T. C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FARKLI KÖK UCU DOLGU VE PERFORASYON TAMİR MATERYALLERİNİN PERİODONTAL LİGAMENT FİBROBLASTLARININ PROLİFERASYONU, ADEZYONU VE MORFOLOJİSİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİ

Dt. Makbule Bilge AKBULUT

DOKTORA TEZİ

ENDODONTİ ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Ayçe ÜNVERDİ ELDENİZ

KONYA-2014

T. C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FARKLI KÖK UCU DOLGU VE PERFORASYON TAMİR MATERYALLERİNİN PERİODONTAL LİGAMENT FİBROBLASTLARININ PROLİFERASYONU, ADEZYONU VE MORFOLOJİSİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİ

Dt. Makbule Bilge AKBULUT

DOKTORA TEZİ

ENDODONTİ ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Ayçe ÜNVERDİ ELDENİZ

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 12202016 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA-2014

ÖNSÖZ

Hayatımın her anında sonsuz sevgi ve destekleri ile yanımda olan aileme,

Doktora öğrenimim boyunca bilgi ve deneyimlerini benden hiçbir zaman esirgemeyen, bilimsel araştırmalar konusunda beni her zaman teşvik eden, bana karşı her konuda anlayış gösteren ve her zaman yol gösterici olan doktora danışmanım Prof. Dr. Ayçe ÜNVERDİ ELDENİZ'e,

Doktora tezim boyunca yardımlarını benden hiç esirgemeyen, tezim için değerli vaktini ayıran ve laboratuar koşullarını sağlayan Dr. Pembegül UYAR'a,

Doktoram süresince kendilerinden çok şey öğrendiğim, bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım Endodonti Anabilim Dalı'ndaki değerli hocalarım Prof. Dr. Sema BELLİ'ye, Prof. Dr. Hale ARI AYDINBELGE'ye, Prof. Dr. Funda KONT ÇOBANKARA'ya ve Doç. Dr. Erhan ÖZCAN'a,

Tezimin ve diğer çalışmalarımızın istatistik analizlerinin yapılmasında ve yorumlanmasında katkısı olan Doç Dr. Serhan AKMAN'a,

Projemizi desteklediği için Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeleri Koordinatörlüğü'ne,

Tezim için çalışma olanaklarını sağlayan Selçuk Üniversitesi İleri Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi'ne,

Tezimin laboratuar aşamalarında katkısı bulunan yüksek lisans öğrencisi Deniz ÖZKAYA (Selçuk Üniversitesi), Uzman Fatih ÖZCAN (Selçuk Üniversitesi) ve Uzman Serhat TIKIZ'a (Afyon Kocatepe Üniversitesi),

Endodonti bölümündeki sevgili asistan arkadaşlarıma ve dostlarıma,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

SİMGELER VE KISALTMALAR

1.GİRİŞ 1

1.1. Endodontik Cerrahi 1

1.1.1. Perforasyon Tamiri.....3

1.1.2. Kök Ucu Cerrrahisi 4

1.1.3. Endodontik Cerrahi Aşamaları ve Retrograd Dolgu Materyalleri 5

1.2. Periodontal Ligament Dokusu ve Periodontal Ligament Fibroblastları 23

1.3. Hücre Canlılık Testleri ve XTT metodu 25

1.4. Hücre Apoptozu ve Flow Sitometri 27

1.5. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) – Enerji Dağılımlı X Işını Analizi (SEM-EDX).....29

2.GEREÇ ve YÖNTEM 31

2.1. Hücre Kültürü.....31

2.1.1. Hücre Sayımı ..... .32

2.2. Materyal Örneklerinin Hazırlanması.....33

2.3. Materyal Eluatlarının Hazırlanması ve İndirek Sitotoksisite Testi 38

2.3.1. Materyal Eluatlarının Hazırlanması 38

2.3.2. İndirek Sitotoksisite Testi için Hücrelerin Hazırlanması 41

2.3.3. XTT Çalışma Solüsyonunun Hazırlanması..... .43

2.3.4. XTT Analizi 44

2.4. Flow Sitometri Analizi 45

2.5. SEM ve SEM-EDX ANALİZİ 51

2.6. Verilerin İstatistiksel Analizi.....55

3.BULGULAR 56

3.1. Materyallerin Farklı Konsantrasyondaki Eluatlarına Maruz Bırakılan PDL Hücrelerinin Morfoloji Değerlendirmesine Ait Bulgular 56

3.2. Farklı Materyallerin Eluatlarının, Eluatların Farklı Konsantrasyonlarının ve Materyallerin Farklı Sertleşme Sürelerinin PDL Hücrelerine Olan Sitotoksik Etkilerinin Kıyaslanmasına Ait Bulgular 65

3.3. Her bir Materyal Deney Grubunun Kendi İçinde Eluat Konsantrasyonlarının ve Sertleşme Sürelerinin PDL Hücrelerine Olan Sitotoksik Etkilerinin Kıyaslanmasına Ait Bulgular 67

3.4. Farklı Materyallerin Eluatlarının 1:8'lik Konsantrasyonlarının PDL Hücreleri Üzerindeki Apoptotik/Nekrotik Etkilerinin Kıyaslanmasına Ait Bulgular (Flow Sitometri Bulguları).....72

3.5. Farklı Materyal Örneklerinin Seyreltilmemiş Eluatlarının pH Değerlerinin Kıyaslanmasına Ait Bulgular 74

3.6. SEM Analizi Bulguları 75

3.7. SEM-EDX Analizi Bulguları 84

4.TARTIŞMA 93

5.SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....116

6.ÖZET.....118

7.SUMMARY 119

8.KAYNAKLAR 120

9.EK: ETİK KURUL KARARI 135

10.ÖZGEÇMİŞ 136

SİMGELER ve KISALTMALAR

An-V : Annexin V

BİS-GMA : Bisfenol Glisidil Metakrilat

°C : Derece santigrad

cc : Santimetreküp

CO_2 : Karbondioksit

CEM : Calcium Enriched Mixture

cm : Santimetre

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DNA : Deoksiribonükleik asit

EDX : Enerji dağılımlı X ışını analizi

ERRM : Endosequence kök tamir materyali

FBS : Fetal Bovine Serum

HBSS : Hanks Balanced Salt Solution

HEMA : Hidroksietilmetakrilat

IRM : Intermediate Restorative Material

ISO : International Organization for Standardization

kV : Kilo Volt

LED : Light Emitting Diode

mg : Miligram

µm : Mikrometre

ml : Mililitre

mm : Milimetre

mW : Miliwatt

MM-MTA : Micro Mega Mineral Trioksit Agregat

MTA : Mineral Trioksit Agregat

MTT : difenil tetrazolyum bromid

nm	: Nanometre
NRC	: New Resin Cement
PBS	: Phosphate Buffered Saline (fosfat tamponlanmış çözelti)
PDL	: Periodontal ligament fibroblast hücresi
pH	: Hidrojen gücü (power of Hydogen)
PMMA	: Poli Metil Metakrilat
PMTA	: ProRoot MTA
PMS	: Fenazin metasülfat
RPM	: Dakikadaki devir sayısı (Revolutions Per Minute)
SDR	: Smart Dentine Replacement
SEM	: Scanning Electron Microscopy (taramalı elektron mikroskobu)
SPSS	: Statistical Package for the Social Sciences
Süper-EBA	: Süper Etoksi Benzoik Asit
TEGDMA	: Trietilenglikol Dimetakrilat
TTCP	: Tetrakalsiyum fosfat
UDMA	: Üretan Dimetakrilat
XTT	:2,3-bis(2-metoksi-4-nitro-5-sülfofenil)-2H-tetrazolyum-5-karboksanilid
4-META	: 4-methacryloxyethyl trimellitate anhydride
L929	: Fare fibroblast hücre hattı
MG63	: Osteosarkom hücre hattı
3T3	: Fare embriyonik fibroblast hücre hattı
7AAD	: 7-aminoactinomycin

1.GİRİŞ

Mikroorganizmalar ve ürünleri pulpal ve periapikal hastalıklarda önemli rol oynamaktadır (Kakeashi ve ark 1966, Sundqvist ve ark 1998). Apikal periodontitis gibi major periapikal hastalıkları engellemek için kök kanal sistemindeki bakteriler elimine edilmelidir. Periradiküler dokuların mikroorganizmalar tarafından kontaminasyonu iyileşmeyi güçleştirir (Nair 2004).

Endodontik tedavinin amacı pulpa boşluğunu ve kök kanallarını dezenfekte etmek (mikrobiyal yükü azaltmak ve nekrotik dokuyu uzaklaştırmak) ve yeniden kontaminasyonu engellemek amacıyla pulpa boşluğunu ve kök kanallarını doldurmaktır. Hastalıklı pulpayı tedavi etmek amacıyla ortograd kök kanal tedavisi öncelikli olarak tercih edilmesi gereken bir yaklaşım olmalıdır. Primer ortograd kök kanal tedavisinin başarı oranı %47-97 olarak rapor edilmiştir (Friedman 2008). Ortograd kök kanal tedavisinin başarısızlığı, tedavi öncesinde periapikal radyolusensi varlığı, yetersiz kök kanal dolguları, radyografik apeksten 2 mm'den daha geride kök kanal dolguları ve kötü koronal restorasyon ile ilişkilendirilmiştir (Ng ve ark 2008). Ortograd kök kanal tedavisinin başarısızlığı durumunda tedavi seçenekleri, kök kanal tedavisinin yenilenmesi (retreatment) ya da endodontik cerrahi olmaktadır (Briggs ve Scott 1997). Pulpa boşluğunun ve kök kanallarının temizlenmesi açısından, kök kanal tedavisinin yenilenmesi cerrahi yaklaşıma nazaran daha etkilidir (Danin ve ark 1996). Fakat bazı klinik durumlarda kök kanal tedavisinin yenilenmesi mümkün olamamakta ve endodontik cerrahi uygulamaları zorunlu hale gelmektedir.

1.1. Endodontik Cerrahi

Endodontik cerrahi, ortograd kök kanal tedavisine dirençli periradiküler enflamasyonu çözmek amacıyla ya da kök kanal tedavisinin yenilenmesi gibi bir seçenek olmadığında yapılmaktadır (Kim ve Kratchman 2006). Endodontik cerrahinin amacı, periapikal patolojiyi uzaklaştırmak, diş ve periodonsiyumun sağlık ve fonksiyonunu idame ettirmektir (Morrow ve Rubenstein 2002).

Endodontik cerrahinin genel endikasyonları şunlardır (El-Swiah ve Walker 1996):

1) İyatrojenik ya da gelişimsel anomalilerin kök kanal tedavisinin yenilenmesini engellediği durumlarla ilişkili periradiküler hastalık varlığında,

2) Periradiküler hastalıklı kök kanal dolgulu dişlerde kök kanal dolgusunun yenilenmesi başarısız olduğunda ya da dişin retansiyonunun olumsuz etkileneceği durumlarda (tıkalı kök kanalları, konvansiyonel girişin alttaki kor yapısını tehlikeye attığı ful kron restorasyonlu dişler, uzaklaştırılması esnasında kök fraktürüne sebep olabilecek post varlığı gibi durumlar),
3) Periradiküler dokuların biyopsisi gerekli olduğunda,
4) Perforasyon ya da kök fraktüründen şüphelenildiğinde periradiküler dokuların görülmesi gerektiği durumlarda,
5) Hastanın kök kanal tedavisinin yenilenmesini istemediği durumlarda endodontik cerrahi yapılmaktadır.

Endodontik cerrahinin az sayıda kesin kontrendikasyonu bulunmaktadır. Endodontik cerrahi planlarken aşağıdaki durumların kontrendikasyon teşkil edebileceği göz önünde bulundurulmalıdır;

1) Hastanın medikal durumu (sistemik hastalıkları ve psikolojik durumu)
2) Dişsel ve anatomik faktörler
   * Olağandışı kemik ya da kök konfigürasyonları
   * Cerrahi giriş sağlanamaması
   * Cerrahi planlanan bölgede nörovasküler yapıların bulunması
   * Dişin restore edilemeyecek durumda olması
   * Destek dokuların oldukça zayıf olması
   * Genel oral hijyenin zayıf olması

3) Hekimin yeteneği, tecrübesi, sahip olduğu olanakları ve ekipmanının yetersiz olması

Endodontik cerrahi kapsamında yapılan işlemler aşağıdaki gibi sıralanabilir;

1) İnsizyon ve drenaj
2) Biyopsi
3) Kök ucu cerrahisi
4) Kök amputasyonu
5) Hemiseksiyon
6) Planlanmış reimplantasyon
7) Perforasyon tamiri

Endodontik cerrahi alanında en sık yapılan işlemlerden ikisi perforasyon tamiri ve kök ucu cerrahisi olarak karşımıza çıkmaktadır.

1.1.1. Perforasyon Tamiri

Kök perforasyonu, patolojik nedenlerle ya da kök kanal tedavisinin herhangi bir aşamasında iyatrojenik nedenlerle ortaya çıkabilen kök kanal sistemi ile dişin destek dokuları ya da oral kavite arasında oluşan yapay bir ilişkidir (Fuss ve Trope 1996). Çürük ya da rezorbsiyon perforasyonlara neden olsa da, çoğu kök perforasyonu iyatrojenik nedenlerle oluşmaktadır. Başarısız olmuş bütün vakaların yaklaşık olarak %10'unun sebebini bir endodontik hata olarak kök perforasyonları oluşturmaktadır (Ingle 1961). Endodontik tedavi süresince ortaya çıkabilen perforasyonlar sıklıkla periodontal ataçman kaybına ve hatta sonunda diş kaybına yol açabilir. İyatrojenik ya da patolojik nedenlerle kök yüzeyinde oluşan defektleri tamir edebilmek için endodontik cerrahi yapılmaktadır.

Mümkün olan durumlarda perforasyon alanını kapatmak için öncelikle ortograd yaklaşım tercih edilmelidir. İdeal bir perforasyon tamir materyali ile o bölge kapatılmalıdır. Enstrümentasyon hatası nedeniyle oluşan perforasyonlar gibi iyi bir görüş açısının ve girişin sağlanabileceği durumlar genelde ortograd yaklaşım ile tedavi edilmektedir. Ancak klinik semptomlar devam ettiğinde, kemik rezorbsiyonu olduğunda ya da geniş perforasyon oluşan vakalarda cerrahi yaklaşıma ihtiyaç duyulmaktadır.

İnternal rezorbsiyon tedavisinde de yine öncelikle ortograd yaklaşımda bulunulmalıdır. Ancak rezorbtif süreç periodontal ligamente uzanacak kadar perforasyona neden olmuşsa kökü tamir edebilmek ve etkili bir kapatma sağlamak için endodontik cerrahiye ihtiyaç duyulmaktadır. Eksternal kök rezorbsiyonunun bazı tiplerinde erken dönemde cerrahi yaklaşımla problem halledilebilmektedir.

Perforasyon tamirinde başarıyı etkileyen önemli faktörler aşağıdaki şekilde belirtilmiştir (Nicholls 1962);

-Perforasyon alanı

-Perforasyonun oluşması ve tamir edilmesi arasında geçen süre

-Kullanılan materyalin perforasyon alanını kapatabilme yeteneği

-Tamir materyalinin biyouyumluluğu

Servikal üçlüde ve pulpa odasının tabanında meydana gelen perforasyonlar, kökün apikal ve orta üçlüsünde meydana gelen perforasyonlara nazaran daha kötü prognoza sahiptirler (Nicholls 1962). Furkal perforasyonların zayıf prognoza sahip olmasının sebebi oral bölgeye yakın olması ve periodontal kayıplara sebebiyet verme potansiyelinin yüksek olmasıdır (Seltzer ve ark 1970). Dişin pulpa odasının tabanının perforasyonu periodontal dokularda hasara sebep olur. Perforasyon alanının oral bölgenin bakteriyel kontaminasyonuna maruz kalması kemik sağlığının bozulması ve diş kaybıyla sonuçlanabilir. Perforasyon alanının gecikmeden kapatıldığı durumlarda daha iyi prognoz izlendiği rapor edilmiştir (Nicholls 1962, Seltzer ve ark 1970).

Perforasyon tamirinin esas amacı enflamatuar süreci durdurmak ve perforasyon alanındaki sağlıklı dokuları koruyarak doku ataçman kaybını engellemektir (Main ve ark 2004). Eğer hâlihazırda lezyon mevcut ise dokunun yeniden ataçmanını sağlamak daha da güçleşecektir. Bu rejeneratif süreci indükleyecek olan uygun materyalin kullanılması perforasyon tamirinde başarılı olunması noktasında önemli rol oynamaktadır.

1.1.2. Kök Ucu Cerrahisi

Kök ucu cerrahisinin amacı, kök kanal tedavisinin yenilenmesiyle çözülemeyen endodontik lezyonlu bir dişin cerrahi müdahale yapılarak ağızda idamesini sağlamaktır (von Arx 2005). Kök ucu cerrahisi; kök ucu rezeksiyonu, kök ucu kavite preparasyonu, kök ucunun retrograd dolgu materyali ile bakteri sızdırmaz bir şekilde kapatılması gibi işlem basamaklarını içermektedir. Ekstraradiküler enfeksiyonun, yabancı cismin ya da kistik dokunun uzaklaştırılabilmesi için apikaldeki patolojik doku tamamen kürete edilmelidir. Uygun bir retrograd dolgu materyali ile kök ucu kapatılmalıdır.

Kök ucu cerrahisinin endikasyonları Avrupa Endodonti Derneği (European Society of Endodontology 2006) tarafından güncellenmiş ve aşağıdaki şekilde belirtilmiştir;

1) Apikal periodontitisi işaret eden radyolojik bulgular ve/veya tıkalı kanalla ilişkili semptomlar (tıkanıklık giderilemiyor ve zarar verme riski oldukça yüksek ise)

2) Apikal periodontitisin klinik ve radyografik bulgularını gösteren taşkın dolgu materyali ve/veya uzun zaman periyodunda devam eden semptomlar
3) Kök kanal tedavisinin yenilenmesinin uygunsuz olduğu durumda, kök kanal tedavisini takiben ısrarcı ve yeniden gelişen hastalık durumları

1.1.3. Endodontik Cerrahi Aşamaları ve Retrograd Dolgu Materyalleri

Yukarıda da bahsettiğimiz gibi endodontik cerrahi alanına ait olan kök ucu cerrahisi ve perforasyon tamiri işlemleri, kök kanal tedavisi başarısız olmuş dişlerin ağızda idamesini sağlamak amacıyla sıklıkla uygulanan cerrahi yöntemlerdendir. Bu cerrahi uygulamalarındaki işlem basamakları şu şekildedir;

1) Preoperatif bakım
2) Anestezi ve hemostaz
3) Yumuşak doku yönetimi
4) Sert doku yönetimi
5) Alanın küretajı
6) Kök rezeksiyonu
7) Retrograd kavite preparasyonu
8) Retrograd dolgu
9) Flabin yerleştirilmesi ve sütur
10) Postoperatif bakım

Retrograd dolgu yerleştirilmesi başarılı bir endodontik cerrahinin önemli aşamalarından bir tanesidir. Retrograd dolgu yerleştirilmesindeki amaç kök kanal sisteminden bakteri penetrasyonunu engellemek için periradiküler alanda sıkı bir kapatma sağlamak, kök kanal sistemi içerisinde bulunan potansiyel irritanların periradiküler dokulara geçişini önlemek ve bu alanda patoloji oluşturmalarının önüne geçmektir (Johnson 1999, Kratchman 2004). Etkili bir kapatma sağlamak ve periradiküler dokuların tamir ve rejenerasyonunu kolaylaştırmak için yerleştirilen kök ucu dolgu ve perforasyon tamir materyalleri kök etrafındaki dokularla uzun bir süre temas halinde kalmaktadır.

İdeal bir kök ucu dolgu ve perforasyon tamir materyali şu özelliklere sahip olmalıdır (Gartner ve Dorn 1992, Kim ve ark 2001, Chong 2004);

-Diş dokusuna adezyon göstermeli ya da bağlantı sağlayabilmeli

-Kök ucunu üç boyutlu olarak kapatabilmeli

-Patojenik mikroorganizmaların gelişimini inhibe etmeli

-Boyutsal olarak stabil olmalı

-Sertleşirken nemden etkilenmemeli

-Periradiküler dokular tarafından iyi tolere edilmeli

-Enflamatuar reaksiyonlara yol açmamalı

-Normal periodonsiyumun rejenerasyonunu stimüle etmeli

-Lokal ve sistemik olarak toksik olmamalı

-Korozyona uğramamalı

-Elektrokimyasal olarak aktif olmamalı

-Diş ya da periradiküler dokularda renklenmeye sebep olmamalı

-Radyograflarda kolayca ayırdedilebilir olmalı

-Raf ömrü uzun olmalı

-Kolay bulunabilmeli ve manipülasyonu kolay olmalı

Diş hekimliği tarihi boyunca retrograd dolgu olarak çok çeşitli materyaller kullanılmıştır. Günümüzde çok fazla sayıda materyale ulaşılabilir olsa da, hiçbir materyal ideal retrograd dolgu materyallerinin bütün özelliklerini taşımamaktadır (Chong ve Pitt Ford 2005).

Amalgam

Amalgam, kolay manipülasyonu, iyi radyoopasitesi ve rezorbe olmaması gibi özelliklerinden dolayı oldukça sık kullanılan retrograd dolgu maddelerinden birisi olmuştur. Amalgam, doku sıvılarında çözünmez ve korozyon ürünlerine bağlı olarak

amalgamın yaşlanması marjinal adaptasyon ve sızdırmazlık özelliklerini geliştirir. Genel olarak yüksek bakırlı çinkosuz amalgamlar tercih edilmektedir. Amalgambondun kullanımı ve amalgam ile birlikte 4-META bonding ajanının kullanılması amalgam retrograd dolguların mikrosızıntısını önemli derecede azaltmıştır (Anderson ve ark 1991). Amalgamın; başlangıç marjinal sızıntısı, korozyon, periapikal dokuların civa kontaminasyonu, bazı amalgam alaşımlarının neme olan hassasiyeti, tutuculuk için andırkatlı preparasyon ihtiyacı, sert ve yumuşak dokuların boyanması gibi dezavantajları vardır (Gartner ve Dorn 1992).

Amalgamın biyolojik etkilerinin üretim şekline ve alaşımın kompoziyonuna bağlı olduğu düşünülmektedir (Espevik ve Mjor 1982). Sitotoksik olarak bilinen çinko, amalgam alaşımlarından salınmaktadır ve amalgamın sitotoksisitesinin asıl sebebi olarak öne sürülmüştür (Espevik ve Mjor 1982). Çinko içeren amalgamlar çinkosuz amalgamlara nazaran daha toksiktir (Kimura 1982).

Yapılan biyouyumluluk çalışmalarında yeni karıştırılan konvansiyonel gümüş amalgamların reaksiyona girmemiş civa dolayısıyla oldukça sitotoksik olduğu ve materyal sertleştikçe sitotoksisitesinin hızlı bir şekilde azaldığı bulunmuştur (Tronstad ve Wennberg 1980). Maher ve ark (1992)'nın yaptığı bir hayvan çalışmasında amalgamın retrograd dolgu olarak uygulanmasını takiben 10-15 hafta içerisinde kronik enflamasyon oluştuğu ve 15 haftadan sonra amalgam kök ucu dolgularının etrafında fibröz bağ dokusu oluştuğu gösterilmiştir.

Yapılan çalışmalar göz önüne alındığında amalgamın erken dönemde zayıf biyouyumluluğa sahip olduğu ve uzun dönemde biyouyumluluğunun geliştiği söylenebilir.

Gutta Perka

Gutta perka konları yaklaşık olarak %19-22 oranında gutta perka, %59-75 oranında çinko oksit, geri kalanında ise mum, renklendirici ajanlar, antioksidanlar, metalik tuzlar gibi ilave maddeler içermektedir (Pitt Ford 2003). Gutta perka genleşebilir özelliktedir ve kök dentinine adaptasyon sağlayabilir. Gutta perka inert, ucuz ve korozyona uğramayan bir malzemedir. Termoplastisize gutta perka geliştirilene kadar gutta perkanın kök ucu dolgu maddesi olarak yerleştirilmesi

desteklenen bir görüş olmamıştır. Abdal ve ark (1982)'nın yaptığı bir çalışmada termoplastisize gutta perkanın amalgam, IRM ve Süper EBA'ya nazaran daha iyi kapatma sağladığı bulunmuştur. Yine başka bir çalışmada termoplastisize gutta perka ile amalgama göre daha etkili bir kapatma sağlandığı rapor edilmiştir (MacPherson ve ark 1989). Gutta perka pöröz tabiatı dolayısıyla etraftaki periapikal dokudan nem abzorbe eder, başlangıç aşamada genişler ve sonraki aşamada büzülür (Kaplan ve ark 1982). Bu durum gutta perkanın zayıf marjinal adaptasyonuna sebebiyet verir ve mikrosızıntıyı arttırır.

Pitt Ford ve ark (1996a)'nın yaptığı bir çalışmada çinko oksit içerikli kök kanal patı ile uygulanan gutta perkaya karşı yok denecek kadar az düzeyde enflamatuar doku cevabı oluştuğu gösterilmiştir. Kloroperka ile yumuşatılmış gutta perka ile doldurulmuş kök uçlarında ise şiddetli enflamasyon gözlemlenmiştir.

Gutta perka konlarının yüksek çinko oksit içeriğine bağlı olarak toksisite gösterdiği rapor edilmiştir (Pascon ve Spangberg 1990*). İn vivo* implantasyon deneylerinde gutta perkanın hayvan dokuları tarafından tolere edildiği, enflamasyona sebep olmadan ya da minimal enflamatuar cevap oluşturarak kollajen kapsül oluşumunu indüklediği bulunmuştur (Wolfson ve Seltzer 1975). Gutta perka düşük derecede toksisiteye sebep olmakla birlikte kabul edilebilir düzeyde biyouyumluluğa sahiptir.

Diaket

Kök kanal patı olarak üretilen Diaket (3M ESPE, Almanya) polivinil rezin malzemedir. Koyu kıvamda hazırlandığında retrograd dolgu materyali olarak da kullanılabileceği bildirilmiştir (Tetsch 1986). Diaket, manipülasyonu kolay ve kompakt bir kök ucu dolgu maddesidir (Regan ve ark 2002). Ayrıca, kısa süre içerisinde sertleşebilir ve yüzey polisajı yapılabilir.

Kök ucu dolgu maddesi olarak kullanılan Diaket'in amalgama göre daha üstün kapatma özellikleri sergilediği bildirilmiştir (Kodohiro 1984). Diaket'in aynı zamanda kemik apozisyonunu indüklediği ve Diaket'e karşı, periodontal ligamentin reformasyonu ve yeni sement depozisyonu ile karakterize iyi iyileşme cevabı oluştuğu gösterilmiştir (Witherspoon ve Gutmann 2000). Nencka ve ark (1995)'nın yapmış olduğu bir çalışmada Diaket'in kemik ile biyouyumlu olduğu gösterilmiştir.

Doku cevabı yönünden Diaket ve MTA'nın karşılaştırıldığı bir çalışmada, Diaket retrograd dolgu maddesinin bitişiğinde daha fazla yeni periodontal ligament dokusunun oluştuğu bildirilmiştir (Regan ve ark 2002).

Çinko Oksit Öjenol Preparatları

Çinko oksit öjenol simanlar retrograd dolgu maddesi olarak sıklıkla kullanılan materyallerdir. Fiziksel özelliklerini geliştirmek amacıyla çinko oksit öjenol simanlarda çeşitli modifikasyonlar yapılmıştır.

1) Süper-EBA:

Çinko oksit öjenolun likiti yerine orto-etoksi benzoik asit (EBA) ve toz kısmına da alüminyum ilavesi ile Süper-EBA elde edilmiştir. Altmışlı yıllarda üretilen Süper-EBA'nın toz içeriği %60 çinko oksit, %34 silikon dioksit, %6 doğal rezin ve likit içeriği %62,5 orto-etoksi benzoik asit, %37,5 öjenolden oluşmaktadır. Sonraki yıllarda, toz kısmındaki silikon dioksit alüminyum ile değiştirilmiştir (Yaccino ve ark 1999). Süper-EBA'nın sıkışma dayanımı ve gerilme dayanımı yüksek olup düşük çözünürlüğe sahiptir. Kök ucu dolgu maddelerinin çözünürlüğünün karşılaştırıldığı bir çalışmada IRM, Süper-EBA ve MTA'nın suda çözünmediği ve Süper-EBA'nın iyi kapatma özelliği sergilediği gösterilmiştir (Poggio ve ark 2007). Yapılan bir mikrosızıntı çalışmasında farklı yoğunluklarda kullanılan Süper-EBA'nın kök ucu dolgu maddesi olarak tercih edilebilen bir materyal olduğu gösterilmiştir (Yaccino ve ark 1999). Süper-EBA'nın bir diğer avantajı, nemli ortamlarda da diş dokusuna yapışabilmesidir. Radyolusent olması ve teknik hassasiyet gerektirmesi Süper-EBA'nın kulanımı ile ilgili limitasyonlardır.

Süper-EBA'nın biyouyumluluğunu araştıran bir takım çalışmalar yapılmıştır (Oynick ve Oynick 1978, Pitt Ford ve ark 1995a, Asrari ve Lobner 2003, Poggio ve ark 2007). Kök ucu dolgularının nörotoksik etkilerinin değerlendirildiği bir çalışmada 7 gün boyunca sertleşen Süper-EBA'nın toksisitesinin azalmadığı rapor edilmiştir (Asrari ve Lobner 2003). Süper-EBA'nın öjenol içeriği doku irritasyonunun temel kaynağı olabilmektedir (Poggio ve ark 2007). Yapılan diğer bir çalışmada Süper-EBA kök ucu dolgularının üzerinde kollajen fibrillerin gelişebildiği ve Süper-EBA'nın, kök apeksinde minimal kronik enflamasyona sebep olduğu rapor edilmiştir (Oynick ve Oynick 1978). Replantasyondan önce dişlere kök ucu dolgu

maddesi olarak yerleştirilen Süper-EBA'nın iyileşme üzerindeki etkilerinin değerlendirildiği bir çalışmada, Süper-EBA'ya karşı az sayıda enflamatuar hücre oluştuğu ve enflamatuar cevabın amalgama göre orta derecede olduğu rapor edilmiştir (Pitt Ford ve ark 1995a).

2) IRM (Intermediate Restorative Material)

IRM, çinko oksit öjenolün toz ağırlığının %20 oranında polimetil metil metakrilat ilavesi ile modifiye edilmiş şeklidir. Bu güçlendirme materyalin sıkıştırma dayanımını, abrazyon direncini ve sertliğini geliştirmiştir (Blaney ve ark 1981, Anderson ve ark 1990).

IRM ve Süper-EBA'nın çinko ve öjenol salınımı yönünden değerlendirildiği bir çalışmada IRM'den öjenol salınımının Süper EBA'dan önemli ölçüde daha yüksek olduğu ve bunun da IRM'nin daha fazla öjenol içeriğinden kaynaklandığı rapor edilmiştir (Al-Saeed ve ark 2008).

Replantasyondan önce dişlere kök ucu dolgu maddesi olarak yerleştirilen IRM'nin amalgama göre daha az şiddette doku cevabı oluşturduğu rapor edilmiştir (Pitt Ford ve ark 1994). Chong ve ark (1997a)'nın yaptığı bir çalışmada, IRM'nin öjenol içeriğinin polimetil metakrilata afinitesi olabileceği ve bu durumun dokulara daha az öjenol salınımını, dolayısıyla bu materyalin sitotoksisitesinin azalmasını sağlayabileceği rapor edilmiştir.

IRM'nin kapatma etkinliğinin longitudinal olarak değerlendirildiği bir çalışmada, yüksek toz-likit oranında hazırlanan IRM'nin sertleşme süresinin kısa olması, toksisitesinin az olması ve çözünürlüğünün az olması gibi özelliklerinden dolayı kök ucu dolgu maddesi olarak tavsiye edilebilir bir malzeme olduğu bildirilmiştir (Crooks ve ark 1994). Amalgam, kompomer, kompozit gibi kök ucu dolgu maddeleriyle kıyaslandığında IRM'nin *S. aureus*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa*'ya karşı iyi antibakteriyel etki gösterdiği rapor edilmiştir (Eldeniz ve ark 2006).

IRM ve amalgam retrograd dolgu materyallerine karşı oluşan doku cevabının karşılaştırıldığı bir çalışmada, 15 hafta içerisinde IRM grubunda osteoid oluşumunun gözlemlenmediği ve IRM örneklerinin kalıcı bir enflamasyon ve daha yavaş iyileşme potansiyeli sergilediği gösterilmiştir (Maher ve ark 1992). Farelerle yapılan diğer bir biyouyumluluk çalışmasında IRM'nin yumuşak doku ve kemik tarafından iyi tolere

edildiği ve retrograd dolgu olarak uygun bir materyal olabileceği bildirilmiştir (Blackman ve ark 1989). Trope ve ark (1996)'nın yaptığı histolojik bir çalışmada IRM ve Süper EBA'ya karşı iyi doku cevabı oluştuğu gösterilmiştir.

Cam İyonomer Simanlar

Cam iyonomer simanlar diş hekimliğinde oldukça geniş kullanım alanına sahiptir. Cam iyonomer simanlar yüksek teknik hassasiyet gerektirse de dentine adezyon göstermesi ve biyouyumlu olması önemli avantajlarındandır (Brook ve Hatton 1998). Cam iyonomer simanlar sertleşme reaksiyonlarının başında neme oldukça hassastırlar. Bu durum, nem kontaminasyonundan kaçınılması zor olan periradiküler bölgeye uygulanmalarını güçleştirmektedir.

Konvansiyonel sertleşen cam iyonomer simanların iyi biyouyumluluk sergilemesi üç ana nedene bağlanmıştır (Nicholson ve ark 1991): (1) minimal ekzotermik reaksiyon ile sertleşirler; (2) nötralizasyon genellikle yeterli derecede hızlıdır ve serbest asit varlığına bağlı potansiyel irritasyon minimal düzeydedir ve (3) sertleşmesini tamamlamış cam iyonomerden salınan maddeler yerleştirildiği bölge için yararlıdır.

Kemik implantasyon çalışmalarında farklı cam iyonomer simanların dokular tarafından iyi tolere edildiği bildirilmiştir (Zmener ve Dominguez 1983, Lehtinen 1986, Blackman 1989). Bazı klinik çalışmalarla da cam iyonomer simanların biyouyumlu olduğu doğrulanmıştır (Callis ve Santini 1987, Zetterqvist ve ark 1987). Crisp ve ark (1980) dental simanların sertleşirken dışarıya verdikleri ısıyı ölçmüşler ve cam iyonomer simanın en az ısıyı verdiğini bulmuşlardır. Cam iyonomer simanların minimal ekzotermik reaksiyon sergilemeleri dolayısıyla termal kaynaklı nekroz oluşma ihtimali minimaldir.

Cam iyonomer simanlar kullanılarak başarılı perforasyon tamirlerinin yapıldığı bir takım klinik çalışmalar mevcuttur (Goon ve Lundergan 1995, Shuman 1999, Behnia 2000, Breault ve ark 2000). Bu vakalar gözönünde bulundurulduğunda, dentin yedeği olarak rol oynayan cam iyonomer simanların perforasyon tamirinde ya da perforasyon bölgesinin yakınında kullanılabilecek uygun materyaller olduğu söylenebilir.

Rezin Modifiye Cam İyonomer Simanlar

Rezin modifiye cam iyonomer simanlar, kimyasal formüllerinde doymamış gruplar içermektedirler ve bundan dolayı biyouyumluluk özelliğini kaybedebilmektedirler (Wilson 1990). Rezin modifiye cam iyonomer simanlardan kısa dönemde de uzun dönemde de alüminyum salınmaktadır (Forss 1993). Geurtsen ve ark (1998a)'na göre rezin modifiye cam iyonomerden ortama salınan komponentler sitotoksik reaksiyonların temel sebebini oluşturmaktadır. Vitremer (3M, St Paul MN, ABD)'in araştırıldığı bir çalışmada HEMA salınımının Vitremer'in sitotoksisitesinin primer sebeplerinden bir tanesi olduğu gösterilmiştir (Geurtsen ve ark 1998a). Vitremer ile yapılan direk pulpa kuafajının pulpal enflamasyona yol açmadığı ve Vitremer implantlarının tavşanlarda sadece hafif reaksiyonlara yol açtığı gösterilmiştir (Bazzucchi ve ark 1995, Tassery ve ark 1997).

Üzerinde oldukça fazla araştırma yapılan rezin modifiye cam iyonomer simanlardan bir tanesi de Vitrebond'dur (3M, St Paul MN, ABD). Pulpa kuafajı için kullanılan Vitrebond'un kalsiyum hidroksite göre pulpa dokusunu daha fazla irrite ettiği bildirilmiştir (do Nascimento ve ark 2000).

Rezin modifiye cam iyonomer simanların konvansiyonel sertleşen cam iyonomer simanlara göre daha kolay manipüle edilebilmesi ve iyi adezyon potansiyeline sahip olması bu materyallerin retrograd dolgu maddesi olarak kullanımını cazip kılmaktadır. Düşük sitotoksisitesi (Chong ve ark 1994a), iyi antibakteriyel etkinliği (Chong ve ark 1994b), enfekte dişlerde kök ucu dolgu maddesi olarak kullanıldığında uygun doku cevabı oluşturması (Chong ve ark 1997a,b) bu materyallerin endodontik cerrahide iyi bir alternatif olabileceğini göstermektedir.

Kompozit Rezinler

Konvansiyonel kompozit rezinler, polimerize olabilen organik matriks, inorganik doldurucu ve organik-inorganik komponentleri birbirine bağlayan silan ajanı içermektedirler. Kompozit rezinlerin organik kısmını monomerler (Bis-GMA, UDMA, TEGDMA) ve polimerizasyon başlatıcı, stabilize edici ya da inhibe edici

fonksiyon gören ilave maddeler oluşturmaktadır. Retrograd dolguların sızıntılarının karşılaştırıldığı bir çalışmada dentin bonding ajanı ile birlikte uygulanan kompozitin en az sızıntı gösterdiği bulunmuştur (McDonald ve Dumsha 1987). Yine karşılaştırmalı bir diğer mikrosızıntı çalışmasında kompozit rezinin, amalgam ve cam iyonomerden daha az apikal sızıntı sergilediği gösterilmiştir (Danin ve ark 1992). Bu çalışmalar göz önünde bulundurulduğunda dentin bonding ajanlarıyla uygulanan kompozitlerin nispeten daha sızdırmaz kapatma sağlayabilen materyaller olduğu söylenebilir. Fakat kompoziti yerleştirirken mükemmel nem kontrolünün sağlanması kompozitin başarısı açısından oldukça önemlidir.

Kompozitin aköz ekstraktlarında TEGDMA, BİS-GMA ve UDMA'nın bulunduğu tespit edilmiştir (Ferracane ve Condon 1990). Uzun dönemde kompozitlerden formaldehit serbest kalmaktadır (Geurtsen 1998b). Kompozitten sızan komponentlerin özellikleri ve miktarı, kompozit materyallerinin biyouyumluluğunu etkilemektedir (Geurtsen 2000). Bu komponentler aynı zamanda kompozit materyallerin, *P. gingivalis, P. intermedia, P. endodontalis, F. nucleatum* gibi bakterilere karşı yüksek antibakteriyel etkinlik sergilemelerinin sebebi olabilir (Nicholson 2007).

Kompozit rezinlere karşı periradiküler dokuların iyileşme cevabı, kullanılan materyal tipine bağlı olarak zayıftan iyiye çeşitlilik göstermektedir (Andreasen ve ark 1989, Trope ve ark 1996). Kompomer, kompozit ve amalgam materyallerinin kullanıldığı bir hayvan çalışmasında 7 günde kompozite karşı enflamatuar cevap oluştuğu ve bu enflamatuar cevabın fibröz doku kapsülü oluşumuyla birlikte 90 günde çözüldüğü rapor edilmiştir (Özbaş ve ark 2003). Kompozit retrograd dolgulu dişlerin periapikal biyopsileri, sement depozisyonu ve rezin dolgu üzerinde periodontal ligamentin yeniden oluştuğunu göstermiştir (Andreasen ve ark 1993).

Kompozit rezin içerikli materyaller olan Retroplast (Retroplast Trading APS, Roervig, Danimarka) ve Geristore'un (Den-Mat, Santa Maria, CA, ABD) kök ucu dolgu maddesi olarak kullanıldığı birtakım çalışmalar yapılmıştır. Rud ve ark (1991) Retroplast ve Gluma dentin bonding ajanı ile uzun dönem klinik başarı rapor etmişlerdir. Diğer bir klinik çalışmada, bonding ajanı ile birlikte kompozit rezinin retrograd dolgu olarak uygulandığı hastalarda %92 oranında tamamen iyileşme rapor

edilmiştir (Rud ve ark 2001). Farklı kök ucu dolgu maddelerinin gingival fibroblastlar üzerindeki etkilerini inceleyen çalışmalarda MTA ile karşılaştırıldığında Geristore'a daha iyi hücre ataçmanının gerçekleştiği bulunmuştur (Camp ve ark 2003, Gupta ve ark 2013). Diğer *in vitro* çalışmalarda da MTA, cam iyonomer ve IRM ile karşılaştırıldığında Geristore'un daha az toksik olduğu gösterilmiştir (Al-sabek ve ark 2005, Gupta ve ark 2013). Hücresel ataçmanın, sitotoksisitenin hassas bir göstergesi olarak dikkate alındığı yakın zamanda yapılan bir çalışmada, IRM, Süper-EBA, Ketac-Fil ve Retroplast'ın zayıf hücresel ataçman sergilediği, en iyi hücresel ataçmanın MTA ve Geristore örneklerinde gerçekleştiği gösterilmiştir (Al-Hiyasat ve ark 2012). Vahid ve ark (2004)'nın yapmış olduğu bir çalışmada dentin bonding ajanlarının monositlerin canlılığını zamanla azalttığı bildirilmiştir.

Daha güncel kompozit sistemleri, ideal retrograd dolgu materyallerinin çoğu özelliğini taşımaktadır. Pekçok rezin materyal periradiküler kullanım için uygun olmasa da kompozitler, kök ucu dolgu seçenekleri arasında yer almaktadır. Kompozit rezinlerin retrograd dolgu olarak kullanımının uzun dönem etkilerini belirlemek için ileri araştırmalar gerekmektedir.

Kompomerler (Poliasit Modifiye Kompozit Rezinler)

Poliasit modifiye kompozit rezin olan kompomerler cam iyonomerlerin florid salma özelliği ile kompozit rezinlerin mekanik özelliklerini kombine etmek üzere geliştirilmiş materyallerdir. Kompozit rezinlere benzer şekilde kompomerlerin polimerizasyon reaksiyonu ışıkla başlatılır. Monomeri asidik fonksiyonel gruplar içerir ve materyal serbest radikal polimerizasyon reaksiyonu ile sertleşir. Kompomerler, cam iyonomer simanlar gibi diş yapısına bağlanamazlar, kompozit rezinler gibi bir bonding ajanına ihtiyaç duyarlar (Nicholson 2007).

Süper-EBA, MTA ve kompomerin kapatma yeteneklerini elektrokimyasal sızıntı yöntemi ile değerlendirilen bir çalışmada kompomerin, MTA ve Süper-EBA ile eşdeğerde kapatma özelliği sergilediği bulunmuştur (Dong ve ark 2004).

Retrograd dolgu materyali olarak amalgam ve kompomeri karşılaştıran bir histolojik çalışmada amalgam retrograd dolgulu hayvan modellerinde sınırlı kemik oluşumu ve orta derecede enflamasyonla karakterize orta dereceli biyouyumluluk

gösterilmiştir. Kompomer grubunda ise daha fazla enflamasyon ve daha fazla kök sementi gelişimi gösterilmiştir (Gargallo ve ark 2008). Süper-EBA ve kompomerin farelerin femur kemiğine implante edildiği bir hayvan çalışmasında 4 hafta sonra her iki materyale karşı fibröz doku oluşumu ile karakterize enflamasyonun geliştiği fakat 12 haftada kemik iyileşmesinin gözlendiği bildirilmiştir. Kemik içi biyouyumluluk açısından her iki materyal benzer özellikler sergilemiştir (Pertot ve ark 1997). Kompomerlere karşı yara iyileşme cevaplarının araştırıldığı bir çalışmada kompomer kök ucu dolgularının yerleştirildiği kök apeksinin etrafında fibroblastların yeniden şekillenmesine izin verecek şekilde gingival dokunun materyale yapıştığı rapor edilmiştir (Dragoo 1997).

Kompomerleri kök ucu dolgusu olarak değerlendiren klinik çalışma sayısı oldukça azdır. Kompomer ve cam iyonomer kök ucu dolguları yapılan 34 dişin 1 yıllık takibinin yapıldığı klinik çalışmada kompomerin kullanıldığı tedavi grubunda %89 oranında tam iyileşme gözlenirken cam iyonomerle tedavisi yapılan grupta %44 oranında tam iyileşme gözlendiği bildirilmiştir (Platt ve Wannfors 2004).

MTA (Mineral Trioksit Agregat)

Doksanlı yılların başında endodonti alanına tanıtılmasıyla birlikte MTA, pek çok klinik prosedürde tercih edilen ve kabul gören bir materyal olmuştur. MTA'nın pulpa kuafaj maddesi (Faraco ve Holand 2001), kök perforasyon tamir materyali (Pitt Ford ve ark 1995b, Holland ve ark 1999), kök ucu dolgu maddesi (Bates ve ark 1996), açık apeksli dişlerde bariyer materyali (Witherspoon ve Ham 2001) olarak kullanıldığı çalışmalarda başarılı sonuçlar elde edildiği rapor edilmiştir. Amalgam, IRM, Süper-EBA ile karşılaştırıldığında MTA'nın bu prosedürler için yeterli bir materyal olduğu söylenebilir (Torabinejad ve ark 1995a, Fischer ve ark 1998).

MTA, trikalsiyum silikat, trikalsiyum alüminat, trikalsiyum oksit, silikat oksit ve diğer mineral oksitlerinin ince hidrofilik partiküllerinden oluşmaktadır ve MTA, nem ile sertleşme reaksiyonunu tamamlamaktadır (Torabinejad ve ark 1995b).

Yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda MTA'nın çevre dokularla uyumlu olduğu bildirilmiştir (Koh ve ark 1998, Torabinejad ve ark 1998). MTA, osteoblast aktivitesini indüklemektedir (Koh ve ark 1997). MTA'nın, amalgam, IRM ve Süper-EBA'ya göre daha az sitotoksik olduğu bildirilmiştir (Kettering ve Torabinejad 1995,

Keiser ve ark 2000). Bunun yanında MTA'nın antibakteriyel özelliklere sahip olduğu da gösterilmiştir (Estrela ve ark 2000, Eldeniz ve ark 2006).

Kök uçları MTA ile doldurulduğunda apikaldeki sert doku oluşumunun indüklendiği gösterilmiştir (Torabinejad ve ark 1997). Pulpa kuafajı ya da parsiyel pulpotomide kullanıldığında MTA'nın reperatif dentin oluşumunu stimüle ettiği, pulpaların MTA ile kapatılmasının enflamasyona sebebiyet vermeden dentin köprüsü oluşumunun tamamlanmasını sağladığı gösterilmiştir (Pitt Ford ve ark 1996b, Tziafas ve ark 2002, Andelin ve ark 2003, Faraco ve Holland 2004, Nair ve ark 2008).

MTA'nın bütün ticari formülasyonlarında uzun sertleşme süresi problemi mevcut olup (Torabinejad ve ark 1995b) bu durum materyalin oral kavitede kullanımını sınırlandırmaktadır. MTA'nın basma dayanımının diğer kök ucu dolgu maddeleriyle karşılaştırılabilir olduğu gösterilmiştir (Torabinejad ve ark 1995b). Zor manipülasyon özellikleri (Chng ve ark 2005) ve yerleştirildiği bölgeden çabuk uzaklaşma eğiliminde olması bu materyalin kullanımını sınırlandırmaktadır (Porter ve ark 2010). MTA'nın klinik kullanımını kolaylaştırmak amacıyla sertleşme süresi ve basma dayanımı gibi fiziksel özelliklerinin geliştirilmesine ihtiyaç vardır.

Bioagregat

Bioagregat, MTA'nın birtakım özelliklerini iyileştirmek üzere geliştirilen yeni biyoseramik kök tamir ve kök ucu dolgu materyalidir. Vital pulpa kuafajı, perforasyon tamiri, retrograd dolgu uygulaması ve apeksifikasyon gibi prosedürler Bioagregat'ın kullanım endikasyonları arasında yer almaktadır. Üretici firmaya göre materyalin toz kısmı; trikalsiyum silikat, dikalsiyum silikat, tantalyum pentoksit, tek bazlı kalsiyum fosfat ve amorföz silikon oksit içerirken, likit kısmını deiyonize su oluşturur.

Bioagregat, gutta perka, amalgam, IRM ve beyaz MTA'nın kapatma özelliklerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada en az mikrosızıntının Bioagregat grubunda olduğu gösterilmiştir (El Sayed ve Saeed 2012).

Bioagregat ve MTA üzerinde pulpa ve periodontal ligament hücrelerinin gelişimini faz kontrast mikroskobu ile inceleyen bir çalışmada MTA örnekleri etrafında inhibisyon zonu gözlendiği, Bioagregat örneklerinin etrafında inhibisyon

zonuna rastlanmadığı bildirilmiştir. Bioagregat'ın pulpa ve periodontal ligament hücrelerine karşı toksik olmadığı bulunmuştur (Chung ve ark 2010). Beyaz MTA ile karşılaştırıldığında Bioagregat'ın insan MG63 hücreleri için de biyouyumlu olduğu gösterilmiştir (Lee ve ark 2010).

Yuan ve ark (2010) Bioagregat'ın osteoblast hücreleri üzerinde mineralle ilişkili gen ekspresyonunu ve toksisitesini araştırmışlardır. Bu çalışmada Bioagregat'ın osteoblast hücrelerine karşı toksik olmadığı ve aynı zamanda osteoblast hücrelerinde mineralizasyonla ilişkili proteinler olan tip I kollajen, osteopontin ve osteokalsinin gen ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiştir. MTA ve Bioagregat'ın sitotoksisitesini karşılaştırmak üzere yapılan diğer bir çalışmada her iki grubun benzer enflamatuar reaksiyon sergilediği, Bioagregat'ın MTA'ya göre daha az yabancı cisim reaksiyonu oluşturduğu bu yüzden Bioagregat'ın MTA'ya göre daha biyouyumlu olduğu bildirilmiştir (Batur ve ark 2013).

MM-MTA

Yakın zamanda piyasaya sürülen yeni endodontik tamir materyallerinden bir diğeri de MM-MTA'dır. Üretici firma, içeriğine kalsiyum karbonat ilavesi sayesinde sertleşme süresinin 20 dakikaya indirildiğini bildirmiştir. Yine üretici firma tarafından, MM-MTA'nın diğer MTA preparatlarına göre daha iyi fizikokimyasal özelliklere sahip olduğu, daha kolay manipüle edilebildiği ve yerleştirilebildiği bildirilmiştir (MicroMega 2014). MM-MTA'nın biyouyumluluğunu araştıran çalışma sayısı oldukça azdır (Chang ve ark 2014a).

Endobinder

MTA'nın klinik uygulanışını ve özelliklerini bozmadan negatif özelliklerini elimine etmek amacıyla Endobinder (Binderware, Sao Carlos, SP, Brezilya) isimli alüminyum esaslı endodontik siman geliştirilmiştir (Wei ve ark 2012). Endobinder, materyalin istenmeyen genleşmesinden sorumlu olan serbest magnezyum oksit ve kalsiyum oksit zerrelerinin ve dişin renklenmesinden sorumlu olan ferrik oksitin elimine edilmesiyle üretilmiştir (Aguilar ve ark 2012). Jacobovitz ve ark (2009)'nın yaptığı bakteriyel sızıntı çalışmasında Endobinder'ın 30 günlük süreçte *E. faecalis* mikrosızıntısını önlediği bildirilmiştir. Yeni materyaller arasında yer alan

Endobinder'ın tatmin edici doku reaksiyonu gösterdiği ve farelerin subkütanöz dokusunda test edildiğinde biyouyumlu olduğu bildirilmiştir (Aguilar ve ark 2012).

Generex A

Generex A, ProRoot MTA'ya benzer şekilde kalsiyum silikat esaslı bir siman olup MTA için kullanılan su yerine farklı jellerle karıştırılmaktadır. Generex A MTA'dan farklı manipülasyon özelliklerine sahiptir. Uygun bir manipülasyon sağlayabilmek için Generex A'nın iyi karıştırılması ve hamur kıvamı elde edilmesi gerekmektedir (Porter ve ark 2010). Generex A, Generex B, Capasio ve Ceramicrete'in primer osteoblast kullanılarak biyouyumluluklarının karşılaştırıldığı bir çalışmada Generex A'nın primer osteoblast gelişimini destekleyen tek yeni jenerasyon endodontik materyal olduğu bildirilmiştir (Washington ve ark 2011). Bu çalışmada ayrıca, sadece Generex A ve MTA'nın bütün bir deney boyunca hücre gelişimine ve hücre proliferasyonuna izin verdiği bulunmuştur (Washington ve ark 2011).

CEM (Calcium Enriched Mixture)

Endodonti alanına tanıtılan yeni materyallerden biri de CEM simanıdır. CEM simanının tozunun majör komponentleri kalsiyum oksit, sülfür trioksit, fosfor pentoksit, silisyum oksit iken minör komponentleri alüminyum oksit, sodyum oksit magnezyum oksit ve klordur (Asgary ve ark 2008). Bu materyal MTA ile benzer pH'a sahiptir ve CEM simanından, normal salin solüsyonu içerisine ve simule insan doku sıvısı içerisine kalsiyum ve fosfat iyonlarının salındığı, bu iyonların hidroksiapatit oluşturduğu bildirilmiştir (Asgary ve ark 2008).

Demir İçermeyen Parsiyel Stabilize Siman

Parsiyel stabilize siman MTA'nın birtakım olumsuzluklarını çözmek amacıyla geliştirilen yeni bir materyaldir. Parsiyel stabilize siman trikalsiyum silikat, dikalsiyum silikat, trikalsiyum alüminat ve kalsiyum alümino ferrit içeren modifiye kalsiyum silikat simanıdır (Lin ve ark 2003). Tek basamaklı sol-jel işlemi kullanılarak demir nitrat yerine çinko ilavesi ile parsiyel stabilize siman

sentezlenmiştir (Lin ve ark 2003). Parsiyel stabilize simanın fiziksel özellikleri ve biyolojik uyumluluğu farelerden izole edilen primer osteoblast hücreleri üzerinde test edilmiş ve kök ucu dolgu maddesi olarak ideal bir madde olabileceği bildirilmiştir (Ndong ve ark 2012).

Endosequence Kök Tamir Materyali (ERRM)

Endosequence kök tamir materyali (ERRM) (Brasseler, ABD) kullanıma hazır, önceden karıştırılmış biyoseramik materyaller olarak geliştirilmiştir. ERRM'nin perforasyon tamiri, apikal cerrahi, apikal plug ve pulpa kuafajları için kullanımı önerilmiştir (Brasseler 2014). Üretici firmaya göre Endosequence'in hem putty hem de paste formu benzer kimyasal kompozisyona sahip olup her ikisi de kalsiyum silikat, zirkonyum oksit, tantalyum oksit ve kalsiyum fosfattan oluşmaktadır. Bu materyaller iyi fiziksel ve biyolojik özelliklere sahiptirler ve çalışılması kolay maddelerdir. Endosequence; hidrofilik, suda çözünmeyen, radyoopak, alüminyumsuz ve yüksek pH'a sahip bir materyaldir (Brasseler 2014). Üretici firmaya göre sertleşme reaksiyonu esnasındaki yüksek alkalen pH'ı materyalin antibakteriyel özellik sergilemesini sağlar.

ERRM'nin sitotoksisitesini değerlendiren bir çalışmada, ERRM'nin MTA ile eş değerde düşük toksisite sergilediği gösterilmiştir (Alanezi ve ark 2010). Diğer bir biyouyumluluk çalışmasında da ERRM'nin 7 gün sertleşen örneklerinin MTA ile benzer şekilde hücre canlılığını etkilediği bildirilmiştir (Ma ve ark 2011). Damas ve ark (2011)'nın yaptığı bir çalışmada ERRM'nin ProRoot MTA ve MTA-Angelus ile benzer sitotoksisite gösterdiği bildirilmiştir.

Ceramicrete

Ceramicrete, kendi kendine sertleşen laboratuarda sentezlenen biyoseramik fosfat bazlı simandır (Wagh ve ark 2003). Yakın zamanda, fosfosilikat seramik içine hidroksi apatit tozu ve keryum oksit radyoopak doldurucuları ilave edilerek biyouyumlu, radyoopak ceramicrete bazlı dental ve kemik materyali olarak üretilmiştir (Wagh ve Primus 2006).

Glikoz penetrasyon yöntemi ile Ceramicrete, Bioagregat ve beyaz MTA kök ucu dolgularının kapatma yeteneği karşılaştırılmış ve Bioagregat ve Ceramicrete'in

MTA ile benzer kapatma özellikleri sergilediği, Ceramicrete'in Bioagregat'tan daha iyi sonuçlar verdiği gösterilmiştir (Leal ve ark 2011). Ceramicrete-D ile ilgili olarak potansiyel biyoaktivite gösterdiği, beyaz MTA ile kıyaslandığında daha iyi kapatma özelliği sergilediği ve sertleştikten sonra bazik pH'ya sahip olduğu rapor edilmiştir (Tay ve ark 2007). Bu materyal pöröz olmadığından ve sertleşme reaksiyonu boyunca kalsiyum ve fosfat iyonları ürettiğinden (Wagh ve ark 2003, Wagh ve Primus 2006) kök ucu dolgu maddesi olarak kullanım potansiyeli taşıyabilir.

iRoot BP

iRoot BP Plus (Innovative BioCeramix, Vancouver, Kanada), tamamen laboratuarda sentezlenen su bazlı biyoseramik simandır. Kullanıma hazır, beyaz hidrolik, önceden karıştırılmış formülü dolayısıyla üretici firma tarafından daha uygun bir tamir materyali olduğu iddia edilmektedir (Innovative Bioceramix 2012). iRoot BP ve MTA'nın mikrosızıntılarının karşılaştırıldığı bir çalışmada iRoot BP'nin MTA'ya göre daha iyi kapatma özelliği sergilediği bildirilmiştir (Wang ve ark 2013). Azimi ve ark (2014)'nın yaptığı klinik bir çalışmada dişlerine parsiyel pulpotomi sonrası iRoot BP ve MTA uygulanan hastalarda 6 hafta sonraki klinik semptomları ve radyografik değişiklikleri takip edilmiş ve pulpası iRoot BP ile kapatılan dişlerin soğuk uyarana daha hassas olduğu gözlemlenmiştir.

Yakın zamanda iRoot BP'nin biyouyumluluğunu araştıran bir çalışmada, iRoot BP ve MTA'nın biyouyumlu olduğu ve kritik sitotoksik etki sergilemediği gösterilmiştir (De-Deus ve ark 2012). Bioagregat ve iRoot BP'nin dental pulpa hücrelerinin proliferasyonuna ve mineralizasyonuna olan etkisinin değerlendirildiği bir çalışmada Bioagregat ve iRoot BP'nin toksik olmadığı ve mineralizasyonu indüklediği rapor edilmiştir (Zhang ve ark 2013).

NRC (New Resin Cement)

NRC ticari adlı yeni kök ucu dolgu maddesi biyoaktif tozlardan ve HEMA içerikli rezin monomerden geliştirilmiştir. Bir likit ve toz sistemi olan NRC'nin toz kısmını kalsiyum oksit, kalsiyum silikat ve trifenilbizmut karbonat oluştururken, likit kısmını HEMA (hidroksimetil metakrilat), benzol peroksit toluidin ve toluensülfinat oluşturmaktadır. NRC'nin sitotoksisitesini araştıran bir çalışmada NRC'nin başlangıç

biyouyumluluğunun kök ucu dolgu maddesi olarak kullanımına izin verecek düzeyde uygun olduğu gösterilmiştir (Kim ve ark 2009). Yakın zamanda yapılan bir klinik çalışmada NRC'nin MTA'ya göre kısmen daha yüksek enflamatuar reaksiyona neden olduğu ve NRC'nin kalsiyum depolama yeteneğinin dokuların mineralizasyonuna yardımcı olabileceği sonucuna varılmıştır (Yang ve ark 2012).

Capasio

Capasio (Primus Consulting, Bradenton, FL, ABD) kalsiyum alümino silikat esaslı bir materyaldir. Bunun yanında içeriğinde bizmut oksit, dental cam da bulundurur. Yakın zamanda yapılan bir çalışmada sentetik doku sıvısına maruz bırakılan Capasio'nun apatit birikimini indüklediği ve dolayısıyla mineralizasyon kapasitesine sahip olduğu gösterilmiştir (Bird ve ark 2012). Aynı araştırıcılar Capasio'nun kök ucu dolgu maddesi olarak kullanıldığında dentin tübüllerine penetre olabildiği sonucuna da varmışlardır.

Biodentine

Biodentine (Septodont, Saint-Maur-des-Fosses, Fransa) yakın zamanda geliştirilen kalsiyum silikat esaslı yeni bir materyaldir. Biodentine'in toz kısmı trikalsiyum silikat, kalsiyum karbonat ve zirkonyum oksitten oluşurken likit kısmı, sertleşmeyi hızlandırıcı kalsiyum klorit ve süperplastisize edici ajan olan modifiye polikarboksilattan oluşmaktadır (Laurent ve ark 2008). Bu yeni materyalin kron ve kök dentini tamiri, perforasyon tamiri, apeksifikasyon ve kök ucunun doldurulması gibi işlemler için kullanımı önerilmiştir (Astrup ve ark 2012).

MTA, Biodentine ve kalsiyum fosfat sementinin mikrosızıntılarının karşılaştırıldığı bir çalışmada Biodentine'in MTA'dan kötü, kalsiyum fosfattan iyi kapatma özelliği sergilediği gösterilmiştir (Sanghavi ve ark 2013). Dentin ve Biodentine arayüzünün interfasiyal özellikleri mikroskop altında incelenmiş ve tag benzeri mikro yapılar tespit edilmiştir. Biodentine, dentin tübüllerine penetre olabilmekte ve arayüzdeki mekanik özellikleri iyileştirebilmektedir (Atmeh ve ark 2012). Güneşer ve ark (2013)'nın yaptığı bir çalışmada, çeşitli irrigasyon solüsyonlarına maruz bırakılan Biodentine'in MTA'ya göre yüksek bağlanma

dayanımı sergilediği gösterilmiştir. Biodentine'in yüzeyinde hidroksiapatit birikimine izin verdiği ve biyoaktivite sergilediği bildirilmiştir (Camilleri ve ark 2013). Yine Biodentine'in biyoaktivitesini gösteren bir başka çalışmada fosfat solüsyonuna daldırıldıktan sonra Biodentine'in apatit formasyonu gösterdiği bulunmuştur (Goldberg ve ark 2009). Kök kanal dentinine silisyum ve kalsiyum alınımının Biodentine grubunda MTA grubuna göre göze çarpar düzeyde fazla olduğu bulunmuştur (Han ve Okiji 2011). Karşılaştırmalı bir *in vitro* biyouyumluluk çalışmasında Biodentine'in MTA'ya benzer gingival fibroblast reaksiyonu oluşturduğu ve MTA ve Biodentine'in cam iyonomer simandan daha az toksik olduğu gösterilmiştir (Zhou ve ark 2013). Biodentine ile ilgili yapılan araştırmalar dikkate alındığında Biodentine'in kök ucu dolgusu ve perforasyon tamiri için iyi bir alternatif olabileceği görülmektedir.

Tetrakalsiyum Fosfat

Baryum sülfat ve zirkonyum oksit içeren bir bileşik olan tetrakalsiyum fosfat (TTCP) potansiyel kök ucu dolgu ve perforasyon tamir materyali olarak önerilmiştir (Krell ve Wefel 1984). Organik asitler ile karıştırıldığında hidroksiapatite dönüşen bu siman (Nakajima ve ark 1986), diş ve kemik mineraline benzer şekilde kristal yapılara ve kimyasal kompozisyona sahiptir (Chohayeb ve ark 1987). Tetrakalsiyum fosfatın hem pulpa odasının hem de kök kanallarının dentin yüzeylerine sıkı ve üniform bir adaptasyon sergilediği rapor edilmiştir (Chohayeb ve ark 1987). Yoshimine ve ark (1993) materyal ile temas halinde olan dokularda ne enflamasyon ne de yabancı cisim reaksiyonu gözlemlemişler ve tetrakalsiyum fosfatın hem biyouyumlu hem de osteokondüktif olduğunu göstermişlerdir.

Polimetil Metakrilat (PMMA) Kemik Simanı

Retrograd dolgu materyallerinin aranan özelliklerini sergileyen yeni materyallerden biri de PMMA kemik simanı olabilir. Ortopedik cerrahide geniş kullanım alanına sahip olan PMMA kemik simanı, özellikle protezlerin fiksasyonu, vertebral kırıkların stabilizasyonu ve kemik defektlerinin doldurulması amacıyla kullanılmaktadır (Stanczyk ve van Rietbergen 2004). Ticari olarak satılan PMMA kemik simanı polimer toz ve monomer likit olmak üzere iki komponentten

oluşmaktadır. PMMA kemik simanı, içeriğindeki akriliğe bağlı polimerizasyon büzülmesi gösterse de kavite marjinlerine iyi adaptasyon sağlar (Badr 2010). PMMA kemik simanı nemli ortamı çok güzel tolere eder ve kan kontaminasyonundan etkilenmez (Badr 2010).

PMMA kemik simanlarıyla alakalı problemlerden bir tanesi sertleşme reaksiyonlarının ekzotermik olmasıdır. Diğer bir problem ise kemik simanının rezidüel metilmetakrilat monomerinin toksik olabilmesidir. Ancak yapılan birtakım çalışmalarda serbest monomerin dokular üzerindeki etkisi araştırılmış ve monomer ile alakalı az toksisite görüldüğü rapor edilmiştir (Linder 1977, Renvall 1991). Kemik simanı ile kemiğin uzun dönem uyumluluğunu araştıran çalışmalarda kemik nekrozu oluşmadan kemik simanı ile kemiğin yumuşak ve sert dokuları arasında kilitlenme olduğu gösterilmiştir (Boss ve ark 1993, Schmalzried ve ark 1993).

PMMA kemik simanı total kalça artroplastisi gibi uygulamalarda fazla miktarda kullanılsa dahi herhangi bir olumsuz etkisinin olmadığı görülmektedir (Badr 2010). Endodontik uygulamalar için gereken miktar ortopedik uygulamalar için gereken miktardan çok daha azdır. Daha az miktarda PMMA kemik simanı kullanılması daha az monomer açığa çıkması ve daha az ekzotermik reaksiyon anlamına gelir. Dolayısıyla medikal alanda sıklıkla kullanılan PMMA kemik simanı dental kullanım için de iyi bir alternatif olabilir.

1.2. Periodontal Ligament Dokusu ve Periodontal Ligament Fibroblastları

Periodonsiyum, dişi çevreleyen ve destekleyen bir ataçman sistemidir. Periodonsiyum, iki sert ve iki yumuşak dokudan meydana gelmektedir. Periodonsiyumun sert doku kısmını anatomik kökü kaplayan sement ve alveolar kemik oluştururken yumuşak doku kısmını dişeti ve periodontal ligament dokusu oluşturmaktadır.

Periodontal ligament, diş kökü ve alveol kemik arasındaki periodontal boşlukta konumlanan yoğun, özelleşmiş fibröz bağ dokusudur. Periodontal ligament, hızlı dönüşüm ve remodeling (yeniden şekillenme) kapasitesi ile karakterizedir (Lekic ve ark 2001). Ayrıca, kendi kendini yenileyebilme ve tamir kapasitesine sahiptir (Beertsen ve ark 1997). Buna ilaveten periodontal ligament dokusu, çiğnemeden ve ortodontik diş hareketlerinden kaynaklanan mekanik stresi de

hafifletmeye yardımcı olur. Periodontal ligamentten köken alan progenitor hücrelerin kendi kendilerini yenileyebilme ve farklı hücre kökenlerine farklılaşabilme özellikleri vardır ve bu hücreler periodontal doku rejenerasyonunda önemli fonksiyona sahiptirler (Ivanovski ve ark 2006, Kaneda ve ark 2006, Nagatomo ve ark 2006).

Embriyonal dönemdeki diş gelişimi incelendiğinde, periodontal ligamentin sementi oluşturan hücrelere kaynak sağlayan ve gelişmekte olan dişi çevreleyen dental folikülden köken aldığı görülmektedir (Handa ve ark 2002, Zhao ve ark 2002). Seo ve ark (2004)'nın yapmış olduğu bir çalışmada periodontal ligamentin, laboratuar şartlarda izole edilebilir-geliştirilebilir özellikte olan ve eşsiz bir kök hücre kaynağı sağlayan multipotent postnatal kök hücre popülasyonu içerdiği gösterilmiştir. Bir dişten toplanan periodontal ligament, *ex vivo* şartlarda proliferasyon kapasitesi sayesinde pek çok sayıda kök hücre oluşumunu sağlayabilmektedir (Seo ve ark 2004).

Periodontal ligament dokusu heterojen hücre topluluklarından oluşur. Bu heterojen hücreler arasında fibroblastlar, periodontal ligament dokusunun baskın hücre popülasyonunu oluşturur (Bartold ve ark 2000). Gingival fibroblastlar, gingival bağ dokusunun bütünlüğünü devam ettirirken, özelleşmiş fonksiyonlara sahip olan periodontal ligament fibroblastları, periodontal ligament fiber ataçmanlarının oluşumu ve idamesinden sorumlu olmakla birlikte bitişik sement ve kemik dokusunun tamiri, remodelasyonu ve rejenerasyonunda önemli rol oynarlar (Boyko ve ark 1981). Periodontal ligament fibroblastları kollajen fiberler gibi matriks komponentlerinin üretilmesini ve sindirilmesini sağlar. Periodontal ligament fibroblast hücrelerinin, alveolar kemik ve sementin yeniden şekillendirilmesini sağlayan osteoblast ve sementoblastlara kaynak sağladığı düşünülmektedir (Roberts ve ark 1982). Gingival fibrobastlar ve dental pulpa ile karşılaştırıldığında periodontal ligament fibroblastlarının özelleşmiş karaktere sahip olduğu görülmektedir (Nakamura ve ark 2007, Noda ve ark 2009).

Kök ucu dolgu ve perforasyon tamir materyallerinin periodontal ligamente ait fibroblast hücrelerine olan sitotoksik etkilerinin belirlenmesi, bu hücrelerin kök ucu dolgu ve perforasyon tamir materyallerine adezyonu ve materyal yüzeyinde

çoğalabilmeleri endodontik cerrahi işlemlerinin başarılı olması açısından büyük önem taşımaktadır.

1.3. Hücre Canlılık Testleri ve XTT metodu

Hücre canlılık testleri, test moleküllerinin hücre proliferasyonu üzerindeki etkilerini değerlendirmek ya da hücre ölümüne yol açan direk sitotoksik etkileri belirlemek amacıyla yapılmaktadır. Kullanılan hücre tipinden bağımsız olarak deneyin sonunda kaç tane hücrenin canlı kaldığının bilinmesi gerekir (Riss ve ark 2013). Hücre canlılığını belirlemek üzere rutinde en yaygın kullanılan tripan mavisi boya dışlama yöntemlerinden, oldukça kompleks analizlere kadar pek çok metod bulunmaktadır (Stoddart 2011). Bu testler, hücrelerin belli bir zaman aralığı boyunca test maddesinin farklı konsantrasyonlarına maruz bırakılıp sonrasında hücre canlılığının derecesinin ve fonksiyonel parametrelerin ölçümü yapıldığından temel olarak birbirleriyle benzemektedir. Hücre canlılığının belirlenmesindeki temel kriterler; hücre kültür karakteristiği, morfoloji, proliferasyon, metabolizma, sitoplazmik membran, mitokondri, lizozom ve kromozomal değerlendirme olarak sıralanabilir (Barile 2013). Bazı toksisite indikatörleri farklı kimyasalların net etkilerini belirleyebilir ve toksik olan son noktayı gösterebilme avantajına sahiptir (Barile 2013).

Hücre canlılığını belirlemek üzere MTT, XTT metodları, kristal viyolet-asit fosfataz, alamar mavisi oksidasyon redüksiyon testi, nötral kırmızısı gibi fonksiyonel testler geliştirilmiştir.

Kolorimetrik yöntemlerden tetrazolyum tuzları, metabolik aktivite testlerinin en yaygın kullanılanlarındandır. Tetrazolyum tuzlarının renksiz ya da hafif renkli aköz solüsyonlardan formazan olarak bilinen parlak renkli türevlerine indirgenmesi biyokimyasal uygulamalarda vital boya olarak kullanımlarının temelini oluşturmaktadır (Stoward ve Pearse 1991). Tetrazolyum tuzları kullanımları rahat ve ucuz araçlar olduğundan hücre kültürü uygulamalarında sıklıkla tercih edilmektedir (Berridge ve ark 2005). Boya molekülü üzerindeki net yük, hücre tarafından alınımdan ya da plazma membran potansiyeli yoluyla hücreden dışlanmadan sorumlu primer faktördür. Diğer faktörler ise tetrazol halkası ve molekülün lipofilisitesidir (Berridge ve ark 2005).

Hücre canlılık testlerinde kullanılan tetrazolyum tuzları aşağıdaki şekilde sıralanabilir;

- MTT 3-(4,5-dimetil-2-tiyazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolyum bromid
- MTS 5-[3-(karboksimetoksi)fenil]-3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2-(4-sülfofenil)-2H-tetrazolyum
- WST-1 sodyum 5-(2,4-disülfofenil)-2-(4-iyodofenil)-3-(4-nitrofenil)-2H-tetrazolyum monosodyum tuzu
- WST-8 2-(2-metoksi-4-nitrofenil)-3-(4- nitrofenil)-5-(2,4- disülfofenil)-2H tetrazolyum, monosodyum tuzu.
- XTT 2,3-bis(2-metoksi-4-nitro-5-sülfofenil)-2H-tetrazolyum-5-karboksanilid

XTT Tekniği

Tetrazolyum tuzları histokimyasal lokalizasyon çalışmalarında ve hücre biyolojisi deneylerinde belirleyici reaktifler olarak uzun yıllardır kullanılmaktadır (Altman 1976, Berridge ve ark 2005). Bir tetrazolyum tuzu olan XTT, Paull ve arkadaşları tarafından 1988 yılında sentezlenmiştir. XTT, hücre proliferasyonu, sitotoksisite ve apoptoz deneylerinde etkili bir şekilde kullanılabilir (Scudiero ve ark 1988, Marshall ve ark 1999, Berridge ve ark 2005).

XTT'nin indirgenmesi primer olarak hücre içindeki glikolitik aktiviteye bağlıdır. XTT deneyinin esası, hücre ölümü sonrası inaktive olan mitokondriyal enzimlerin aktivitesine dayanmaktadır. XTT'nin renkli formazana indirgenmesi metabolik olarak aktif hücrelerin mitokondrilerindeki süksinat tetrazolyum redüktaz sistemi aracılığıyla gerçekleşmektedir. Reaksiyon esas olarak mitokondriyal enzimler ve elektron taşıyıcılar üzerinden yürümektedir fakat birtakım mitokondriyal olmayan enzimler de bu reaksiyonda yer almaktadır. XTT'nin indirgendiği çözünebilir turuncu formazan boyasının abzorbansı spektrofotometrik okuyucuda 490 ya da 450 nm dalga boyunda ölçülebilir (Trevigen 2014).

XTT renksiz ya da hafif sarı renkli bir bileşik olup indirgendiğinde parlak portakal rengine dönüşmektedir. Bu renk değişikliği pozitif yüklü kuaterner tetrazol halkasının kırılması ve ayrılması sebebiyle gerçekleşir (Berridge ve ark 2005). XTT'nin giren hücrelerden net negatif yükü dolayısıyla dışarıda bırakıldığı düşünülmektedir (Berridge ve ark 2005). XTT deneyleri esasen hücrelerin piridin

nükleotid redoks durumlarını ölçmektedir (Marshall ve ark 1999, Berridge ve ark 2005). XTT kendi başına belirleyici reaktif olarak kullanılsa da sonuçlar optimum olamamaktadır. PMS (fenazin metasülfat)'nin XTT ile birlikte kullanımı XTT deneyinin sonuçlarını geliştirmektedir. Aradaki elektron taşıyıcısı olan PMS'nin kullanımıyla XTT deneylerinin hassasiyeti arttırılmıştır. PMS hücre düzeyinde elektronları toplayarak XTT redüksiyonunu düzenler ve XTT'yi yüksek pigmentli formazan ürününe indirgeyen reaktif ara maddeyi oluşturur. PMS, XTT'nin indirgenmesine ve bunun formazan türevinin oluşmasına yardımcı olur.

Aktif olarak prolifere olan hücrelerde XTT dönüşümündeki artış spektrofotometrik olarak değerlendirilmektedir. Bu değerin herhangi bir işleme tabi tutulmamış kontrol grubu ile karşılaştırılması sonucunda hücresel proliferatif aktivitenin göreceli artışı belirlenir.

İlk XTT hücre proliferasyonu deneyi Scuidero ve ark tarafından 1988 yılında yapılmıştır ve XTT'nin tümör hücre hatlarında ilaç hassasiyetini ve hücre gelişimini ölçmek için etkili bir metod olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada XTT'nin 1950'li yıllardan bu yana kullanılan ve kendisi gibi kolorimetrik test metodu olan MTT (difenil tetrazolyum bromid)'ye olan üstünlükleri de gösterilmiştir. MTT'nin aksine XTT ölçümden önce çözme gerektirmez. MTT ise çözünemeyen formazan oluşturur ve sonuçları alabilmek için boyayı çözdürmek gereklidir (Mosmann 1983). Ayrıca XTT'nin indirgenmesinin hassasiyeti daha yüksektir.

1.4. Hücre Apoptozu ve Flow Sitometri

Hücre ölümü, apoptoz ve nekroz olmak üzere iki başlık altında sınıflandırılabilir. Programlanmış hücre ölümü olarak bilinen apoptoz çok hücreli organizmalarda görülür (Green 2011) ve birtakım hücresel sinyal yollarıyla düzenlenir. Apoptoz, normal fizyolojik koşullarda ortaya çıkabilir ve hücre kendi ölümünde katılımcı rol oynar (Kerr ve ark 1972). Apoptozda hücre hasarına ve ölümüne yol açan bir takım biyokimyasal olaylar meydana gelir. Apoptozda hücresel fragmantasyon, kromozomal DNA'nın ayrılması, DNA'nın bozulması gözlenmektedir. Apoptotik hücre ölümü organellerin içe doğru büzülmesi, plazma membranının veziküler apoptotik gövdelere doğru çıkıntı oluşturması ve genetik materyalin bozulması ile karakterizedir (Aslan ve Thomas 2009). Nekroz ise hücre ölümünün pasif şeklidir ve hücrelerin ya da dokuların zamanından önce ölmesi

şeklinde tanımlanabilir. Nekroz boyunca hücreler ilk olarak şişer, plazma membranı büzülür ve sonrasında hücreler hızlı bir şekilde parçalanır (Proskuryakov ve ark 2003). Apoptoz ile hücrelerin ölümü ve eliminasyonu immun sistem tarafından farkedilmemiş olarak kalırken nekrotik hücrelerden ekstraselüler alana intraselüler içeriğin salımı enflamatuar cevabı indükler (Guimaraes ve Linden 2004). Yani apoptotik hücreler makrofajlar tarafından temizlenir dolayısıyla ölen hücrenin etrafında enflamasyon gözlenmez.

Apoptoz ve nekroz çoğu yönlerden birbirinden farklıdır. Bazen uyaranın derecesi hücrenin apoptoza ya da nekroza gideceğini belirler. Hipoksi örneği ile açıklanacak olursa düşük konsantrasyonlarda uyaranlar apoptozu indükleyebilirken aynı uyaranın yüksek dozu nekroza yol açabilmektedir (Elmore 2007).

Hücrelerin sitotoksik ajanlara maruz bırakılması nekroz ya da apoptoza sebebiyet verebilir. Kullanılan endodontik materyal sitotoksik ise hücre ölümünün şeklinin tespit edilmesi, materyalin biyouyumluluğunun belirlenmesi açısından faydalı olacaktır. Apoptoz, hücreler toksik dental materyallere maruz bırakıldığında da oluşabilir. Bundan dolayı apoptozun analiz edilmesi dental materyallerin sitotoksisitesi için ilave bir belirleyici olarak kullanılabilir.

Flow sitometri, hücreler ya da kromozomlar gibi mikroskobik partiküllerin sayılması ve incelenmesi için kullanılan bir tekniktir. Bu teknikte hücreler akan bir sıvının içerisine konur ve elektronik belirleyici bir aparatın içerisinden geçirilir. Flow sitometri kullanılarak bir saniyede binlerce hücrenin fiziksel ya da kimyasal karakteristiğinin eş zamanlı analizi yapılabilmektedir. Flow sitometri moleküler biyoloji, patoloji, immünoloji, bitki biyolojisi ve deniz biyolojisi gibi bilim dallarında pek çok uygulama alanına sahiptir. Yine tıp alanında da özellikle kan kanseri gibi hastalıkların teşhisinde, transplantasyon, hematoloji, tümör immünolojisi ve genetik bilimlerinde bu biyoteknoloji sıklıkla kullanılmaktadır (Wikimedia 2014).

Flow sitometri, hem hücre siklusu analizine hem de apoptozisin belirlenmesine olanak sağlayan eşsiz bir metoddur. Literatürde dental materyallerin ya da kök ucu dolgu maddeleri ve perforasyon tamir materyallerinin hücreler üzerindeki apoptotik etkisini belirlemek üzere flow sitometri yöntemini kullanan pek çok çalışma bulunmaktadır (Lin ve ark 2004, Hernandez ve ark 2005, Görduysus ve

ark 2007, Samuelsen ve ark 2008, Wei ve ark 2012, Zhou ve ark 2013, Eid ve ark 2014)

1.5. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) – Enerji Dağılımlı X Işını Analizi (SEM-EDX)

Taramalı elektron mikroskobu (SEM) katı örneklerin yüzeyindeki çok küçük bir noktaya odaklanan yüksek enerjili elektronlarla yüzeyin taranması prensibiyle çalışır. Elektron ve örnek etkileşimlerinden kaynaklanan sinyaller örneğin eksternal morfolojisi (dokusu), kimyasal kompozisyonu ve yapısı hakkında bilgi verir. Elektronlar örnek ile etkileşirken sekonder elektronları, geri yansıyan elektronları ve karakteristik X ışınını üretirler. Daha sonra bilgisayar ekranında gösterilecek olan görüntüleri üretmek amacıyla bu sinyaller, bir ya da daha fazla dedektör tarafından toplanır. Elektron ışını örnek yüzeyine çarptığında, hızlanan voltaj ve örneğin yoğunluğuna bağlı olarak birkaç mikron derinliğinde örneğin içerisine doğru penetre olur. Sekonder elektronlar ya da X ışını gibi sinyaller, örnek içerisindeki bu etkileşimler sonucunda üretilir. Bir SEM görüntüsünde görülebilecek en ufak ayrıntı 4-5 nm'dir. SEM ile analiz edilebilecek en küçük detay ise 2-3 μm boyutundadır (Glafo 2014).

Özel örnek hazırlama yöntemleri ile hazırlandığında biyolojik materyaller de SEM ile incelenebilmektedir. Biyolojik örnekleri SEM ile inceleyebilmek için, örneklerin yeteri kadar kuru ve dayanıklı olması ve örneğin altın ya da metal gibi ince bir metal tabakası ile kaplanması gerekmektedir.

EDS ya da EDAX olarak da kısaltılan enerji dağılımlı X ışını analizi (EDX), materyallerin elemental kompozisyonunu belirlemek için kullanılan bir X ışını tekniğidir. EDX sistemleri, SEM ya da TEM gibi elektron mikroskoplarına ilave edilerek kullanılmaktadır. SEM-EDX analizi en iyi bilinen ve yaygın olarak kullanılan yüzey tahlil tekniğidir. Yüksek odaklı tarayıcı (primer) elektron ışını ile yüzey topografisinin yüksek çözünürlüklü görüntüleri oluşturulmaktadır. Primer elektronlar, 0,5-30 kV enerji ile yüzeye girerler ve çok sayıda düşük enerjili sekonder elektron üretirler. Bu sekonder elektronların yoğunluğu örneğin yüzey topografisi tarafından kontrol edilir. Dolayısıyla örnek yüzeyinin görüntüsü sekonder

elektronların yoğunluğunun ölçülmesiyle inşa edilir. Primer elektron ışını, 10 nm'den daha küçük noktaya odaklanabildiğinden SEM-EDX analizinde yüksek uzaysal çözünürlük mümkün olabilmektedir.

Düşük enerjili sekonder elektronlara ilave olarak, geri yansıyan elektronlar ve X ışını da primer elektron bombardımanında üretilmektedir. Geri yansıyan elektronların yoğunluğu örnekleme hacmi dahilindeki elementin atom numarası ile ilişkilendirilebilir. Bunun sonucu olarak bazı niteliksel element bilgileri elde edilebilmektedir. Örnekten yayılan karakteristik X ışınının analizi niceliksel elemental bilgi vermektedir. EDX analizi tarafından üretilen veri, incelenen örneğin gerçek kompozisyonunu oluşturan elementlere karşılık gelen pikleri gösteren spektrumu içermektedir. EDX ile aynı zamanda örneğin elemental haritalaması ve görüntü analizi de mümkün olmaktadır (İntertek 2014).

Deneysel materyallerin avantajlı özellikleri, onları kök ucu dolgusu ve perforasyon tamiri için aday hale getirmektedir. Pek çok yeni ürüne karşı oluşabilecek muhtemel doku cevabı ile ilgili bilgimiz kısıtlıdır.

Bu çalışmanın amacı dört yeni kök ucu dolgu ve perforasyon tamir materyali olan Biodentine (Septodont, Fransa), MM-MTA (MicroMega, Fransa), polimetilmetakrilat (PMMA) kemik simanı (AF cement, Laboratorios, Arjantin), SDR (Dentsply, Almanya) materyallerinin periodontal ligament fibroblastları üzerindeki toksik etkilerini değerlendirmek ve bu yeni materyalleri güncel olan IRM (Dentsply, ABD), Dyract Kompomer (Dentsply, Almanya), ProRoot MTA (Dentsply Maillefer, Ballaigues, İsviçre), Vitrebond (3M ESPE, Almanya) kök ucu dolgu ve perforasyon tamir materyalleri ile 2,3-bis-(2-metoksi-4-nitro-5-sülfofenil)-2H-tetrazolyum-5-karboksanilid (XTT) analizi kullanarak karşılaştırmaktır. Çalışmanın ikinci kısmında yeni materyallerin eluatlarının, insan periodontal ligament fibroblast hücreleri üzerindeki apoptotik etkisinin değerlendirilmesi, yaygın kullanılan materyaller ile flow sitometri kullanılarak karşılaştırılması ve periodontal ligament fibroblastlarının bu materyaller üzerindeki ataçmanının SEM ile değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

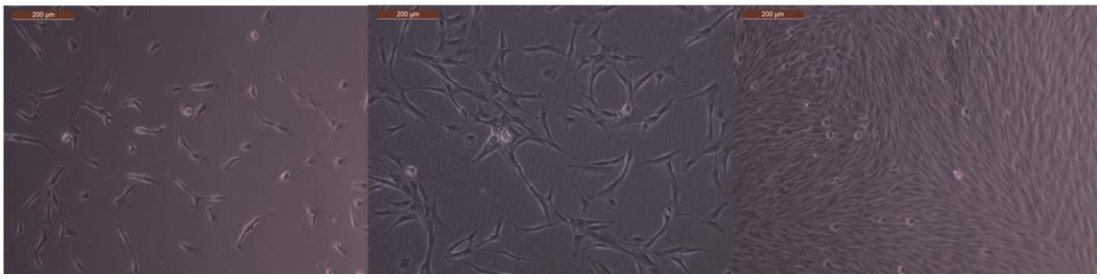
2. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma Selçuk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Etik Kurulu'nun 09.12.2013 tarihli ve 2013/11 sayılı kararı tarafından onaylandı (Bkz EK). Bu *in vitro* çalışma, Selçuk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Araştırma Merkezi, Selçuk Üniversitesi İleri Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi ve Afyon Kocatepe Üniversitesi Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde yapıldı.

2.1. Hücre Kültürü:

İnsan periodontal ligament fibroblast (PDL) hücreleri Selçuk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Ağız, Diş ve Çene Hastalıkları Cerrahisi Bölümü'ne ortodontik nedenlerle çekim yaptırmak üzere başvuran 11 ve 17 yaşlarında bayan iki hastanın üst birinci küçük azı dişlerinin periodontal ligament dokusundan izole edilerek elde edildi. Hücre kültürü prosedürleri, Selçuk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Etik Kurul Komitesi kurallarına uygun olarak gerçekleştirildi ve her hastadan bilgilendirilmiş onam formu alındı. Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)'dan 500 ml alınarak ve içerisine 50 ml FBS (Fetal Bovin Serum), 5 ml 100 U/ml penisilin + 100 mg/ml streptomisin eklenerek hücre kültür medyası hazırlandı. Hazırlanan kültür medyasından 15 ml'lik iki adet falkon tüpe 5'er ml eklendi. Hemen çekimi yapılan dişler herhangi bir yer ile temas ettirilmeden 15 ml'lik falkon tüplerde hazırlanmış olan hücre kültür medyasının içine aktarıldı. PDL hücrelerinin primer kültürü Rompen ve ark (1999)'nın çalışmasında bahsedilen prosedürlerde minör modifikasyonlar yapılarak elde edildi. Falkon tüplerdeki hücre kültür medyası boşaltıldı ve dişler 60 ml'lik hücre kültür kaplarına aktarıldı. Dişler üzerine taze hücre kültür medyası eklendi. Dişler, 60 ml'lik hücre kültür kabının tabanına presel yardımıyla sabitlendi ve kökün orta üçlüsündeki periodontal ligament dokusu steril bir bistüri yardımıyla kazındı. Medya içerisindeki doku parçacıkları pastör pipet yardımıyla toplandı ve falkon tüpe aktarıldı. Falkon tüp 800 RPM'de 5 dakika santrifüjlendi. Santrifüjden sonra falkonda yüzeydeki süpernatant pastör pipet ile toplandı. Doku parçacıklarının üzerine tekrar taze kültür medyası eklendi. Medya ve doku parçacıklarının homojen karışması sağlandı. Tekrar 800 RPM'de 5 dakika santrifüjlendi. Süpernatant toplandı ve kalan doku parçacıklarının üzerine taze medya eklenip karıştırıldı. Sıkıştırılmış hücre pelleti, ataçmanının sağlanması için 6 kuyucuklu hücre kültür kabında bulunan hücre kültür medyası (DMEM) içine yeniden bırakıldı ve 37 °C'de % 95 hava-% 5 CO_2 atmosferinde inkübe edildi. Hücre

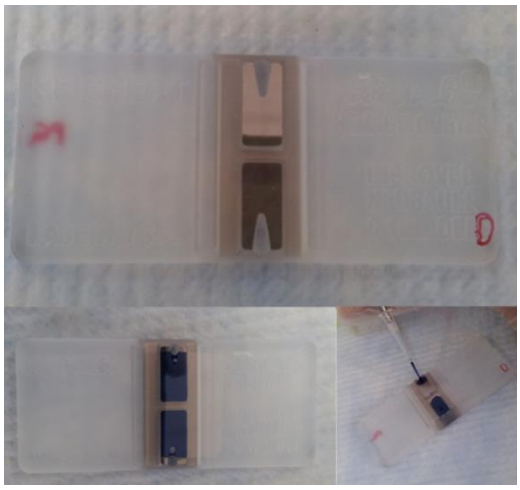
kültür kabının tabanına yapışan PDL hücrelerinin invert mikroskopta fotoğrafları çekildi (Resim 2.1). Hücreler birbirleriyle temas eder hale gelinceye kadar büyütüldü. Sonrasında %0,05'lik tripsin kullanılarak tripsinleme işlemi yapıldı ve hücre popülasyonunu genişletmek amacıyla 25 cm^2'lik kültür flasklarında pasaj yapıldı (ilk hücre pasajı). Bütün deneylerde 4. ve 7. pasajdan kültürü yapılan hücreler kullanıldı.



Resim 2.1. Hücre kültür flaskının tabanına yapışmış olan insan PDL hücrelerinin invert mikroskop görüntüsü (soldan sağa 7, 10 ve 14. günler) (10x büyütme)

2.1.1. Hücre Sayımı

Falkonda bulunan hücre süspansiyonu 1000'lik pipet yardımıyla karıştırıldı. 200'lük pipet kullanılarak 100 µl hücre süspansiyonu 1 ml'lik plastik eppendorf tüpü içerisine aktarıldı. Eppendorf tüpü üzerine 50 µl tripan mavisi eklendi ve karıştırıldı. Hemositometrenin her iki alanına 10'ar µl tripan mavisi-hücre karışımı yerleştirildi (Resim 2.2). Işık mikroskobu altında hemositometrenin her iki alanındaki hücreler sayılıp ortalaması alındı. Bu ortalama 10^4 ve dilüsyon faktörü ile çarpılarak mililitredeki toplam hücre sayısı hesaplandı.

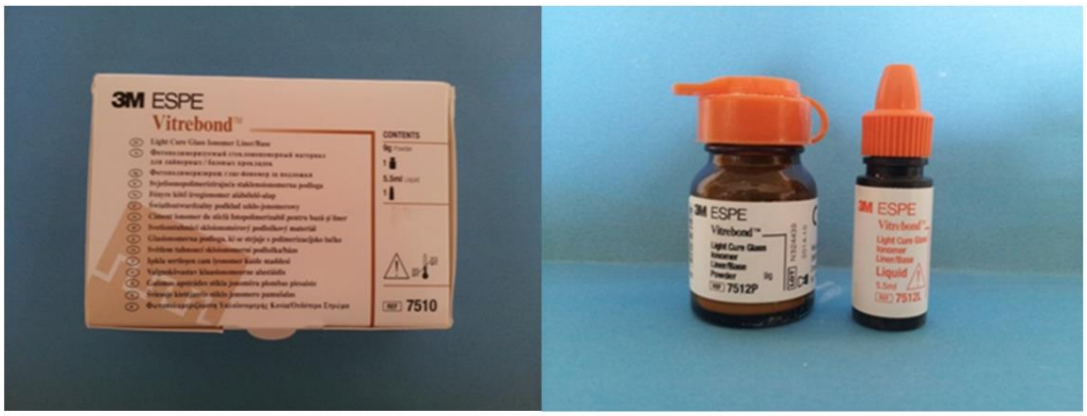


Resim 2.2. Hemositometrede hücre sayımı

2.2. Materyal Örneklerinin Hazırlanması

Grup 1: Vitrebond (Işıkla Sertleşen Cam İyonomer Siman)

Vitrebond'un (3M ESPE, S. Paul, MN, ABD) (Resim 2.3) üretici firması tozun likite oranı değiştirilerek karışımın akıcılığının değiştirilebileceğini belirtmiştir. Bu oranın 1 kaşık toz / 2 damla likitten, 2 kaşık toz / 1 damla likite kadar kabul edilebilir seviyede olduğu belirtilmiştir. Kök ucu dolgu veya perforasyon tamir materyali katılığı elde edebilmek amacıyla Vitrebond grubunun materyal örnekleri 1 damla likit ile 2 kaşık toz karıştırılarak hazırlandı. Her bir örnek 30 saniye 1200 mW/cm^2 güce sahip LED ışık kaynağı (Bluephase, Ivoclar Vivadent, Lichtenstein, Almanya) ile polimerize edildi.



Resim 2.3. Vitrebond

Grup 2: Biodentine

Biodentine (Septodont, Saint-Maur-des-Fosses, Fransa) (Resim 2.4) grubunun materyal örnekleri üretici firma talimatlarına göre hazırlandı. Bir kapsül Biodentine tozu içerisine 5 damla likit ilave edildi. Amalgamatörde 30 saniye karıştırıldı.



Resim 2.4. Biodentine

Grup 3: IRM (Intermediate Restorative Material)

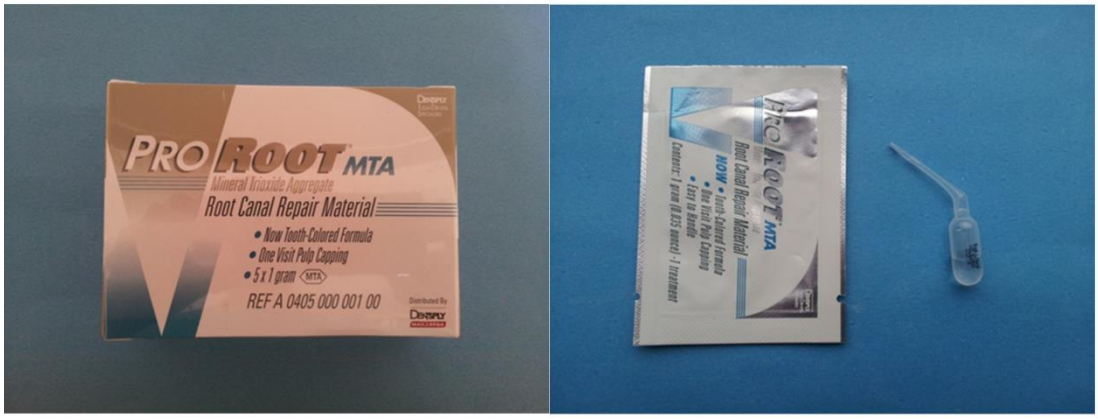
IRM (Dentsply, ABD) (Resim 2.5), grubunun materyal örnekleri 1 damla likit ile 1 kaşık toz karıştırılarak hazırlandı.



Resim 2.5. IRM

Grup 4: PMTA (ProRoot Mineral Trioxide Aggregate)

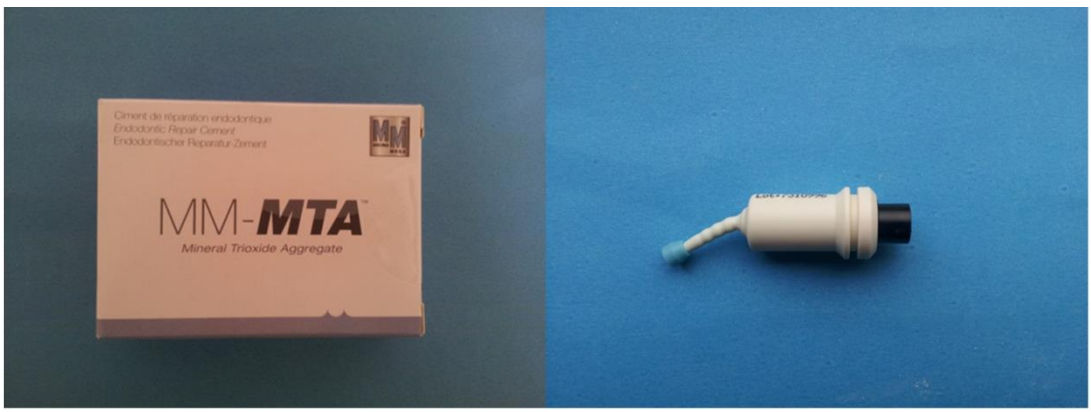
ProRoot MTA (Dentsply Maillefer, Ballaigues, İsviçre) (Resim 2.6) grubunun materyal örnekleri üretici firmanın talimatlarına göre yani 1 paket toz 1 kapsül likit karıştırılarak hazırlandı. Örneklerin sertleşme reaksiyonlarını tamamlamaları için nemli ortamda 4 saat bekletildi.



Resim 2.6. ProRoot MTA

Grup 5: MM-MTA (Micro Mega Mineral Trioxide Aggregate)

Hazır kapsüller içindeki MM-MTA (MicroMega, Besançon, Fransa) (Resim 2.7) örnekleri kapsül aktive edildikten sonra 30 saniye amalgamatörde karıştırılarak elde edildi.



Resim 2.7. MM-MTA

Grup 6: SDR (Smart Dentine Replacement)

Bir akışkan kompozit olan SDR (Dentsply, Almanya) (Resim 2.8) kompozit örnekleri LED ışık kaynağı ile 20 saniye polimerize edildi.



Resim 2.8. SDR

Grup 7: Dyract Kompomer

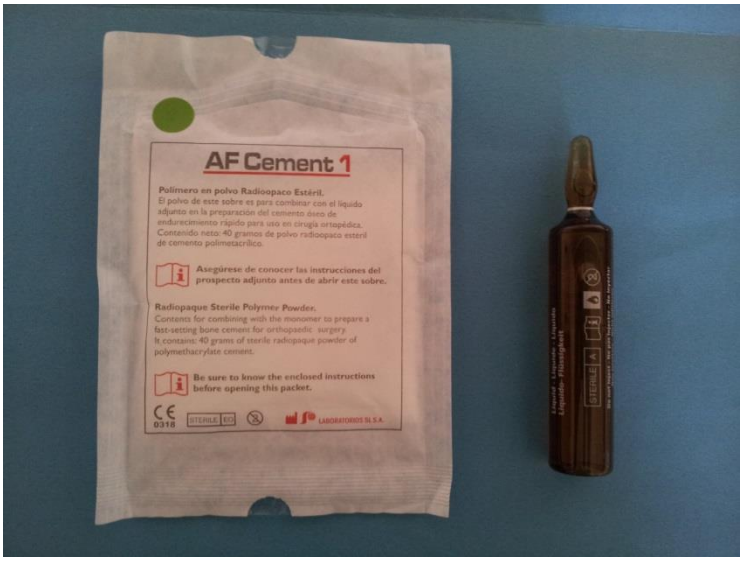
Hazır kapsüller içerisindeki Dyract kompomer (Dentsply, Almanya) (Resim 2.9), LED ışık kaynağı ile 20 saniye polimerize edildi.



Resim 2.9. Dyract Kompomer

Grup 8: PMMA (Polimetil Metakrilat) Kemik Simanı

PMMA kemik simanı (AF cement, Laboratorios, Arjantin) (Resim 2.10) grubunun materyal örnekleri üretici firma talimatlarına göre 2 gr toz ile 1 ml likit karıştırılarak hazırlandı.



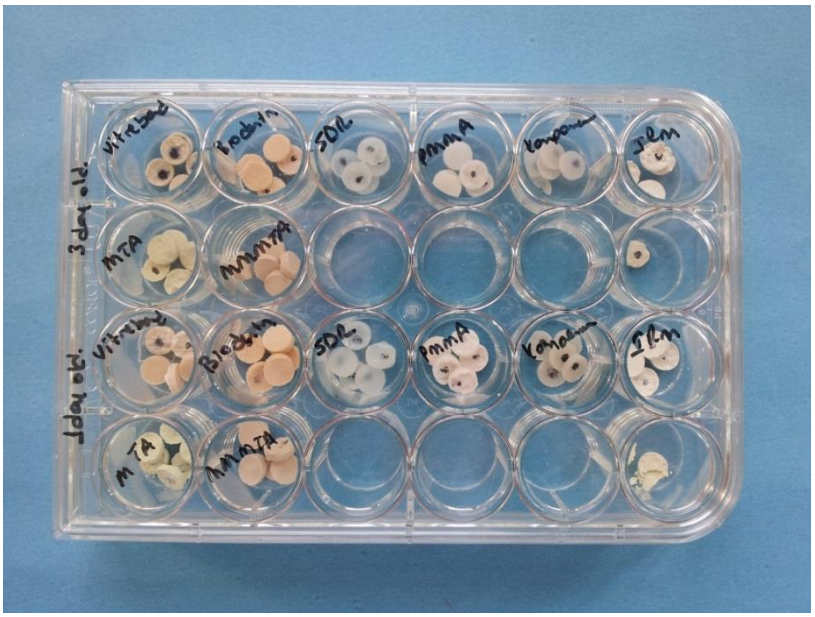
Resim 2.10. PMMA kemik simanı

Deney gruplarının bütün örnekleri teflon kalıplar içerisinde hazırlandı. Materyal diskleri, 6 mm çapında ve 2 mm yüksekliğinde oluşturuldu ve başlangıç sertleşme reaksiyonlarının tamamlanması sağlandı. IRM, PMTA, Vitrebond, PMMA kemik simanı gruplarında toz ve likit karıştırılarak, SDR akışkan kompozit ve Dyract kompomer ışık ile, MM-MTA ve Biodentine gruplarında da kapsüller amalgamatörde karıştırılarak sertleşme reaksiyonları başlatıldı. İndirek sitotoksisite testi için her bir deney grubu kendi içinde 1 günlük sertleşen ve 3 günlük sertleşen olmak üzere iki alt gruba ayrıldı. Her grubun materyal örnekleri başlangıç sertleşme reaksiyonu tamamlandıktan sonra 37°C'de ve %100 nemlilikte 1 gün ve 3 gün inkübe edildi.

2.3. Materyal Eluatlarının Hazırlanması ve İndirek Sitotoksisite Testi:

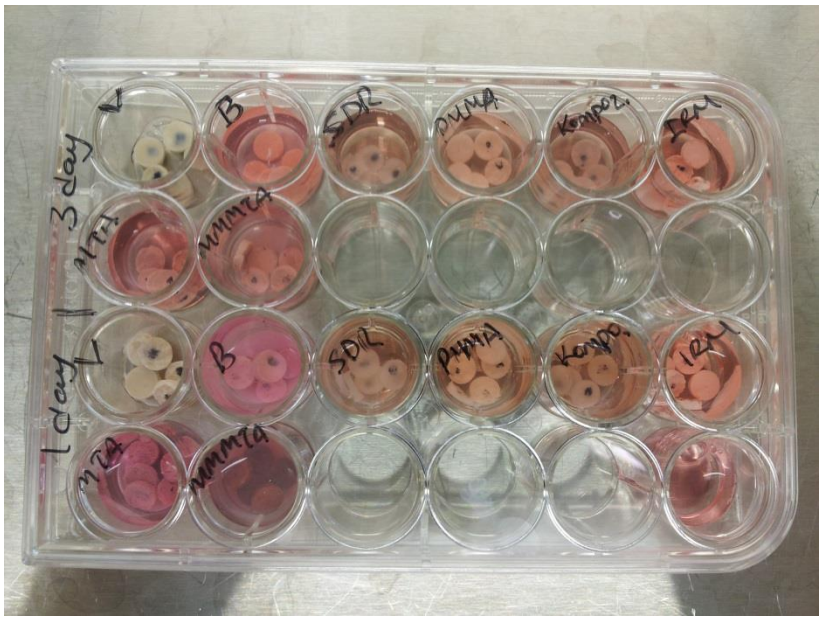
2.3.1. Materyal Eluatlarının Hazırlanması:

İndirek sitotoksisiteyi belirlemek amacıyla her bir gruptan 5 tanesi 1 günlük sertleşen 5 tanesi de 3 günlük sertleşen olmak üzere 10 adet materyal disk hazırlandı. Bir günlük ve 3 günlük sertleşen örnekler her bir yüzü 20 dakika olacak şekilde ultraviyole ışığı altında bırakılarak steril edildi (Ma ve ark 2011). Sterilizasyonu sağlanan materyal örnekleri 24 kuyucuklu hücre kültür kabının kuyucuklarına bir kuyucukta 5 örnek olacak şekilde yerleştirildi (Resim 2.11)



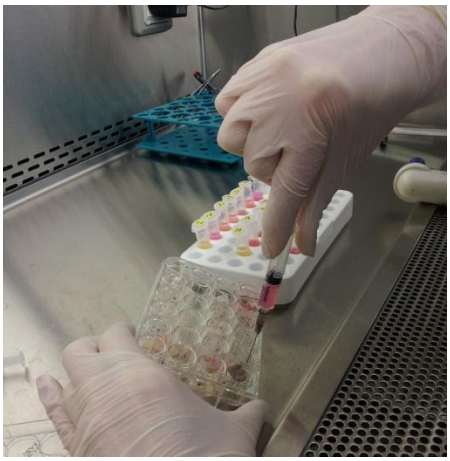
Resim 2.11. Bir günlük ve 3 günlük sertleşen örneklerin 24 kuyucuklu hücre kültür kabına yerleştirilmesi

ISO standartlarına göre 3cm^2/ml olacak şekilde silindir şekilli örneklerin yüzey alanı hesaplaması yapıldı (ISO 2009). Bir kuyucukta bulunan 5 materyal için 1400 µl (280x5) hücre kültür medyası (%10 FBS ve %1 penisilin + streptomisin içeren DMEM) örneklerin üzerine eklendi (Resim 2.12) Hücre kültür medyası ile muamele edilen materyal örnekleri 37°C'de 24 saat inkübe edildi.



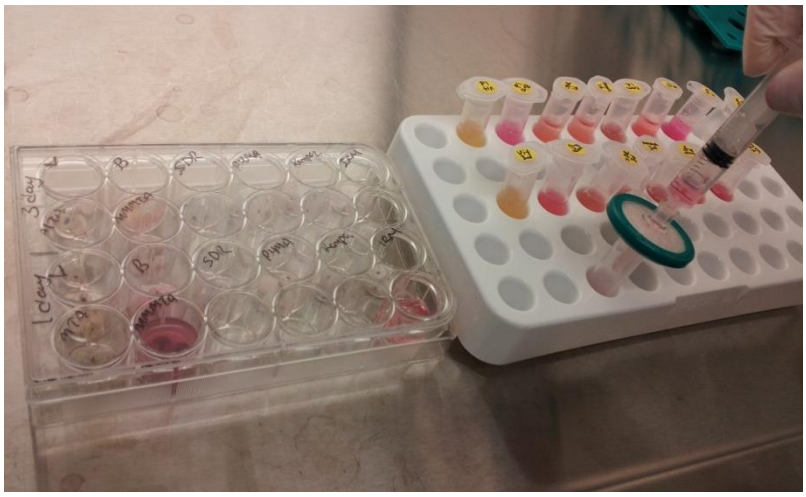
Resim 2.12. Sertleşmesi tamamlanan örneklerin hücre kültür medyası ile 24 saat inkübasyonu

İnkübasyon süreci tamamlandıktan sonra materyaller üzerindeki 24 saatlik eluatlar 2,5 cc'lik enjektör yardımıyla 24 kuyucuklu hücre kültür kabından toplandı (Resim 2.13).

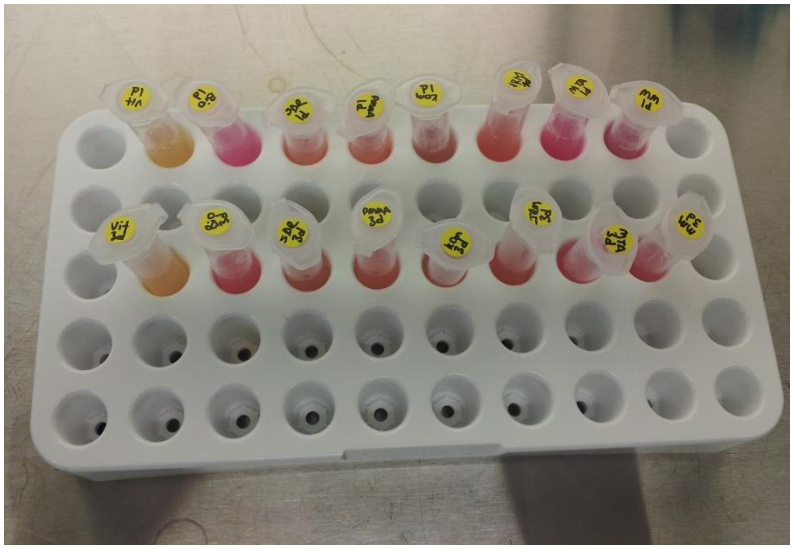


Resim 2.13. Materyal eluatlarının enjektör yardımıyla toplanması

0,22 μm'lik filtreden geçirilen 24 saatlik eluatlar (Resim 2.14) 1,5 ml'lik eppendorf tüplerine aktarıldı (Resim 2.15).



Resim 2.14. Materyal eluatlarının filtreden geçirilmesi



Resim 2.15. Eppendorf tüplerine aktarılan materyal eluatları

Orijinal materyal eluatları 1/1, 1/2, 1/4, 1/8 oranlarında seyreltilerek farklı dilüsyonları hazırlandı. Seri dilüsyon için eppendorf tüpleri içerisine 500 µl besiyeri aktarıldı. Orijinal materyal eluatının (1/1) bulunduğu tüpten 500 µl eluat alıp besiyeri bulunan tüpe aktarıldı. Besiyeri ve eluat karıştırıldı (1/2). Bu karışımdan 500 µl alınıp diğer tüpe aktarıldı (1/4). Ve aynı işlem üçüncü tüp için de gerçekleştirildi (1/8). Bu şekilde materyal eluatlarının farklı konsantrasyonları hazırlandı (Resim 2.16).



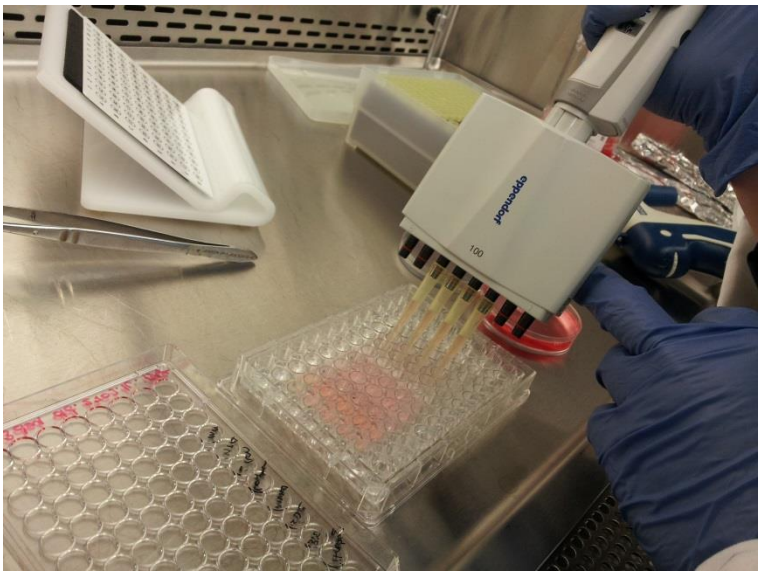
Resim 2.16. Materyal eluatlarının dilüsyonu 1/2, 1/4, 1/8'lik konsantrasyonlarının hazırlanması

2.3.2. İndirek Sitotoksisite Testi için Hücrelerin Hazırlanması:

İndirek sitotoksisite testi için;

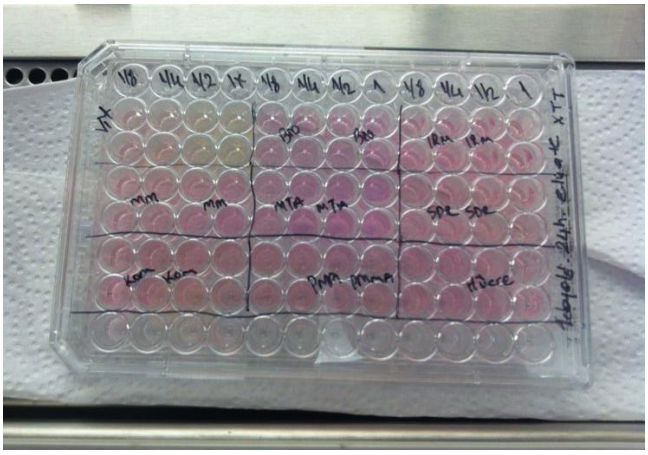
1) Bir günlük sertleşen örneklerin 24 saatlik eluatının 24 saat hücre ile inkübasyonu,
2) Üç günlük sertleşen örneklerin 24 saatlik eluatının 24 saat hücre ile inkübasyonunu değerlendirmek üzere 2 tane 96 kuyucuklu hücre kültür kabı kullanıldı.

İki adet 96 kuyucuklu hücre kültür kabında, kuyucuk başına 5000 hücre olacak şekilde her bir kuyucuğa 50 µl hücre kültür medyası ve 50 µl hücre süspansiyonu eklendi (Resim 2.17). PDL hücrelerinin, hücre kültür kabına yeterli derecede ataçmanının sağlanması için 37°C'de 24 saat inkübe edildi.



Resim 2.17. 96 kuyucuklu hücre kültür kabına 5000 hücre/kuyucuk olacak şekilde PDL hücrelerinin ekilmesi

PDL hücrelerinin 96 kuyucuklu hücre kültür kabında 24 saat inkübasyonu sonrasında kullanılmış besiyerler kuyucuklardan aspiratör yardımıyla çekildi. Besiyerleri çekilmiş olan ve hücrelerin tabanına yapıştığı 96 kuyucuklu hücre kültür kabının kuyucuklarına, 1 günlük sertleşen ve 3 günlük sertleşen materyallerin 24 saatlik eluatlarının 1/1, 1/2, 1/4 ve 1/8'lik konsantrasyonlarından 100'er µl aktarıldı (Resim 2.18). Hücre kontrol grubu için de kuyucuklardan besiyeri aspire edildikten sonra 100'er µl taze hücre kültür medyası eklendi.



Resim 2.18. Materyal eluatlarının farklı konsantrasyonlarının hücreler üzerine eklenmesi

Farklı konsantrasyondaki materyal eluatları hücreler ile 37°C'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon süreci tamamlandıktan sonra XTT analizi yapıldı.

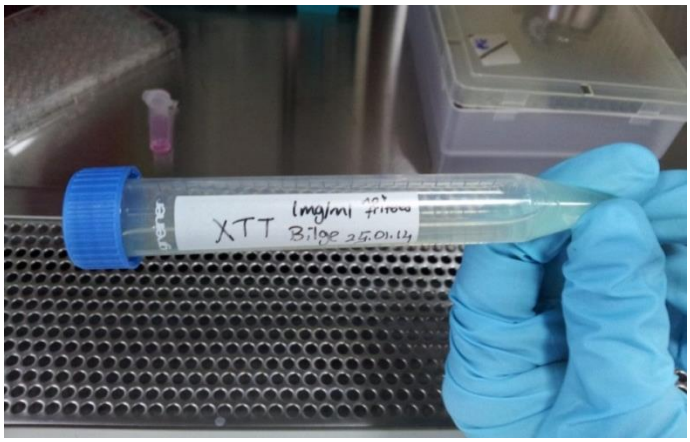
2.3.3. XTT Çalışma Solüsyonunun Hazırlanması

XTT (SERVA Electrophoresis, Heidelberg, Almanya) (Resim 2.19) solüsyonu daha önce Scudiero ve ark (1988)'nın belirttiği üzere deney için hazırlandı.



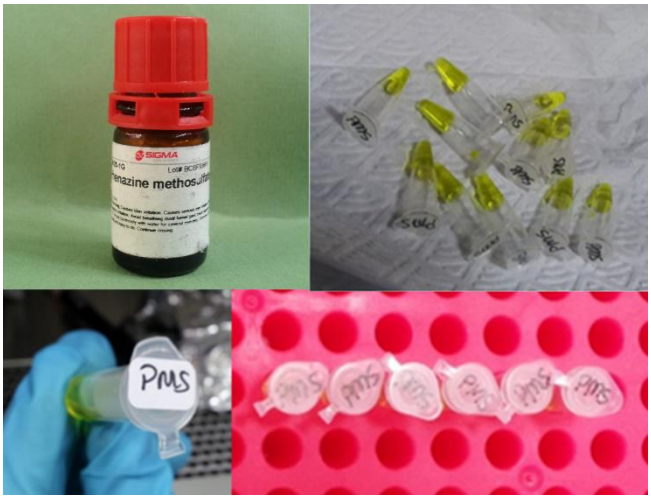
Resim 2.19. XTT (Güneşer 2013)

10 mg XTT tozu ile 10 ml fosfat tamponlanmış çözelti (PBS, pH=7,2, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ABD) 15 ml'lik falkon tüp içerisinde karıştırılarak 1 mg/ml XTT hazırlandı (Resim 2.20).



Resim 2.20. 1 mg/ml XTT'nin hazırlanması

PMS (N-metil dibenzopirazin metil sülfat) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ABD) tozundan 15,3 mg alındı ve 10 ml PBS ile karıştırılarak 1,53 mg/ml PMS hazırlandı. 1,5 ml'lik eppendorf tüplerine alikotlama yapıldı (Resim 2.21).

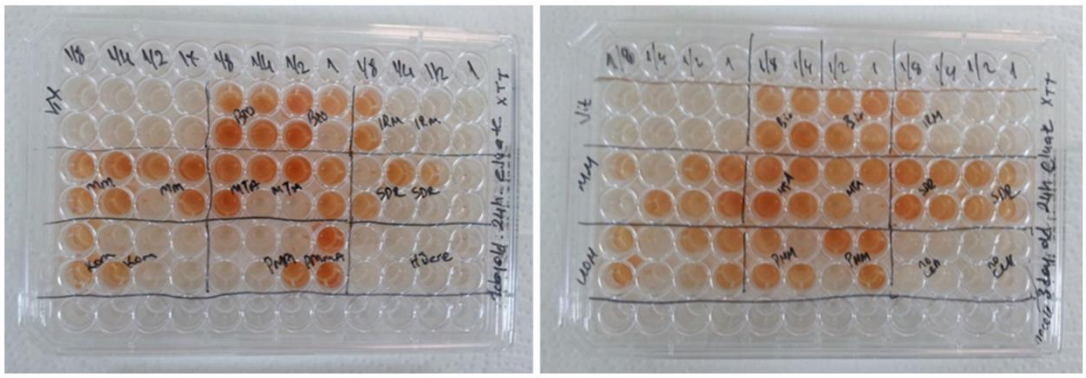


Resim 2.21. PMS tozu ve 1,53 mg/ml PMS'nin hazırlanması

Karanlık ortamda, 1,53 mg/ml PMS'den 50 µl ve 1 mg/ml XTT'den 5 ml karıştırılarak XTT çalışma solüsyonu hazırlandı.

2.3.4. XTT Analizi

Bir günlük ve 3 günlük sertleşen örneklerin 24 saatlik eluatlarının 24 saat hücre ile inkübasyonu sonrasında 96 kuyucuklu hücre kültür kabının kuyucuklarındaki hücre-eluat karışımı aspire edildi. Farklı eluat konsantrasyonlarına maruz bırakılan PDL hücrelerinin morfolojilerindeki değişiklikleri değerlendirmek amacıyla invert mikroskop (Leica DM IL LED, Almanya) altında 10x büyütmede çok hızlı bir şekilde kuyucuk tabanlarının fotoğrafı alındı. Daha sonra her bir kuyucuğa 100'er µl renksiz besiyeri ve 50 µl XTT çalışma solüsyonu eklendi ve 96 kuyucuklu hücre kültür kapları XTT solüsyonu ile 37°C'de 5 saat inkübe edildi (Resim 2.22). Oluşan solüsyonda meydana gelen renk değişimleri 460 nm dalga boyunda okundu (Resim 2.23). XTT testi üç kez tekrar edildi.



Resim 2.22. Bir günlük ve 3 günlük sertleşen materyallerin 24 saatlik eluatlarının XTT çalışma solüsyonu ile 5 saat inkübasyonu sonrasında görüntüsü

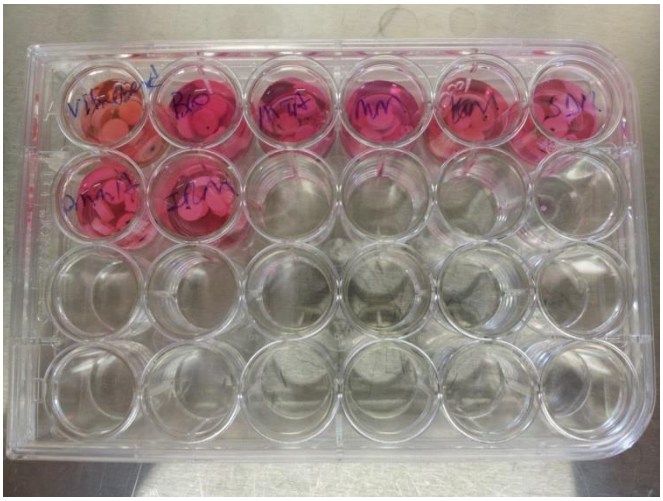


Resim 2.23. XTT solüsyonunun optik yoğunluğunun ölçümünde kullanılan spektrofotometrik okuyucu

2.4. Flow Sitometri Analizi

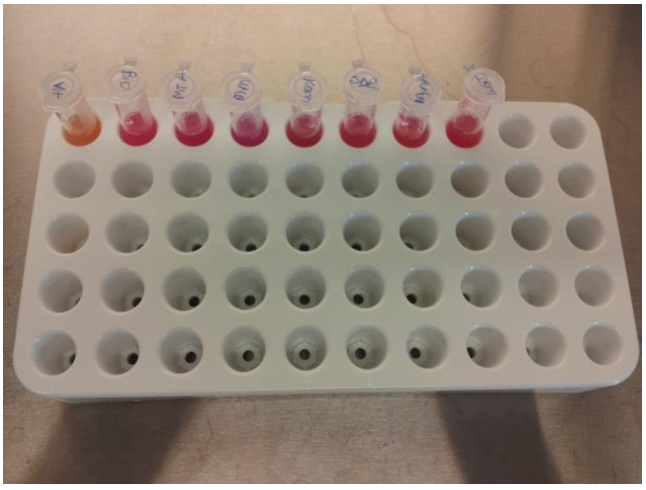
XTT sonuçları değerlendirildikten sonra, flow sitometri analizi için 3 günlük sertleşen materyal örneklerinin eluatlarının 1:8'lik konsantrasyonu seçilmiştir. Materyal örnekleri yukarıda daha önce belirtildiği şekilde hazırlandı ve nemli ortamda 37°C'de 3 gün inkübe edildi. Üç günlük sertleşen örnekler her bir yüzü 20 dakika olacak şekilde ultraviyole ışığı altında bırakılarak steril edildi (Ma ve ark 2011). Sterilizasyonu sağlanan 8 grubun materyal örnekleri 24 kuyucuklu hücre

kültür kabının kuyucuklarına bir kuyucukta 5 örnek olacak şekilde yerleştirildi. İndirek sitotoksisite testi için uygulandığı şekliyle eluat elde edebilmek için bir kuyucukta bulunan 5 materyal için 1400 µl hücre kültür medyası (%10 FBS ve %1 penisilin + streptomisin içeren DMEM) örneklerin üzerine eklendi (Resim 2.24) Hücre kültür medyası ile muamele edilen materyal örnekleri 37°C'de 24 saat inkübe edildi.



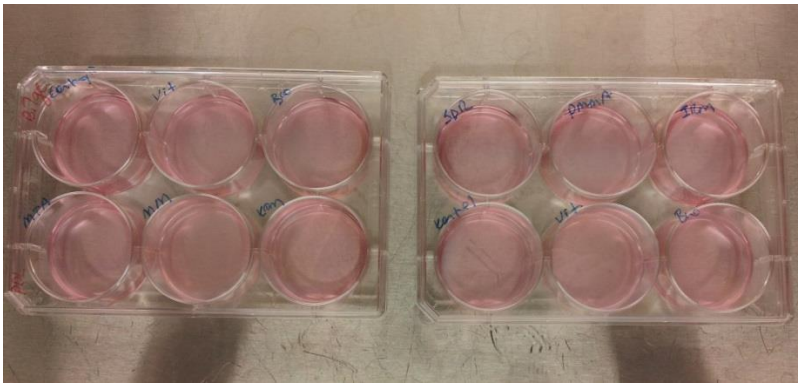
Resim 2.24. Üzerine hücre kültür medyası eklenen 3 günlük sertleşen materyallerin inkübatöre yerleştirilmeden önceki görüntüsü

Materyaller üzerindeki eluatlar 2,5 cc'lik enjektör yardımıyla toplandıktan sonra 0,22 µm'lik filtreden geçirilerek ependorf tüplerine aktarıldı (Resim 2.25).



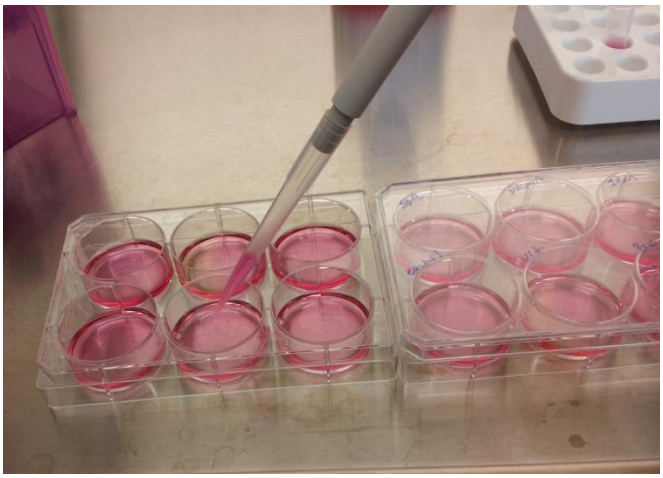
Resim 2.25. Üç günlük sertleşen materyallerin 24 saatlik eluatları

Flow sitometri analizi için 6 kuyucuklu hücre kültür kabına PDL hücreleri 50.000 hücre/ml olacak şekilde ekildi (Resim 2.26). Her bir kuyucuğa 1,5 ml hücre süspansiyonu eklendi. Hücrelerin kültür kabının tabanına adezyon sağlamaları için mikroplakalar ekimi takiben inkübatörde 24 saat 37°C'de bekletildi.



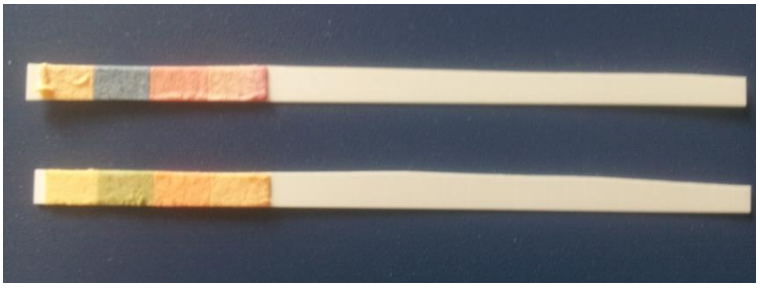
Resim 2.26. 6 kuyucuklu hücre kültür kabına ekilen PDL hücreleri

Sonrasında PDL hücrelerinin üzerine, hücre kontrol gruplarında 500 µl taze besiyeri eklendi. Test gruplarında ise her bir kuyucuğa 250 µl besiyeri ve 250 µl seyreltilmemiş eluat eklendi (Resim 2.27). Bu şekilde 1:8'lik eluat konsantrasyonu elde edildi. Eluatlarla muamele edilen PDL hücrelerinin bulunduğu 6 kuyucuklu hücre kültür kabı 37°C'de 24 saat inkübe edildi.



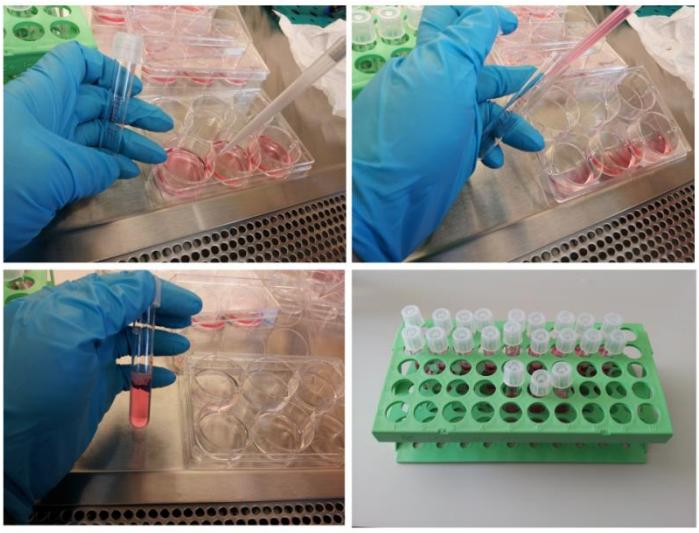
Resim 2.27. PDL hücrelerinin üzerine eluatların eklenmesi

Flow sitometri için kullanılan seyreltilmemiş eluatların artan kısımlarının pH değerleri pH kağıdı (Merck Millipore, Almanya) kullanılarak ölçüldü (Resim 2.28).



Resim 2.28. Materyallerin seyreltilmemiş eluatlarının pH değerlerini ölçen pH kağıtları

Altı kuyucuklu hücre kültür kabında eluatlar ile muamele edilen PDL hücreleri 24 saatlik inkübasyon sürecini tamamladıktan sonra toplandı ve flow tüplerine aktarıldı. Hücre kültür kabının tabanına yapışan hücreler Hanks Balanced Salt Solution (HBSS) ile iki kere yıkandıktan sonra her bir kuyucuğa 500 µl tripsin eklendi. Tripsinlenen PDL hücreleri inkübatörde 5 dakika bekletildi. Bu işlem hücreleri yüzeyden kaldırmak için yapıldı. İnkübatörden çıkarılan hücre kültür kaplarının her bir kuyucuğuna 500 µl besiyeri eklendi. Hem yüzen hem de yüzeye yapışan hücreler toplanarak flow tüplerine aktarıldı (Resim 2.29). Sekiz materyal test grubu, 1 hücre kontrol grubu ve 3 boya kontrol grubu olmak üzere toplam 12 grup için flow sitometri analizi yapıldı. Boya kontrol gruplarının biri Annexin-V biri 7AAD (7-aminoactinomycin-d) ve biri de boyanmamış kontrol grubunu içermekteydi.



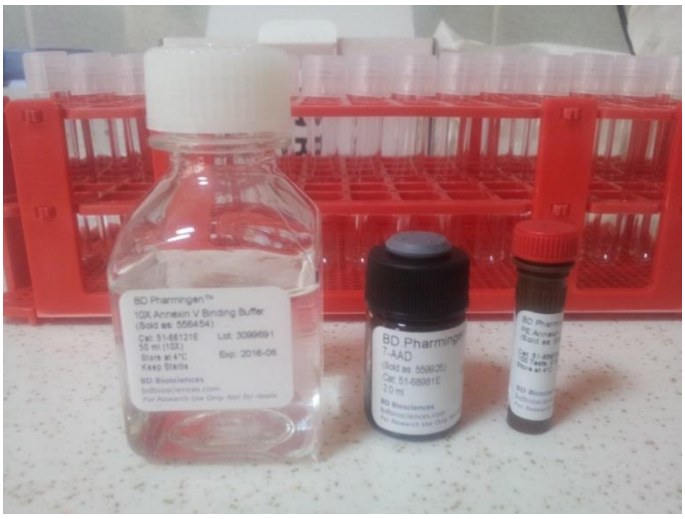
Resim 2.29. Flow sitometri için yüzen ve yapışan hücrelerin toplanıp flow tüplerine aktarılması

Örneklerin aktarıldığı flow tüpleri 1500 RPM'de 5 dakika santrifüj edildi (Resim 2.30). Tüplerdeki süpernatant uzaklaştırıldı. Tüpler, içerisindeki hücre pelletinin homojenize edilmesi için karıştırıcıda karıştırıldı. Hücre pelletlerinin üzerine 1'er µl PBS eklendi ve karıştırıldı. Flow tüpleri tekrar 1500 RPM'de 5 dakika santrifüjlendi, süpernatant uzaklaştırıldı, tüpler karıştırıldı.



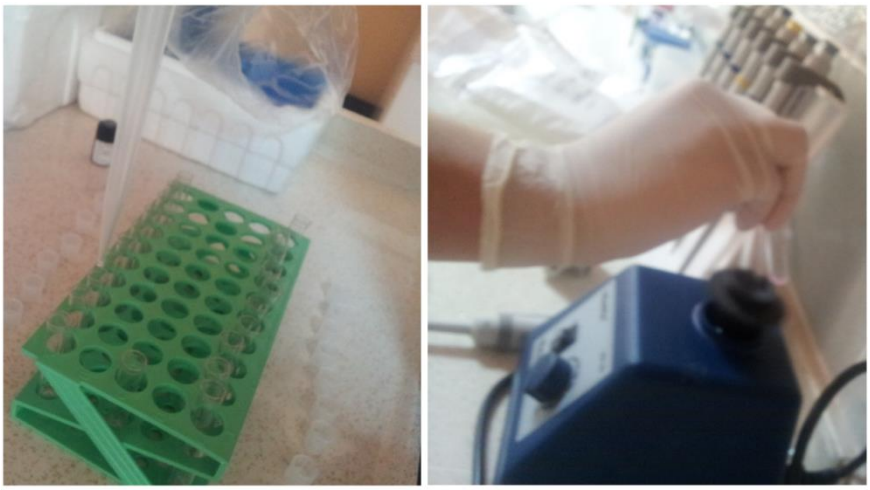
Resim 2.30. Santrifüj cihazına yerleştirilen flow tüpleri

Flow sitometri analizi yapmak için kullanılan kit (BD Pharmingen, Kanada), bağlanma tamponu, Annexin V ve 7AAD boyalarından oluşmaktaydı (Resim 2.31).



Resim 2.31. Flow sitometri kiti; Bağlanma tamponu, 7AAD boyası ve Annexin V boyası

Annexin V bağlanma tamponunu %10'luk hazırlamak için 18 ml distile su içerisine 2 ml bağlanma tamponu eklendi ve karıştırıldı. Süpernatantı uzaklaştırılmış olan hücre pelletlerinin üzerine 100'er µl bu bağlanma tamponundan eklenip karıştırıldı (Resim 2.32).



Resim 2.32. Hücre pelletlerinin üzerine bağlanma tamponunun eklenmesi ve tüplerin karıştırılması

Bağlanma tamponu bütün test, hücre kontrol ve boya kontrol gruplarına eklendi. Hücre kontrol ve test gruplarında bağlanma tamponuna ilaveten 4'er µl Annexin-V boyası ve 4'er µl 7AAD boyası eklendi. Boyanmamış kontrol grubuna

hiçbir boya eklenmedi. Annexin-V kontrol grubuna bağlanma tamponuna ilaveten Annexin-V boyası, 7AAD kontrol grubunda da bağlanma tamponuna ilaveten 7AAD boyası eklendi.

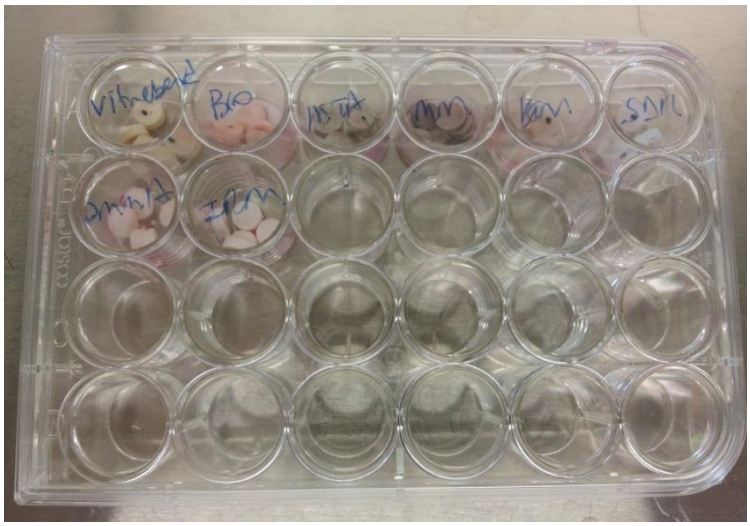
Üzerlerine bağlanma tamponu, Annexin-V ve 7AAD boyaları ilave edilen flow tüpleri oda sıcaklığında ve karanlık ortamda 15 dakika inkübe edildi. İnkübasyon süreci tamamlandıktan sonra örneklerin üzerine 400 µl bağlanma tamponu ilave edildi. Flow tüpleri 1500 RPM'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırılıp tüpler karıştırıldıktan sonra flow tüplerine 500 µl bağlanma tamponu eklendi ve tüpler sırayla flow sitometri cihazına (BD FACSAria III Biosciences, San Jose, Kanada) yerleştirildi (Resim 2.33). Kullanılan lazer eksitasyonunun dalga boyu 488 nm'dir. Boyanan PDL hücrelerinin; vital, erken apoptotik, geç apoptotik/ nekrotik ve ölü yüzde dağılımı hesaplandı.



Resim 2.33. Flow sitometri cihazı ve örnek yerleştirilen bölmesi

2.5. SEM ve SEM-EDX ANALİZİ

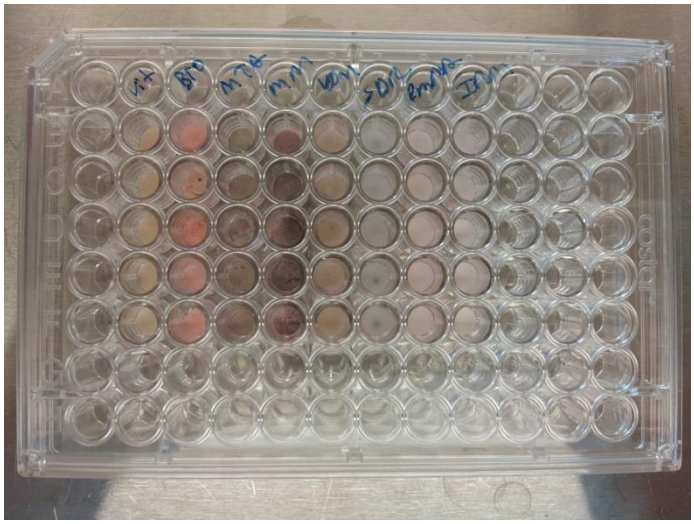
Flow sitometri için eluatları toplanan 3 günlük sertleşen materyal örnekleri SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu) ve SEM-EDX'de (Enerji Dağılımlı X ışını analizi) değerlendirilmek üzere aşağıda anlatılan işlemlere tabi tutuldu (Resim 2.34).



Resim 2.34. Flow sitometri için eluatları toplanan materyallerin SEM ve SEM-EDX için hazırlanması

Üç günlük sertleşen materyaller 24 saat de hücre kültür medyasında bekletildiğinden SEM için hazırlanan örneklerin yaşlandırması 4 gün olmuştur.

Her bir gruptan 5'er örnek 96 kuyucuklu hücre kültür kabının tabanına yerleştirildi (Resim 2.35).



Resim 2.35. SEM ve SEM EDX analizi için 96 kuyucuklu hücre kültür kabına yerleştirilen materyal örnekleri

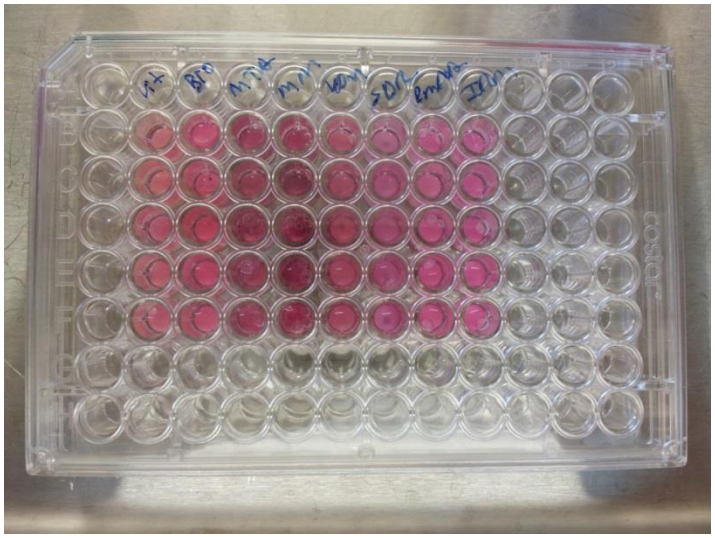
Beş örneğin 3'ü hücresel ataçmanı değerlendirmek üzere SEM için 2'si de elemental analizi değerlendirmek üzere SEM-EDX için kullanıldı.

SEM-EDX analizi için ayrılan materyal disklerinin üzerine 100'er µl hücre kültür medyası eklendi. SEM analizi için ayrılan materyal diskleri üzerine 100.000

hücre/ml olacak şekilde (10.000 hücre/kuyucuk) PDL hücreleri ekildi (Resim 2.36) Materyal örnekleri PDL hücreleri ile 37°C'de 72 saat inkübe edildi.

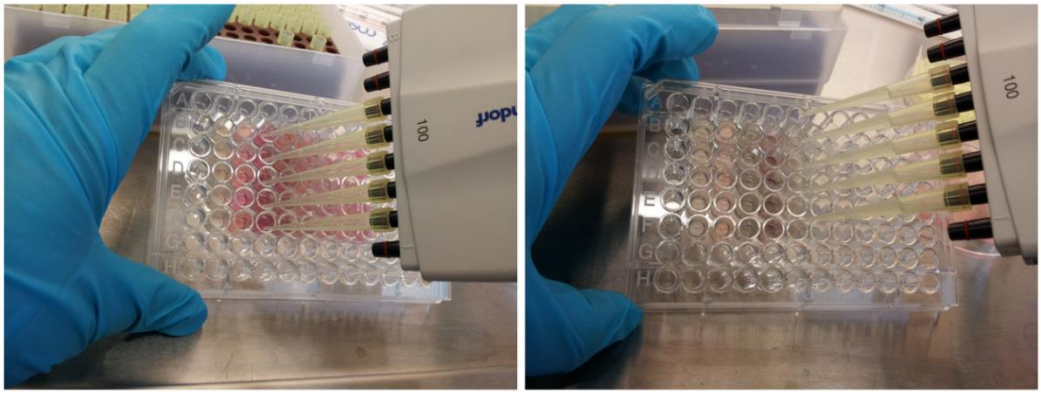


Resim 2.36. SEM analizi için materyal diskleri üzerine hücre süspansiyonunun eklenmesi



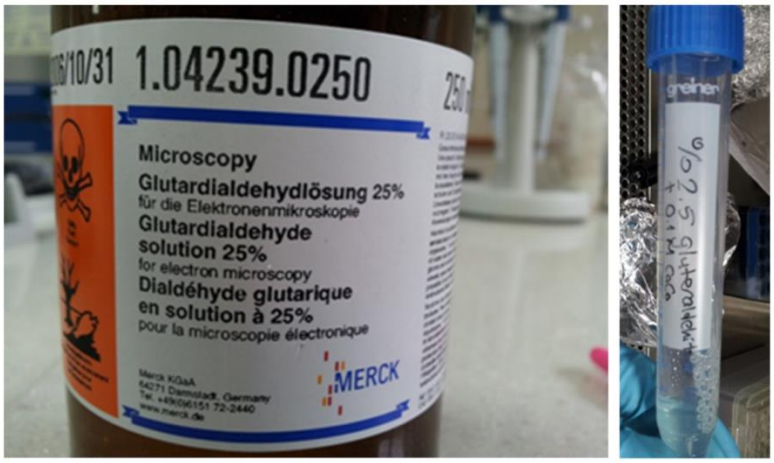
Resim 2.37. SEM ve SEM-EDX için hazırlanan örneklerin üzerlerine hücre ve besiyeri eklendikten sonraki görüntüsü

İnkübasyon sürecini tamamlayan materyal örneklerinin üzerine 100 µl 0,1 molar kakodilat eklendi. Birkaç dakika beklendikten sonra kakodilat aspire edildi. Bu işlem iki kere tekrarlandı. Bu şekilde materyaller üzerindeki besiyeri artıkları uzaklaştırılarak yıkama işlemi tamamlandı (Resim 2.38).



Resim 2.38. Materyal örneklerinin kakodilat ile yıkama işlemi

Gluteraldehitin %25'lik konsantrasyonu %1'lik kakodilat ile 10 kat seyreltilerek %2,5'luk gluteraldehit hazırlandı (Resim 2.39).



Resim 2.39. Fiksasyon için %2,5'luk gluteraldehit solüsyonunun hazırlanması

Yıkama işlemi tamamlandıktan sonra her bir materyal disk üzerine 100 µl gluteraldehit eklendi. 96 kuyucuklu hücre kültür kabı içindeki, üzerine gluteraldehit eklenmiş materyal diskleri oda sıcaklığında karanlık ortamda 60 dakika inkübe edildi. Gluteraldehit ile inkübasyon süreci tamamlandıktan sonra gluteraldehit aspire edildi ve yukarıda bahsedildiği şekilde her bir materyal örneğine 0.1 molar 100 µl kakodilat eklenerek iki kere yıkama işlemi yapıldı. Yıkama işlemi tamamlanan örnekler üzerindeki kakodilat aspire edildi ve her bir disk üzerine 100 µl distile su eklendi. Hücre kültür kabı alüminyum folyo ile sarılarak -80°C'de bir gece

bekletildi. Sonra liyofilizatörde 1 gece bekletilerek dehidratasyon işlemi gerçekleştirildi (Resim 2.40).



Resim 2.40. Örneklerin -80°C'de saklandığı dondurucu ve Liyofilizatör

Materyal örnekleri Selçuk Üniversitesi Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi Araştırma Laboratuarı'nda Polaron Sc7620 Sputter Coater (VG Microtech Inc. Japonya) cihazı kullanılarak ince bir altın film tabakası ile kaplandı. İki farklı büyütmede (500x, 5000x) SEM (Leo 440, Electron Microscopy Ltd. Cambridge, İngiltere) altında materyal yüzeyi ve materyal yüzeyine yapışan periodontal ligament fibroblastlarının yoğunluğu ve morfolojisi incelendi.

Materyal yüzeyleri ince bir altın film tabakası ile kaplandıktan sonra yüzeydeki sodyum, potasyum, magnezyum, kalsiyum, fosfor ve silikon iyonları hakkında bilgi elde etmek amacıyla her bir örneğin rastgele üç ayrı bölgesinden EDX analizi yapıldı.

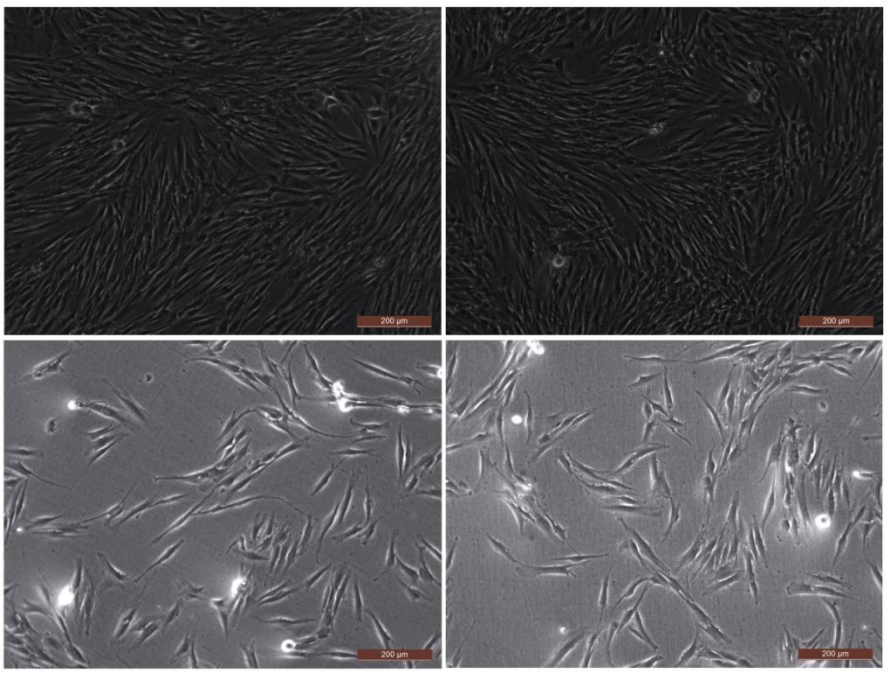
2.6. Verilerin İstatistiksel Analizi

XTT analizi ile elde edilen verilerin istatistiksel analizi SPSS 15.0V bilgisayar programı kulanılarak yapıldı. Materyallerin, eluat konsantrasyonlarının ve materyallerin sertleşme sürelerinin PDL hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkisini değerlendirmek üzere tek değişkenli varyans analizi ve çoklu karşılaştırma için ise Tukey testi kullanıldı. Ardından her bir materyal test grubunun kendi içinde eluat konsantrasyonlarının ve sertleşme sürelerinin PDL hücrelerinin canlılığı üzerinde etkisi olup olmadığı iki yönlü varyans analizi ile değerlendirildi. Grafikler, Graphpad programı kullanılarak hazırlandı.

3. BULGULAR

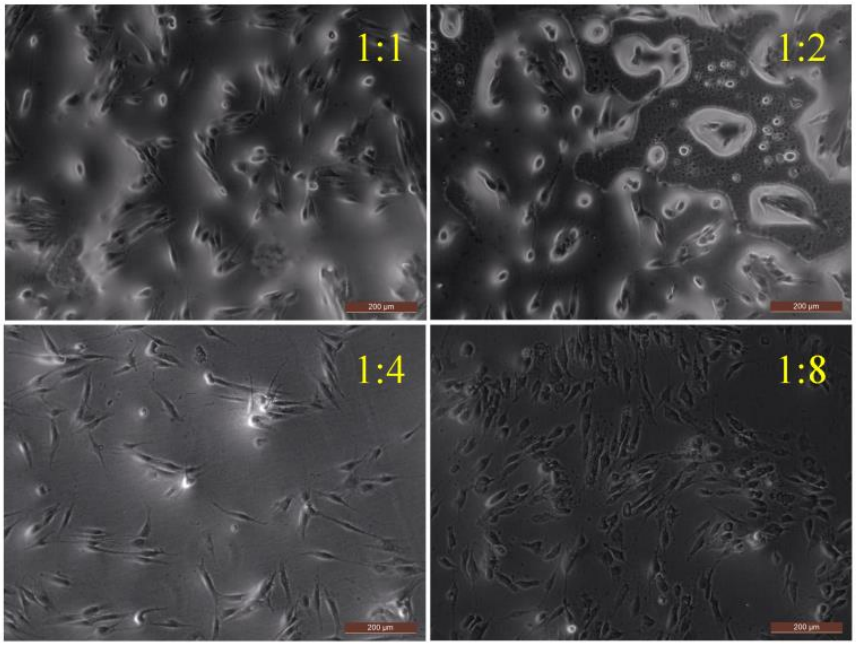
3.1. Materyallerin Farklı Konsantrasyondaki Eluatlarına Maruz Bırakılan PDL Hücrelerinin Morfoloji Değerlendirmesine Ait Bulgular

Herhangi bir işleme tabi tutulmayan hücre kontrol grubuna ait periodontal ligament fibroblastlarının (PDL) invert mikroskop altındaki görüntüsü Resim 3.1'de gösterilmiştir. PDL hücrelerinin 96 kuyucuklu hücre kültür kabının tabanına yapıştığı, kabın tabanında yayılım gösterdiği, kümeler oluşturduğu, fibroblast gövdelerinin uzun mekik şeklinde olduğu ve iğsi uzantılara sahip olduğu görülmektedir.

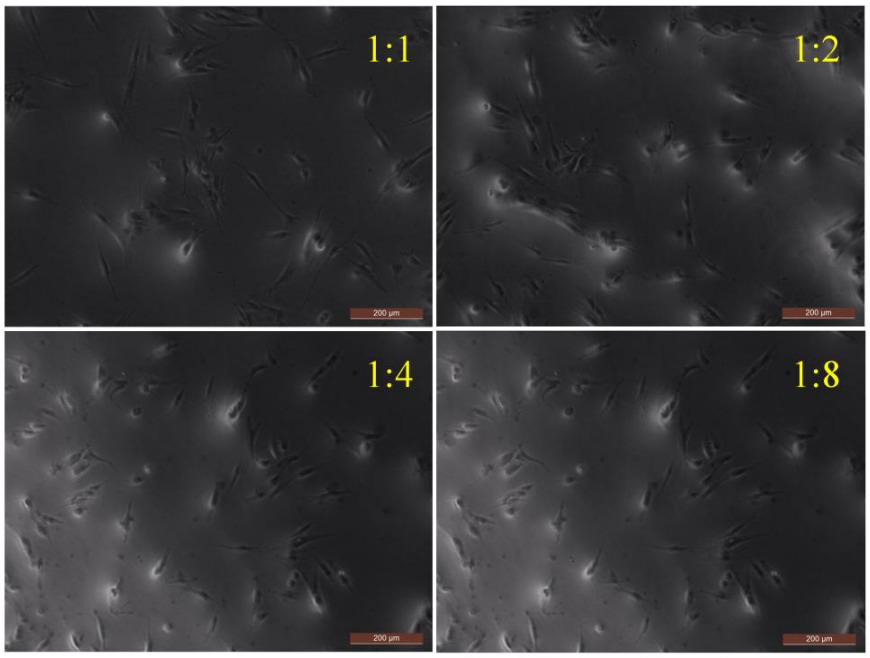


Resim 3.1. Hücre kontrol grubuna ait rastgele seçilen dört kuyucuktaki PDL hücrelerinin invert mikroskop görüntüsü (10x büyütme)

Bir günlük ve 3 günlük sertleşen Vitrebond'un 24 saatlik eluatına maruz bırakılan PDL hücrelerinde ciddi morfolojik değişiklikler gözlemlenmiştir. Vitrebond eluatının bütün konsantrasyonlarında hücrelerin daha yuvarlaklaşmış gövdeye sahip olduğu ve nispeten daha kısa uzantılara sahip olduğu görülmektedir (Resim 3.2, Resim 3.3). Bazı konsantrasyonda (1:2) daha net olmak üzere hücrelerin etrafında bir takım partiküllerin bulunduğu gözlemlenmiştir (Resim 3.2).

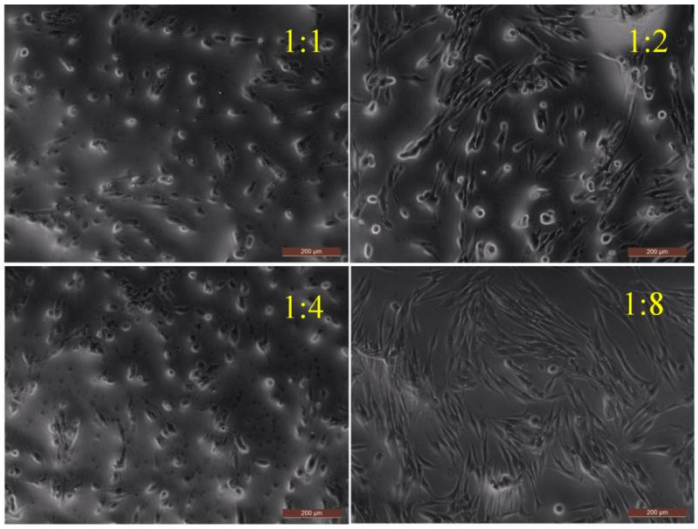


Resim 3.2. Bir günlük sertleşen Vitrebond'un 24 saatlik eluatına maruz bırakılan PDL hücrelerinin invert mikroskop görüntüsü (10x büyütme)

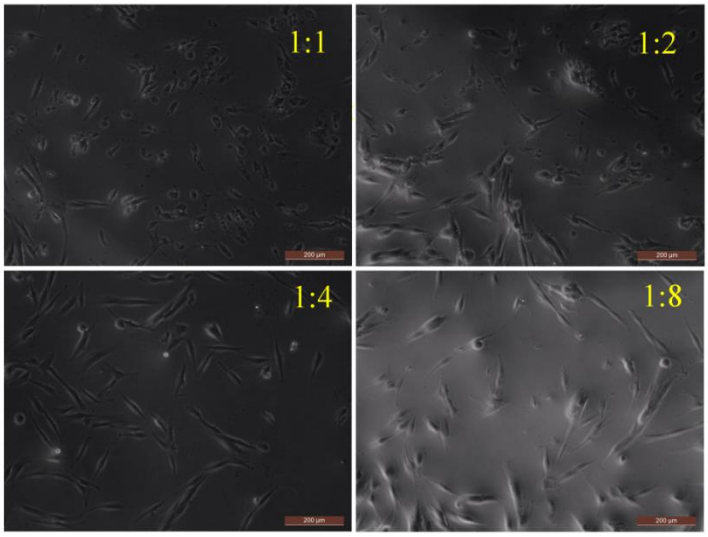


Resim 3.3. Üç günlük sertleşen Vitrebond'un 24 saatlik eluatına maruz bırakılan PDL hücrelerinin invert mikroskop görüntüsü (10x büyütme)

Bir günlük sertleşen Biodentine'in 24 saatlik eluatının 1:1, 1:2 ve 1:4'lük konsantrasyonlarına maruz bırakılan PDL hücrelerinin yuvarlaklaşma eğiliminde olduğu gözlenirken 1:8'lik konsantrasyonda fibroblastlarda herhangi bir morfolojik değişiklik gözlenmemiştir (Resim 3.4). Üç günlük sertleşen Biodentine'in 24 saatlik eluatının 1:4 ve 1:8'lik konsantrasyonlarının da PDL hücreleri üzerinde morfolojik değişikliğe neden olmadığı görülmektedir (Resim 3.5).

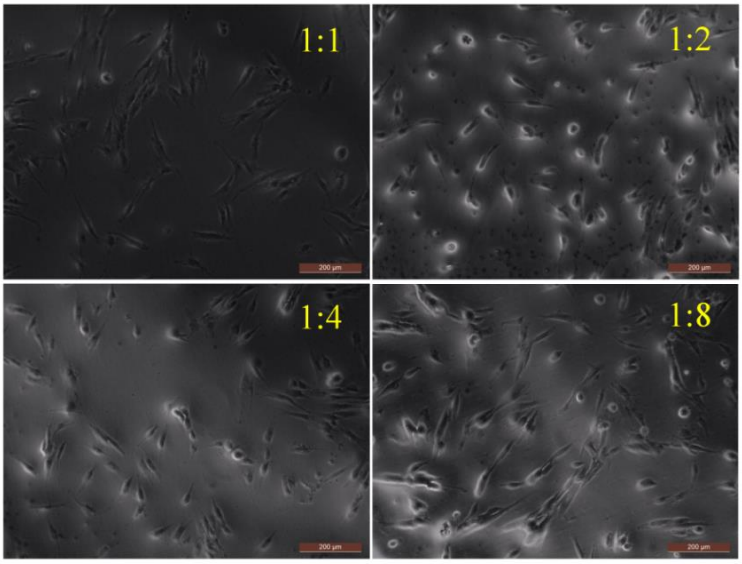


Resim 3.4. Bir günlük sertleşen Biodentine'in 24 saatlik eluatına maruz bırakılan PDL hücrelerinin invert mikroskop görüntüsü (10x büyütme)

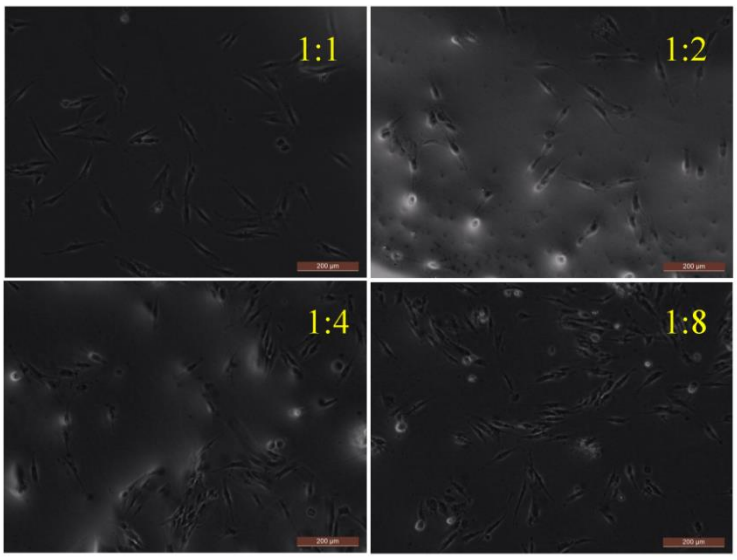


Resim 3.5. Üç günlük sertleşen Biodentine'in 24 saatlik eluatına maruz bırakılan PDL hücrelerinin invert mikroskop görüntüsü (10x büyütme)

Bir günlük ve 3 günlük sertleşen IRM'nin 24 saatlik eluatına maruz bırakılan PDL hücrelerinde özellikle 1:1, 1:2 ve 1:4'lük konsantrasyonlarda morfolojik değişiklikler olduğu, hücrelerin retrakte olduğu gözlemlenmiştir. IRM eluatının 1:8'lik konsantrasyonuna maruz bırakılan PDL hücrelerinde nispeten daha az morfolojik değişiklik olduğu görülmektedir (Resim 3.6, Resim 3.7).

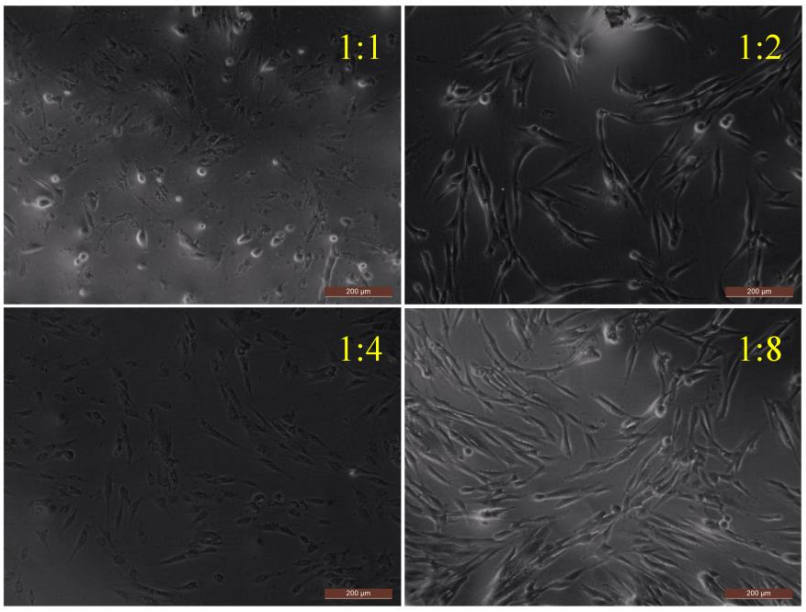


Resim 3.6. Bir günlük sertleşen IRM'nin 24 saatlik eluatına maruz bırakılan PDL hücrelerinin invert mikroskop görüntüsü (10x büyütme)

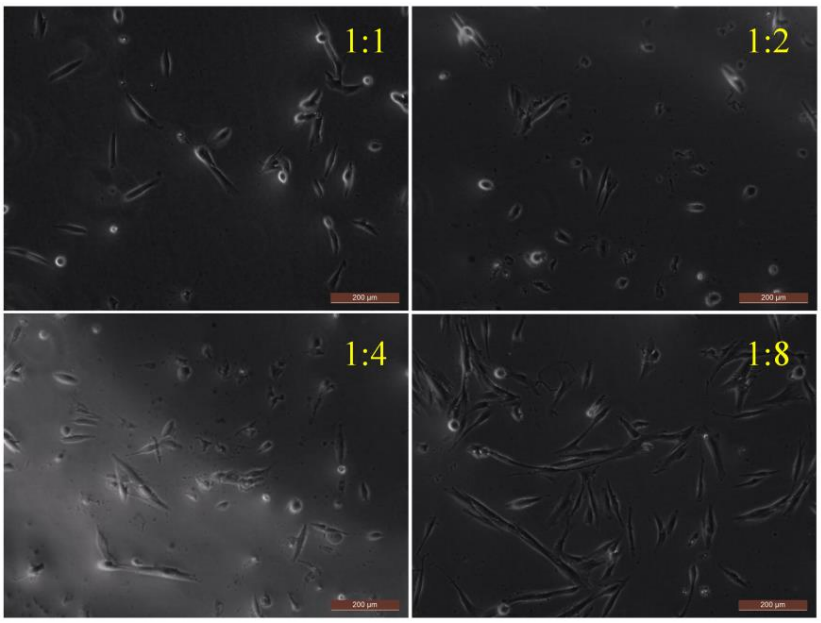


Resim 3.7. Üç günlük sertleşen IRM'nin 24 saatlik eluatına maruz bırakılan PDL hücrelerinin invert mikroskop görüntüsü (10x büyütme)

Bir günlük ve 3 günlük sertleşen ProRoot MTA (PMTA)'nın 24 saatlik eluatına maruz bırakılan PDL hücrelerinde 1:1'lik konsantrasyon haricinde önemli morfolojik değişiklikler gözlenmemiştir. 1:8'lik konsantrasyonda hücrelerin normal fibroblastik konfigürasyon sergilediği görülmektedir (Resim 3.8, Resim 3.9).

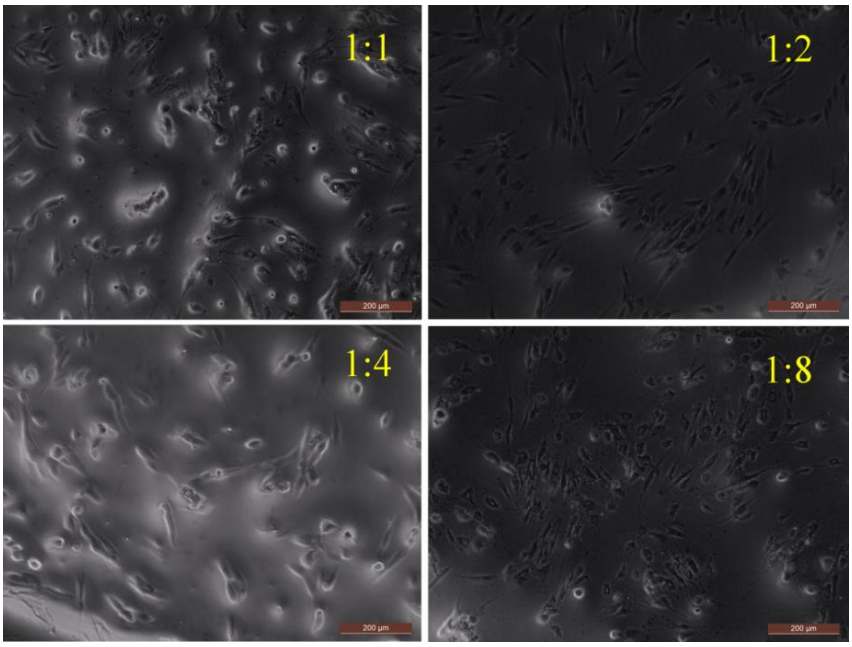


Resim 3.8. Bir günlük sertleşen PMTA'nın 24 saatlik eluatına maruz bırakılan PDL hücrelerinin invert mikroskop görüntüsü (10x büyütme)

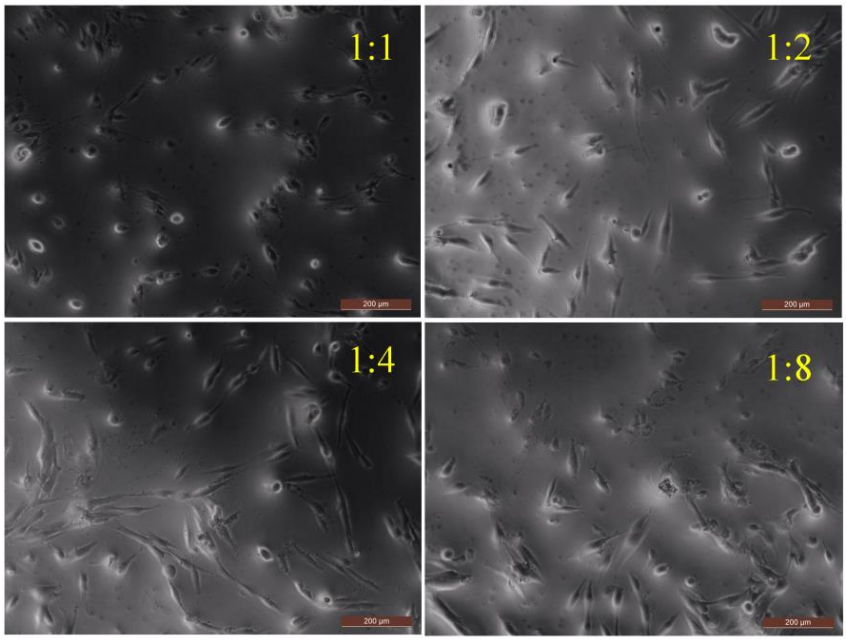


Resim 3.9. Üç günlük sertleşen PMTA'nın 24 saatlik eluatına maruz bırakılan PDL hücrelerinin invert mikroskop görüntüsü (10x büyütme)

Bir günlük ve 3 günlük sertleşen MM-MTA'nın 24 saatlik eluatlarının uygulandığı örneklerde PDL hücrelerinin gövdelerinin yuvarlaklaşma eğiliminde olduğu ve iğsi uzantılarının kısaldığı bir morfolojik yapı sergiledikleri gözlemlenmiştir (Resim 3.10, Resim 3.11).

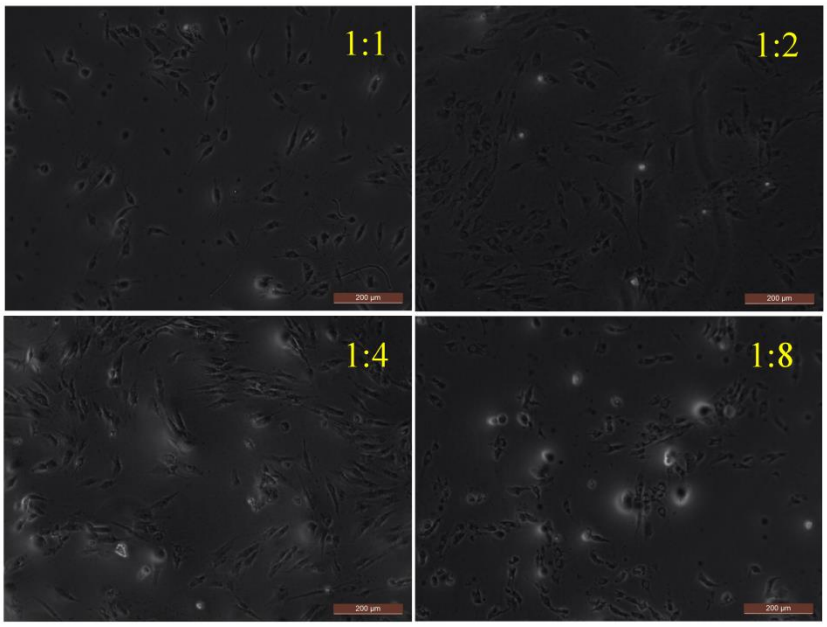


Resim 3.10. Bir günlük sertleşen MM-MTA'nın 24 saatlik eluatına maruz bırakılan PDL hücrelerinin invert mikroskop görüntüsü (10x büyütme)

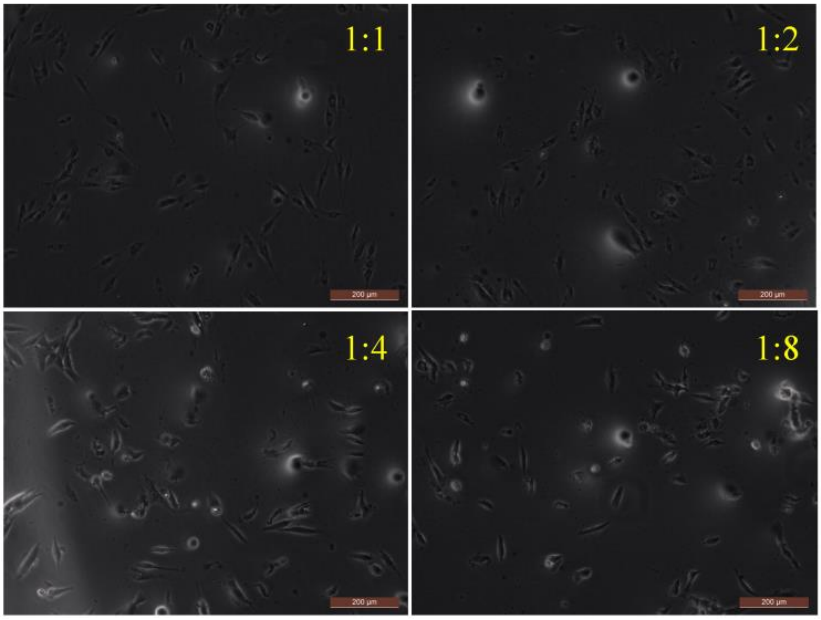


Resim 3.11. Üç günlük sertleşen MM-MTA'nın 24 saatlik eluatına maruz bırakılan PDL hücrelerinin invert mikroskop görüntüsü (10x büyütme)

Bir günlük ve 3 günlük sertleşen SDR'nin 24 saatlik eluatına maruz bırakılan PDL hücrelerinin mekik şeklini korudukları yassılaşma eğiliminde oldukları fakat sitoplazmik uzantılarının yok olduğu gözlemlenmiştir (Resim 3.12, Resim 3.13).

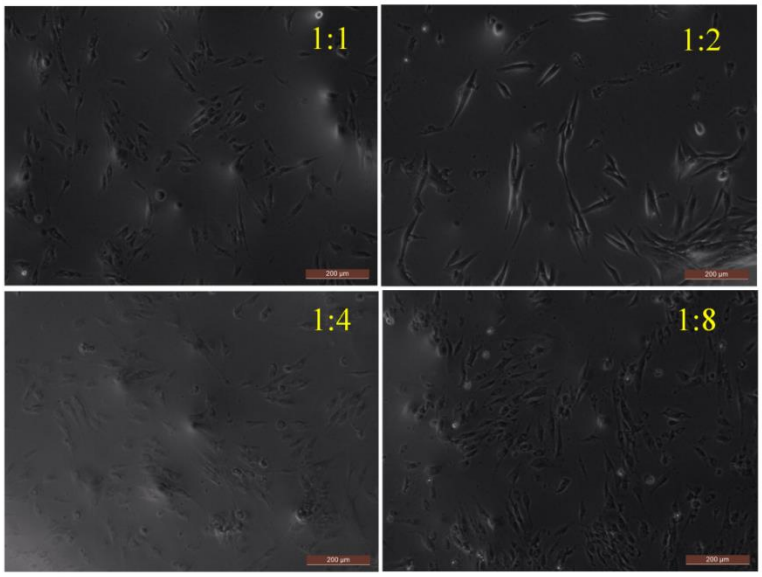


Resim 3.12. Bir günlük sertleşen SDR'nin 24 saatlik eluatına maruz bırakılan PDL hücrelerinin invert mikroskop görüntüsü (10x büyütme)

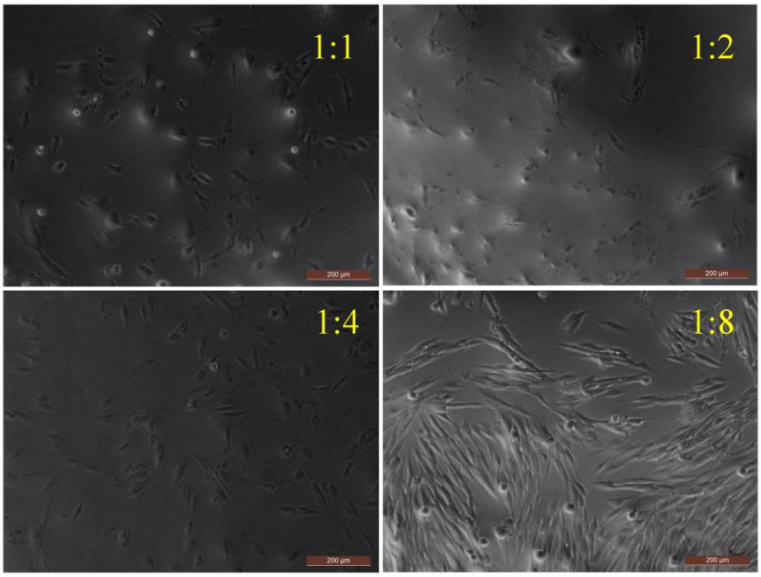


Resim 3.13. Üç günlük sertleşen SDR'nin 24 saatlik eluatına maruz bırakılan PDL hücrelerinin invert mikroskop görüntüsü (10x büyütme)

Bir günlük ve 3 günlük sertleşen Dyract Kompomerin 24 saatlik eluatının 1:1, 1:2 ve 1:4'lük konsantrasyonlarının PDL hücreleri üzerinde morfolojik değişikliklere sebep olduğu gözlemlenmiştir. Her iki sertleşme süresi için de 1:1'lik (seyreltilmemiş yüksek konsantrasyonlu eluatlarda) konsantrasyonlarda fibroblast gövdelerinin bir miktar kısaldığı görülmektedir (Resim 3.14, Resim 3.15). 1:8'lik konsantrasyonda ise PDL hücrelerinin sağlıklı olduğu görülmektedir.

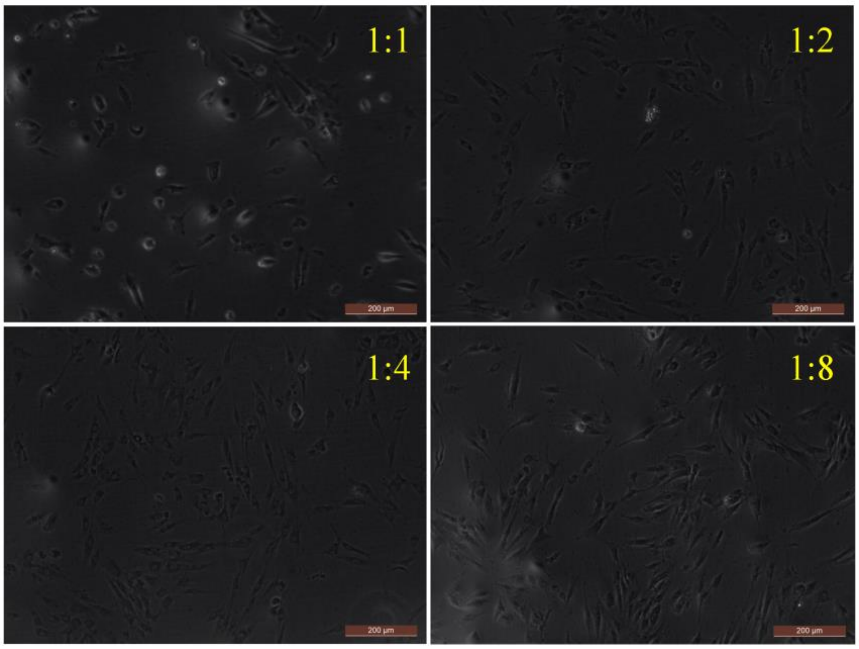


Resim 3.14 Bir günlük sertleşen Dyract Kompomer'in 24 saatlik eluatına maruz bırakılan PDL hücrelerinin invert mikroskop görüntüsü (10x büyütme)

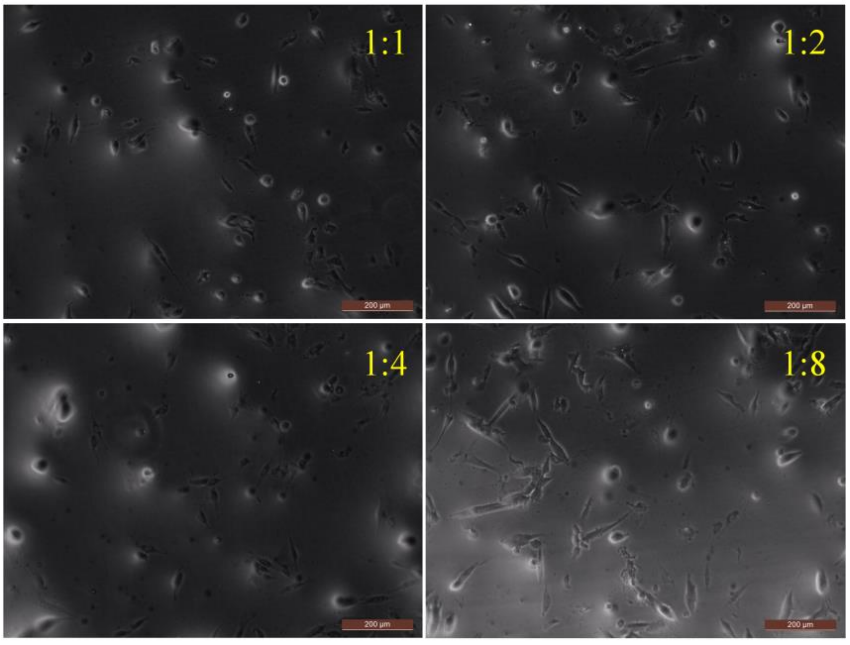


Resim 3.15 Üç günlük sertleşen Dyract Kompomer'in 24 saatlik eluatına maruz bırakılan PDL hücrelerinin invert mikroskop görüntüsü (10x büyütme)

Bir günlük ve 3 günlük sertleşen PMMA kemik simanının 24 saatlik eluatının 1:8'lik konsantrasyonunun PDL hücreleri üzerinde önemli morfolojik değişikliklere sebep olmadığı görülmüştür. Diğer konsantrasyonlarda ise fibroblastların yuvarlaklaşmış olduğu gözlemlenmiştir (Resim 3.16, Resim 3.17).



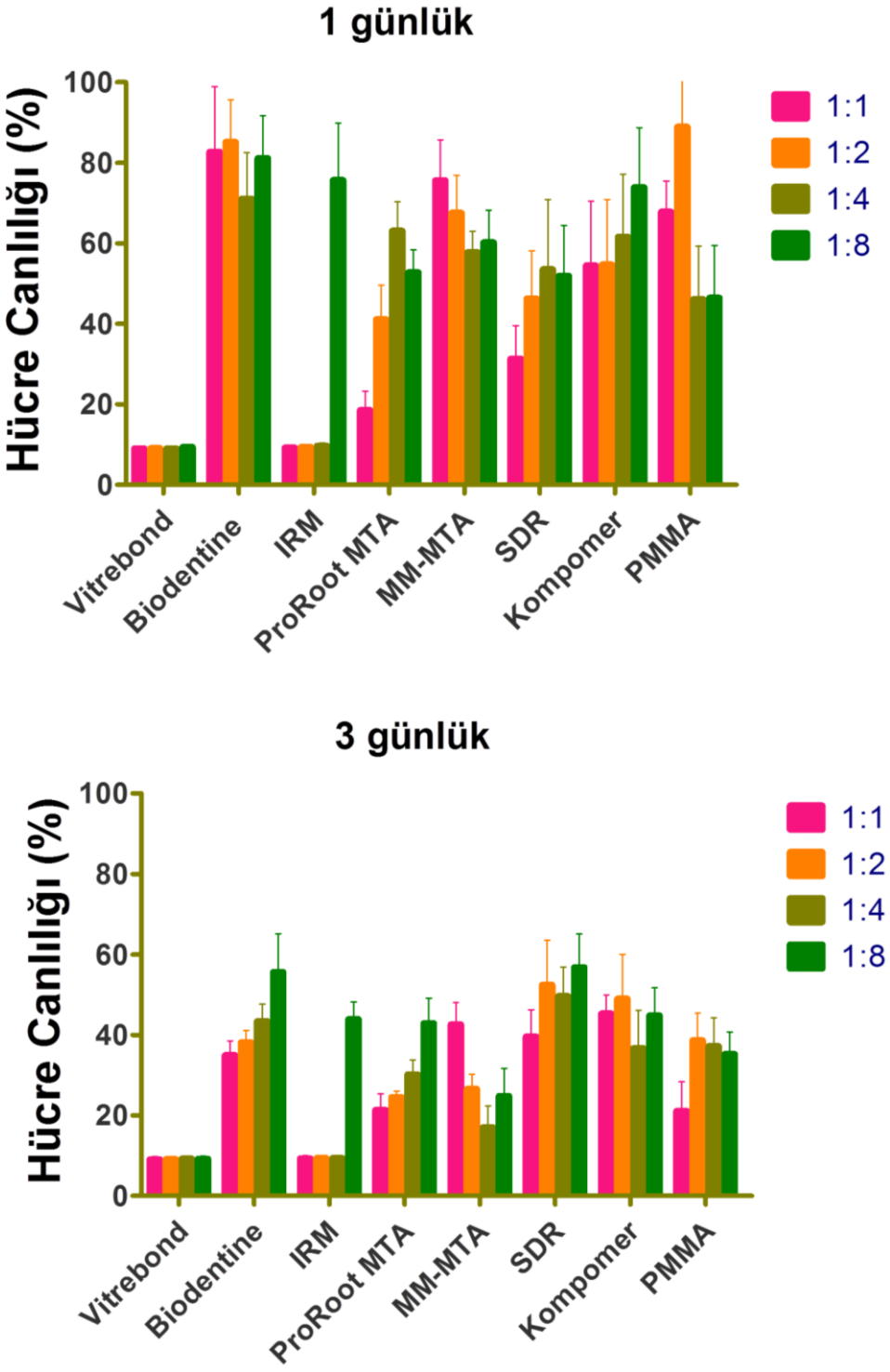
Resim 3.16. Bir günlük sertleşen PMMA kemik simanının 24 saatlik eluatına maruz bırakılan PDL hücrelerinin invert mikroskop görüntüsü (10x büyütme)



Resim 3.17. Üç günlük sertleşen PMMA kemik simanının 24 saatlik eluatına maruz bırakılan PDL hücrelerinin invert mikroskop görüntüsü (10x büyütme)

3.2. Farklı Materyallerin Eluatlarının, Eluatların Farklı Konsantrasyonlarının ve Materyallerin Farklı Sertleşme Sürelerinin PDL Hücrelerine Olan Sitotoksik Etkilerinin Kıyaslanmasına Ait Bulgular

Materyallerin, eluat konsantrasyonlarının ve materyallerin sertleşme sürelerinin periodontal ligament fibroblastlarının (PDL) canlılığı üzerindeki etkisini değerlendirmek üzere tek değişkenli varyans analizi ve çoklu karşılaştırma için ise Tukey testi uygulandı. PDL hücrelerinin canlılığı ile materyal tipi, materyalin sertleşme süresi ve eluat konsantrasyonu arasında bir ilişki olduğu bulundu. Yapılan istatistiksel analiz sonucunda materyallerin hücre canlılığı üzerindeki etkileri arasındaki fark anlamlı bulundu ($p<0,05$). Vitrebond ve IRM diğer kök tamir materyallerine göre daha sitotoksik bulundu. Biodentine ve Kompomer eluatına maruz bırakılan hücrelerin en yüksek oranda canlılık gösterdiği tespit edildi. PDL hücrelerinin, PMTA, MM-MTA, SDR ve PMMA kemik simanı gruplarının eluatlarına karşı benzer derecede canlılık gösterdiği belirlendi ($p>0,05$). Eluatların 1:8'lik konsantrasyonlarının en az sitotoksik, seyreltilmemiş orjinal konsantrasyonlarının (1:1) ise en fazla sitotoksik olduğu saptandı ($p<0,05$). Farklı sertleşme sürelerinin hücre canlılığı üzerindeki etkisinin önemli olduğu tespit edildi ($p<0,05$). Üç günlük sertleşen örneklerin 1 günlük sertleşen örneklere göre daha sitotoksik olduğu tespit edildi (Şekil 3.1). Test gruplarına ait verilerin ortalamaları, standart sapmaları ve gruplar arası harflendirmeler Çizelge 3.1'de verilmiştir.



Şekil 3.1. Bir günlük ve 3 günlük sertleşen materyal eluatlarının farklı konsantrasyonlarına maruz bırakılan PDL hücrelerinin canlılığı

Çizelge 3.1. Test gruplarının eluatlarına maruz kalan PDL hücrelerinin canlı kalma yüzdesini gösteren veriler

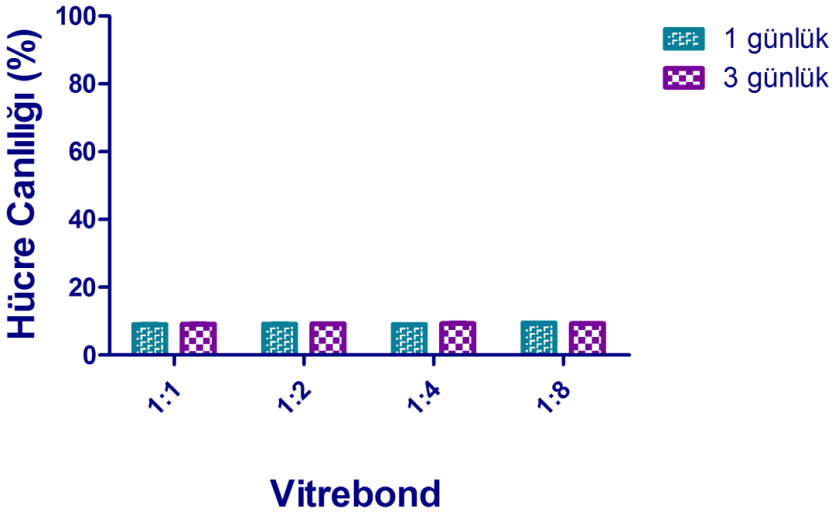
Test Grupları	Hücre Canlılık Değerleri (%)
Vitrebond	9,19 ± 1,33 [d]
Biodentine	61,57 ± 29,45 [a]
IRM	22,03 ± 26,29 [d]
PMTA	36,85 ± 19,51 [c]
MM-MTA	46,56 ± 26,10 [bc]
SDR	47,71 ± 25,87 [bc]
Kompomer	52,59 ± 30,30 [ab]
PMMA	47,71 ± 33,03 [bc]

*Farklı harf taşıyan gruplar arasındaki fark anlamlıdır ($p<0,05$)

3.3. Her bir Materyal Deney Grubunun Kendi İçinde Eluat Konsantrasyonlarının ve Sertleşme Sürelerinin PDL Hücrelerine Olan Sitotoksik Etkilerinin Kıyaslanmasına Ait Bulgular

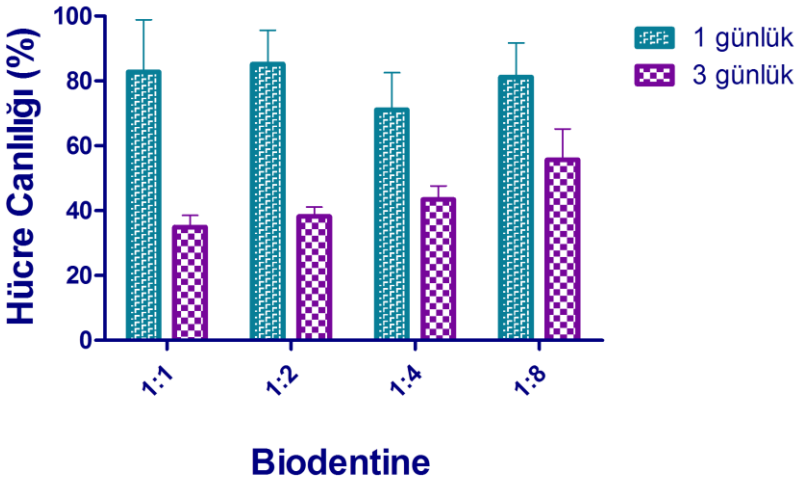
Her bir materyal test grubu kendi içinde eluat konsantrasyonu ve sertleşme süresi değişken olarak ele alınıp tüm deney gruplarına tek tek iki yönlü varyans analizi yapılmıştır.

Vitrebond grubunda eluatların farklı konsantrasyonlarının hücre canlılığı üzerinde önemli bir etkisinin olmadığı görülmüştür ($p>0,05$). Yine aynı şekilde 1 gün ve 3 gün sertleşmenin hücre canlılığı üzerinde benzer etkiye sahip olduğu görülmüştür ($p>0,05$) (Şekil 3.2).



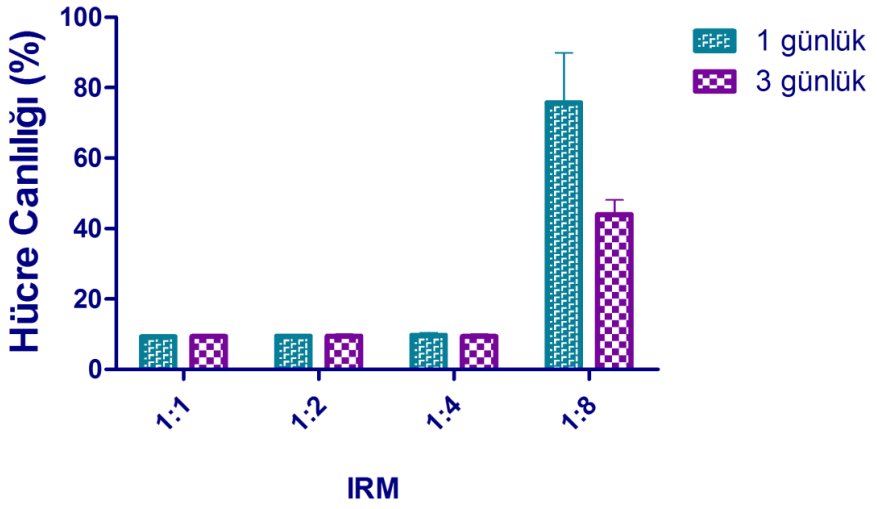
Şekil 3.2. Bir günlük ve 3 günlük sertleşen Vitrebondun 24 saatlik eluatına maruz bırakılan PDL hücrelerinin % cinsinden canlılığı

Biodentine grubunda eluatların farklı konsantrasyonlarının hücre canlılığı üzerinde önemli bir etkisinin olmadığı görülmüştür ($p>0,05$). Fakat farklı sertleşme sürelerinin hücre canlılığına etkileri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). Bir günlük sertleşen örneklerin eluatına maruz bırakılan hücrelerin daha yüksek oranda canlılık sergilediği gösterilmiştir (Şekil 3.3).



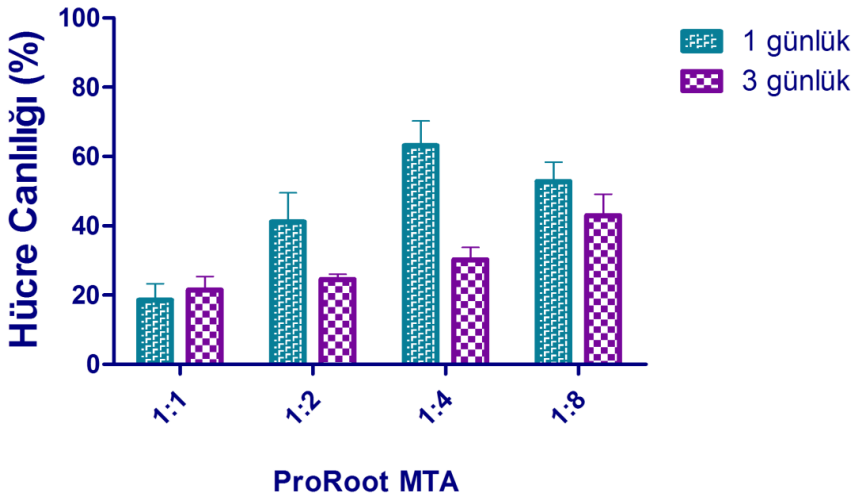
Şekil 3.3. Bir günlük ve 3 günlük sertleşen Biodentine'in 24 saatlik eluatına maruz bırakılan PDL hücrelerinin % cinsinden canlılığı

IRM grubunda 1:8'lik konsantrasyona maruz bırakılan PDL hücrelerinin canlılığının diğer konsantrasyonlara maruz bırakılan hücrelerin canlılığından istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu bulunmuştur. ($p<0,05$). Eluatların diğer konsantrasyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$). Bir günlük sertleşme süresinin, üç günlük sertleşme süresine göre daha fazla hücre canlılığına sebep olduğu gösterilmiştir ($p<0,05$) (Şekil 3.4).



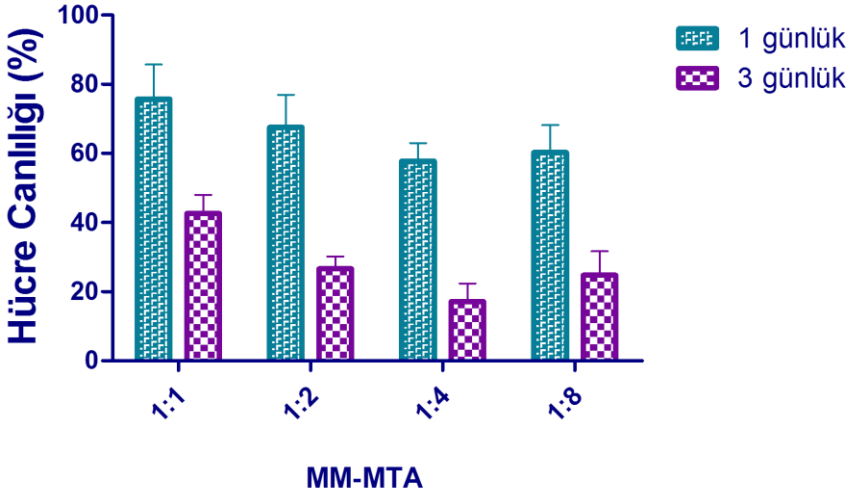
Şekil 3.4. Bir günlük ve 3 günlük sertleşen IRM'nin 24 saatlik eluatına maruz bırakılan PDL hücrelerinin % cinsinden canlılığı

ProRoot MTA grubunda, eluatların 1:8'lik konsantrasyonuna maruz bırakılan PDL hücrelerinin 1:1'lik konsantrasyona maruz bırakılanlara göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha fazla hücre canlılığı sergilediği bulunmuştur ($p<0,05$). Üç günlük sertleşen materyal eluatlarının 1 günlük sertleşenlere nazaran daha sitotoksik olduğu gösterilmiştir ($p<0,05$) (Şekil 3.5).



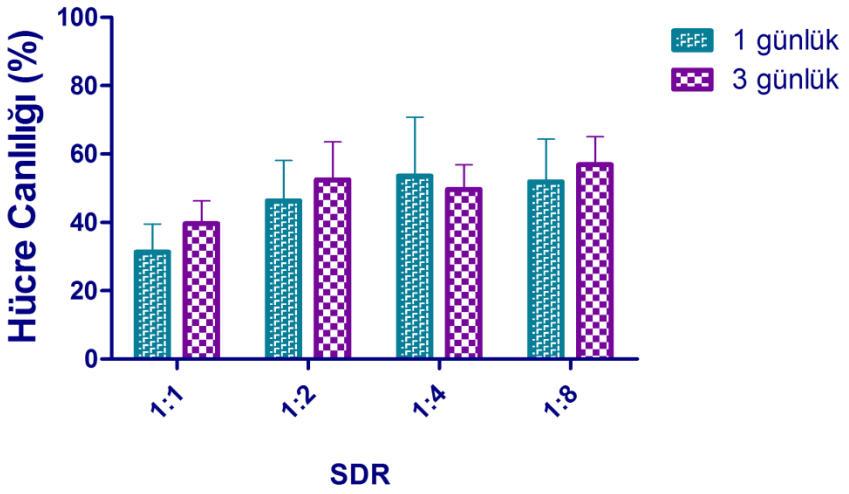
Şekil 3.5. Bir günlük ve 3 günlük sertleşen PMTA'nin 24 saatlik eluatına maruz bırakılan PDL hücrelerinin % cinsinden canlılığı

MM-MTA grubunda eluatların farklı konsantrasyonlarının hücre canlılığına etkileri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). Eluatların 1:1'lik konsantrasyonunun en az sitotoksik olduğu görülürken 1:4'lük konsantrasyonunun en sitotoksik olduğu saptanmıştır. Bir günlük sertleşen MM-MTA eluatları karşısındaki hücre canlılığı üç günlük sertleşenlere göre istatistiksel olarak önemli derecede daha yüksek bulunmuştur ($p<0,05$) (Şekil 3.6).



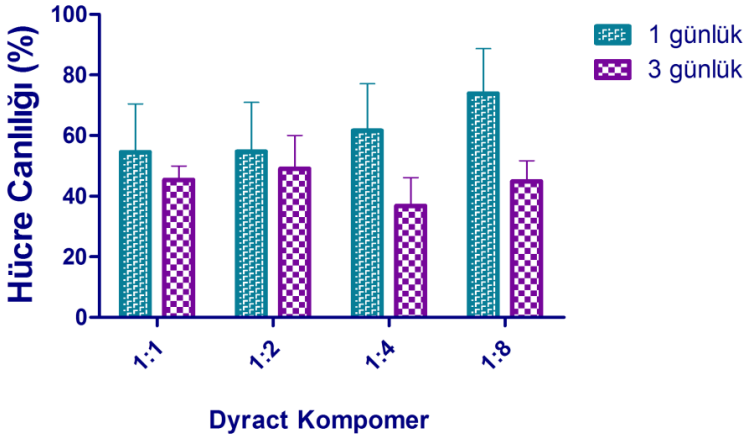
Şekil 3.6. Bir günlük ve 3 günlük sertleşen MM-MTA'nin 24 saatlik eluatına maruz bırakılan PDL hücrelerinin % cinsinden canlılığı

SDR grubunda, eluatların farklı konsantrasyonlarının hücre canlılığı üzerinde önemli bir etkisinin olmadığı görülmüştür ($p>0,05$). Yine aynı şekilde 1 gün ve 3 gün sertleşmenin hücre canlılığı üzerinde benzer etkiye sahip olduğu görülmüştür ($p>0,05$) (Şekil 3.7).



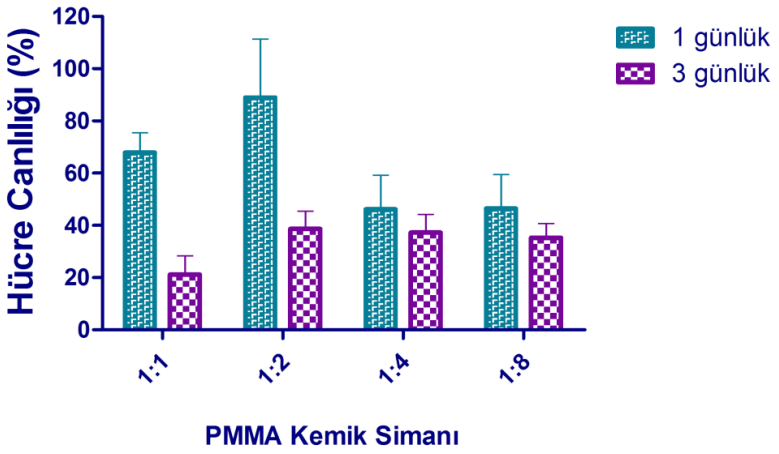
Şekil 3.7. Bir günlük ve 3 günlük sertleşen SDR'nin 24 saatlik eluatına maruz bırakılan PDL hücrelerinin % cinsinden canlılığı

Kompomer grubunda hem eluatların farklı konsantrasyonlarının hem de materyallerin farklı sertleşme sürelerinin hücre canlılığı üzerinde istatistiksel olarak önemli derecede bir etkiye sahip olmadığı görülmüştür ($p>0,05$) (Şekil 3.8).



Şekil 3.8. Bir günlük ve 3 günlük sertleşen Dyract Kompomer'in 24 saatlik eluatına maruz bırakılan PDL hücrelerinin % cinsinden canlılığı

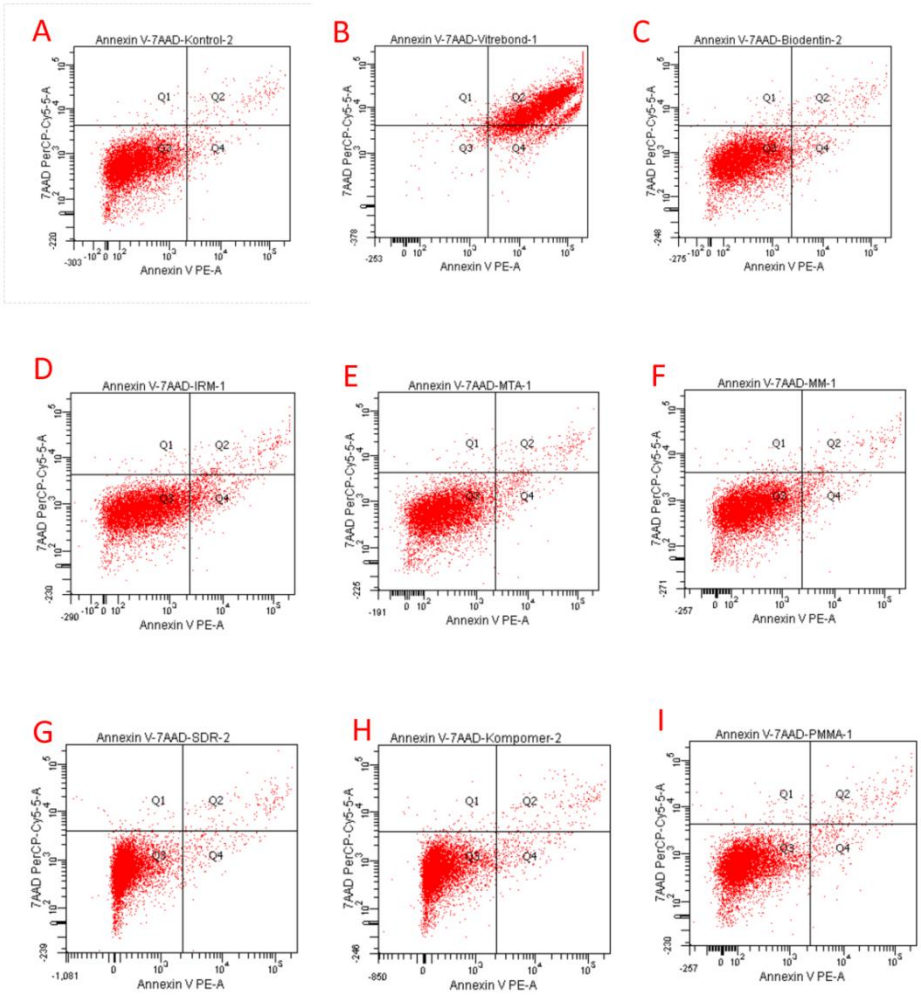
PMMA kemik simanı grubunda, hücre canlılığı açısından eluatların farklı konsantrasyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$). Bir günlük sertleşen materyal eluatına maruz kalan hücrelerin daha yüksek oranda canlılık gösterdiği tespit edilmiştir ($p<0,05$) (Şekil 3.9).



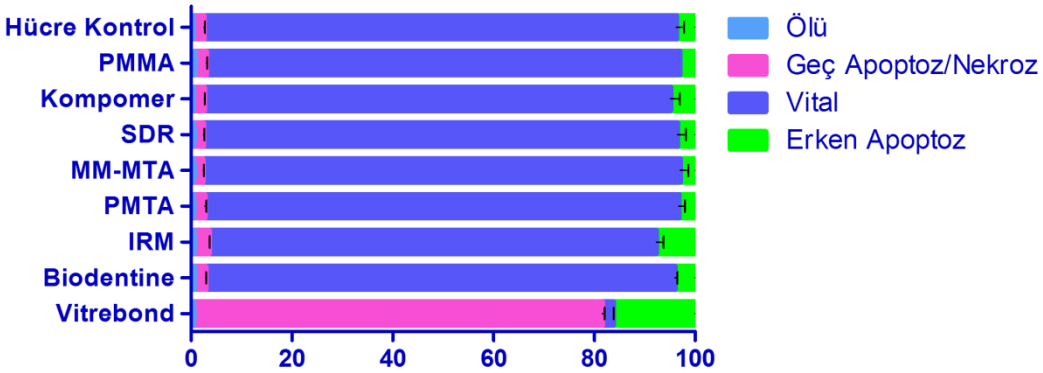
Şekil 3.9. Bir günlük ve 3 günlük sertleşen PMMA Kemik Simanı'nın 24 saatlik eluatına maruz bırakılan PDL hücrelerinin % cinsinden canlılığı

3.4. Farklı Materyallerin Eluatlarının 1:8'lik Konsantrasyonlarının PDL Hücreleri Üzerindeki Apoptotik/Nekrotik Etkilerinin Kıyaslanmasına Ait Bulgular (Flow Sitometri Bulguları)

Hücre kontrol ve test gruplarının iki boyutlu flow sitometri noktasal grafiği şekil 3.10'da verilmiştir. Q1 alanı ölü hücreleri, Q2 alanı nekrotik/geç apoptotik hücreleri, Q3 alanı vital hücreleri ve Q4 alanı erken apoptotik hücreleri temsil etmektedir. Bu grafikler değerlendirildiğinde Vitrebond eluatının 1:8'lik konsantrasyonunun PDL hücrelerinde nekroza yol açtığı görülmektedir. Diğer bütün materyallerin eluatlarının 1:8'lik konsantrasyonuna maruz bırakılan PDL hücrelerinin yüksek oranda vital kaldığı izlenmektedir. Test materyal gruplarının ve hücre kontrol grubunun nekrotik ve vital hücrelerin yüzdelerinin karşılaştırıldığı bar grafiği şekil 3.11'de verilmiştir.



Şekil 3.10. Hücre kontrol ve materyal test gruplarının iki boyutlu flow sitometri noktasal grafiği, (A) Hücre kontrol, (B) Vitrebond, (C) Biodentine, (D) IRM, (E) PMTA, (F) MM-MTA, (G) SDR, (H) Kompomer, (I) PMMA kemik simanı. (x: Ann V, y: 7AAD)



Şekil 3.11. Deney gruplarının ve hücre kontrol grubunun nekrotik ve vital hücrelerinin yüzdesini gösteren bar grafiği

3.5. Farklı Materyal Örneklerinin Seyreltilmemiş Eluatlarının pH Değerlerinin Kıyaslanmasına Ait Bulgular

Üç günlük sertleşen materyallerin seyreltilmemiş eluatlarının pH değerleri karşılaştırıldığında en asidik değerin Vitrebond'da en alkali değerin ise MM-MTA'da olduğu görülmektedir. SDR, Kompomer, PMMA kemik simanı ve IRM eluatlarının pH değerleri aynıdır. Biodentine ve PMTA eluatlarının pH değerleri benzer olup SDR, Kompomer, PMMA kemik simanı ve IRM eluatlarının pH değerlerinden hafifçe yüksektir (Çizelge 3.2).

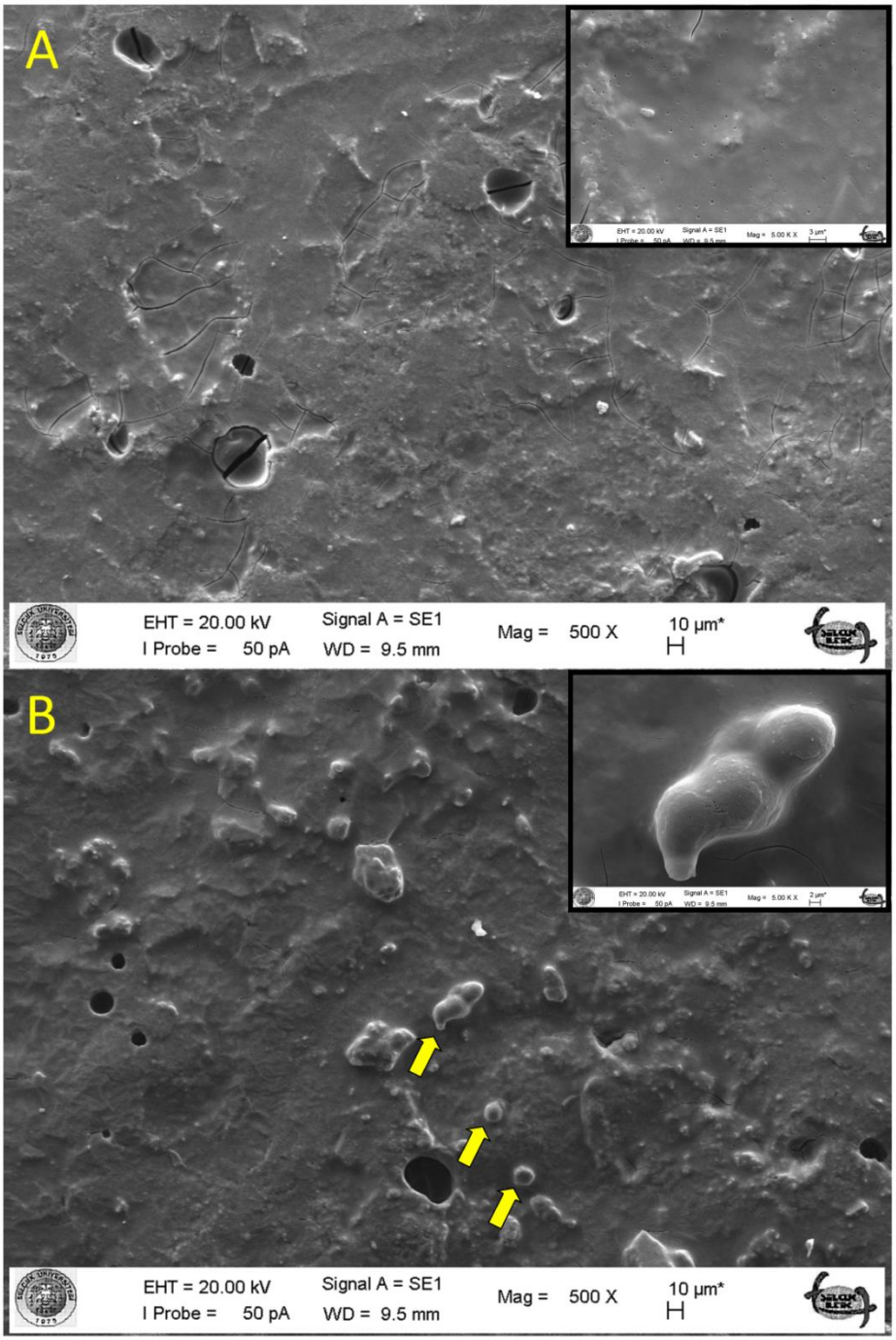
Çizelge 3.2. Üç günlük sertleşen materyallerin seyreltilmemiş eluatlarının pH değerleri

Test Grupları	Eluatların pH değeri
Vitrebond	6
Biodentine	9
IRM	8-9
PMTA	9-10
MM-MTA	11
SDR	8
Kompomer	8
PMMA	8

3.6. SEM Analizi Bulguları

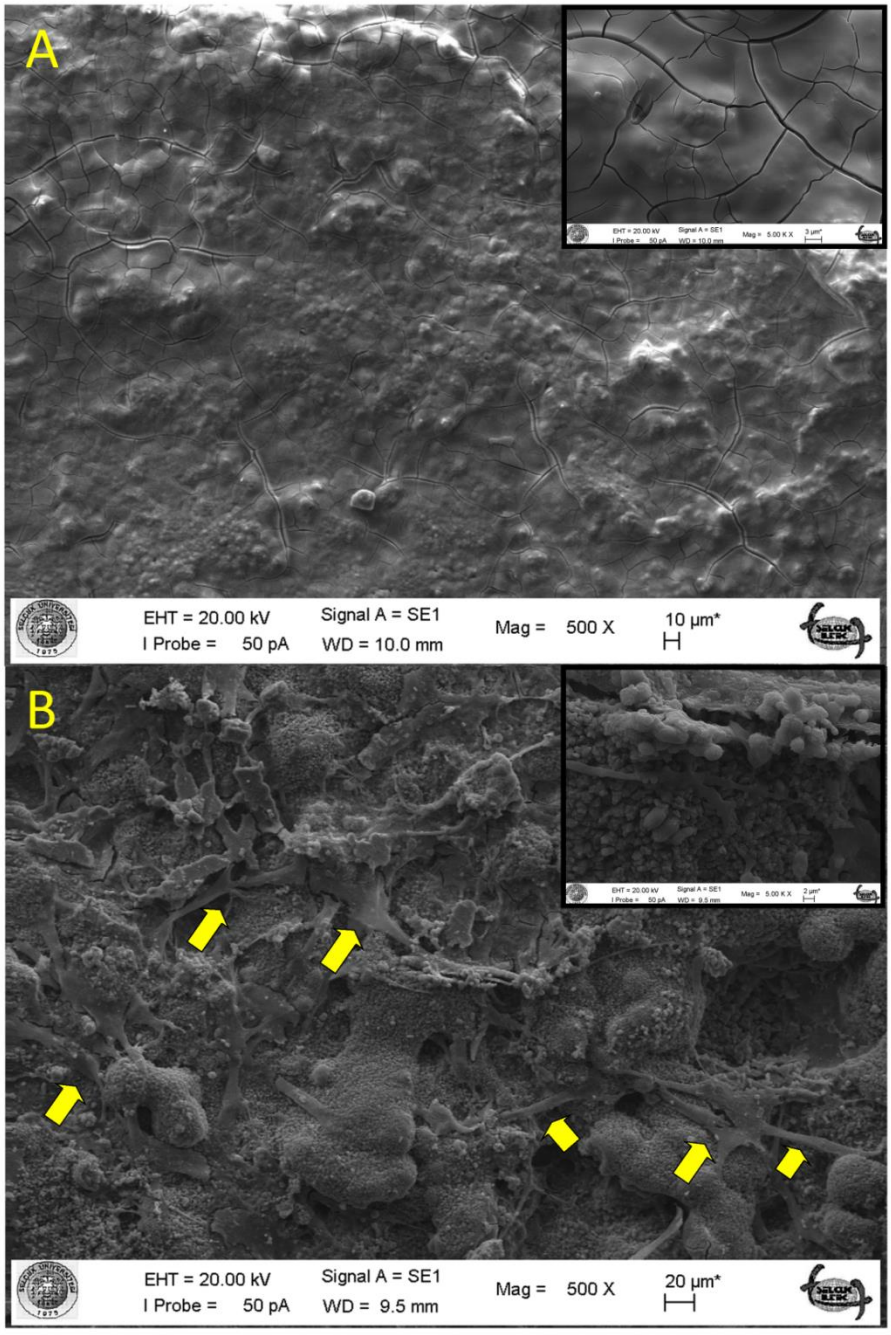
Flow sitometri için kullanılan örnekler aynı zamanda SEM analizi için de kullanılmıştır. Üç günlük sertleşen materyaller 1 gün de DMEM içerisinde bekletilip eluatları toplandıktan sonra materyal yüzeylerine PDL hücreleri ekilmiştir. Dolayısıyla SEM analizi yapılan bütün örneklerin sertleşme süresi 4 gün olmuştur. Aşağıda belirtilen SEM görüntülerinden üsttekiler orijinal materyal yüzeyini alttakiler PDL hücresi ekilen materyal yüzeyini göstermektedir. Her bir SEM görüntüsü içerisindeki küçük kare alanda yer alan görüntüler aynı alandaki görüntünün 5000x'lik büyütmesini göstermektedir.

Vitrebond materyal yüzeyinin hafif pürüzlü ve homojen olduğu ve bazı bölgelerde küçük çatlaklar olduğu görülmektedir. Materyal yüzeyinde düzensiz tümseklere ve bazı alanlarda küçük boşluklara rastlanmıştır. PDL hücresi ekilen materyal yüzeyi tarandığında oldukça az sayıda hücreye rastlanmıştır. Vitrebond örneklerinin SEM görüntüleri PDL hücrelerinin materyale iyi tutunamadığını göstermektedir. Fibroblast hücrelerinin yuvarlaklaşmış morfoloji sergilediği izlenmektedir (Resim 3.18).



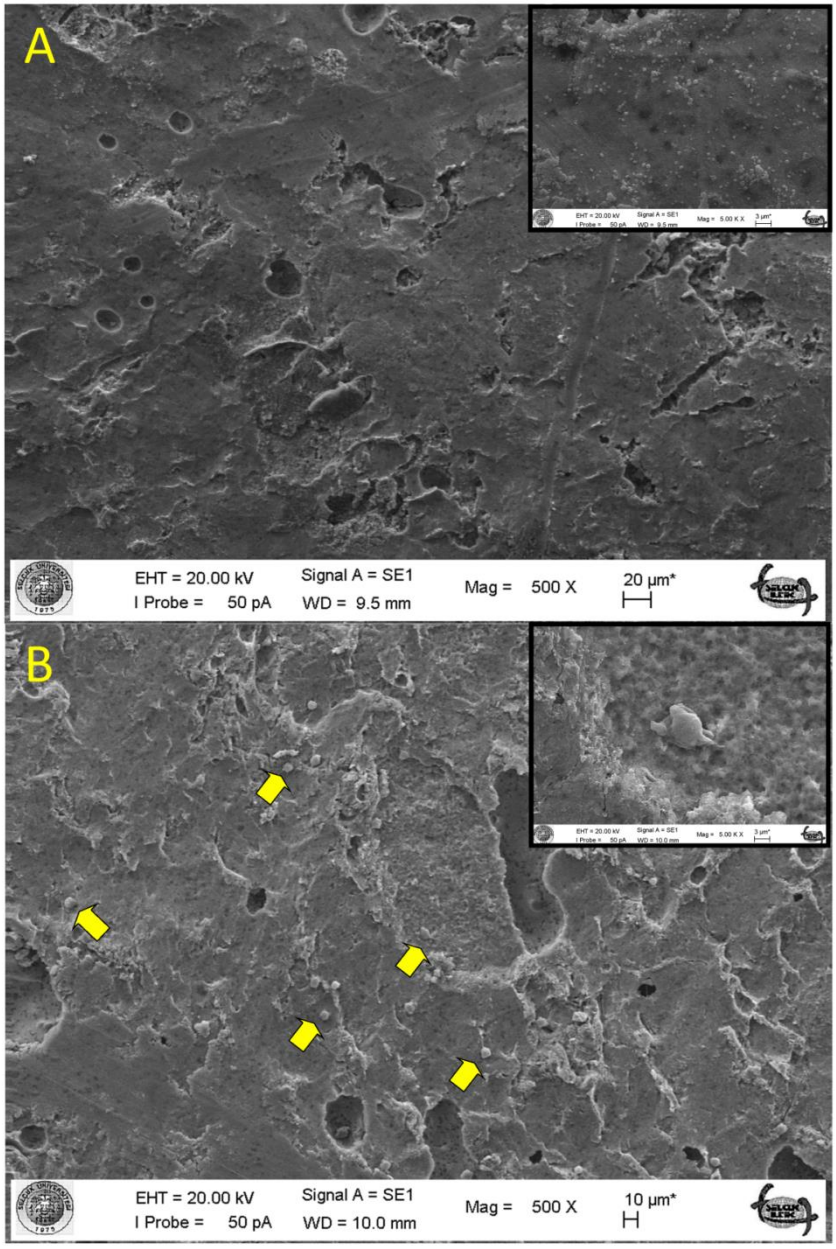
Resim 3.18. Vitrebond materyal yüzeyi (A) ve bu yüzeye tutunan PDL hücreleri'ne ait SEM görüntüleri (B) (500x ve 5000x büyütme)

Biodentine materyal yüzeyi kristalli, amorföz bir yapıya sahip olmakla birlikte liyofilizatörün vakum etkisine bağlı olarak materyal yüzeyinde çatlaklar izlenmektedir. Biodentine örnekleri üzerinde sayıca oldukça fazla PDL hücresine rastlanmıştır. Fibroblastların orijinal morfolojilerini korudukları ve çok sayıda filopodyal ve lamelipodyal oluşum gösterdikleri izlenmektedir (Resim 3.19).



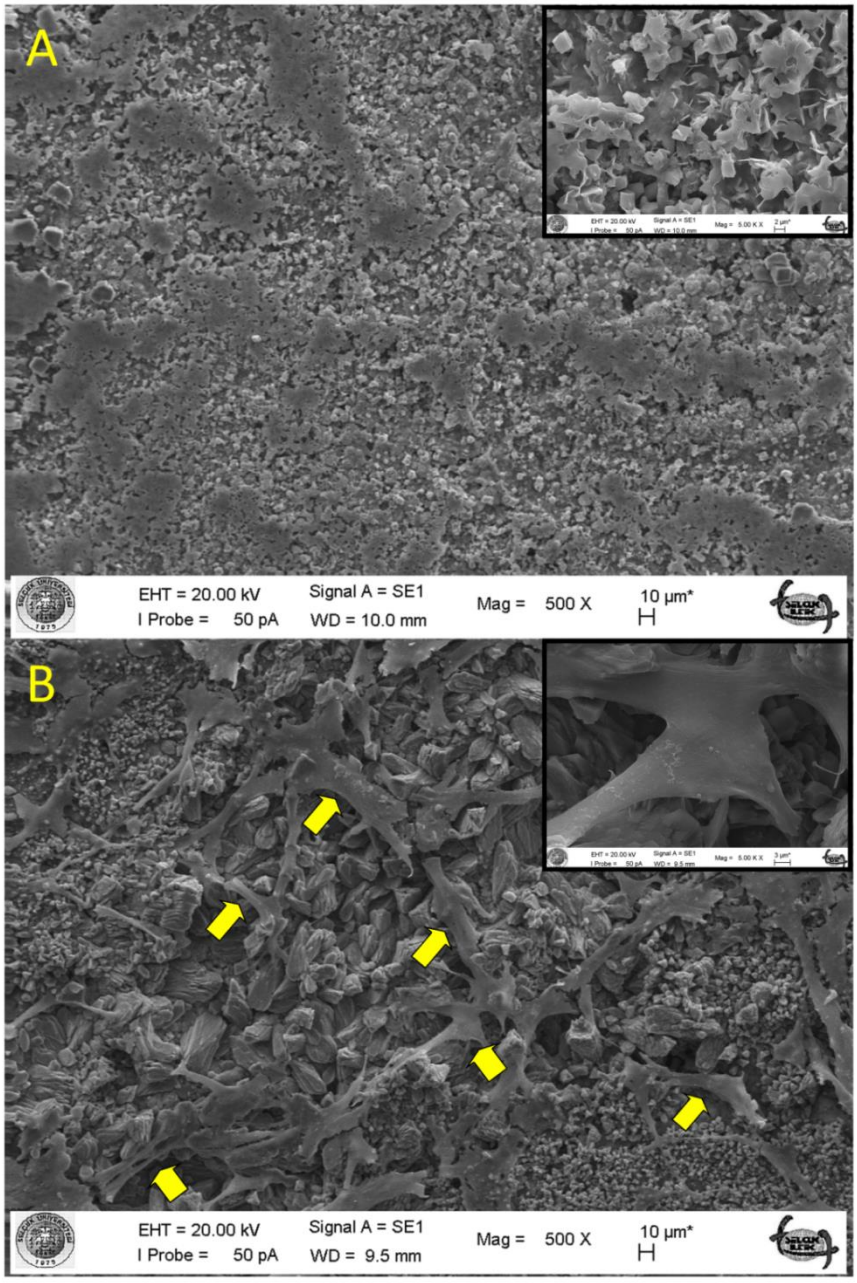
Resim 3.19. Biodentine materyal yüzeyi (A) ve bu yüzeye tutunan PDL hücreleri'ne ait SEM görüntüleri (B) (500x ve 5000x büyütme)

IRM materyal yüzeyinin yapısal küçük boşluklar haricinde düzgün olduğu gözlemlenmektedir. IRM yüzeyindeki PDL hücrelerinin sayıca oldukça az olduğu ve hücrelerin yuvarlaklaşmış bir şekilde materyal yüzeyinde kaldığı izlenmektedir. Bazı alanlarda PDL hücrelerinin ciddi morfolojik değişikliğe uğradığı gözlemlenmiştir. IRM'ye tutunan PDL hücrelerinde herhangi bir filopodyal oluşuma rastlanmamıştır (Resim 3.20).



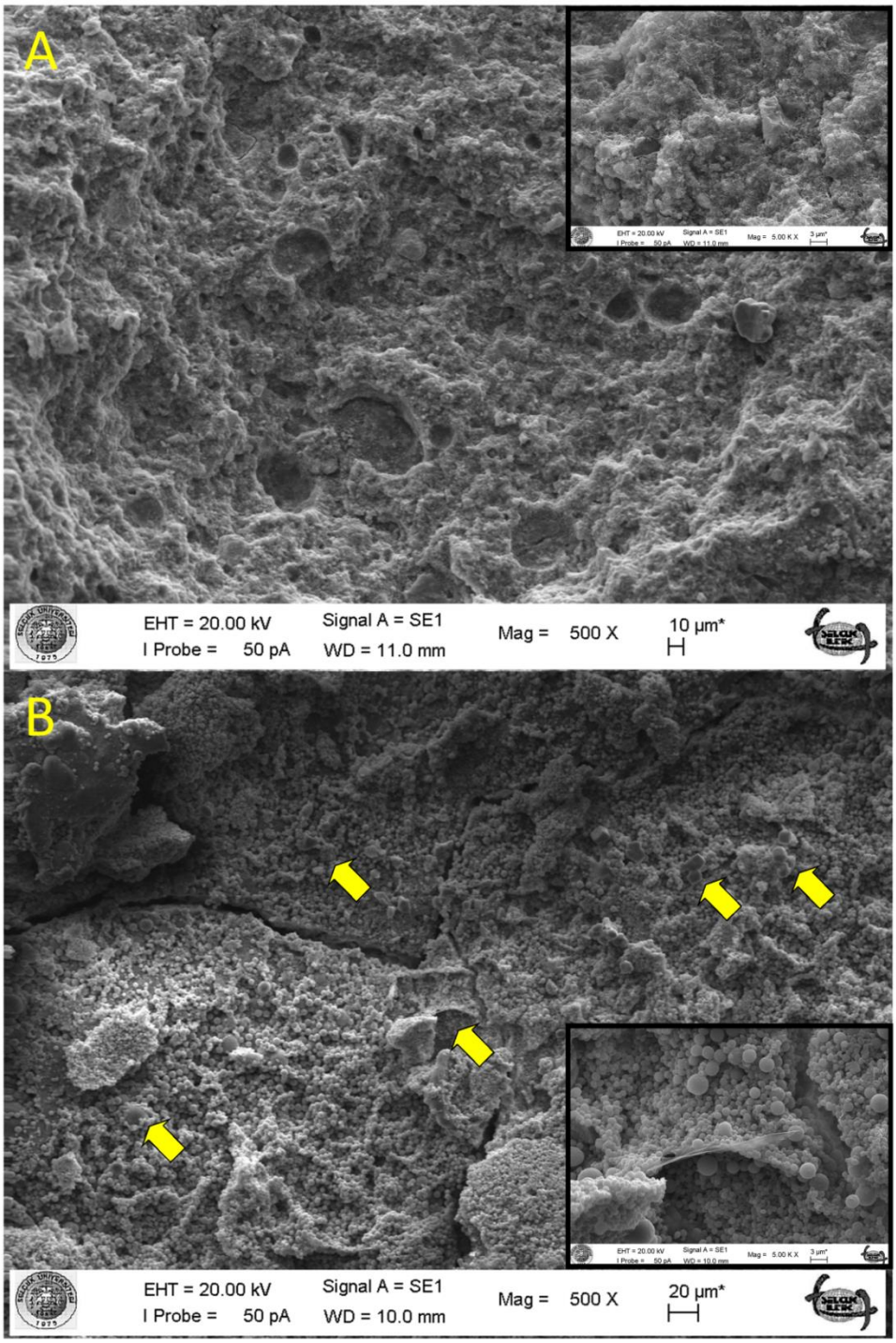
Resim 3.20. IRM materyal yüzeyi (A) ve bu yüzeye tutunan PDL hücreleri'ne ait SEM görüntüleri (B) (500x ve 5000x büyütme)

PMTA yüzeyinin kristalize bir yapıda olduğu gözlemlenmiştir. PDL hücrelerinin tipik yapısal morfolojisi açıkça izlenmektedir. En iyi hücre morfolojisinin PMTA grubunda olduğu görülmektedir. PDL hücrelerinin PMTA yüzeyinde tek kat hücre tabakası oluşturduğu, daha çok lamelipodyal oluşum gösterdikleri izlenmektedir. PMTA grubunda Biodentine ile karşılaştırıldığında daha az PDL hücresine rastlanmıştır fakat hücrelerin Biodentine grubuna göre daha fazla uzamaya meyilli oldukları göze çarpmaktadır (Resim 3.21).



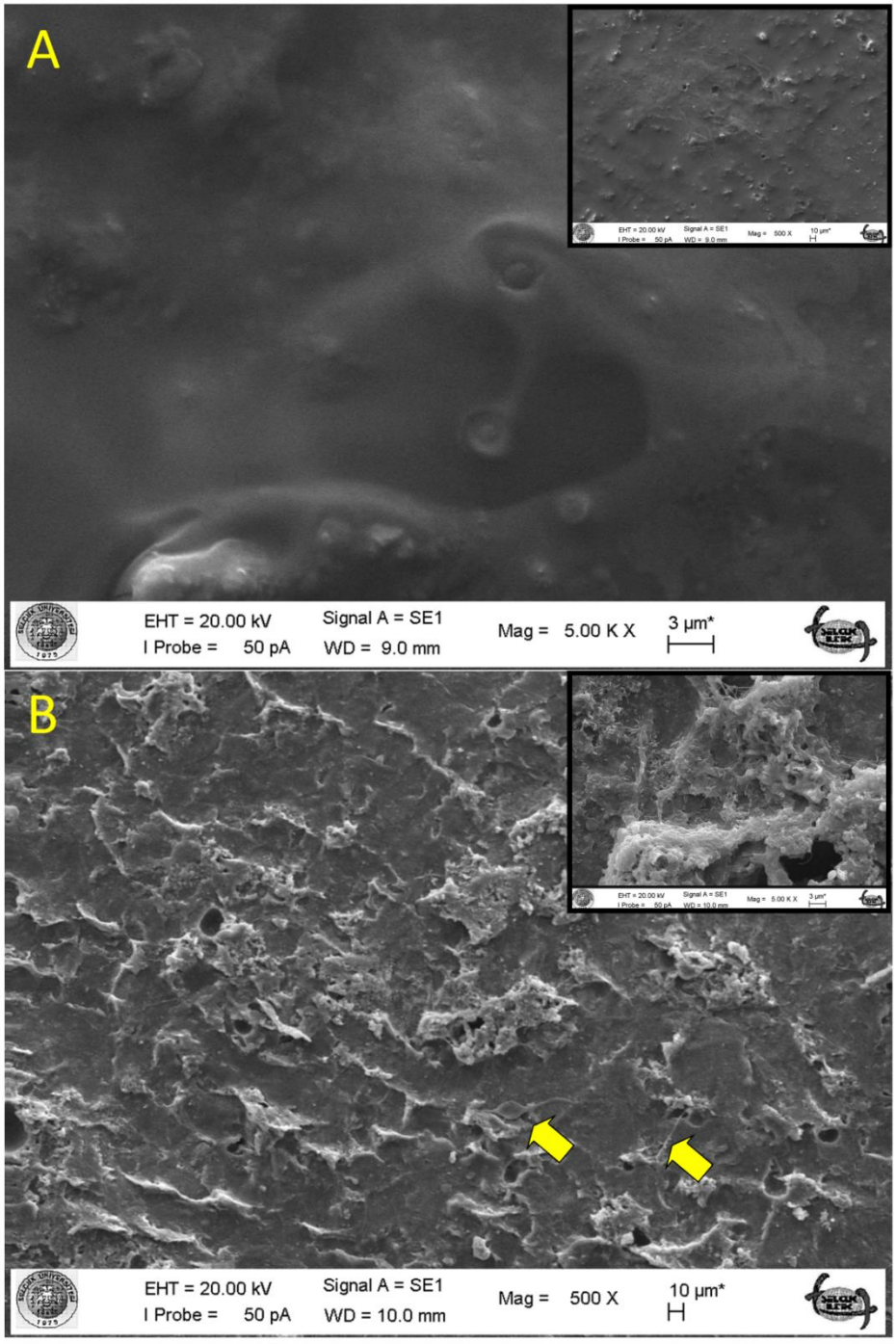
Resim 3.21. PMTA materyal yüzeyi (A) ve bu yüzeye tutunan PDL hücreleri'ne ait SEM görüntüleri (B) (500x ve 5000x büyütme)

MM-MTA yüzeyinin amorföz, globüler tarzda kristalize bir yapıda olduğu görülmektedir. MM-MTA yüzeyinde çok fazla sayıda yuvarlaklaşmış PDL hücresine rastlanmıştır. Çok az alanda PDL hücrelerinin tutunup uzamaya başladığı ve kısa filopodyalar oluşturduğu gözlemlenmiştir (Resim 3.22).



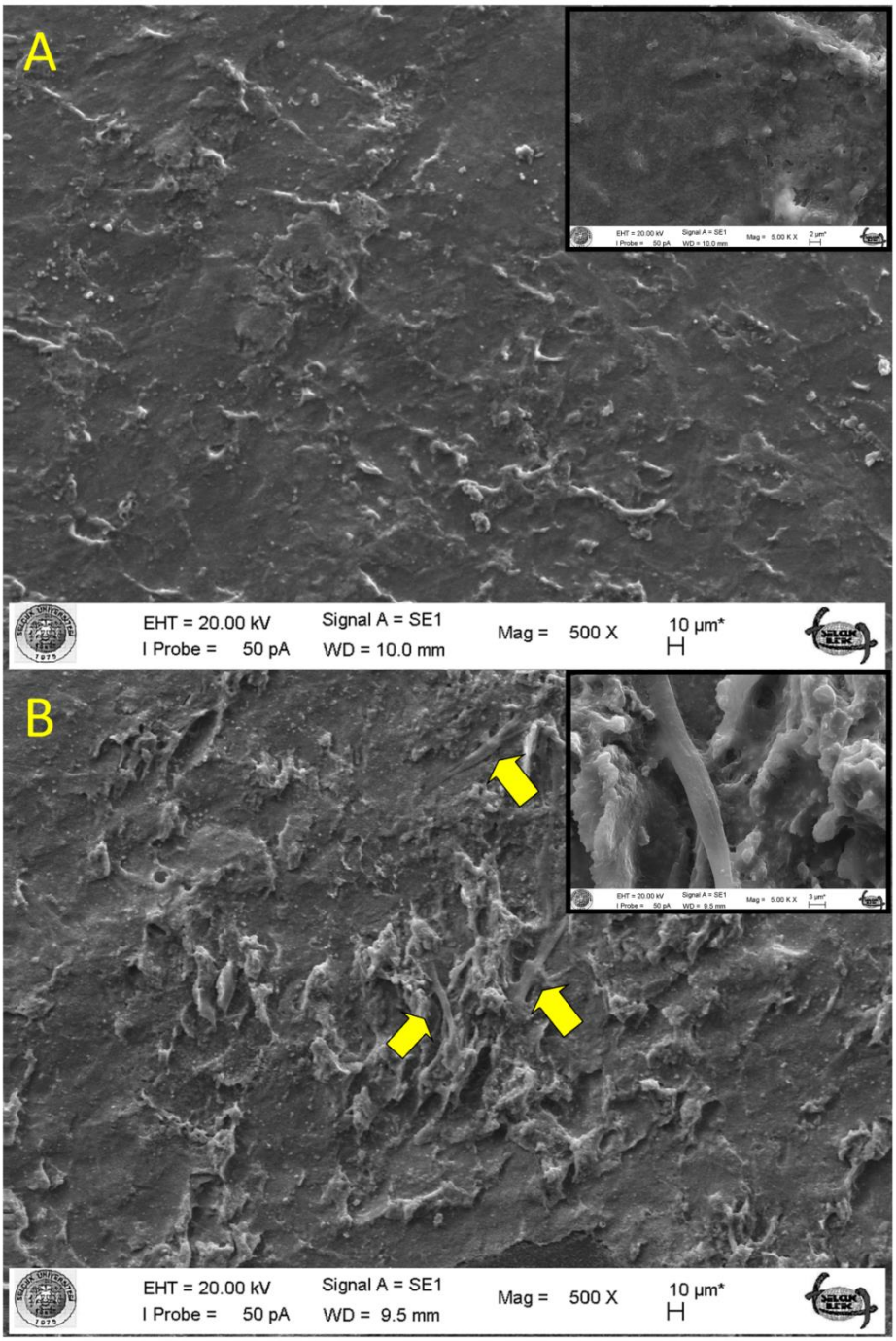
Resim 3.22. MM-MTA materyal yüzeyi (A) ve bu yüzeye tutunan PDL hücreleri'ne ait SEM görüntüleri (B) (500x ve 5000x büyütme)

SDR materyal yüzeyinin homojen ve nispeten pürüzsüz olduğu izlenmektedir. Materyal yüzeyinde dalga şeklinde küçük katlantılar görülmektedir. SDR yüzeyinde az sayıda hücreye rastlanmıştır ve hücrelerin yuvarlaklaşma eğiliminde olduğu gözlemlenmiştir. Çok az sayıda hücrenin ince filopodyalar oluşturduğu göze çarpmaktadır (Resim 3.23).



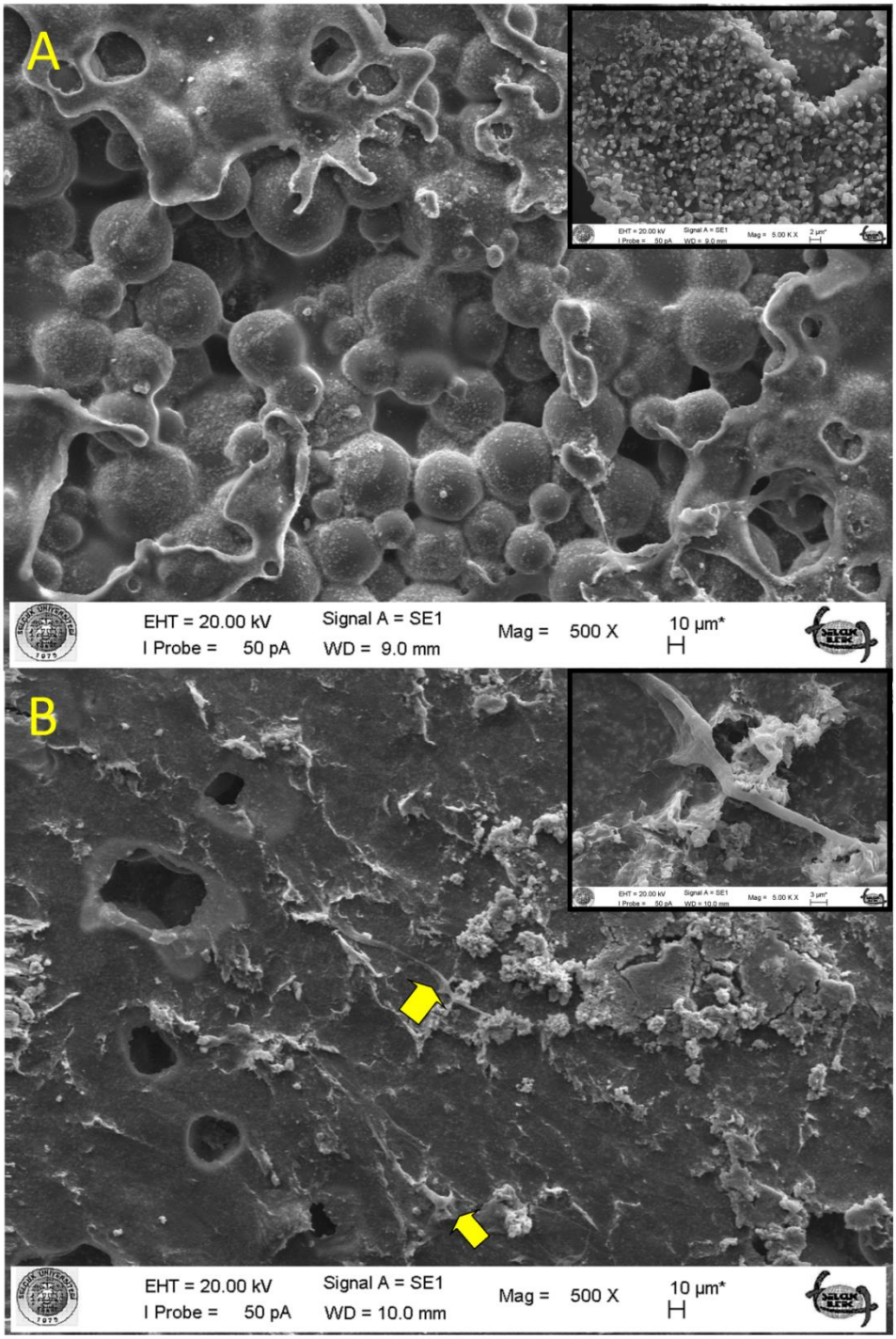
Resim 3.23. SDR materyal yüzeyi (A) ve bu yüzeye tutunan PDL hücreleri'ne ait SEM görüntüleri (B) (500x ve 5000x büyütme)

Kompomer materyal yüzeyinin 500'lük büyütmede bulutsu bir görünüme sahip olduğu 5000'lik büyütmede ise yüzeyde küçük katlantıların olduğu izlenmektedir. PMTA ve Biodentine ile kıyaslandığında Kompomer yüzeyinde daha az sayıda hücreye rastlanmıştır. Fakat tutunan hücrelerin iyi uzadıkları ve filopodyal ve lamelipodyal oluşum gösterdikleri görülmektedir (Resim 3.24).



Resim 3.24. Kompomer materyal yüzeyi (A) ve bu yüzeye tutunan PDL hücreleri'ne ait SEM görüntüleri (B) (500x ve 5000x büyütme)

PMMA kemik simanı yüzeyinin çeşitli boyutlarda globüllerden oluştuğu görülmektedir. PMMA yüzeyine yapışan hücre sayısı oldukça azdır. Nadir bazı alanda hücre görüntüsü yakalanabilmiştir. Tutunan hücrelerin ince uzun ipliksi görünümleri ve filopodyal oluşumları dikkat çekmektedir (Resim 3.25).



Resim 3.25. PMMA kemik simanı materyal yüzeyi (A) ve bu yüzeye tutunan PDL hücreleri'ne ait SEM görüntüleri (B) (500x ve 5000x büyütme)

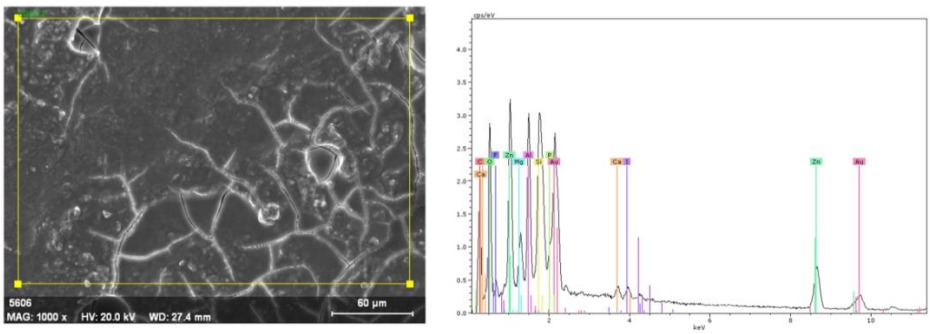
3.7. SEM-EDX Analizi Bulguları

Yapılan SEM-EDX incelemesinde materyal yüzeyi altınla kaplandığı için her bir EDX spektrumunda altın elementine rastlanmaktadır. Elemental kompozisyon belirtilirken altın elementi dikkate alınmamıştır. Aşağıdaki EDX spektrumlarında X ekseni KV birimli X ışını enerjisini gösterirken Y ekseni X-ray ışınının yoğunluğunu temsil etmektedir.

Vitrebond örneğinin SEM-EDX analizinde rastlanan elementler ve bunların ağırlıkça yüzdeleri Çizelge 3.3'de verilmiştir. Vitrebond'un ana kompozisyonunu karbon, oksijen ve flor oluşturmaktadır. EDX analizi silikon, çinko ve alüminyum pikleri de göstermektedir (Şekil 3.12). Bunun yanında eser miktarda magnezyum, kalsiyum, fosfor ve iyota da rastlanmıştır.

Çizelge 3.3. Vitrebond grubunda SEM-EDX analizi sonucunda elde edilen elemental kompozisyon ve ağırlıkça yüzdeleri

Elemental Kompozisyon	Ağırlıkça Yüzde (%)
Karbon	16,01
Oksijen	33,97
Flor	24,07
Magnezyum	2,03
Alüminyum	5,40
Silikon	8,31
Fosfor	1,43
Kalsiyum	0,37
Çinko	7,30
İyot	1,12

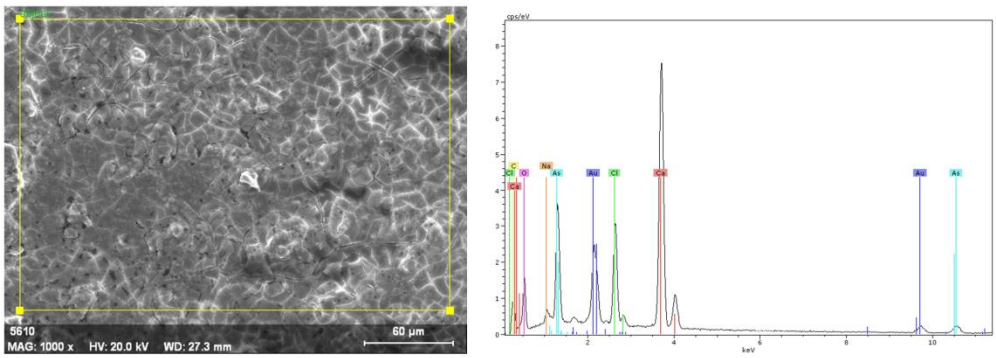


Şekil 3.12. Vitrebond materyal yüzeyinde rastgele seçilen bir alanın SEM görüntüsü (1000x büyütme) ve aynı alanın EDX spektrumu

EDX analizi sonuçlarına göre Biodentine'in ana kimyasal kompozisyonunu karbon, oksijen ve kalsiyum elementlerinin oluşturduğu görülmektedir (Çizelge 3.4). EDX analizi düşük oranda sodyum, arsenik ve klor pikleri de göstermektedir (Şekil 3.13).

Çizelge 3.4. Biodentine grubunda SEM-EDX analizi sonucunda elde edilen elemental kompozisyon ve ağırlıkça yüzdeleri

Elemental Kompozisyon	Ağırlıkça Yüzde (%)
Karbon	11,28
Oksijen	43,02
Sodyum	2,29
Klor	7,87
Kalsiyum	26,27
Arsenik	9,26

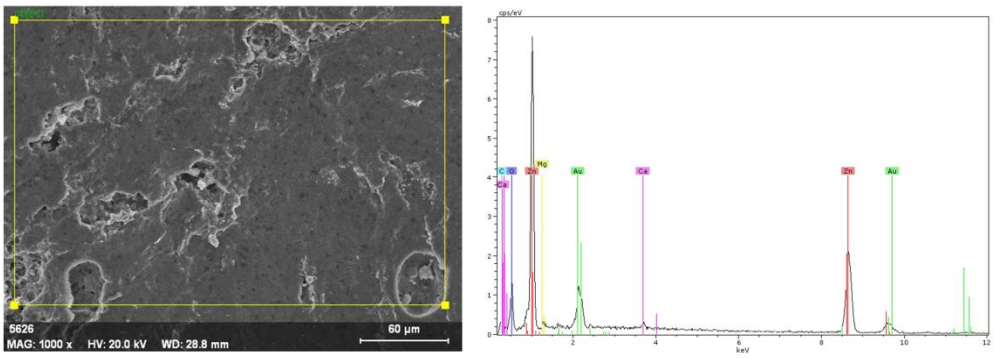


Şekil 3.13. Biodentine materyal yüzeyinde rastgele seçilen bir alanın SEM görüntüsü (1000x büyütme) ve aynı alanın EDX spektrumu

IRM'nin elemental kütlesinin çoğunluğunu çinko ve oksijen oluşturmaktadır (Çizelge 3.5). EDX analizi düşük oranda karbon, kalsiyum ve magnezyum pikleri de göstermektedir (Şekil 3.14).

Çizelge 3.5. IRM grubunda SEM-EDX analizi sonucunda elde edilen elemental kompozisyon ve ağırlıkça yüzdeleri

Elemental Kompozisyon	Ağırlıkça Yüzde (%)
Karbon	5,42
Oksijen	26,26
Magnezyum	2,31
Kalsiyum	0,61
Çinko	65,40

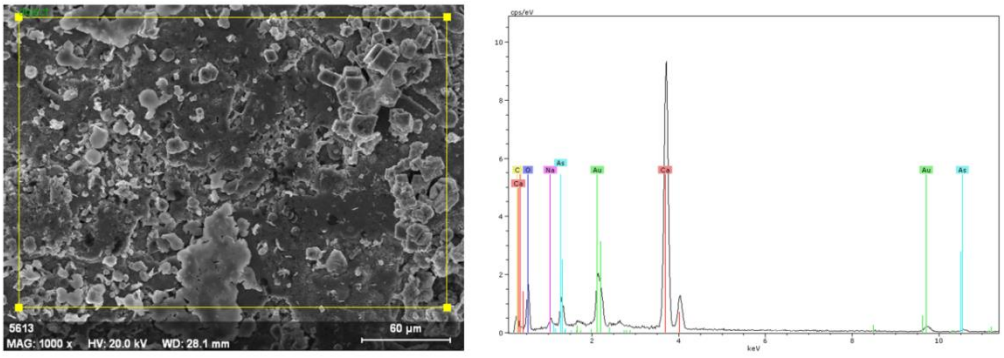


Şekil 3.14. IRM materyal yüzeyinde rastgele seçilen bir alanın SEM görüntüsü (1000x büyütme) ve aynı alanın EDX spektrumu

PMTA örneğinin ana elemental kompozisyonunu kalsiyum ve oksijen oluşturmaktadır (Çizelge 3.6). Bunun yanında EDX analizi düşük oranda karbon, sodyum ve arsenik pikleri sergilemektedir (Şekil 3.15).

Çizelge 3.6. PMTA grubunda SEM-EDX analizi sonucunda elde edilen elemental kompozisyon ve ağırlıkça yüzdeleri

Elemental Kompozisyon	**Ağırlıkça Yüzde (%)**
Karbon	6,72
Oksijen	48,63
Kalsiyum	39,51
Sodyum	1,00
Arsenik	1,90

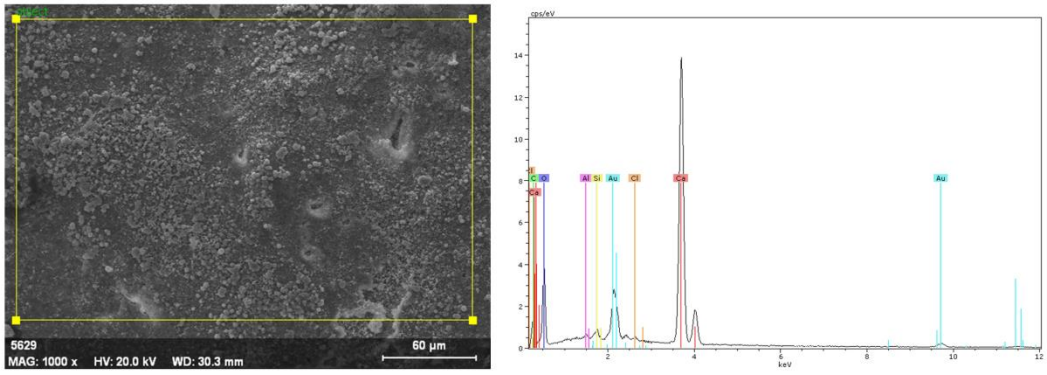


Şekil 3.15. PMTA materyal yüzeyinde rastgele seçilen bir alanın SEM görüntüsü (1000x büyütme) ve aynı alanın EDX spektrumu

MM-MTA grubunun ana elemental kompozisyonunu kalsiyum ve oksijen oluşturmaktadır (Çizelge 3.7). EDX analizi düşük oranda karbon piki göstermiştir. MM-MTA'nın kompozisyonunda eser miktarda alüminyum, silikon ve klora rastlanmıştır (Şekil 3.16).

Çizelge 3.7. MM-MTA grubunda SEM-EDX analizi sonucunda elde edilen elemental kompozisyon ve ağırlıkça yüzdeleri

Elemental Kompozisyon	Ağırlıkça Yüzde (%)
Karbon	8,29
Oksijen	60,45
Alüminyum	0,08
Silikon	0,26
Klor	0,24
Kalsiyum	30,68

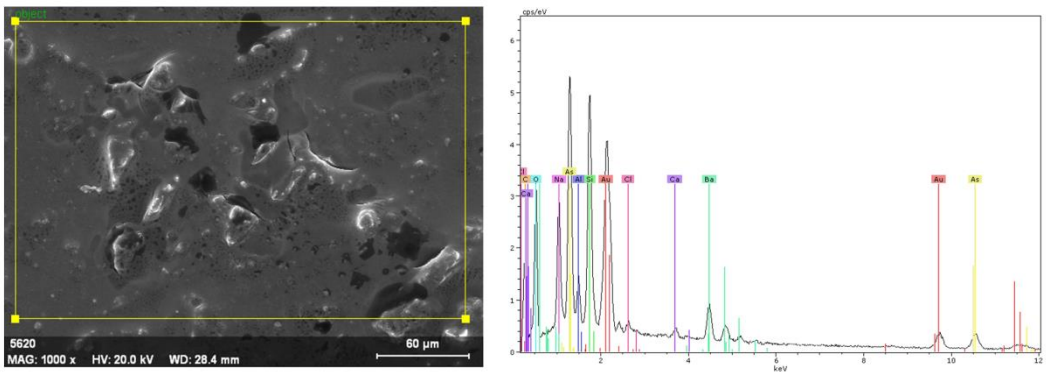


Şekil 3.16. MM-MTA materyal yüzeyinde rastgele seçilen bir alanın SEM görüntüsü (1000x büyütme) ve aynı alanın EDX spektrumu

SDR örneklerinde çeşitli sayıda elemente rastlanmıştır. SDR kompozisyonunda yüksek oranda oksijen ve karbon bulundururken düşük oranda sodyum, alüminyum, silikon, arsenik ve baryum bulundurmaktadır (Çizelge 3.8). EDX analizi eser miktarda kalsiyum ve klor pikleri göstermiştir (Şekil 3.17).

Çizelge 3.8. SDR grubunda SEM-EDX analizi sonucunda elde edilen elemental kompozisyon ve ağırlıkça yüzdeleri

Elemental Kompozisyon	Ağırlıkça Yüzde (%)
Karbon	18,45
Oksijen	51,66
Sodyum	5,64
Alüminyum	2,05
Silikon	9,14
Kalsiyum	0,27
Arsenik	7,06
Baryum	5,47
Klor	0,24

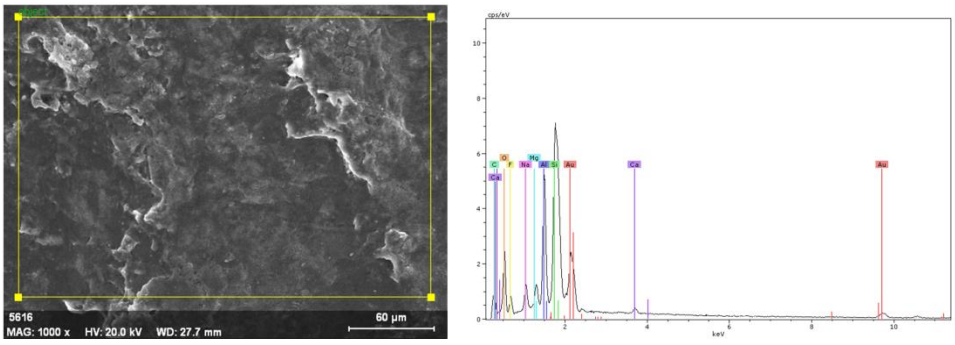


Şekil 3.17. SDR materyal yüzeyinde rastgele seçilen bir alanın SEM görüntüsü (1000x büyütme) ve aynı alanın EDX spektrumu

Kompomer grubunun ana elementlerini oksijen, flor ve silikon oluşturmaktadır (Çizelge 3.9). EDX spektrumu karbon, alüminyum ve daha az oranda olmak üzere sodyum, magnezyum ve kalsiyum pikleri göstermektedir (Şekil 3.18).

Çizelge 3.9. Kompomer grubunda SEM-EDX analizi sonucunda elde edilen elemental kompozisyon ve ağırlıkça yüzdeleri

Elemental Kompozisyon	Ağırlıkça Yüzde (%)
Karbon	9,77
Oksijen	30,74
Flor	24,93
Sodyum	2,89
Magnezyum	1,95
Alüminyum	8,76
Silikon	20,51
Kalsiyum	0,46

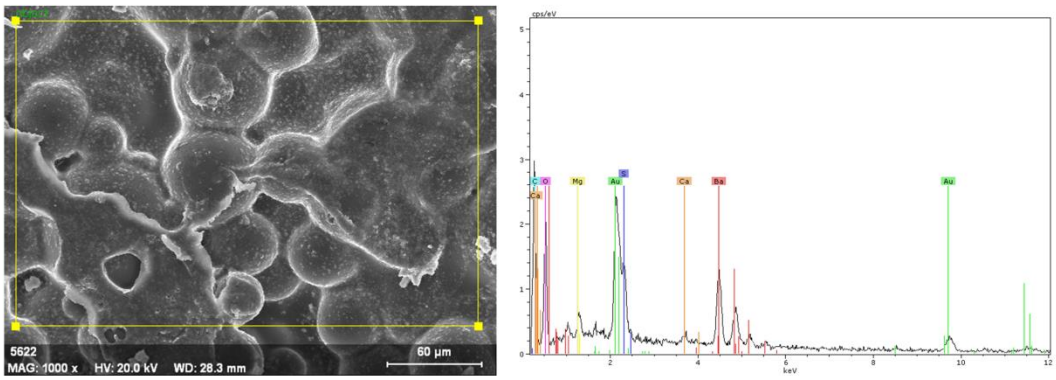


Şekil 3.18. Kompomer materyal yüzeyinde rastgele seçilen bir alanın SEM görüntüsü (1000x büyütme) ve aynı alanın EDX spektrumu

PMMA kemik simanı örneklerinin ana kimyasal kompozisyonunu karbon, oksijen ve baryumun oluşturduğu görülmektedir (Çizelge 3.10). EDX analizi düşük oranda sülfür, kalsiyum ve magnezyum pikleri de sergilemektedir (Şekil 3.19).

Çizelge 3.10. PMMA kemik simanı grubunda SEM-EDX analizi sonucunda elde edilen elemental kompozisyon ve ağırlıkça yüzdeleri

Elemental Kompozisyon	Ağırlıkça Yüzde (%)
Karbon	32,23
Oksijen	50,17
Magnezyum	1,13
Sülfür	3,02
Kalsiyum	0,14
Baryum	13,31



Şekil 3.19. PMMA kemik simanı materyal yüzeyinde rastgele seçilen bir alanın SEM görüntüsü (1000x büyütme) ve aynı alanın EDX spektrumu

4. TARTIŞMA

Endodonti alanında kullanılan materyallerin biyouyumluluğu bu materyallerde ilk başta aranan özelliklerden birisidir. Özellikle perforasyon tamiri ya da kök ucu dolgusu yerleştirilmesi işlemlerinde materyal çevredeki canlı doku ile uzun süre, temas halinde kalacağından bu durum daha da önem kazanmaktadır. Biyouyumlu olmayan retrograd dolgu materyalleri komşu periapikal dokularda dejenerasyona sebebiyet verebilmekte ve yara iyileşmesini geciktirebilmektedir.

Bir kök ucu dolgu maddesi ya da perforasyon tamir materyalinin biyouyumluluğu üç aşamada değerlendirilmektedir. İlk aşamada bir takım laboratuar sitotoksisite deneyleri yapılır. Materyalin *in vitro* şartlarda sitotoksik olmadığı tespit edilirse, subkütanoz doku ya da kas içerisine implante edilip lokal doku reaksiyonu değerlendirilir. Son olarak da test materyaline karşı hedef dokunun *in vivo* reaksiyonu hayvan ya da insan deneklerinde değerlendirilir (Osorio ve ark 1998).

Hücresel reaksiyonların *in vitro* analizi genellikle başlangıç yaklaşım olarak düşünülmektedir (Schmalz 1994). Sitotoksisite, biyouyumluluğu değerlendiren *in vitro* testlerin yaygın olarak kullanılanlarından bir tanesidir. Sitotoksisite hangi materyalin çalışmadan çıkartılacağı ve hangi materyalin ileri testlere tabi tutulacağı konusunda değerli bilgiler veren basit, hızlı, tekrar edilebilir ve pahalı olmayan bir test metodudur (Torabinejad ve ark 1995c, Hirschman ve ark 2012). *İn vitro* sitotoksisite çalışmaları materyalin temel biyolojik karakterinin ve bunun altında yatan hücresel mekanizmaların analizine izin verir (Camargo ve ark 2009). İmplantasyon gibi *in vivo* testler, konak ve incelenen materyaller arasındaki kompleks etkileşimlerin belirlenmesine olanak tanır. *İn vivo* şartlarda gerçekleştirilen deneylerde sıklıkla problem teşkil eden deneysel değişkenler *in vitro* testlerde kontrol altına alınabilmektedir (Spangberg 1969).

Dental materyallerin biyouyumluluğunu değerlendirmek üzere pek çok metod önerilmiştir. Fonksiyonel testler, tipik olarak hücrelerin anabolik aktiviteler için gerekli enerjiyi sağlayabilme yeteneklerini ölçmektedir (Keiser ve ark 2000). Bu tez çalışmasında bir fonksiyonel test olan XTT tekniği kullanılmıştır. XTT metodu, MTT gibi tetrazolyum tuzlarını kullanan diğer prosedürlere göre daha az basamaklı bir işlemdir. XTT ve MTT metodlarının bir farkı da gerçekte aynı enzim sistemlerini

değerlendirmemeleridir. MTT redüksiyonunun sadece mitokondri ile ilişkili olmadığı aynı zamanda sitoplazma ve lizozom, plazma membranı gibi mitokondriyal olmayan membranlarla ilişkili olduğu gösterilmiştir (Berridge ve ark 2005). Çözdürme işlem basamağına gerek kalmamasının yanında, XTT metodunun hızlı sonuçlar ile yüksek verimlilik, daha az hücre ile daha yüksek hassasiyet ve doğruluğunun tekrarlanabilirliği gibi pekçok avantajı bulunmaktadır (Atay ve ark 2012). Bu metod aynı zamanda radyoaktif olmayan bir test metodu olup hücrelerden krom salınımı esasına dayanan diğer sitotoksisite testlerine göre daha çok tercih edilmektedir (Bean ve ark 1995).

Biyouyumluluk çalışmalarındaki önemli noktalardan birisi de hücre tipinin seçimidir. Biyouyumluluğu değerlendirme için kullanılan hücre tipi klinikte kullanılan biyomateryalle temas halinde olan hücreleri temsil etmelidir. Dental materyallerin sitotoksisitesini değerlendiren daha önceki çalışmalarda osteoblastlar (Zhu ve ark 2000, Perez ve ark 2003, Saidon ve ark 2003), fare fibroblastları (Joffe 2002, Haglund ve ark 2003, Osorio ve ark 1998) ve insan fibroblastları (Koka ve ark 1996, Keiser ve ark 2000, Pistorius ve ark 2003, Balto 2004) kullanılmıştır. Biyouyumluluğu test etmek için çok sayıda hücre hattı günümüzde mevcuttur fakat bu hücre hatlarının çoğu yeniden farklılaşmıştır ve dokuya özel karakteristiklerinin çoğunu kaybetmiş durumdadırlar (Macnair ve ark 1997). Dolayısıyla bu tez çalışmasında sitotoksisiteyi değerlendirmek üzere primer periodontal ligament fibroblast hücreleri kullanılmıştır. Primer hücre kültürü sistemleri iyi belirlenmiş yöntemlerdendir ve hücre ile biyomateryal arasındaki reaksiyonu değerlendirmek için oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır (Sun ve ark 1998). İnsan hücrelerinin aynı zamanda daha az sayıda pasaj ile kültürü yapılabilmekte ve bu şekilde hücresel değişiklikler minimale indirilmektedir (Karimjee ve ark 2006). İnsan hücre hatlarının L929 gibi hayvan hücre hatlarına göre biyouyumluluk testlerine daha hassas olduğu yakın zamanda yapılan bir sitotoksisite çalışmasında gösterilmiştir (Illeperuma ve ark 2012).

Hwang ve ark (2011) kök ucu dolgu maddelerinin eluatlarının kullanılmasının laboratuar şartlarında toksisiteyi belirlemek amacıyla oldukça kullanışlı olduğunu belirtmiştir. Eluatların filtrasyon yoluyla kolayca steril edilebilme ve materyallerin, komşu hücreler ya da materyallere uzak olan hücreler üzerindeki etkilerinin

belirlenebilmesini sağlama gibi önemli avantajları mevcuttur (Keiser ve ark 2000). *İn vitro* eluat testi, kök ucu dolgu ve perforasyon tamir materyallerinin toksik elementlerinin kemik kriptası ve doku sıvılarına sızabileceği cerrahi sonrası periradiküler alanı taklit etmektedir (Huang ve ark 2005, Modareszadeh ve ark 2011). Aynı zamanda eluat çalışmalarında farklı konsantrasyonlar kullanılarak olası doza bağlı ilişkiler de değerlendirilebilmektedir (Keiser ve ark 2000). Bu çalışmada materyal eluatları elde edebilmek için yüzey alanının hacme oranı olarak $3cm^2/ml$ kullanılmıştır (ISO 2009). Bu ISO standardı kalınlığı 0,5 mm'den fazla olan sentetik polimerler, metaller ve kompozit materyaller için belirlenmiştir (ISO 2009). Bizim çalışmamızda kullandığımız materyallerin ve örnek kalınlığının bu gruba uygun olduğu görüldüğünden bu ISO standardı seçilerek deneyler yapılmıştır.

Bu tez çalışmasının XTT testinin bulguları test edilen materyal eluatlarına maruz bırakılan hücrelerin canlılığının eluat konsantrasyonlarına yüksek oranda bağlı olduğunu, yüksek eluat konsantrasyonlarının düşük eluat konsantrasyonlara göre daha sitotoksik olduğunu göstermektedir. Bu sonuçlar toksikolojik risklerin hücreler bileşiğe maruz kaldığında ortaya çıkabilceğini ve bütün maddelerin doza bağlı olarak toksik olabileceğini yansıtmaktadır (Deichmann ve ark 1986). Üstünde durulması gereken önemli konulardan birisi de hücre kültürü koşullarının homeostatik olmadığıdır ve *in vivo* şartlarda gerçekleşen toksik maddelerin eliminasyonu hücre kültürü koşullarında sağlanamamaktadır (Wei ve ark 2012). Aksine canlı dokular toksik artıkları uzaklaştırabilecek periapikal savunma mekanizmasına ve lemfatiklere sahiptir (Camps ve About 2003). Bu çalışmada materyal eluatlarının seyreltilmiş konsantrasyonları kullanılarak hem doza bağlı etkinin araştırılması hem de klinik şartların simülasyonu amaçlanmıştır. Çünkü ağız ortamında yerleştirilen kök ucu dolgu ve perforasyon tamir materyallerinden salınan toksik komponentlerin konsantrasyonu sirkülasyondaki doku sıvıları tarafından seyreltilmektedir (Wei ve ark 2012).

Materyal eluatlarına maruz bırakılan PDL hücrelerinin invert mikroskop altındaki incelemeleri, hücreler ve kullanılan retrograd dolgu maddeleri arasındaki etkileşimi bize görsel olarak sunabilmektedir. İnvert mikroskop incelemeleri, Biodentine ve kompomer eluatına maruz bırakılan hücre kültürlerinde yoğun ve hemen hemen konflüant hücrelerin bulunduğunu göstermektedir. Biodentine ve

kompomer eluatlarının 1:8'lik konsantrasyonunda PDL hücrelerinin oldukça sağlıklı olduğu gözlemlenmiştir. PMTA grubunda da PDL hücrelerinin minimal morfolojik değişiklik gösterdiği gözlemlenirken, morfolojisi ciddi anlamda bozulan PDL hücrelerine Vitrebond grubunda rastlanmıştır. IRM grubunda 1:8'lik konsantrasyon haricinde PDL hücrelerinin retraksiyona uğradığı görülmektedir. SDR grubunda daha fazla olmak üzere PMMA kemik simanı ve MM-MTA gruplarında da PDL hücrelerinin morfolojisinin değişmeye meyilli olduğu görülmektedir. Deney esnasında alınan mikroskop görüntülerinin XTT testinin sonuçları ile paralel olduğu görülmektedir. Diğer bütün gruplardan farklı olarak Vitrebond simanından bir takım partiküllerin hücre kültür sistemi içine salındığı invert mikroskop ile saptanmıştır. Vitrebondun sınırları içerisindeki çok sayıda ve yoğun olarak karşımıza çıkan bu salınan partiküllerin hücre gelişimini olumsuz yönde etkilemiş olabileceği söylenebilir. Deney esnasında PDL hücrelerinin mikroskobik görüntüsü de alındığından materyallerden salınan iyonların hücre morfolojisi üzerinde farklı etkilerde bulunabileceği göz önünde bulundurulmalıdır.

Cam iyonomer simanlar, adeziv özellikleri ve flor salma kapasiteleri nedeniyle diş hekimliğinde popülarite kazanan materyallerden olmuşlardır. İyi adezyon özelliklerine rağmen neme olan hassasiyetleri, bu malzemelerin endodontik cerrahi alanındaki kullanımlarını kısıtlamıştır. Bu tez çalışmasında Vitrebond en sitotoksik iki materyalden biri olarak karşımıza çıkmaktadır. Cam iyonomer simanların MTA'ya göre daha sitotoksik maddeler olduğu daha önce yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Abdullah ve ark 2002, Görduysus ve ark 2007, Camargo ve ark 2009, Nunez ve ark 2014). Dental materyallerin süzülebilir komponentleri hücre kültürleri üzerinde olumsuz etki oluşturmaktadır (de Souza Costa ve ark 2003). Cam iyonomer simanların eluatlarında tespit edilen düşük miktarda alüminyum ve/veya demir iyonları bu sitotoksisitenin sebeplerinden biri olabilir (Soheili ve ark 2003).

Karimjee ve ark (2006) yaptıkları sitotoksisite çalışmasında cam iyonomer siman eluatının mitokondriyal aktiviteyi yavaşlattığını göstermiştir. Bizim tez çalışmamızın bulgularıyla uyumlu olarak farklı değerlendirme yöntemlerini kullanan çalışmalar da Vitrebond'un yüksek derecede sitotoksik olduğunu göstermiştir (Schuster ve ark 2001, Galler ve ark 2005). Yine yapılan başka birtakım çalışmalar

da, bizim çalışmamızın bulgularıyla paralel olarak Vitrebond'un sitotoksik bir materyal olduğunu doğrulamıştır (Geurtsen ve ark 1998a, Nicholson ve Czarnecka 2008, Vajrabhaya ve ark 2009).

Cam iyonomer simanlardan salınan komponentlerin materyalin biyouyumluluğunu etkilediği bilinmektedir (Schuurs ve van Amerongen 1993). Materyalden alüminyum ve flor salınımının asidite ile kombinasyonu cam iyonomer simanları toksik yapmaktadır (Savarino ve ark 2000). Çalışmamızda gösterdiğimiz Vitrebondun toksisitesinin sebebi materyalden flor (Doherty 1991) ve alüminyum fosfat salınımı olabilir (Sogawa 1981). Florun insan pulpa hücrelerinde hücre gelişimini, proliferasyonunu, mitokondriyal aktiviteyi ve protein sentezini inhibe ederek sitotoksik etki gösterdiği bildirilmiştir (Chang ve Chou 2001).

Reaktif oksijen türleri normal oksijen metabolizmasının doğal yan ürünleridir ve hücre haberleşmesinde, proliferasyonunda, canlılığında önemli rol oynamaktadır (Ray ve ark 2012). Stres altında reaktif oksijen üretiminde artış, hücre yapılarında ciddi hasara neden olmakta ve kanser, yaşlanma, nörodejeneratif hastalıklar ve diyabet gibi hastalıklarda görülmektedir (Floyd 1990, Ames ve Shigenega 1992, Jenner 1994, Dandona ve ark 1996). Dolayısıyla reaktif oksijen üretimindeki artış hücresel toksisitenin olası mekanizmalarından birini açıklayabilmektedir. Nitekim Camargo ve ark (2009) Vitrebond'un orijinal eluatının reaktif oksijen üretimini 7 kat arttırdığını bulmuşlardır. Dolayısıyla Vitrebond'un sitotoksisitesiyle reaktif oksijen üretimine etkisi arasında sıkı bir ilişki olduğu söylenebilir (Camargo ve ark 2009).

Çalışmamızda istatistiksel olarak önemli olmasa da IRM'nin Vitrebond'dan sonra en sitotoksik materyal olduğu bulunmuştur. Çalışmamızın bulgularıyla paralel olarak yapılan bazı çalışmalarda da IRM'nin yüksek derecede sitotoksisite sergilediği gösterilmiştir (Haglund ve ark 2003, Lin ve ark 2004).

Retrograd dolgu maddesi olarak kullanıldığında çinkooksit öjenol simanların suda yüksek çözünürlük özelliği dolayısıyla su ve doku sıvıları ile kontak halindeyken çinko hidroksit ve öjenole ayrıştığı bilinmektedir (Mazumdar ve ark 2005). IRM grubunda hücre sayısının önemli derecede azalmasının sebebi öjenol olabilir (Haglund ve ark 2003, Sousa ve ark 2004). Konsantrasyonuna bağlı olarak öjenol, prostoglandin sentezini ve duyusal sinir aktivitesini inhibe edebilmekte ve allerjen özellikler sergileyebilmektedir (Hume 1984, Hume 1986). Düşük

konsantrasyonda öjenolün analjezik, antienflamatuar ve antiplatelet etkileri vardır ve reaktif oksijen türlerini uzaklaştırabilir (Markowitz ve ark 1992, Fujisawa ve ark 2000). Öjenolün dental pulpa hücrelerine, oral mukozal fibroblastlara ve epitelyal hücrelere karşı toksik olduğu gösterilmiştir (Kasugai ve ark 1990, Jeng ve ark 1994, Chang ve ark 2002)

Cox ve ark (1996) yapmış oldukları bir çalışmada çinko oksit öjenol içerikli restoratif materyalleri direk olarak ekspoze vital pulpa üzerine yerleştirmiş ve bakteriyel sızıntıya neden olmadan uzun dönemde pulpal enflamatuar cevaba yol açmadıklarını göstermişlerdir. Mazumdar ve ark (2005) tavşanlarda yaptığı implantasyon çalışmasında IRM'ye karşı orta dereceli bir enflamasyon geliştiğini fakat 12 hafta sonra enflamasyon izlenmeden tamamen iyileşme görüldüğünü bildirmiştir. Enflamasyonun zamanla çözülmesinin sebebinin, serbest öjenolün sistemik dolaşımdaki serum ve ekstraselüler proteinlere bağlanması olabileceği yine bu çalışmada belirtilmiştir (Mazumdar ve ark 2005). Tez çalışmamızda da IRM eluatının 1:1, 1:2 ve 1:4'lük konsantrasyonunda hücre canlılığı oldukça düşük iken 1:8'lik konsantrasyonda hücre canlılığının arttığı tespit edilmiştir. Yukarıda bahsedilen hayvan çalışmasının sonuçlarıyla paralel olarak IRM'nin en seyreltilmiş konsantrasyonunun en az sitotoksik olduğu bulunmuştur.

Çalışmamızda IRM'nin biyouyumluluk değerleri düşük çıksa da, IRM'nin endodontik cerrahi alanındaki klinik başarısının MTA ile karşılaştırılabilecek düzeyde yüksek olduğu gösterilmiştir (Chong ve ark 2003). Bu durumda öjenol toksisitesinin hücrelerde geçici bir cevaba yol açtığı ve materyalin biyouyumluluğunun apikal cerrahinin klinik başarısını etkileyen tek faktör olmadığını söyleyebiliriz. Dentine bağlanma kapasitesi, kapatma yeteneği, sızıntı potansiyeli, boyutsal stabilitesi, uygulama kolaylığı vs gibi faktörler de klinik başarı için önem teşkil etmektedir.

Biodentine, periradiküler dokular ile yakın temasta ve kalıcı yerleştirilmek üzere tasarlanan yeni bir kalsiyum silikat esaslı materyaldir. Dolayısıyla Biodentine'in periodontal ligament fibroblastları üzerindeki olası sitotoksik etkilerinin değerlendirilmesi oldukça önemlidir.

Çalışmamızın XTT testinin bulguları Biodentine'in en biyouyumlu materyal olduğunu göstermektedir. Biodentine'in likit kısmını kalsiyum klorit oluşturmaktadır. Yeni portland simanlarının biyouyumluluğunu araştıran bir çalışmada portland simanının kompozisyonuna kalsiyum klorit ilave edilerek sertleşme zamanını kısaltmak ve materyallerden kalsiyum iyonu salınımı sağlanarak hücre gelişimini indüklemek amaçlanmıştır (Abdullah ve ark 2002, Bortoluzzi ve ark 2006, Gandolfi ve ark 2008a). Biodentine kompozisyonunda bulunan kalsiyum kloritin, materyalin biyouyumluluğuna katkısı olduğu görülmektedir.

Biodentine eluatlarının biyouyumluluğunu araştıran çalışma sayısı oldukça azdır (Laurent ve ark 2008, Zanini ve ark 2012, Zhou ve ark 2013, Nunez ve ark 2014). Çalışmamızın bulguları Biodentine'in PMTA'ya göre çok daha fazla tercih edilebilir bir materyal olduğunu göstermektedir. Bizim sonuçlarımızdan farklı olarak Nunez ve ark (2014) Biodentine ve MTA'ya maruz bırakılan hücrelerin canlılık açısından benzer sonuçlar sergilediğini bulmuşlardır. Yine Zhou ve ark (2013)'nın yaptığı çalışmada da Biodentine ve MTA eluatlarına maruz bırakılan insan gingival fibroblast hücrelerinin benzer derecede canlılık sergilediği gösterilmiştir. Chang ve ark (2014b) da Biodentine ve MTA'nın benzer derecede hücre canlılığı sergilediğini bildirmişlerdir.

Çalışmamızın bulgularıyla paralel olarak Laurent ve ark (2008) Biodentine ve MTA'nın insan pulpa hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerini değerlendirmişler ve MTA ile karşılaştırıldığında Biodentine'in toksik olmadığını bulmuşlardır. Zanini ve ark (2012) Biodentine'in immortalize fare pulpa hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisini incelemişler ve hücreler Biodentine'e maruz bırakıldığında, ilk iki gün boyunca hücre çoğalmasında inhibisyon gözlemlemişlerdir. Bu inhibitör etki gözlemlendikten sonra işlem görmemiş kontrollere nazaran hücre proliferasyonunda artış olduğunu bulmuşlardır. Bu sonuçlar Biodentine ve PMTA'nın kompozisyonlarındaki farklılık ile açıklanabilir. Biodentine'in radyoopaklık veren maddesi zirkonyum oksit iken PMTA'nın radyoopasitesini bizmut oksit sağlamaktadır. Daha önce yapılan çalışmalarda bizmut oksitin hücre gelişimini indüklemediği gösterilmiştir (Camilleri ve ark 2004). Zirkonyum oksitin toksisitesini değerlendiren çalışmalar daha olumlu sonuçlar göstermiştir (Camilleri ve ark 2011a, Cutajar ve ark 2011). Dion ve ark (1997)'nın yaptığı bir çalışmada zirkonyum oksitin

fare fibroblast hücreleri ve insan farklılaşmamış hücreleri üzerinde sitotoksik etkisinin olmadığı rapor edilmiştir. Biodentine'in PMTA'ya olan diğer bir üstünlüğü de yukarıda bahsettiğimiz Biodentine'nin yapısında bulunan kalsiyum kloritin PMTA'da bulunmamasıdır.

Biodentine'in kompozisyonundaki diğer bir fark ise yapısında saf olmayan elementlerin bulunmamasıdır (Septodont 2014). Üretici firma Biodentine'in üretiminde kullanılan aktif biyosilikat teknolojisi sayesinde katışıksız bir kalsiyum silikat elde etmenin mümkün olduğunu iddia etmektedir (Septodont 2014). MTA gibi Portland simanı kaynaklı kalsiyum silikat simanlarda ise düşük konsantrasyonda metalik katışıklarla birlikte intrinsik olarak saflaştırılamayan alaşımlar bulunmaktadır (Septodont 2014). Yapılan bir takım çalışmalarda MTA eluatlarında arsenik, krom, kurşun gibi toksik ağır metallerin olduğu bulunmuştur (Dammaschke ve ark 2005, Monteiro Bramante ve ark 2008, Schembri ve ark 2010). Yakın zamanda yapılan bir çalışmada, Biodentine eluatında eser miktarda arsenik, kurşun ve krom elementlerine rastlanmıştır (Camilleri ve ark 2012). Çalışmamızın SEM-EDX bulguları da Biodentine'in kompozisyonunda arsenik içerdiğini doğrulamaktadır. Fakat bu miktar gözardı edilebilir seviyede olduğundan, güvenli kabul edilebileceği bildirilmiştir (Camilleri ve ark 2012).

Laurent ve ark (2008) Biodentine'in iyi biyouyumluluğu dolayısıyla dental pulpa ile direk temas halinde yerleştirilebileceğini bildirmiştir. Çalışmamızın bulguları gözönüne alınarak Biodentine'in kök ucu dolgu ve perforasyon tamir materyali olarak alternatif olabileceği söylenebilir.

Ümit vadedici ve doku dostu retrograd dolgu maddesi olarak tanıştırıldığımız MTA'nın biyouyumlu bir materyal olduğu ve osteogenezis ve sementogenezisi indüklediği yapılan önceki çalışmalarda gösterilmiştir (Torabinejad ve ark 1993, Torabinejad ve ark 1995c, Koh ve ark 1997, Thomson ve ark 2003). PMTA, son yıllarda oldukça popüler bir retrograd dolgu maddesi olan en bilindik MTA preparatıdır (Hayashi ve ark 2004). PMTA'nın uzun sertleşme süresi, zor manipülasyon ve yüksek fiyat gibi dezavantajları bulunmaktadır (Bozeman ve ark 2006).

MTA'nın çeşitli hücre hatlarında ve test sistemlerinde nontoksik ya da en az sitotoksik olduğu defalarca gösterilmiştir (Osorio ve ark 1998, Lin ve ark 2004, De-Deus ve ark 2005, Souza ve ark 2006, Rezende ve ark 2007). Yine yapılan bazı başka çalışmalarda da MTA'nın en biyouyumlu retrograd dolgu materyali olduğu ve PDL hücrelerine karşı toksik olmadığı rapor edilmiştir (Torabinejad ve Parirokh 2010, Fayazi ve ark 2011). Ayrıca, kalsiyum silikat MTA simanlarının osteoblast gelişimi ve proliferasyonuna izin verdiği gösterilmiştir (Torabinjad ve Parirokh 2010). Buna karşın bazı yazarlar MTA'ya kısa süre maruz bırakılan hücrelerin canlılığının azalabileceğini bildirmiştir (De-Deus ve ark 2005, Guven ve ark 2007).

Çalışmamızda PMTA diğer materyaller ile karşılaştırıldığında orta sıralarda yer almakta istatistiki olarak önemli olmasa da PMMA kemik simanı, SDR ve MM-MTA'dan daha sitotoksik olarak karşımıza çıkmaktadır. PMTA kompozisyonundaki bizmut oksitin ortama salınımı hücre canlılığının azalmasının sebeplerinden biri olabilir (Gandolfi ve ark 2010a). Nitekim daha önce yapılan çalışmalarda bizmut oksitin hücre gelişimini desteklemediği gösterilmiştir (Camilleri ve ark 2004). Min ve ark (2007)'nın yaptığı bir çalışmada bizmut oksit içeren MTA ve portland simanının dental pulpa hücrelerinin sitotoksisitesini indüklediği ve hücre canlılığını olumsuz yönde etkilediği gösterilmiştir.

Çalışmamızın bulgularıyla paralel olarak kalsiyum silikat MTA esaslı simanların IRM, Süper EBA, amalgam gibi daha eski kulanılan kök ucu dolgu maddelerine nazaran daha biyouyumlu olduğu gösterilmiştir (Bonson ve ark 2004, Pelliccioni ve ark 2004, Gandolfi ve ark 2008a, Gandolfi ve ark 2008b, Chen ve ark 2009, Torabinejad ve Parirokh 2010). Biyouyumluluk çalışmasında gingival fibroblastları kullanan Osorio ve ark (1998) MTA grubunun kontrol grubuna eşit düzeyde ve cam iyonomer ve amalgam grubundan ise daha fazla hücre canlılığı gösterdiğini bulmuştur.

Haglund ve ark (2003) çalışmamızın XTT bulgularıyla uyumlu olarak MTA'nın makrofajlar ve fibroblastlar üzerinde sitotoksik etkisi olduğunu bildirmiştir. Aynı çalışmada MTA'nın yüksek pH'sı dolayısıyla komşu hücrelerin ölümüne ve kültür medyası proteinlerinin denatürasyonuna sebep olduğu bildirilmiştir. MM-MTA'dan sonra en yüksek pH'nın PMTA eluatına ait olduğu

görülmektedir. PMTA grubunun toksisitesi hücrelerin sitoplazmik membranındaki enzim aktivitesini engelleyen yüksek pH'sından kaynaklanabilir (Özdemir ve ark 2008).

PMTA'ya alternatif olarak üretilen MM-MTA dental marketin yeni ürünlerinden biri olarak karşımıza çıkmaktadır. MM-MTA'yı araştıran çalışma sayısı oldukça azdır (Kum ve ark 2014, Chang ve ark 2014a). Yapılan bir çalışmada primer osteoblastların MTA'nın farklı tipleriyle farklı yollardan reaksiyona girdiği gösterilmiştir (Perez ve ark 2003). Bu durum MTA'nın farklı ticari formlarının olası sitotoksik etkileri bakımından farklı sonuçlara yol açabileceğini göstermektedir. Bu tez çalışmasında MM-MTA'nın biyouyumluluğu bütün gruplar içerisinde orta sıralarda yer almaktadır. Nitekim MM-MTA; PMMA kemik simanı, SDR ve PMTA ile benzer sitotoksisite sergilemiştir. Çalışmamızda, istatistiksel olarak anlamlı olmasa da MM-MTA'nın PMTA'dan daha yüksek hücre canlılık değerleri sergilediği gösterilmiştir. MTA Angelus, MM-MTA ve Bioagregat'ın içeriğindeki ağır metal düzeylerini araştıran bir çalışmada MM-MTA'nın minör düzeyde alüminyum, arsenik, berilyum, kadmiyum, krom ve demir içerdiği gösterilmiştir (Kum ve ark 2014). Fakat bu metal oksitlerin seviyesinin güvenli düzeyde olduğu belirtilmiştir. Çalışmamızın SEM-EDX bulguları da MM-MTA'da ağırlıkça %0,08 oranında alüminyum bulunduğunu göstermektedir. Kum ve ark (2014)'nın çalışmasının sonuçlarından yola çıkarak MM-MTA'nın PMTA ile benzer düzeyde ağır metal içerdiğini söyleyebilmekteyiz. Tez çalışmamızda gösterdiğimiz MM-MTA ve PMTA'nın benzer sitotoksisite değerleri, bu iki materyalin aynı seviyede ağır metal içermesinden kaynaklanabilir. Chang ve ark (2014a)'nın yakın zamanda yaptıkları çalışmanın sonuçlarına göre PMTA ve MM-MTA'nın benzer derecede biyouyumluluk gösterdiği ve MM-MTA'nın hücre canlılık değerlerinin IRM'den daha yüksek olduğu bulunmuştur. İnsan dental pulpa hücrelerini kullanan bu çalışmanın bulguları bizim tez çalışmamızın bulgularıyla paralellik göstermektedir.

Rezin kompozit dolgu materyalleri, diş hekimliğinde istikrarlı bir şekilde popülarite kazanmışlardır ve hem anterior hem de posterior dişlerin restorasyonu için kabul gören materyallerden olmuşlardır (ADA 1998). Kompozit rezinler, retrograd dolgu maddesi olarak nemli ortamda yerleştirildiğinde mikrosızıntı sergileyebilmektedirler. Işıkla sertleşen kompozit rezinler kök ucu dolgu maddesi

olarak kullanıldığında, polimerizasyonu sağlayan ışığın derin kanallara zayıf transmisyonu ve derin kök ucu dolgu maddeleri için kendi kendine sertleşen veya dual sertleşen rezin materyallere ihtiyaç duyulması gibi problemler doğmaktadır (Roberson ve ark 2006). Bu tez çalışmasının gruplarından biri olan SDR düşük büzülmeye sahip olan akıcı kompozittir. Üretici firma tarafından direk restorasyonların altında kaide maddesi ve pit ve fissür örtücü olarak tasarlanan SDR kavite içerisine 4 mm kalınlığında yerleştirilebilmektedir (Dentsply 2014). SDR'de polimerizasyon büzülmesinden kaynaklanan stres minimumdur ve iyi internal kavite adaptasyonu sayesinde post operatif hassasiyeti azalttığı üretici firma tarafından bildirilmiştir (Dentsply 2014). Bu avantajları gözönünde bulundurulduğunda, iyi bir nem izolasyonu sağlanması şartıyla SDR'nin yaklaşık 3 mm derinliğinde hazırlanan kök ucu kavitelerinde kullanılabilen alternatif bir retrograd dolgu materyali olabileceğini düşündük. Nitekim literatürde SDR'yi retrograd dolgu materyali olarak değerlendiren bir çalışma bulunmamaktadır. Literatürde yapılan çalışmalar SDR'nin çoğunlukla fiziksel ve mekanik özelliklerini ele almışlardır (Juloski ve ark 2013, Bukovinszky ve ark 2014, Garcia ve ark 2014, Leprince ve ark 2014). Akıcı kompozitlerin pulpa ve gingival dokulara yakınlığı sebebiyle bu dokular üzerindeki sitotoksik etkisini inceleyen bir çalışmada SDR, başka bir ticari akıcı kompozit ile karşılaştırılmış ve SDR'nin rezin içerikli dental restoratif materyal olarak seçilebileceği önerilmiştir (Rodriguez-Lozano ve ark 2013). Daha önce de belirttiğimiz gibi SDR grubu PMTA, MM-MTA ve PMMA kemik simanı grupları ile benzer sitotoksisite sergilemiştir. Kompozit rezinlerdeki rezin monomerler yüksek konsantrasyonda sitotoksik etki göstermektedirler (Geurtsen ve ark 1998a, Al-Hiyasat ve ark 2005). SDR'nin rezin monomer içeriği PDL hücrelerinin canlılığının azalmasına sebep olmuş olabilir.

Doksanlı yılların başında üretilen kompomerler, kompozitlerin iyi mekanik özellikleri ve cam iyonomer simanların düşük teknik hassasiyet ve flor iyonu salma özelliklerini kombine eden ve dental kompozitlere daha yakın olan materyallerdir. Kompomerler poliasit modifiye monomer ve flor salan silikat camlar içermektedirler. Çalışmamızın XTT bulguları, Biodentine ve kompomeri en iyi biyouyumluluğa sahip retrograd dolgu materyalleri olarak sunmaktadır. Hücre canlılığı yönünden değerlendirildiğinde Biodentine ve kompomer arasındaki fark istatistiksel olarak önemli olmasa da kompomer eluatına maruz bırakılan PDL hücrelerinin Biodentine

grubuna göre daha azının canlı kalabildiği gösterilmiştir. Nitekim literatürde Biodentine ve kompomerin biyouyumluluğunu karşılaştıran bir çalışma bulunmamaktadır.

Kompomer eluatları pulpa hücreleri üzerinde sitotoksik etki gösterseler de daha önce yapılan bir çalışmada kompozit eluatları ile karşılaştırıldığında kompomerin hücreler ile daha olumlu reaksiyon gösterdiği bildirilmiştir (Huang ve Chang 2002). Çalışmamızın bulgularından farklı olarak Huang ve ark (2002) kompomerin insan gingival fibroblastlarına karşı sitotoksik olduğunu göstermiştir. Başka bir çalışmada kompomer eluatının 3T3 fibroblast hücrelerinin yaralanmasını indüklediği gösterilmiştir (Geurtsen ve ark 1998a). Yine benzer şekilde kompomerlerin aköz eluatlarının kültürü yapılan hücrelerde yaralanmayı indüklediği bildirilmiştir (Schedle ve ark 1998). Tunç ve ark (2009) kompomerlerin insan pulpa fibroblastlarına karşı toksisite potansiyeli taşıdığını göstermişlerdir. Kompomer materyalinden Bis-GMA, TEGDMA ve UDMA'nın sızabileceği ve olumsuz etkilere yol açabileceği rapor edilmiştir (Geurtsen ve ark 1998a). Kompomerlerin sitotoksik etkisinin ortadan şiddetliye doğru değişebileceği bildirilmiştir (Sletten ve Dahl 1999). Bu farkın olası açıklaması hücre hatlarının farklılığı olabilir. Literatürde farklı dokulardan izole edilen hücrelerin farklı davrandığı bildirilmiştir (Koka ve ark 1996). Yine farklı ticari materyallerin kullanılması ve farklı metodların uygulanması literatür ile bazı noktalarda çelişen sonuçlarımızı kısmi olarak açıklayabilir. Kompomerlerin retrograd dolgusu olarak kullanıldığı biyouyumluluğunu değerlendiren klinik çalışmalara ihtiyaç vardır.

Polimetil metakrilat esaslı simanlar diş hekimliğinin protetik diş tedavisi dalında sıklıkla kullanılmaktadır. Bu materyaller ağız dokuları ile uzun süre temas halinde kalmaktadır. Termal değişiklikler, pH, nem, mikroorganizmalar-enzimler gibi oral çevrenin biyolojik faktörleri bu materyallerin fiziksel ve kimyasal özelliklerini değiştirebilmektedir (Sehajpal ve Sood 1989). PMMA esaslı simanlardan sızan komponentlerin ağız dokusunda irritasyon, enflamasyona ve hastalarda alerjik reaksiyona yol açtığı gösterilmiştir (Aalto-Korte ve ark 2008).

Literatürde PMMA kemik simanını retrograd dolgu maddesi olarak değerlendiren çalışmalar bu malzemeyi daha çok sızıntı yönünden incelemişlerdir

(Holt ve Dumsha 2000). PMMA kemik simanının retrograd dolgu maddesi olarak biyouyumluluğunu araştıran çalışma sayısı oldukça azdır (High ve Russell 1989, Badr 2010). Çalışmamızın bulguları diğer materyaller ile karşılaştırıldığında PMMA kemik simanının ne Biodentine kadar biyouyumlu ne de Vitrebond kadar toksik olmadığını göstermektedir. Bizim çalışmamızın bulgularıyla uyumlu olarak Badr (2010) MTA ve PMMA kemik simanının fibroblast hücreleri üzerinde benzer derecede toksisite sergilediğini bulmuştur. PMMA esaslı materyallerin siktotoksisitesinin asıl nedeninin materyalden salınan rezidüel metil metakrilat monomeri olduğu bildirilmiştir (Stafford ve Brooks 1985).

Çalışmamızda Vitrebond, SDR, Kompomer gruplarında farklı sertleşme sürelerinin hücre canlılığı üzerinde önemli bir etkiye sahip olmadığı bulunmuştur. Biodentine, IRM, PMTA, MM-MTA ve PMMA kemik simanı gruplarında ise 1 günlük sertleşen örneklerin 3 günlük sertleşenlere nazaran daha biyouyumlu olduğu bulunmuştur.

IRM grubunda konsantrasyonlar dikkate alındığında 1:1, 1:2 ve 1:4'lük konsantrasyonların benzer derecede ve oldukça sitotoksik olduğu görülmektedir. 1:8'lik konsantrasyonda ise hücre canlılığının arttığı göze çarpmaktadır. Sertleşme süresinin hücre canlılığına olan etkisi değerlendirildiğinde 1:8'lik konsantrasyonun istatistik sonucunu etkilediğini söyleyebiliriz. Nitekim sertleşme süreleri 1:1, 1:2 ve 1:4'lük konsantrasyonlarda, hücre canlılığını pek etkilememiştir. IRM'de öjenol salınımı uzun dönem devam ettiğinden (Markowitz ve ark 1992) daha yaşlı örnekler daha yüksek toksisite sergilemiş olabilir.

Camilleri ve ark (2004) yaptığı bir biyouyumluluk çalışmasında bizim çalışmamızın bulgularıyla uyumlu olarak 1 gün sertleşen MTA örneklerinin 28 gün sertleşenlere nazaran daha biyouyumlu olduğunu göstermişlerdir. 28 gün sertleşen simanların daha zayıf hücre gelişimi gösterdiği bildirilmiştir. Camilleri ve ark (2008a)'nın diğer bir çalışmasında cam iyonomer siman ve trikalsiyum silikat esaslı prototip materyallerin biyouyumluluğu araştırılmış ve yine bizim çalışmamızın bulgularıyla uyumlu olarak 1 günlük sertleşen örneklerin yaşlandırılmış örneklere nazaran daha iyi hücre gelişimi sergilediği tespit edilmiştir. Trikalsiyum silikatın sertleşme reaksiyonu sonucunda kalsiyum hidroksit üretilmektedir (Lea 1970).

Kalsiyum hidroksitin materyalin erken dönemdeki biyouyumluluğunun sorumlusu olabileceği rapor edilmiştir (Camilleri ve ark 2004, Camilleri ve ark 2008a). Materyal yaşlandıkça kalsiyum hidroksit seviyesinde azalma gerçekleşmektedir ve bunun sertleşme süresince havaya maruz kalan materyalin yüzey karbonizasyonundan kaynaklanabileceği bildirilmiştir (Camilleri ve ark 2004). Daha uzun sertleşme sürelerinde materyalde daha az miktarda kalsiyum hidroksit mevcut olacağından 3 günlük sertleşen Biodentine, PMTA ve MM-MTA örnekleri daha yüksek sitotoksisite sergilemiş olabilir.

PMMA esaslı bir simanın protetik malzeme olarak sitotoksisitesini değerlendiren bir çalışmada uzun dönem yaşlandırmanın materyalin sitotoksisitesini arttırdığı bulunmuştur (Uzun ve ark 2013). Bizim çalışmamızda da 1 günlük sertleşen PMMA kemik simanının 3 günlük sertleşene nazaran daha az sitotoksik olduğu gösterilmiştir. Bunun sebebi PMMA'dan rezidüel monomer salınımının 3 gün sertleşme süresi sonunda dahi devam ediyor olması olabilir (Uzun ve ark 2013).

Apoptoz deneyleri ile hücresel hasar tarafından indüklenen plazma membran değişiklikleri incelenmektedir. Apoptozun başlangıç aşamalarında, membran içerisindeki fosfatidilserin plazma membranının dış kısmına doğru yer değiştirir. Fosfolipit bağlı bir protein olan An-V'nin fosfatidilserine karşı yüksek afinitesi vardır. Dolayısıyla An-V boyası ile hücre yüzeyindeki fosfatidilserinin tespiti yapılabilir (Verhoven ve ark 1995). An-V normal canlı hücrelere bağlanamazken apoptotik hücrelerin yüzeyinde ortaya çıkan fosfatidilserine bağlanabilmektedir. Aynı zamanda plazma membranı bozulmuş olan nekrotik hücreler de An-V tarafından etiketlenebilmektedir. Dolayısıyla flow sitometri değerlendirmesi yapılırken, fosfatidilserin pozitif olan hücrelerin membran geçirgenliğini kontrol edebilmek için 7-aminoactinomycin-d (7AAD) gibi membrandan geçemeyen DNA boyaları ile çift boyama yapılması gerekli olmaktadır (Wei ve ark 2012).

Çalışmamızda flow sitometri deneyine geçmeden önce XTT testinin sonuçları değerlendirilmiştir. XTT deneyinin sonuçlarına göre tüm gruplar için aynı sertleşme süresi ve tek bir konsantrasyon seçilerek flow sitometri deneyine devam edilmiştir. Bu seçimi yaparken hücre canlılığı yüzdesinin %50-60 civarında olmasına dikkat edilmiştir. Bu yüzde değerlerinde canlılık gösteren hücrelerin kullanılmasıyla hem

canlı kalan hücreler hem de eğer apoptoz varsa hücre ölümünün ilk safhasının tespiti amaçlanmıştır. Daha düşük hücre canlılığının tespit edildiği materyal sertleşme süresi ve eluat konsantrasyonu seçilseydi Vitrebond gibi oldukça toksik olan materyalin hücre ölümü flow sitometri ile gösterilememiş olacaktı. Aynı zamanda bu canlılık yüzdesine karşılık gelen parametrelerin seçilmesiyle erken apoptoz ve geç apoptozu ayırt edebilmek, ölüm basamaklarını yakalayabilmek amaçlanmıştır. Nitekim 3 günlük sertleşme süresi ve eluatların 1:8'lik konsantrasyonunda test gruplarının çoğunda hücre canlılığının %50-60 civarlarında olduğu görülmektedir. Dolayısıyla flow sitometri deneyi için 3 günlük sertleşen materyal eluatlarının 1:8'lik konsantrasyonu seçilmiştir.

Çalışmamızın flow sitometri sonuçlarına göre Vitrebond'un PDL hücrelerinde nekroza yol açtığı görülmektedir. Vitrebond haricindeki diğer bütün gruplarda ise PDL hücrelerinin benzer derecede ve yüksek oranda vital kaldığı görülmektedir. Vitrebond grubu için XTT ile gösterdiğimiz hücre canlılık değerlerinin flow sitometri ile gösterdiğimiz vitalite değerinden yüksek olduğu görülmektedir. Bu bağlamda XTT ile apoptoz sonuçlarının paralellik göstermediğini söyleyebiliriz. XTT ve flow sitometri hücre fonksiyonunu farklı açılardan ölçmektedir. Önce yapılan XTT analizi hücre canlılığı ile ilgili bilgi sağlamaktayken flow sitometri ile hücre ölüm şekli değerlendirilmiştir. XTT mitokondriyal metabolik aktiviteyi ölçmekte flow sitometri ise membran geçirgenliğini belirlemektedir. Flow sitometri ile nekroza yol açtığı gösterilen Vitrebond eluatının 1:8'lik konsantrasyonunun XTT testinde %10 civarında hücre canlılığı sergilemesi stres altında kalan hücrenin normal hücreden çok daha fazla metabolik aktivite göstermesinden kaynaklanabilir (Lancel ve ark 2009). Yani az sayıda hücre yüksek mitokondriyal aktivite sergilediğinden sayıca çokmuş gibi bir yanılgıya düşmemize sebep olabilir.

Biodentine, IRM, Dyract Kompomer, PMTA, MM-MTA, SDR, PMMA kemik simanı gruplarında flow sitometri ile elde edilen hücre canlılık değerlerinin XTT ile elde edilen değerlere göre daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Bunun olası bir açıklaması, sitotoksik ajanların plazma membranından önce hücre içine zarar vermesi olabilir. Yani plazma membranı bozulmadan kalmış ama hücre geri dönüşümsüz olarak hasara uğramış olabilir (Wei ve ark 2012). Flow sitometri

yöntemi membran geçirgenliğini değerlendirdiğinden hücresel hasarı tam olarak göstermekte yetersiz kalabilir. Bu farkın diğer bir açıklaması da XTT deneyleri 96 kuyucuklu hücre kültür kabında gerçekleştirilirken flow sitometri için PDL hücrelerinin 6 kuyucuklu hücre kültür kaplarına ekilmesi olabilir. Nitekim bulunduğu yüzeye yapışıp uzayarak büyümeyi tercih eden PDL hücreleri için 6 kuyucuklu hücre kültür kabı daha uygun bir ortam teşkil etmektedir.

Sitotoksik ilaçlar ya da kanser gibi patolojiler sonucunda apoptoz düzenlemesi bozulabilmektedir (Cha ve Kim 2012, Engeler ve ark 2012, Kobayashi ve ark 2013). Dental kompozitlerin içerisinde bulunan kamferokinon gibi sitotoksik ajanlar oksidatif strese sebep olabilmekte ve apoptozu indükleyebilmektedir (Masuki ve ark 2007, Christensen ve ark 2010). Yakın zamanda yapılan bir çalışmada PMTA'nın başlangıç sitotoksisitesinin apoptoza atfedilebileceği bildirilmiştir (Eid ve ark 2014). Lin ve ark (2004)'nın yaptığı bir çalışmada IRM ve cam iyonomer simanın hücresel apoptotik değişiklikleri indüklediği gösterilmiştir. Kompomer eluatlarının makrofajlarda hücre ölümünü indükleme kapasitesine sahip olduğu gösterilmiştir (Becher ve ark 2006). Retrograd dolgu materyalleri tarafından indüklenen hücre membran hasarının ve apoptozisin açıklığa kavuşturulması için daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Fibrobastların da dahil olduğu hücre grupları ekstraselüler pH değişikliklerine hassas olup hücre kültürlerinin ideal pH'ının 7,2-7,4 olduğu bildirilmiştir (Harrison ve Rae 1997). Trikalsiyum silikat esaslı simanlardan kalsiyum salınımı meydana geldiği ve sonuç solüsyonun alkali pH'da olduğu gösterilmiştir (Grech ve ark 2013). Biodentine ve PMTA gibi materyallerin solüsyon içerisine kalsiyum hidroksit salınımı gerçekleştirdiği bilinmektedir (Camilleri 2011a). MM-MTA grubunun seyreltilmemiş eluatlarının pH değeri diğer bütün gruplar arasında en yüksek çıkmıştır. Bu pH artışının sebebi fazla miktarda kalsiyum hidroksitin materyalden çözünmesi olabilir (Gandolfi ve ark 2010b). Materyalin yüksek pH'sı komşu hücrelerin parçalanmasına ve materyal ile temas halinde olan fibroblastların kültür medyası proteinlerinin denatürasyonuna neden olmaktadır (Haglund ve ark 2003). Çalışmamızda Vitrebond'un pH'ının ise en düşük olduğu gösterilmiştir. Daha önce de belirttiğimiz gibi Vitrebond eluatının asiditesi yüksek toksisitesinin sebeplerinden biri olabilir. Yapılan pH ölçümlerinin flow sitometri için hazırlanan örneklerde yani

3 günlük sertleşen materyallerin 24 saatlik eluatları üzerinde yapıldığına dikkat edilmelidir. Nitekim çalışmamızda zamana bağlı pH değişikliği değerlendirilmemiştir.

Fibroblast migrasyonu, ataçmanı, oryentasyonu hücre adezyon rejenerasyonunun önemli basamaklarıdır ki bu rejenerasyon süreci endodontik cerrahiyi takiben iyileşme gerçekleşmesinin ön koşuludur (Weston ve ark 1999). Hücreler fonksiyonel olarak ihtiyaç duyuldukları noktaya göç etmeli ve tutunmalıdırlar, aksi taktirde fonksiyonal doku ve organların gelişimi ve rejenerasyonu imkansız olacaktır (Singer ve Clark 1999). Aynı zamanda hücre adezyonu ve yayılması retrograd dolgu materyallerinin biyouyumluluğunun değerlendirilmesindeki önemli kriterlerden bir tanesidir (Zhu ve ark 2000). Hücre adezyonu sürecinde, hücre önce yüzeye tutunur sonrasında filopodyal uzantılar geliştirir, sitoplazmik ağ ile çevrilir ve son olarak da hücre yassılaşmaya başlar (Rajaraman ve ark 1974).

Çalışmamızda, retrograd dolgu maddelerinin biyouyumluluğunu değerlendirmek üzere hücre canlılık testine ve flow sitometriye ilave olarak bu materyaller ile temas halindeyken gelişen PDL hücrelerinin adezyonunu ve morfolojisini değerlendirmek için SEM analizi yapılmıştır. Seçilen hücre hattının dental materyal ile temas halinde bulunduğunda morfolojisini incelemek amacıyla SEM'in kullanımı, sitotoksisiteyi belirlemek amacıyla daha önce de önerilmiştir (Koh ve ark 1998, Zhu ve ark 2000, Al-Sabek ve ark 2005, Yoshimine ve ark 2007).

Taramalı elektron mikroskobu altında materyal üzerindeki hücre gelişiminin ve proliferasyonunun incelenmesi için hücreleri fikse etmek amacıyla gluteraldehit kullanılmaktadır ve fiksasyondan sonra hücre yapısını korumak amacıyla kritik nokta kurulaması yapılmaktadır. MTA tipi materyaller üzerinde SEM kullanılması artefaktların oluşumuna yol açabilmektedir (Camilleri 2008b). Fosfat tamponlu gluteraldehit materyal üzerinde fosfat kristalerinin çökelmesine sebebiyet vermektedir (Camilleri 2005a). Kritik nokta kurulaması ise materyal yüzeyi üzerinde kalsiyum karbonat polimorflarının oluşumuna sebep olmaktadır (Camilleri ve ark 2004). SEM her ne kadar kalsiyum silikat esaslı simanların sitotoksisitesini değerlendirmek için tercih edilen yöntemlerden biri olsa da SEM'deki işlem süreci

hücrelerin görünümlerini etkileyebilmektedir (Camilleri ve ark 2004). Materyal yüzeyindeki değişiklikler materyalin biyouyumluluğunu etkileyen doğru olmayan çıkarımlara yol açabilmektedir (Camilleri 2008b).

Çalışmamızın SEM bulguları en iyi hücresel ataçmanın PMTA ve Biodentine yüzeylerinde gerçekleştiğini göstermektedir. Biodentine yüzeyinde PMTA'ya göre sayıca daha fazla PDL hücresine rastlanırken PMTA yüzeyindeki PDL hücrelerinin daha fazla uzama sergiledikleri görülmüştür. Yani Biodentine yüzeyinde PDL hücrelerinin daha fazla bölünerek çoğaldıklarını söyleyebiliriz. Bu iki materyalden sonra en iyi hücre morfolojisinin kompomer yüzeyinde olduğu gözlemlenmiştir. Kompomer grubundaki yüzeye tutunan PDL hücrelerinin sayısı Biodentine ve PMTA'ya göre nispeten daha azdır. PMTA, Biodentine ve kompomer yüzeyinde görülen mekik şeklinde ve kümeleşmiş PDL hücreleri, hücre gelişiminin bu simanlardan diğer simanlara göre daha az etkilendiğine işaret edebilir. PDL hücrelerinin iyi yayılması ve lamelipodyal-filopodyal oluşumlar göstermesi bu hücrelerin materyallere iyi ataçman gerçekleştirdiğini göstermektedir. Aksine izole ve yuvarlaklaşmış hücreler Vitrebond ve IRM yüzeylerinde gözlemlenmiştir. Hiç yayılamayan ya da çok az yayılan yuvarlaklaşmış hücrelerin varlığı materyal yüzeyinin toksik olabileceğine işaret etmektedir (Zmener ve Cabrini 1986, Zhu ve ark 2010).

Çalışmamızda gösterdiğimiz PDL hücrelerinin IRM yüzeyine zayıf ataçmanı daha önce yapılan çalışmalar ile uyumlu bulunmuştur (Zhu ve ark 2000, Al-Hiyasat ve ark 2012). Al-Sabek ve ark (2005) gingival fibroblastların IRM'ye zayıf bir şekilde tutunduğunu, Zhu ve ark (2000) da osteoblastlar ile benzer sonuçlar elde ettiğini, hücrelerin yuvarlak bir yapıya sahip olduğunu bildirmiştir. Yakın zamanda yapılan bir çalışmada bizim çalışmamızın bulgularıyla paralel olarak Biodentine'in dental pulpal kök hücrelerinin migrasyon ve adezyon yeteneğini arttırdığı gösterilmiştir (Luo ve ark 2014).

PMTA'nın osteoblast hücrelerinde biyolojik cevabı stimüle ettiği ve aynı zamanda hücre adezyonu için biyouyumlu bir yüzey sağladığı daha önce yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Koh ve ark 1997, Koh ve ark 1998, Zhu ve ark 2000, Bonson ve ark 2004). PMTA ile ilgili SEM bulgularımız Balto (2004) ve Al-Hiyasat

ve ark (2012) ile uyum içerisindedir. Abdullah ve ark (2002), osteosarkom hücrelerinin MTA yüzeyine 12 saatte ataçman gösterdiğini ve bu yüzeyde 3 günde prolifere olduğunu bulmuştur. Yine Al-Rabeah ve ark (2006)'nın çalışmasında MTA'nın hem gri hem de beyaz formülasyonlarının hücre ataçmanını desteklediği bildirilmiştir. MTA'dan salınan komponentlerden biri olan kalsiyum, fibroblast adezyonunda önemli rol oynamaktadır (Baxter ve ark 2002, Al-Sa'eed ve ark 2008). PMTA'nın en iyi hücresel ataçman sergileyen materyal olması çalışmamızın EDX bulgularında gösterdiğimiz PMTA'nın yüksek orandaki kalsiyum içeriğinden kaynaklanabilir. Nitekim bütün gruplar içerisinde en fazla kalsiyum yüzdesi PMTA grubunda bulunmuştur. MTA yüzeyinin granüler bir görünümde olduğu SEM analizi bulgularımızda görülmektedir. Hücrelerin PMTA'nın pürüzlü yüzey yapılarına girmesi MTA yüzeyi ve PDL hücreleri arasında sıkı bir integrasyon oluşmasına yardımcı olmuş olabilir (Yoshimine ve ark 2007).

Çalışmamızın SEM analizi bulguları PDL hücrelerinin MM-MTA, SDR ve PMMA kemik simanı yüzeyinde zayıf hücresel ataçman gerçekleştirdiğini göstermektedir. Bu materyaller üzerinde sadece hücre yoğunluğunun azalması değil aynı zamanda morfolojilerinin de farklılaşmaya başladığı gözlemlenmiştir. MM-MTA örneklerinin pH'ı diğer bütün örneklerden daha yüksektir. Bu materyale olan zayıf hücresel ataçman MM-MTA'nın yüksek yüzey pH'sına bağlı olarak, materyal ile temas halindeki hücrelerin ölmesine ve medya proteinlerinin denatürasyona uğramasına atfedilebilir (Saidon ve ark 2003). Chang ve ark (2014a) dental pulpa hücrelerinin PMTA, MM-MTA ve IRM materyalleri üzerindeki ataçmanını değerlendirmişler ve hücrelerin PMTA ve MM-MTA üzerinde yayıldığını gözlemlerken, IRM yüzeyindeki pulpa hücrelerinin tamamen yuvarlak halde kaldığını ve zayıf hücresel ataçman sergilediğini göstermişlerdir. Başka bir hücre adezyon çalışmasında osteoblastların polisajlanmış kompozit rezin yüzeylerde normal gelişim gösterdiği bulunmuştur (Zhu ve ark 2000). MTA ve PMMA esaslı bir materyalin osteoblastlardaki biyolojik cevabının karşılaştırıldığı bir çalışmada PMMA'nın hücre adezyonunu desteklemediği gösterilmiştir (Koh ve ark 1997).

Çalışmamızın SEM analizi bulguları en iyi hücre adezyonunun ve hücre yayılımının Biodentine, PMTA ve kompomer gruplarında olduğunu açıkça göstermektedir. Oldukça sitotoksik olan ve hücre nekrozuna yol açan Vitrebond

örneklerinde zaten iyi bir hücresel adezyon beklenmemektedir. Vitrebond'un düşük pH'sı hücresel ataçmanı olumsuz etkileyen etmenlerden biri olabilir.

Bu çalışmada olduğu gibi hücrelerin direk materyaller üzerine uygulanması klinik uygulama ile tam olarak örtüşmemektedir. Çünkü vücut savunma mekanizması ve doku sıvıları hücrelerin maruz kaldığı yaralanmayı hafifletmektedir. Bu sebeple klinik uygulamalarda hücrelerin cevabının böyle bir deneydeki hücre cevabından daha iyi olacağı düşünülebilir (Gandolfi ve ark 2011).

Çalışmamızda materyallerin PDL hücreleriyle inkübasyon süresi 3 gün olarak seçilmiştir. Hücre inkübasyon periyodunun arttırılmasının daha iyi hücre adezyonu sağlayabileceği bildirilmiştir (Camilleri ve ark 2004). Ancak daha önce yaptığımız pilot çalışmalarda materyaller 3 günden fazla PDL hücreleri ile inkübe edildiğinde alınan SEM görüntülerinde hücreye rastlanmamıştır. Bunun sebebi yüksek ihtimalle 96 kuyucuklu hücre kültür kabında bulunan hücre kültür medyasının besin değerlerini kaybetmesi ve aynı ortamı paylaşan PDL hücrelerinin çoğaldıkça ortamdaki besini tüketmesi ve beslenemeyen hücrelerin ölmesi olabilir (Mitchell ve ark 1999). Daha önce yapılan çalışmalarda hücrelerle inkübasyon süresi olarak 3 gün seçildiği görülmektedir (Mitchell ve ark 1999, Yuan ve ark 2010, Ma ve ark 2011, Maeda ve ark 2011, Shon ve ark 2012). Çalışmamızda farklı inkübasyon süreleri karşılaştırılmamış olup materyal örnekleri 3 gün PDL hücreleri ile inkübe edilerek değerlendirilmiştir.

Materyalin yüzey kimyası ve yüzey topografisinin; hücre adezyonu, hücre yayılımı, proliferasyon ve farklılaşma gibi çeşitli hücre davranışlarını etkileyebileceği bildirilmiştir (Hamilton ve Brunette 2007). Kök ucu dolgu ve perforasyon tamir materyalleri doku sıvılarıyla temas halinde yerleştirildiğinde çevre dokuları etkileyebilecek elementler yapılarından ortama salınabilmektedir (Grech ve ark 2013). Dolayısıyla materyalin kompozisyonu klinik olarak önem taşımaktadır. Çalışmamızda materyallerin içeriğindeki elemental kompozisyonu belirlemek amacıyla SEM-EDX analizi kullanılmıştır. SEM-EDX analizi daha önce Portland simanının ve MTA'nın hidratasyon karakteristiğini değerlendirmek üzere kullanılmıştır (Camilleri 2007). SEM-EDX metodu duyarlı ve güvenilir bir metod olmakla birlikte temel dezavantajı homojen örnekler üzerinde ideal sonuçlar

verebilmesidir. Heterojen örnekler değerlendirmede hatalara yol açabilir (Camilleri 2011b). Çalışmamızda elde karıştırılarak hazırlanan Vitrebond, IRM, PMTA ve PMMA kemik simanı gibi gruplarda manipülasyona bağlı olarak bir takım heterojenlikler söz konusu olabilir.

Avulsiyon, daimi dentisyonda görülen, dişin alveolar soketinden tamamen ayrıldığı en ciddi travmatik yaralanma türüdür. Avulse dişin prognozunu geliştirmek ve ağızda uzun dönem idamesini sağlamak için avulsiyon yaralanmalarında tedavi yaklaşımı pulpa ve periodontal ligament hücrelerinin canlılığını korumaya yöneliktir (Ingle ve ark 2008). PDL hücrelerinin sağlıklı olması replante edilen avulse dişlerin iyileşmesi için zorunludur (Blomlöf 1981). Avulse olan dişin ekstra-alveolar saklama koşulları PDL hücrelerinin canlılığını etkilemektedir (Patel ve ark 1994). Avulsiyon yaralanmasında kullanılan saklama solüsyonunun PDL hücrelerinin canlılığını korumaya yardımcı olacak oral çevre koşullarını sağlayan fizyolojik bir solüsyon olması gerektiği bildirilmiştir (Ingle ve ark 2008). Avulse olan dişleri saklamak üzere pek çok solüsyon önerilmiştir. Hanks tuz çözeltisi, Eagle Medyumu, süt, Viaspan, Custodiol, DMEM, propolis, Dentosafe, kontakt lens solüsyonu, yumurta akı, normal salin solüsyonu, tükrük ekstraktı, hindistan cevizi suyu önerilen saklama solüsyonları arasında yer almaktadır (Udoye ve ark 2012). PDL hücrelerinin canlılığını korumak için pH ve osmolalite değerleri primer olarak önem taşısa da bu solüsyonların kimyasal kompoziyonu da PDL hücrelerinin canlılığı için önem teşkil etmektedir (Udoye ve ark 2012). Nitekim yukarıda bahsedilen solüsyonlar genel olarak değerlendirildiğinde bunların aminoasit, vitamin ve esansiyel metabolitler açısından zengin olduğunu görmekteyiz. Dolayısıyla bu tez çalışmasında materyallerin bünyesinde bulunan esansiyel metabolit olan sodyum, potasyum ve magnezyumun PDL hücrelerinin canlılığını etkileyebileceğini düşündük. SEM-EDX analizi bulgularımız Vitrebond, IRM ve PMMA kemik simanı örneklerinde eser miktarda magnezyum; Biodentine, PMTA ve SDR örneklerinde eser miktarda sodyum; kompomerde de minimal oranda sodyum ve magnezyum bulunduğunu göstermektedir. MM-MTA'da bu üç elementten hiçbirine rastlanmamıştır. Hücre canlılığını olumlu yönde etkileyebileceğini düşündüğümüz sodyum, magnezyum ve potasyum elementleri hiçbir materyalin bünyesinde yüksek oranlarda yer almamaktadır. Dolayısıyla bu elementlerin materyallerin biyouyumluluğunu etkilediği yönünde bir çıkarım yapamamaktayız.

Kalsiyum iyonu canlı hücrelerin gelişimini ve fonksiyonunu devam ettirmesinde önemli rol oynamaktadır ve ekstraselüler kalsiyumun osteoblastların proliferasyonu/diferansiyasyonunda önemli etkisi olduğu gösterilmiştir (Nemeth ve Carafoli 1990, Nakade ve ark 2001, Maeno ve ark 2005). Kontonasaki ve ark (2007)'nın biyoaktif seramiklerin biyouyumluluklarını değerlendirdikleri bir çalışmada PDL hücrelerinin kalsiyum ve fosfor kaplı yüzeylerde kalsiyum ve fosfor partiküllerine yönelmiş bir şekilde filopodyal ve lamellipodyal gelişim sergilediği gösterilmiştir. Yine başka bir çalışmada materyal yüzeyinde kalsiyum karbonat oluşumunun biyouyumluluğu olumlu şekilde etkilediği gösterilmiştir (Gallego ve ark 2008). Materyal yüzeyinde bulunan kalsiyum ve fosfordan zengin biyoaktif tabakanın osteoblastların adezyonunu ve proliferasyonunu indüklediği gösterilmiştir (Camilleri ve ark 2005b. Gandolfi ve ark 2008a, Gandolfi ve ark 2008 b, Gandolfi ve ark 2009). Pulpa kuafajı apeksogenezis gibi prosedürlerde de kalsiyum salınımı biyolojik olarak önemli rol oynamaktadır (Takita ve ark 2006, Tuna ve Ölmez 2008, Nair ve ark 2008). Kalsiyum iyonları pulpa hücrelerinin farklılaşması ve mineralizasyonu için gerekli olmaktadır (Schröder 1985).

Silikon iyonunun da hücre davranışında anahtar faktör olabileceği bildirilmiştir (Gough ve ark 2004, Shie ve ark 2012). Silikon iyonları kemik remodelasyon sürecini teşvik etmektedir (Porter ve ark 2004). Retrograd dolgu materyallerinden salınan kalsiyum ve silikon iyonlarının hücre gelişimini ve osteoblasts maturasyonunu uyarabileceği rapor edilmiştir (Gandolfi ve ark 2010a). Silikon iyon konsantrasyonunun apoptoz, hücre ataçmanı, proliferasyon ve diferansiyasyon gibi hücre davranışlarını düzenleyebildiği bildirilmiştir (Shie ve ark 2011). Lai ve ark (2014)'nın yaptığı bir çalışmada simanlardan salınan uygun silikon konsantrasyonunun dental pulpa hücrelerinin proliferasyonunu desteklediği ve hücrelerin enflamatuar cevabını azalttığı gösterilmiştir. Yine başka çalışmalarda silikonun hücre canlılığını ve adezyonunu geliştirebileceği gösterilmiştir (Gandolfi ve ark 2009, Gandolfi ve ark 2010a).

Yapılan çalışmalar dikkate alındığında retrograd dolgu maddelerinin kimyasal kompozisyonundaki kalsiyum, silikon ve fosfor elementlerinin PDL hücrelerinin proliferasyonunu indükleyebileceği görülmektedir. Çalışmamızın SEM-EDX analizi bulguları %39 ile en yüksek kalsiyum oranının PMTA grubunda olduğunu göstermektedir. Kalsiyumun hücreler üzerindeki bu olumlu etkisi PMTA

grubunda PDL hücrelerinin iyi ataçman sergilemesinin sebebi olabilir. Çalışmamızın SEM-EDX bulguları en yüksek silikon yüzdesinin (%20,51) kompomer örneklerinde olduğunu göstermektedir. PDL hücrelerinin kompomere iyi adezyon göstermesinin sebebi yüksek silikon oranından kaynaklanabilir. Fosfor elementine sadece Vitrebond örneklerinde rastlanmıştır. Çalışmamızın SEM-EDX analizi fosfor bulguları ile materyal biyouyumluluğu arasında bağlantı kurmak doğru çıkarımlara yol açmayabilir. SEM-EDX analizi bulgularımız Vitrebond'un kimyasal kompozisyonunda % 24,07 oranında flor, %7,30 oranında çinko bulunduğunu; IRM'nin elemental kompozisyonunda ise %65,40 oranında çinko bulunduğunu göstermektedir. Flor ve çinkonun toksik ajanlar olabileceği daha önce bildirilmiştir (Leirskar ve Helgeland 1977, Doherty 1991). Materyallerin bünyesinde bulunan bu elementler bu retrograd dolgu maddelerinin yüksek sitotoksisitesinin olası sebeplerinden birini açıklayabilir. SEM-EDX analizi sonuçları materyallerin kimyasal kompozisyonu ile ilgili genel bilgiler sunmaktadır. Bu sonuçlar değerlendirilirken SEM-EDX analizinin yarı-kantitatif bir değerlendirme olduğu göz önünde bulundurulmalıdır.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Sekiz farklı kök ucu dolgu ve perforasyon tamir materyalinin biyouyumluluğunun değerlendirildiği bu *in vitro* çalışmanın sınırları dahilinde şu sonuçlara ulaşılmıştır:

● Yapılan mikroskobik incelemede IRM ve Vitrebond eluatlarına maruz bırakılan PDL hücrelerinin yuvarlaklaşarak morfolojik yapılarının bozulduğu, SDR grubunda daha belirgin olmak üzere MM-MTA ve PMMA kemik simanı gruplarının PDL hücrelerinde gövdelerinde kısalma ve retrakte olma şeklinde morfolojik değişikliklere sebep olduğu bulunmuştur. PMTA eluatına maruz bırakılan PDL hücreleri minimal morfolojik değişiklik sergilerken Biodentine ve Kompomer eluatlarının özellikle 1:8'lik konsantrasyonlarına maruz bırakılan PDL hücrelerinin oldukça sağlıklı olduğu görülmektedir.

● Bu çalışmada test edilen farklı materyallerin, materyal eluatlarının farklı konsantrasyonlarının ve materyallerin farklı sertleşme sürelerinin PDL hücrelerinin canlılığı üzerinde önemli ölçüde etkisinin olduğu gözlenmiştir. Eluatların 1:8'lik konsantrasyonlarının en az sitotoksik, seyreltilmemiş konsantrasyonlarının (1:1) en sitotoksik olduğu bulunmuştur. Üç günlük sertleşen örneklerin 1 günlük sertleşen örneklere nazaran daha az hücre canlılığına sebep olduğu görülmektedir.

● Bu çalışmanın XTT bulgularına göre Vitrebond ve IRM'nin en sitotoksik, Biodentine ve kompomerin en az sitotoksik olduğu bulunmuştur. PMTA, MM-MTA, SDR ve PMMA kemik simanı gruplarında PDL hücrelerinin benzer derecede canlılık sergilediği gösterilmiştir.

● Vitrebond, SDR, kompomer gruplarında farklı sertleşme sürelerinin hücre canlılığı üzerinde önemli bir etkiye sebep olmadığı gözlenirken Biodentine, IRM, PMTA, MM-MTA ve PMMA kemik simanı gruplarında 1 günlük sertleşen örneklerin 3 günlük sertleşenlere kıyasla daha biyouyumlu olduğu gösterilmiştir.

● Bu çalışmanın flow sitometri bulgularına göre 3 günlük sertleşen Vitrebond eluatının 1:8'lik konsantrasyonunun PDL hücrelerinde nekroza yol açtığı, diğer bütün grupların 3 günlük sertleşen örneklerinin eluatlarının 1:8'lik konsantrasyonuna maruz bırakılan PDL hücrelerinin vital kaldığı gözlemlenmiştir.

● pH ölçümleri değerlendirildiğinde en yüksek pH'ın MM-MTA eluatında en düşük pH'ın ise Vitrebond eluatında olduğu tespit edilmiştir. SDR, kompomer ve PMMA kemik simanı eluatlarının pH değerleri benzer olup Biodentine, IRM ve PMTA'nın pH değerlerinin bunlardan hafifçe yüksek olduğu gösterilmiştir.

● Bu çalışmanın SEM analizi bulgularına göre en iyi hücresel ataçmanın PMTA, Biodentine ve kompomer gruplarında olduğu görülmektedir. Biodentine'de sayıca daha fazla PDL hücresine rastlanırken PMTA'ya tutunan PDL hücrelerinin daha iyi morfoloji sergiledikleri görülmektedir. Kompomer örnekleri üzerindeki hücre sayısı PMTA ve Biodentine'e göre daha azdır. En zayıf hücresel ataçman IRM ve Vitrebond örneklerinde gözlemlenmiştir. MM-MTA, SDR ve PMMA kemik simanı örnekleri üzerindeki PDL hücrelerinde sayıca azalma ve morfolojik farklılıklar gözlenmiştir.

● Bu çalışmanın SEM-EDX analizi bulgularına göre ağırlıkça en yüksek kalsiyum yüzdesi PMTA örneklerinde, ağırlıkça en yüksek silikon yüzdesi kompomer örneklerinde tespit edilmiştir. Hücre davranışını olumlu yönde etkileyen kalsiyum ve silikon elementleri bu materyallerin daha iyi biyouyumluluk sergilemesinin sebebi olabilir. Materyal içeriğindeki ve ortama salınan kalsiyum ve silikon elementlerinin PDL hücrelerinin canlılığı üzerine olan etkilerinin değerlendirilebilmesi için ileri çalışmalar gerekmektedir.

● PMTA, Biodentine'den daha toksik olmasına rağmen PDL hücreleri için uygun bir iskele sunmaktadır. PMTA'nın eluatından ziyade simanın kendisinin biyouyumlu olduğu söylenebilir.

● Biodentine ve Dyract Kompomer, hücresel ataçman ve potansiyel biyouyumluluk bağlamında değerlendirildiğinde diğer materyallerden daha üstün kök ucu dolgu ve perforasyon tamir materyalleri olabilir. Bu çalışmanın verileri endodonti pratiğinde, özellikle periradiküler cerrahide ve iyatrojenik perforasyonların tamirinde Biodentine ve kompomerin kullanımını desteklemektedir.

6.ÖZET

T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Farklı Kök Ucu Dolgu ve Perforasyon Tamir Materyallerinin Periodontal Ligament Fibroblastlarının Proliferasyonu, Adezyonu ve Morfolojisi Üzerindeki Etkisi

Makbule Bilge AKBULUT

Endodonti Anabilim Dalı

DOKTORA TEZİ / KONYA-2014

Bu çalışmanın amacı yeni önerilen kök ucu dolgu ve perforasyon tamir materyalleri olan; Biodentine (Septodont, Fransa), MM-MTA (MicroMega, Fransa), polimetilmetakrilat (PMMA) kemik simanı (AF cement, Laboratorios, Arjantin) ve SDR (Dentsply, Almanya)'nin insan periodontal ligament fibroblastları (PDL) üzerindeki biyouyumluluğunu değerlendirmek ve bu materyalleri güncel olan; IRM (Dentsply, ABD), Dyract Kompomer (Dentsply, Almanya), ProRoot MTA (PMTA) (Dentsply, İsviçre), Vitrebond (3M ESPE, Almanya) ile karşılaştırmaktır.

Her bir materyalden 10 tane disk steril Teflon kalıplar içerisinde hazırlandı ve her kök tamir materyali 1-gün ya da 3-gün sertleştikten sonra hücre kültür medyasında bekletilerek 24 saatlik eluatları elde edildi. İnsan periodontal ligament fibroblastları 5.000 hücre/ kuyucuk olacak şekilde ekildi. İndirek toksisite testi için, fibroblastlar eluatların 1:1, 1:2, 1:4 ve 1:8'lik konsantrasyonlarıyla 24 saat inkübe edildi. Hücre canlılığı XTT testi ile değerlendirildi. Hücre canlılık değerleri, hücre kontrol grubuna göre yüzde olarak hesaplandı. Materyallerin, eluat konsantrasyonlarının ve sertleşme sürelerinin fibroblastlara olan sitotoksik etkisini değerlendirmek için tek değişkenli varyans analizi ardından çoklu karşılaştırma için Tukey testi kullanılarak istatistik analizi yapıldı (σ= 0.05). Üç gün sertleşen materyallerin 1:8'lik konsantrasyonuna maruz bırakılan PDL hücrelerinin apoptotik/nekrotik aktivitesi flow sitometri ile belirlendi. Test materyalleri ile 3 gün inkübe edilen PDL hücrelerinin ataçmanı, yoğunluğu ve morfolojik değişiklikleri taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile değerlendirildi. Materyallerin elemental kompozisyonu (ağırlıkça yüzde) enerji dağılımlı x ışını analizi (SEM-EDX) ile tespit edildi.

Hücre canlılık değerlerinin istatistiksel sıralaması şu şekildedir: Biodentine ≥ Dyract Kompomer > MM-MTA= SDR = PMMA kemik simanı ≥ PMTA > IRM ≥ Vitrebond. Üç günlük sertleşen örnekler 1 günlük sertleşen örneklerden daha sitotoksiktir ($p<0.05$). Siman eluatlarının 1:1'lik konsantrasyonları 1:2, 1:4 ya da 1:8'lik konsantrasyonlarından önemli derecede daha sitotoksiktir ($p<0.05$). Vitrebondun hücre nekrozunu indüklediği flow sitometri ile gösterilmiştir. SEM bulguları hücrelerin Biodentine, PMTA ve kompomer yüzeylerine tutunduklarını ve iyi yayıldıklarını gösterirken diğer gruplarda çeşitli morfolojik değişiklikler gözlemlenmiştir. SEM-EDX analizi en fazla kalsiyum yüzdesinin PMTA örneklerinde, en fazla silikon yüzdesinin Dyract Kompomer örneklerinde olduğunu göstermiştir.

Bu in vitro çalışma Biodentine ve kompomerin diğer kök ucu dolgu ve perforasyon tamir materyallerinden daha biyouyumlu olduğunu göstermektedir. PMTA, PDL hücre agregatlarının ataçmanı için uygun iskele sunmaktadır. Materyalin kalsiyum ve silikon içeriği hücre ataçmanını arttırabilir.

Anahtar Sözcükler: Biyouyumluluk; kök ucu dolgusu; periodontal ligament fibroblastları, perforasyon tamir materyalleri; sitotoksisite

7. SUMMARY

Effects of Different Root End Filling and Perforation Repair Materials on Proliferation, Adhesion and Morphologic Behaviour of Periodontal Ligament Fibroblasts

The objective of this *in vitro* study was to evaluate the biocompatibility of newly proposed root-end filling and perforation repair materials; Biodentine (Septodont, France), MM-MTA (MicroMega, France), polymethylmethacrylate (PMMA) bone cement (AF cement, Laboratorios, Argentina), SDR (Dentsply, Germany) in comparison with contemporary root repair materials; IRM (Dentsply, USA), Dyract Compomer (Dentsply, Germany), ProRoot MTA (PMTA) (Dentsply, Switzerland), Vitrebond (3M ESPE, Germany) by using human periodontal ligament fibroblasts (PDL).

Ten disc from each material were fabricated in sterile Teflon molds and 24h eluates were obtained from each root repair material in cell culture media after 1 or 3-day setting. Human periodontal ligament fibroblasts were plated at a density of 5.000/well. For indirect toxicity assay, fibroblasts were incubated for 24h with 1:1, 1:2, 1:4 and 1:8 concentrations of eluates. Cell viability was evaluated by XTT assay. Cell viabilities were calculated as percentage relative to the cell control. The impact of materials, eluate concentration and setting time on cytotoxicity of fibroblasts was statistically analyzed using univariate analysis of variance followed by post hoc tukey test (σ= 0.05). Apoptotic/necrotic activity of PDL cells exposed to 1:8 concentration of 3-day set material eluates was established by flow cytometry. Attachment, density and morphological changes of PDL cells incubated with test materials for 3-days was evaluated with scanning electron microscope (SEM). The elemental composition (%weight) of materials was determined by energy dispersive X-ray spectroscopy (SEM-EDX).

The statistical ranking of cell viability values was as follows: Biodentine ≥ Dyract Compomer > MM-MTA= SDR = PMMA bone cement ≥ PMTA > IRM ≥ Vitrebond. Three-day old samples were more cytotoxic than 1-day old samples ($p<0.05$). Eluates from the cements at 1:1 concentration were significantly more cytotoxic than that eluates at 1:2, 1:4 or 1:8 concentration ($p<0.05$). Vitrebond induced cell necrose as demonstrated by flow cytometry. Cells were attached and well spread on the surfaces of Biodentine, PMTA and compomer whilst varied morphological alterations were observed in other groups with SEM. SEM-EDX analysis revealed maximum calcium percentage on PMTA specimens as well maximum silicon percentage on Dyract Compomer specimens.

This *in vitro* study demonstrated that Biodentine and Compomer are more biocompatible than other root end filling and perforation repair materials. PMTA presents a favourable scaffold for better attachment of the PDL cell aggregates. Calcium and silicon content of a material may enhance PDL cell attachment.

Key Words: Biocompatibility; cytotoxicity; perforation repair materials; periodontal ligament fibroblasts; root-end filling

8. KAYNAKLAR

1. Aalto-Korte K, Alanko K, Kuuliala O, Jolanki R. Occupational methacrylate and acrylate allergy from glues. Contact Dermatitis. 2008;58:340-6.
2. Abdal AK, Retief DH, Jamison HC. The apical seal via the retrosurgical approach.-An evaluation of retrofilling material. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1982;54: 213-18.
3. Abdullah D, Ford TR, Papaioannou S, Nicholson J, McDonald F. An evaluation of accelerated Portland cement as a restorative material. Biomaterials. 2002;23:4001-10
4. ADA Council of Dental Benefit Programs, ADA Council of Scientific Affairs. Statement on posterior resin based composites. JADA 1998;129:1627-28.
5. Aguilar FG, Roberti Garcia LF, Panzeri Pires-de-Souza FC. Biocompatibility of new calcium aluminate cement (EndoBinder). J Endod. 2012;38:367-71.
6. Al-Hiyasat AS, Darmani H, Milhem MM. Cytotoxicity evaluation of dental resin composites and their flowable derivatives. Clin Oral Investig. 2005;9:21-5.
7. Al-Hiyasat AS, Al-Sa'Eed OR, Darmani H. Quality of cellular attachment to various root-end filling materials. J Appl Oral Sci. 2012;20:82-8.
8. Al-Rabeah E, Perinpanayagam H, MacFarland D. Human alveolar bone cells interact with ProRoot and tooth-colored MTA. J Endod. 2006;32:872-5.
9. Al-Sa'eed OR, Al-Hiyasat AS, Darmani H. The effects of six root-end filling materials and their leachable components on cell viability. J Endod. 2008;34:1410-4.
10. Al-Sabek F, Shostad S, Kirkwood KL. Preferential attachment of human gingival fibroblasts to the resin ionomer Geristore. J Endod. 2005;31:205-8.
11. Alanezi AZ, Jiang J, Safavi KE, Spangberg LS, Zhu Q. Cytotoxicity evaluation of endosequence root repair material. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2010;109:e122-5.
12. Altman FP. Tetrazolium salts and formazans. Prog. Histochem. Cytochem. 1976;9: 1-56.
13. Ames BN, Shigenaga MK. Oxidants are a major contributor to aging. Ann N Y Acad Sci. 1992;663:85-96.
14. Andelin WE, Shabahang S, Wright K, Torabinejad M. Identification of hard tissue after experimental pulp capping using dentin sialoprotein (DSP) as a marker. J Endod. 2003;29:646-50.
15. Anderson RW, Pashley DH, Pantera EA. Microleakage of Amalgambond in endodontic retrofillings. J Endod. 1991;17:198, Abstr. #51
16. Anderson RW, Powell BJ, Pashley DH. Microleakage of IRM used to restore endodontic access preparations. Endod Dent Traumatol. 1990;6:137-41.
17. Andreasen JO, Rud J, Munksgaard EC. Retrograde root obturations using resin and a dentin bonding agent: a preliminary histologic study of tissue reactions in monkeys. Tandlaegebladet. 1989;93:195-7.
18. Andreasen JO, Munksgaard EC, Fredebo L, Rud J. Periodontal tissue regeneration including cementogenesis adjacent to dentin-bonded retrograde composite fillings in humans. J Endod. 1993;19:151-3.
19. Asgary S, Shahabi S, Jafarzadeh T, Amini S, Kheirieh S. The properties of a new endodontic material. J Endod. 2008;34:990-3.
20. Aslan JE, Thomas G. Death by committee: organellar trafficking and communication in apoptosis. Traffic. 2009;10:1390–404.
21. Asrari M, Lobner D. In vitro neurotoxic evaluation of root-end filling materials. J Endod. 2003;29:742-6.
22. Astrup II, Knutsson CH, Osen TB (Danışman Eero Kerosuo) Biodentine as a root-end filling. Tromstad Üniversitesi, Doktora Tezi, 2012.
23. Atay A, Bozok Cetintas V, Cal E, Kosova B, Kesercioglu A, Guneri P. Cytotoxicity of hard and soft denture lining materials. Dent Mater J. 2012;31:1082-6.
24. Atmeh AR, Chong EZ, Richard G, Festy F, Watson TF. Dentin-cement interfacial interaction: calcium silicates and polyalkenoates. J Dent Res. 2012;91:454-9.
25. Azimi S, Fazlyab M, Sadri D, Saghiri MA, Khosravanifard B, Asgary S. Comparison of pulp response to mineral trioxide aggregate and a bioceramic paste in partial pulpotomy of sound human premolars: a randomized controlled trial. Int Endod J. 2014;47:873-81.
26. Badr AE. Marginal adaptation and cytotoxicity of bone cement compared with amalgam and mineral trioxide aggregate as root-end filling materials. J Endod. 2010;36:1056-60.
27. Balto HA. Attachment and morphological behavior of human periodontal ligament fibroblasts to mineral trioxide aggregate: a scanning electron microscope study. J Endod. 2004;30:25-9.
28. Barile FA. Principles of Toxicology Testing, 2nd edition, CRC Press, 2013.

29. Bartold PM, Walsh LJ, Narayanan AS. Molecular and cell biology of the gingiva. Periodontol 2000. 2000;24:28-55.
30. Bates CF, Carnes DL, del Rio CE. Longitudinal sealing ability of mineral trioxide aggregate as a root-end filling material. J Endod. 1996;22:575-8.
31. Batur YB, Acar G, Yalcin Y, Dindar S, Sancakli H, Erdemir U. The cytotoxic evaluation of mineral trioxide aggregate and bioaggregate in the subcutaneos connective tissue of rats. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2013;18:e745-51.
32. Baxter LC, Frauchiger V, Textor M, ap Gwynn I, Richards RG. Fibroblast and osteoblast adhesion and morphology on calcium phosphate surfaces. Eur Cell Mater. 2002;4:1-17.
33. Bazzucchi M, Mori G, Goracci G. Pulpal response to direct capping of adhesive resins and glass ionomer cements. Journal of Dental Research 1995;74:555 (abstract 1240).
34. Bean TA, Zhuang WC, Tong PY, Eick JD, Chappelow CC, Yourtee DM. Comparison of tetrazolium colorimetric and 51Cr release assays for cytotoxicity determination of dental biomaterials. Dent Mater. 1995;11:327-31.
35. Becher R, Kopperud HM, Al RH, Samuelsen JT, Morisbak E, Dahlman HJ, Lilleaas EM, Dahl JE. Pattern of cell death after in vitro exposure to GDMA, TEGDMA, HEMA and two compomer extracts. Dent Mater. 2006;22:630-40.
36. Beertsen W, McCulloch CA, Sodek J. The periodontal ligament: a unique, multifunctional connective tissue. Periodontol 2000. 1997;13:20-40.
37. Behnia A, Strassler HE, Campbell R. Repairing iatrogenic root perforations. J Am Dent Assoc. 2000;131:196-201.
38. Berridge MV, Herst PM, Tan AS. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. Biotechnol Annu Rev. 2005;11:127-52.
39. Bird DC, Komabayashi T, Guo L, Opperman LA, Spears R. *In Vitro* evaluation of dentinal tubule penetration and biomineralization ability of a new root-end filling material. J Endod. 2012;38:1093-6.
40. Blackman R, Gross M, Seltzer S. An evaluation of biocompatibility of a glass-ionomer-silver cement in rat connective tissue. J Endod. 1989;15:76-9.
41. Blaney TD, Peters DD, Setterstrom J, Bernier WE. Marginal sealing quality of IRM and Cavit as assessed by microbiol penetration. J Endod. 1981;7:453-7.
42. Blomlöf L. Milk and saliva as possible storage media for traumatically exarticulated teeth prior to replantation. Swed Dent J Suppl. 1981;8:1–26.
43. Bonson S, Jeansonne BG, Lallier TE. Root-end filling materials alter fibroblast differentiation. J Dent Res. 2004;83:408–13.
44. Boss JH, Shajrawi I, Dekel S, Mendes DG. The bone-cement interface: histological observations on the interface of cemented arthroplasties within the immediate and late phases. J Biomater Sci Polym Ed. 1993;5:221-30.
45. Bortoluzzi AE, Juárez Broon N, Antonio Hungaro Duarte M, de Oliveira Demarchi AC, Monteiro Bramante C. The use of a setting accelerator and its effect on pH and calcium ion release of mineral trioxide aggregate and white Portland cement. J Endod. 2006;32:1194-7.
46. Boyko GA, Melcher AH, Brunette DM. Formation of new periodontal ligament by periodontal ligament cells implanted in vivo after culture in vitro. A preliminary study of transplanted roots in the dog. J Periodontal Res. 1981;16:73-88.
47. Bozeman TB, Lemon RR, Eleazer PD. Elemental analysis of crystal precipitate from gray and white MTA. J Endod. 2006;32:425-8.
48. Brasseler 2014,availablefromhttp:/www.Brasselerusa.com/display.cfm?pid=newproducts
49. Breault LG, Fowler EB, Primack PD. Endodontic perforation repair with resin-ionomer: a case report. J Contemp Dent Pract. 2000;1:48-59.
50. Briggs PF, Scott BJ. Evidence-based dentistry: endodontic failure-how should it be managed. Br Dent J. 1997;183:159–64.
51. Brook IM, Hatton PV. Glass-ionomers: Bioactive implant materials: review. Biomaterials. 1998;19:565-71.
52. Bukovinszky K, Molnár L, Bakó J, Szalóki M, Hegedus C. Comparative study of polymerization shrinkage and related properties of flowable composites and an unfilled resin. Fogorv Sz. 2014;107:3-8.
53. Callis PD, Santini A. Tissue response to retrograde root fillings in the ferret canine: a comparison of a glass ionomer cement and gutta-percha with sealer. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1987;64:475-9.
54. Camargo SE, Camargo CH, Hiller KA, Rode SM, Schweikl H, Schmalz G. Cytotoxicity and genotoxicity of pulp capping materials in two cell lines. Int Endod J. 2009;42:227-37.

55. Camilleri J, Montesin FE, Papaioannou S, McDonald F, Pitt Ford TR. Biocompatibility of two commercial forms of mineral trioxide aggregate. Int Endod J. 2004;37:699-704.
56. Camilleri J, Montesin FE, Brady K, Sweeney R, Curtis RV, Pitt Ford TR. The chemical constitution of mineral trioxide aggregate. Dent Mater. 2005a;21:297-303.
57. 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. 2005b;38:834-42.
58. Camilleri J. Hydration mechanisms of mineral trioxide aggregate. Int Endod J. 2007;40:462-70.
59. Camilleri J, Montesin FE, Juszczyk AS, Papaioannou S, Curtis RV, Donald FM, Ford TR. The constitution, physical properties and biocompatibility of modified accelerated cement. Dent Mater. 2008a;24:341-50.
60. Camilleri J. The biocompatibility of modified experimental Portland cements with potential for use in dentistry. Int Endod J. 2008b;41:1107-14.
61. Camilleri J. Characterization and hydration kinetics of tricalcium silicate cement for use as a dental biomaterial. Dent Mater. 2011a;27:836-44.
62. Camilleri J. Scanning electron microscopic evaluation of the material interface of adjacent layers of dental materials. Dent Mater. 2011b;27:870-8.
63. 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;45:737-43.
64. Camilleri J, Sorrentino F, Damidot D. Investigation of the hydration and bioactivity of radiopacified tricalcium silicate cement, Biodentine and MTA Angelus. Dent mater. 2013;29:580-93.
65. Camp MA, Jeansonne BG, Lallier T. Adhesion of human fibroblasts to root-end filling materials. J Endod. 2003;29:602-7.
66. Camps J, About I. Cytotoxicity testing of endodontic sealers: a new method. J Endod. 2003;29:583-6.
67. Cha JD, Kim JY. Essential oil from Cryptomeria japonica induces apoptosis in human oral epidermoid carcinoma cells via mitochondrial stress and activation of caspases. Molecules. 2012;17:3890-901.
68. Chang MC, Uang BJ, Wu HL, Lee JJ, Hahn LJ, Jeng JH. Inducing the cell cycle arrest and apoptosis of oral KB carcinoma cells by hydroxychavicol: roles of glutathione and reactive oxygen species. Br J Pharmacol. 2002;135:619-30.
69. Chang SW, Lee SY, Kum KY, Kim EC. Effects of ProRoot MTA, Bioaggregate, and Micromega MTA on odontoblastic differentiation in human dental pulp cells. J Endod. 2014a;40:113-8.
70. Chang SW, Lee SY, Ann HJ, Kum KY, Kim EC. Effects of calcium silicate endodontic cements on biocompatibility and mineralization-inducing potentials in human dental pulp cells. J Endod. 2014b;40:1194-200.
71. Chang YC, Chou MY. Cytotoxicity of fluoride on human pulp cell cultures in vitro. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2001;91:230-4.
72. Chen CL, Huang TH, Ding SJ, Kao CT. Comparison of calcium and silicate cement and mineral trioxide aggregate biologic effects and bone markers expression in MG63 cells. J Endod. 2009;35:682–5.
73. Chohayeb AA, Chow LC, Tsaknis PJ Evaluation of calcium phosphate as a root canal sealer-filler material. J Endod. 1987;13:384–7.
74. Chng HK, Islam I, Yap AU, Tong YW, Koh ET. Properties of a new root-end filling material. J Endod. 2005;31:665–8.
75. Chong BS. A surgical alternative. In: managing endodontic failure in practice, Ch. 8. London Quintessence Publishing Co., Ltd, 2004.p.123-47
76. Chong BS, Owadally ID, Pitt Ford TR, Wilson RF. Cytotoxicity of potential retrograde root-filling materials. Endod Dent Traumatol. 1994a;10:129-33.
77. Chong BS, Owadally ID, Pitt Ford TR, Wilson RF. Antibacterial activity of potential retrograde root filling materials. Endod Dent Traumatol. 1994b;10:66-70.
78. Chong BS, Pitt Ford TR. Root end filling materials: rationale and tissue response. Endodontic Topics. 2005;11:114-30
79. Chong BS, Pitt Ford TR, Hudson MB. A prospective clinical study of Mineral Trioxide Aggregate and IRM when used as root-end filling materials in endodontic surgery. Int Endod J. 2003;36:520-6.
80. Chong BS, Ford TR, Kariyawasam SP. Tissue response to potential root-end filling materials in infected root canals. Int Endod J. 1997a;30:102-14.

81. Chong BS, Pitt Ford TR, Kariyawasam SP. Short term response to potential root-end filling materials in infected root canals. Int Endod J. 1997b;30: 240-9.
82. Christensen T, Morisbak E, Tønnesen HH, Bruzell EM. In vitro photosensitization initiated by camphorquinone and phenyl propanedione in dental polymeric materials. J Photochem Photobiol B. 2010;100:128-34.
83. Chung CR, Kim E, Shin SJ. Biocompatibility of bioaggregate cement on human pulp and periodontal ligament (PDL) derived cells. J Korean Acad Conserv Dent. 2010;35:473-8.
84. Cox CF, Sübay RK, Suzuki S, Suzuki SH, Ostro E. Biocompatibility of various dental materials: pulp healing with a surface seal. Int J Periodontics Restorative Dent. 1996;16:240-51.
85. Crisp S, Lewis BG, Wilson AD. Characterization of glass ionomer cements. Part 6. A study of erosion and water absorption in both neutral and acidic media. J Dent. 1980;8:68-74.
86. Crooks WG, Anderson RW, Powell BJ, Kimbrough WF. Longitudinal evaluation of the seal of IRM root end fiilings. J Endod. 1994;20:250-2.
87. Cutajar A, Mallia B, Abela S, Camilleri J. Replacement of radiopacifier in mineral trioxide aggregate; characterization and determination of physical properties. Dent Mater. 2011;27:879-91.
88. Damas BA, Wheater MA, Bringas JS, Hoen MM. Cytotoxicity comparison of mineral trioxide aggregates and EndoSequence bioceramic root repair materials. J Endod. 2011;37:372-5.
89. Dammaschke T, Gerth HU, Züchner H, Schäfer E. Chemical and physical surface and bulk material characterization of white ProRoot MTA and two Portland cements. Dent Mater. 2005;21:731-8.
90. Dandona P, Thusu K, Cook S, Snyder B, Makowski J, Armstrong D, Nicotera T. Oxidative damage to DNA in diabetes mellitus. Lancet. 1996;347:444-5.
91. Danin J, Linder L, Sund ML, Stromberg T, Torstenson B, Zetterqvist L. Quantitative radioactive analysis of microleakage of four different retrograde fillings. Int Endod J. 1992; 25:183-8.
92. Danin J, Stromberg T, Forsgren T et al. Clinical management of nonhealing periradicular pathosis. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 1996; 82:213–7.
93. De Deus G, Ximenes R, Gurgel-Filho ED, Plotkowski MC, Coutinho-Filho T. Cytotoxicity of MTA and Portland cement on human ECV 304 endothelial cells. Int Endod J. 2005;38:604-9.
94. De-Deus G, Canabarro A, Alves GG, Marins JR, Linhares AB, Granjeiro JM. Cytocompatibility of the ready-to-use bioceramic putty repair cement iRoot BP Plus with primary human osteoblasts. Int Endod J. 2012;45:508-13.
95. Deichmann WB, Henschler D, Holmsted B, Keil G. What is there that is not poison? A study of the Third Defense by Paracelsus. Arch Toxicol. 1986;58:207-13.
96. Dentsply2014,availiablefromhttps://www.dentsply.co.uk/Products/Restorative/Composites/SDR.aspx.
97. Dion I, Rouais F, Baquey C, Lahaye M, Salmon R, Trut L, Cazorla JP, Huong PV, Monties JR, Havlik P. Physico-chemistry and cytotoxicity of ceramics: part I: characterization of ceramic powders. J Mater Sci Mater Med. 1997;8:325-32.
98. do Nascimento AB, Fontana UF, Teixeira HM, Costa CA. Biocompatibility of a resin-modified glass-ionomer cement applied as pulp capping in human teeth. Am J Dent. 2000;13:28-34.
99. Dong Sung-park, suh-Jin Sohn, Tae-Seok oh, Hyun-Mi Yoo, Chan-Je Park, Soon-Ho Yim, Young-Kyoo Lee, Seung-Bum Kye, An electrochemical study of the sealing ability of three retrofilling materials. J Korean Acad Conserv Dent. 2004;29:365-69.
100. Doherty PJ. Biocompatibility evaluation of glass ionomer cement using cell culture techniques. Clin Mater. 1991;7:335-40.
101. Dragoo MR. Resin-ionomer and hybrid-ionomer cements: part II, human clinical and histologic wound healing responses in specific periodontal lesions. Int J Periodontics Restorative Dent. 1997;17:75-87.
102. Eid AA, Gosier JL, Primus CM, Hammond BD, Susin LF, Pashley DH, Tay FR. In vitro biocompatibility and oxidative stress profiles of different hydraulic calcium silicate cements. J Endod. 2014;40:255-60.
103. El Sayed M, Saeed M. In vitro comparative study of sealing ability of Diadent BioAggregate and other root-end filling materials. J Conserv Dent. 2012;15:249-52.
104. El-Swiah JM, Walker RT. Reasons for apicectomies. *A retrospective study*. Endod Dent Traumatol. 1996;12:185–91.
105. Eldeniz AU, Hadimli HH, Ataoglu H, Orstavik D. Antibacterial effect of Selected root-end filling materials. J Endod. 2006;32:345-9.
106. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. Toxicol Pathol. 2007;35:495-516.

107. Engeler DS, Scandella E, Ludewig B, Schmid HP. Ciprofloxacin and epirubicin synergistically induce apoptosis in human urothelial cancer cell lines. Urol Int. 2012;88:343-9.
108. Espevik S, Mjor IA. Corrosion and Toxicology of dental amalgams. In: Smith DC, Williams DF, eds. Biocompatibility of dental materials. Vol III. Boca Raton, FL: CRC Press; 1982. pp.1-18
109. Estrela C, Bammann LL, Estrela CR, Silva RS, Pécora JD. Antimicrobial and chemical study of MTA, Portland cement, calcium hydroxide paste, Sealapex and Dycal. Braz Dent J. 2000;11:3-9.
110. European Society of Endodontology. Quality guidelines for endodontic treatment: consensus report of the European Society of Endodontology. Int. Endod. J. 2006;39, 921–30.
111. Faraco IM Jr, Holland R. Response of the pulp of dogs to capping with mineral trioxide aggregate or a calcium hydroxide cement. Dent Traumatol. 2001;17:163-6.
112. Faraco Junior IM, Holland R. Histomorphological response of dogs' dental pulp capped with white mineral trioxide aggregate. Braz Dent J. 2004;15:104-8.
113. Fayazi S, Ostad SN, Razmi H. Effect of ProRoot MTA, Portland cement, and amalgam on the expression of fibronectin, collagen I, and TGFβ by human periodontal ligament fibroblasts in vitro. Indian J Dent Res. 2011;22:190-4.
114. Ferracane JL, Condon JR. Rate of elution of leachable components from composite. Dent Mater. 1990;6:282-7.
115. Fischer EJ, Arens DE, Miller CH. Bacterial leakage of mineral trioxide aggregate as compared with zinc-free amalgam, intermediate restorative material, and Super-EBA as a root-end filling material. J Endod. 1998;24:176-9.
116. Floyd RA. Role of oxygen free radicals in carcinogenesis and brain ischemia. FASEB J. 1990;4:2587-97.
117. Forss H. Release of fluoride and other elements from light-cured glass ionomers in neutral and acidic conditions. J Dent Res. 1993;72:1257-62.
118. Friedman S. Treatment outcome and prognosis of endodontic therapy. In: Ørstavik D, Pitt Ford TR eds. Essential Endodontology. 2nd edn. Oxford: Blackwell Science; 2008. 426–32.
119. Fujisawa S, Atsumi T, Satoh K, Kadoma Y, Ishihara M, Okada N, Nagasaki M, Yokoe I, Sakagami H. Radical generation, radical-scavenging activity, and cytotoxicity of eugenol-related compounds. In Vitr Mol Toxicol. 2000;13:269-80.
120. Fuss Z, Trope M. Root perforations: classification and treatment choices based on prognostic factors. Endod Dent Traumatol. 1996: 12:255–64.
121. Gallego D, Higuita N, Garcia F, Ferrel N, Hansford DJ. Bioactive coatings on Portland cement substrates: Surface precipitation of apatite-like crystals. Mater Sci Engin. 2008;28:347-52.
122. Galler K, Hiller KA, Ettl T, Schmalz G. Selective influence of dentin thickness upon cytotoxicity of dentin contacting materials. J Endod. 2005;31:396-9.
123. Gandolfi MG, Perut F, Ciapetti G, Mongiorgi R, Prati C. New Portland cement-based materials for endodontics mixed with articaine solution: a study of cellular response. J Endod. 2008a;34:39-44.
124. Gandolfi MG, Pagani S, Perut F, Ciapetti G, Baldini N, Mongiorgi R, Prati C. Innovative silicate-based cements for endodontics: a study of osteoblast-like cell response. J Biomed Mater Res A. 2008b;87:477-86.
125. Gandolfi MG, Ciapetti G, Perut F, Taddei P, Modena E, Rossi PL, Prati C. Biomimetic calcium-silicate cements aged in simulated body solutions. Osteoblast response and analyses of apatite coating. J Appl Biomater Biomech. 2009;7:160-70.
126. Gandolfi MG, Ciapetti G, Taddei P, Perut F, Tinti A, Cardoso M, Van Meerbeek B, Prati C. Apatite formation on bioactive calcium-silicate cements for dentistry affects surface topography and human marrow stromal cells proliferation. Dent Mater. 2010a;26:974-92.
127. Gandolfi MG, Taddei P, Tinti A, De Stefano Dorigo E, Rossi PL, Prati C. Kinetics of apatite formation on a calcium-silicate cement for root-end filling during ageing in physiological-like phosphate solutions. Clin Oral Investig. 2010b;14:659-68.
128. Gandolfi MG, Taddei P, Siboni F, Modena E, Ciapetti G, Prati C. Development of the foremost light-curable calcium-silicate MTA cement as root-end in oral surgery. Chemical-physical properties, bioactivity and biological behavior. Dent Mater. 2011;27:e134-57.
129. Garcia D, Yaman P, Dennison J, Neiva G. Polymerization Shrinkage and Depth of Cure of Bulk Fill Flowable Composite Resins. Oper Dent. 2014;39:441-8.
130. Gargallo Albiol J, Aguirre Urízar JM, Gay Escoda C. A comparative study of silver amalgam and compomer as retrograde filling materials in periapical surgery. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2008;13:E133-7.

131. Gartner AH, Dorn SO. Advances in endodontic surgery. Dent Clin North Am. 1992;36:357-78.
132. Geurtsen W, Spahl W, Leyhausen G. Residual monomer/additive release and variability in cytotoxicity of light-curing glass-ionomer cements and compomers. J Dent Res. 1998a;77:2012-9.
133. Geurtsen W. Substances released from dental resin composites and glass ionomer cements. Eur J Oral Sci. 1998b;106:687-95.
134. Geurtsen W. Biocompatibility of resin-modified filling materials. Crit Rev Oral Biol Med. 2000;11:333-55.
135. Glafo 2014; available from http://www.glafo.se/pdf/2006/sem_edx_analyses.pdf
136. Goldberg M, Pradella-Plasse N, Tran X et al. Emerging trends in biomaterial researches, In: Goldberg M, ed. Biocompatibility or cytotoxic effects of dental composites. Oxford, UK:Coxmoor Publishing, 2009; pp. 181-203.
137. Goon WW, Lundergan WP. Redemption of a perforated furcation with a multidisciplinary treatment approach. J Endod. 1995;21:576-9.
138. Gorduysus M, Avcu N, Gorduysus O, Pekel A, Baran Y, Avcu F, Ural AU. Cytotoxic effects of four different endodontic materials in human periodontal ligament fibroblasts. J Endod. 2007;33:1450-4.
139. Gough JE, Jones JR, Hench LL. Nodule formation and mineralisation of human primary osteoblasts cultured on a porous bioactive glass scaffold. Biomaterials. 2004;25:2039-46.
140. Grech L, Mallia B, Camilleri J. Characterization of set Intermediate Restorative Material, Biodentine, Bioaggregate and a prototype calcium silicate cement for use as root-end filling materials. Int Endod J. 2013;46:632-41.
141. Green D. Means To An End Apoptosis and Other Cell Death Mechanisms. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2011 220pp.
142. Guimaraes CA, Linden R. Programmed cell death. Apoptosis and alternative deathstyles. Eur J Biochem. 2004; 271:1638–50.
143. Guneser MB, Akbulut MB, Eldeniz AU. Effect of various endodontic irrigants on the push-out bond strength of biodentine and conventional root perforation repair materials. J Endod. 2013;39:380-4.
144. Gupta SK, Saxena P, Pant VA, Pant AB. Adhesion and biologic behavior of human periodontal fibroblast cells to resin ionomer Geristore: a comparative analysis. Dent Traumatol. 2013;29:389-93.
145. Guven G, Cehreli ZC, Ural A, Serdar MA, Basak F. Effect of mineral trioxide aggregate cements on transforming growth factor beta1 and bone morphogenetic protein production by human fibroblasts in vitro. J Endod. 2007;33:447-50.
146. Güneşer MB (Danışman Ayçe Ünverdi Eldeniz) İşlem görmüş dentin kollajenine enterococcus faecalis'in adezyonunda jelatinaz enziminin etkisi, Selçuk Üniversitesi Doktora tezi 2013.
147. Haglund R, He J, Jarvis J, Safavi KE, Spångberg LS, Zhu Q. Effects of root-end filling materials on fibroblasts and macrophages in vitro. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2003;95:739-45.
148. Hamilton DW, Brunette DM. The effect of substratum topography on osteoblast adhesion mediated signal transduction and phosphorylation. Biomaterials. 2007;28:1806-19.
149. Han L, Okiji T. Uptake of calcium and silicon released from calcium silicate-based endodontic materials into root canal dentine. Int Endod J. 2011;44:1081-7.
150. Handa K, Saito M, Tsunoda A, Yamauchi M, Hattori S, Sato S, Toyoda M, Teranaka T, Narayanan AS. Progenitor cells from dental follicle are able to form cementum matrix in vivo. Connect Tissue Res. 2002;43:406-8.
151. Harrison MA, Rae IF. General techniques of cell culture: Cambridge University Press;1997.
152. Hayashi M, Shimizu A, Ebisu S. MTA for obturation of mandibular central incisors with open apices: case report. J Endod. 2004;30:120-2.
153. Hernandez EP, Botero TM, Mantellini MG, McDonald NJ, Nör JE. Effect of ProRoot MTA mixed with chlorhexidine on apoptosis and cell cycle of fibroblasts and macrophages in vitro. Int Endod J. 2005;38:137-43.
154. High AS, Russell JL. Retrograde root filling using antibiotic-containing, radiopaque, bone cement. J Dent. 1989;17:241-5.
155. Hirschman WR, Wheater MA, Bringas JS, Hoen MM. Cytotoxicity comparison of three current direct pulp-capping agents with a new bioceramic root repair putty. J Endod. 2012;38:385-8.

156. Holland R, de Souza V, Nery MJ, Otoboni Filho JA, Bernabé PF, Dezan Júnior E. Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tubes filled with mineral trioxide aggregate or calcium hydroxide. J Endod. 1999;25:161-6.
157. Holt GM, Dumsha TC. Leakage of amalgam, composite, and Super-EBA, compared with a new retrofill material: bone cement. J Endod. 2000;26:29-31.
158. Huang FM, Chang YC. Cytotoxicity of resin-based restorative materials on human pulp cell cultures. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2002;94:361-5.
159. Huang FM, Tai KW, Chou MY, Chang YC. Resinous perforation-repair materials inhibit the growth, attachment, and proliferation of human gingival fibroblasts. J Endod. 2002;28:291-4.
160. Huang TH, Yang CC, Ding SJ, Yan M, Chou MY, Kao CT. Biocompatibility of human osteosarcoma cells to root end filling materials. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2005;72:140-5.
161. Hume WR. An analysis of the release and the diffusion through dentin of eugenol from zinc oxide-eugenol mixtures. J Dent Res. 1984;63:881-4.
162. Hume WR. The pharmacologic and toxicological properties of zinc oxide-eugenol. J Am Dent Assoc. 1986;113:789-91.
163. Hwang YC, Kim DH, Hwang IN, Song SJ, Park YJ, Koh JT, Son HH, Oh WM. Chemical constitution, physical properties, and biocompatibility of experimentally manufactured Portland cement. J Endod. 2011;37:58-62
164. Illeperuma RP, Park YJ, Kim JM, Bae JY, Che ZM, Son HK, Han MR, Kim KM, Kim J. Immortalized gingival fibroblasts as a cytotoxicity test model for dental materials. J Mater Sci Mater Med. 2012;23:753-62.
165. Ingle JI. A standardized endodontic technique utilizing newly designed instruments and filling materials. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1961;14:83–91.
166. Ingle JI, Bakland LK, Baumgartner JC. Ingle's endodontics. 6th ed. Hamilton, ON: B.C. Decker Inc; 2008.
167. Innovative BioCeramix, Inc Co. 2012 Available from: http://www.ibioceramix.com/Publications.html
168. Intertek 2014 available from http://www.intertek.com/analysis/microscopy/edx/
169. ISO 10993-5 (2009). Biological evaluation of medical devices-Part5: Tests for in vitro cytotoxicity.
170. Ivanovski S, Gronthos S, Shi S, Bartold PM. Stem cells in the periodontal ligament. Oral Dis. 2006;12:358-63.
171. Jacobovitz M, Vianna ME, Pandolfelli VC, Oliveira IR, Rossetto HL, Gomes BP. Root canal filling with cements based on mineral aggregates: an in vitro analysis of bacterial microleakage. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2009;108:140-4.
172. Jeng JH, Hahn LJ, Lu FJ, Wang YJ, Kuo MY. Eugenol triggers different pathobiological effects on human oral mucosal fibroblasts. J Dent Res. 1994;73:1050-5.
173. Jenner P. Oxidative damage in neurodegenerative disease. Lancet. 1994;344:796-8.
174. Joffe E. Use of mineral trioxide aggregate (MTA) in root repairs. Clinical cases. N Y State Dent J. 2002;68:34-6.
175. Johnson BR. Considerations in the selection of a root-end filling material. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 1999;87:398–404.
176. Juloski J, Goracci C, Radovic I, Chieffi N, Vichi A, Vulicevic ZR, Ferrari M. Post-retentive ability of new flowable resin composites. Am J Dent. 2013;26:324-8.
177. Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposure of dental pulps in germfree and conventional laboratory rats. J South Calif Dent Assoc. 1966;34:449-51.
178. Kaneda T, Miyauchi M, Takekoshi T, Kitagawa S, Kitagawa M, Shiba H, Kurihara H, Takata T.Characteristics of periodontal ligament subpopulations obtained by sequential enzymatic digestion of rat molar periodontal ligament. Bone. 2006;38:420-6.
179. Kaplan SD, Tanzilli JP, Raphael D, Moodnik RM. A comparison of the marginal leakage of retrograde techniques. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1982;54:583-5.
180. Karimjee CK, Koka S, Rallis DM, Gound TG. Cellular toxicity of mineral trioxide aggregate mixed with an alternative delivery vehicle. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2006;102:e115-20.
181. Kasugai S, Hasegawa N, Ogura H. A simple in vito cytotoxicity test using the MTT (3-(4,5)-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) colorimetric assay: analysis of eugenol toxicity on dental pulp cells (RPC-C2A). Jpn J Pharmacol. 1990;52:95-100.

182. Keiser K, Johnson CC, Tipton DA. Cytotoxicity of mineral trioxide aggregate using human periodontal ligament fibroblasts. J Endod. 2000;26:288-91.
183. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer. 1972;26:239-57.
184. Kettering JD, Torabinejad M. Investigation of mutagenicity of mineral trioxide aggregate and other commonly used root-end filling materials. J Endod. 1995;21:537-42.
185. Kim M, Ko H, Yang W, Lee Y, Kim S, Mante FK. A new resin-bonded retrograde filling material. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2009;108:e111-6.
186. Kim S, Kratchman S. Modern endodontic surgery concepts and practice: a review. J Endod. 2006;32:601–23.
187. Kim S, Pecora G, Rubinstein R. Color Atlas of Microsurgery in Endodontics. Philadelphia: WB Saunders, 2001
188. Kimura JT. A comparative analysis of zinc and non-zinc alloys used in retrograde endodontic surgery. Part 1: Apical seal and tissue reaction. J Endod. 1982;8:359-63.
189. Kobayashi M, Tsutsui TW, Kobayashi T, Ohno M, Higo Y, Inaba T, Tsutsui T. Sensitivity of human dental pulp cells to eighteen chemical agents used for endodontic treatments in dentistry. Odontology. 2013;101:43-51.
190. Kodohiro G. A comparative of the sealing quality of zinc-free malgam and Diaket when used as a retrograde filling material. Hawaii Dental Journal. 1984;15:8-9.
191. Koh ET, Torabinejad M, Pitt Ford TR, Brady K, McDonald F. Mineral trioxide aggregate stimulates a biological response in human osteoblasts. J Biomed Mater Res. 1997;37:432-9.
192. Koh ET, McDonald F, Pitt Ford TR, Torabinejad M. Cellular response to Mineral Trioxide Aggregate. J Endod. 1998;24:543-7.
193. Koka S, Reinhardt R, Maze C, Dyer J. Variability of inflammatory mediator production by human periodontal fibroblasts stimulated with bacterial lipopolysaccharide. In Vitro Cell Dev Biol Anim. 1996;32:528-30.
194. Kontonasaki E, Sivropoulou A, Papadopoulou L, Garefis P, Paraskevopoulos K, Koidis P. Attachment and proliferation of human periodontal ligament fibroblasts on bioactive glass modified ceramics. J Oral Rehabil. 2007;34:57-67.
195. Kratchman SI. Perforation repair and one-step apexification procedures. Dent Clin North Am. 2004;48:291–307.
196. Krell KF, Wefel JS. A calcium phosphate cement root canal sealer – scanning electron microscopic analysis. J Endod. 1984;10:571–6.
197. Kum KY, Kim EC, Yoo YJ, Zhu Q, Safavi K, Bae KS, Chang SW. Trace metal contents of three tricalcium silicate materials: MTA Angelus, Micro Mega MTA and Bioaggregate. Int Endod J. 2014;47:704-10.
198. Lai WY, Kao CT, Hung CJ, Huang TH, Shie MY. An evaluation of the inflammatory response of lipopolysaccharide-treated primary dental pulp cells with regard to calcium silicate-based cements. Int J Oral Sci. 2014;6:94-8.
199. Lancel S, Hassoun SM, Favory R, Decoster B, Motterlini R, Neviere R. Carbon monoxide rescues mice from lethal sepsis by supporting mitochondrial energetic metabolism and activating mitochondrial biogenesis. J Pharmacol Exp Ther. 2009;329:641-8.
200. Laurent P, Camps J, De Méo M, Déjou J, About I. Induction of specific cell responses to a Ca(3)SiO(5)-based posterior restorative material. Dent Mater. 2008;24:1486-94.
201. Lea FM. The chemistry of cement and concrete,3rd edn. London:Edward Arnold Publishers Ltd, 1970; p. 252.
202. Leal F, De-Deus G, Brandão C, Luna AS, Fidel SR, Souza EM. Comparison of the root-end seal provided by bioceramic repair cements and White MTA. Int Endod J. 2011;44:662-8.
203. Lee JH, Shon WJ, Lee W, Baek SH. The effect of several root-end filling materials on MG63 osteoblast-like cells. J Korean Acad Conserv Dent. 2010;35:222-8.
204. Lehtinen R. Tissue reactions to glass ionomer cement and dental amalgam in the rat. Proc Finn Dent Soc. 1986;82:144-7.
205. Leirskar J, Helgeland K. Toxicity of some dental cements in a cell culture system. Scand J Dent Res. 1977;85:471-9.
206. Lekic P, Rojas J, Tenenbaum H, McCulloch CA. Phenotypic comparison of periodontal ligament cells in vivo and in vitro. J Periodontal Res. 2001;36:71-79
207. Leprince JG, Palin WM, Vanacker J, Sabbagh J, Devaux J, Leloup G. Physico-mechanical characteristics of commercially available bulk-fill composites. J Dent. 2014;42:993-1000.
208. Lin CP, Chen YJ, Lee YL, Wang JS, Chang MC, Lan WH, Chang HH, Chao WM, Tai TF, Lee MY, Lin BR, Jeng JH. Effects of root-end filling materials and eugenol on mitochondrial

dehydrogenase activity and cytotoxicity to human periodontal ligament fibroblasts. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2004;71:429-40.
209. Lin FH, Wang WH, Lin CP. Transition element contained partial-stabilized cement (PSC) as a dental retrograde-filling material. Biomaterials. 2003;24:219-33.
210. Linder L. Reaction of bone to the acute chemical trauma of bone cement. J Bone Joint Surg Am. 1977;59:82–7.
211. Luo Z, Li D, Kohli MR, Yu Q, Kim S, He WX. Effect of Biodentine™ on the proliferation, migration and adhesion of human dental pulp stem cells. J Dent. 2014;42:490-7.
212. Ma J, Shen Y, Stojicic S, Haapasalo M. Biocompatibility of two novel root repair materials. J Endod. 2011;37:793-8.
213. Macnair R, Rodgers EH, MacDonald C, Wykman A, Goldie I, Grant MH. The response of primary rat and human osteoblasts and an immortalized rat osteoblast cell line to orthopaedic materials: Comparative sensitivity of several toxicity indices. J Mater Sci Mater Med 1997;8:105–11.
214. MacPherson MG, Hartwell GR, Bondra DL, Weller RN. Leakage *in vitro* with high-temperature theroplaticized gutta-percha, high copper amalgam and warm gutta percha when used as retrofilling material. J Endod.1989;15: 212-5.
215. Maeda H, Tomokiyo A, Koori K, Monnouchi S, Fujii S, Wada N, Kono K, Yamamoto N, Saito T, Akamine A. An in vitro evaluation of two resin-based sealers on proliferation and differentiation of human periodontal ligament cells. Int Endod J. 2011;44:425-31.
216. Maeno S, Niki Y, Matsumoto H, Morioka H, Yatabe T, Funayama A, Toyama Y, Taguchi T, Tanaka J. The effect of calcium ion concentration on osteoblast viability, proliferation and differentiation in monolayer and 3D culture. Biomaterials. 2005;26:4847-55.
217. Maher WP, Johnson RL, Hess J, Steiman HR. Biocompatibility of retrograde filling materials in the ferret canine. Amalgam and IRM. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1992;73:738-45.
218. Main C, Mirzayan N, Shabahang S, Torabinejad M. Repair of root perforations using mineral trioxide aggregate: a long-term study. J Endod. 2004;30:80-3.
219. Markowitz K, Moynihan M, Liu M, Kim S. Biologic properties of eugenol and zinc oxide-eugenol. A clinically oriented review. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1992;73:729-37.
220. Marshall NJ, Goodwin CJ, Holt SJ. A critical assessment of the use of microculture tetrazolium assays to measure cell growth and function. Growth Regulation. 1999;5:69-84.
221. Masuki K, Nomura Y, Bhawal UK, Sawajiri M, Hirata I, Nahara Y, Okazaki M. Apoptotic and necrotic influence of dental resin polymerization initiators in human gingival fibroblast cultures. Dent Mater J. 2007;26:861-9.
222. Mazumdar D, Ray P, Wang CK, Dhanuka S. An investigation into the irritant properties of some retrograde filling materials-an in vivo study. Journal of Conservative Dentistry 2005;8:4-13.
223. McDonald NJ, Dumsha TC: A comparative retrofill leakage study utilizing a dentin bonding material. J Endod. 1987;13: 224-8.
224. Micromega 2014, available from www.micromega.com
225. Min KS, Chang HS, Bae JM, Park SH, Hong CU, Kim EC. The induction of heme oxygenase-1 modulates bismuth-oxide-induced cytotoxicity in human dental pulp cells. J Endod. 2007;33:1342-6.
226. Mitchell PJ, Pitt Ford TR, Torabinejad M, McDonald F. Osteoblast biocompatibility of mineral trioxide aggregate. Biomaterials. 1999;20:167-73.
227. Modareszadeh MR, Chogle SA, Mickel AK, Jin G, Kowsar H, Salamat N, Shaikh S, Qutbudin S. Cytotoxicity of set polymer nanocomposite resin root-end filling materials. Int Endod J. 2011;44:154-61.
228. Monteiro Bramante C, Demarchi AC, de Moraes IG, Bernadineli N, Garcia RB, Spångberg LS, Duarte MA. Presence of arsenic in different types of MTA and white and gray Portland cement. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2008;106:909-13.
229. Morrow SG, Rubinstein RA. Endodontic surgery. In: Ingle JI, Bakland LK, eds. Endodontics, 5th edn. Ch. 12, Hamilton, Ontario, Canada: BC Decker Inc, 2002: 669–746.
230. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods. 1983;65:55-63.
231. Nagatomo K, Komaki M, Sekiya I, Sakaguchi Y, Noguchi K, Oda S, Muneta T, Ishikawa I. Stem cell properties of human periodontal ligament cells. J Periodontal Res. 2006;41:303-10.
232. Nair PNR. Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. Crit Rev Oral Biol Med. 2004;15:348–81.

233. Nair PN, Duncan HF, Pitt Ford TR, Luder HU. Histological, ultrastructural and quantitative investigations on the response of healthy human pulps to experimental capping with mineral trioxide aggregate: a randomized controlled trial. Int Endod J. 2008;41:128-50.
234. Nakade O, Takahashi K, Takuma T, Aoki T, Kaku T. Effect of extracellular calcium on the gene expression of bone morphogenetic protein-2 and -4 of normal human bone cells. J Bone Miner Metab. 2001;19:13-9.
235. Nakajima H, Hashomoto H, Monma H, Goto M. Properties of alpha tricalcium phosphate polycarboxylic acid complex. Journal of dental research 1986;65,778 (abstract).
236. Nakamura Y, Nomura Y, Arai C, Noda K, Oikawa T, Kogure K et al. Laser capture microdissection of rat periodontal ligament for gene analysis. Biotech Histochem 2007;82:295-300.
237. Ndong F, Sadhasivam S, Lin FH, Savitha S, Wen-Hsi W, Lin CP. The development of iron-free partially stabilized cement for use as dental root-end filling material. Int Endod J. 2012;45:557-64.
238. Nemeth EF, Carafoli E. The role of extracellular calcium in the regulation of intracellular calcium and cell function. Cell Calcium. 1990;11:319-21
239. Nencka D,WaliaH, Austin BP. Histologic evaluation of the biocompability of Diaket. Journal of Dental Research 1995;74,101.
240. Ng YL, Mann V, Rahbaran S, Lewsey J, Gulabivala K. Outcome of primary root canal treatment: systematic review of the literature– Part 2: Influence of clinical factors. Int Endod J. 2008;41:6-31.
241. Nicholls E. Treatment of traumatic perforations of the pulp cavity. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1962;15:603-12.
242. Nicholson JW, Braybrook JH, Wasson EA. The biocompatibility of glass-poly(alkenoate) (Glass-Ionomer) cements: a review. J Biomater Sci Polym Ed. 1991;2:277-85.
243. Nicholson JW. Polyacid-modified composite resins (compomers) and their use in clinical dentistry. Dent Mater. 2007;23:615-22.
244. Nicholson JW, Czarnecka B. The biocompatibility of resin-modified glass-ionomer cements for dentistry. Dent Mater. 2008;24:1702–8.
245. Noda K, Nakamura Y, Kogure K, Nomura Y. Morphological changes in the rat periodontal ligament and its vascularity after experimental tooth movement using superelastic forces. Eur J Orthod. 2009;31:37–45.
246. 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;40:406-11.
247. Osorio RM, Hefti A, Vertucci FJ, Shawley AL. Cytotoxicity of endodontic materials. J Endod. 1998;24:91-6.
248. Oynick J, Oynick T. A study of new material for retrograde fillings. J Endod. 1978;4:203-6.
249. Ozbas H, Yaltirik M, Bilgic B, Issever H. Reactions of connective tissue to compomers, composite and amalgam root-end filling materials. Int Endod J. 2003;36:281-7.
250. Özdemir HO, Ozçelik B, Karabucak B, Cehreli ZC. Calcium ion diffusion from mineral trioxide aggregate through simulated root resorption defects. Dent Traumatol. 2008;24:70-3.
251. Pascon EA, Spångberg LS. In vitro cytotoxicity of root canal filling materials: 1. Gutta-percha. J Endod. 1990;16:429-33.
252. Patel S, Dumsha TC, Sydiskis RJ. Determining periodontal ligament (PDL) cell vitality from exarticulated teeth stored in saline or milk using fluorescein diacetate. Int Endod J. 1994;27:1-5.
253. Pelliccioni GA, Ciapetti G, Cenni E, Granchi D, Nanni M, Pagani S, Giunti A. Evaluation of osteoblast-like cell response to ProRoot MTA (mineral trioxide aggregate) cement. J Mater Sci Mater Med. 2004;15:167-73.
254. Pérez AL, Spears R, Gutmann JL, Opperman LA. Osteoblasts and MG-63 osteosarcoma cells behave differently when in contact with ProRoot MTA and White MTA. Int Endod J. 2003;36:564-70.
255. Pertot WJ, Stephan G, Tardieu C, Proust JP. Comparison of the intraosseous biocompatibility of Dyract and Super EBA. J Endod. 1997;23:315-9.
256. Pistorius A, Willershausen B, Briseño Marroquin B. Effect of apical root-end filling materials on gingival fibroblasts. Int Endod J. 2003;36:610-5.
257. Pitt Ford TR, Andreasen JO, Dorn SO, Kariyawasam SP. Effect of IRM root end fillings on healing after replantation. J Endod. 1994;20:381-5.

258. Pitt Ford TR. Surgical treatment of apical periodontitis. In: Orstavik D, Pitt Ford TR, eds. Essential Endodontology, 5th ed. Oxford: Blackwell Publishing company 2003; Pp. 273-308.
259. Pitt Ford TR, Andreasen JO, Dorn SO, Kariyawasam SP. Effect of Super-EBA as a root end filling on healing after replantation. J Endod. 1995a;21:13-5.
260. Pitt-Ford TR, Torabinejad M, McKendry DJ, Hong CU, Kariyawasam SP. Use of mineral trioxide aggregate for repair of furcal perforations. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 1995b;79:756-63.
261. Pitt Ford TR, Andreasen JO, Dorn SO, Kariyawasam SP. Effect of various sealers with gutta-percha as root-end fillings on healing after replantation. Endod Dent Traumatol. 1996a;12:33-7.
262. Pitt-Ford TR[1], Torabinejad M, Abedi HR, Bakland LK, Kariyawasam SP. Using mineral trioxide aggregate as a pulp-capping material. J Am Dent Assoc. 1996b;127:1491-4.
263. Platt AS, Wannfors K. The effectiveness of compomer as a root-end filling: a clinical investigation. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2004;97:508-12.
264. Poggio C, Lombardini M, Alessandro C, Simonetta R. Solubility of root-end-filling materials: a comparative study. J Endod. 2007;33:1094-7.
265. Porter AE, Patel N, Skepper JN, Best SM, Bonfield W. Effect of sintered silicate-substitutedhydroxyapatite on remodelling process at the bone-implant interface. Biomaterials. 2004;25:3303-14.
266. Porter ML, Berto A, Primus CM, Watanabe I. Physical and chemical properties of new-generation endodontic materials. J Endod. 2010;36:524–8.
267. Proskuryakov SA, Konoplyannikov AG, Gabai VL. Necrosis: a specific form of programmed cell death? Experimental Cell Research 2003;1:1-16.
268. Rajaraman R, Rounds DE, Yen SP, Rembaum A. A scanning electron microscope study of cell adhesion and spreading in vitro. Exp Cell Res. 1974;88:327-39.
269. Ray PD, Huang BW, Tsuji Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. Cell Signal. 2012;24:981-90.
270. Regan JD, Gutmann JL, Witherspoon DE. Comparison of Diaket and MTA when used as root-end filling materials to support regeneration of the periradicular tissues. Int Endod J. 2002;35:840-7.
271. Renvall S. Bone cement and wound healing: an experimental study in the rat. Ann Chir Gynaecol. 1991;80:285–8.
272. Rezende TM, Vieira LQ, Cardoso FP, Oliveira RR, de Oliveira Mendes ST, Jorge ML, Ribeiro Sobrinho AP. The effect of mineral trioxide aggregate on phagocytic activity and production of reactive oxygen, nitrogen species and arginase activity by M1 and M2 macrophages. Int Endod J. 2007;40:603-11.
273. Riss TL, Moravec RA, BS, Niles AL, Benink HA, Worzella TJ and Minor L. Cell Viability Assays. Assay Guidance Manual [Internet]. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004-.2013 May 01.
274. Roberson TM, Heyman HO, Swift EJ. Sturdevant's art and science of operative dentistry. 5th ed. Philadelphia: Mosby; 2006; p. 205-10.
275. Roberts WE, Mozsary PG, Klingler E. Nuclear size as a cellkinetic marker for osteoblast differentiation. Am J Anat. 1982;165:373–384.
276. Rodríguez-Lozano FJ, Serrano-Belmonte I, Pérez Calvo JC, Coronado-Parra MT, Bernabeu-Esclapez A, Moraleda JM. Effects of two low-shrinkage composites on dental stem cells (viability, cell damaged or apoptosis and mesenchymal markers expression). J Mater Sci Mater Med. 2013;24:979-88.
277. Rompen EH, Goffinet GH, Nusgens B. Human periodontal ligament fibroblast behavior on chemically conditioned dentine: an in vitro study. J Periodontol. 1999;70:1144-52.
278. Rud J, Munksgaard EC, Andreasen JO, Rud V, Asmussen E. Retro grade filling with a composite and a dentin bonding agent. I. Endont Dent Traumatol. 1991;7:118-25.
279. Rud J, Rud V, Munksgaard EC. Periapical healing of mandibular molars after root-end sealing with dentine-bonded composite. Int Endod J. 2001;34:285-92.
280. Saidon J, He J, Zhu Q, Safavi K, Spångberg LS. Cell and tissue reactions to mineral trioxide aggregate and Portland cement. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2003;95:483-9.
281. Samuelsen JT, Holme JA, Becher R, Karlsson S, Morisbak E, Dahl JE. HEMA reduces cell proliferation and induces apoptosis in vitro. Dent Mater. 2008;24:134-40.

282. Sanghavi T, Shah N, Shah RR. Comparative analysis of sealing ability of Biodentine and Calcium phosphate cement against MTA as a furcal repair material. National journal of integrated research in medicine. 2013;4:56-60.
283. Savarino L, Cervellati M, Stea S, Cavedagna D, Donati ME, Pizzoferrato A, Visentin M. In vitro investigation of aluminum and fluoride release from compomers, conventional and resin-modified glass-ionomer cements: a standardized approach. J Biomater Sci Polym Ed. 2000;11:289-300.
284. Schedle A, Franz A, Rausch-Fan X, *et al*. Cytotoxic effects of dental composites, adhesive substances, compomers and cements. Dent Mater. 1998;14:429–40.
285. Schembri M, Peplow G, Camilleri J. Analyses of heavy metals in mineral trioxide aggregate and Portland cement. J Endod. 2010;36:1210-5.
286. Schmalz G. Use of cell cultures for toxicity testing of dental materials--advantages and limitations. J Dent. 1994;22 Suppl 2:S6-11.
287. Schmalzried TP, Maloney WJ, Jasty M, Kwong LM, Harris WH. Autopsy studies of the bone-cement interface in well-fixed cemented total hip arthroplasties. J Arthroplasty. 1993;8:179-88.
288. Schröder U. Effects of calcium hydroxide-containing pulp-capping agents on pulp cell migration, proliferation, and differentiation. J Dent Res. 1985;64 Spec No:541-8.
289. Schuster U, Schmalz G, Thonemann B, Mendel N, Metzl C. Cytotoxicity testing with three-dimensional cultures of transfected pulp-derived cells. J Endod. 2001;27:259-65.
290. Schuurs AH, van Amerongen JP. Amalgam. X. Glass-ionomer cement: a biocompatible substitute for amalgam? Ned Tijdschr Tandheelkd. 1993;100:484-8.
291. Scudiero DA, Shoemaker RH, Paull KD, Monks A, Tierney S, Nofziger TH, Currens MJ, Seniff D, Boyd MR. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. Cancer Res. 1988;48:4827-33.
292. Sehajpal SB, Sood VK. Effect of metal fillers on some physical properties of acrylic resin. J Prosthet Dent. 1989;61:746-51.
293. Seltzer S, Sinai I, August D. Periodontal effects of root perforations before and during endodontic procedures. J Dent Res. 1970;49:332–9.
294. Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahim J, Young M, Robey PG, Wang CY, Shi S. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. Lancet. 2004;364:149-55.
295. Septodont 2014; available from http://www.septodont.fr/fichiers_upload/biodentinescientificfile.pdf
296. Shie MY, Ding SJ, Chang HC. The role of silicon in osteoblast-like cell proliferation and apoptosis. Acta Biomater. 2011;7:2604-14.
297. Shie MY, Chang HC, Ding SJ. Effects of altering the Si/Ca molar ratio of a calcium silicate cement on in vitro cell attachment. Int Endod J. 2012;45:337-45.
298. Shon WJ, Bae KS, Baek SH, Kum KY, Han AR, Lee WC. Effects of calcium phosphate endodontic sealers on the behavior of human periodontal ligament fibroblasts and MG63 osteoblast-like cells. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2012;100:2141-7.
299. Shuman IE. Repair of a root perforation with a resin-ionomer using an intentional replantation technique. Gen Dent. 1999;47:392-5.
300. Singer AJ, Clark RA. Cutaneous wound healing. N Engl J Med. 1999;341:738-46.
301. Sletten GBG, Dahl JE. Cytotoxic effects of extracts of compomers. Acta Odontol Scand. 1999;57:316–22.
302. Sogawa K. [Comparative study on cytotoxicity of main components of three luting cements in vitro (author's transl)]. Shika Rikogaku Zasshi. 1981;22:172-86.
303. Soheili Majd E, Goldberg M, Stanislawski L. In vitro effects of ascorbate and Trolox on the biocompatibility of dental restorative materials. Biomaterials. 2003;24:3-9.
304. Sousa CJ, Loyola AM, Versiani MA, Biffi JC, Oliveira RP, Pascon EA. A comparative histological evaluation of the biocompatibility of materials used in apical surgery. Int Endod J. 2004;37:738-48.
305. Souza NJ, Justo GZ, Oliveira CR, Haun M, Bincoletto C. Cytotoxicity of materials used in perforation repair tested using the V79 fibroblast cell line and the granulocyte-macrophage progenitor cells. Int Endod J. 2006;39:40-7.
306. de Souza Costa CA, Hebling J, Garcia-Godoy F, Hanks CT. In vitro cytotoxicity of five glass-ionomer cements. Biomaterials. 2003;24:3853-8.

307. Spangberg L. Biological effects of root canal filling materials. 1. Media for the investigation of the toxic effect of water-soluble substances on human cells in vitro. Odontol Revy. 1969;20:123-32.
308. Stafford GD, Brooks SC. The loss of residual monomer from acrylic orthodontic resins. Dent Mater. 1985;1:135-8.
309. Stanczyk M, van Rietbergen B. Thermal analysis of bone cement polymerisation at the cement-bone interface. J Biomech 2004;37:1803-10.
310. Stoddart MJ. Cell viability assays: introduction. Methods Mol Biol. 2011;740:1-6.
311. Stoward PJ and Pearse AGE. Histochemistry, Theoretical and Applied,Vol. 2, Edinburgh, Churchill Livingstone, 1991.
312. Sun JS, Liu HC, Chang WH, Li J, Lin FH, Tai HC. Influence of hydroxyapatite particle size on bone cell activities: an in vitro study. J Biomed Mater Res. 1998;39:390-7.
313. Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjögren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 1998; 85:86-93.
314. Takita T, Hayashi M, Takeichi O, Ogiso B, Suzuki N, Otsuka K, Ito K. Effect of mineral trioxide aggregate on proliferation of cultured human dental pulp cells. Int Endod J. 2006;39:415-22.
315. Tassery H, Remusat M, Koubi G, Pertot WJ. Comparison of the intraosseous biocompatibility of Vitremer and super EBA by implantation into the mandible of rabbits. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 1997;83:602-8.
316. Tay KC, Loushine BA, Oxford C, Kapur R, Primus CM, Gutmann JL, Loushine RJ, Pashley DH, Tay FR. In vitro evaluation of a Ceramicrete-based root-end filling material. J Endod. 2007;33:1438-43.
317. Tetsch P. Wurzelspitzenresektionen. Munchen, Germany: Carl Hanser Verlag. 1986. p. 96-9.
318. Thomson TS, Berry JE, Somerman MJ, Kirkwood KL. Cementoblasts maintain expression of osteocalcin in the presence of mineral trioxide aggregate. J Endod. 2003;29:407-12.
319. Torabinejad M, Watson TF, Pitt Ford TR. Sealing ability of a mineral trioxide aggregate when used as a root end filling material. J Endod. 1993;19:591-5.
320. Torabinejad M, Smith PW, Kettering JD, Pitt Ford TR. Comparative investigation of marginal adaptation of mineral trioxide aggregate and other commonly used root-end filling materials. J Endod. 1995a;21:295-9.
321. Torabinejad M, Hong CU, McDonald F, Pitt Ford TR. Physical and chemical properties of a new root-end filling material. J Endod. 1995b;21:349-53.
322. Torabinejad M, Hong CU, Pitt Ford TR, Kettering JD. Cytotoxicity of four root end filling materials. J Endod. 1995c;21:489-92.
323. Torabinejad M, Pitt Ford TR, McKendry DJ, Abedi HR, Miller DA, Kariyawasam SP. Histologic assessment of mineral trioxide aggregate as a root-end filling in monkeys. J Endod. 1997;23:225-8.
324. Torabinejad M, Ford TR, Abedi HR, Kariyawasam SP, Tang HM. Tissue reaction to implanted root-end filling materials in the tibia and mandible of guinea pigs. J Endod. 1998;24:468-71.
325. Torabinejad M, Parirokh M. Mineral Trioxide Aggregate: a comprehensive literature review. Part II. Leakage and biocompatibility investigations. J Endod. 2010;36: 190-202.
326. Trevigen 2014, avaliable from http://www.trevigen.com/docs/productSheet_Cell.pdf
327. Tronstad l, Wennberg A: *In vitro* assessment of toxicity of filling materials. Int Endod J. 1980;13:131-8.
328. Trope M, Lost C, Schmitz HJ, Friedman S. Healing of apical periodontitis in dogs after apicoectomy and retrofilling with various filling materials. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 1996;81:221-8.
329. Tuna D, Olmez A. Clinical long-term evaluation of MTA as a direct pulp capping material in primary teeth. Int Endod J. 2008;41:273-8.
330. Tunç ES, Ozer L, Sari S, Cetiner S. Cytotoxic effects of halogen- and light-emitting diode-cured compomers on human pulp fibroblasts. Int J Paediatr Dent. 2009;19:55-60.
331. Tziafas D, Pantelidou O, Alvanou A, Belibasakis G, Papadimitriou S. The dentinogenic effect of mineral trioxide aggregate (MTA) in short-term capping experiments. Int Endod J. 2002;35:245-54.
332. Udoye CI, Jafarzadeh H, Abbott PV. Transport media for avulsed teeth: a review. Aust Endod J. 2012;38:129-36.

333. Uzun IH, Tatar A, Hacimuftuoglu A, Saruhan F, Bayindir F. In vitro evaluation of long-term cytotoxic response of injection-molded polyamide and polymethyle metacrylate denture base materials on primary fibroblast cell culture. Acta Odontol Scand. 2013;71:1267-72.
334. Vahid A, Hadjati J, Kermanshah H, Ghabraei S. Effects of cured dentin bonding materials on human monocyte viability. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2004;98:619-21.
335. Vajrabhaya L, Korsuwannawong S, Bosl C, Schmalz G. The cytotoxicity of self-etching primer bonding agents in vitro. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2009;107:e86-90.
336. Verhoven B, Schlegel RA, Williamson P. Mechanisms of phosphatidylserine exposure, a phagocyte recognition signal, on apoptotic T lymphocytes. J Exp Med. 1995;182:1597-601.
337. von Arx, T. Failed root canals: the case for apicoectomy (periradicular surgery). J. Oral Maxillofac. Surg. 2005a;63,832-7.
338. Wagh AS, Jeong SY, Lohan D, Elizabeth A. Chemically bonded phospho-silicate ceramic. U. S. Patent no. 6,518,212. US Patent & Trademark Office, 2003.
339. Wagh AS, Primus C. Method and product for phosphosilicate slurry for use in dentistry and related bone cements. U. S. Patent no.7,083,672. US Patent & Trademark Office, 2006.
340. Wang M, Yin S, Wang Q, Gao Y, Wang Y, Zhang L. Study of molar furcal perforation repaired with iRoot BP. Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. 2013;31:257-9, 266.
341. Washington JT, Schneiderman E, Spears R, Fernandez CR, He J, Opperman LA. Biocompatibility and osteogenic potential of new generation endodontic materials established by using primary osteoblasts. J Endod. 2011;37:1166-70.
342. Wei W, Qi YP, Nikonov SY, Niu LN, Messer RL, Mao J, Primus CM, Pashley DH, Tay FR. Effects of an experimental calcium aluminosilicate cement on the viability of murine odontoblast-like cells. J Endod. 2012;38:936-42.
343. Weston GD, Moule AJ, Bartold PM. A comparison in vitro of fibroblast attachment to resected root-ends. Int Endod J. 1999;32:444-9.
344. Wikimedia 2014 available from http://en.wikipedia.org/wiki/Flow_cytometry
345. Wilson AD. Resin-modified glass-ionomer cements. Int J Prosthodont. 1990;3:425-9.
346. Witherspoon DE, Gutmann JL, Analysis of the healing response to gutta-percha and Diaket when used as root-end filling materials in periradicular surgery. Int Endod J. 2000;33:37-45.
347. Witherspoon DE, Ham K. One-visit apexification: technique for inducing root-end barrier formation in apical closures. Pract Proced Aesthet Dent. 2001;13:455-60; quiz 462.
348. Wolfson EM, Seltzer S. Reaction of rat connective tissue to some gutta-percha formulations. J Endod. 1975;1:395-402.
349. Yang WK, Ko HJ, Kim MR. Evaluation of the rat tissue reaction to experimental new resin cement and mineral trioxide aggregate cement. Restor Dent Endod. 2012;37:194-200.
350. Yaccino JM, Walker WA, Carnes DL, Schindler WG. , Longitudinal microleakage evaluation of Super-EBA as a root-end sealing material. J Endod. 1999;25:552-4.
351. Yoshimine Y, Akamine A, Mukai M, Maeda K, Matsukura M, Kimura Y, Makishima T. Biocompatibility of tetracalcium phosphate cement when used as a bone substitute. Biomaterials. 1993;14:403-6.
352. Yoshimine Y, Ono M, Akamine A. In vitro comparison of the biocompatibility of mineral trioxide aggregate, 4META/MMA-TBB resin, and intermediate restorative material as root-end-filling materials. J Endod. 2007;33:1066-9.
353. Yuan Z, Peng B, Jiang H, Bian Z, Yan P. Effect of bioaggregate on mineral-associated gene expression in osteoblast cells. J Endod. 2010;36:1145-8.
354. Zanini M, Sautier JM, Berdal A, Simon S. Biodentine induces immortalized murine pulp cell differentiation into odontoblast-like cells and stimulates biomineralization. J Endod. 2012;38:1220-6.
355. Zetterqvist L, Anneroth G, Nordenram A. Glass-ionomer cement as retrograde filling material. An experimental investigation in monkeys. Int J Oral Maxillofac Surg. 1987;16:459-64.
356. Zhang S, Yang X, Fan M. BioAggregate and iRoot BP Plus optimize the proliferation and mineralization ability of human dental pulp cells. Int Endod J. 2013;46:923-9.
357. Zhao M, Xiao G, Berry JE, Franceschi RT, Reddi A, Somerman MJ. Bone morphogenetic protein 2 induces dental follicle cells to differentiate toward a cementoblast/osteoblast phenotype. J Bone Miner Res. 2002;17:1441-51.
358. Zhou HM, Shen Y, Wang ZJ, Li L, Zheng YF, Häkkinen L, Haapasalo M. In vitro cytotoxicity evaluation of a novel root repair material. J Endod. 2013;39:478-83.

359. Zhu Q, Haglund R, Safavi KE, Spangberg LS. Adhesion of human osteoblasts on root-end filling materials. J Endod. 2000;26:404-6.
360. Zmener O, Dominguez FV. Tissue response to a glass ionomer used as an endodontic cement. A preliminary study in dogs. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1983;56:198-205.
361. Zmener O, Cabrini RL. Adhesion of human blood monocytes and lymphocytes to different endodontic cements. A methodological in vitro study. J Endod. 1986;12:150-5.

10. ÖZGEÇMİŞ

25 Haziran 1987 tarihinde Konya'da doğdu. İlköğrenimini Özel İdeal İlköğretim Okulu, orta öğrenimini Özel Gündoğdu Koleji ve lise öğrenimini Konya Karatay Anadolu Lisesi'nde tamamladı. 2004 yılında girmeye hak kazandığı Selçuk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi'nden 2009 yılında mezun oldu. Aynı yıl Selçuk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Endodonti Anabilim Dalı'nda doktora öğrenimine başladı. İngilizce bilmektedir.