ve içeriğinde trikalsiyum silikat, dikalsiyum silikat, tetrakalsiyum alüminoferrit ve dehidrate kalsiyum sülfat vardır. Çalışmalarda MTA'nın ağırlık olarak %75 Portland siman, %20 bizmut oksit ve %5 alçı taşından oluştuğu bildirilmiştir (77). Portland simanı MTA'ya oranla çok daha fazla ağır metal içermektedir ve daha az saflaştırma işleminden geçerek üretilmektedir. Yapılan bir çalışmada MTA'nın içeriğinde bizmut oksit bulundurması ve potasyum içermemesinin MTA ve Portland simanın kimyasal yapısındaki esas farkı oluşturduğu bildirilmiştir (78).

MTA; Trikalsiyum silikat, dikalsiyum silikat, trikalsiyum alüminat, tetrakalsiyum alüminoferrit ve alçıtaşı içerirken radyoopasite verici olarak bizmut oksit ve az miktarda magnezyum oksit, kalsiyum oksit, potasyum ve sodyum sülfat içermektedir (78). Gri ve beyaz olmak üzere iki formu mevcuttur. İlk piyasaya sürülen Gri MTA'da diş kronunda sebep olduğu renklenme sorununu çözmek için yapısındaki tetrakalsiyum alüminoferritin formülünden çıkarılmış ve kalsiyum silikat oranı artırılarak beyaz MTA olarak kullanılmaya başlanmıştır (79). Daha küçük partiküllerden oluşan beyaz MTA; daha pürüzsüz bir yapıya sahip olduğu için, gri MTA'ya göre kolay uygulanabilmektedir (80).

MTA tozu, su ile karıştırıldığında yaklaşık 3 saatte sertleşen kolloidal jel haline gelmektedir. MTA'nın diğer materyallere göre uzun sürede sertleşmesi klinik olarak bir dezavantaj olarak görülse de, buna bağlı olarak daha az boyut kaybına uğraması mikrosızıntıyı önlemesi açısından lehine bir özellik olarak değerlendirilmiştir (81). MTA

düşük çözünürlük özelliğine sahiptir, ayrıca hidrofilik özelliğinden dolayı çevre dokudaki nem varlığı bu materyalin kimyasal reaksiyonu için bir aktivatör vazifesi görmektedir. Radyoopasitesinin ise dentinden biraz daha fazla olduğu bildirilmektedir (82).

MTA karıştırıldığında pH değeri 10,2 olarak görülürken sertleşme reaksiyonundan sonra pH'sının 12,5'e yükseldiği bildirilmektedir (81). Maddenin mikroorganizmalara karşı olan antibakteriyel etkisinin bu yüksek pH özelliğine bağlı olduğu düşünülmektedir. MTA'nın kalsiyum hidroksit ile benzer alkali pH derecelerine sahip olması, her iki materyalin de sert doku oluşumunu indüklemeye özelliğini arttırdığını düşündürmektedir (81,83). Materyalin etki mekanizmasıyla ilgili olarak temelde kalsiyum hidroksit içermediği, yapısındaki kalsiyum oksitin doku sıvıları ile teması sonucu kalsiyum hidroksite dönüştüğü şeklinde görüşler olduğu gibi, materyalin saldırdığı temel iyonun kalsiyum olduğu ve salınan kalsiyumun doku sıvılarındaki fosfat iyonlarıyla reaksiyona girerek hidroksiapatit oluşumu gözlemlendiği şeklinde farklı görüşler de mevcuttur (84,85). MTA'nın doku tarafından iyi tolere edilebilir bir materyal olduğu, aynı zamanda hücre farklılaşması ve aktivasyonunu uyarak sert doku oluşumunu indüklediği tespit edilmiştir. MTA'nın oluşturduğu dentinogenez, materyalin sızdırmazlık özelliğinin, yüksek doku uyumunun ve bazik karakterde olmasının bir sonucu olduğu belirtilmektedir (81,86,87).

MTA biyouyumluluk ve bakteriyel sızdırmazlık gibi özellikleri sayesinde pulpanın korunması, tamiri ve canlılığının devamını sağlamada ideal bir materyal olarak ön plana çıkmaktadır. Sertleşme süresinin uzun olması, taşıma ve yerleştirme güçlüğü ve yüksek maliyet gibi dezavantajlarının klinik kullanımı sınırlandırdığı bildirilmekte ve bu nedenlere bağlı olarak alternatif materyal arayışları devam etmektedir (76,88,89)

MTA'nın olumsuz özelliklerini gidermek üzere piyasaya kök kanal tamir malzemeleri adı altında birçok biyoaktif endodontik siman çıkmıştır. Bu materyaller MTA ile biyoaktivite açısından benzer özellikte kalsiyum silikat bazlı yapıdadır ve MTA'nın olumsuz özelliklerini elimine edecek şekilde oldukları belirtilmiştir (90,91).

2.3.2. NeoMTA® 2



Şekil 2.2: NeoMTA® 2

NeoMTA® 2 (NuSmile, Houston, TX, USA), trikalsiyum silikat ve dikalsiyum silikat ile inorganik bileşen içeren toz kısım ve su bazlı likitten oluşan yeni bir toz-likit sistemidir. Toz içeriğinde trikalsiyum silikat, dikalsiyum silikat, tantalyum oksit, kalsiyum sülfat; likit içeriğinde ise distile su ve polimer bulunmaktadır. Bizmut oksit varlığının diş dokularında renklenme yapması nedeniyle radyoopasite sağlamak amacıyla NeoMTA® 2 içeriğine tantalum oksit eklenmiştir (5).

Kalsiyum hidroksit ve diğer kalsiyum silikat içerikli simanlar gibi Ca^{+2} ve OH⁻ iyonlarını salmasıyla sert doku yapımını uyaran biyoaktif bir materyaldir. İyileşme sürecini dentindeki hidroksiapatiti indükleyerek sağlar. NeoMTA® 2, büzülmeye karşı dirençli ve çözünürlüğü düşük olması sebebiyle bakteriyel sızdırmazlık sağlayan bir biyomateriyaldir (90).

NeoMTA® 2'nin 14 dakikalık çalışma süresi olduğu fakat yoğunluğu azaltılarak karıştırıldığında bu sürenin 21 dakikaya kadar uzadığı bildirilmiştir. Çalışma zamanı uzatılmak istenirse karıştırılan malzemenin üzerine nemli bir örtü kapatılabilir ya da karışıma yeniden likit ilave edilebilir. Karıştırma işlemi likitin emilmeyeceği, cam veya dayanıklı bir karıştırma kağıdı gibi bir materyal üzerinde, plastik veya metal bir spatül yardımıyla yapılmalıdır. NeoMTA® 2'nin son sertleşmesi 14-70 dakika aralığındadır. Materyal kaviteye taşınınca, nemli pamuk pelet veya amalgam fulvarı ile kaviteye adaptasyonu sağlanılabilir. Apeksifikasyon tedavisinde ise ters çevrilmiş gutta perka ya da paper point biyomateriyalin kök ucuna iletilmesinde kullanılabilir (92).

Klinik kullanım alanları; pulpa kaplama tedavileri (indirekt ve direkt pulpa kaplaması), pulpotomi, kök ucu retrograt dolgu materyali ve apeksifikasyon tedavileridir. Pulpotomi tedavilerinde ya da kaide olarak kullanıldığında, 1,5 mm kalınlığındaki tabakalar halinde yerleştirilmelidir. Apeksifikasyon tedavisinde ise kök ucunda 3-5 mm kalınlığında materyal yerleştirilerek apikal tıkaç oluşturulmalıdır (92).

Üretici firma NeoMTA® 2'nin, diğer MTA benzeri biyomateryallere göre manüplasyonunun daha kolay, radyoopasitesinin %30 daha fazla ve renginin daha parlak beyaz olduğunu bildirmiştir (92).

2.3.3. NeoPUTTY®



Şekil 2.3: NeoPUTTY®

Elle karıştırmanın sertleşme reaksiyonu üzerindeki etkisini azaltmak, heterojen karışma ihtimalinin üstesinden gelmek ve klinik uygulamayı basitleştirmek için geleneksel toz-sıvı simanlara alternatif olarak önceden karıştırılmış kalsiyum silikat simanlar geliştirilmiştir (93).

2020 yılında NeoPUTTY® (Avalon Biomed, Houston, TX, USA) ticari olarak piyasaya sürülmüştür. NeoPUTTY®; trikalsiyum silikat, dikalsiyum silikattan oluşan, boyanmayan, önceden karıştırılmış MTA içerikli biyoaktif, biyoseramik bir malzemedir (6). NeoPUTTY®'de renklenme probleminin önüne geçilmesi adına, radyoopaklaştırıcı ajan olarak bizmut oksit yerine tantalyum oksit (Ta_2O_5) kullanılmıştır (90).

Önceden karıştırılmış simanların endodontik prosedürlere göre iki farklı formu mevcuttur. Direkt pulpa teması gereken sızdırmazlık ihtiyacının arttığı durumlarda düşük viskoziteli kıvamında kullanılırken daha yüksek viskoziteli macun kıvamında olanlar

endodontik restoratif prosedürler için imal edilmiştir (6). Macun formunun raf ömrünün kısa olmasının, ambalajından çıkarıldıktan sonra materyalin atmosferdeki nem ile tepkimeye girmesi, ambalajının nem geçirgenliği veya organik taşıyıcının buharlaşması gibi sebeplerden dolayı olduğu düşünülmektedir (6).

NeoPUTTY®, NeoMTA® 2 ile aynı trikalsiyum ve dikalsiyum silikat tozlarını kullanarak iyileşmeyi desteklemektedir. Nem varlığında sertleşerek kalsiyum hidroksit oluşturmaktadır. pH'nın 12 olması sayesinde, yüzeyde kalsiyum fosfat çökmesine neden olmaktadır. Bu reaksiyon, hidroksiapatit ve dentin köprüsü oluşumunu indüklemektedir (27).

Paket içerisinde kendiliğinden sertleşmezler, nem varlığında in vivo olarak sertleşmektedirler. Bu simanlar bulundukları kaptan çıkartıldıktan sonra atmosferdeki neme maruz kaldıkları için genellikle kısa raf ömrüne sahiptir. Kapalı kabından çıkarıldıktan sonra atmosferik nem ile reaksiyona uğraması sonucunda kabın nem geçirgenliği artmakta veya organik taşıyıcının buharlaşması sonucu erken bozulmaya uğramaktadır (6).

Üretici firma tarafından NeoPUTTY®'nin çalışma süresinin 1 saat, sertleşme süresinin ise 4 saat olduğu belirtilmiştir (94). Kullanılacak miktar kadar paketten alınabildiği için maliyetten ve karıştırma süresi olmadığı için zamandan tasarruf sağlar. 3 yıllık bir raf ömrüne sahiptir ve radyografik teşhis için 8.1 mm kalınlıkta alüminyuma eşdeğer olarak sınıfında en yüksek radyopasiteye sahiptir. İyi bir sızdırmazlık sağlamak için büzülme miktarı çok az ve boyutsal olarak stabildir bu da bakteriyel sızıntı olasılığını en aza indirmektedir.

Ancak piyasaya yakın zamanda çıkması nedeniyle, sitotoksik özellikleri hakkında çok fazla bilgi yoktur. Bu amaçla vital dokular ile direkt temas edecek olan biyomateryallerin biyoyumluluğunu değerlendiren in vitro çalışmalar, potansiyel risklerini ve tedavi yeterliliğini değerlendirmek için gereklidir.

2.3.4. Biodentine™



Şekil 2.4: Biodentine™

2009 yılında piyasaya çıkan Biodentine™ (Septodont, Saint-Maur-des-Fosses, Fransa) aktif biyosilikat teknolojisi ile üretilmiş kalsiyum silikat esaslı bir materyaldir. MTA'nın renklenmeye neden olması, sertleşme süresinin uzun olması ve manipülasyon zorluğu gibi dezavantajlarını gidermek amacıyla üretilmiştir. Toz kısmının içeriğinde; temel ana bileşen olarak trikalsiyum silikat, ikinci ana bileşenler dikalsiyum silikat ve kalsiyum oksit, doldurucu olarak kalsiyum karbonat, ve radyoopasiteyi sağlayan zirkonyum oksit; likit kısmında kalsiyum klorit ile su bulunmaktadır (95). Biodentine™ tek kullanımlık kapsül şeklinde satılmaktadır. Kapsül içerisinde toz ve plastik tüp içerisinde likitten oluşmaktadır. Üretici firmanın önerisine göre bir kapsüle beş damla likit eklendikten sonra amalgamatörde 30 saniye karıştırılarak hazırlanmaktadır. Dentinle birçok yönden benzerlik gösteren Biodentine™ 12 dakikada sertleşmekte ve MTA'dan farklı olarak sertleşme esnasında neme ihtiyaç duymamaktadır (96).

Biodentine™'in MTA'ya göre daha küçük yapıda ve yüzey alanına göre daha fazla sayıda trikalsiyum silikat partikülünden oluştuğu bildirilmiştir (97). Biodentine™'in toz ve likit kısımları karıştıktan sonra jel bir yapıya dönüşmektedir, ardından iyonik değişim başlamakta ve sertleşme reaksiyonu sonrası tamamen katı halini almaktadır (97). Elastik modülü dentine çok benzer olup 22.0 Gpa'dır. Basınç dayanımı ve mikrosertlik değerleri de dentin dokusuna benzemektedir (98). İlk olarak dentini taklit edebilen bir materyal

olarak tanıtılmış ve iyi tıkkama kabiliyeti, yüksek sıkışma dayanımı, kısa sertleşme süresi, biyouyumlu ve biyoaktif oluşu gibi özellikleri nedeniyle öne çıkmıştır (98,99).

Biodentine™ yeni bir materyal olmakla beraber, şimdiye kadar yapılan çalışmalarda veriler materyalin periradiküler ve pulpal hücreler üzerinde sitotoksik etki oluşturmadığı ve doku tarafından kabul edilebilir bir materyal olduğunu göstermiştir (100,101).

Yapılan bir diğer çalışmada gömülü üçüncü büyük azı dişlerinden elde edilen dental pulpa kök hücreleri üzerinde Biodentine™'in hücre proliferasyonu, migrasyonu ve adezyonunu artırdığı belirlenmiş ve bu özellik materyalin biyoaktif ve biyouyumlu olmasına bağlanmıştır (102). Biodentine™, uygulandığı alanda pulpa hücrelerini uyarak hücrelerde erken mineralizasyonu başlatan TGF-β1 ekspresyonu artırmaktadır. Sertleşme reaksiyonu sırasında ortaya çıkan kalsiyum hidroksitin yüksek pH'sına bağlı olarak yara bölgesinde koagülasyon nekrozu oluşturmaktadır. Bu nekroz alanı dental pulpa kök hücrelerinin odontoblastlara farklılaşmasını uyarak reaksiyoner dentin oluşumunu sağlamaktadır (98).

2.3.5. MTAFlow™ White



Şekil 2.5: MTAFlow White™

MTAFlow™ White (Ultradent Products Inc., South Jordan, UT, ABD); dikalsiyum silikat, trikalsiyum silikat ve tantalum oksitten oluşan ve silikon içeren su bazlı bir jel ile karıştırılmış yeni geliştirilmiş bir materyaldir (4). Beyaz versiyonunda, üretimi için kullanılan ham toz rengi beyaza dönüştürülmüş ve potansiyel diş renk değişimini

önlemek için radoopaklaştırıcı ajan bizmut oksit yerine tantalum oksit ile değiştirilmiştir. Pulpotomi, pulpa kuafajı, kök ve furka perforasyon onarımı, apeksifikasyon, gibi endodontik uygulamalarda kullanıma uygundur (4).

MTAFlow™ White, hidrasyonu için kullanılan su bazlı jel sayesinde farklı toz/jel oranlarında karıştırılarak daha pürüzsüz bir kıvama ulaşabilmektedir. Materyalin 'ince', 'kalın' ve 'macun' kıvamında kullanımına imkan sağlamaktadır. Üretici firmanın önerilerinde karıştırılırsa ince ve kalın formları kutudan çıkan enjektör ile kullanılabilir, bu da bir klinik kullanımda dikkate alınacak yenilikçi bir taşıma yöntemidir (4). Bu taşıma yöntemi ortograd yoldan ulaşımında güçlüklerle karşılaşılacak kök perforasyon tamir uygulamaları için avantaj sunmaktadır (103,104). MTAFlow™ White, MTA ile benzer bileşimi olmasıyla birlikte daha küçük parçacık boyutu (<10 µ) ile 15 dakika gibi daha kısa sertleşme süresine sahiptir (105).

2.4. Biyouyumluluk ve Sitotoksiste

Biyouyumluluk; bir materyalin canlı dokular ile temas ettiğinde lokal veya sistemik uygun konak cevabı oluşturması durumudur (106).

Kullanılan materyalin hücre yapı ve fonksiyonlarında hasarlar meydana getirmesi sitotoksiste olarak tanımlanır. Sitotoksiste testlerinde;

- Hücrenin morfolojisi, canlılığı, gelişimi, sayısı ve metabolizması,
- Hücre membran hasarı ve geçirgenliği,
- Enzim aktiviteleri,
- RNA, DNA ve protein sentezinin durması değerlendirilmektedir (107).

Dental materyallerin sitotoksiste ve biyouyumluluklarının insan üzerinde kullanıma uygunluğu için çeşitli testler yapılmaktadır. Materyaller klinik uygulamaya geçmeden önce, başlangıçta hücre kültürü gibi in vitro testler ile incelenmekte, değerlendirmelere hayvan testleri ile devam edilmektedir. Arzu edilen sonuçlar elde edilirse klinik kullanım test çalışmaları aşamasına geçilmektedir.

2.4.1. In Vitro Testler

Yeni bir materyalin biyouyumlu olup olmadığını değerlendirmek amacıyla ilk uygulanan test yöntemi in vitro deneylerdir. Biyouyumluluğun değerlendirilmesindeki in vitro testler test tüpü içinde, hücre kültür kabında veya canlı mikroorganizmada

uygulanır. Dental materyallerin in vitro olarak sitotoksitesini belirlemede en yaygın kullanılan biyolojik sistemler hücre kültürleridir (107).

2.4.2. Hücre Kültürü

Hücre kültürünün temel ilkesi, canlı dokulardan alınan parçaların in vitro koşullarda yaşatılması ve üremelerinin devam ettirilmesidir. Falkon, flask, petri gibi laboratuvar gereçlerinde kültür vasatı veya medyumunu denilen, içerisinde; tuzlar, tampon maddeleri, amino asitler, vitaminler, dana veya at serumu barındıran besleyici uygun sıvıların içinde üretilirler. Bu amaçla çeşitli canlıların (insan, fare, tavşan, maymun gibi) çeşitli dokuları önce parçalanarak tek tek hücrelere ayrılırlar ve kültür vasatıyla birlikte steril kaplara konurlar. Bu hücre süspansiyonu %5 karbondioksit (CO₂) içeren 37 °C ortamda bekletildiğinde hücreler kabın çeperine yapışarak üremeye başlarlar. Bu üreme sonucunda oluşan yapıya hücre kültürü denilmektedir (108).

Hücre kültürü çalışmalarında primer hücre ve devamlı hücre hatları olmak üzere iki tip hücre kullanılır. Primer hücre kültürleri doku ve organlardan ayrılan hücrelerin 24 saatten daha uzun süre kültür edilmesiyle elde edilir. Primer hücre kültürlerinde çoğalan hücreler buradan alınıp başka kültürlerle ekilebilir ve çoğaltılabilir (109). Verici dokunun fizyolojik durumunu yansıtmaması, genotip ve fenotipinin verici dokuyla aynı özellikler göstermesi primer hücre hatlarının avantajlarından biridir. Biyouyumluluk değerlendirme çalışmalarında primer hücre hatları alındığı doku ile benzer özellikler göstermesi bakımından sürekli hücre hatlarına göre daha ideal gözükmektedir.

2.4.3. Sitotoksite testleri

Uluslararası Standart Organizasyonu (ISO) testlerin belirli standartlarda yapılması amacıyla diş hekimliğinde kullanılan tıbbi materyallerin biyouyumluluğunun değerlendirilmesi için ISO 7405 dökümanını sunmuştur. Bu dökümanda geçen testlere ek olarak ISO 10993-5 standartları da in vitro sitotoksite testleri için önerilen genel bir test protokolüdür (110).

ISO standartlarına göre in vitro sitotoksite değerlendirmelerinde kullanılan test yöntemleri şunlardır:

1) Hücre kültürü testleri

a) Direkt hücre kültür metodu

i) Direkt temas testi

ii) Ekstrakt testi

b) Bariyer test metodu

2) Agar difüzyon testi

3) Filtre difüzyon testi

4) Dentin bariyer testi (110)

Bu testler test edilecek materyalin hücre, enzim ya da diğer biyolojik sistemlerle temasıyla gerçekleştirilir. Test edilecek malzemenin, hücre kültür ortamında hücre sayısı, büyüme oranı, morfolojik özellikleri, metabolik fonksiyonları kontrol grupları ile karşılaştırılarak değerlendirilir. Deneyler arada herhangi bir bariyer olmaksızın materyalin hücre ile direkt temasıyla ya da materyal ile hücre arasında küçük bir bariyer yerleştirilmesiyle indirekt şekilde uygulanabilir (109).

2.4.4. Sitotoksosite Testlerinin Değerlendirilmesinde Kullanılan Yöntemler

Bir materyal hücre kültürü üzerine uygulandığında hücrenin membran yapısını değiştirebilir, metabolik faaliyetlerinde bozulmaya sebep olabilir, kromozom yapısında değişikliğe sebep olabilir. Bu oluşan sitotoksik etkiler değerlendirilirken 4 farklı test yöntemi kullanılır (109).

-Canlılık değerlendirme testleri

-Yaşam değerlendirme testleri

-Hücre proliferasyonu değerlendirme testleri

-Hücre metabolizması değerlendirme testleri

2.4.5. Metabolizma Değerlendirme Testleri

Canlı hücrelerin enzim aktivitelerini, metabolik ve proliferatif kapasitelerini mikropilok okuyuculu spektrofotometre aracılığıyla değerlendiren kolorimetrik testlerdir. Uzun dönem toksisitenin değerlendirildiği ucuz ve kolay olan bu yöntemde dimetiltiyazol difenil tetrazolyum bromür (MTT) testi, alamar mavisi testi ve laktat dehidrogenaz testi gibi testler metabolizmayı değerlendiren testlerdir (107).

2.4.6. MTT Testi

Sitotoksosite testlerinden olan MTT hassas bir testtir ve düşük dozlardaki toksisitenin değerlendirilmesini sağlar. MTT testi diğer test yöntemlerine göre uygulama

anlamında daha basittir ve tekrarlanabilir sonuçlar elde edilebilir (109). Bu nedenle dental materyallerin sitotoksitesinin değerlendirilmesinde sıklıkla kullanılmaktadır (106).

MTT testinde, canlı ve ölü hücreleri belirleyebilmek için bir tetrazolyum tuzu olan MTT boyası kullanılır. Canlı hücrelerdeki mitokondriler MTT boyasının tetrazolyum halkasını süksinat dehidrogenaz enzimi ile parçalayarak MTT boyasını indirgeyebilirken, ölü hücreler bu boyayı indirgeyemez. MTT boyasındaki tetrazolyum halkasının parçalanması ile sarı renkli olan MTT boyası mavi-mor renkli formazan kristallerine dönüşür. Bu testin sonucunda canlı hücreler mavi-mor renge boyanırken, ölü hücreler boyanmamaktadır. Bundan sonraki aşamada formazan kristallerinin konsantrasyonu spektrofotometre ile ölçülür ve bir canlılık değeri elde edilir (106).

2.5. Apoptozis

Hücre ölümleri morfolojik ve biyolojik olarak değerlendirildiğinde, apoptotik ve nekrotik hücre ölümü olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Apoptozis, programlı hücre ölümü olarak adlandırılırken; nekroz, hasar yolu ile ölüm anlamını taşımaktadır (111).

Apoptozis, bir organizmanın istenmeyen hücrelerini inflamatuvar bir tepkiye yol açmadan ortadan kaldırdığı bir süreçtir. Nekrozdan farklı olarak apoptozis, çok hücreli organizmalarda, rutin olarak yürütülen ve çevresel faktörler tarafından etkilenen fizyolojik bir olaydır (112). Apoptozis çok hücreli organizmalara avantaj sağlamaktadır, bu sayede organizmalarda homeostaz korunmaktadır ve yaşam döngüsü dengede kalmaktadır. Doku homeostazının sürdürülebilmesi için proliferasyon ile apoptozis arasındaki denge korunmalıdır (113).

Apoptozisin birden fazla indükleyicisi tanımlanmıştır. Bu sinyaller genellikle hücre tipine özgü olmakla birlikte büyüme faktörlerinin azalması, kimyasallar, radyasyon, kalsiyum iyon akışı, tümör nekroz faktör (TNF- α) ve glukokortikoidler olabilir. Bu sinyallere yanıt olarak hücre, hücrenin yok edilmesiyle sonuçlanan programlanmış olaylar dizisini indükler (114).

Apoptozis süreci başladığında meydana gelen hücresel biyolojik değişiklikler düzenli bir sırayla gerçekleşir. Bu değişiklikler canlı veya ölmekte olan hücreleri ayırt etmek ve hücre ölümünün (apoptozis veya nekroz) kapsamını ve türünün analiz etmek için kullanılır (115). Apoptozis, hücrede ışık saçılımıyla ifade edilen hücre büzülmesiyle başlar. Başlangıçta hücre zarının bütünlüğü bozulmadan kalır daha sonrasında caspaselerin aktivasyonu ile birlikte mitokondriyal membran potansiyeli değişir ve

kalsiyum iyonlarının hücre içi değişimlerinden dolayı pH düşüşü ve asidoz gözlenir. Mitokondriyal membran potansiyel kaybından sonra lizozomdaki enzimlerin salınımıyla beraber hücre apoptotik cisimcikler halinde parçalanır (116).

2.5.1. Apoptozisde Caspaselerin Rolü

Caspaselar (sistein-aspartik proteazlar), inflamasyonun yanı sıra apoptoz, nekroptoz ve piroptoz gibi programlanmış hücre ölümünde önemli biyolojik olaylardan sorumlu proteazlardır. Apoptozisde morfolojik süreçte hücrenin parçalanmasında yer alan enzimlerdir. Caspaselar normalde proenzim (procaspase) olarak bulunurlar ve kendileri tarafından aktif formlarına dönüşürler (117). Bu şekilde aktive edilmiş bir caspase, diğer caspase öncülerini aktive edebilir ve böylece hücre ölümünün apoptotik programını başlatan makromoleküler yapıların kontrollü bölünmesine yol açar (118). Bugüne kadar yapılan araştırmalara göre caspase ailesinin en az 15 üyesi tanımlanmıştır ve işlevsel açıdan iki gruba ayrılırlar (100). Başlatıcı caspaselar (caspase 2,8,9,10) ilk proapoptotik sinyale yanıt olarak aktive edilirler. Efektör caspaselar (caspase 3,6,7), hücreyi apoptotik cisimlere bölmek için başlatıcı caspaselar tarafından aktive edilirler.

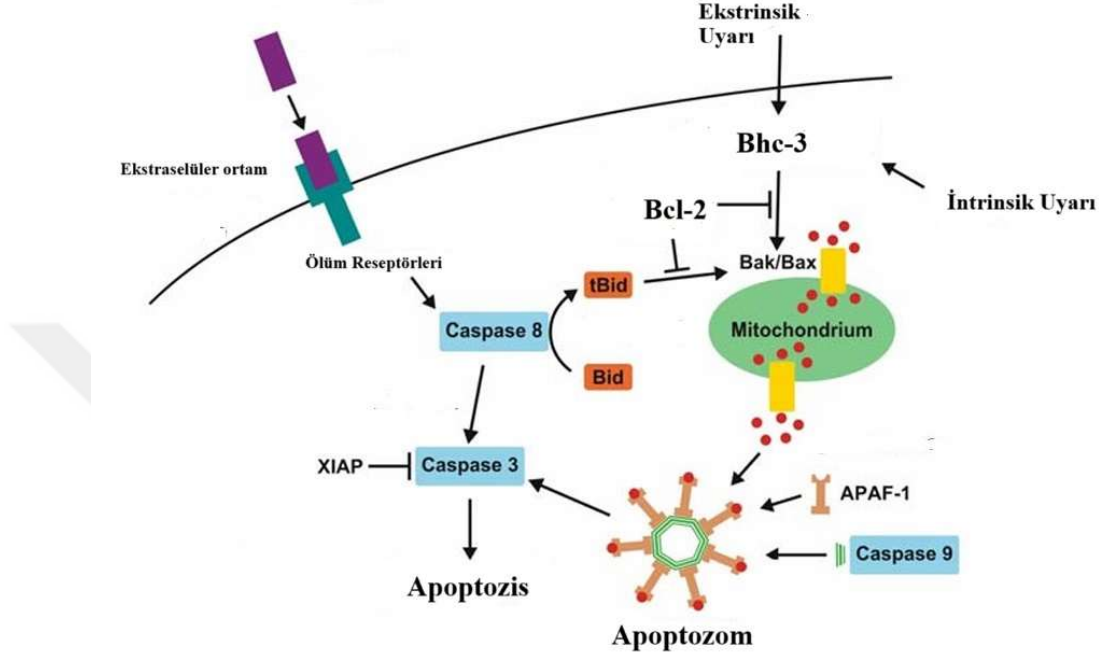
Efektör caspase-3 başlangıçta olgunlaşmamış procaspase olarak sentezlenir. Caspase-3, apoptotik hücrelerde hem intrinsik (mitokondriyal) hemde ekstrinsik yollarla aktive edilen, apoptozisin en önemli düzenleyicisidir (102). DNA hasarı, sitotoksik ilaçlar, enfeksiyöz ajanlar ve hipoksi gibi proapoptotik sinyaller, intrinsik yol aracılığıyla, apoptozisle ilgili özelleşmiş proteinlerin (Bax) mitokondriyal dış membran içinde oligomerize olmasını sağlar. Bu oligomerizasyon mitokondriyal dış zarı geçirgen hale getirerek Sitokrom-c'nin mitokondriden sitozole sızmasına neden olur. Sitokrom-c daha sonra apoptotik proteaz aktive edici faktör 1'e (APAF-1) e bağlanır ve apoptozom oluşumunu kolaylaştırır. Apoptozom başlatıcı caspase-9'u aktive eder, bu da procaspase-3'ü parçalayıp aktive eder (111).

Apoptozisin ekstrinsik yolu, tümör nekroz faktörü (TNF) reseptör ailesinin üyeleri olan ölüm reseptörleri tarafından modüle edilir. Bu ölüm reseptörlerinin toplanması caspase-8'i aktive eder. Aktive edilmiş caspase-9, procaspase-3'ü doğrudan caspase-3'e ayırır ve aktive eder (119).

2.5.2. Apoptozisde Mitokondri ve Sitokrom-c İlişkisi

Mitokondri, hücrenin yaşamında ve ölümünde çok önemli rol oynar çünkü hayatta kalmak için gereken enerjinin çoğunu üretip, aynı zamanda apoptozise giden intrinsik yolu da düzenlerler. Mitokondrinin hücre ölümüne katılımı genellikle mitokondriyal

membran depolarizasyonu veya mitokondriyal dış membran geçirgenliği takip edilerek ölçülür (106).



Şekil 2.6: Apoptozis diyagramı

Mitokondri, bir iç ve bir dış zarla çevrelenmiş matris içeren dinamik bir organeldir. Apoptozis sırasında dış zar geçirgen hale gelir ve mitokondriyal zarlar arası 23 boşluktan çözünabilir proteinler salınır bu da Caspase'ların aktivasyonunda önemli bir olaydır (106). Sitokrom-c, mitokondriyal elektron taşıma zincirinde önemli bir rol oynar ayrıca apoptozisin anahtar düzenleyicisidir. İç ve dış mitokondriyal membran arasındaki boşlukta bulunur ve mitokondriyal dış membran geçirgenliğini takiben sitoplazmaya salınır. Mitokondriyal elektron taşıma zincirinde Sitokrom-c, kompleks III' ten kompleks IV'e elektron taşıyıcısı olarak görev yapar (109). Bununla birlikte, hücrede DNA hasarı, metabolik stres veya katlanmamış proteinlerin varlığı gibi apoptotik bir uyarı tespit edildiğinde, intrinsik apoptotik yol tetiklenir.

Proapoptik stres üzerine aktifleştirilmiş Bax ve Bak, mitokondriyal dış membran geçirgenliğini indükler. Mitokondriyal dış membran geçirgenliği sonucunda Sitokrom-c ve zarlar arasında bulunan proteinler sitozole salınır. Sitokrom-c, APAF-1'i bağlayarak apoptozom adı verilen yapıyı oluşturur bu da başlatıcı caspase-9'u aktive eder. Aktif caspase-9 efektör caspase-3'ü parçalayıp aktive ederek hızlı hücresel yıkıma yol açar.

2.5.3. Bcl-2 Ailesi

Mitokondriyal apoptozis, Bcl-2 ailesi üyeleri tarafından düzenlenir. Bcl-2 ailesi üyeleri apoptozis regülatörleridir.

Bcl-2 Ailesi	
Apoptosisi indükleyen genler	Apoptosisi baskılayan genler
Bad, Bax, Bcl-xs, Bid, Bak	Bcl-2, Bcl-xl

Antiapoptotik üyeler, Sitokrom-c'nin salınmasını baskılar. Proapoptotik üyelerin antiapoptotik üyelerle bağlanması halinde bu inhibitör etki ortadan kalkar ve Sitokrom-c salınır. Bu yüzden, pro ve antiapoptotik üyelerin dengesi yaşam ve ölüm arasındaki seçeneği belirler (120).

Apoptozisi başlatan yolların kesiştiği kavşak noktanın mitokondri olduğu görülmüştür. Bu yüzden mitokondrinin aktivasyonu (Sitokrom-c'nin mitokondriden sitoplazmaya salınması) apoptotik süreçte geri dönülemez noktayı gösterir.

Apoptozisin regülasyonu Bcl-2/Bax gen ailesi ile sağlanır (121). Bcl-2/Bax gen ailesinin ürünleri, mitokondri ve çekirdek zarlarının yanısıra endoplazmik retikulum zarının üzerinde de yer alırlar ve homodimer ya da heterodimerler şeklinde kompleks oluşturarak çalışırlar (119). Örneğin; Bcl 2'nin Bax ile olan etkileşiminde Bcl-2'nin oranının daha yüksek olması hücrenin yaşamını sürdürmesini sağlarken, Bax'ın daha fazla olması durumunda hücre ölüme gitmektedir (121).

Bir hücrede hücre içi Bcl-2/Bax oranı hücrenin apoptosise gidip gitmeyeceğine karar vermede son derece önemlidir. Eğer Bax fazla ise hücre apoptozise gidecektir, Bcl-2 fazla ise apoptozis inhibe olacaktır.

2.5.4. p53'ün Rolü

Hücrede iç veya dış nedenlerle DNA hasarı oluştuğunda aktive olan bazı genler, hücrenin apoptozisine neden olabilir. Bu genlerden en önemlisi p53 genidir. Normalde inaktif olarak bulunan p53 geni, DNA hasarı oluştuğunda aktifleşerek p21 genini harekete geçirir. p21 geni hücrenin G1 fazında kalarak S fazına geçmesini engeller. Böylece hücre siklusu durdurularak oluşmuş olan DNA hasarlı hücrenin çoğalması engellenir. Hücre hasarının tamiri başarılı olmazsa p53 geni Bax proteinini aktive ederek mitokondri

aracılığı ile hücrenin apoptozise giderek ölmesini sağlar. Böylece hasarlı hücre ortadan kaldırılmış olur. Bir tümör süpresör gen olarak çalışan p53 mutasyona uğradığı ya da bulunmadığı zaman hücre yaşamı uzar (119).

2.6. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), bilimsel, tıbbi ve tanısal topluluklara kantitatif nükleik asit analizi için kullanılan güçlü bir araçtır. PCR ile, karmaşık bir numunede bulunan herhangi bir nükleik asit dizisi, kolaylıkla analiz edilebilecek çok sayıda özdeş kopya oluşturmak için amplifiye edilebilir. Gerçek zamanlı PCR (RT-PCR), reaksiyon sırasında oluşan ürün miktarıyla orantılı olarak reaksiyona giren boyaların veya problemlerin floresansını ve belirli bir değer elde etmek için gereken amplifikasyon döngülerinin sayısını izleyerek oluşan miktarda DNA molekülü kaydedilir. Tipik olarak amplifikasyon döngüsü başına molekül sayısının iki katına yakın olan belirli bir amplifikasyon verimi varsayıldığında, örnekte başlangıçta mevcut olan amplifiye sekansın DNA moleküllerinin sayısını hesaplamak mümkündür (122). Günümüzde mevcut olan yüksek verimli tespit kimyaları, hassas enstrümantasyon ve optimize edilmiş tahliller ile, karmaşık bir numunedeki belirli bir dizinin DNA moleküllerinin sayısı, tek bir molekülü tespit etmeye yetecek kadar doğruluk ve hassasiyetle belirlenebilir. Gerçek zamanlı PCR'nin tipik kullanımları arasında patojen tespiti, gen ekspresyonu analizi, tek nükleotid polimorfizmi analizi, kromozom sapmalarının analizi ve en son olarak gerçek zamanlı immüno PCR ile protein tespiti yer alır (122).

Çalışmamızın amacı, Çocuk Diş Hekimliği'nde endodontik tedavi prosedürlerinde sıklıkla kullanılan NeoMTA® 2, NeoPUTTY®, Biodentine™ ve MTAFlow™ White ticari isimli biyoseramik içerikli kök kanal tamir materyalinin insan periodontal ligament hücrelerine olan sitotoksik etkisini karşılaştırmaktır.

Hipotezimiz bu dört farklı biyoseramik içerikli kök kanal tamir materyallerinin sitotoksik etkisinin benzer olmasıdır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 07.2023 Tarih ve 56 Karar Numarası ile onaylanmıştır (EK-1). Çalışma; in vitro koşullarda gerçekleştirilen deneysel bir çalışma olup, kök hücre izolasyonu ve deneyler Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji ile Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında gerçekleştirildi. Kök hücre izolasyonu için gerekli olan insan periodontal ligament dokusu, Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Çocuk Diş Hekimliği Anabilim Dalı'na başvuran 14-18 yaş aralığında, sistemik bir hastalığı bulunmayan hastaların ortodontik amaçla çekim endikasyonu konulmuş birinci küçük azı dişlerinden elde edildi. Çalışmaya katılan gönüllü bireylerin velilerinden Gönüllü Bilgilendirme ve Onam Formu'nu okumalarının ardından imzalı onayları alındı (EK-2).

3.1. Gereçler

3.1.1. Çalışmada Kullanılan Biyoseramik İçerikli Materyaller ve İçerikleri

Çalışmada kullanılan biyoseramik içerikli kök kanal tamir materyalleri Şekil 3.1'de gösterilmektedir.



Şekil 3.1: Çalışmada kullanılan biyoseramik içerikli kök kanal tamir materyalleri: Biodentine™, NeoPUTTY®, NeoMTA 2® ve MTAFlow™ White.

Çalışmamızda kullanılan kök kanal tamir materyallerinin içeriği, tipi, uygulama şekli ve üretici firmaları ile ilgili bilgi Tablo 3.1 'de gösterildi.

Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan biyoseramik içerikli kök kanal tamir materyallerinin içeriği, tipi, uygulama şekli ve üretici firmaları.

Materyal	İçeriği	Tipi/Uygulama Şekli	Üretici Firma
NeoMTA[®] 2	Toz: Trikalsiyum silikat, dikalsiyum silikat, tantalyum oksit, kalsiyum sülfat Jel: su ve polimer	Toz-likit jel	NuSmile, Houston, TX, USA
NeoPUTTY[®]	Susuz organik bir likit içinde trikalsiyum silikat, dikalsiyum silikat toz, tantalyum oksit	Önceden karıştırılmış macun kıvamında uygulamaya hazır	Avalon Biomed, Houston, TX, USA
Biodentine[™]	Toz: Kalsiyum karbonat, trikalsiyum silikat, dikalsiyum silikat ve zirkonyum oksit Likit: Kalsiyum klorit ile su	Toz-likit Kapsül içerisinde toz, pipet içerisinde likit bulunur.	Septodont, Saint-Maur-des-Fosses Cedex, France
MTAFlow[™] White	Toz: Dikalsiyum silikat, trikalsiyum silikat, tantalyum oksit Likit: Suda çözünür silikon bazlı jel	Toz-likit	Ultradent Products Inc South Jordan, UT, USA

3.1.2. Hücre Kültür Çalışmasında Kullanılan Cihazlar, Sarf Malzemeler ve Kimyasallar

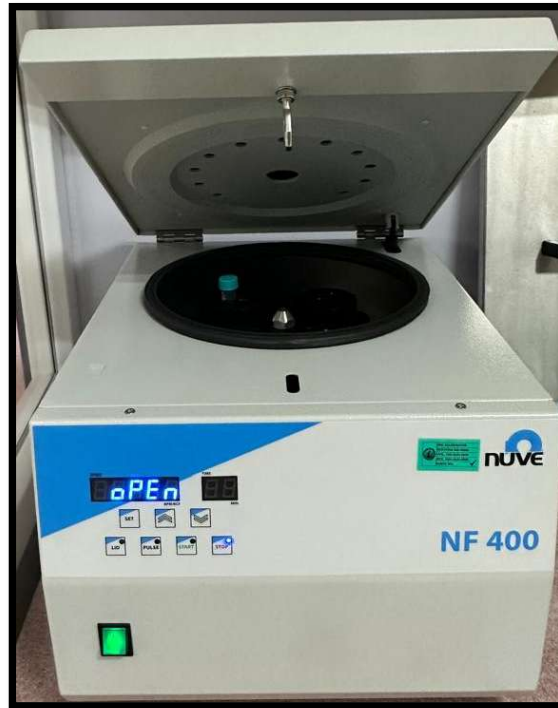
3.1.2.1. Cihazlar

Tablo 3.2. Kullanılan cihazlar

Üretici	Model/Katalog No	Cihaz
Beko	74785 MB	Mini Buzdolabı
Biosan	MSH 300	Manyetik Karıştırıcı
Deltalab	EN 12469	Kimyasal Madde Kabini
Drummond	4-131-201-E	Şarjlı otomatik pipetleyici
Gilson	Pipetman F144801	0,2-2 µL pipet
Gilson	Pipetman F144802	1-10 µL pipet
Gilson	Pipetman F123601	20-100 µL pipet
Gilson	Pipetman F123602	200-1000 µL pipet
HeraCell	150i	Karbondioksitli inkübatör
In Vitrogen	Qubit 2.0	Qubit florometri cihazı
Inolab	WTW pH720	pH metre
Isolab	075.03.001	Neubauer hematositometri lamı
Nalgene	5100-001	Hücre dondurma taşıyıcısı
Nikon	Eclipse TS100	Ters faz kontrast mikroskop
Nüve	ST 30	Çalkalamalı su banyosu
Nüve	NF 800 R	Santrifüj cihazı
Nüve	OT 012	Otoklav
Olympus	DP25	Mikroskop kamerası
Panasonic	VIP Plus	-80 °C derin dondurucu
Precisa	XB 220 A	Hassas terazi
Thermo Scientific	Forma Direct Heat	Karbondioksitli inkübatör
Thermo Scientific	MSC-Advantage	Sınıf II biyogüvenlik kabini
Thermo Scientific	Multiskan GO	ELISA okuyucu
Thermo Scientific	400P	Güç kaynağı
Thermo Scientific	Minicell Primo EC320	Elektroforez jel sistemi
Worthington	UN1977	Sıvı azot tankı
Eppendorf	EP6336000023	Eppendorf Thermal Cycler Cihazı
Vilber Lourmat BIO-VISION	A44116	Jel Görüntüleme Sistemi
Quant Studio 5	A34322	Real Time PCR



Şekil 3.2: Karbondioksitli inkübatör



Şekil 3.3. Santrifüj cihazı



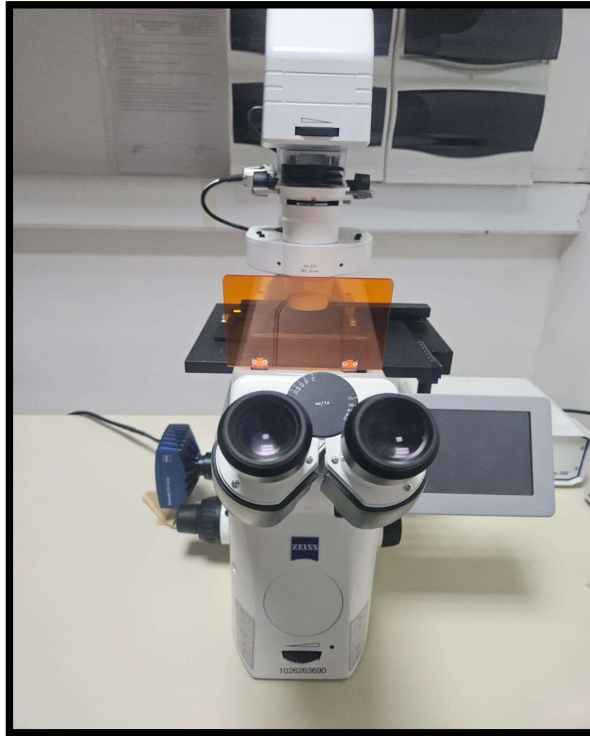
Şekil 3.4: Mikrosantrifüj cihazı



Şekil 3.5: Çalkalamalı su banyosu



Şekil 3.6: Laminer akışlı kabin



Şekil 3.7: Mikroskop

3.1.2.2. Sarf Malzeme ve Kimyasallar

Tablo 3.3. Kullanılan sarf malzeme ve kimyasallar.

ABP Biosciences	N018	iQuant™ RNA BR Assay Kit
A.B.T.™	Q03-02-05	2X qPCR SYBR-Green MasterMix
BioFroxx	298-93-1	3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-2,5 difeniltetrazolyum-bromür (MTT)
Biowest	L0009-100	Amfoterisin-B (100X)
Capricorn	TRY-1B10	Trypsin-EDTA (10X)
Corning	CLS4488-200EA	10 mL serolojik pipet
Corning	CLS4487-200EA	5 mL serolojik pipet
Corning	CLS4489-200EA	25 mL serolojik pipet
Gibco	11900-073	Alpha MEM
Gibco	25030-024	L-Glutamin (200mM)
Gibco	15140-122	Penisilin-streptomisin
Merck	MilliEx SLGP033RS	0,22 µm Filtre
Sigma	T6146-25G	Tripan Mavisi
VWR	10062-872	T25 hücre kültür kabı
VWR	10062-860	T75 hücre kültür kabı
VWR	525-0610	50 mL steril santrifüj tüpü
VWR	525-0604	15 mL steril santrifüj tüpü
VWR	89041-376	1-200 µL pipet ucu
VWR	89041-370	100-1250 µL pipet ucu
VWR	53509-070	0,1-10 µL pipet ucu
VWR	83009-668	Real Time PCR Plate
Thermo	15596026	RNA izolasyon Kiti
Nucleogene	NGMM019	NucleoGene cDNA Synthesis Kiti

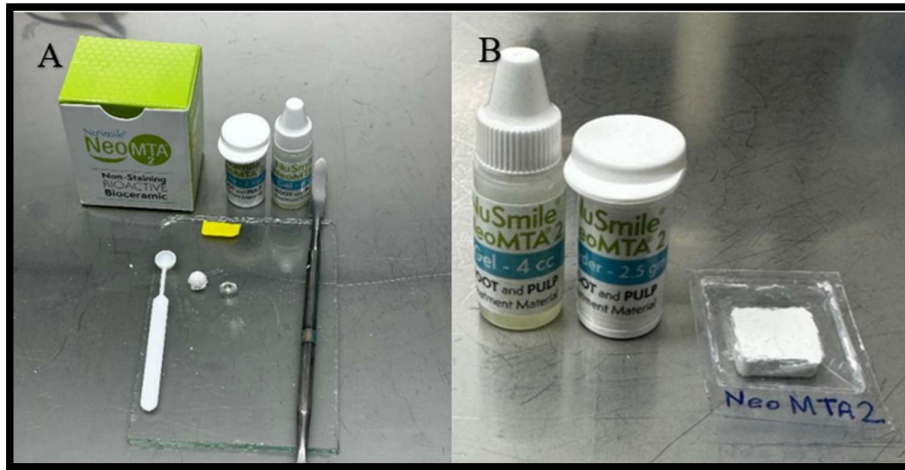
3.2. Yöntem

3.2.1. Çalışmada Kullanılan Biyoseramik İçerikli Kök Kanal Tamir

Materyallerinin Hazırlanması

Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda laminar akışlı kabin içinde Şekil 3.4'de gösterilen şekilde biyoseramik içerikli kök kanal tamir materyalleri aseptik koşullarda hazırlandı. Çalışmaya dahil edilen materyallerden NeoMTA® 2 ve MTAFlow™ White toz-likit formunda üreticinin tavsiyeleri doğrultusunda karıştırıldı. 15x15 mm uzunluk ve genişliğinde, 5 mm yüksekliğinde plastik doku gömme kalıbı içerisine yerleştirildi. NeoPUTTY® önceden karıştırılmış macun formunda olduğu için direkt plastik kalıbın içerisine yerleştirildi. Biodentine™ üretici talimatları doğrultusunda kapsülünün içerisindeki toza pipetindeki likitten 5 damla damlatılarak amalgamatör yardımıyla 30 saniye karıştırılıp kapsül içerisinden çıkarıldı ve plastik doku gömme kalıbı içerisine yerleştirildi.

Daha sonra kök kanal tamir materyalleri sertleşmenin gerçekleşmesi için 24 saat boyunca 37°C'de %5 CO₂ ile nemlendirilmiş inkübatörde bekletildi. Sertleşmesi tamamlandıktan sonra kabin içerisinde 30 dakika ultraviyole ışık altında bırakılarak sterilize edildi.



Şekil 3.8: A) NeoMTA 2® toz ve likit formunda karıştırılmaya hazır, B) Plastik doku gömme kalıbı içerisine konulmuş NeoMTA 2



Şekil 3.9: Önceden karıştırılmış hazır formda bulunan NeoPUTTY



Şekil 3.10: Biodentine™ kapsülünün içerisine likidi eklendikten sonra amalgamatörle karıştırılıp plastik doku gömme kalıbı içerisine yerleştirildi.

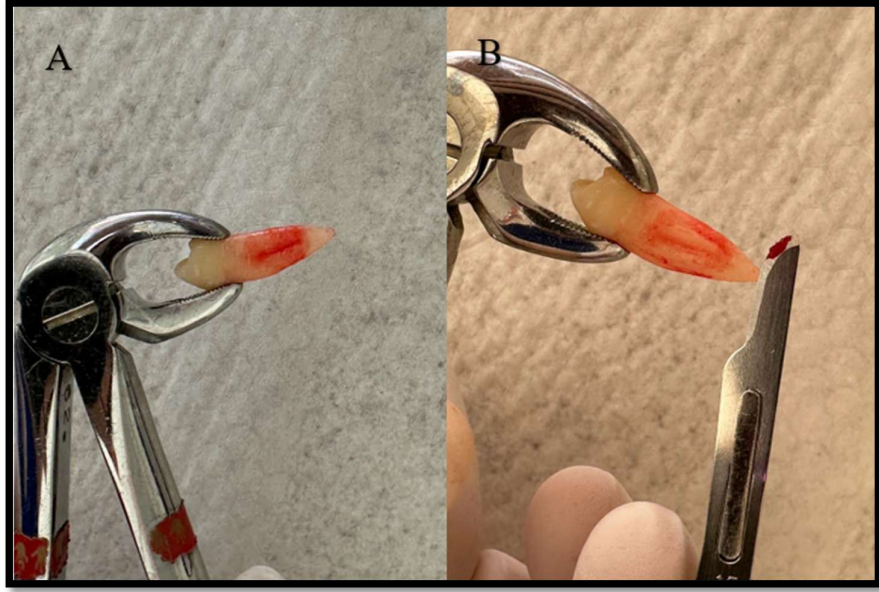


Şekil 3.11: A) MTAFlow™ White üretici talimatlarına göre hazırlanması,

B) MTAFlow™ White sertleşmesi için plastik doku gömme kalıbı içerisine yerleştirildi

3.2.2. Periodontal Ligament Dokularının Elde Edilmesi

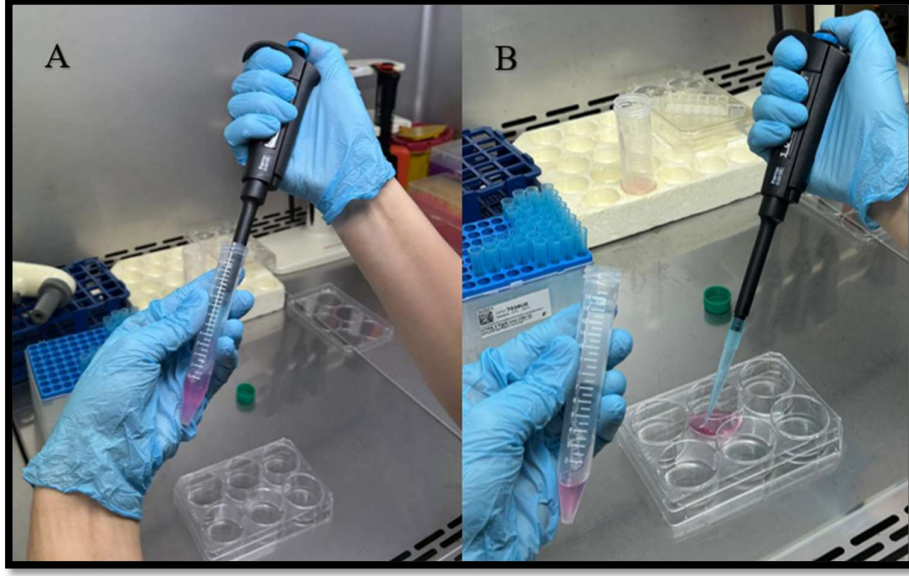
Ocak 2023 ve Temmuz 2023 tarihleri arasında, Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Çocuk Diş Hekimliği Anabilim Dalı'na ortodontik seri çekim için başvuran hastaların 1. küçük azı dişlerinin minimal travmatik diş çekimi gerçekleştirildi. Diş çekimi sonrası gingival ve apikal 1/3 lük bölümden doku kontaminasyonunu önlemek için kök yüzeyinin orta 1/3 kısmından periodontal ligament dokusu bistüri yardımıyla kazınarak %1 Penicillin - Streptomycin ve fosfat tamponlu tuzlu su (PBS) bulunan 15 ml'lik steril konik kapaklı tüpler ile 1 saat içerisinde laboratuvara taşındı.



Şekil 3.12: A) Ortodontik amaçla çekilen küçük azı dişinin gingival ve apikal uçlüsündeki dokular kontaminasyonun olmaması için uzaklaştırılmıştır, B) PDL dokusunun bistüri ile kazınması



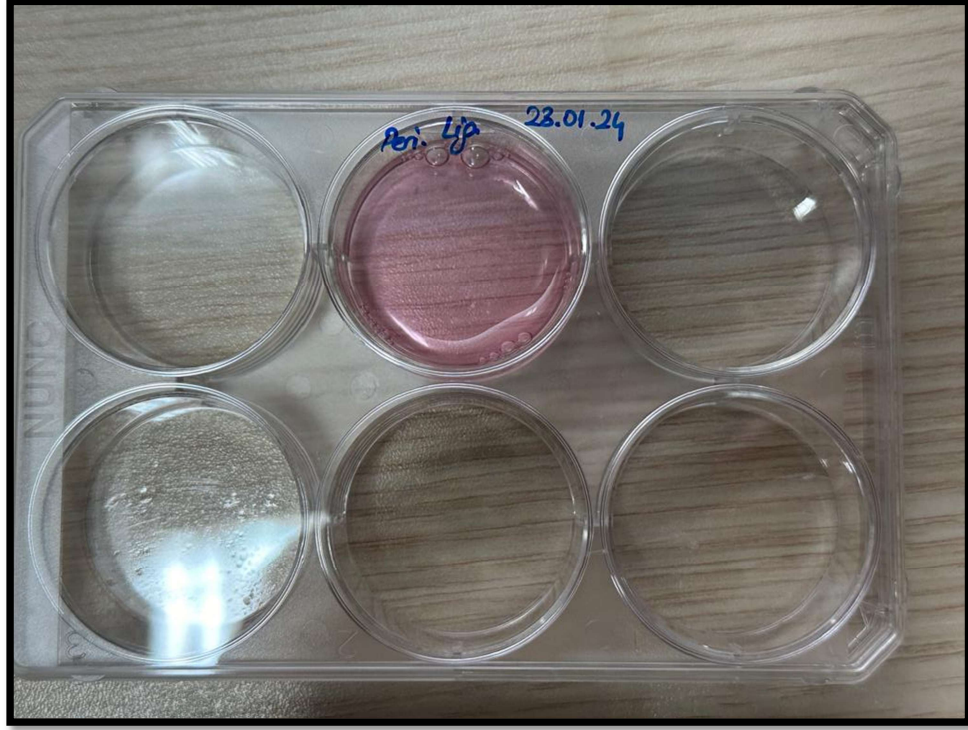
Şekil 3.13: Taşıma solüsyonu içerisindeki PDL dokusunun görüntüsü



Şekil 3.14: A) PDL dokularının taşıma solüsyonu içerisinde pipet ile çekilmesi, B) Dokuların 6 well plate besiyerine alınması

3.2.3. Kök Hücre İzolasyonu ve Kültürü

Periodontal ligament hücre izolasyonu eksplant kültür yöntemi ile yapıldı. Doku örnekleri, steril bistüri kullanılarak 1mm^3 'lük küçük parçalara ayrıldı, 3 kez antibiyotikli PBS ile yıkandı ve hücreler %10 FBS ve %1 Penisilin-Streptomisin içeren alfa MEM kültür medyumuna ile flasklara ekildi ve %5 CO_2 içeren inkübatörde 37°C 'de kültüre edildi. Kültür ortamı 3 günde bir değiştirildi. Eksplant doku parçası etrafında çoğalan hücreler ters faz kontrast mikroskop altında gözlemlendi. %70 konfluense ulaşıldıktan sonra hücreler %0.05'lik Trypsin, 0.53 mM Etilen diamino tetra asetik asit (EDTA) ile pasajlandı. Tüm deneylerde 3. pasajdan sonraki hücreler kullanıldı.



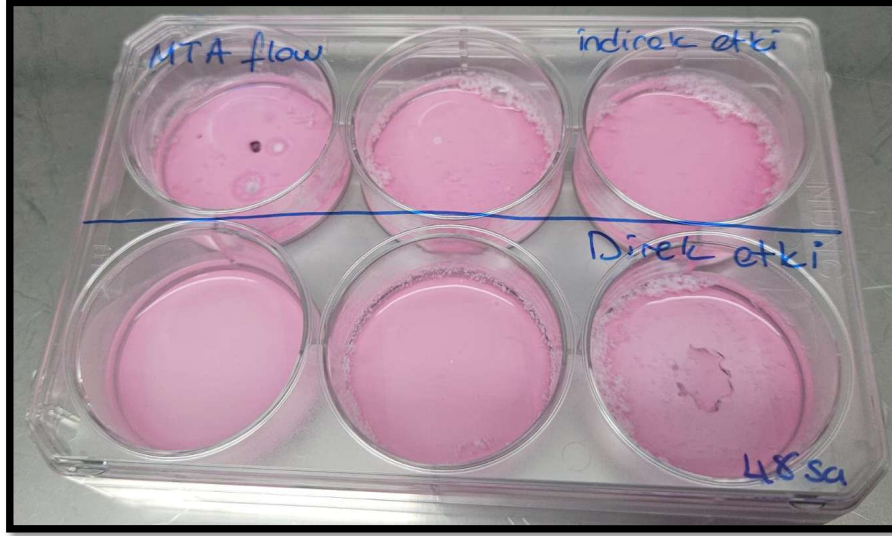
Şekil 3.15: Dokuların inkübatöre yerleştirilmeden önceki görüntüsü

3.2.4. Hücrelerin Pasajlanması

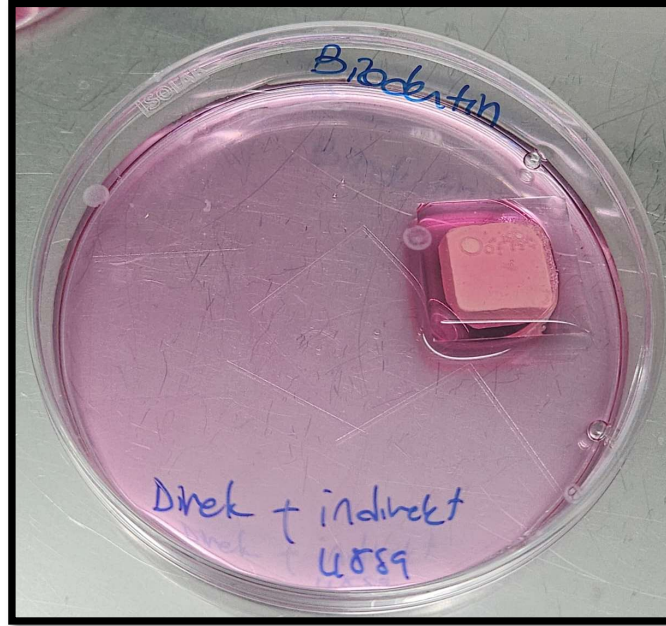
Hücrelerin pasajlanması için kültür kaplarından medyum uzaklaştırıldı ve flask steril PBS ile yıkandı. Hücreleri içeren kültür kaplarına tripsin-EDTA solüsyonu eklendi. Hücreler 37°C’de yaklaşık 5 dakika inkübe edilerek yüzeyden ayrılmaları sağlandı. Ters faz kontrast mikroskop ile tüm hücrelerin yüzeyden ayrıldığı gözlendikten sonra tripsin-EDTA aktivitesini durdurmak için kültür kabına %10 FBS içeren hücre kültür medyumunu ilave edildi. Hücreler 15 mL’lik santrifüj tüpüne aktarıldı ve 250 g de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı ve hücre peleti 1mL hücre kültür medyumunu ile süspanse edildi. Bu süspansiyondan 30uL örnek alınarak eşit miktarda tripan mavisi boya solüsyonu (%0,4) ile iyice karıştırıldı. Bu karışımdan 10 uL alınarak Neubauer lamı üzerinde 4 farklı karede hücre sayımı yapıldı. Hücreler 25 cm²’lik yeni kültür kaplarına 5x10 hücre/flask konsantrasyonunda ekilerek pasajlama işlemi tamamlandı. Bu işlem dördüncü pasaja kadar sürdürüldü.

3.2.5. Biyoseramik İçerikli Kök Kanal Tamir Materyallerinin Hücre Kültürüne Yerleştirilmesi

Lameller, hücrelerin direkt ya da indirekt temasını sağlaması için Şekil 3.16 ve 3.17'deki gibi içerisinde 3 ml medyum içeren 6 kuyucuklu plakadaki biyomateriyaller üzerine yerleştirildi.



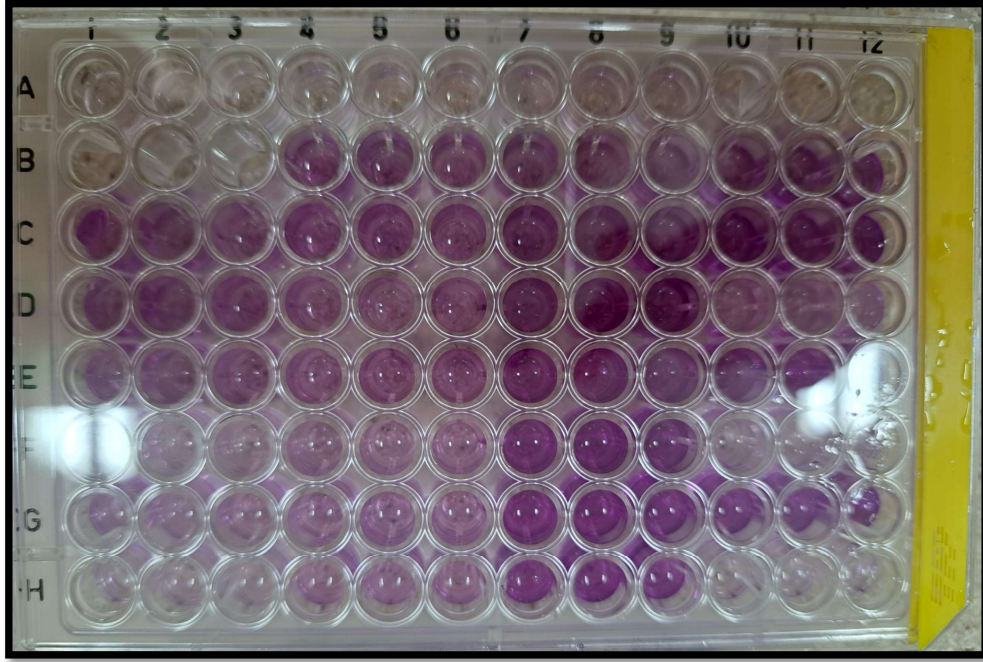
Şekil 3.16. MTAFlow™ White 6 well plate içerisine hücre lamelleriyle birlikte yerleştirildi.



Şekil 3.17: Biodentine™ 6 well plate içerisine hücre lamelleriyle birlikte yerleştirildi.

3.2.6. MTT Testi

Biyomateryallerin hücrelerin canlılığı ve çoğalması üzerindeki etkisini belirlemek için MTT testi yapıldı. Hücreler; %10 FBS, %1 glutamin %1 Penisilin-streptomisin, %0.01 Amfoterisin-B içeren α -MEM medyum içerisinde süspanse edilerek 24 kuyucuklu plaka içine yerleştirilen steril lameller üzerine her kuyucukta 3×10^4 hücre olacak şekilde ekildi. Hücreler 37 °C'de, %5 CO₂ içeren ortamda 48 saat inkübe edildi. Bu süre sonunda lameller, hücrelerin direkt ya da indirekt temasını sağlayacak şekilde içerisinde 3 ml medyum içeren 6 kuyucuklu plakadaki biyomateryal üzerine yerleştirildi. Ayrıca kontrol amaçlı olarak bazı lameller sadece medyum içeren ortama konuldu. Her uygulama için 3 tekrar yapıldı. 48 saatlik inkübasyonu takiben Orazizadeh ve ark.'nın protokolleri modifiye edilerek MTT analizi yapıldı (123). MTT stok solüsyonu (5mg/ml), medyum içerisinde 1:9 dilue edilerek çalışma solüsyonu (500 µg/ml) hazırlandı. Hazırlanan MTT solüsyonu 24 kuyucuklu plakanın her kuyucuna 1 ml olacak şekilde konuldu. Daha sonra biyomateryaldeki lameller ve kontrol için ayrılan lameller hücreler üst tarafa bakacak şekilde 24 kuyucuklu plakada MTT solüsyonu içine aktarıldı. Hücre içermeyen lameller blank olarak MTT solüsyonu içeren kuyucuklara konuldu. Plaka alüminyum folyoya sarılarak etüvde 37 °C'de 4 saat inkübe edildi. MTT solüsyonu uzaklaştırıldıktan sonra her kuyucuğa 1 ml dimetil sülfoksit (DMSO) eklendi. 10 dakika çalkalayıcıda bekletildi. Mikroplaka okuyucuda okutmak için örnekler Şekil 3.18'deki 96 kuyucuklu plakaya aktarıldı. 24 kuyucuklu plakadaki her kuyucuk için 96 kuyucuklu plakada 200µl'lik 3 kuyucuk oluşturuldu. Mikroplaka okuyucuda 570 nm'da okutuldu. Bütün aşamalar karanlık ortamda gerçekleştirildi.



Şekil 3.18: 96 kuyucuklu plakanın mikrolaka okuyucu öncesi hazırlanması

Değerlendirme: Biyomateryal ile teması olmayan kontrol grubunda hücre canlılığı % 100 olarak kabul edildi, deney gruplarında hücrelerinin canlılık oranları % olarak ifade edildi. % canlılık oranı: (deney grubu absorbans değeri/kontrol grubu absorbans değeri) X100 formülü ile hesaplandı.

3.2.7. RNA İzolasyonu İçin Örneklerin Hazırlanması

24x24 mm boyutunda lamellerin her biri 6 kuyucuklu kültür plakalarına yerleştirildi. Plakalar içerisinde kuyucuklara yerleştirilen lameller fetal bovine serum ile kaplandıktan sonra her bir kuyucuğa 100.000 hücre olacak şekilde periodontal ligament hücreleri ekildi. Hücreler 48 saat sonra kültüre edildi ve hücreler ile kaplı lameller kök kanal tamir materyali ile kaplı 6 kuyucuklu plakalara yerleştirildi. Her grup için 6 kuyucuklu plakanın kuyucuklarına yerleştirilen 6 adet hücre kaplı lamel kullanıldı. Direkt hücre teması için lamelin hücre ile kaplı yüzü MTA materyaline bakacak şekilde ters yerleştirildi. İndirekt hücre teması için ise lamelin hücre ile kaplı yüzü yukarı bakacak şekilde yerleştirildi. 24 ve 48 saat 37 °C’de %5 CO₂’ li ortamda inkübe edildi.

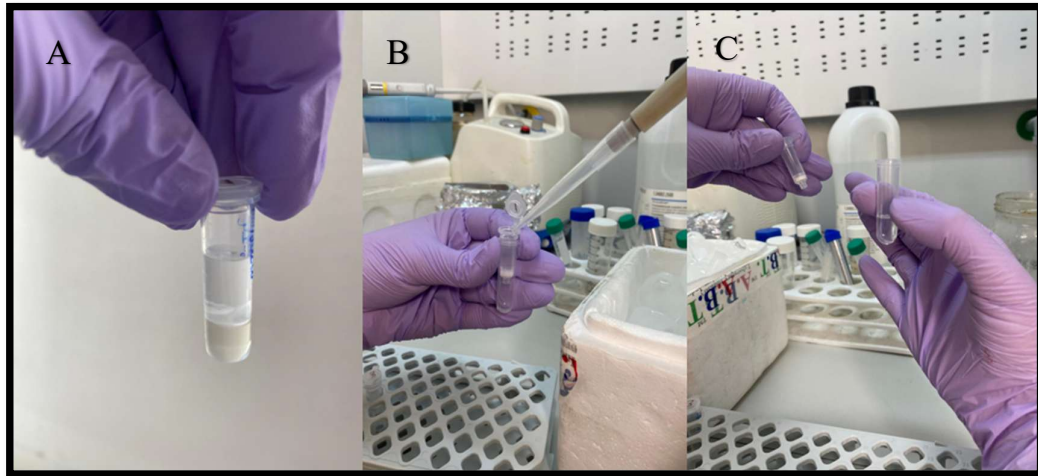
Biyomateryaller ile kültüre edilen periodontal ligament kökenli hücreler ile kaplı lameller ayrı bir 6 kuyucuklu plakalara alındı ve hücreler 1 ml tripsin-EDTA (%0.25) solüsyonu eklenerek lamel yüzeyinden kaldırıldı. 1 ml %10 FBS içeren hücre kültür medyumunu eklenerek Tripsin-EDTA aktivasyonu durduruldu. Hücreleri içeren medyum

15 mL'lik tüplere alınarak 10 dakika boyunca 350 g de santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra hücre peleti 1 mL kültür medyumuna ile süspansiyon edildi ve 1,5 mL'lik ayrı bir santrifüj tüpüne aktarıldı. Mikro santrifüj cihazında 10 dakika 350 g de santrifüj edilen örneklerin süpernatantı atıldıktan sonra tüpün dibinde kalan pelet RNA izolasyonu için -80°C'de saklandı.

3.2.8. Real-Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) için RNA İzolasyonu

Periodontal ligament kökenli hücrelerden total RNA, ticari RNA izolasyon kiti (TRIzol Reagent, Thermo) kullanılarak izole edildi.

Örnekler ilk olarak -80 °C'den -20 °C'ye daha sonra +4°C'de beklenerek oda sıcaklığına alındı. Örnekler 200 µl PBS eklenerek tüpün dibindeki hücreler süspansiyon edildi. Daha sonra örnekler 1000 µl Lizis Buffer ve 10 µl β-merkaptetanola eklendi. Elde edilen karışım pipetleme yapıldıktan sonra 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Tüplere 200 µl kloroform: izoamil alkol etanol karışımı (49:1) eklendi ve pipetaj yapıldıktan sonra iki dakika inkübe edildi. Örnekler inkübasyondan sonra +4°C'de 12.000 g'de 15 dakika santrifüj edildi. Santrifüjü takiben tüplerde 2 faz halinde altta DNA, üstte RNA içeren ve ortada beyaz katman içeren yapı elde edildi. RNA'ları içeren üst kısım yeni santrifüj tüpüne aktarıldı. Yeni tüpe aktarılan RNA miktarının (~ 600 µl) 1,25 katı kadar tüplere etanol eklendi ve pipetleme ile karıştırıldı. Elde edilen lizattan spin kolon tüplere 700 µl eklendi ve tüp, 12.000 g'de 20 saniye santrifüj edildi.



Şekil 3.19: A) 2 faz halinde altta DNA üstte RNA içeren ve ortada beyaz katman içeren yapı, B) RNA'ların spin kolona aktarılması, C) Spin kolonda altta kalan sıvının uzaklaştırılması.

Santrifüj bitiminde spin kolon tüpünün altında toplanan sıvı uzaklaştırıldı ve elde edilen lizatın kalanı için aynı işlem tekrar edildi. Daha sonra spin kolona 700 µl yıkama solüsyonu 1 eklendi ve 12000 g de 20 saniye santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında spin kolon tüpünün altında kalan sıvı uzaklaştırıldı. Spin kolona 600 µl yıkama solüsyonu 2 eklendi ve 12000 g de 20 saniye santrifüj edildi. Tüpün alt kısmındaki sıvı uzaklaştırıldıktan sonra bu işlem bir kere daha tekrarlandı. Yıkama aşaması bittikten sonra spin kolon boş bir şekilde 17000 g de 1 dakika santrifüj edildi. Spin kolonun alt kısmı atılarak kolon filtresi başka bir santrifüj tüpüne yerleştirildi. Kolon filtresine nükleaz içermeyen 60 °C'deki 60 µl dietil pirokarnonathı (DEPC) su eklendi. Santrifüj tüpleri 12000 g 1 dakika santrifüj edildi ve santrifüj sonrası kolon filtresi atılarak tüplerin kapakları kapatıldı. Elde edilen RNA'ların her birinden 5 µl alındı ve µDrop Plaka kullanılarak total RNA miktarı, DNA kontaminasyonu (260/280 nm dalga boyunda) ve kimyasal kirliliği (260/230 nm dalga boyunda) MultiScanGo (Thermo Scientific) cihazında tespit edildi. RNA'lar daha sonra komplement DNA (cDNA) sentezinde kullanılmak üzere -80 °C'de saklandı.

Total RNA miktarı The iQuant™ RNA BR Assay Kitin talimatlarına göre, Qubit 2.0 Florometre cihazı ile belirlendi. Örnekler 1 µl'de aynı ng RNA içerecek şekilde sulandırıldıktan sonra cDNA sentezi aşamasına geçildi.

3.2.9. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi

Standardize edilen RNA örneklerinden NucleoGene cDNA Synthesis Kiti aracılığı ile qPCR'da kullanılmak üzere cDNA elde edildi. Bu amaçla 0.2 mL tüplere örnek başına Tablo 3.4'de belirtilen kimyasallar kullanılarak reaksiyon karışımı hazırlandı. Hazırlanan karışım 25 °C'de 5 dakika, 50 °C'de 30 dakika, 85 °C'de 5 dakika inkübe edildikten sonra qPCR'da kullanılmak üzere -20 °C'de saklandı.

Tablo 3.4: cDNA sentezinde kullanılan kimyasallar ve miktarları

Kimyasallar	Miktar
NucleoGene cDNA Sentez Kiti	4 µl
1 µg RNA	8 µl
RNAz içermeyen su	8 µl
Toplam hacim	20 µl

Gradient PCR

Primer çiftleri için en uygun bağlanma sıcaklığını (melting tempature, T_m) belirlemek amacıyla her primer çiftine ayrı ayrı gradient PCR yapıldı. Bu amaçla 2X qPCR SYBR-Green MasterMix 5 µl, ileri primer 0,4 µl, geri primer 0,4 µl, cDNA 1,5 µl ve RNaz içermeyen su 2,7 µl ile toplam hacim 10 µl olacak şekilde reaksiyon karışımı hazırlandı ve termal siklus cihazına yerleştirildi. Eppendorf Thermal Cycler cihazı 95 °C’de 5 dakika 1 döngü; 98 °C’de 15 sn, 56-66 °C 30 sn ve 72 °C’de 40 sn 40 döngü; 72 °C’de 5 dakika 1 döngü olacak şekilde programlandı.

RT-PCR analizi ile periodontal ligamentten elde edilen mezenkimal kök hücrelerde 1,2,3 ve 4. Pasajda toplanan hücrelerin mezenkimal kök hücrelere özgü antijenlere ait ekspresyon düzeyleri CD 29+, CD 44+, CD 45-, CD 105+ primerleri kullanılarak belirlendi.

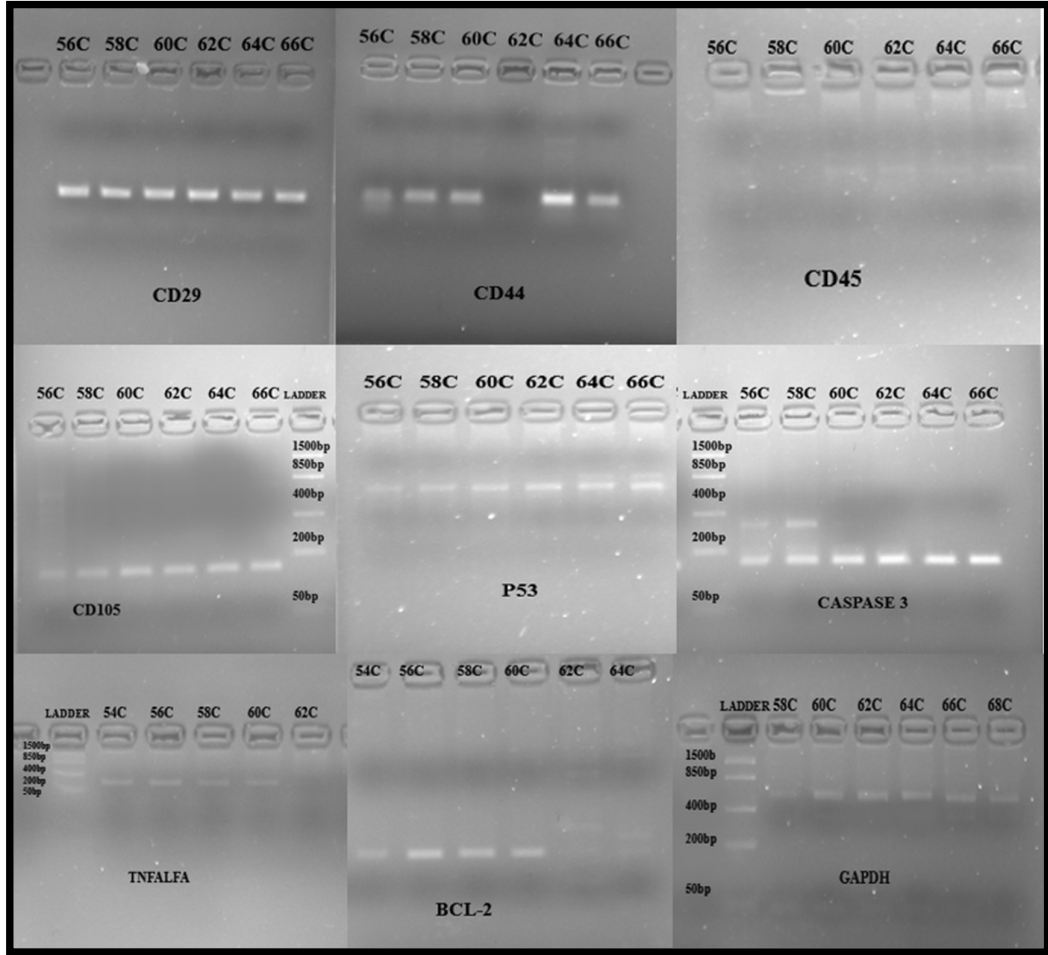
Biyoseramik içerikli ürünler ile kültüre edilen PDL’den elde edilen mezenkimal kök hücrelerde dışsal ve içsel apoptoz yollarında etkili olan TNF- α , Bcl-2, p53 ve caspase-3 genlerinin mRNA ekspresyon düzeyleri belirlendi.

Tüm çalışmalarda referans gen olarak Gliseraldehid 3-Fosfat Dehidrogenaz (GAPDH) geni kullanıldı. Kullanılan belirteçlerin primerleri FastPCR Professional 6.1.2 beta yazılımı yardımıyla tasarlandı. Primerler, kullanılmadan önce 10 pmol/µL konsantrasyonuna seyreltilti.

Tablo 3.5: Kullanılan primerler ve özellikleri

Gen	İleri (5'→3')	Geri (5'→3')	Tm (°C)	Baz Çifti
CD29	AAGATCAGGGGAGCCACAGAC	GCCAAATCCAATTCTGAAGTCCGA	65	187
CD44	CTGAGCCTGGCGCAGATCGA	TCCGAGAGATGCTGTAGCGACC	65	91
CD45	TTGCTGCACAAGGTCCCAGGGA	AGTGCCCTCTTCCATTGACGGCCA	65	152
CD105	GCCTACAATTCCAGCCTGGTC	GATGCTCTGGGGGTCATTGAGC	65	150
P53	ATAGCGATGGTCTGGCCCCTC	GGTGGTACAGTCAGAGCCAACCTC	62	143
Caspase-3	GGAAGCGAATCAATGGACTCTGGA	CCTGAGGTTTGCTGCATCGA	65	159
Caspase-9	AAATATGTCCTGGGGTAT	TACAGCTGTTGAGACTCTAGTA	57	128
TNF- α	GAGTGACAAGCCTGTAGCCCA	GCTGGTTATCTCTCAGCTCCACG	56	119
Bcl-2	AGTACCTGAACCGGCACCT	GCCGTACAGTTCCACAAAGG	56	74
GAPDH	CAAGGTCATCCATGACAACTTTG	GTCCACCACCCTGTTGCTGTAG	63-65	496

Gradient PCR işlemi sonucu elde edilen ürünlerinin görüntülenmesi amacıyla (%3'lük) agaroz jel hazırlandı. Jelde bulunan her bir kuyucuk için 8 µl yükleme boyası (1x loading dye) ve 4 µl PCR ürünü içeren karışım kuyucuklara yüklendi ve 90 voltta (7 V/cm) 40 dakika yürütüldü. Daha sonra PCR sonuçları Vilber Lourmat BIO-VISION jel görüntüleme sisteminde Şekil 3.20'deki gibi görüntülendi. Işıma görüntüsü veren bantlar pozitif, ışıma görülmeyen bantlar ise negatif olarak değerlendirildi.



Şekil 3.20: Gradient PCR primer görüntüleri

3.2.10. Real-Time PCR Analizi

Real-time PCR analizi için A.B.T.™ 2X qPCR SYBR-Green MasterMix with ROX kiti kullanıldı. Tablo 3.6'da belirtilen şekilde reaksiyon karışımı hazırlandı ve karışım 8,5 µL olacak şekilde 96 kuyucuklu PCR plakalarının kuyucuklarına dağıtıldı.

Reaksiyon karışımının üzerine her bir örneğin cDNA' sı 1,5 µL eklendi. PCR plakalarının üzeri optik geçirgen bir bant ile kapatılarak 1700 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Karanlık ortamda RT-PCR cihazında (Quant Studio 5) analizler yapıldı.

Tablo 3.6: RT-PCR reaksiyon bileşenleri ve miktarları

Kimyasallar	Miktar
2X qPCR SYBR-Green MasterMix	5 µl
İleri primer	0,4 µl
Geri primer	0,4 µl
RNAz içermeyen su	2,7 µl
Toplam hacim	8,5 µl

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

Tablo 3.7: RT-PCR analiz aşamaları

PCR Aşamaları	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü sayısı
Başlagıç denatürasyonu	95	5 dk	1
Denatürasyon	95	30 sn	
Bağlanma	60-66	30 sn	40
Uzama	72	40 sn	
Melting curve	65	4 sn	1

Denatürasyon, primer yapışması ve zincir uzatma olmak üzere üç basamaktan oluşan amplifikasyon işleminden sonra elde edilen amplifikasyon eğrilerine ait döngü eşiği (Ct) değerlerinden hareketle, hedef genlerin mRNA ifade düzeylerinin nisbi değişimleri 2- $\Delta\Delta C_t$ metodu ile hesaplandı. Bu hesaplamada;

$$\Delta\Delta C_t = (C_{t\text{hedef gen}} - C_{t\text{beta actin}})_{\text{denek grubu}} - (C_{t\text{hedef gen}} - C_{t\text{beta actin}})_{\text{kontrol grubu}}$$

formülü uygulandı; hesaplanan değer her bir gen için 2- $\Delta\Delta C_t$ formülünde yerine konularak mRNA ifade düzeyi misli olarak azalma ya da artış şeklinde belirlendi Endojen kontrol olarak GAPDH geni kullanıldı ve her bir örneğe ait GAPDH gen düzeyine göre diğer genlerin ifade düzeylerinde düzeltme (normalizasyon) uygulandı. RT-PCR çalışmalarında deneysel hataları ve farkları azaltmak için her gruptan örnekler aynı

şartlarda ve aynı grup içerisinde 3'er kez çalışılarak bu u ölçümün ortalaması analizlerde kullanıldı.

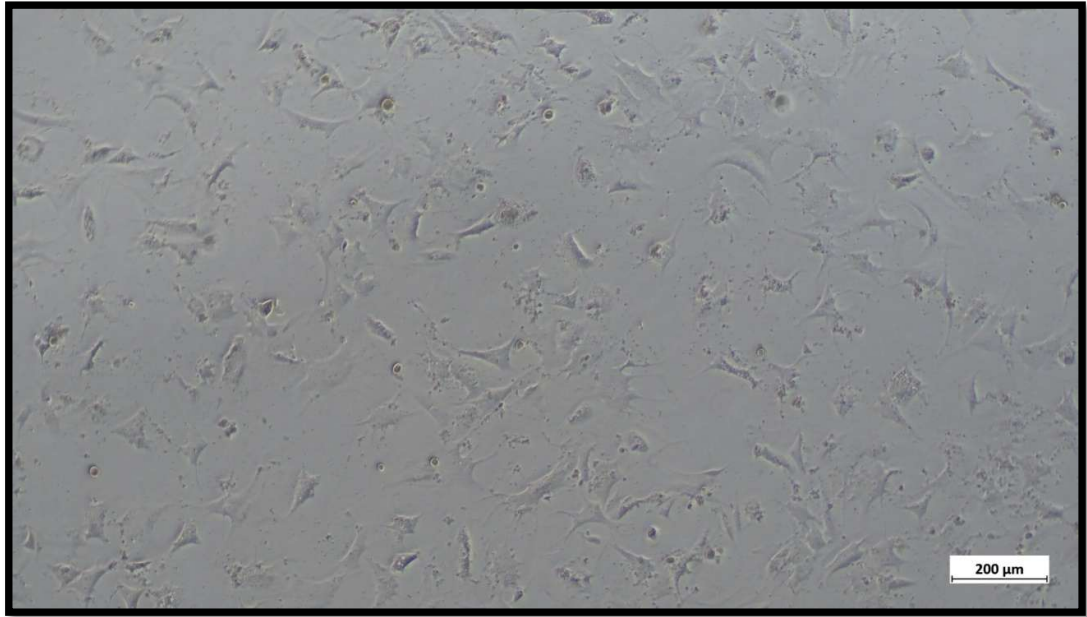
İstatistiksel Analizler

Elde edilen verilerin istatistiksel analizleri IBM SPSS Statistics version 22 (Statistical Package for Social Science, IBM SPSS, Chicago, U.S.A.) programı kullanarak yapıldı. İki grubun sayısal verileri arasındaki farkın analizinde Mann-Whitney U Testi ikiden fazla grup durumunda verilerin gruplar arası karşılaştırmalarında Kruskal Wallis testi ve farklılığa neden olan grubun tespitinde Mann Whitney U test kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık değeri olarak $p \leq 0,05$ belirlendi. Bu varsayıma göre elde edilen değeriin 0,05'den büyük olması durumunda istatistiksel anlamlılık olmadığı, 0,05'den küçük olması durumunda ise değeriin anlamlılık ifade ettiği anlaşılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Periodontal ligament hücre morfolojisi

PDL doku parçalarının kültüre edildikten 7 gün sonra doku çevresinde hücrelerin çoğalmaya başladığı belirlendi. Yaklaşık 3 hafta sonra hücrelerin %70 konfluense ulaştığı fibroblast benzeri bir morfolojiye sahip oldukları gözlemlendi. Tüm pasajlarda hücrelerin bu morfolojiyi korudukları saptandı. Şekil 4.1’de Pasaj 4 (P4)’teki hücrelerin mikroskop görüntüsü görülmektedir.



Şekil 4.1: PDL fibroblast hücrelerinin mikroskop görüntüsü

4.1.1. P1’e Göre P2, P3 ve P4’te Periodontal Ligament Hücrelerinde Mezenkimal Kök Hücre Belirteçlerinin Gen İfadeleri

PDL hücreleri 4. pasaja kadar çoğaltıldı ve P1’e göre P2, P3 ve P4 teki hücrelerde mezenkimal kök hücre belirteçlerinin gen ifadeleri kat değişimi şeklinde Tablo 4.1’de gösterildi.

P1 hücreleri ile karşılaştırıldığı zaman P2 ve P3 hücrelerinde CD29 gen ifadesinin azaldığı ancak bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edildi. Pasaj 4 hücrelerinde ise bu gen ifadesinin arttığı ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptandı.

CD44 gen ifadesinin P1 hücrelerine kıyasla P2 ve P4 hücrelerinde arttığı ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi. P3 hücrelerinde ise bu gen ifadesinin istatistiksel olarak önemli olmayan seviyede azaldığı tespit edildi.

CD45 gen ifadesinin P1 hücrelerine kıyasla P2, P3 hücrelerinde azaldığı belirlendi ve gen ifadesindeki azalmanın gruplarda istatistiksel olarak anlamlı bulunmadığı saptandı. P4 hücrelerinde ise bu gen ifadesinin arttığı ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi.

CD105 gen ifadesinin P1 hücrelerine göre P2, P3 ve P4 hücrelerinde azaldığı tespit edildi ve gen ifadesindeki azalmanın tüm gruplarda istatistiksel olarak önemli bulunmadığı saptandı.

Tablo 4.1: P1, P2, P3 ve P4'teki Periodontal hücrelerinde mezenkimal kök hücre belirteçlerinin gen ifadelerinin istatistiksel olarak karşılaştırılması

GENLER		CD29		CD44		CD45		CD105	
N	Pasaj Grupları	Ortalama $\pm$ S.D.	Ortanca	Ortalama $\pm$ S.D.	Ortanca	Ortalama $\pm$ S.D.	Ortanca	Ortalama $\pm$ S.D.	Ortanca
3	PASAJ 1^a	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
3	PASAJ 2^b	0,228 $\pm$ 0,221	0,184	2,027 $\pm$ 0,748	1,948	0,304 $\pm$ 0,081	0,272	0,003 $\pm$ 0,001	0,004
3	PASAJ 3^c	0,165 $\pm$ 0,006	0,168	0,555 $\pm$ 0,481	0,665	0,478 $\pm$ 0,347	0,298	0,007 $\pm$ 0,006	0,005
3	PASAJ 4^d	3,675 $\pm$ 3,092	4,795	1,508 $\pm$ 0,936	0,936	1,670 $\pm$ 1,213	2,013	0,112 $\pm$ 0,0376	0,108
P		a-b= 0,180 a-c=0,180 a-d=0,655		a-b=0,180 a-c=0,180 a-d=0,655		a-b=0,180 a-c=0,180 a-d=0,655		a-b=0,157 a-c=0,180 a-d=0,180	

4.2. MTT Testi

Tüm biyomateryal gruplarında, direkt biyomateryale maruziyette hücre canlılığının indirekt maruziyete göre daha az olduğu görülmektedir. MTAFlow™ White, NeoPUTTY® ve Biodentine™ gruplarında indirekt uygulamadaki % hücre canlılığı, direkt uygulamaya göre istatistiksel olarak önemli iken ($p \leq 0.05$), NeoMTA® 2'deki fark ise istatistiksel olarak önemli bulunmadı.

Tablo 4.2: İndirekt ve direkt uygulamalarda MTT analiz sonuçlarının grup içinde karşılaştırılması.

Biyomateryal	Group	N	Ortalama $\pm$ S.D.	Ortanca	p
MTAFlow™ White	İndirekt	3	167,927 $\pm$ 8,970	166,218	0,050*
	Direkt	3	19,114 $\pm$ 14,787		
Neo MTA® 2	İndirekt	3	190,428 $\pm$ 31,457	196,043	0,513
	Direkt	3	176,550 $\pm$ 34,429		
NeoPUTTY®	İndirekt	3	70,754 $\pm$ 11,158	71,527	0,050*
	Direkt	3	48,512 $\pm$ 3,804		
Biodentine™	İndirekt	3	75,545 $\pm$ 6,783	75,028	0,050*
	Direkt	3	24,422 $\pm$ 14,086		

*p $\leq$ 0.05; **p $\leq$ 0.01; ***p $\leq$ 0.001.

MTAFlow™ White ve NeoMTA® 2 indirekt uygulamasının hücre sayısını kontrole göre arttırdığı gözlemlendi. Ancak tüm biyomateryal grupları kontrolle karşılaştırıldığında hiçbir grupta önem gözlenmedi. İstatistiksel olarak MTAFlow™ White ve NeoMTA® 2 indirekt arasında istatistiksel fark bulunmazken her iki biyomateryalin NeoPUTTY® ve Biodentine™ göre istatistiksel olarak önemli olduğu belirlendi. NeoPUTTY® ve Biodentine™ arasında fark saptanmadı [Sırasıyla ($p \leq 0.05$) ve ($p \leq 0.01$) ve Biodentine™ ($p \leq 0.05$)].

Tablo 4.3: İndirekt uygulamalarda MTT analiz sonuçlarının gruplar arasında karşılaştırılması.

Grup	Biyomateryal	N	Ortalama $\pm$ S.D.	Ortanca	P
İNDİREKT	MTAFlow™ White ^a	3	167,927 $\pm$ 8,970	166,218	a-b: 0,783 a-c: 0,013* a-d: 0,028* a-e: 0,272 b-c: 0,006** b-d: 0,013* b-e: 0,169 c-d: 0,783 c-e: 0,169 d-e: 0,272
	NeoMTA® 2 ^b	3	190,428 $\pm$ 31,457	196,043	
	NeoPUTTY® ^c	3	70,754 $\pm$ 11,158	71,527	
	Biodentine™ ^d	3	75,545 $\pm$ 6,783	75,028	
	KONTROL ^e	3	100,000 $\pm$ 0,000	100,000	

a: MTAFlow White b: NeoMTA 2 c: NeoPUTTY d: Biodentine e: Kontrol *p $\leq$ 0.05; **p $\leq$ 0.01; ***p $\leq$ 0.001.

Hücrelerin biyomateryale direkt temasta kaldığı gruplarda sadece NeoMTA® 2 grubunda hücre canlılık yüzdesinin kontrole göre arttığı gözlemlendi ($p \leq 0.05$). MTAFlow™ White grubunda direkt temasta kontrole göre istatistiksel olarak önemli olan azalma gözlemlendi ($p \leq 0.05$). Diğer gruplarda ise kontrole göre hücre canlılık yüzdesinde istatistiksel düzeyde önemli olmayan azalma belirlendi. Ayrıca NeoMTA® 2 grubundaki artış MTAFlow™ White ve Biodentine™ gruplarına göre de önemlidir ($p \leq 0.01$).

Tablo 4.4: Direkt uygulamalarda MTT analiz sonuçlarının gruplar arasında karşılaştırılması.

Grup	Biyomateryal	N	Ortalama $\pm$ S.D.	Ortanca	P
DİREKT	MTAFlow™ White ^a	3	19,114 $\pm$ 14,787	13,873	a-b: 0,003** a-c: 0,169 a-d: 0,783 a-e: 0,028* b-c: 0,099 b-d: 0,006** b-e: 0,410 c-d: 0,272 c-e: 0,410 d-e: 0,054
	NeoMTA® 2 ^b	3	176,550 $\pm$ 34,429	166,931	
	NeoPUTTY® ^c	3	48,512 $\pm$ 3,804	48,942	
	Biodentine™ ^d	3	24,422 $\pm$ 14,086	19,578	
	KONTROL ^e	3	100,000 $\pm$ 0,000	100,000	

a: MTAFlow White b: NeoMTA 2 c: NeoPUTTY d: Biodentine e: Kontrol * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$;

*** $p \leq 0.001$.

4.3. Real Time PCR Bulguları

4.3.1. Periodontal Ligament Hücrelerinin Biyomateryallere İndirekt Olarak 24 ve 48 Saat Süreyle Maruz Bırakıldığında Apoptozis ile İlgili Belirteçlerin Gen İfadelerindeki Kat Değişimlerinin İstatistiksel Olarak Karşılaştırılması

Çalışmamızda, PDL hücrelerinin biyomateryallere indirekt olarak 24 ve 48 saat süre ile maruz bırakıldığında hücrelerin apoptozis ile ilgili belirteçlerinin gen düzeyindeki farklılıkları kat değişimi olarak Tablo 4.5 ve Tablo 4.6’da gösterildi. Kontrol grubu olarak P3’ten sonraki periodontal hücreler kullanıldı.

4.3.1.1. Biyomateryallerin 24. Saat İndirekt Etkisinde Apoptozis Gen Belirteçleri

İndirekt olarak 24 saat boyunca Biodentine™’e maruz kalan hücrelerde kontrole göre Bcl-2 gen ifadesi 311,798 kat, caspase-3 gen ifadesi 1,652 kat, p53 gen ifadesi 8,747 kat, TNF- α gen ifadesi 49,919 kat ve caspase-9 gen ifadesi ise 2,875 kat arttı. Kontrol ile karşılaştırıldığında sadece Bcl-2 gen ifadesindeki kat artışı $p \leq 0.05$ düzeyinde önemli olarak belirlendi. İndirekt olarak 24 saat boyunca MTAFlow™ White’a maruz kalan

hücrelerde Bcl-2 gen ifadesi 52,043 kat, p53 gen ifadesi 2,089 kat, TNF- α 2,371 kat artarken caspase-3 ve caspase-9 gen ifadeleri sırasıyla 0,182 ve 0,626 kat azaldı. Fakat kontrol ile karşılaştırıldığında gen ifadelerinin kat düzeyleri arasında istatistiki olarak önem saptanmadı.

İndirekt olarak 24 saat boyunca NeoMTA® 2'ye maruz kalan hücrelerde kontrole göre Bcl-2 gen ifadesi 4,104 kat, p53 gen ifadesi 1,414 kat ve caspase-9 gen ifadesi ise 13,363 kat artarken, caspase-3 ve TNF- α gen ifadeleri sırasıyla 0,094 ve 0,7 kat azaldı. Fakat kontrol ile karşılaştırıldığında gen ifadelerinin kat düzeyleri arasında istatistiki olarak fark belirlenmedi.

İndirekt olarak 24 saat boyunca NeoPUTTY®'ye maruz kalan hücrelerde kontrole göre Bcl-2 gen ifadesi 2,756 kat, caspase-9 gen ifadesi 5,408 kat artarken; caspase-3, p53 ve TNF- α gen ifadelerinde sırasıyla 0,416, 0,442 ve 0,332 kat azaldı. Fakat kontrol ile karşılaştırıldığında gen ifadelerinin kat düzeyleri arasında istatistiki olarak önemli bir fark saptanmadı.

İndirekt olarak 24 saat boyunca 4 grupta farklı kök kanal tamir materyallerine maruz bırakılan periodontal ligament hücrelerinde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında Bcl-2 geninin ifadesinde kat artışı görüldü ve bu artışın özellikle Biodentine™ ve MTA Flow™ White gruplarında çok yüksek olarak saptandı. Ancak gen ifadesindeki bu artış istatistiki olarak sadece Biodentine™ grubunda ($p \leq 0.05$) önemli bulundu. Aynı zamanda Biodentine™ ile NeoMTA® 2 grubu arasında ($p \leq 0.05$) ve Biodentine™ ile NeoPUTTY® grubu arasında da istatistiksel bir fark olduğu belirlendi ($p \leq 0.01$).

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığı zaman caspase-3 gen ifadesinin kat değişiminde Biodentine™ grubunda artış gözlenirken, MTAFlow™ White, NeoMTA® 2 ve NeoPUTTY® gruplarında kat değişiminde azalma olduğu belirlendi. Caspase-3 geni için Biodentine™ ile MTAFlow™ White grupları arasında ve Biodentine™ ile NeoMTA 2 grupları arasında istatistiki bir fark saptandı ($p \leq 0.05$).

p53 geninin ifadesinin kat değerleri incelendiğinde kontrol grubuna kıyasla Biodentine™, MTAFlow™ White ve NeoMTA® 2 gruplarında artış saptanırken, NeoPUTTY® grubunun gen ifadesinde azalma olduğu belirlendi. p53 gen ifadesi kat değişimi için Biodentine™ ve NeoPUTTY® grupları arasında da istatistiksel bir önem olduğu ($p \leq 0.01$) saptandı ancak diğer gruplar arasında istatistiki açıdan önem bulunmadı. TNF- α gen ifadesinde kontrol grubuna kıyasla Biodentine™ ve MTAFlow™ White

gruplarında kat artışı gözlenirken NeoMTA® 2 ve NeoPUTTY® gruplarında azalma belirlendi. TNF- α gen ifadesi kat değişimi yönünden Biodentine™ ile NeoMTA® 2 grupları, Biodentine™ ile NeoPUTTY® grupları ve MTAFlow™ White ile NeoPUTTY® grupları arasında da sırasıyla $p \leq 0.05$ ve $p \leq 0.01$ düzeyinde istatistiksel bir fark olduğu belirlenirken diğer gruplarda istatistiki önem saptanmadı. Caspase-9 geninin ifadesi kontrol grubu ile kıyaslandığında Biodentine™, NeoMTA® 2 ve NeoPUTTY® gruplarında kat artışı gösterirken, MTAFlow™ White grubunda azalma saptandı. MTAFlow™ White ile NeoMTA® 2 grupları ve MTAFlow™ White ile NeoPUTTY® grupları arasında $p \leq 0.05$ istatistiksel bir fark belirlendi ancak diğer gruplar arasında istatistiksel önem saptanmadı (Tablo 4.5).

Tablo 4.5: Periodontal ligament hücrelerinin kök kanal tamir materyallerine indirekt olarak 24 saat süreyle maruz bırakıldığında apoptozis belirteçlerin gen ifadelerindeki kat değişimlerinin istatistiksel olarak karşılaştırılması

	GENLER	Bcl-2		Caspase 3		p53		TNF- α		Caspase 9	
N	Biyomateryal	Ortalama $\pm$ S.D.	Ortanca	Ortalama $\pm$ S.D.	Ortanca	Ortalama $\pm$ S.D.	Ortanca	Ortalama $\pm$ S.D.	Ortanca	Ortalama $\pm$ S.D.	Ortanca
³	Biodentine ^b	311,798 $\pm$ 22,027	321,721	1,652 $\pm$ 0,270	1,530	8,747 $\pm$ 3,503	9,476	49,919 $\pm$ 12,643	50,891	2,875 $\pm$ 0,441	2,909
³	MTAFlow White ^c	52,043 $\pm$ 11,646	46,549	0,182 $\pm$ 0,037	0,169	2,089 $\pm$ 0,756	1,935	2,371 $\pm$ 0,232	2,417	0,626 $\pm$ 0,114	0,667
³	NeoMTA 2 ^d	4,104 $\pm$ 1,987	5,006	0,094 $\pm$ 0,026	0,103	1,414 $\pm$ 0,904	1,010	0,7 $\pm$ 0,322	0,838	13,363 $\pm$ 8,861	17,097
³	NeoPUTTY ^e	2,756 $\pm$ 1,313	3,465	0,416 $\pm$ 0,353	0,217	0,442 $\pm$ 334	0,253	0,332 $\pm$ 0,178	0,311	5,408 $\pm$ 2,508	6,438
³	KONTROL ^a	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
<i>P</i>		a-b= 0,014*		a-b=0,657		a-b=0,120		a-b=0,266		a-b=0,266	
		a-c=0,075		a-c=0,335		a-c=0,459		a-c=0,657		a-c=0,657	
		a-d=0,335		a-d=0,075		a-d=0,824		a-d=0,604		a-d=0,604	
		a-e=0,553		a-e=0,553		a-e=0,553		a-e=0,299		a-e=0,299	
		b-c=0,345		b-c=0,046*		b-c=0,249		b-c=0,345		b-c=0,116	
		b-d=0,036*		b-d=0,002**		b-d=0,059		b-d=0,021*		b-d=0,208	
		b-e=0,009**		b-e=0,142		b-e=0,002*		b-e=0,002**		b-e=0,529	
		c-d=0,249		c-d=0,249		c-d=0,463		c-d=0,173		c-d=0,005*	
		c-e=0,093		c-e=0,600		c-e=0,059		c-e=0,036*		c-e=0,028*	
		d-e=0,600		d-e=0,093		d-e=0,249		d-e=0,463		d-e=0,529	

* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$

4.3.1.2. Biyomateryallerin 48. Saat İndirekt Etkisinde Apoptozis Gen

Belirteçleri

İndirekt olarak 48 saat boyunca NeoMTA® 2'ye maruz kalan hücrelerde kontrole göre Bcl-2 gen ifadesi 2,130 kat, caspase-9 6,213 kat artarken; caspase-3 gen ifadesi 0,179 kat, p53 gen ifadesi 0,356 kat, TNF- α gen ifadesi 0,228 kat azaldı. Kontrol ile karşılaştırıldığında NeoMTA® 2 grubunda caspase-9 gen ifadesi kat artışında istatistiki olarak $p \leq 0.05$ düzeyinde bir fark saptandı.

İndirekt olarak 48 saat boyunca NeoPUTTY®'a maruz kalan hücrelerde kontrole göre Bcl-2 gen ifadesi 8,614 kat, p53 gen ifadesi 1,540, TNF- α 1,610 ve caspase-9 5,913 kat artarken; caspase-3 gen ifadesi 0,532 kat azaldı. Kontrol ile karşılaştırıldığında NeoPUTTY® grubunda Bcl-2 ve caspase-9 gen ifadesi kat artışında istatistiki olarak $p \leq 0.05$ düzeyinde bir fark saptandı.

İndirekt olarak 48 saat boyunca Biodentine™ maruz kalan hücrelerde kontrole göre Bcl-2 gen ifadesi 4,100 kat, caspase-3 gen ifadesi 8,614 kat, p53 gen ifadesi 1,235 kat arttı TNF- α ve caspase-9 gen ifadeleri sırasıyla 0,374 ve 0,406 kat azaldı. Kontrol ile karşılaştırıldığında Biodentine™ grubu gen ifadelerinin kat düzeyleri arasında istatistiki olarak önemli bir fark saptanmadı.

İndirekt olarak 48 saat boyunca MTAFlow™ White'a maruz kalan hücrelerde kontrole göre Bcl-2 gen ifadesi 87,279 kat, p53 gen ifadesi 4,776 kat, TNF- α gen ifadesi 28,083 ve caspase-9 gen ifadesi 2,167 kat artarken; caspase-3 gen ifadesi 0,168 kat azaldı. Kontrol ile karşılaştırıldığında MTAFlow™ White grubunda Bcl-2 gen ifadesi kat artışında istatistiki olarak $p \leq 0.01$ düzeyinde bir fark saptandı.

İndirekt olarak 48 saat boyunca kök kanal tamir materyallerine maruz bırakılan PDL hücrelerinde kontrol grubuna kıyasla Bcl-2 geninin ifadesinde kat artışı görüldü, kontrol grubu ile karşılaştırıldığı zaman en yüksek kat artışının MTAFlow™ White grubunda olduğu ve MTAFlow™ White ve kontrol grubu ile NeoPUTTY® grupları arasındaki kat artışının sırasıyla $p \leq 0.01$ ve $p \leq 0.05$ düzeylerinde istatistiki olarak önemli olduğu saptandı. Diğer gruplarda belirlenen kat artışının kontrole göre istatistiki açıdan önemli olmadığı belirlendi. Ancak Biodentine™ ile MTAFlow™ White ve MTAFlow™ White ile NeoMTA® 2 grupları arasında da $p \leq 0.05$ düzeyinde istatistiksel bir fark olduğu

gözlemlendi. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında zaman Biodentine™ grubunda caspase-3 gen ifadesinde kat artışı saptanırken, MTAFlow™ White, NeoMTA® 2 ve NeoPUTTY® gruplarında azalma olduğu görüldü. Caspase-3 gen ifadesi kat değişiminde gruplar arasında istatistiki bir fark saptanmadı. p53 geninin ifadesinin kat değerleri incelendiğinde kontrol grubuna kıyasla Biodentine™, MTAFlow™ White ve NeoPUTTY® gruplarında artma saptanırken, NeoMTA® 2 grubunun gen ifadesinde azalma olduğu belirlendi. p53 gen ifadesinde MTAFlow™ White ile NeoMTA® 2 grupları arasında da istatistiksel bir önem olduğu saptandı ($p \leq 0.001$). Ancak diğer gruplar arasında istatistiki açıdan önem bulunmadı. TNF- α geninin ifadesinde kontrol grubuna kıyasla MTAFlow™ White ve NeoPUTTY® gruplarında kat artışı gözlenirken Biodentine™ ve NeoMTA® 2 gruplarında azalma belirlendi. TNF- α gen ifadesi kat artışı yönünden Biodentine® ile MTAFlow™ White grupları arasında ($p \leq 0.05$) ve MTAFlow™ White ile NeoMTA® 2 grupları arasında ($p \leq 0.01$) istatistiksel bir fark olduğu belirlenirken; diğer gruplarda istatistiki bir önem saptanmadı. Caspase-9 geninin ifadesi kontrol grubu ile kıyaslandığında MTAFlow™ White, NeoMTA® 2 ve NeoPUTTY® gruplarında kat artışı gözlenirken, Biodentine™, grubunda azalma saptandı. Ayrıca kontrol grubuna kıyasla NeoMTA® 2 ve NeoPUTTY® gruplarında $p \leq 0.05$ düzeyinde ve Biodentine™ ile NeoMTA® 2 grupları ve Biodentine™ ile NeoPUTTY® grupları arasında $p \leq 0.05$ düzeyinde istatistiksel bir fark gözlenirken diğer gruplar arasında istatistiksel önem saptanmadı (Tablo 4.6).

Tablo 4.6: Periodontal ligament hücrelerinin kök kanal tamir materyallerine indirekt olarak 48 saat süreyle maruz bırakıldığında apoptozis belirteçlerin gen ifadelerindeki kat değişimlerinin istatistiksel olarak karşılaştırılması

GENLER		Bcl-2		Caspase 3		p53		TNF- α		Caspase 9	
N	Biyomateryal	Ortalama $\pm$ S.D.	Ortanca	Ortalama $\pm$ S.D.	Ortanca	Ortalama $\pm$ S.D.	Ortanca	Ortalama $\pm$ S.D.	Ortanca	Ortalama $\pm$ S.D.	Ortanca
3	Biodentine ^b	4,100 $\pm$ 3,518	5,350	8,614 $\pm$ 1,168	0,029	1,235 $\pm$ 0,743	1,427	0,374 $\pm$ 0,119	0,414	0,406 $\pm$ 0,238	0,405
3	MTAFlow White ^c	87,279 $\pm$ 37,940	70,898	0,168 $\pm$ 0,055	0,150	4,776 $\pm$ 2,284	4,523	28,083 $\pm$ 7,565	28,155	2,167 $\pm$ 0,433	2,128
3	NeoMTA 2 ^d	2,130 $\pm$ 0,976	2,401	0,179 $\pm$ 0,100	0,227	0,356 $\pm$ 0,193	0,296	0,228 $\pm$ 0,040	0,238	6,213 $\pm$ 01,934	5,802
3	NeoPUTTY ^e	8,614 $\pm$ 2,681	8,286	0,532 $\pm$ 0,298	0,616	1,540 $\pm$ 0,801	1,818	1,610 $\pm$ 1,148	1,987	5,913 $\pm$ 1,285	6,434
3	KONTROL ^a	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
<i>P</i>		a-b= 0,360				a-b= 0,855		a-b= 0,314		a-b= 0,410	
		a-c=0,003**				a-c=0,054		a-c=0,169		a-c=0,410	
		a-d=0,410				a-d=0,200		a-d=0,067		a-d=0,035*	
		a-e=0,035*				a-e=0,583		a-e=0,927		a-e=0,044*	
		b-c=0,035*				b-c=0,082		b-c=0,017*		b-c=0,099	
		b-d=0 ,927				b-d=0,143		b-d=0,410		b-d=0,003**	
		b-e=0,234				b-e=0,714		b-e=0,272		b-e=0,005**	
		c-d=0,028*				c-d=0,001***		c-d=0,001**		c-d=0,200	
		c-e=0,360				c-e=0,169		c-e=0,200		c-e=0,234	
		d-e=0,200				d-e=0,067		d-e=0,054		d-e=0,927	

* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$

4.3.2. Periodontal Ligament Hücrelerinin Biyomateryallere Direkt Olarak 24 ve 48 Saat Süreyle Maruz Bırakıldığında Apoptozis ile İlgili Belirteçlerin Gen İfadelerindeki Kat Değişimlerinin İstatistiksel Olarak Karşılaştırılması

Çalışmamızda, PDL hücrelerinin biyomateryallere direkt olarak 24 ve 48 saat süre ile maruz bırakıldığında hücrelerin apoptozis ile ilgili belirteçlerinin gen düzeyindeki farklılıkları kat değişimi olarak Tablo 4.7 ve Tablo 4.8’de gösterildi. Kontrol grubu olarak P3’ten sonraki periodontal hücreler kullanıldı.

4.3.2.1. Biyomateryallerin 24. Saat Direkt Etkisinde Apoptozis Gen Belirteçleri

Direkt olarak 24 saat boyunca NeoMTA® 2’ye maruz kalan hücrelerde kontrole göre Bcl-2 gen ifadesi 2,510 kat ve caspase-9 gen ifadesi 7,168 kat arttı. Caspase 3 gen ifadesi 0,063 kat, p53 gen ifadesi 0,677 kat ve TNF- α gen ifadesi ise 0,347 kat azaldı. Kontrol ile karşılaştırıldığında NeoMTA® 2 grubunda caspase-3 ve caspase-9 gen ifadelerini kat düzeyi arasında istatistiki olarak önemli bir fark $p \leq 0.01$ saptanırken, TNF- α gen ifadesinde ise $p \leq 0.05$ düzeyinde bir önem belirlendi.

Direkt olarak 24 saat boyunca NeoPUTTY®’e maruz kalan hücrelerde kontrole göre Bcl-2 gen ifadesi 3,653 kat, p53 gen ifadesi 1,477 kat ve caspase-9 gen ifadesi 10,568 kat arttı. Caspase-3 gen ifadesi 0,128 kat ve TNF- α gen ifadesi ise 0,228 kat azaldı. Kontrol ile karşılaştırıldığında NeoMTA® 2 grubunda caspase-3 ve TNF- α gen ifadelerini kat düzeyi arasında istatistiki olarak önemli bir fark $p \leq 0.05$ saptanırken, caspase-9 gen ifadesinde ise $p \leq 0.01$ düzeyinde bir önem belirlendi.

Direkt olarak 24 saat boyunca Biodentine™ maruz kalan hücrelerde kontrole göre Bcl-2 gen ifadesi 6,022 kat ve caspase-9 gen ifadesi 5,814 kat arttı. Caspase-3 gen ifadesi 0,265 kat, p53 gen ifadesi 0,253 kat ve TNF- α gen ifadesi ise 0,246 kat azaldı. Kontrol ile karşılaştırıldığında Biodentine™ grubunda Bcl-2 ve TNF- α gen ifadelerinin kat düzeyleri arasında istatistiki olarak önemli bir fark saptandı ($p \leq 0.01$).

Direkt olarak 24 saat boyunca MTAFlow™ White’a maruz kalan hücrelerde kontrole göre Bcl-2 gen ifadesi 5,187 kat ve caspase-9 gen ifadesi 4,834 kat arttı. Caspase-3 gen ifadesi 0,240 kat, p53 gen ifadesi 0,711 kat ve TNF- α gen ifadesi ise 0,582 kat

azaldı. Kontrol ile karşılaştırıldığında MTAFlow™ White grubunda Bcl-2 gen ifadesinin kat düzeyi arasında istatistiki olarak önemli bir fark saptandı ($p \leq 0.01$).

Direkt olarak 24 saat boyunca kök kanal tamir materyallerine maruz bırakılan PDL hücrelerinde kontrol grubuna kıyasla Bcl-2 geninin ifadesinde kat artışı görüldü. Kat değişimi yönünden kontrol grubuna göre Biodentine™ ve MTAFlow™ White gruplarında $p \leq 0.01$ düzeyinde istatistiki bir fark gözlenirken, Biodentine™ ve NeoMTA® 2 grupları arasında gözlenen kat artışı istatistiki olarak önemli bulundu ($p \leq 0.05$). Diğer gruplarda belirlenen kat artışı istatistiki açıdan önemli bulunmadı.

Caspase-3 gen ifadesi kat değişimi yönünden, kontrol grubuna kıyasla Biodentine™, MTAFlow™ White, NeoMTA® 2 ve NeoPUTTY® gruplarında azalma olduğu görüldü. Caspase-3 geni için kontrol grubuna kıyasla NeoMTA® 2 ve NeoPUTTY® gruplarındaki azalmanın istatistiki olarak sırasıyla $p \leq 0.05$ ve $p \leq 0.01$ düzeyinde önemli olduğu görüldü. Diğer gruplarda istatistiksel önem saptanmadı.

p53 geninin ifadesin kat değerleri incelendiğinde kontrol grubuna kıyasla Biodentine™, MTAFlow™ White ve NeoPUTTY® gruplarında azalma saptanırken, NeoMTA® 2 grubunun gen ifadesinde kat artışı olduğu belirlendi. p53 gen ifadesi kat değişimi yönünden gruplar arasında istatistiki açıdan önem bulunmadı. TNF- α gen ifadesinde kontrol grubuna kıyasla Biodentine™, MTAFlow™ White, NeoMTA® 2 ve NeoPUTTY® gruplarında azalma olduğu belirlendi. TNF- α geni için kontrol grubu ile Biodentine™ grubu arasında $p \leq 0.01$, kontrol ile NeoMTA® 2 ve NeoPUTTY® grupları arasında $p \leq 0.05$ düzeyinde fark gözlenirken Biodentine™ ile MTAFlow™ White grupları arasında $p \leq 0.05$ düzeyinde istatistiksel bir önem olduğu belirlendi. Diğer gruplarda istatistiki önem saptanmadı. Caspase-9 gen ifadesi kontrol grubu ile kıyaslandığında Biodentine™, MTAFlow™ White, NeoMTA® 2 ve NeoPUTTY® gruplarında kat artışı görülürken, kontrol grubuna kıyasla NeoMTA® 2 ve NeoPUTTY® gruplarında istatistiksel bir fark saptandı ($p \leq 0.01$).

Tablo 4.7: Periodontal ligament hücrelerinin biyomateryallere direkt olarak 24 saat süreyle maruz bırakıldığında apoptozis ile ilgili belirteçlerin gen ifadelerindeki kat değişimlerinin istatistiksel olarak karşılaştırılması

GENLER		Bcl-2		Caspase 3		p53		TNF - α		Caspase 9	
N	Biyomateryal	Ortalama $\pm$ S.D.	Ortanca	Ortalama $\pm$ S.D.	Ortanca	Ortalama $\pm$ S.D.	Ortanca	Ortalama $\pm$ S.D.	Ortanca	Ortalama $\pm$ S.D.	Ortanca
³	Biodentine ^b	6,022 $\pm$ 1,513	5,291	0,265 $\pm$ 0,195	0,195	0,253 $\pm$ 0,074	0,289	0,246 $\pm$ 0,058	0,257	5,814 $\pm$ 0,830	5,493
³	MTAFlow White ^c	5,187 $\pm$ 1,355	5,083	0,240 $\pm$ 0,113	0,201	0,711 $\pm$ 0,485	0,657	0,582 $\pm$ 0,147	0,507	4,834 $\pm$ 0,742	4,684
³	NeoMTA [®] 2 ^d	2,510 $\pm$ 0,929	2,726	0,128 $\pm$ 0,119	0,063	1,477 $\pm$ 1,440	0,861	0,228 $\pm$ 0,147	0,279	10,568 $\pm$ 6,348	7,672
³	NeoPUTTY [®] ^e	3,653 $\pm$ 0,606	3,443	0,063 $\pm$ 0,028	0,049	0,677 $\pm$ 0,481	0,692	0,347 $\pm$ 0,058	0,351	7,168 $\pm$ 1,373	7,406
³	KONTROL ^a	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
<i>P</i>		a-b= 0,003** a-c=0,008** a-d=0,360 a-e=0,099 b-c=0,714 b-d=0,035* b-e=0,169 c-d=0,082 c-e=0,314 d-e=0,464		a-b= 0,143 a-c=0,169 a-d=0,022* a-e=0,002** b-c=0,927 b-d=0,410 b-e=0,099 c-d=0,360 c-e=0,082 d-e=0,410				a-b= 0,003** a-c=0,360 a-d=0,017* a-e=0,044* b-c=0,044* b-d=0,583 b-e=0,360 c-d=0,143 c-e=0,272 d-e=0,714		a-b= 0,099 a-c=0,314 a-d=0,003** a-e=0,008** b-c=0,521 b-d=0,200 b-e=0,314 c-d=0,054 c-e=0,099 d-e=0,783	

*p $\leq$ 0.05, ** p $\leq$ 0.01, *** p $\leq$ 0.001

4.3.2.2. Biyomateriyallerin 48. Saat Direkt Etkisinde Apoptozis Gen

Belirteçleri

Direkt olarak 48 saat boyunca NeoMTA[®] 2'ye maruz kalan hücrelerde kontrole göre Bcl-2 gen ifadesi 2,200 kat ve caspase-9 gen ifadesi 6,354 kat arttı. Caspase-3 gen ifadesi 0,061 kat, p53 gen ifadesi 0,737 kat ve TNF- α gen ifadesi ise 0,263 kat azaldı. Kontrol ile karşılaştırıldığında NeoMTA[®] 2 grubunda caspase-3 gen ifadesinin kat düzeyinde istatistiki olarak $p \leq 0.01$ düzeyinde bir önem saptanırken; TNF- α gen ifadesinin kat artışında $p \leq 0.05$ düzeyinde bir fark belirlendi.

Direkt olarak 48 saat boyunca NeoPUTTY[®] e maruz kalan hücrelerde kontrole göre Bcl-2 gen ifadesi 5,419 kat, TNF- α geni 1,787 kat ve caspase-9 gen ifadesi 5,160 kat arttı. Caspase-3 gen ifadesi 0,211 kat ve p53 gen ifadesi 0,332 kat azaldı. Kontrol ile karşılaştırıldığında NeoPUTTY[®] grubunda Bcl-2 gen ifadesinin kat düzeyi arasında istatistiki olarak önemli bir fark $p \leq 0.01$ saptandı.

Direkt olarak 48 saat boyunca Biodentine[™] maruz kalan hücrelerde kontrole göre Bcl-2 gen ifadesi 3,478 kat ve caspase-9 gen ifadesi 4,262 kat arttı. Caspase-3 gen ifadesi 0,131 kat, p53 gen ifadesi 0,196 kat ve TNF- α gen ifadesi ise 0,256 kat azaldı. Kontrol ile karşılaştırıldığında Biodentine[™] grubunda Bcl-2, caspase-3 ve TNF- α gen ifadelerinin kat düzeyleri arasında istatistiki olarak önemli bir fark $p \leq 0.01$ saptandı.

Direkt olarak 48 saat boyunca MTAFlow[™] White'a maruz kalan hücrelerde kontrole göre Bcl-2 gen ifadesi 3,441 kat ve caspase-9 gen ifadesi 3,725 kat arttı. Caspase-3 gen ifadesi 0,205 kat, p53 gen ifadesi 0,204 kat ve TNF- α gen ifadesi ise 0,356 kat azaldı. Kontrol ile karşılaştırıldığında MTAFlow[™] White grubunda Bcl-2 gen ifadesinin kat düzeyi arasında istatistiki olarak önemli bir fark $p \leq 0.01$ saptandı.

Direkt olarak 48 saat boyunca kök kanal tamir materyallerine maruz bırakılan PDL hücrelerinde kontrol grubuna kıyasla Bcl-2 geninin ifadesinde kat artışı görüldü. Kat değişimi yönünden kontrol grubuna göre Biodentine[™], MTAFlow[™] White ve NeoPUTTY[®] gruplarında $p \leq 0.05$ düzeyinde istatistiki bir fark gözlenirken, Diğer gruplarda belirlenen artış istatistiki açıdan önemli bulunmadı.

Caspase-3 gen ifadesi kat değişimi yönünden, kontrol grubuna kıyasla Biodentine[™], MTAFlow[™] White, NeoMTA[®] 2 ve NeoPUTTY[®] gruplarında azalma olduğu görüldü. Caspase-3 geni için kontrol grubuna kıyasla Biodentine[™] ve NeoMTA[®]

2 gruplarındaki azalma istatistiki olarak önemli ($p \leq 0.05$) bulunurken diğer gruplarda istatistiksel önem saptanmadı. p53 geninin ifadesin kat değerleri incelendiğinde kontrol grubuna kıyasla Biodentine™, MTAFlow™ White, NeoMTA® 2 ve NeoPUTTY® gruplarında azalma saptanırken, p53 gen ifadesi kat değişimi yönünden gruplar arasında istatistiki açıdan önem bulunmadı. TNF- α geninin ifadesinde kontrol grubuna kıyasla Biodentine™, MTAFlow™ White ve NeoMTA® 2 gruplarında azalma NeoPUTTY® grubunda ise kat artışı olduğu belirlendi. TNF- α geni için kontrol grubuna kıyasla Biodentine™ ve NeoMTA® 2 grupları ile Biodentine™ ve NeoPUTTY® ile NeoMTA® 2 ve NeoPUTTY® grupları arasında istatistiksel bir önem ($p \leq 0.05$) olduğu belirlenirken diğer gruplarda istatistiki önem saptanmadı. Caspase-9 geninin ifadesi kontrol grubu ile kıyaslandığında Biodentine™, MTAFlow™ White, NeoMTA® 2 ve NeoPUTTY® gruplarında artış gösterirken, caspase-9 geninin ifadesi için gruplar arasında istatistiki açıdan önem belirlenmedi.

Tablo 4.8: Periodontal ligament hücrelerinin biyomateryallere direkt olarak 48 saat süreyle maruz bırakıldığında apoptozis ile ilgili belirteçlerin gen ifadelerindeki kat değişimlerinin istatistiksel olarak karşılaştırılması

GENLER		Bcl-2		Caspase 3		p53		TNF- α		Caspase 9	
N	Biyomateryal	Ortalama $\pm$ S.D.	Ortanca	Ortalama $\pm$ S.D.	Ortanca	Ortalama $\pm$ S.D.	Ortanca	Ortalama $\pm$ S.D.	Ortanca	Ortalama $\pm$ S.D.	Ortanca
³	Biodentine ^b	3,478 $\pm$ 0,974	3,405	0,131 $\pm$ 0,015	0,195	0,196 $\pm$ 0,088	0,199	0,256 $\pm$ 0,135	0,233	4,262 $\pm$ 0,447	4,468
³	MTAFlow White ^c	3,441 $\pm$ 1,411	3,909	0,205 $\pm$ 0,101	0,161	0,204 $\pm$ 0,052	0,207	0,356 $\pm$ 0,173	0,391	3,725 $\pm$ 1,250	3,949
³	NeoMTA 2 ^d	2,200 $\pm$ 0,788	2,393	0,061 $\pm$ 0,064	0,030	0,737 $\pm$ 0,286	0,661	0,263 $\pm$ 0,127	0,300	6,354 $\pm$ 3,950	6,488
³	NeoPUTTY ^e	5,419 $\pm$ 2,124	5,999	0,211 $\pm$ 0,071	0,251	0,332 $\pm$ 0,294	0,171	1,787 $\pm$ 0,923	1,658	5,160 $\pm$ 1,988	5,904
³	KONTROL ^a	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
<i>P</i>		a-b= 0,035* a-c=0,035* a-d=0,272 a-e=0,003** b-c=1,000 b-d=0,314 b-e=0,410 c-d=0,314 c-e=0,410 d-e=0,067		a-b= 0,013* a-c=0,169 a-d=0,003** a-e=0,143 b-c=0,272 b-d=0,647 b-e=0,314 c-d=0,119 c-e=0,927 d-e=0,143				a-b= 0,044* a-c=0,119 a-d=0,028* a-e=0,783 b-c=0,647 b-d=0,855 b-e=0,022* c-d=0,521 c-e=0,067 d-e=0,013*			

* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$

4.4. NeoMTA® 2 İndirekt ve Direkt 24. ve 48. Saat Apoptozis Gen

Belirteçleri

Kontrol grubuna göre NeoMTA® 2 biyomateryaline maruz bırakılan hücrelerin hem indirekt hem direkt 24. ve 48. saat gen ifade düzeyleri ve bu gen ifade düzeylerinin istatistiki olarak karşılaştırılması Tablo 4.9' da gösterildi.

NeoMTA® 2 biyomateryalinin indirekt olarak 24 saat ve 48 saat uygulandığı gruplar arasında Bcl-2 ($p=0,275$), caspase-3 ($p=0,513$) ve caspase-9 ($p=0,513$) genleri için gruplar arasında istatistiksel bir anlam belirlenemezken TNF- α ($p=0,050$) ve p53 ($p=0,050$) genleri için gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlendi ($p\leq 0.05$).

NeoMTA® 2 biyomateryalinin direkt olarak 24 saat ve 48 saat uygulandığı gruplar arasında Bcl-2 ($p=0,275$), caspase-3 ($p=0,513$), p53 geni ($p=0,827$), TNF- α ($p=0,127$) ve caspase-9 ($p=0,827$) genleri için gruplar arasında istatistiksel bir anlam saptanmadı ($p\leq 0.05$).

NeoMTA® 2 biyomateryalinin indirekt olarak 24 saat ve direkt olarak 24 saat uygulandığı gruplar arasında Bcl-2 ($p=0,827$), caspase-3 ($p=0,127$), p53 geni ($p=0,127$), TNF- α ($p=0,513$) ve caspase-9 ($p=0,827$) genleri için gruplar arasında istatistiki olarak anlamlı bir ifade belirlenmedi ($p\leq 0.05$).

NeoMTA® 2'nin indirekt olarak 48 saat ve direkt olarak 48 saat uygulandığı gruplar arasında Bcl-2 ($p=0,513$), caspase-3 ($p=0,275$), p53 geni ($p=0,827$), TNF- α ($p=0,827$) ve caspase-9 ($p=0,513$) genleri için gruplar arasında gen ifadeleri açısından istatistiksel bir anlam gözlemlenmedi ($p\leq 0.05$).

Tablo 4.9: Periodontal ligament hücrelerinin NeoMTA® 2' ye direkt ve indirekt olarak 24 ve 48 saat süreyle maruz bırakıldığında apoptozis ile ilgili belirteçlerin gen ifadelerindeki kat değişimlerinin istatistiksel olarak karşılaştırılması

GENLER →		Bcl-2		Caspase 3		p53		TNF- α		Caspase 9	
Gruplar ↓		Ortalama ±S.D.	Ortanca	Ortalama ±S.D.	Ortanca	Ortalama ±S.D.	Ortanca	Ortalama ±S.D.	Ortanca	Ortalama ±S.D.	Ortanca
İndirekt	24 saat (N=3)	4,104	5,006	0,094	0,103	1,414	1,010	0,700	0,838	13,364	17,097
	48 saat (N=3)	2,130	2,401	0,180	0,227	0,357	0,296	0,229	0,238	6,213	5,802
P		0,275		0,513		0,050*		0,050*		0,513	
Direkt	24 saat (N=3)	2,511	2,726	0,129	0,063	1,478	0,861	0,324	0,279	10,568	7,672
	48 saat (N=3)	2,201	2,393	0,061	0,030	0,737	0,661	0,263	0,300	6,355	6,488
P		0,513		0,275		0,827		0,827		0,513	
24 saat	İndirekt	4,104	5,006	0,094	0,103	1,414	1,010	0,700	0,838	13,364	17,097
	Direkt	2,511	2,726	0,129	0,063	1,478	0,861	0,324	0,279	10,568	7,672
P		0,275		0,513		0,827		0,127		0,827	
48 saat	İndirekt	2,130	2,401	0,180	0,227	0,357	0,296	0,229	0,238	6,213	5,802
	Direkt	2,201	2,393	0,061	0,030	0,737	0,661	0,263	0,300	6,355	6,488
P		0,827		0,127		0,127		0,513		0,827	

*p ≤ 0.05

4.5. NeoPUTTY® İndirekt ve Direkt 24. ve 48. Saat Apoptozis Gen

Belirteçleri

Kontrol grubuna göre NeoPUTTY® biyomateryaline maruz bırakılan hücrelerin hem indirekt hem direkt 24. ve 48. saat gen ifade düzeyleri ve bu gen ifade düzeylerinin istatistiki olarak karşılaştırılması Tablo 4.10'da gösterildi.

NeoPUTTY® biyomateryalinin indirekt olarak 24 saat ve 48 saat uygulandığı gruplar arasında Bcl-2 ($p=0,050$) geni için gruplar arasında istatistiki olarak anlamlı bir fark belirlenirken caspase-3 ($p=0,827$), p53 ($p=0,127$), TNF- α ($p=0,127$) ve caspase-9 ($p=0,513$) genleri için gruplar arasında istatistiksel bir anlam bulunamadı ($p \leq 0.05$).

NeoPUTTY® biyomateryalinin direkt olarak 24 saat ve 48 saat uygulandığı gruplar arasında caspase-3 ($p=0,050$) ve TNF- α ($p=0,050$) geni için gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı gözlenirken Bcl-2 ($p=0,513$), p53 ($p=0,127$) ve caspase-9 ($p=0,275$) genleri için gruplar arasında istatistiksel bir anlam gözlenmedi ($p \leq 0.05$).

NeoPUTTY® biyomateryalinin indirekt olarak 24 saat ve direkt olarak 24 saat uygulandığı gruplar arasında caspase-3 ($p=0,050$) geni için gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanırken Bcl-2 ($p=0,827$), p53 ($p=0,827$), TNF- α ($p=0,827$) ve caspase-9 ($p=0,275$) genleri için gruplar arasında istatistiksel bir anlam saptanmadı ($p \leq 0.05$).

NeoPUTTY® biyomateryalinin indirekt olarak 48 saat ve direkt olarak 48 saat uygulandığı gruplar arasında Bcl-2 ($p=0,127$), caspase-3 ($p=0,275$), p53 geni ($p=0,127$), TNF- α ($p=0,827$) ve caspase-9 ($p=0,513$) genleri için gruplar arasında gen ifadeleri açısından istatistiksel bir anlam gözlenmedi ($p \leq 0.05$).

Tablo 4.10: Periodontal ligament hücrelerinin NeoPUTTY®'e direkt ve indirekt olarak 24 ve 48 saat süreyle maruz bırakıldığında apoptozis ile ilgili belirteçlerin gen ifadelerindeki kat değişimlerinin istatistiksel olarak karşılaştırılması

GENLER →		Bcl-2		Caspase 3		p53		TNF- α		Caspase 9	
Gruplar ↓		Ortalama ±S.D.	Ortanca	Ortalama ±S.D.	Ortanca	Ortalama ±S.D.	Ortanca	Ortalama ±S.D.	Ortanca	Ortalama ±S.D.	Ortanca
İndirekt	24 saat (N=3)	2,757	3,465	0,417	0,217	0,442	0,253	0,332	0,311	5,408	6,438
	48 saat (N=3)	8,614	8,286	0,532	0,616	1,540	1,818	1,610	1,987	5,914	6,434
	P	0,050*		0,827		0,127		0,127		0,827	
Direkt	24 saat (N=3)	3,654	3,443	0,063	0,049	0,678	0,692	0,347	0,351	7,168	7,406
	48 saat (N=3)	5,419	5,999	0,211	0,251	0,332	0,171	1,788	1,658	5,160	5,904
	P	0,513		0,050*		0,127		0,050*		0,275	
24 saat	İndirekt	2,757	3,465	0,417	0,217	0,442	0,253	0,332	0,311	5,408	6,438
	Direkt	3,654	3,443	0,063	0,049	0,678	0,692	0,347	0,351	7,168	7,406
	P	0,827		0,050*		0,827		0,827		0,275	
48 saat	İndirekt	8,614	8,286	0,532	0,616	1,540	1,818	1,610	1,987	5,914	6,434
	Direkt	5,419	5,999	0,211	0,251	0,332	0,171	1,788	1,658	5,160	5,904
	P	0,127		0,275		0,127		0,827		0,513	

*p ≤ 0.05

4.6. Biodentine™ İndirekt ve Direkt 24. ve 48. Saat Apoptozis Gen Belirteçleri

Kontrol grubuna göre Biodentine™ biyomateryaline maruz bırakılan hücrelerin hem indirekt hem direkt 24. ve 48. saat gen ifade düzeyleri ve bu gen ifade düzeylerinin istatistiki olarak karşılaştırılması Tablo 4.11’ de gösterildi.

İndirekt Biodentine™ 24 saat maruz kalan hücrelerin tüm gen ifadelerinde kontrole göre kat artışı gözlenirken; 48 saat süre ile Biodentine™ maruz kalan hücrelerde bu kat artışının sadece Bcl-2 ve p53 gen ifadelerinde olduğu ve bu genlerde ki kat artışının da 24 saat uygulama süresine göre daha düşük olduğu görüldü. İndirekt 24 ve 48 saat grupları arasında Bcl-2 ve p53 gen ifadelerinin kat değişimleri arasında $p \leq 0.05$ düzeyinde bir fark olduğu saptandı.

İndirekt 24 saat grubunun aksine, indirekt 48 saat Biodentine™ maruz kalan hücrelerde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında caspase-3, TNF- α ve caspase-9 gen ifadelerinde kat azalma olduğu görülmektedir. İndirekt 24 ile 48 saat Biodentine™ grupları karşılaştırıldığı zaman, TNF- α ve caspase-9 gen ifade kat değerlerinin istatistiki olarak $p \leq 0.05$ düzeyinde farklı olduğu saptanırken, caspase-3 gen ifadesinde ki kat değişimin önemli olmadığı belirlendi.

Direkt uygulamada 24 saat ile 48 saat Biodentine™ uygulama süresi arasında Bcl-2, caspase-3, p53, TNF- α ve caspase-9 gen ifadelerinin kontrole göre kat değişimlerinin karşılaştırılması Tablo 11’de gösterildi. Direkt olarak hem 24 hem de 48 saat süre ile Biodentine™’e maruz kalan hücrelerde kontrole göre Bcl-2 gen ifadesinde kat artışı gözlenirken diğer gen ifadelerinde kat azalması saptandı. Bcl-2 ve caspase-9 gen ifadelerinde ki kat değerleri yönünden direkt 24 ve 48 saat süreleri arasında istatistiki olarak $p \leq 0.05$ düzeyinde bir fark olduğu belirlendi. Diğer gen ifadelerinde kat değerleri arasında istatistiki olarak bir fark olmadığı görüldü.

24 saat süre ile Biodentine™’ in direkt ve indirekt uygulamaları arasında Bcl-2, caspase-3, p53, TNF- α ve caspase-9 gen ifadelerinin kontrole göre kat değişimlerinin karşılaştırılması Tablo 11’de gösterildi. İndirekt uygulamada tüm gen ifadelerinde kontrole göre gen ifadesinde kat artışı görülürken direkt uygulamada sadece Bcl-2 ve caspase-9 gen ifadelerinde kat artışı saptandı.

İndirekt uygulamada Bcl-2 gen ifadesi 311,798 kat artarken direkt uygulamada 6,022 kat arttı. İki uygulama arasında istatistiki olarak $p \leq 0.05$ düzeyinde bir fark saptandı. İndirekt uygulamada caspase-3 gen ifadesi 1,652 kat artarken direkt uygulamada 0,265 kat azaldı. İki uygulama arasında $p \leq 0.05$ düzeyinde bir fark saptandı.

İndirekt uygulamada p53 gen ifadesi 8,747 kat artarken direkt uygulamada 0,253 kat azaldı. İki uygulama arasında $p \leq 0.05$ düzeyinde bir fark saptandı. İndirekt uygulamada TNF- α gen ifadesi 49,919 kat artarken direkt uygulamada 0,246 kat azaldı. İki uygulama arasında $p \leq 0.05$ düzeyinde bir fark saptandı. Caspase-9 gen ifadesi indirekt uygulamada 2,875 kat direkt uygulamada 5,814 kat arttı. İki uygulama arasında $p \leq 0.05$ düzeyinde bir fark saptandı.

48 saat süre ile Biodentine™'in direkt ve indirekt uygulamaları arasında Bcl-2, caspase-3, p53, TNF- α ve caspase-9 gen ifadelerinin kontrole göre kat değişimlerinin karşılaştırılması Tablo 11'de gösterildi. İndirekt uygulamada Bcl-2 ve p53 gen ifadesinde kontrole göre kat artışı görülürken direkt uygulamada Bcl-2 ve caspase-9 gen ifadelerinde kat artışı saptandı. İndirekt uygulamada caspase-3, TNF- α ve caspase-9 gen ifadelerinde kat değerinde azalma direkt uygulamada ise caspase-3, p53 ve TNF- α gen ifadelerinin kat değerinde azalma görüldü.

İndirekt uygulamada Bcl-2 gen ifadesi 4,100 kat artarken direkt uygulamada 3,478 kat arttı. İki uygulama arasında istatistiki olarak fark gözlenmedi. İndirekt uygulamada caspase-3 gen ifadesi 0,696 kat azalırken direkt uygulamada 0,131 kat azaldı. İki uygulama arasında istatistiki olarak fark gözlenmedi. İndirekt uygulamada p53 gen ifadesi 1,235 kat artarken direkt uygulamada 0,196 kat azaldı. İki uygulama arasında istatistiki olarak $p \leq 0.05$ düzeyinde bir fark saptandı.

İndirekt uygulamada TNF- α gen ifadesi 0,374 kat azalırken direkt uygulamada 0,256 kat azaldı. İki uygulama arasında istatistiki olarak fark gözlenmedi.

İndirekt uygulamada caspase-9 gen ifadesi 0,406 kat azalırken direkt uygulamada 4,468 kat arttı. İki uygulama arasında istatistiki olarak $p \leq 0.05$ düzeyinde bir fark saptandı.

Tablo 4.11: Periodontal ligament hücrelerinin Biodentine™'e direkt ve indirekt olarak 24 ve 48 saat süreyle maruz bırakıldığında apoptozis ile ilgili belirteçlerin gen ifadelerindeki kat değişimlerinin istatistiksel olarak karşılaştırılması

GENLER →		Bcl-2		Caspase 3		p53		TNF- α		Caspase 9	
Gruplar ↓		Ortalama ±S.D.	Ortanca	Ortalama ±S.D.	Ortanca	Ortalama ±S.D.	Ortanca	Ortalama ±S.D.	Ortanca	Ortalama ±S.D.	Ortanca
İndirekt	24 saat (N=3)	311,798	321,721	1,652	1,530	8,747	9,476	49,919	50,891	2,875	2,909
	48 saat (N=3)	4,100	5,350	0,696	0,029	1,235	1,427	0,374	0,414	0,406	0,405
	<i>P</i>	0,050*		0,513		0,050*		0,050*		0,050*	
Direkt	24 saat (N=3)	6,022	5,291	0,265	0,195	0,253	0,289	0,246	0,257	5,814	5,493
	48 saat (N=3)	3,478	3,405	0,131	0,126	0,196	0,199	0,257	0,233	4,262	0,405
	<i>P</i>	0,050*		0,513		0,275		0,827		0,050*	
24 saat	İndirekt	311,798	321,721	1,652	1,530	8,747	9,476	49,919	50,891	2,875	2,909
	Direkt	6,022	5,291	0,265	0,195	0,253	0,289	0,246	0,257	5,814	5,493
	<i>P</i>	0,050*		0,050*		0,050*		0,050*		0,050*	
48 saat	İndirekt	4,100	5,350	0,696	0,029	1,235	1,427	0,374	0,414	0,406	0,405
	Direkt	3,478	3,405	0,131	0,126	0,196	0,199	0,256	0,233	4,262	4,468
	<i>P</i>	0,513		0,513		0,050*		0,127		0,050*	

*p ≤ 0.05

4.7. MTAFlow™ White İndirekt ve Direkt 24. ve 48. Saat Apoptozis Gen Belirteçleri

İndirekt uygulamada 24 saat ile 48 saat MTAFlow™ White uygulama süresi arasında Bcl-2, caspase-3, p53, TNF- α ve caspase-9 gen ifadelerinin kontrole göre kat değişimlerinin karşılaştırması Tablo 4.12’de gösterildi.

İndirekt MTAFlow™ White’a 24 saat maruz kalan hücrelerin Bcl-2, p53 ve TNF- α gen ifadelerinde kontrole göre kat artışı caspase-3 ve caspase-9 gen ifadelerinde kat değerinde azalma gözlenirken; 48 saat süre ile MTAFlow™ White’a maruz kalan hücrelerde bu kat artışının Bcl-2, p53 ve TNF- α gen ifadeleri ile birlikte caspase-9 gen ifadesinde de olduğu görüldü.

İndirekt 24 ve 48 saat grupları arasında Bcl-2, caspase-3 ve p53 gen ifadelerinin kat değişimleri arasında istatistiki olarak önem gözlenmezken, TNF- α ve caspase-9 gen ifadelerinin kat değişimleri arasında $p \leq 0.05$ düzeyinde bir fark olduğu saptandı.

Direkt uygulamada 24 saat ile 48 saat MTAFlow™ White uygulama süresi arasında Bcl-2, caspase-3, p53, TNF- α ve caspase-9 gen ifadelerinin kontrole göre kat değişimlerinin karşılaştırması Tablo 12’de gösterildi.

Direkt MTAFlow™ White’a hem 24 hem de 48 saat maruz kalan hücrelerin Bcl-2 ve caspase-9 gen ifadelerinde kontrole göre kat artışı saptanırken caspase-3, p53 ve TNF- α gen ifadelerinde kat değerinde azalma gözlemlendi. Direkt 24 ve 48 saat uygulama yapılan MTAFlow™ White grupları arasında istatistiki bir önem belirlenmedi.

24 saat süre ile MTAFlow™ White’ın direkt ve indirekt uygulamaları arasında Bcl-2, caspase-3, p53, TNF- α ve caspase-9 gen ifadelerinin kontrole göre kat değişimlerinin karşılaştırılması Tablo 12’de gösterildi. İndirekt uygulamada Bcl-2, p53 ve TNF- α ifadelerinde kontrole göre gen ifadesinde kat artışı görülürken direkt uygulamada sadece caspase-9 gen ifadelerinde kat artışı saptandı.

İndirekt uygulamada Bcl-2 gen ifadesi 52,043 kat artarken direkt uygulamada 5,187 kat arttı. İki uygulama arasında istatistiki olarak $p \leq 0.05$ düzeyinde bir fark saptandı. İndirekt uygulamada caspase-3 gen ifadesi 0,182 kat azalırken direkt uygulamada 0,240 kat azaldı. İki uygulama arasında istatistiki olarak fark gözlenmedi. İndirekt uygulamada p53 gen ifadesi 2,089 kat artarken direkt uygulamada 0,711 kat azaldı. İki uygulama

arasında istatistiki olarak $p \leq 0.05$ düzeyinde bir fark saptandı. İndirekt uygulamada TNF- α gen ifadesi 2,371 kat artarken direkt uygulamada 0,582 kat azaldı. İki uygulama arasında istatistiki olarak $p \leq 0.05$ düzeyinde bir fark saptandı. İndirekt uygulamada caspase-9 gen ifadesi 0,626 kat azalırken direkt uygulamada 4,834 kat arttı. İki uygulama arasında istatistiki olarak $p \leq 0.05$ düzeyinde bir fark saptandı.

48 saat süre ile MTAFlow™ White'ın direkt ve indirekt uygulamaları arasında Bcl-2, caspase-3, p53, TNF- α ve caspase-9 gen ifadelerinin kontrole göre kat değişimlerinin karşılaştırılması Tablo 12'de gösterildi. İndirekt uygulamada Bcl-2, p53 ve TNF- α ve caspase-9 ifadelerinde kontrole göre gen ifadesinde kat artışı görülürken direkt uygulamada sadece Bcl-2 ve caspase-9 gen ifadelerinde kat artışı saptandı.

İndirekt uygulamada Bcl-2 gen ifadesi 87,279 kat artarken direkt uygulamada 3,441 kat arttı. İki uygulama arasında istatistiki olarak $p \leq 0.05$ düzeyinde bir fark saptandı. İndirekt uygulamada caspase-3 gen ifadesi 0,168 kat azalırken direkt uygulamada 0,206 kat azaldı. İki uygulama arasında istatistiki olarak fark gözlenmedi. İndirekt uygulamada p53 gen ifadesi 4,776 kat artarken direkt uygulamada 0,204 kat azaldı. İki uygulama arasında istatistiki olarak $p \leq 0.05$ düzeyinde bir fark saptandı. İndirekt uygulamada TNF- α gen ifadesi 28,083 kat artarken direkt uygulamada 0,356 kat azaldı. İki uygulama arasında istatistiki olarak $p \leq 0.05$ düzeyinde bir fark saptandı. İndirekt uygulamada caspase-9 gen ifadesi 2,167 kat artarken direkt uygulamada 3,725 kat arttı. İki uygulama arasında istatistiksel olarak fark gözlenmedi.

Tablo 4.12: Periodontal ligament hücrelerinin MTAFlow™ White'a direkt ve indirekt olarak 24 ve 48 saat süreyle maruz bırakıldığında apoptozis ile ilgili belirteçlerin gen ifadelerindeki kat değişimlerinin istatistiksel olarak karşılaştırılması

GENLER →		Bcl-2		Caspase 3		p53		TNF- α		Caspase 9	
Gruplar ↓		Ortalama ±S.D.	Ortanca	Ortalama ±S.D.	Ortanca	Ortalama ±S.D.	Ortanca	Ortalama ±S.D.	Ortanca	Ortalama ±S.D.	Ortanca
İndirekt	24 saat (N=3)	52,043	46,549	0,182	0,169	2,089	1,935	2,371	2,417	0,626	0,667
	48 saat (N=3)	87,279	70,898	0,168	0,150	4,776	4,523	28,083	28,155	2,167	2,128
<i>P</i>		0,127		0,513		0,127		0,050*		0,050*	
Direkt	24 saat (N=3)	5,187	5,083	0,240	0,201	0,711	0,657	0,582	0,507	4,834	4,684
	48 saat (N=3)	3,441	3,909	0,206	0,161	0,204	0,207	0,356	0,391	3,725	3,949
<i>P</i>		0,275		0,513		0,077		0,275		0,275	
24 saat	İndirekt	52,043	46,549	0,182	0,169	2,089	1,935	2,371	2,417	0,626	,667
	Direkt	5,187	5,083	0,240	0,201	0,711	0,657	0,582	0,507	4,834	4,684
<i>P</i>		0,050*		0,827		0,050*		0,050*		0,050*	
48 saat	İndirekt	87,279	70,898	0,168	0,150	4,776	4,523	28,083	28,155	2,167	2,128
	Direkt	3,441	3,909	0,206	0,161	0,204	0,207	0,356	0,391	3,725	3,949
<i>P</i>		0,050*		0,513		0,050*		0,050*		0,127	

*p ≤ 0.05

5. TARTIŞMA

Yeni ve güncel dental materyallerin klinik uygulama pratiğinde kullanılmadan önce biyouyumluluk ve sitotoksosite bulgularını değerlendirebilmek için hücre kültürü testleri (in vitro testler) veya hayvan deneyleri (in vivo testler) yapılmaktadır (109). Hücre kültürü test yöntemleri, hayvan deneyleri ile karşılaştırıldığında; daha iyi standardize olması, tekrarlanabilirliği, hızlı ve kolay olması, etik açıdan tartışmaya neden olmaması ve nispeten daha düşük maliyetlerle gerçekleştirilebilmesi gibi önemli teknik avantajlara sahiptir (124). Bu çalışmada pediatrik endodontik tedavilerde kullanılan materyallerin hücre kültürü kullanılarak in vitro ortamda sitotoksosite ve gen düzeyinde biyouyumlulukları değerlendirilmiştir.

İn vitro çalışmalarda iki tip hücre kullanılmakta olup bunlar primer hücre ve devamlı hücre hatlarıdır (109). Devamlı hücre hatları, süresiz çoğalabilme özelliğine sahip transformasyona uğramış primer hücreler olup daha stabil bir karakterdedir. Sıklıkla tercih edilen devamlı hücre hatları grubunda; fare fibroblastları, insan epitel hücreleri yer almaktadır (109). Primer hücre kültürleri, doku veya organdan izole edilen hücreler olup kültür ortamında en az 24 saatlik inkübasyonu ile elde edilebilmektedir. Dental pulpa fibroblastları ve periodontal ligament fibroblastları primer hücre kültürüne örnek olarak verilebilir (109). Dokudan izole edilen hücrelerin izolasyonu ve kültüre edilmesi zahmetli ve zor olmaktadır. Kültür aşamalarının oldukça zahmetli ve hassas olmasına rağmen primer hücrelerin, laboratuvar koşullarında in vivo şartlara en yakın fizyolojik ortamı yansıttığı bildirilmektedir (109,125).

Dental materyallerin biyouyumluluklarının değerlendirildiği çalışmalarda hedefe yönelik hücre kullanılması gerekliliği söz konusudur. Hücre kültürü çalışmaları; ilaç ve materyallerin toksisitesi değerlendirileceği zaman, hücre tipi seçiminde materyalin temasta olacağı veya etki göstereceği bölgedeki hücre tipinin seçilmesi daha doğru bir yaklaşım olmaktadır. Pulpa ve periapikal dokular birbirinin devamı halindedir. Periapikal alanda oluşan iltihabı olay çevre dokulara kolayca yayılabilir ve bunun sonucunda endodontik tedavi ihtiyacı oluşur. Kök kanal tamir materyalleri periodontal dokulara yakın yerleştirilir ve bölgedeki kök hücrelerle arasındaki etkileşimin önemli olduğu sıklıkla vurgulanmaktadır (126). Periodontal

ligament heterojen hücre topluluklarından oluşur ve bu hücrelerden olan multipotent mezenkimal kök hücreler iyileşme sürecinde kemik/segment benzeri dokular oluşturabilecek potansiyelindedir (127). PDL mezenkimal kök hücreleri ve PDL fibroblast hücreleri kök kanal tamir materyallerinin sitotoksitelerinin değerlendirildiği hücre kültürü çalışmalarında tercih edilen hücre gruplarından olduğu için bu çalışmada PDL hücreleri tercih edildi (128). Çalışmamızda insan periodontal ligament kökenli hücreler primer hücre kültür yöntemiyle izole edildi.

Periodontal ligament hücresi sadece küçük azı ve 20 yaş dişlerinden değil ayrıca süt dişleri veya süpernumererer dişlerden de elde edilebilir. Çalışmamızda seçtiğimiz PDL fibroblast hücresini Samyutkha ve ark.'nın yaptığı gibi ortodontik amaçla çekilmiş küçük azı dişlerden elde ettik (129). Kök yüzeyinin uzun olması nedeniyle apikal ve koronal bölgedeki dokuların kontaminasyonunu engellemek için dokunun sadece orta üçlündeki PDL dokusunun kazınarak elde edilmesindeki kolaylık ve donör yaşının küçük olmasının getirdiği hücre çoğalma kapasitesinin fazla olması gibi avantajları küçük azı dişlerini kullanmamızdaki sebep olmuştur (130).

Uluslararası Hücre Terapisi Derneği, MKH'lerin kimliğinin sağlanması için asgari kriterler belirlemiştir. Bu kriterler arasında CD73, CD90 ve CD105'in pozitif belirteçler olarak kullanılması yer alırken, CD34, CD31 ve CD45'in negatif belirteçler olarak kabul edilmesi yer almaktadır (131). Ayrıca PDL'de CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, STRO-1, CD166, NANOG ve OCT4 gibi hücre yüzey antijenleri tanımlanmış ve PDL kök hücre kaynağı olarak kabul edilmiştir (132). Çalışmamızda P1'e göre ilerleyen pasajlarda CD29 ve CD44 ifadesi değişkenlik göstermektedir. Ayrıca CD105'in P1'e oranla düşük ifade olması ve CD 45'in yapılan son pasajda P1'e göre artmış olması elde ettiğimiz hücrelerin kök hücre özelliği taşımadığını göstermektedir.

Materyallerin hücre kültürüne yerleştirilmesinden önce, çalışmada gruplar arası farklılıkların doğru bir şekilde değerlendirilebilmesi ve belli bir standardizasyonu sağlaması için tüm örneklerin aynı boyutlardaki kalıplarda olması önemlidir. Bu durumu sağlayabilmek için çalışmalarda çeşitli boyutlarda farklı materyallerden yapılmış kalıplar kullanılmaktadır. Kullanılan bu materyaller plastik, teflon veya kauçuk esaslı olabilir. Rodrigues-Lozano ve ark., MTA'nın sitotoksitesini değerlendirdikleri bir çalışmada, çapı 5 mm derinliği 2 mm'lik silindirik kauçuk kalıp tercih ederken

Wildbiller ve ark., 6 mm çapında 2 mm derinliğinde teflon kalıp kullanmışlardır (133,134). Bu çalışmada örneklerin standardizasyonunu sağlamak için 15 mm genişlik ve uzunluğunda kare şeklinde yüksekliliği 5 mm olan plastik doku gömme kalıbı kullanıldı.

Endodontik tedavi prosedürlerinde kullanılmak üzere geliştirilen çeşitli içerik ve özelliklere sahip birçok yeni kök kanal tamir materyali piyasaya sürülmektedir. Mevcut çalışmada piyasa isimleri NeoMTA[®] 2, NeoPUTTY[®], Biodentine[™] ve MTAFlow[™] White olan materyallerin periodontal ligament hücreleri üzerine sitotoksik etkileri incelendi. Bu çalışmada da kök kanal tamir materyallerinin hücresel sitotoksitesini değerlendirmek amacıyla MTT yöntemi tercih edildi. MTT yöntemi biyoyumluluk testleri içinde hassas olmasının yanı sıra hızlı sonuç elde edilmesi, çok düşük düzeydeki toksisite değerlendirilmelerine imkn tanınması, tekrarlanabilir olması ve farklı çalışmalar arasında karşılaştırma yapılmasına imkan sağlaması gibi avantajları ile günümüzde dental materyallerin sitotoksisite değerlendirmesinde en çok tercih edilen yöntemler arasındadır (106).

Çalışmamızda kullanılan materyallerden NeoMTA[®] 2, nceki versiyonu olan NeoMTA Plus[®] gibi kronta renk değişikliği potansiyelinin üstesinden gelmek için bizmut oksit yerine radyopasifiye edici ajan olarak tantalyum oksit içerir ve üstün kullanım özellikleri sağlayan su bazlı bir jel ile karışırılır. Üreticiye göre karışırırma aşamasında toz-likit oranı, kullanım endikasyonuna bağlı olarak değiştirilebilir; sealer amacıyla kullanmak için ince kıvamda veya pulpotomi, perforasyon tamiri gibi prosedürlerde kalın kıvamda uygulanabilir. Piyasaya yeni sürülmesi nedeniyle, NeoMTA[®] 2 ile ilgili sitotoksisite ve biyoyumluluk çalışmaları sınırlıdır. Yapılan sitotoksisite ve biyoyumluluk çalışmaları dental pulpa hücrelerinde olup (90), PDL hücreleriyle ilgili sitotoksisite çalışmasına rastlanmamıştır. Lozano ve ark., 2021 yılında yaptıkları bir çalışmada NeoMTA[®] 2 ve NeoMTA[®] Plus'ın dental pulpa kök hücreleri üzerinde yaptıkları sitotoksisite çalışmasında indirekt olarak materyallerden salınan ekstrakt salınım sıvılarıyla 24., 48. Ve 72. saatte hücre canlılığını karşılaştırmışlar, iki materyalin de hücre canlılığını arttırdığını ve benzer biyoyumluluk sergilediğini göstermişlerdir (90). Bu çalışmayla tutarlı olarak çalışmamızda da NeoMTA[®] 2'nin

hem direkt hem indirekt temas grubunda 48. saatte hücre canlılığını istatistiki anlamda önemli olmayan düzeyde artırdığı bulundu.

Apoptozis veya programlanmış hücre ölümü, hücresel homeostazın ve gelişimin sürdürülmesinde çok önemli bir süreçtir. Apoptozis caspase gen ailesi tarafından yürütülen ve Bcl-2 protein ailesinin karşıt fraksiyonlarınca düzenlenen, evrimsel olarak korunmuş bir hücre intihar sürecidir. Bu süreçteki iki kilit oyuncu Bcl-2 protein ailesi ve caspase-3'tür. Bcl-2 apoptozu inhibe etmedeki rolüyle bilinirken, caspase-3 apoptozun kritik bir katalizörüdür. Bcl-2 ve caspase-3 arasındaki ilişkinin anlaşılması, apoptoz mekanizmalarının çözümünde anahtar rol oynar. Apoptotik sürecin en kesin göstergelerinden biri caspase-3 gen ekspresyonunun artmasıdır ve caspase-3 aktivitesini tespit etmek apoptozisin tüm morfolojik özellikleri gözlemlenmeden önce bile apoptozisi değerlendirmek için güçlü bir göstergedir (135). Bu çalışmada, caspase-3'ün gen ekspresyonunun izlenmesi qPCR yöntemi ile gösterildi. Benzer olarak Sun ve ark. 2021 yılında NeoPUTTY® ve ES Putty ile yaptıkları biyouyumluluk çalışmasında caspase-3 aktivitesini değerlendirmişlerdir (6).

NeoMTA® 2'nin Real Time PCR bulgularımızda indirekt 24. saatte hem antiapoptotik Bcl-2 gen düzeyinde hem de apoptotik caspase-9 gen düzeyinde artış görülürken apoptotik belirteçlerden caspase-3 ve TNF- α gen ifadelerinde azalma saptandı. Kontrol ile karşılaştırıldığı zaman apoptotik ve antiapoptotik gen düzeyleri arasında istatistiki olarak fark gözlenmedi. Bu bulgulara benzer olarak indirekt 48. saatte de hem antiapoptotik Bcl-2 gen düzeyinde hem de apoptotik caspase-9 gen düzeyinde bir artış gözlemlendi. Ancak apoptotik caspase-9 gen ifadesindeki bu artışın istatistiki olarak önemli olduğu görüldü. Diğer apoptotik belirteçlerin ekspresyonlarında istatistiki olarak önemli bir farklılık gözlenmedi. Dolayısıyla 48.saatten itibaren hücreler hafif düzeyde apoptozise sürükleniyor olabilir. Çalışmamıza benzer başka bir çalışma olmadığı için elde edilen sonuçların ileri dönemde yapılacak çalışmalar ile kıyaslanarak değerlendirilmesi daha net çıkarımlarda bulunulması için gereklidir.

İndirekt uygulama sonuçlarına benzer olarak hem 24 saat hem de 48 saat direkt uygulamada NeoMTA® 2'ye maruz kalan hücrelerde hem antiapoptotik Bcl-2 hem de apoptotik caspase-9 gen ifadelerinde artış gözlenirken diğer apoptotik gen ifadelerinde ise azalma saptandı. Özellikle apoptotik caspase-3 ve TNF- α gen

ifadelerindeki azalmanın ve caspase-9 gen ifadesindeki artışın istatistiki olarak önemli olduğu belirlendi. İndirekt uygulamada hem 24 hem 48 saat uygulamaya baktığımız zaman apoptotik ve antiapoptotik gen ifadelerinin benzer bir davranış sergilediğini gözlemliyoruz. İndirekt grupta hem 24 hem 48 saatte Bcl-2 ve TNF- α da azalma saptandı. p53 gen ifadesinde 24 saatte gen ifadesinde artış görülürken 48 saatte ise azaldığı tespit edildi. İndirekt 24 saat ile 48 saati karşılaştırdığımızda p53 ve TNF- α gen düzeyleri arasında istatistiksel olarak önemli bir fark olduğu belirlendi. Direkt uygulama grubunda hem 24 saatte hem 48 saatte Bcl-2 ve caspase-9 gen ifadelerinde bir artış varken caspase-3 ve TNF- α gen ifadelerinde bir azalma vardır. İndirekt gruptaki bulgulara benzer olarak direkt grupta da p53 geni 24 saatte düzeyi artarken 48 saatte düzeyi azalmıştır. Hem caspase-9 ekspresyonlarında hem p53 geninin daha da azalması 48. saatte apoptozis daha da inhibe edilmiştir. Sonuç olarak caspase-9 ifadesinde artışa rağmen apoptozisin inhibe edildiği anlaşılmaktadır.

Hücrel stresin apoptozisin intrinsik yolağını indüklemesi üzerine, apoptotik Bcl-2 gen ailesi üyeleri oligomerizasyonu tetikler ve mitokondriyal dış zarının geçirgen hale gelmesi ile Sitokrom-c'nin mitokondriden sitozole sızmasına neden olur. Sitokrom-c daha sonra APAF-1'e bağlanır ve apoptozom oluşumunu sağlar. Apoptozom da başlatıcı caspase-9'u aktive eder, bu da caspase-3'ü aktive eder (119). APAF-1 caspase-9'u aktive etmek için Sitokrom-c'ye ihtiyaç duyduğundan ve antiapoptotik Bcl-2 geni mitokondriyal Sitokrom-c salınımını engellediğinden, Bcl-2'nin mitokondriyal membran bütünlüğünü koruyarak apoptozisi engellediği bilinmektedir (119). Marsden ve ark., 2002 de, Bcl-2 gen ifadesini ve farelerde lenfosit sayısını artırdığını ve birçok apoptotik uyararı ise inhibe ettiğini bildirerek, APAF-1 veya caspase-9 geninden yoksun farelerde ise apoptozisin inhibe olmadığını saptamışlardır. Dolayısıyla güçlü bir caspase antagonistinin hem apoptozisi inhibe edebileceği hem de Sitokrom-c salınımını geciktirebileceğini öngörerek, Bcl-2' nin Sitokrom-c/APAF-1/caspase-9 'apoptozomundan' bağımsız olarak bir caspase aktivasyon programını düzenlediği yani Bcl-2'nin caspase-9'a ya da onun aktivatörü olan APAF-1'e gereksinim duymadan hücre ölüm yolağını kontrol ettiği sonucuna varmışlardır (136). Diğer yandan artan caspase 9 aktivasyonuna bağlı olarak caspase-3 aktivasyonunda da bir artış beklenir ancak bu çalışma caspase-3'ün aktivasyonunu engelleyen farklı inhibitörlerin de devreye girdiğini düşünmekteyiz. Caspazelerin düzenlenmesinde Bcl-2 ailesi dışında

caspase aktivasyonunu inhibe eden apoptozis inhibitörleri (IAP) ailesi de önem taşımaktadır. Bu ailede görev alanlar arasında NAIP (BIRC1), cIAP1 (BIRC2), cIAP2 (BIRC3), X-linked IAP (XIAP, BIRC4), Survivin (BIRC5), Apollon (BRUCE, BIRC6), Livin/ML-IAP(BIRC7), ve IAP-benzeri protein 2 (ILP-BIRC8) bulunur. Bunlardan XIAP, birkaç farklı mekanizma yoluyla apoptozisi frenleyen çok yetenekli bir moleküldür (135). XIAP, IAP'lerdeki işlevsel birim olan BIR alanları içerirler ve her biri farklı işlevler sergilediği üç BIR alanı bulundurur. Üçüncü BIR alanı (BIR3), işlenmiş kaspaz-9'un aktivitesini güçlü bir şekilde inhibe ederken, BIR1 ve BIR2 arasındaki bağlayıcı bölge seçici olarak kaspaz-3 ve -7'yi hedef alırlar. BIR3, kaspaz-3'ü inhibe etmezken, BIR1 ve BIR2 bölgelerinin ise caspase 9 üzerinde etkileri yoktur hedefler (137). Caspase 9'un aktif formuna XIAP bağlanarak aktivitesini azaltabilir. Böylelikle caspase-9'un caspase-3'ü aktive etme yeteneği azalır. Apoptozis sırasında bu inhibitörler, mitokondri membranları arası alanından sitozole salınan apoptojenik proteinler olan Omi/HtrA2 ve Smac/DIABLO tarafından devre dışı bırakılır. Smac peptitleri/BIR3 etkileşimi, caspase-9'u serbest bırakmak için caspase-9/BIR3 etkileşimini bozarak caspase-9 aktivitesini güçlendirir. Öte yandan, Smac peptidleri, XIAP'ın kavramasından caspase-3'ü kaldıramaz çünkü XIAP'ın bağlayıcı bölgesiyle etkileşime girmezler (138). Bu durumda XIAP'ın, Smac düzenlemesi yanıt vermesi için Smac'ın hem BIR2 hem de BIR3 alanları ile etkileşime girmesi gereklidir. Bu çalışmada caspase-9 artarken caspase-3 azalmıştır. Apoptozis inhibitörü olan XIAP'nin caspase-9'a ve caspase-3 farklı BIR bölgeleri ile bağlanarak aktivasyonunu engelleyebileceği diğer yandan Smac'ın caspase-9 ile XIAP'ın BIR bölgelerini hedefleyerek XIAP'ın caspase-9 üzerine olan inaktivasyonun inhibisyonu ortadan kaldırmış olabileceği düşünülmektedir. Böylece aktif caspase-9'da artış ortaya çıkmış olabilir. Caspase-3'teki azalma ise Smac'ın caspase-3 ve XIAP arasındaki bağlantıyı bozması için BIR2 hem de BIR3 alanları ile etkileşime girmesi gibi karmaşık mekanizmalar içermesi Smac'ın bu çalışmada XIAP inaktivasyonunu ortadan kaldıramadığı düşünülmektedir. İleri dönemde yapılacak çalışmalarda caspase inhibitörlerinin gen ifade düzeylerindeki değişimlerin gösterilmesi mekanizmanın tam olarak aydınlatılmasına katkı sağlayacaktır.

NeoPUTTY®, yeni bir materyal olup toz/likit karışım ürünü olan MTA'ların aksine macun formunda bulunmaktadır. Toz/likit karışımının sertleşme reaksiyonu

üzerindeki etkisini azaltmak ve klinik uygulamaları kolaylaştırmak adına geleneksel toz/likit simanlara alternatif olarak geliştirilmiştir. NeoPUTTY®, toz/likit formunda olan materyallerin kapakları açıldıktan sonra atmosferik neme maruz kalmaları durumunda raf ömürlerinin kısaldığı belirtilmektedir. Ancak, NeoPUTTY® MTA ürünü ile bu sorunun elimine edildiği gösterilmiştir. NeoPUTTY® MTA'nın su içermeyen organik bir sıvı ile formüle edildiği ve klinik uygulamada dentin tübülleri, pulpa ve apikalden gelen nem ile sertleştiği belirtilmiştir (94). Literatürde, NeoPUTTY®'nin PDL hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerine ilişkin az sayıda çalışmaya rastlanmaktadır. 2021 yılında Sun ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada PDL kök hücreleri ve dental pulpa kök hücreleri üzerinde NeoPUTTY® MTA ve EndoSequence BC RRM Putty materyallerinin 3. gün sonundaki MTT hücre canlılık değerlerine bakılmış ve NeoPUTTY® MTA'nın hem PDL mezenkimal kök hücrelerinin hem de dental pulpa mezenkimal kök hücrelerinin, EndoSequence BC-RRM Putty'e kıyasla hücre canlılıklarını artırdığı ve EndoSequence Putty'e göre daha biyoyumlu olduğu rapor edilmiştir (6). Çalışmamızda MTT testinde NeoPUTTY®'nin direkt olarak uygulandığında hücre canlılığını indirekt uygulamaya göre daha fazla azalttığı fakat hücre canlılığındaki bu azalmanın hem direkt hem de indirekt uygulamada istatistiksel olarak önemli olmadığını gözlemledik. Sun ve ark.'nın çalışmasına uyumlu olarak direkt uygulamaya kıyasla indirekt uygulamada NeoPUTTY®'nin daha fazla biyoyumlu olduğu saptandı.

NeoPUTTY®'ye maruz kalan hücrelerde indirekt 24. saatte hem antiapoptotik Bcl-2 gen hem de apoptotik caspase-9 gen düzeylerinde artış görülürken apoptotik belirteçlerden caspase-3, p53 ve TNF- α gen ifadelerinde ise azalma saptandı. Kontrol ile karşılaştırıldığı zaman apoptotik ve antiapoptotik gen düzeyleri arasında istatistiki olarak bir fark gözlenmedi. İndirekt 48. Saatte de hem antiapoptotik Bcl-2 gen düzeyinde hem de apoptotik caspase-9 gen düzeyinde bir artış gözlenirken apoptotik caspase-3 gen ifadesinde azalma gözlemlendi. Bcl-2 ve caspase-9 gen ifadesindeki bu artışın istatistiki olarak önemli olduğu görüldü. Caspase-9'da artış ve caspase-3'teki azalmanın daha önce NeoMTA 2'de belirtildiği gibi apoptozis mekanizmasında görev alan inhibitör ve aktivatör faktörlerin caspase-9 ve caspase-3 farklı bir şekilde etkilemelerinden kaynaklanıyor olabileceği düşünülmektedir. Diğer apoptotik belirteçlerin ekspresyonlarında istatistiki olarak önemli bir farklılık gözlenmedi. Bu

sonuçlara göre indirekt temasta 48. saate doğru hücrelerin daha fazla hayatta kaldığını göstermektedir. Bu sonuçlar direkt temasta indirekt temasa göre hücre metabolizmasında daha fazla azalma olduğunu gördüğümüz MTT sonuçlarımızla paralellik göstermekte ve dolayısıyla direkt temasta hücre sayısında daha fazla azalma olduğu görüşümüzü desteklemektedir.

Hakeem ve ark., 2023 yılında yaptıkları çalışmada NeoPUTTY® ve Rootdent MTA'nın insan fibroblast hücrelerinde MTT testi ile sitotoksik etkilerini ve Real Time PCR ile caspase-3 gen ifadesini değerlendirmişlerdir. 24. ve 72. Saat olarak iki zaman diliminde de NeoPUTTY® grubunda hücre canlılığının MTA grubuna göre daha fazla olduğunu bildirmişlerdir. Caspase-3 gen ifadesinin, MTA grubunda NeoPUTTY® grubuna göre daha fazla gen ekspresyonu gösterdiğini belirtmişlerdir. Apoptotik olan caspase-3'ün MTA grubunda daha fazla bulunması ve MTT testinde daha az hücre canlılığı göstermesi bu çalışmada NeoPUTTY®'nin MTA'ya göre daha az hücre ölümüne neden olduğu görüşünü desteklemektedir. Çalışmamızda indirekt temasta MTT testi bulgularına göre hem NeoMTA® 2 hem MTAFLOW™ White grubunda hücre canlılığı NeoPUTTY® grubuna göre istatistiki anlamda daha yüksek bulunmuştur. Caspase-3 gen ifadesinde ise anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. Yukarıdaki sonuçlara göre Hakeem ve ark.'nın NeoPUTTY®'nin MTA'dan daha biyouyumlu olduğu sonuçları çalışmamızla çelişmektedir. NeoMTA® 2'de belirtilen apoptozis mekanizmasında görev alan inhibitör ve aktivatör faktörlerin caspase-9 ve caspase-3 farklı bir şekilde etkilemelerinden kaynaklanıyor olabileceği düşünülmektedir.

Biodentine™ “dentin yerine geçen materyal” veya “dentin onarım materyali” olarak tanıtılan ve MTA'nın bazı dezavantajlarının üstesinden geldiği iddia edilen kalsiyum silikat bazlı bir simandır (7). MTA'ya benzer şekilde toz bileşimini esas olarak trikalsiyum silikat ve dikalsiyum silikatın oluşturduğu materyalde radyopasite verici ajan olarak MTA'dan farklı olarak zirkonyum oksit kullanılmıştır (139). Biodentine™ içeriğindeki zirkonyum oksitin dişlerde renk değişimine yol açmaması, Biodentine™'in hızlı sertleşme süresine sahip olması, mükemmel sızdırmazlık kabiliyetine sahip olması, yüksek basınç dayanımı, yüksek biyouyumluluk ve biyoaktivite göstermesi sebebiyle Biodentine™ günümüz diş hekimliği uygulamalarında başarıyla kullanılan bir materyaldir (98).

Biodentine™, NeoPUTTY® ve Theracal PT'nin sitotoksitelerinin değerlendirildiği 2023 yılında yapılan bir çalışmada, materyallerin PDL hücrelerine 1:1 oranında ekstrakt sıvısı ile indirekt temasında 24. ve 72. saatte Biodentine™ ve NeoPUTTY®, TheraCal PT grubundan anlamlı olarak daha yüksek hücre canlılığı göstermiştir. 7. günde en yüksek hücre canlılığını Biodentine™ grubu gösterirken, NeoPUTTY® ve TheraCal PT grubunda anlamlı fark bulunamamıştır. 1:2 ve 1:4 oranında seyreltilmiş indirekt temasta 24. saatte Biodentine™ ve NeoPUTTY® grubu daha yüksek hücre proliferasyonu gösterirken, 3. Ve 7. Günde 3 grup arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır (140). Çalışmamızdaki MTT bulgularına baktığımızda Biodentine™ ve NeoPUTTY®'nin hem direkt hem indirekt temasta benzer hücre canlılığı gösterdiğini ve anlamlı bir fark olmadığı belirlenmiştir. Saber ve ark. çalışmalarında da bu çalışmadan elde edilen sonuçlara benzer olarak Biodentine™ ve NeoPUTTY®'nin PDL hücre canlılığı üzerine etkilerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığını bildirilmişlerdir (140).

Maria Escobar Garcia ve ark. 2016 yılında yaptıkları çalışmada Biodentine™ ve MTA'nın PDL fibroblast hücrelerine olan sitotoksikite ve biyoyumluluğunun değerlendirildiği bir çalışmada çalışmamızla uyumlu olarak 48 saatlik inkübasyon sonrası her iki materyalinde sitotoksik etkisinin olmadığı ve biyoyumlu olduklarını bildirmişlerdir (100).

Biodentine™ ile yapılan çalışmalarda, Biodentine™'in hücre canlılığı üzerine etkilerinin dilüsyon oranlarına bağlı olduğu ve yüksek düzeyde dilüsyon oranlarının da sitotoksik etki oluşturmadığı ileri sürülmektedir (141,142). Çalışmamızda Biodentine™ direkt ve indirekt maruziyet sonrası hücre canlılık oranlarında azalma olmasına rağmen her iki uygulama arasında anlamlı bir fark olmadığı görüldü. Saber ve ark., bizim bulgularımıza benzer şekilde 48 saatte hücre canlılığının azaldığını gözlemlemişlerdir. Yakın zamanda yapılan bir çalışmada Biodentine™ eluatlarında arsenik, kurşun ve krom izleri bulunduğu bildirilmiştir (143). Başka bir çalışma Biodentine™'in arsenik, bakır, demir, manganez ve çinko gibi ağır metalleri serbest bıraktığını ortaya koymuştur (144). Ancak Camilleri ve ark., (143) Biodentine™ örneklerinde tespit edilen arsenik miktarının ihmal edilebilir düzeyde olduğunu;

dolayısıyla Biodentine™'in güvenli bir malzeme olarak kabul edilebileceğini belirtmiştir.

Samyutkha ve ark., 2014 yılında PDL hücrelerinde yaptıkları sitotoksosite çalışmasında MTA ve Biodentine™'in 24 ve 48 saatlik inkübasyon süresinde hücre canlılığını değerlendirmişlerdir. MTA'nın Biodentine™'e göre hücre canlılığını 24. saatte daha fazla artırdığını ancak 48. saatte MTA ve Biodentine™ grubunda hücre canlılığının benzer olduğunu bildirmişlerdir. 48. Saatte Kontrol grubuyla Biodentine™ grubu karşılaştırıldığında Biodentine™ grubunda hücre canlılığının azaldığını belirtmişlerdir (129). Bizim çalışmamızda da MTT testinde benzer şekilde 48. saatte hücre canlılığının Biodentine™ grubunda kontrole göre azaldığı ancak istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü. Kontrol grubunda 48. saat ile karşılaştırıldığında Biodentine™'e göre hücre canlılığının daha fazla olması bizim çalışmamızın bulgularını desteklemektedir.

Biodentine™ grubunda Real Time PCR bulgularının apoptozis gen ifadelerine baktığımız zaman, direkt olarak hem 24 hem de 48 saat süre ile Biodentine™'e maruz kalan hücrelerde kontrole göre antiapoptotik Bcl-2 gen ifadesinde ve apoptotik caspase-9 gen ifadesinde artış gözlenirken diğer gen ifadelerinde azalma saptandı. Bcl-2 ve caspase-9 gen ifadelerinde direkt 24 ve 48 saat süreleri arasında istatistiki olarak önemli düzeyde bir fark olduğu belirlendi. Biodentine™ grubunda indirekt grupta 24. Saatte antiapoptotik Bcl-2 ifadesinde artış görünürken, 48. Saatte gerçekleşen artış arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlıydı. Benzer şekilde caspase -9 gen ifadesinde de indirekt grupta 24. ve 48. saatler arasında gen ifadesindeki düşüşün anlamlı derecede farklı olduğunu görmekteyiz. NeoMTA® 2 grubunda olduğu gibi apoptotik ve antiapoptotik olan bu iki gen benzer davranışı göstermiştir. 48. saate baktığımızda ise indirekt ve direkt gruplar arasında Bcl-2 gen ifadesinde anlamlı bir farklılık olmazken, caspase-9 gen ifadesinde direkt temasta anlamlı derecede artış gözlemlendi. Bu sonuca göre PDL hücrelerinin Biodentine™ grubunda direkt temasta 48. Saate doğru apoptozisin indüklendiğini göstermektedir. Bu düşüncemizi dexterler şeklinde MTT bulgularımızda da 48. saatte hücre canlılığının direkt grupta indirek gruba göre fazla olduğu olduğu görüldü.

Birant ve ark., 2020 yılında dental pulpa kök hücreleri üzerinde yaptıkları çalışmada Biodentine™, ProRootMTA ve NeoMTA Plus'ın Annexin V boyama ile flow sitometri cihazında 1. 3. Ve 7. günlerde erken ve geç apoptozis ile nekroz hücre oranlarını incelemişlerdir. Biodentine™ grubunda canlı hücre oranlarına bakıldığında 7. gündeki hücre canlılığı diğer günlere göre daha yüksek bulunmuştur. Bizim çalışmamızda ise genellikle 48. saatte hücre canlılığı biodentine hem direkt hem indirekt uygulamada diğer biyomateryallere göre düşük bulunmuştur. Bu fark bizim çalışmamızda farklı olarak bu çalışmada pulpa kök hücrelerinin kullanılmasına bağlı olarak hücrelerin karakteristik özellikleri ile ilgili olabilir. ProRoot MTA ve NeoMTA Plus grubunun analizine benzer şekilde erken apoptotik, geç apoptotik ve nekrotik hücre yüzdeleri sırasıyla 1., 3. ve 7. günlerde daha yüksek olarak hesaplanmıştır. En düşük erken apoptotik hücre oranı tüm günlerde Biodentine™ grubunda bulunmuştur. 7. günde geç apoptotik hücre oranı en düşük grup Biodentine™ grubu olmuştur (145). Diğer yandan bizim çalışmamızda da Bcl-2 gibi apoptozis inhibitörü 24 saatte yüksekken 48. saatte düşük olması ilerleyen sürelerde apoptozis inhibisyonun azaldığını düşündürür

Bu çalışmada test edilen MTAFlow™ White, aynı isimli gri versiyonunun yeni geliştirilen alternatifidir. Tozu değiştirilip beyaz olmakla kalmamış, radyoopasite verici ajan bizmut oksit yerine tantalyum oksit kullanılmıştır. MTA'nın uzun sertleşme süresi, kumlu kıvamı ve yerleştirilmesindeki zorlukların getirdiği dezavantajların üstesinden gelinmesi amacıyla üretilmiştir (4). Üretici firma pürüzsüz bir kıvam elde edildiği ve 'ince', 'kalın' ve macun formunda olmak üzere 3 farklı toz-likit oranında karıştırılarak sahip olduğu taşıyıcı enjektörle de uygulanabilme kolaylığı sağladığını belirtmektedir (146). Literatürde MTAFlow™ White'ın sitotoksikite ve biyouyumluluk bilgisi sınırlıdır. Pelepenko ve ark. 2018 yılında yaptığı bir çalışmada, MTAFlow™ White, Biodentine™ ve ProRoot MTA'nın PDL fibroblast hücrelerinde 24 saatlik direkt temas sonrası en düşük hücre canlılığı gösteren materyal MTAFlow™ White olmuştur. Bizim çalışmamızda da Pelepenko ve ark.'na benzer olarak direkt temas sonrası 48. saatte MTAFlow™ White grubunda Biodentine™'e göre hücre canlılığı daha az olup istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.

Asuka Aka ve ark., 2024 yılında yaptığı bir çalışmada MTAFlow™ White, MTARepair HP ve Nishika Canal Sealer BG'nin PDL hücreleri üzerinde 7 ve 28 günlük sitotoksitelerini değerlendirmişlerdir. 7. ve 28. Günlerde MTAFlow™ White ve Nishika Canal Sealer BG grubunda hücre canlılığını MTA Repair HP ve kontrol grubundan anlamlı derecede daha düşük bulmuşlardır. MTAFlow™ White ve Nishika Canal Sealer arasında anlamlı bir fark bulunmazken en düşük hücre canlılığı MTAFlow™ White grubunda bulunmuştur. Yine aynı çalışmada MTAFlow™ White'ın 7.ve 28. Günde 3 farklı toz-likit oranının kendi içinde karşılaştırmasında her iki zamanda da en yüksek hücre canlılığını en koyu kıvamlı yani en fazla toz kullanılan macun formunda göstermiştir. Bizim çalışmamızda 48 saatlik inkübasyon süresi sonrasında MTAFlow™ White grubunda direkt temasta indirekt temasa göre hücre canlılığında azalma istatistiksel olarak anlamlı düzeyde gerçekleşti. Kontrol grubuyla karşılaştırdığımızda direkt temasta anlamlı olarak daha düşük hücre canlılığı belirlendi. İndirekt temasta kontrol grubuna göre hücre canlılığındaki artış istatistiksel olarak anlamlı değildi. Direkt temasta hücre canlılığındaki azalma bulgularımız literatürdeki çalışmalarla uyumludur.

MTAFlow™ White apoptozis gen ifadelerine baktığımızda, indirekt 24 saat maruz kalan hücrelerin Bcl-2, p53 ve TNF- α gen ifadelerinde kontrole göre artışı, caspase-3 ve caspase-9 gen ifadelerinde azalma gözlenirken; 48 saat süre ile MTAFlow™ White'a maruz kalan hücrelerde bu kat artışının Bcl-2, p53 ve TNF- α gen ifadeleri ile birlikte caspase-9 gen ifadesinde de olduğu görüldü. İndirekt 24 ve 48 saat grupları arasında Bcl-2, caspase-3 ve p53 gen ifadelerinin değişimleri arasında istatistiki olarak önem gözlenmezken, TNF- α ve caspase-9 gen ifadelerinde istatistiksel olarak fark olduğu saptandı.

Direkt MTAFlow™ White'a hem 24 hem de 48 saat maruz kalan hücrelerin Bcl-2 ve caspase-9 gen ifadelerinde kontrole göre artışı saptanırken caspase-3, p53 ve TNF- α gen ifadelerinde kat değerinde azalma gözlendi. Direkt 24 ve 48 saat uygulama yapılan MTAFlow™ White grupları arasında istatistiki bir önem belirlenmedi. Gerek indirekt 48. saat indirekt temasta gerekse 24 ve 48. saat direkt temasta gözlenen caspase-9'daki artış ve caspase-3'teki azalmanın diğer biyomateriyallerde de bahsedilen apoptozisin düzenleyicileri arasında yer alan XIAP ve Smac'ın etkileşimleri ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir.

MTAFlow™ White grubunda indirekt ve direkt karşılaştırma yapıldığında antiapoptotik Bcl-2 gen ifadelerinde indirekt grupta hem 24. hem 48. Saatte gen ekspresyonları istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu. Apoptotik caspase-9 gen ifadesine baktığımızda da 24. Saatte indirekt grupta direkt gruba göre istatistiksel olarak anlamlı olarak düşük olan sonuçları görmekteyiz. MTAFlow™ White grubu direkt temasta indirekt temasa göre hücreleri daha çok apoptozis için uyarmış ve hücre ölümü yoluna daha fazla gitmiştir. Bu sonuçlar MTAFlow™ White'ın direkt etkisinde daha düşük hücre canlılığı gösterdiği MTT bulgularımızı desteklemektedir. İndirekt temasta direkt temasa göre daha fazla hücrenin hayatta kaldığını gözlemlemekteyiz.

Bu çalışmada, PDL dokusu üzerinde biyomateryalin klinik uygulamasını taklit etmek için, hücrelerin direkt biyomateryal teması ile zorlandığı bir ortam tasarlanması amaçlanmıştır. Yapılan hücre kültürü çalışmalarında, biyoseramik içerikli kök kanal tamir materyallerine karşı hücre tepkisinin hücre tipi, çalışma süresi, yeni karıştırılmış veya bekletilmiş malzeme kullanımı, ortamın değiştirilme sıklığı, materyalin direkt teması veya indirekt olarak salınım ekstraktlarının kullanımı ve hücre kültürü ortamındaki malzeme konsantrasyonu gibi birçok faktöre bağlı olduğunu göstermektedir (147). Tsai ve ark., 2018'de MTA'nın eksfoliyé süt dişlerinin kök hücreleri üzerinde hücre canlılığını direkt ve indirekt temas yöntemi ile incelediği çalışmada, WST-1 test metodu ile sitotoksité incelemişler ve apoptozis tayin yöntemi olarak TUNEL ve Annexin V/7-AAD boyama yöntemi kullanılarak kalitatif analizi yapılmıştır. MTA'nın direkt temas etkisi ile hücreler üzerinde canlılığı olumsuz etkilediği bulunmuştur. Bizim çalışmamızda da bu sonucu destekler nitelikte olup her grupta direkt temasta hücre canlılığının azaldığını gözlemledik.

Tsai ve ark., aynı çalışmalarında Bcl-2 protein ailelerinin MTA ile indüklenen apoptotik hücre ölümünde başlıca rol oynayıp oynamadığını belirlemek için, Bcl-2, Bcl-xL ve Bax aktivitelerini bir Western Blot testi kullanarak incelemişlerdir. Antiapoptotik proteinlerin (Bcl-2, Bcl-xL) 2 gün MTA'ya teması sonrası kontrole kıyasla önemli ölçüde azaldığını göstermiştir. Pro-apoptotik protein (Bax) MTA gruplarında hafifçe artmış olsa da, kontrol ile karşılaştırıldığında anlamlı bir fark yoktu. Annexin V/7AAD sonuçlarına göre de MTA ile direkt temasın erken apoptotik hücrelerin sayısını artırdığını belirtmişlerdir (147). Çalışmamızda da bu sonuçlara benzer olarak

MTAFlow™ White grubunda hem 24. Hem 48. Saatte indirekt temasta direkt temasa göre antiapoptotik Bcl-2 gen ekspresyonu anlamlı derecede artmış, caspase-9 gen ekspresyonu ise 24. Saatte artmıştır. Bu sonuçlar indirekt temasta hücrelerin apoptoza gitme eğiliminin daha az olduğu görüşümüzü desteklemektedir.

Yeni karıştırılmış taze materyalin veya bekletilmiş malzemelerin kullanımı da sitotoksiteyi etkileyen faktörlerden olmaktadır. Agrafioti ve ark., dental pulpa kök hücreleri üzerinde yaptıkları bir çalışmada karıştırıldıktan sonra 1 saat bekletilen taze MTA'nın 24 saat bekletilen MTA'ya göre 4. Ve 7. günde daha az hücre canlılığı gösterdiğini belirtmişlerdir (148). Kalsiyum iyonlarının ilk salınımının yanı sıra taze MTA'dan sızabilen bileşenlerin varlığı hücrelerin davranışını etkileyebilir. Taze karıştırılmış kalsiyum-silikat bazlı simanların erken dönemde kalsiyum-silikat hidratlar oluşturabileceği ve kalsiyum fosfat ve kalsiyum karbonat çökeltebileceği bildirilmiştir (149). Çalışmamızda kullanılan biyoseramik malzemeler sadece 1 defa karıştırılmış ve her test öncesi yeni materyal karıştırılması tercih edilmemiştir. Bu tercihimizin sebebi klinik uygulama prosedürlerine paralel bir çalışma yürütmektir. Ancak bu tercihin elde edilen sonuçları etkilemiş olma ihtimali bulunmaktadır. İleri dönem yapılacak çalışmalarda her test öncesi yeni materyal karıştırılarak değerlendirmelerde bulunulması sonuçlarımızın doğrulanması açısından faydalı olacaktır.

Hücre kültürü ile yapılan in vitro biyouyumluluk çalışmaları diş hekimliği alanında kullanılan ve yeni geliştirilen materyallerin değerlendirilmesinde ilk basamaktır. Ancak yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlar her zaman klinik kullanımdan elde edilen sonuçlarla paralellik göstermeyebilir. Bunun birçok nedeni olabilir. Örneğin hidrofilik bir materyalin in vivo koşullarda sertleşme süresi in vitro koşuldaki sertleşme süresinden farklı olabilmektedir. Bunun yanı sıra hücre kültürüne uygulanan çeşitli ilaç/materyal konsantrasyonunun in vivo şartlarda canlı dokuda hangi konsantrasyona denk geldiği bilinmemektedir. Ayrıca in vivo çalışmalarda çevre dokuda meydana gelen hücresel yanıt in vitro çalışmalarda mevcut değildir. İn vitro hücre kültürü çalışmaları dental materyallerin biyolojik etkileri hakkında ön bilgi sağlamaktadır. Kesin sonuca varabilmek için in vitro ve in vivo çalışmaların bir arada yapılması gerekmektedir.

Bu çalışmada genel olarak, hem MTT hem de apoptotik genlerin ekspresyon sonuçlarına göre direkt maruziyetin indirekt maruziyete göre etkilerinin fazla olduğu gözlenmiştir. Örneğin MTAFlow™ White'ta indirekt hücre canlılığının kontrole göre indirekte yüksekken direkt uygulamada oldukça düşük olduğu görüldü. Biodentine™ ve NeoPUTTY®'de her iki uygulamanın hücre canlılığını azalttığı belirlendi. Kullanılan biyomateryallerin hücreye sitotoksik etkileri nekroz ve apoptozis gibi hücre ölüm tipleri ile açıklanabilir. Hücre ölüm tiplerinden hangisinin olduğunun ayırımının yapılması ölüm tiplerinde gözlenen farklı biyolojik cevaplar açısından önem taşımaktadır. Enzimlerin lizozomlardan dışarı sızması, sitoplazmaya geçmesi ve hücre sindirilmesi olayı nekrozda gerçekleşmektedir. Hücresel içerik zedelenmiş olan plazma membranından hücre dışı aralığa geçer, inflamatuvar yanıt başlar ve hücre hasarı görülür. Apoptozisde ise hücre, büyüme faktörlerinden yoksun kaldığında, DNA ve proteinler geri dönülemeyecek düzeyde zedelendiğinde, membran bütünlüğü bozulmadan çekirdeğin dağılması ile apoptotik cisimcikler oluşur ve hücre kendini öldürür. Dolayısıyla apoptozis ile gerçekleşen hücre ölümünde immün yanıt oluşmaz. Bu farka bağlı olarak materyal ile temasta olan hücrelerin daha çok apoptozisi indüklediği durumlarda dokularda inflamasyon oluşturmadığı ve dokularda meydana gelen modifikasyonlara daha hızlı adapte olacağı düşünülmektedir (150). Bu nedenlerden dolayı bir materyalin hangi yolla toksik etkiye neden olduğunun tespiti ile daha ileri çalışmalarda toksisitenin nekroz veya apoptozisde hangi basamakta meydana geldiğini araştırmak için önemli bir adım olacaktır. Bu çalışmada hücre canlılığında gözlenen azalmanın apoptozis kaynaklı olup olmadığını belirlemek için belirlediğimiz apoptotik belirteçlerin gen düzeylerini değerlendirdik. Genel olarak Bcl-2'deki artış ve caspase-3'teki azalma bize hücre ölümünün apoptozis aracılığıyla değil nekroz ile gerçekleştiğini düşündürdü. NeoMTA® 2 grubunda ise farklı olarak hücre canlılığının arttığı grup olarak karşımıza çıktı. Hücre proliferasyonun yüksek olması da istenilen bir durum değildir. Biyomateryalin hücre ve doku üzerine kontrole yakın etkiler sergilemesi biyoyumluluk için önemlidir. Kullanılan biyomateryale bağlı gelişen reaksiyonların ve bunların hücre ve dokular üzerindeki etkilerinin belirlenmesi için farklı yöntemlerle mekanizmalarının ortaya konması önem arz etmektedir. Bu çalışma diş hekimliğinde kullanılacak materyallerin biyoyumluluğu konusunda ve yeni üretilen ideal malzemenin diş hekimlerinin kullanımına sunulması için referans olacaktır.

Bu çalışmanın en önemli sınırlaması; çalışma bütçesinin ve süresinin kısıtlı olması nedeniyle deneylerin 72. Saat, 1 hafta gibi daha uzun süreli maruziyette hücrelerin biyomateryallere karşı davranışlarının gözlemlenememesi olmuştur. Hücre kültürü prosedüründe hücrelerin enfekte olması, kısa sürede yeterli sayıda hücreye ulaşamaması gibi olumsuzluklar testlere tekrardan başlanmasına neden olarak hem malzeme hem zaman kaybına sebep olmuştur. Primer hücre kültüründeki hücrelerin çoğaltılmasındaki zorluklar ve bu aşamada hücre kültüründe çalışmanın teknik hassasiyet gerektiren doğası; deneylerin ilerleyen basamaklarındaki sitotoksik testleri sırasında devamlı olarak hücre kaybına ve buna bağlı olarak yeni hücreler ile testlerin tekrarlanmasına sebep olmuştur. Bu gibi prosedürel zorluklar sitotoksik ve Real Time PCR analizleri için zamanımızı kısıtlamıştır. Ayrıca elde edilen test sonuçlarının tekrarlanarak doğrulanması gerekmektedir. Ancak hem malzeme hem zaman kısıtlamasından dolayı sonuçlarımızı doğrulayacak yeterli tekrar testleri yapılamamıştır.

Apoptozis karmaşık kompleks bir mekanizmadır. Hücre çoğalması ve apoptozis ile ilgili çok çeşitli genlerin aktivasyonu ve inhibisyonu rol oynamaktadır. Bcl-2 ve caspase-3 arasındaki ilişki, Bcl-2'nin genellikle caspase-3 aktivitesini baskılayarak apoptozisi inhibe ettiği düzenleyici bir denge ile karakterize edilir. Bununla birlikte, spesifik hücresel stres gibi bazı koşullar altında, bu denge değişerek caspase-3'ün aktivasyonuna ve apoptozisin teşvik edilmesine yol açabilir. Bu dinamik etkileşim, apoptozis mekanizmalarını anlamak ve düzensiz hücre ölümünü içeren hastalıklar için terapötik stratejiler geliştirmek için çok önemlidir. Ayrıca apoptozisin regülasyonu Bcl-2/Bax gen ailesi ile sağlanır (121). Örneğin, Bcl 2'nin Bax ile olan etkileşiminde Bcl-2'nin oranının daha yüksek olması hücrenin yaşamını sürdürmesini sağlarken, Bax'ın daha fazla olması durumunda hücre ölümüne gitmektedir (121). Apoptozisi aktive eden ve inhibe eden çok sayıda çeşitli genler de bu mekanizmada rol oynadığı için Bcl-2/Bax oranının da belirlenmesi gerekmektedir.

Bu çalışmada kullanılan biyomateryaller üzerinde apoptozis-nekroz tayini ve gen ekspresyonunun değerlendirildiği herhangi bir çalışmaya literatürde rastlanılmamış olup sonuçlarımızın daha net değerlendirilebilmesi için daha fazla in vitro ve in vivo çalışmaya ihtiyaç vardır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Endodontik tedavi prosedürlerinde kullanılan biyoseramik içerikli kök kanal tamir materyallerinin hücre kültürü yöntemiyle insan periodontal ligament fibroblast hücreleri üzerinde sitotoksik etkilerinin MTT ve Real Time PCR testi kullanılarak kıyaslandığı çalışmamızda şu sonuçlar elde edilmiştir:

1. MTT sitotoksikite testinde; tüm biyomateriyal gruplarında direkt temasta indirekt temasa göre daha az hücre canlılık aktivitesi saptanmıştır.
2. MTT sitotoksikite testi sonuçlarına göre direkt temasta; kontrol grubuna göre daha yüksek hücre canlılık aktivitesi gösteren tek grup NeoMTA® 2'dir. Direkt temasta en az hücre canlılık aktivitesinin, MTAFlow™ White grubunda olduğu belirlenmiştir. İndirekt temasta
3. Çalışmada Real Time PCR sonuçlarımıza göre anti-apoptotik Bcl-2 gen ekspresyonu indirekt temasta 48. Saatte en yüksek MTAFlow™ White grubunda bulunmuştur. İndirekt temas 24. Saatte ise en yüksek Biodentine™ grubunda saptanmıştır.
4. Apoptotik caspase-3 gen ekspresyonunda direkt temas 24. saatte en düşük grup NeoPUTTY® olmuştur. Direkt temas 48. Saatte ise en düşük caspase-3 gen ekspresyonu NeoMTA® 2 grubunda gözlenmiştir. (sadece biodentine grubunda yüksek çıktı diğerlerinde ise kontrolle karşılaştırıldığında düşük çıktı)
5. Hem MTT sitotoksikite testinde hem Real Time PCR apoptozis gen ekspresyonları sonuçlarımıza bakıldığında MTAFlow™ White'ın indirekt uygulamalarda daha iyi sonucu verdiğini düşünmekteyiz.
6. NeoMTA® 2 daha az hücre ölümüne ve apoptozise neden olmuştur. Çalışmada kullandığımız diğer materyallere göre biyouyumluluk açısından en iyi sonucu vermiştir.
7. Çalışmamızın sonuçlarına göre tüm biyomateriyallerin sitotoksik özelliklerinin kabul edilebilir seviyede ve biyouyumlu olduğu sonucuna varılmıştır. MTT sitotoksikite sonuçlarına göre hücre canlılığı azalan gruplarda apoptozis-nekroz ayrımı yapılması için daha ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

7. KAYNAKLAR

1. Jardine AP, Montagner F, Quintana RM, Zaccara IM, Kopper PMP. Antimicrobial effect of bioceramic cements on multispecies microcosm biofilm: a confocal laser microscopy study. *Clin Oral Investig*. 2019 Mar 8;23(3):1367–72.
2. Mondelli JAS, Hoshino RA, Weckwerth PH, Cerri PS, Leonardo RT, Guerreiro-Tanomaru JM, et al. Biocompatibility of mineral trioxide aggregate flow and biodentine. *Int Endod J*. 2019 Feb 1;52(2):193–200.
3. Palczewska-Komsa M, Kaczor-Wiankowska K, Nowicka A. materials New Bioactive Calcium Silicate Cement Mineral Trioxide Aggregate Repair High Plasticity (MTA HP)-A Systematic Review. 2021.
4. Pelepenko LE, Saavedra F, Antunes TBM, Bombarda GF, Gomes BPFA, Zaia AA, et al. Physicochemical, antimicrobial, and biological properties of White-MTAFlow.
5. NuSmile NeoMTA 2 Starter Kit 1.0gm – The Paediatric Dental Company. [cited 2024 Mar 11]. Available from: <https://tp-dc.com.au/products/nusmile-neomta-2-starter-kit-1-0gm>
6. Sun Q, Meng M, Steed JN, Sidow SJ, Bergeron BE, Niu L na, et al. Manoeuvrability and biocompatibility of endodontic tricalcium silicate-based putties. *J Dent*. 2021 Jan 1;104.
7. Kaup M, Schäfer E, Dammaschke T. An in vitro study of different material properties of Biodentine compared to ProRoot MTA. *Head Face Med* [Internet]. 2015 May 2 [cited 2024 Sep 3];11(1). Available from: </pmc/articles/PMC4424823/>
8. Malkondu Ö, Kazandağ MK, Kazazoğlu E. A Review on Biodentine, a Contemporary Dentine Replacement and Repair Material. *Biomed Res Int*. 2014 Jun 16, 2014:160951.
9. Madukwe IU. *Journal of Dentistry and Oral Hygiene* Anatomy of the periodontium: A biological basis for radiographic evaluation of periradicular pathology. 2014 [cited 2024 Aug 26];6(7):70–6. Available from: <http://www.academicjournals.org/JDOH>
10. Miguez PA, Morelli T. *Periodontology Applied to Operative Dentistry*. Sturdevant's Art and Science of Operative Dentistry. 2019 Jan 1;415–32.
11. Beertsen W, McCulloch CAG, Sodek J. The periodontal ligament: a unique, multifunctional connective tissue. *Periodontol 2000* [Internet]. 1997 [cited 2024 Jan 8];13(1):20–40. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9567922/>
12. Chai Y, Jiang X, Ito Y, Bringas P, Han J, Rowitch DH, et al. Fate of the mammalian cranial neural crest during tooth and mandibular morphogenesis. *Development* [Internet]. 2000 Apr [cited 2024 Jan 8];127(8):1671–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10725243/>
13. Nanci A. *Ten Cate's Oral Histology: Development, Structure, and Function*. Ten Cates Oral Histology: Development, Structure, and Function, Eighth Edition [Internet]. 2012 Jan 1 [cited 2024 Jan 8];1–379. Available from: <https://search.worldcat.org/title/870979187>

14. Lallier TE, Spencer A, Fowler MM. Transcript profiling of periodontal fibroblasts and osteoblasts. *J Periodontol* [Internet]. 2005 Jul [cited 2024 Jan 8];76(7):1044–55. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16018745/>
15. Macneil RL, Somerman MJ. Development and regeneration of the periodontium: parallels and contrasts. *Periodontol 2000* [Internet]. 1999 [cited 2024 Mar 12];19(1):8–20. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10321213/>
16. Isaka J, Ohazama A, Kobayashi M, Nagashima C, Takiguchi T, Kawasaki H, et al. Participation of periodontal ligament cells with regeneration of alveolar bone. *J Periodontol*. 2001 Mar;72(3):314–23.
17. Park JC, Kim JM, Jung IH, Kim JC, Choi SH, Cho KS, et al. Isolation and characterization of human periodontal ligament (PDL) stem cells (PDLSCs) from the inflamed PDL tissue: in vitro and in vivo evaluations. *J Clin Periodontol* [Internet]. 2011 Aug [cited 2024 Mar 12];38(8):721–31. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21449989/>
18. Hakki SS, Kayis SA, Hakki EE, Bozkurt SB, Duruksu G, Unal ZS, et al. Comparison of mesenchymal stem cells isolated from pulp and periodontal ligament. *J Periodontol*. 2015 Feb;86(2):283–91.
19. Weissman IL, Anderson DJ, Gage F. Stem and Progenitor Cells: Origins, Phenotypes, Lineage Commitments, and Transdifferentiations. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.17.1.387> [Internet]. 2003 Nov 28 [cited 2023 Dec 12];17:387–403. Available from: <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.cellbio.17.1.387>
20. Smith AG. Embryo-Derived Stem Cells: Of Mice and Men. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.17.1.435> [Internet]. 2003 Nov 28 [cited 2023 Dec 12];17:435–62. Available from: <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.cellbio.17.1.435>
21. Simara P, Motl JA, Kaufman DS. Pluripotent stem cells and gene therapy. *Translational Research* [Internet]. 2013 Apr 1 [cited 2023 Dec 13];161(4):284–92. Available from: <http://www.translationalres.com/article/S1931524413000030/fulltext>
22. Kelly EB. Stem cells. 2007 [cited 2024 Jan 9];203. Available from: https://books.google.com/books/about/Stem_Cells.html?hl=tr&id=1CxDarcSR6cC
23. Alhadlaq A, Mao JJ. Mesenchymal stem cells: isolation and therapeutics. *Stem Cells Dev* [Internet]. 2004 Aug [cited 2024 Jan 9];13(4):436–48. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15345137/>
24. Yildirim S, Zibandeh N, Genc D, Ozcan EM, Goker K, Akkoc T. The Comparison of the Immunologic Properties of Stem Cells Isolated from Human Exfoliated Deciduous Teeth, Dental Pulp, and Dental Follicles. *Stem Cells Int* [Internet]. 2016 [cited 2024 Jan 9];2016. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26770205/>
25. Parker GC, Anastassova-Kristeva M, Broxmeyer HE, Dodge WH, Eisenberg LM, Gehling UM, et al. Stem cells: shibboleths of development. *Stem Cells Dev*

- [Internet]. 2004 [cited 2024 Jan 9];13(6):579–84. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15684825/>
26. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* [Internet]. 2002 [cited 2024 Jan 10];418(6893):41–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12077603/>
 27. Thomson M, Liu SJ, Zou LN, Smith Z, Meissner A, Ramanathan S. Pluripotency factors in embryonic stem cells regulate differentiation into germ layers. *Cell* [Internet]. 2011 Jun 10 [cited 2024 Jan 10];145(6):875–89. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21663792/>
 28. Huang J, Wang F, Okuka M, Liu N, Ji G, Ye X, et al. Association of telomere length with authentic pluripotency of ES/iPS cells. *Cell Res* [Internet]. 2011 May [cited 2024 Jan 10];21(5):779–92. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21283131/>
 29. Bongso A, Lee EH. Stem cells: From bench to bedside. *Stem Cells: From Bench to Bedside* [Internet]. 2005 Jan 1 [cited 2023 Dec 12];1–565. Available from: https://books.google.com/books/about/Stem_Cells.html?hl=tr&id=AsRgDQAAQBAJ
 30. Kansu E. Kök hücre biyolojisi ve plastisitesinde güncel kavramlar. *Hacettepe Tıp Dergisi* [Internet]. 2005 [cited 2023 Dec 13];36:191–6. Available from: <https://silo.tips/download/kk-hcre-aratrmalar-konusunda-bugne-kadar-ulalan-nokta-gelecek-iin-byk>
 31. Ratajczak MZ, Zuba-Surma E, Kucia M, Poniewierska A, Suszynska M, Ratajczak J. Pluripotent and multipotent stem cells in adult tissues. *Adv Med Sci* [Internet]. 2012 Jun 1 [cited 2024 Mar 12];57(1):1–17. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22515973/>
 32. Dzobo K. Multipotent Human Mesenchymal Stem/Stromal Cells: An Updated Review on Historical Background, Recent Trends and Advances in their Clinical Applications. 2021 Mar 15 [cited 2024 Mar 12]; Available from: <https://www.preprints.org/manuscript/202103.0373/v1>
 33. Zakrzewski W, Dobrzyński M, Szymonowicz M, Rybak Z. Stem cells: Past, present, and future. *Stem Cell Res Ther* [Internet]. 2019 Feb 26 [cited 2023 Dec 13];10(1):1–22. Available from: <https://stemcellres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13287-019-1165-5>
 34. Ajaykumar Vishwakarma, Paul Sharpe, Songtao Shi, Murugan Ramalingam. Stem cell biology and tissue engineering in dental sciences. Academic Press. *Stem Cell Biology and Tissue Engineering in Dental Sciences*. 2015;
 35. Essential Stem Cell Methods - Google Kitaplar [Internet]. [cited 2024 Mar 17]. Available from: https://books.google.com.tr/books/about/Essential_Stem_Cell_Methods.html?id=aPcvphPV6AgC&redir_esc=y
 36. Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell*

- Tissue Kinet [Internet]. 1970 [cited 2024 Mar 17];3(4):393–403. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/5523063/>
37. Caplan AI. Review: mesenchymal stem cells: cell-based reconstructive therapy in orthopedics. Tissue Eng [Internet]. 2005 Jul [cited 2024 Mar 17];11(7–8):1198–211. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16144456/>
 38. Cihova M, Altanerova V, Altaner C. Stem cell based cancer gene therapy. Mol Pharm [Internet]. 2011 Oct 3 [cited 2024 Mar 17];8(5):1480–7. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/mp200151a>
 39. Tarihi G. Mezenkimal Kök Hücreler ve İmmünomodülasyon Fonksiyonları Mesenchymal Stem Cells and Immunomodulatory Functions. Akdeniz Medical Journal Akd Tıp D / Akd Med J. 2020;6(3):324–33.
 40. Diş Hekimliği Bilimleri Dergisi U, Mühendisliğinde Diş Dokusundan Türetilmiş Mezenkimal Kök Hücreler D, ALMARRAWI Bülent Ecevit Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi A, ve Çene D. Dental Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells in Tissue Engineering.
 41. Gronthos S, Brahimi J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A, et al. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. J Dent Res [Internet]. 2002 Aug 1 [cited 2024 Mar 18];81(8):531–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12147742/>
 42. Huang GTJ, 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 [Internet]. 2009 Sep [cited 2024 Mar 17];88(9):792–806. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19767575/>
 43. Oyar P. Dental Kök Hücre Kaynakları Ve Kemik Doku Rejenerasyonunda Kullanılma Potansiyelleri. Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi [Internet]. 2015 Jun 16 [cited 2024 Mar 17];25(1).
 44. Sonoyama W, Liu Y, Fang D, Yamaza T, Seo BM, Zhang C, et al. Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine. PLoS One [Internet]. 2006 Dec 20 [cited 2023 Dec 26];1(1).
 45. Abe S, Yamaguchi S, Amagasa T. Multilineage Cells from Apical Pulp of Human Tooth with Immature Apex. Oral Sci Int [Internet]. 2007 May [cited 2024 Jan 9];4(1):45–58. Available from: https://www.researchgate.net/publication/257518395_Multilineage_Cells_from_Apical_Pulp_of_Human_Tooth_with_Immature_Apex
 46. Morsczeck C, Schmalz G, Reichert TE, Völlner F, Galler K, Driemel O. Somatic stem cells for regenerative dentistry. Clin Oral Investig [Internet]. 2008 Jun [cited 2024 Jan 9];12(2):113–8.
 47. Huang GTJ, 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 [Internet]. 2009 Sep [cited 2024 Jan 9];88(9):792–806.
 48. Atalayın Ç, Ergücü Z, Tezel H. Diş Hekimliğinde Kök Hücre Ve Dental Pulpa Kök Hücreleri Stem Cells In Dentistry And Dental Pulp Stem Cells. GÜ Diş Hek Fak Derg. 2012;29(2):115–20.

49. Yalvac M, Rizvanov A, Kilic E, Sahin F, Mukhamedyarov M, Islamov R, et al. Potential role of dental stem cells in the cellular therapy of cerebral ischemia. *Curr Pharm Des* [Internet]. 2009 Oct 17 [cited 2024 Aug 27];15(33):3908–16. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19938343/>
50. Morsczeck C, Götz W, Schierholz J, Zeilhofer F, Kühn U, Möhl C, et al. Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth. *Matrix Biol* [Internet]. 2005 Apr [cited 2024 Aug 27];24(2):155–65. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15890265/>
51. Yao S, Pan F, Prpic V, Wise GE. Differentiation of Stem Cells in the Dental Follicle. *J Dent Res* [Internet]. 2008 Aug [cited 2023 Dec 26];87(8):767. Available from: [/pmc/articles/PMC2553250/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/178253250/)
52. Mori G, Ballini A, Carbone C, Oranger A, Brunetti G, di Benedetto A, et al. Osteogenic Differentiation of Dental Follicle Stem Cells. *Int J Med Sci* [Internet]. 2012 [cited 2023 Dec 26];9(6):480. Available from: [/pmc/articles/PMC3427952/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23427952/)
53. Ma L, Makino Y, Yamaza H, Akiyama K, Hoshino Y, Song G, et al. Cryopreserved dental pulp tissues of exfoliated deciduous teeth is a feasible stem cell resource for regenerative medicine. *PLoS One* [Internet]. 2012 Dec 14 [cited 2024 Mar 17];7(12). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23251621/>
54. Mochizuki M, Nakahara T. Establishment of xenogeneic serum-free culture methods for handling human dental pulp stem cells using clinically oriented in-vitro and in-vivo conditions. *Stem Cell Res Ther* [Internet]. 2018 Feb 3 [cited 2024 Mar 18];9(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29394956/>
55. Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2000 Dec 5 [cited 2024 Mar 18];97(25):13625–30.
56. Mitsiadis TA, Orsini G, Jimenez-Rojo L. Stem cell-based approaches in dentistry. *Eur Cell Mater* [Internet]. 2015 [cited 2024 Mar 18];30:248–57. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26562631/>
57. Todorović V, Marković D, Milošević-Jovčić N, Petakov M, Balint B, Čolić M, et al. Dental pulp stem cells: Potential significance in regenerative medicine. *Stomatol Glas Srb* [Internet]. 2008 [cited 2024 Mar 18];55(3):170–9. Available from: <https://doiserbia.nb.rs/Article.aspx?id=0039-17430803170T>
58. Feng X, Xing J, Feng G, Sang A, Shen B, Xu Y, et al. Age-dependent impaired neurogenic differentiation capacity of dental stem cell is associated with Wnt/ β -catenin signaling. *Cell Mol Neurobiol* [Internet]. 2013 Nov 1 [cited 2024 Jun 11];33(8):1023–31. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24043508/>
59. Yi Q, Liu O, Yan F, Lin X, Diao S, Wang L, et al. Analysis of Senescence-Related Differentiation Potentials and Gene Expression Profiles in Human Dental Pulp Stem Cells. *Cells Tissues Organs* [Internet]. 2017 Jan 1 [cited 2024 Jun 11];203(1):1–11. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27627434/>
60. Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahimi J, et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *The Lancet*. 2004 Jul 10;364(9429):149–55.

61. Abedian Z, Jenabian N, Moghadamnia AA, Zabihi E, Pourbagher R, Hossein-Nataj H, et al. A comparative study on immunophenotypic characterization and osteogenic differentiation of human mesenchymal stromal cells derived from periodontal ligament and gingiva. *J Periodontol* [Internet]. 2020 Sep 1 [cited 2024 Jun 11];91(9):1194–202. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31960428/>
62. Eleuterio E, Trubiani O, Sulpizio M, Di Giuseppe F, Pierdomenico L, Marchisio M, et al. Proteome of Human Stem Cells from Periodontal Ligament and Dental Pulp. *PLoS One* [Internet]. 2013 Aug 5 [cited 2024 Jun 11];8(8). Available from: </pmc/articles/PMC3733711/>
63. Trubiani O, Pizzicannella J, Caputi S, Marchisio M, Mazzon E, Paganelli R, et al. Periodontal Ligament Stem Cells: Current Knowledge and Future Perspectives. *Stem Cells Dev* [Internet]. 2019 Aug 1 [cited 2024 Jun 11];28(15):995–1003. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31017047/>
64. Lee YC, Chan YH, Hsieh SC, Lew WZ, Feng SW. Comparing the Osteogenic Potentials and Bone Regeneration Capacities of Bone Marrow and Dental Pulp Mesenchymal Stem Cells in a Rabbit Calvarial Bone Defect Model. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2019 Oct 2 [cited 2024 Jun 13];20(20). Available from: </pmc/articles/PMC6834129/>
65. Oryan A, Kamali A, Moshirib A, Eslaminejad MB. Role of Mesenchymal Stem Cells in Bone Regenerative Medicine: What Is the Evidence? *Cells Tissues Organs* [Internet]. 2017 Aug 1 [cited 2024 Jun 13];204(2):59–83. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28647733/>
66. Tahara Y, Sekino T, Okazaki J, Carrasco GC, Dong X, Xu X. Bioceramics in Endodontics: Updates and Future Perspectives. *Bioengineering* 2023, Vol 10, Page 354 [Internet]. 2023 Mar 13 [cited 2024 Sep 26];10(3):354. Available from: <https://www.mdpi.com/2306-5354/10/3/354/htm>
67. Krishnan V, Lakshmi T. Bioglass: A novel biocompatible innovation. *J Adv Pharm Technol Res* [Internet]. 2013 [cited 2024 Sep 26];4(2):78. Available from: </pmc/articles/PMC3696226/>
68. Wang Z. Bioceramic materials in endodontics. *Endod Topics* [Internet]. 2015 May 1 [cited 2024 Sep 26];32(1):3–30. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/etp.12075>
69. Han L, Kodama S, Okiji T. Evaluation of calcium-releasing and apatite-forming abilities of fast-setting calcium silicate-based endodontic materials. *Int Endod J* [Internet]. 2015 Feb 1 [cited 2024 Sep 26];48(2):124–30. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24702182/>
70. Prati C, Gandolfi MG. Calcium silicate bioactive cements: Biological perspectives and clinical applications. *Dent Mater* [Internet]. 2015 Apr 1 [cited 2024 Sep 26];31(4):351–70. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25662204/>
71. Torabinejad M, Parirokh M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review--part II: leakage and biocompatibility investigations. *J Endod* [Internet]. 2010 Feb [cited 2024 Sep 26];36(2):190–202. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20113774/>

72. Martin RL, Monticelli F, Brackett WW, Loushine RJ, Rockman RA, Ferrari M, et al. Sealing properties of mineral trioxide aggregate orthograde apical plugs and root fillings in an in vitro apexification model. *J Endod* [Internet]. 2007 Mar [cited 2024 Sep 26];33(3):272–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17320712/>
73. Endodontics - A New Day Has Dawned Drs. Kenneth Koch and Dennis Brave - Dentaltown [Internet]. [cited 2024 Sep 26]. Available from: <https://www.dentaltown.com/magazine/articles/1990/endodontics-a-new-day-has-dawned>
74. Raghavendra SS, Jadhav GR, Gathani KM, Kotadia P. Bioceramics in endodontics – a review. *J Istamb Univ Fac Dent* [Internet]. 2017 Nov 17 [cited 2024 Aug 27];51(3 Suppl 1):S128. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35750835/>
75. Parioikh M, Torabinejad M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review--Part I: chemical, physical, and antibacterial properties. *J Endod* [Internet]. 2010 Jan [cited 2024 Jun 13];36(1):16–27. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20003930/>
76. Torabinejad M, Chivian N. Clinical applications of mineral trioxide aggregate. *J Endod* [Internet]. 1999 [cited 2024 Jun 13];25(3):197–205. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10321187/>
77. Ferris DM, Baumgartner JC. Perforation repair comparing two types of mineral trioxide aggregate. *J Endod* [Internet]. 2004 [cited 2024 Sep 28];30(6):422–4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15167471/>
78. Islam I, Chng HK, Yap AUJ. X-ray diffraction analysis of mineral trioxide aggregate and Portland cement. *Int Endod J* [Internet]. 2006 Mar [cited 2024 Sep 28];39(3):220–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16507076/>
79. Camilleri J, Pitt Ford TR. Mineral trioxide aggregate: a review of the constituents and biological properties of the material. *Int Endod J* [Internet]. 2006 Oct [cited 2024 Jun 13];39(10):747–54. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16948659/>
80. Skibsted J, Hall C. Characterization of cement minerals, cements and their reaction products at the atomic and nano scale. *Cem Concr Res*. 2008 Feb 1;38(2):205–25.
81. Torabinejad M, Hong CU, McDonald F, Pitt Ford TR. Physical and chemical properties of a new root-end filling material. *J Endod* [Internet]. 1995 [cited 2023 May 7];21(7):349–53. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7499973/>
82. Torabinejad M, Hong CU, Pitt Ford TR, Kettering JD. Cytotoxicity of four root end filling materials. *J Endod* [Internet]. 1995 [cited 2023 May 7];21(10):489–92. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8596067/>
83. Islam I, Kheng Chng H, Jin Yap AU. Comparison of the physical and mechanical properties of MTA and portland cement. *J Endod* [Internet]. 2006 Mar [cited 2023 May 7];32(3):193–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16500224/>
84. Holland R, De Souza V, Nery MJ, Otoboni Filho JA, Bernabé PFE, Dezan E. Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tubes filled with mineral trioxide aggregate or calcium hydroxide. *J Endod* [Internet]. 1999 [cited 2023 May 7];25(3):161–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10321179/>

85. Sarkar NK, Caicedo R, Ritwik P, Moiseyeva R, Kawashima I. Physicochemical basis of the biologic properties of mineral trioxide aggregate. *J Endod* [Internet]. 2005 [cited 2023 May 7];31(2):97–100. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15671817/>
86. Mitchell PJC, Pitt Ford TR, Torabinejad M, McDonald F. Osteoblast biocompatibility of mineral trioxide aggregate. *Biomaterials* [Internet]. 1999 Jan [cited 2023 May 7];20(2):167–73. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10022786/>
87. Parirokh M, Torabinejad M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review--Part III: Clinical applications, drawbacks, and mechanism of action. *J Endod* [Internet]. 2010 Mar [cited 2023 May 7];36(3):400–13. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20171353/>
88. Bogen G, Kuttler S. Mineral trioxide aggregate obturation: a review and case series. *J Endod* [Internet]. 2009 Jun [cited 2023 May 7];35(6):777–90. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19482173/>
89. Camilleri J, Montesin FE, Di Silvio L, Pitt Ford TR. The chemical constitution and biocompatibility of accelerated Portland cement for endodontic use. *Int Endod J* [Internet]. 2005 Nov [cited 2023 May 7];38(11):834–42. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16218977/>
90. Rodríguez-Lozano FJ, Lozano A, López-García S, García-Bernal D, Sanz JL, Guerrero-Gironés J, et al. Biomineralization potential and biological properties of a new tantalum oxide (Ta₂O₅)–containing calcium silicate cement. *Clin Oral Investig* [Internet]. 2022 Feb 1 [cited 2024 Sep 2];26(2):1427–41. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00784-021-04117-x>
91. 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* [Internet]. 2018 Feb 1 [cited 2024 Apr 15];51(2):177–205. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28836288/>
92. NeoMTA 2 [Internet]. [cited 2024 Sep 10]. Available from: <https://www.avalonbiomed.com/products/neomta-2>
93. Persson C, Engqvist H. Premixed calcium silicate cement for endodontic applications: injectability, setting time and radiopacity. *Biomater* [Internet]. 2011 [cited 2024 Mar 11];1(1):76–80. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23507729/>
94. NuSmile NeoPutty [Internet]. [cited 2024 Sep 2]. Available from: <https://nusmile.com/pages/neoputty>
95. Kaup M, Schäfer E, Dammaschke T. An in vitro study of different material properties of Biodentine compared to ProRoot MTA. *Head Face Med* [Internet]. 2015 May 2 [cited 2024 Jan 8];11(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25934270/>
96. Camilleri J. Investigation of Biodentine as dentine replacement material. *J Dent* [Internet]. 2013 Jul [cited 2024 Jan 8];41(7):600–10. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23685034/>

97. Camilleri J, Sorrentino F, Damidot D. Investigation of the hydration and bioactivity of radiopacified tricalcium silicate cement, Biodentine and MTA Angelus. *Dent Mater* [Internet]. 2013 May [cited 2023 May 7];29(5):580–93. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23537569/>
98. Priyalakshmi S., Ranjan M. Review on Biodentine-A Bioactive Dentin Substitute. *IOSR Journal of Dental and Medical Sciences (IOSR-JDMS)* e-ISSN [Internet]. 2014 [cited 2023 May 7];13(1):13–7. Available from: www.iosrjournals.org
99. Corral Nuñez CM, Bosomworth HJ, Field C, Whitworth JM, Valentine RA. Biodentine and mineral trioxide aggregate induce similar cellular responses in a fibroblast cell line. *J Endod*. 2014 Mar;40(3):406–11.
100. María Escobar-García D, Aguirre-López E, Méndez-González V, Pozos-Guillén A. Cytotoxicity and Initial Biocompatibility of Endodontic Biomaterials (MTA and Biodentine) Used as Root-End Filling Materials. 2016 [cited 2024 Sep 23]; Available from: <http://dx.doi.org/10.1155/2016/7926961>
101. Manaspon C, Jongwannasiri C, Chumprasert S, Sa-Ard-Iam N, Mahanonda R, Pavasant P, et al. Human dental pulp stem cell responses to different dental pulp capping materials. *BMC Oral Health* [Internet]. 2021 Dec 1 [cited 2024 Sep 23];21(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33902558/>
102. 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* [Internet]. 2014 [cited 2023 May 7];42(4):490–7.
103. Guimarães BM, Vivan RR, Piazza B, Alcalde MP, Bramante CM, Duarte MAH. Chemical-physical Properties and Apatite-forming Ability of Mineral Trioxide Aggregate Flow. *J Endod* [Internet]. 2017 Oct 1 [cited 2024 Jun 4];43(10):1692–6.
104. Mondelli JAS, Hoshino RA, Weckwerth PH, Cerri PS, Leonardo RT, Guerreiro-Tanomaru JM, et al. Biocompatibility of mineral trioxide aggregate flow and biodentine. *Int Endod J* [Internet]. 2019 Feb 1 [cited 2024 Jun 5];52(2):193–200. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30035812/>
105. Sravya V, Deepa VL, Lalitha PL, Komandla DR, Bollu IP, Dalavai P. Role of phosphate-buffered saline on push-out bond strength of MTA Flow™ and Biodentine™ after acid challenge: An in vitro study. *J Conserv Dent* [Internet]. 2022 May 1 [cited 2024 Jun 5];25(3):264–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35836567/>
106. Moharamzadeh K, Brooki IM, Van Noort R. Biocompatibility of Resin-based Dental Materials. *Materials*. 2009 ;2(2):514.
107. Yıldırım ZS, Pınar Bakır E, Bakır Ş, Aydın S. Diş hekimliğinde biyouyumluluk ve değerlendirme yöntemleri. *Selcuk Dent J*, 2017; 4: 162-169.
108. Freshney Rian. *Culture of animal cells : a manual of basic technique*. 2005;642.
109. Tuncer S, Demirci M. Dental Materyallerde Biyouyumluluk Değerlendirmeleri. *Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi*. 2011 Feb 1 ;2011(2):141–9.
110. ISO 10993-5:2009- Biological evaluation of medical devices — Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity [Internet]. [cited 2024 Jul 25].

- 111.SCHWARTZMAN RA, CIDLOWSKI JA. Apoptosis: the biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *Endocr Rev* [Internet]. 1993 Apr ;14(2):133–51.
- 112.Kerr JFR. History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept. *Toxicology*. 2002 Dec 27;181–182:471–4.
- 113.Compton MM, Cidlowski JA. Rapid in vivo effects of glucocorticoids on the integrity of rat lymphocyte genomic deoxyribonucleic acid. *Endocrinology*. 1986 Oct ;118(1):38–45.
- 114.Golstein P. Controlling cell death. *Science*. 1997 Feb 2;275(5303):1081–2.
- 115.Krysko D V., Vanden Berghe T, D’Herde K, Vandenabeele P. Apoptosis and necrosis: Detection, discrimination and phagocytosis. *Methods*. 2008 Mar;44(3):205–21.
- 116.Loo DT, Rillema JR. Measurement of cell death. *Methods Cell Biol*. 1998;57(57):251–64.
- 117.Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochemical Journal*. 1997 Aug 8;326(Pt 1):1.
- 118.Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature*. 1998 Jan 1;391(6662):43–50.
- 119.Israels LG, Israels ED. Apoptosis. *Stem Cells*. 1999;17(5):306–13.
- 120.Renehan AG, Booth C, Potten CS. What is apoptosis, and why is it important? *BMJ : British Medical Journal* [Internet]. 2001 Jun ;322(7301):1536.
- 121.Chao DT, Korsmeyer SJ. BCL-2 family: regulators of cell death. *Annu Rev Immunol*. 1998;16:395–419.
- 122.Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, et al. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med* . 2006 Apr;27(2–3):95–125.
- 123.Orazizadeh M, Khodadadi A, Bayati V, Saremy S, Farasat M, Khorsandi L. In Vitro Toxic Effects of Zinc Oxide Nanoparticles on Rat Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Cell J*. 2015; 17(3):412–21.
- 124.Schmalz G. Use of cell cultures for toxicity testing of dental materials—advantages and limitations. *J Dent*. 1994 Jan 1;22(SUPPL. 2):S6–11.
- 125.Schmalz G, Arenholt-Bindslev D. Biocompatibility of dental materials. *Biocompatibility of Dental Materials*. 2009;1–12.
- 126.Wang Y, Zhou Y, Jin L, Pang X, Lu Y, Wang Z, et al. Mineral trioxide aggregate enhances the osteogenic capacity of periodontal ligament stem cells via NF- κ B and MAPK signaling pathways. *J Cell Physiol* [Internet]. 2018 Mar 1;233(3):2386–97.
- 127.Panduwawala CP, Zhan X, Dissanayaka WL, Samaranayake LP, Jin L, Zhang C. In vivo periodontal tissue regeneration by periodontal ligament stem cells and endothelial cells in three-dimensional cell sheet constructs. *J Periodontal Res*. 2017 Jun 1;52(3):408–18.

- 128.Aka A, Matsuura T, Yoshimura A. An Evaluation of the Cytocompatibility of Endodontic Bioceramics in Human Periodontal-Ligament-Derived Cells. *J Funct Biomater*. 2024 Aug 19;15(8):231.
- 129.Samyuktha V, Ravikumar P, Nagesh B, Ranganathan K, Jayaprakash T, Sayesh V. Cytotoxicity evaluation of root repair materials in human-cultured periodontal ligament fibroblasts. *J Conserv Dent*. 2014 Sep;17(5):467–70.
- 130.Jönsson D, Nebel D, Bratthall G, Nilsson BO. The human periodontal ligament cell: a fibroblast-like cell acting as an immune cell. *J Periodontal Res* [Internet]. 2011 Apr [cited 2024 Aug 22];46(2):153–7.
- 131.Maslennikov S, Golovakha ML. The most commonly used cell surface markers for determining mesenchymal stromal cells in stromal vascular fraction and bone marrow autologous concentrate: a systematic review. Article in *Journal of Biotech Research*. 2023, 14:85-94.
- 132.Kawanabe N, Murata S, Murakami K, Ishihara Y, Hayano S, Kurosaka H, et al. Isolation of multipotent stem cells in human periodontal ligament using stage-specific embryonic antigen-4. *Differentiation*. 2010 Feb;79(2):74–83.
- 133.Javier Rodríguez-Lozano F, López-García S, García-Bernal D, Sanz JL, Lozano & A, Pecci-Lloret MP, et al. Cytocompatibility and bioactive properties of the new dual-curing resin-modified calcium silicate-based material for vital pulp therapy. *Clin Oral Investig*. 2021 Aug;25(8):5009-5024.
- 134.Widbiller M, Lindner & SR, Buchalla & W, Eidt & A, Hiller KA, Schmalz G, et al. Three-dimensional culture of dental pulp stem cells in direct contact to tricalcium silicate cements. *Clin Oral Investig*. 2016 Mar;20(2):237-46.
- 135.Hussar P. Apoptosis Regulators Bcl-2 and Caspase-3. *Encyclopedia* 2022, Vol 2, Pages 1624-1636. 2022 Sep 21;2(4):1624–36.
- 136.Marsden VS, O'Connor L, O'Reilly LA, Silke J, Metcalf D, Ekert PG, et al. Apoptosis initiated by Bcl-2-regulated caspase activation independently of the cytochrome c/Apaf-1/caspase-9 apoptosome. *Nature* 2002 419:6907. 2002 Sep 25;419(6907):634–7.
- 137.Fesik SW, Shi Y. Structural biology. Controlling the caspases. *Science*. 2001 Nov 16;294(5546):1477–8.
- 138.Huang Y, Rich RL, Myszka DG, Wu H. Requirement of both the second and third BIR domains for the relief of X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP)-mediated caspase inhibition by Smac. *J Biol Chem*. 2003 Dec 5;278(49):49517–22.
- 139.Rajendran DrM, M DrJ, K DrP. Biodentine: Periodontal perspective. *International Journal of Applied Dental Sciences*. 2017;3(1):12–6.
- 140.Saber SM, Gomaa SM, Elashiry MM, El-Banna A, Schäfer E. Comparative biological properties of resin-free and resin-based calcium silicate-based endodontic repair materials on human periodontal ligament stem cells. *Clin Oral Investig*. 2023 Nov 1;27(11):6757–68.
- 141.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 Apr 1;42(4):490–7.

142. Abuarqoub D, Aslam N, Jafar H, Harfil ZA, Awidi A. dentistry journal Biocompatibility of Biodentine™ ® with Periodontal Ligament Stem Cells: In Vitro Study. *Dent J* 2020. Feb 8;8(1):17.
143. Camilleri J, Kralj P, Veber M, Sinagra E. Characterization and analyses of acid-extractable and leached trace elements in dental cements. *Int Endod J*. 2012 Aug;45(8):737–43.
144. Jang YE, Lee BN, Koh JT, Park YJ, Joo NE, Chang HS, et al. Cytotoxicity and physical properties of tricalcium silicate-based endodontic materials. *Restor Dent Endod*. 2014;39(2):89.
145. Birant S, Gokalp M, Duran Y, Koruyucu M, Akkoc T, Seymen F. Cytotoxicity of NeoMTA Plus, ProRoot MTA and Biodentine on human dental pulp stem cells. *J Dent Sci* 2021 Jul 1;16(3):971–9.
146. Endo-Eze™ MTAFlow™ White-Mineral Trioksit Agregat Tamir Simani [Internet]. [cited 2024 Sep 3]. Available from: <https://www.ultradent.com.tr/products/categories/endodontics/mta-repair/mta-flow-white?sku=5980->
147. Tsai CL, Ke MC, Chen YH, Kuo HK, Yu HJ, Chen CT, et al. Mineral trioxide aggregate affects cell viability and induces apoptosis of stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *BMC Pharmacol Toxicol*. 2018 May 15;19(1).
148. Appl J, 481 OS, Agrafioti A, Taraslia V, Chrepa V, Lymperi S, et al. Interaction of dental pulp stem cells with Biodentine and MTA after exposure to different environments. *J Appl Oral Sci*. 2016 Sep-Oct;24(5):481-486
149. Gandolfi MG, Ciapetti G, Taddei P, Perut F, Tinti A, Cardoso MV, et al. Apatite formation on bioactive calcium-silicate cements for dentistry affects surface topography and human marrow stromal cells proliferation. *Dent Mater* 2010 ;26(10):974–92.
150. Cimpan MR, Cressey LI, Skaug N, Halstensen A, Lie SA, Gjertsen BT, et al. Patterns of cell death induced by eluates from denture base acrylic resins in U-937 human monoblastoid cells. *Eur J Oral Sci*. 2000;108(1):59–69.

EKLER

EK-1 ETİK KURUL ONAYI

T.C.
AFYONKARAHİSAR SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARARLARI

Toplantı Tarihi	07.04.2023	Toplantı Numarası	2023/4	Toplantı Saati	09:00	Etik Kurul Kodu 2011-KAEK-2
221- Dr. Öğr. Üyesi Özgür DOĞAN'ın sorumluluğunda yürütülecek olan “Biyoseramik İçerikli Kök Kanal Tamir Materyallerinin Periodontal Ligament Hücreleri Üzerine Sitotoksik Etkilerinin Karşılaştırılması” konulu Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar için başvuru dosyası incelendi. Araştırma protokolüne uyularak, Sağlık Bakanlığı'nın 13.04.2013 tarih 28617 sayılı Klinik Araştırmalar Hakkındaki Yönetmeliği ve yayımlanan kılavuzlarında belirtilen hususlar dikkate alınarak, sorumluluk araştırmacılara ait olmak üzere araştırmanın yapılmasında etik sakınca olmadığına toplantıya katılan üyelerin oy birliği ile karar verildi.						

EK-2 BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

ARAŞTIRMA AMAÇLI ÇALIŞMA İÇİN AYDINLATILMIŞ ONAM FORMU

Sayın Katılımcı,

Bu araştırma, Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Çocuk Diş Hekimliği Ana Bilim Dalı uzmanlık öğrencisi Melikşah URAL'ın uzmanlık tezi kapsamında Dr. Öğretim Üyesi Özgür DOĞAN danışmanlığında yürütülecek olan bilimsel bir çalışmadır. Bu çalışmada yer almayı kabul etmeden önce, araştırmanın ne amaçla yapılmak istendiğini anlamanız ve kararınızı bu bilgilendirme çerçevesinde özgürce vermeniz gerekmektedir.

Aşağıdaki bilgileri lütfen dikkatlice okuyunuz, sorularınız olursa sorunuz ve açık yanıtlar isteyiniz.

Bu uzmanlık tez çalışmasında, yeni ve güncel kanal tamir materyallerinin Periodontal Ligament kök hücreleri üzerinde; canlılık değerlerinin analiz edildiği, sitotoksisite ve biyoyumumluluklarının karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Bu çalışmada, periodontal kök hücre kaynağı olarak 1.Küçük azı dişleri kullanılacaktır. Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi'ne dişi/dişlerinin çekimi için başvuran hastaların gönüllülüğü esas alınarak çekilen dişleri toplanacak ve bu çalışmada kullanılacaktır. Bu çalışma kapsamında, toplanan dişler uygun saklama koşullarında saklanarak kök hücre kaynağı olarak kullanılacaktır. Bu araştırma için gönüllü olan hastalardan 1.Küçük azı dişleri haricinde herhangi bir veri isteginde bulunulmayacaktır.

Araştırmaya dahil olan gönüllülerin, çekilmiş dişleri kullanılacağından gönüllü için herhangi bir risk söz konusu değildir, atık materyal olarak geçmektedir. Gönüllüler, araştırmaya katılmayı kabul etmemeleri ya da araştırmadan ayrılmaları durumunda herhangi bir olumsuz sonuçla karşı karşıya kalmayacaklardır. "Bu araştırmada yer almak tümüyle sizin isteginize bağlıdır. Araştırmada yer almayı reddedebilirsiniz ya da başladıktan sonra yarıda bırakabilirsiniz. Bu araştırmanın sonuçları bilimsel amaçlarla kullanılacaktır. Sizden elde edilen tüm bilgiler gizli tutulacak, araştırma yayınlandığında da varsa kimlik bilgilerinizin gizliliği korunacaktır."

☐ 'Yukarıda yer alan ve araştırmaya başlanmadan önce gönüllülere verilmesi gereken bilgileri içeren metni okudum ve sözlü olarak dinledim. Eksik kaldığını düşündüğüm konularda sorularımı araştırmacılara sordum ve doyurucu yanıtlar aldım.'

☐ 'Yazılı ve sözlü olarak tarafıma sunulan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anladığımı kanımsındayım. Çalışmaya katılmayı isteyip istemediğim konusunda karar vermem için yeterince zaman tanındı.'

'Bu koşullar altında, araştırma kapsamında elde edilen şahsıma ait çekilmiş dişin/dişlerin bilimsel amaçlarla kullanılmasını, gizlilik kurallarına uyulmak kaydıyla sunulmasını ve üzerinde çalışılarak sonuçların yayınlanmasını, hiçbir baskı ve zorlama altında kalmaksızın, kendi özgür irademle kabul ettiğimi beyan ederim.

Gönüllü (Hasta Velisi)

Araştırmacı

İmza

İmza

EK 3. İNTİHAL RAPORU

BİYOSERAMİK İÇERİKLİ KÖK KANAL TAMİR MATERYALLERİNİN PERİODONTAL LİGAMENT HÜCRELERİ ÜZERİNE SİTOTOKSİK ETKİSİ

ORIGINALITY REPORT

12%

SIMILARITY INDEX

PRIMARY SOURCES