

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

YENİ GELİŞTİRİLEN MTA (MİNERAL TRİOKSİT AGREGAT)
MADDESİNİN KEMİK İYİLEŞMESİNDE MANDİBULAR KEMİK
DEFEKTİ MODELİNDE RATLARDA HİSTOPATOLOJİK VE
İMMÜNOHİSTOKİMYASAL YÖNDEN DEĞERLENDİRİLMESİ

Hazırlayan
Arş. Gör. Dt. Hatice TÜRKOĞLU

Danışman
Dr. Öğr. Üyesi Özgür DOĞAN
Dr.Öğr. Üyesi Özlem ÖZDEN AKKAYA

Tez No: 36

2023 – AFYONKARAHİSAR

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

**YENİ GELİŞTİRİLEN MTA (MİNERAL TRİOKSİT AGREGAT)
MADDESİNİN KEMİK İYİLEŞMESİNDE MANDİBULAR KEMİK
DEFEKTİ MODELİNDE RATLARDA HİSTOPATOLOJİK VE
İMMÜNOHİSTOKİMYASAL YÖNDEN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Hazırlayan
Arş. Gör. Dt. Hatice TÜRKOĞLU
DİŞ HEKİMLİĞİNDE UZMANLIK TEZİ

Bu çalışma; Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 22.DUS.004 kodlu proje ile desteklenmiştir.

2023 – AFYONKARAHİSAR

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK SAYFASI

Çalışmamızın etik kurul onayı Afyonkarahisar Kocatepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan (AKUHADYЕК) alınmıştır. (49533702/17 sayılı karar). (EK-1)

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca her konuda klinik ve akademik bilgisini benimle paylaşan, iyi bir pedodontist olmam için her konuda destek veren ve mesleğimi severek yapmamda öncü olan değerli tez danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Özgür DOĞAN’a

Uzmanlık eğitimim boyunca her konuda bilgi ve tecrübesini benimle paylaşan, her zaman yanımda olan değerli hocalarım Dr. Öğr. Üyesi Burcu GÜÇYETMEZ TOPAL’a, Dr. Öğr. Üyesi İsmail Haktan ÇELİK ve Dr. Öğr. Üyesi Mehmet ÜNAL’a,

Tezimin deney aşamasında bilgi ve tecrübeleriyle bana destek olan hocalarım Prof. Dr. Korhan ALTUNBAŞ ve Dr. Öğr. Üyesi Özlem ÖZDEN AKKAYA’a,

Tezimin deney aşamasında yanımda olan, desteğiyle beni yalnız bırakmayan sevgili arkadaşım Arş.Gör. Dt. Melikşah URAL’a

Uzmanlık eğitimim boyunca birlikte çalışmaktan keyif aldığım Pedodonti Anabilim Dalı’ndaki bütün asistan arkadaşlarıma ve tüm yardımcı sağlık personeline,

Uzmanlık eğitimim boyunca birlikte çalışmaktan keyif aldığım Uzm. Dt. Fatma Duygu DERTLİ, Uzm. Dt. Edanur GÖKÇE MEYDAN ve Uzm. Dt. Seher Gözde UĞUR’a,

Uzmanlık eğitim sürecimi güzelleştiren, neşe katan, birlikte olmaktan keyif aldığım sevgili dostlarım Arş. Gör. Dt. Onur ŞAHAR, Arş. Gör. Dt. M.Selim PERÇİN, Arş. Gör. Dt. Sevilcan PERÇİN, Arş. Gör. Dt. Sinan BİLİCİ, Arş. Gör. Dt. Nur PEKTAŞ ve Arş. Gör. Dt. M.Yasin PEKTAŞ’a,

Uzmanlık eğitimine birlikte başladığım her daim yanımda olan, birlikte büyüyüp çokça güldüğüm sevgili dostlarım Uzm. Dt. Melike TIRAŞ ve Uzm. Dt. Ayşenur TANRIKULU’na,

Uzmanlık eğitimim boyunca ve hayatımın her alanında yanımda olan ve olacağına inandığım; Afyon’daki ailem olan sevgili dostlarım Burak CİVELEK ve Uzm. Dt. Beril FALAY CİVELEK’e,

Beni bu günlere getiren, her zaman destekleyen ve yanımda olan annem Emine TÜRKOĞLU, babam Numan TÜRKOĞLU ve çok sevdiğim kardeşlerim Fatma, Semih, Bahadır ve Kerem Can TÜRKOĞLU’na

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

**YENİ GELİŞTİRİLEN MTA (MİNERAL TRİOKSİT AGREGAT) MADDESİNİN
KEMİK İYİLEŞMESİNDE MANDİBULAR KEMİK DEFEKTİ MODELİNDE
RATLARDA HİSTOPATOLOJİK VE İMMÜNOHİSTOKİMYASAL YÖNDEN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Hatice TÜRKOĞLU

Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Pedodonti

Anabilim Dalı Diş Hekimliğinde Uzmanlık Tezi

Eylül 2023

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Özgür DOĞAN

ÖZET

Amaç: Yeni geliştirilen NeoMTA 2 (NuSmile Avalon Biomed, Bradenton, FL) materyalinin kemikle temasında kullanılacak dental prosedürlerde kemik iyileşmesi üzerindeki etkinliğinin incelenmesi amaçlanmaktadır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmada 42 adet Wistar cinsi, ortalama ağırlıkları 200-250 gr arasında değişen, ortalama 6-8 haftalık erkek albino ratlar kullanıldı. Ratlar Kontrol grubu, Membran grubu, MTA grubu, MTA + Membran grubu, Biodentine grubu ve Biodentine + Membran grubu olarak 6 gruba ayrıldı. Ratların sağ mandibulalarında 5 mm boyutunda kritik boyutlu kemik defektleri oluşturuldu ve oluşturulan gruplara uygun olacak şekilde materyaller yerleştirildi. Kontrol grubunda oluşturulan defektler ise boş bırakıldı. Cerrahi operasyondan 3 ay sonra ratlar sakrifiye edildi ve mandibulaları çıkarıldı. Gerekli doku takibi prosedürleri sonrasında Masson-Goldner trikrom boyaması ile histolojik inceleme, Osteopontin (OPN) ve Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF) ekspresyonu ile immünohistokimya incelemesi yapılmıştır.

Bulgular: Yapılan histolojik ve immünohistokimyasal inceleme sonrasında boyanan kesitler mikroskop (Olympus BX50) altında incelendi. İmmünohistokimyasal inceleme sonucunda kontrol grubunda OPN ekspresyonu gözlenmezken, en fazla OPN ekspresyonunun saptandığı grup Biodentine grubu olarak belirlenmiştir. VEGF ekspresyonu değerlendirildiğinde gruplar arasında farklılık gözlenmemiştir. Masson Goldner trikrom boyamada tüm gruplarda yeni hücrelerinin varlığı izlenmiştir.

Sonuç: İncelenen kesitlerde OPN ekspresyonu Biodentine grubunda en fazla bulunmuş olup, NeoMTA 2'nin OPN reaksiyonu orta şiddette gözlenmiştir. NeoMTA 2'nin kontrol grubuyla kıyaslandığında kemik iyileşmesinde başarılı olduğu gözlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: NeoMTA 2, Kemik iyileşmesi, Osteopontin, Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü, İmmünohistokimya, Masson-Goldner

HISTOPATOLOGICAL AND IMMUNOHISTOCHEMICAL EVALUATION OF NEWLY DEVELOPED MTA (MINERAL TRIOXIDE AGGREGATE) IN BONE HEALING IN MANDIBULAR BONE DEFECT MODEL IN RATS

Hatice TÜRKOĞLU

Afyonkarahisar Health Sciences University

Faculty of Dentistry Department of Pediatric Dentistry Specialization Thesis

Supervisor: Assist.Prof. Özgür DOĞAN

ABSTRACT

Objective: It is aimed to examine the effectiveness of the newly developed NeoMTA 2 (NuSmile Avalon Biomed, Bradenton, FL) material on bone healing in dental procedures to be used in contact with bone.

Materials and Methods: In the study, 42 Wistar breed male Wistar albino rats with an average weight of 200-250 g and an average of 6-8 weeks were used. Rats were divided into six groups Control group, Membrane group, MTA group, MTA + Membrane group, Biodentine group and Biodentine + Membrane group. Critical bone defects of 5 mm in size were created in the right mandible of the rats and materials were placed by the groups formed. Defects created in the control group were left blank. Three months after the surgical operation, the rats were sacrificed, and their mandibles were isolated. After the necessary tissue follow-up procedures, histological examination with Masson-Goldner trichrome staining, immunohistochemistry examination with Osteopontin (OPN) and Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) expression were performed.

Results: After histological and immunohistochemical examination, the stained sections were examined under a microscope (Olympus BX50). As a result of the immunohistochemical examination, OPN expression was not observed in the control group, while the group with the highest OPN expression was determined as the Biodentine group. When VEGF expression was evaluated, no difference was observed between groups. The presence of inflammatory cells was observed in all groups in Masson Goldner trichrome staining.

Conclusion: In the examined sections, OPN expression was highest in the Biodentine group, and the OPN reaction of NeoMTA 2 was observed at moderate intensity. It was observed that NeoMTA 2 was successful in bone healing compared to the control group.

Keywords: NeoMTA 2, bone healing, Osteopontin, Vascular Endothelial Growth Factor, immunohistochemistry, Masson Goldner

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	viii
TABLolar DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Kemik Dokusu.....	4
2.1.2. Kemik Doku Çeşitleri.....	8
2.1.3. Kemik İyileşmesi.....	11
2.2. KRİTİK KEMİK DEFEKTİ.....	15
2.3. VEGF	16
2.4. OPN	17
2.5. Mineral Trioksit Agregat (MTA)	18
2.5.1. MTA'nın Kimyasal İçeriği	19
2.5.2. MTA'nın Fiziksel Özellikleri	20
2.5.3. MTA'nın Biyouyumluluğu	22
2.5.4. MTA'nın Sert Doku Oluşturma Potansiyeli İle İlgili Yapılmış Araştırmalar.....	23
2.5.5. MTA'nın Dezavantajları	26
2.5.6. NeoMTA Plus	28
2.5.7. NeoMTA 2	30
2.6. Biodentine	32
2.6.1. Biodentine'in Kimyasal Yapısı	32
2.6.2. Biodentine'in Fiziksel Özellikleri	33
2.6.3. Biodentine'in Biyouyumluluğu.....	35
2.6.4. Biodentine'in Sert Doku Oluşturma Potansiyeli ile ilgili yapılmış araştırmalar .	36
2.7. Kollajen Membran.....	37
3. GEREÇ ve YÖNTEMLER.....	40
3.1. Deney Hayvanları.....	40
3.2. Oluşturulan Çalışma Gruplarının Tanımı.....	40

3.3.	Cerrahi prosedür	41
3.4.	Sakrifikasyon.....	45
3.5.	Dokuların Histolojik Aşama İçin Hazırlanması	45
3.5.1.	Tespit ve Dekalsifikasyon	46
3.5.2.	Doku Takibi.....	46
3.6.	Değerlendirme Yöntemleri.....	49
3.6.1.	Histoloji.....	49
3.6.2.	İmmünohistokimyasal Yöntem	50
4.	BULGULAR	54
5.	TARTIŞMA	69
6.	SONUÇ ve ÖNERİLER.....	83
7.	KAYNAKLAR.....	84
EKLER.....		111

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

MTA	Mineral Trioksit Agregat
BMP	Kemik Morfogenik Protein
HA	Hidroksiapatit
VEGF	Vasküler Endotel Büyüme Faktörü
RANKL	Reseptör Aktivatör Nükleer Kappa-B Ligandı
OPN	Osteopontin
HIF	Hipoksi ile İndüklenebilir Faktör
OCN	Osteokalsin
BSP	Kemik Sialoprotein
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
IRM	Intermediate Restoratif Materyal
ISO	Uluslararası Standartlar Teşkilatı
IL	İnterlökin
PDL	Periodontal Ligament
CEM	Kalsiyumla Zenginleştirilmiş Karışım
NaOCl	Sodyum Hipoklorit

EDX Analizi	Enerji Dağıtıcılı X Işını Analizi
ESEM	Çevresel Taramalı Elektron Mikroskopi
YDR	Yönlendirilmiş Doku Rejenerasyonu
YKR	Yönlendirilmiş Kemik Rejenerasyonu
PBS	Fosfat Tamponlu Solüsyon
KBD	Kritik Boyutlu Kemik Defekti
ALP	Alkalen Fosfataz
MPa	Megapascal
Ark.	arkadaşları
Mm	milimetre
Ca ⁺²	Kalsiyum
PO ₄ ⁻³	Fosfat
H&E	Hematoksilen Eozin

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 2.1: NeoMTA plus ve NeoMTA 2 içerikleri

Tablo 3.1: Deney grupları ve denek sayısı dağılımı

Tablo 3.2: Dokular ve boyanan renk



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1: Operasyon sahasının povidon iode solüsyonu ile asepsisinin sağlanması

Şekil 3.2: Deri ve deri altı ensizyonu

Şekil 3.3: Kritik boyutlu kemik defektinin hazırlanması

Şekil 3.4: MTA'nın kritik boyutlu kemik defektine yerleştirilmesi

Şekil 3.5: Operasyon sahasının 4/0 ipek iplikle suture edilmesi

Şekil 3.6: Sakrifikasyon sonrası toplanan hemi-mandibula örneği

Şekil 3.7: Tespit solüsyonuna alınan mandibula örneği

Şekil 3.8: Dehidratasyon işlemi için dokuların alkol serilerinden geçirilmesi

Şekil 3.9: Parafin blok hazırlanan dokuların görüntüsü

Şekil 3.10: Hazırlanan parafin bloklardan mikrotom ile kesit alınması

Şekil 3.11: Alınan kesitlerin jelatinli lamlara çekilmesi

Şekil 4.1: *da*: Defekt alanı, *siyah ok*: kemik doku, *sarı ok başı*: yangı hücresi, *sarı ok*: eritrosit

Şekil 4.2: *da*: Defekt alanı, *siyah ok*: kemik doku, *kuyruklu ok*: osteoblast

Şekil 4.3: *da*: Defekt alanı, *siyah ok*: kemik doku, *siyah ok başı*: materyali çevreden bağ doku, *kuyruklu ok*: osteoblast, *kırmızı yıldız*: MTA materyali, *sarı ok başı*: plazma hücresi, *yeşil ok başı*: makrofaj, *kırmızı ok başı*: osteoklast

Şekil 4.4: *da*: Defekt alanı, *siyah ok*: kemik doku, *kuyruklu ok*: osteoblast, *kırmızı yıldız*:

Biodentine materyali, *sarı ok başı*: plazma hücresi, *daire*: bağ doku ile parçalara ayrılmış

Bioedentine alanları

Şekil 4.5: *Siyah ok*: kemik doku, *kuyruklu ok*: osteoblast, *kırmızı yıldız*: MTA materyali,

kuyruklu ok: osteoblast, *siyah ok başı*: materyali çevreleyen bağ doku, *sarı ok başı*: plazma

hücresi, *ince siyah ok*: materyal içerisine uzanan bağ doku, *baklava dilimi*: yağ hücreleri

Şekil 4.6: *Siyah ok*: kemik doku, *kuyruklu ok*: osteoblast, *kırmızı yıldız*: MTA materyali,

siyah ince ok: materyal içine uzanan bağ doku, *sarı ok*: plazma hücresi, *yeşil ok başı*:

makrofaj, **artı işareti:** yeni oluşan kemik adası, **daire:** bağ doku ile parçalara ayrılmış biyodentin alanları

Şekil 4.7: Kontrol grubuna ait VEGF immunreaksiyonu

Şekil 4.8: Membran grubuna ait VEGF immunreaksiyonu

Şekil 4.9: MTA grubuna ait VEGF immunreaksiyonu

Şekil 4.10: Biyodentine grubuna ait VEGF immunreaksiyonu

Şekil 4.11: MTA-Membran grubuna ait VEGF immunreaksiyonu

Şekil 4.12: Biyodentine-Membran grubuna ait VEGF immunreaksiyonu



YENİ GELİŞTİRİLEN MTA (MİNERAL TRİOKSİT AGREGAT) MADDESİNİN KEMİK İYİLEŞMESİNDE MANDİBULAR KEMİK DEFEKTİ MODELİNDE RATLARDA HİSTOPATOLOJİK VE İMMÜNOHİSTOKİMYASAL YÖNDEN DEĞERLENDİRİLMESİ

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Güncel pedodonti pratiğinde, süt dişleri ve daimi dişlerde furkasyon veya kök perforasyonlarının tamiri, apeksifikasyon tedavisi gibi tedavilerde kullanılan materyaller zaman zaman periradiküler dokular ve alveolar kemikle temas edebilmektedir. Kullanılan bu materyallerin periradiküler dokular ve kemik iyileşmesi üzerindeki etkileri tedavi başarısını da etkilemektedir.

Mineral Trioksit Agregat (MTA) güncel diş hekimliğinde geniş bir kullanma alanına sahiptir. 1990'lı yılların başında diş hekimliği uygulamalarına dahil olan MTA günümüzde özellikle endodonti ve pedodonti pratiğinde rutin kullanıma sahip bir materyaldir. İyi biyouyumluluk göstermesi, sızdırmazlık özelliğinin iyi olması, pulpa ve periradiküler dokularda rejenerasyon potansiyelini artırması MTA'nın çoğu dental tedavide altın standart olarak kabul edilmesini sağlamıştır. Piyasaya sürüldüğü yıllarda kök ucu dolgu materyali olarak kullanılan MTA sahip olduğu rejeneratif potansiyeli sayesinde günümüzde direk pulpa kuafajı, amputasyon tedavisi, apeksifikasyon tedavisi, kök ve furkal perforasyon tamiri gibi diş hekimliği uygulamalarında başarıyla kullanılmaktadır.

MTA'nın sertleşme reaksiyonu sonucunda kalsiyum oksit oluşturduğu ve bu maddenin doku sıvılarıyla temasıyla da kalsiyum hidroksit oluşturduğu bilinmektedir. MTA'nın kalsiyum hidroksit oluşumunu uyarması ve aynı zamanda sahip olduğu yüksek pH sebebiyle MTA'nın sert doku oluşumunu uyaran bir materyal olduğu bilinmektedir (1,2). Pulpa ile temasında dentin oluşumunu indüklediği bilinen MTA aynı zamanda sement ve yeni kemik oluşumunu da uyarmaktadır (1,3).

MTA'nın sağladığı avantajların yanında uzun sertleşme süresi, manipülasyonunun zor olması ve dişlerde renklenmeye sebep olması gibi bazı dezavantajları vardır. Araştırmacılar yıllar içerisinde bu sorunun çözümüne yönelmiş, farklı MTA'lar piyasaya sürülmüştür. Piyasaya ilk sürülen ProRoot MTA'nın sahip olduğu gri renkten ötürü dişlerde renklenme yaptığına kanaat getirilmiş, yerine beyaz renkli ProRoot MTA üretilmiştir. Zamanla MTA içeriğindeki bizmut oksitin renk değişikliği yapan ana element olduğu tespit edilmiş, bu yüzden bu içerik değiştirilmeye çalışılmıştır.

NeoMTA Plus ve sonrasında gelişmiş formu olarak piyasaya sunulan NeoMTA 2 dişte renklenmeye sebebiyet veren bizmut oksit yerine radyoopasite verici ajan olarak tantalum oksit içerir. Aynı zamanda üretici firmanın iddialarına göre geliştirilmiş formülü kolay manipülasyonuna ve yerleştirilmesine olanak sağlamaktadır. Değişen toz likit oranına göre farklı kıvamlarda hazırlanabildiği için farklı endikasyonlarda da kullanımı mümkündür. NeoMTA Plus'ın farklı çalışmalarda farklı endikasyonlar için başarılı olduğu bildirilse de NeoMTA 2'nin piyasaya yeni sürülen bir materyal olması nedeniyle hakkındaki literatür bilgisi sınırlıdır.

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

Yeni alveolar kemik oluşumunu içeren periodontal rejeneratif tedavilerde yönlendirilmiş doku rejenerasyonu prosedürleri ön plana çıkmaktadır. Kemik iyileşmesi istenen bölgede seçilen hücrelerin çoğalmasına ve bu sayede yeni oluşan dokunun doğasının belirlenmesine yönelik olan bu tedavi; iyileşme bölgesinde epitel hücrelerinin çoğalmasını engellemek amacıyla defekt bölgesinin bir membran

aracılığıyla örtülmesini içermektedir. Kollajen membranlar bu amaçla kullanılan materyaller arasında oldukça popülerdir.

Bu çalışmada yeni geliştirilen NeoMTA 2 materyalinin kök veya furkal perforasyonlarda kemikle temasında kullanımının kemik iyileşmesi üzerindeki etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Wistar ratlarda oluşturulan kritik boyutlu kemik defektlerine yerleştirilen materyallerin kemik iyileşmesi ve sert doku oluşumu üzerindeki etkilerinin incelenmesi, böylelikle yeni geliştirilen NeoMTA 2'nin kemikte temasında gözlenecek değişikliklerin literatüre katkı sağlaması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kemik Dokusu

2.1.1 Kemik histolojisi

Kemik dokusu; üzerine yapışan kasların düzenli kasılması ile vücudun hareket etmesini sağlayan ve organizmanın ana iskelet yapısını oluşturan, gelişmiş bir kanlanma ve innervasyona sahip özel bir bağ dokusudur. Hayati önem taşıyan organları koruyup destek olmakla birlikte yapısında kan hücrelerinin yapımını sağlayan kemik iliğini bulundurur. Kalsiyum, fosfat ve diğer temel iyon ve minerallerin vücuttaki konsantrasyonunun sağlanmasında bir depo olarak görev alır. Vücudun en sert dokularından biri olmakla birlikte; üzerine gelen fizyolojik ve mekanik uyarılar doğrultusunda kendini yeniden şekillendirebilen esnek ve dinamik bir yapıdadır (4).

2.1.1.1. Kemik Zarları

Kemiğin dış yüzeyinde dıştan sıkı bağ dokusu ile çevrelenmiş olan, içi osteoprogenitör hücreleri barındıran periosteum adı verilen tabaka bulunur (5). Eklem yüzeyleri hariç tüm kemiği dıştan çevreleyen bu tabaka vasküler, konnektif bağ dokusudur. Kemiğe destek sağlayarak gelişiminde, beslenmesinde ve tamirinde önemli rol oynar. Sharpey lifleri adı verilen kollajen uzantıları ile kemiğe sıkıca bağlanır. Periosteum, dışta fibröz tabaka ve içte osteojenik tabaka olarak adlandırılan iki tabakadan oluşmaktadır. Dış tabakada kemik metabolizmasında rol alan damarlar ve lenfatikler bulunmaktadır. İç tabaka ise gevşek bağ dokusu yapısında olup yeni kemik yapımını sağlayan hücreleri içermektedir (4,6,7).

Kemik iliği boşluğu ve kompakt kemiğin kanal sistemleri ince bir bağ dokusu olan endosteum ile örtülüdür. Endosteum tek tabakalıdır ve periosteumdan daha incedir. Osteoprogenitör hücreler ve osteoblastlardan oluşur (5). Kemik doku ve kan yapım hücrelerini yapabilme özelliği vardır (8).

Kemik, hücreler arasında kalsifiye olan kemik matriksi içinde dizilim gösteren hücrelerden oluşur. Kemikle ilişkili çok sayıda hücre mevcut olmasına rağmen bunların içinde kemik üretimi, yıkımı ve yapımını düzenlemede özelleşmiş

olan hücre tipleri ön plana çıkmaktadır. Bunlar; osteositler, osteoblastlar, osteoklastlar ve osteoprogenitör hücrelerdir (4).

2.1.1.2. Kemik Hücreleri

Osteoprogenitör Hücreler

Embriyonik mezenkimal hücrelerden köken alan osteoprogenitör hücreler kemikteki çoğalma ve farklılaşma kapasitesine sahip kök hücrelerdir. Havers kanallarını çevreleyen endosteum ve periosteumun hücreden zengin iç tabakasında bulunan bu hücreler iğsi bir şekle sahiptir (4,6,7).

Osteoprogenitör hücreler, yaşamları boyunca canlılıklarını devam ettirebilmektedir (9). Kemik büyümesinde, travma sonucu kemik zedelenmesi ve kemik tamirinde aktif hale gelen bu hücreler mitotik aktivite ile kemik morfojenik proteini (BMP) aracılığıyla osteoblastlara dönüşürler. Kemik tamir mekanizmasında osteoklastlara da dönüşebilirken görevleri tamamlandığında inaktif halde bulunurlar (10,11,12).

Osteoblastlar

Osteoprogenitör hücrelerden köken alan osteoblastlar, kübik ya da silindirik şekle sahip yaklaşık 20-30 µm büyüklüğündeki hücrelerdir. Kemik hücrelerinin toplamda %4 -6'sını oluşturur (4,13). Kemik yüzeylerinde yan yana tek katlı epitel hücreleri gibi dizilim gösteren osteoblastlar, matriks sentezi yaparken aktif durumdadır ve kübikten prizmatığe kadar değişik şekillerde bulunabilir. Aktif haldeki osteoblastlar bazofilik sitoplazmaya sahiptirler. Matriks sentezi azalan aktif osteoblast ya düzleşerek bone-lining hücrelerine dönüşüp kemiğin yüzeyinde kalmaya devam eder. Mevcut kemik matriksi ile temasta olan yüzeylerinden salgılanan osteoid adı verilen demineralize matriks tabakası ile çevrenip osteosit haline dönüşür ya da ortadan kaybolur (4,14).

Osteoblastlar, kemik matriksinin organik kısımlarını sentezlemek ve sekresyonunu yapmakla görevli hücrelerdir (4,14). Osteoblast hücrelerinin ürettiği kollajenden zengin bu tabakaya osteoid adı verilir (15). Oluşan bu tabakanın mineralizasyonu da osteoblast hücrelerinin sorumluluğundadır. Osteoblast hücreleri

tarafından sentezlenen osteokalsin (OCN) ve osteoblastların hücre zarlarından salgılanan alkalen fosfataz (ALP) da mineralizasyonda önemli bir yere sahiptir (16).

Osteoblastlar salgıladıkları sitokinler aracılığıyla osteoklast rezorpsiyonuna da aracılık ederler (4,14). Bu olayın mekanizması osteoblast membranında bulunan paratroid hormon reseptörleri sayesinde olmaktadır. Paratroid hormonunun bu reseptörlere bağlanması sonucunda kemik yıkımında görevli Reseptör Aktivatör Nükleer Kapp-B Ligandı (RANKL) ekspresyonunu artırırken, kemik yıkımını engelleyen osteoprotegerin proteininin sentezi bloke olur. Parathormon etkisiyle bu hücreler kemik yüzeyini osteoklastların yapışması için uygun bir ortam haline getirirler (5,7).

Osteositler

Osteoblastlardan köken alan osteositler, olgun kemik içinde sayıca en çok bulunan hücrelerdir. Kemik hücrelerin %90'ından fazlasını osteositler oluşturur (14). Kemik matriksindeki lakuna isimli boşluklarda bulunurlar. Her bir lakunada bir adet osteosit, bu osteositin uzantıları ve beraberinde az miktarda kireçlenmiş olan matriks vardır (4). Osteositler kanalikül adı verilen ince kanalcıklar ile birbirleriyle bağlantılıdır. Kanaliküller içinde bulunan komşu hücre uzantıları oluklu bağlantılar (gap junction) ile bağlanırlar ve kemik içi hücre ağı oluştururlar. Oluşturulan bu kemik içi hücre ağı aracılığı ile hücreler arası molekül geçişi sağlanır (4,7).

Osteositler kemiğin canlılığı için gerekli maddeleri salgılar (5). Kemik onarımından sorumlu olan bu hücrelerin matriks sentezi ve lokal matriks rezorpsiyon yeteneği bulunmaktadır. Bu hücreler aktif olarak kemik matriksinin bakımından sorumlu olup, ölümlerini takiben matrikste erime görülür (4). Osteositlerin hemostatik mekanizmayı düzenlemek için kemiğin mineral yapısını çözerek kalsiyumun kemiklerden kana verilmesini sağlayan metabolik görevleri de vardır (17,18). Hücre dışı kalsiyum ve fosfat iyon konstrasyonunun düzenlenmesinde görev alırlar (12).

Osteoklastlar

Diğer kemik hücrelerinin aksine osteoprogenitör kökenli olmayan osteoklastlar kemik iliğindeki monosit-makrofaj projenitör hücrelerden köken alırlar

(19). Bu hücreler aktif fagositoz yapmamalarına rağmen, mononükleer fagositer sisteme dahil edilmiştir. Çok çekirdekli, dallanmış yapıda bulunan, hareketli ve büyük (150 mikron) hücrelerdir (19). Kemikte Howship lakünası adı verilen boşlukta bulunan osteoklast hücreleri, kemik matriksine bakan yüzlerde hücre membranının katlanması sonucu oluşan fırçamsı katlantılara sahiptir. Bu uzantılar hücre yüzeyinin genişletilmesinde ve kemik rezorpsiyonunda mikro çevrenin oluşumunda rol oynamaktadır (7,19).

Osteklastlar, kemiğin fizyolojik şekillenmesinde, yeniden yapılanmasında, kemik iyileşmesinde osteoblastlarla birlikte görev alırlar (20). Osteoklast hücreleri kollajenaz ve diğer proteolitik enzimleri salgıladıklarından kemik rezorpsiyonundan sorumludurlar (4,14,19). Bu enzimlerin hedef kemik matriksine bağlanması ile rezorpsiyona sebep olan, pH'ı yaklaşık 3.5 olan asidik bir çevre meydana gelir. Böylece kalsifiye olmuş matriksi çözerek serbest hale getirirler. Ayrıca kemik rezorpsiyonu sırasında meydana gelen atıkların da ortadan kaldırılmasını sağlarlar (4,21).

Osteoklast hücreleri kemiğin remodelasyon sürecinde kemik mineral yapısının çözünmesini sağlayarak kalsiyumun kemikten kana verilmesinde görev alır ve vücudun kalsiyum dengesinde de rol oynarlar (22, 23).

2.1.1.3. Kemik Matriksi

Hacimsel olarak kemik dokusunun %90'ından fazlasını oluşturan kemik matriksi esas olarak organik ve inorganik komponentlerden oluşmaktadır (14,24).

İnorganik matriks

Kemik matriksinin kuru ağırlığının yaklaşık %65'ini oluşturur (19). Kemiğin sertliği, gücü, kompresyon güçlerine karşı dirençten sorumlu olan inorganik matriks aynı zamanda iyon deposu olarak da kemik dokuda görev alır (14).

Hidroksiapatit kristalleri (HA) ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) şeklinde olmak üzere bol miktarda kalsiyum ve fosfor içerir. Ek olarak bikarbonat, sitrat, magnezyum, potasyum ve sodyum da bulunduran matriks Tip I kollajen lifleri boyunca uzanır

(19). Hidroksiapatit kristallerin üzerinde su ve iyonlardan oluşan, hidrasyon kabuğu adı verilen vücudun sıvı-iyon dengesini sağlayan bir tabaka bulunmaktadır (12,19).

Hidroksiapatit kristallerinin kemiği oluşturan kollajen ile birlikteliği kemiğin sertliği ve dayanıklılığını oluşturan esas etmendir. Örneğin kemik doku dekalsifiye edildiğinde normal şeklini korur ancak oldukça esnek ve bükülebilir bir hal alır. Organik kısım kemikten uzaklaştırıldığında ise kemik şeklini yine korur ancak bu kez oldukça kırılgan bir hal alır (19).

Organik Matriks

Kemik kuru ağırlığının %35'ini organik matriks oluşturmaktadır. %90 Tip I kollajen liflerinden oluşan organik kısım; değişik oranlarda kondroitin sülfat, keratan sülfat, hyaluronik asitten zengin proteoglikanları ve kollajen olmayan proteinleri içermektedir (7,14). Tip I kollajen diğer kollajenlerden özgün aminoasit yapısı ve nispeten daha büyük fibril yapısı ile ayırt edilebilir (14).

Organik matriks de osteoblastlarca sentezlenen kalsiyum bağlayıcı glikoproteinler olan osteonektin ve osteokalsinden fazla miktarda bulunmaktadır. Bu glikoproteinler ile matriks veziküllerindeki hücrelerden salgılanan fosfatazlar organik matriksin mineralizasyonunda görev alırlar (25).

2.1.2. Kemik Doku Çeşitleri

Kemik dokusu mikroskobik olarak primer (birincil) ve sekonder (ikincil) olmak üzere iki farklı tipte incelenmektedir (26).

Primer kemik; embriyolojik gelişim sürecinde ilk ortaya çıkan kemik türüdür. Olgunlaşmamış liflere sahiptir. Primer kemik kalıcı değildir ve erişkinlerde yerini sekonder (ikincil) kemiğe bırakır (27).

Sekonder kemik ise; lameller halinde organize olmuş kollajen lif dağılımının tersine; rastgele ve değişik yönlere dağılmış ince kollajen lifleri ile tanınır (19,28).

2.1.2.1. Primer kemik dokusu

Primer kemik dokusu olgunlaşmamış kemik, nonlameller kemik (Woven, reticulated) olarak da adlandırılır. Prenatal gelişme, büyüme ve kemik iyileşmesi sırasında kan damarlarının yakınında bulunan osteoprogenitör hücreler tarafından üretilir. Primer kemik embriyolojik gelişim sırasında, kırıkta ve diğer travmalardaki tamir olaylarında ilk üretilen kemik türüdür. Primer kemik iyileşme sürecinde kallus oluşumunu sağlar ve sonrasında remodelling süreci ile kompakt veya spongioz kemiğe dönüşür (25,29). Sekonder kemiğe oranla daha fazla osteosit ve daha az mineral içerir (27,30). Erişkinlerde kraniumdaki eklemlerde, diş alveollerinde ve tendonların kemiğe yapıştığı alanlar gibi yerler haricinde geçici bir kemik yapısıdır (31). Erişkinlerde temporal kemiğin yapısında, kafatası sutur bölgesinde, diş çevreleyen alveolar kemikte ve tendonların kemik doku ile birleştiği yerlerde bulunmaya devam ederler (32).

2.1.2.2. Sekonder kemik dokusu

Lameller yapıda bulunan sekonder kemik, primer kemik dokusuna göre daha kalsifiye ve daha güçlü yapıdadır. Primer kemik dokusunda dağınık halde bulunan osteositlerin primer kemik dokusunda dağınık, sekonder kemik dokusunda ise komşu lameller aralarına sıkışmış halde bulunurlar. Her lamelde bulunan kollajen fibriller birbirine paralel uzanır; fakat komşu lamellerdeki kollajen fibrillere çapraz yönde ve spiraller yaparak seyreder. Fibrillerin oluşturduğu bu özel seyir sekonder kemiğe dayanıklılık kazandırır. Hem primer hem de sekonder kemik dokularında HA kristalleri, çoğunlukla kollajen fibrillerin üzerlerine yığılmıştır. Bu durum kemik dokusunun sertliğini sağlamada önemli bir rol oynar (33). Sekonder kemik dokusu kortikal kemik (kompakt, lameller) ve spongioz kemik (süngerimsi, kansellöz) olmak üzere iki yapıda bulunmaktadır (34,35).

Spongioz kemik

Spongioz kemik, trabeküler kemik veya kansellöz kemik olarak da adlandırılır. Uzun kemiklerin epifiz bölgesinde, kortikal kemiğin iç yüzünde görünürken yassı kemiklerde ise iki kortikal tabaka arasında bulunmaktadır. Spongioz kemik birbiriyle anastomoz yapan ince kemik trabeküllerinden oluşmuştur.

Bu trabeküller yapı kemik iliği ile dolu şekilsiz boşluklardan oluşmaktadır ve bu boşluklarda damarsal yapı içermez (4,36).

Kemik hücreleri besin maddelerini stoplazmik uzantılarıyla kan damarlarınca zengin olan kemik iliğinden almaktadır (34). Spongioz kemik kemiğin metabolik faaliyetlerinin düzenlenmesinde rol almaktadır. Bu, kemik gelişme periyodunda oluşan ilk kemiktir (37). Korikal kemiğe göre yaklaşık 8 kat fazla kemik yüzeyi oranına sahip olan spongioz kemik bu sayede osteoblastik aktiviteye sahip hücrelere daha fazla ulaşabilmektedir (35).

Kortikal Kemik

Lameller kemik olarak da bilinen kortikal kemik dokusu, nonlameller kemikten yeniden yapılanma sonrasında oluşmaktadır (38,39). Kortikal kemik tüm kemiklerin dış yüzeyinde bulunmaktadır. Kortikal kemik dokusu uzun kemiklerin dış yüzeylerini, yassı kemiklerin ise iç ve dış tabakalarını oluşturmaktadır (40), (41).

Kortikal kemiğin ana yapısını osteon veya Havers sistemi adı verilen yapılar oluşturmaktadır. Osteon, kemiğin uzun aksına paralel seyreden, merkezinde damar ve sinir paketi bulunan silindirik şekilli ünitelerden oluşmaktadır (39). Kompakt kemiğin enine kesitlerinde Havers kanalları (kan damarı kanalları) dairesel şekilde görülür. Komşu osteonları birbirine bağlayan Volkmann kanalları ise dik veya oblik şekilde seyreder (42). Kemik matriksi ve hücrelerini besleyen vasküler damarlar kemik yüzeyindeki kanallardan Volkmann kanallarına ilerler. Buradan havers kanallarına sonrasında da dallanarak iç bölgedeki kanal ve boşluklara ulaşırlar (19). Kemik matriksi ve hücrelerinin beslenmesi bu şekilde sağlanmaktadır. Ayrıca osteonların sıkı dizilimi kortikal kemiğin mekanik gücünü belirlemektedir (29,43).

Vital organları koruyan kompakt kemik aynı zamanda iç dengenin oluşması için uygun bir ortam oluşturur (44). Kompakt kemikteki trabeküller ise kortekse dik açı ile konumlandıklarından dışarıdan gelen fiziksel kuvvetlere yapısal olarak karşı koyma gücü sağlarlar. Aynı zamanda trabeküler kemik internal endosteal katmanda, devamlı olarak yeniden yapılanma sağlamaktadır (45,46).

2.1.3. Kemik İyileşmesi

Yaralanma sonucu birbiriyle ilişkili hücresel, humoral ve vasküler olaylar sonucunda hücreye yapı ve fonksiyonunu tekrar kazandıran doku cevabı, iyileşme olarak tanımlanır. Kemik; bir matrikste entegre olmuş metabolik ve biyolojik olarak aktif hücrelerden oluşmuş, dinamik bir dokudur. Bu sebeple, kemikte kırık hattında ve defekt sahasında çok sayıda biyokimyasal, biyomekanik, hücresel, hormonal ve patolojik reaksiyon gerçekleşir (47,48). Büyüme faktörleri, sitokinle ve sinyal molekülleri de doku ve hücre çoğalmasında görev almaktadır (49).

Kemik dokusunun iyileşmesi temel olarak bağ doku iyileşmesidir (50). Kemik dokusunun iyileşmesi geçirdiği yaralanmaya göre rejenerasyon ve tamir olaylarını içerir. Yaralanmış dokunun orijinal dokuya fonksiyonel ve yapısal olarak benzemeyen bir doku oluşturarak iyileşmesine ‘tamir’ denir. Organizmada yaralanmış dokular fibröz skar oluşumu ile tamir olmaktadır. Yapı ve fonksiyonun tam olarak restorasyonu ise doku rejenerasyonu olarak tanımlanır (51). Örneğin stabilize bir yeşil ağaç kırığında rejenerasyon şeklinde olurken, kemikteki daha geniş bir defekt ise tamir ile iyileşir (52).

Kemik dokusunun iyileşmesi, primer ve sekonder olmak üzere iki şekilde gerçekleşmektedir; bu mekanizmalar birbiriyle ilintili biyolojik olayları kapsamaktadır. Primer (doğrudan) kemik iyileşmesinde defekt bölgesinde herhangi bir kallus oluşumu görülmez, iyileşme intramembranöz kemikleşme ile gerçekleşmektedir. Sekonder (dolaylı) kemik iyileşmesinde ise defekt bölgesinde oluşan kallus ile hareketsizlik sağlar ve iyileşme endokondral kemikleşme ile gerçekleşmektedir (53).

Kemik dokusunun iyileşmesinde histolojik olarak birbirinden keskin sınırlar ve zamanlamalarla ayrılamayan üç aşamada incelenmektedir (54);

- Enflamasyon (yangı) evresi
- Reperasyon (onarım) evresi
- Remodeling (yeniden şekillenme) evresi

Enflamasyon (Yangı) Evresi

Diğer doku travmalarında olduğu gibi kemik doku travmalarında da verilen ilk yanıt enflamasyondur. Travma sonrası bölgedeki kan damarlarında ilk aşamada vazokonstriksiyon, sonrasında ise mast hücrelerinin etkisiyle vazodilatasyon meydana gelir. Böylece lenfositler, monositler ve polimorf çekirdekli lökositler gibi savunma elemanları yara bölgesine ulaşır. Bu bölgeye sıvı geçişinin de artmasından dolayı ödem meydana gelir. Aynı zamanda yara bölgesine ulaşan pıhtılaşma faktörleri ve trombositler periost altında pıhtı oluşturarak birkaç gün içinde hematoma oluşmasına neden olur. Etrafındaki yumuşak doku sahasıyla sınırlanan hematoma hipoksi - asidik bir ortama sahiptir. Onarım hücreleri hematoma içerisinde organize olur ve hematoma defekt iyileşmesinde görevli faktörler için rezervuar görevi görür. Bölgede kanamanın durması ve pıhtı oluşumunun sağlanması için trombotik faktörler salınır ve buraya trombosit göçü başlar. Hematoma içerisinde nekrotik pıhtı oluşumunu sağlamak için fibrin depolanır (55,56). Biriken fibrin yapı içinde zengin kapiller ağ gelişir ve fibroblastların kollajen sentezlemesiyle granülasyon dokusu meydana gelir. Bölgeye gelen osteoklast ve makrofajlar nekrotik hasarlı dokuları lenfositlerin fagositik aktivitesiyle ortamdan uzaklaştırır (57,58). Makrofajlar aynı zamanda yeni doku oluşumu sırasında defekt alanına ulaşması gereken büyüme faktörleri ve sitokinlerin ortama salınmasında görev alır (59,60).

Aynı zamanda yeni doku oluşumu aşamasında, mezenkimal hücrelerin defekt alanına göçünü ve farklılaşmasını sağlayacak olan büyüme faktörleri ve sitokinler, makrofajlar tarafından enflamasyonu bölgesine salınırlar (59,60).

Reperasyon (Onarım) Evresi

Granülasyon dokusu içinde biriken ve hızla bölünen mezenkimal hücreler fibroblast, kondroblast ve osteoblastlara dönüşür. Fibroblastlar kollojen lifleri, osteoblastlar spongioz kemiğin organik matriksini, kondroblastlar ise glikozaminoglikanları oluştururlar. Sonrasında mineralizasyon başlar. Kollojen lifler, glikozaminoglikanlar, glikolipit ve glikoproteinlerin oluşturduğu ekstraselüler matriks sonrasında fibrokartilaj kallusa dönüşür. Oluşan kemik matriksi ve kırıkta sistem yumuşak kallus oluşumuyla karakterizedir.

Matriks içerisinde yer alan kondroblastların hipertrofisiyle lakünalar meydana gelir. Lakünalar sayesinde kılcal damar ve osteoblastların bölgeye ulaşabileceği bir ortam oluşur. Osteoblast ve kondroblastlar yavaşça mineralize olarak sert kallusu oluşturur. Olgunlaşmamış trabeküler kemik sert kallus olarak adlandırılmaktadır (61). Oluşan kalsifiye kıkırdak bu sayede örgü kemiğe yerini bırakır. Böylece kemik doku iyileşmesinde oluşan ilk kemik örgü kemiktir. Bölgenin periost ile örtülmesiyle reperasyon evresi tamamlanır (58,60,62,63).

Remodeling (Yeniden Şekillenme) Evresi

Kemik iyileşmesinin en uzun süren evresi yeniden şekillenme evresidir. Bu evre aylarca hatta yıllarca sürebilir (5,64).

Onarım evresinde oluşan örgü kemik osteoblastlar tarafından aktiflenen osteoklastlar aracılığıyla yıkılmaya başlar. Öncesinde oluşan mikroskobik olarak düzensiz olan kallus, lameller kemik ve kemik iliğiyle yer değiştirir (59,65).

Düzensiz, zayıf yapıdaki örgü kemik trabeküler ve kortikal kemiğe dönüşerek daha güçlü bir hale gelir. Oluşan kemikte kas kuvvetlerine ve mekanik etkenlere paralel olarak kemiğin havers sistemi yapılır. Bu evrede kemiğin orijinal güç, şekil ve yapısı oluşur (7).

Kemik Gelişimi

Embriyonik dönemde başlayan kemik gelişimi, genç erişkin döneme kadar devam etmektedir. Kemik oluşumu, osteoblastların salgıladıkları matriksin doğrudan mineralize olmasıyla (intramembranöz) olarak veya kıkırdak matriks üzerine kemik matriksinin birikmesiyle (endokondral) gerçekleşir (7,66).

Intramembranöz Kemikleşme

Matriksin mezenşimal bağ dokusu desteğiyle direkt olarak kalsifiye olması sonucu intramembranöz kemikleşme gerçekleşir (50). Kemik defektinin tamir bölgesinde farklılaşmamış mezenşimal hücreler birikir. Defekt tamir bölgesinin kan damarlarınca zenginleşmesiyle mezenşimal doku içinde zengin bir kapiller ağ oluşur.

Mezenşimal hücreler hızla bölünerek osteoprojenitör hücrelere farklılaşırlar. Osteoprojenitör hücreler ise osteoblastlara dönüşür ve sonradan mineralize olacak kemik matriksi birikmeye başlar. Kan damarları aracılığıyla bölgeye taşınan kalsiyum ve fosfor iyonları osteoblastlarca sentezlenen ALP enzimi aracılığıyla kalsiyum fosfat moleküllerine dönüşerek kemik matriksinin mineralizasyonunu sağlar. Böylece kemik trabekülleri oluşur. Trabeküller içerisinde kalan ve aktiviteleri azalan osteoblastlar osteosit hücrelerine dönüşürler. Oluşan osteoid matriksin mineralizasyonu devam eder ve olgun kemiğe dönüşür (41,67,68). İntramembranöz kemikleşme kafatası, sternum, klavikula gibi yassı kemiklerde, yüz kemiklerinde, uzun ve kısa kemiklerin kompakt kısımlarında görülür. Mandibulanın kondil başı ve simfisis dışındaki bölgelerinde de intramembranöz kemikleşme görülmektedir. Doğum sonrasında kemik defektlerinin rejenerasyonunda ve kırık iyileşmesi sırasındaki periosteal iyileşme de intramembranöz kemikleşme mekanizması ile gerçekleşmektedir (69).

Endokondral Kemik Oluşumu

Endokondral kemik oluşumunda, kemik oluşum mekanizması için öncelikle hyalin yapıllı kıkırdak bir taslak oluşumu gereklidir (50). Hyalin kıkırdak doku oluşumundan sonra yeni kemik oluşumu gerçekleşmektedir.

Kıkırdak taslak projenitör hücrelerin salınımını yapan periost ve perikondrium ile çevrilidir. Öncelikle projenitör hücreler kondrositlere dönüşür ve kondrositler de kıkırdak matriks sentezini sağlarlar. Aynı zamanda kıkırdak matriks merkezinde kan damarı oluşumunu indükleyecek olan Vasküler Endotelial Growth Faktör (VEGF) de yine bu hücrelerden salınır. Kıkırdak matriksin merkezinde vasküler tomurcuklar oluşur. Oluşan kan damarları sayesinde kemik yapımından sorumlu osteoprojenitör hücrelerin kıkırdak matrikse ulaşımı sağlanır (24). Bu bölgeye ulaşan hücrelerin kıkırdak matriks merkezini rezorbe etmesi sonucunda matriksin medullar bölgesinde bir boşluk oluşur. Oluşan boşluktaki osteoprojenitör hücreler osteoblastlara dönüşerek mineralize kıkırdakta osteoid matriksi sentezler. Bölgedeki kondrositler beslenemez ve hipertrofiye uğrayarak yıkılırlar. Kıkırdak doku üzerinde boş kaviteler oluşur ve sonrasında kemik iliği boşluğunu oluşturur (6,7,67,

68). Osteoklastların kalsifiye kıkırdak ve kemik matriksini rezorbe etmesiyle bölgedeki osteoblastlar lameller kemiği oluşturur (69,70).

Endokondral kemikleşme klavikula hariç uzun kemiklerin oluşumunda ve bazı kısa kemiklerin oluşumunda görülmektedir. Mandibula kondil bölgesi ve kafa kaidesinde yer alan oksipital, sphenoid ve ethmoid kemikler de endokondral kemikleşme görülmektedir (71). Ayrıca doğumdan sonra sabit fiksasyon yapılamayan kırık iyileşmesinde de endokondral kemikleşme rol almaktadır (7,66).

2.2. KRİTİK KEMİK DEFECTİ

Kemik defektlerinin iyileşmesinde ve rekonstruktif cerrahi uygulamalarında kemik augmentasyonunda greft materyalleri, büyüme faktörleri, implantlar gibi çeşitli tedavi yöntemleri mevcuttur. Bu yöntemler yıllar içerisinde gelişmekte ve çeşitlenmektedir. Gelişen bu materyallerin etkinliklerinin diğer materyallerle kıyaslanabilmesi ve değerlendirilebilmesi için standart modellere ihtiyaç vardır (72,73).

Kemik defektlerinde oluşacak iyileşme seçilen hayvanın türü, gelişmişlik derecesi, oluşan defektin büyüklüğü gibi etkenlere bağlıdır. Aynı tür hayvanlar içerisinde iyileşme büyük oranda defekt büyüklüğü ile ilgilidir. Başarısı kıyaslanacak materyallerin etkinliklerinin net olarak değerlendirilebilmesi için oluşturulan defektin spontan olarak iyileşemeyecek büyüklükte olması gerekmektedir. Hollinger ve Kleinschmidt bu özellikte standart büyüklükte oluşturulacak defektleri 'Kritik Boyut Defektleri' (KBD) olarak tanımlamıştır (73-76).

KBD hayvan kemik defektlerinde hayvanın yaşamı boyunca spontan olarak iyileşemeyecek en küçük intraosseöz yara olarak tanımlanabilir. Ayrıca, yapılan çalışmalarda deney süresinin kısıtlı olması sebebiyle çalışma sonuna dek spontan olarak iyileşemeyecek yaraları tanımlamak için de kullanılmaktadır (77).

KBD defektin oluşturulacağı hayvan türüne ve defektin oluşturulduğu bölgeye göre değişmektedir. KBD için genellikle kalvaryum, tibia ve mandibula gibi kemikler seçilmektedir (75,78). Farklı kaynaklarda rakamlar değişmekle birlikte KBD kranial defektler için ratlarda KBD 8 mm, tavşanlarda 15 mm, maymun ve

köpeklerde ise 20 mm olarak kabul edilir (74,79,80). Ratlarda mandibulada oluşturulan defektler içinse KBD 5 mm olarak belirlenmiştir (81-83).

2.3. VEGF

VEGF vasküler gelişim ve anjiyogenezin düzenlenmesinde en önemli büyüme faktörlerinden biridir. Kemik doku damarlanması ileri düzeyde gelişmiş bir yapıdır ve damarlanmanın oluşması osteogenezde oldukça önemli bir rol oynar. Dolayısıyla VEGF hem iskelet gelişiminde hem de doğum sonrasında kemik onarımında kritik önemdedir (84-87). Doğum sonrası kemik onarımı ve rejenerasyonu, intramembranöz ve endokondral kemikleşme gibi iskelet gelişiminin bazı adımlarını tekrarlar (88),(89). Aynı zamanda enflamatuar hücrelerin ortama dahil edilmesi ve mezenkimal kök hücrelerin sayısının azaltılması gibi olaylar da kemik onarımı ve rejenerasyonunda görülmektedir (90,91). VEGF'nin kemik onarımı ve rejenerasyonunun çeşitli aşamalarına katıldığı bildirilmiştir. Kemik gelişiminde ve doğum sonrası kemik onarımında kritik rol oynayan çeşitli büyüme faktörleri, özellikle osteoblastik hücrelerde VEGF ekspresyonunu da düzenler. Kemiğe gelen mekanik kuvvetler de VEGF ekspresyonunun bir başka düzenleyicisidir. Mekanik stres altında osteoblastlar VEGF salgılar ve bu VEGF biyolojik yanıtları uyarır (92,93).

Kemik travmasından sonra oluşan hematoma ve bunu takip eden enflamasyon kemik onarımını başlatır. VEGF bu süreçte önemli bir rol oynar ve kemik yaralanması sonrası hematoma yoğunlaşır. Hematom alanında yer alan hipoksi, defekt içindeki kemik hücrelerinde ve enflamatuar hücrelerde VEGF ekspresyonunu indükler. Aynı zamanda endokondral kemikleşmede VEGF perikondriumdaki osteoblast öncülleri ve hipertrofik kondroblastlar tarafından üretilir. Bu da osteoblastik hücrelerin kan damarları, osteoklastlar ve hematopoetik kök hücrelerle birlikte primer kemikleşme merkezine göç etmesini sağlar (87,93). VEGF, iskelet vaskülarizasyonunu uyarmanın yanı sıra epifizyel kondrosit sağkalımı için de kritik bir faktördür (85,94).

Kan damarlarının kıkırdak oluşumunu engellediği endokondral ossifikasyonun aksine, intramembranöz kemik oluşumu anjiyogenez ve osteogenezin birleşmesine dayanır. Hem vasküler hem de iskelet morfogenezi VEGF'ye bağlı

olduğundan, VEGF bu bağlantıda önemli bir role sahiptir (Şekil 3). İnflamasyon sırasında hipoksiye maruz kaldıklarında, osteoblastlar HIF-1 α yolu üzerinden VEGF gibi faktörleri salgılar. Bu, endotel hücrelerini aktive eder ve damar geçirgenliğini artırır (95). Artan vaskülogenez ve anjiyogenez, kemik oluşturan progenitörlerin yanı sıra mineralizasyon için gerekli olan beslenme, oksijen ve mineralleri de beraberinde getirir. Ayrıca, kan damarlarından salınan BMP 2 gibi osteojenik faktörler osteoblast farklılaşmasını ve mineralizasyonunu teşvik eder (96). Buna karşılık, olgunlaşan osteoblastlar anjiyogenezi daha da desteklemek için Platelet Kaynaklı Büyüme Faktörü (PDGF) ve VEGF gibi anjiyojenik faktörler üretir (97).

2.4.OPN

Osteopontin (OPN), kemiğin yeniden şekillenmesini destekleyen, kollajen olmayan bir kemik matriks proteinidir. Küçük integrin bağlayıcı ligand N-bağlı glikoprotein ailesinin bir üyesidir. Kemikte en fazla OPN'yi pre-osteoblastlar, osteoblastlar ve osteositler oluşturur (98). OPN ayrıca kemik dışı hücreler; odontoblastlar, bazı kemik iliği hücreleri ve epitel türevli hücreler tarafından da üretilir (99). Adını, hücreler ve mineraller arasında bir bağlantı olarak oynadığı rolden almıştır. OPN'nin biyomineralizasyondaki rolü osteoklast ve osteoblast hücre bağlanmasını artırmaktır. OPN ekspresyonunun ayrıca periodontal ligamentlerde de gösterilmesi, periodontal ligamentteki hücrelerin sert doku oluşumunu kolaylaştırma yeteneğine sahip olduğu ve sonuç olarak periodontal rejenerasyonda rol oynadığı teorisini desteklemektedir (98,99). Önceki çalışmalar OPN ekspresyonu bakılan preparatların orta düzeyde ve ya fokal ekspresyon görülenlerinin kemik rezorpsiyonunu, yoğun ekspresyonunun ise kemik oluşumunu gösterdiğini açıklamıştır (99).

OPN, kemik ve dentin de dahil olmak üzere mineralize dokularda yüksek oranda eksprese edilir. Odontoblast progenitör hücrelerinin yapışmasını, göçünü ve farklılaşmasını düzenler, bu da osteojenik ve odontojenik farklılaşma için önemini doğrular niteliktedir (100). OPN, dokudaki dağılımı, kalsiyum afinitesi, mineralizasyon bölgelerindeki immüno-lokalizasyonu ve OPN gen ekspresyonunun kalsitropik hormonlar tarafından düzenlenmesi sayesinde mineralizasyon sürecini

düzenler (100,101). OPN bu sebeple dental materyallerin sert doku oluşumunu incelemek için birçok çalışmada kullanılmıştır. Bu bağlamda, Kemik Sialoproteini, OCN, OPN gibi mineralize dokuların organik matriksinin protein bileşenleri, bu çalışmada olduğu gibi mineralizasyon belirteçleri olarak kullanılabilir (102).

2.5. Mineral Trioksit Agregat (MTA)

Mineral trioksit agregat (MTA), esas olarak kalsiyum ve silikat elementlerden oluşan bir biyoaktif endodontik simandır (103). Endodontik uygulamalarda kullanılmak üzere 1990'lı yılların başlarında araştırılmaya başlanan MTA, 1993 yılında Loma Linda Üniversitesi'nde M.Torabinejad tarafından yürütülen bir çalışmayla diş hekimliği literatürüne girmiştir. 1998 yılına dek deneysel olarak başarılı sonuçlar aldıktan sonra Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanmış ve tüm dünyada yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır (104,105).

Endodontik uygulamalarda retrograd dolgu maddesi olarak kullanımı başlayan MTA sonrasında direkt pulpa kuafajı, perforasyon tamiri ve apeksifikasyon gibi dental tedavilerde kullanım alanı bulmuştur (106-109). MTA günümüzde; vital pulpa olgularında, kök ve furkasyon perforasyonlarında, kök kırığı ve rezorpsiyonu vakalarında, cerrahi veya cerrahi olmayan uygulamalardaki retrograd dolgulara, diş beyazlatma uygulamalarında, apeksi açık nekrotik dişlerde apeksifikasyon ve revaskülarizasyon tedavilerinde başarılı bir şekilde kullanılmaktadır (105,110).

MTA'nın bu uygulamalarda başarılı bir şekilde kullanılabilmesi ve diğer materyallerin önüne geçebilmesi; MTA'nın biyouyumluluk, sızdırmazlık, bazı fiziksel ve kimyasal özelliklerinin daha üstün bulunması sonucunda gerçekleşmiştir (111-113). Laboratuvar çalışmalarında, mükemmel biyouyumluluk ve sızdırmazlık kabiliyetine sahip olduğu; ayrıca perforasyonların onarımı, vital pulpa tedavileri, kök ucu dolguları, kök dolgularında ve apikal bariyer olarak kullanıldığında istenen klinik sonuçlarla ilişkili olduğu bildirilmiştir (114,115).

Ayrıca yapılan çalışmalarda MTA'nın pulpal ve periradiküler dokularda rejenerasyon kapasitesini arttırdığı, sement benzeri dokuların oluşumunu ve kemik formasyonunu stimüle ettiği bildirilmiştir (116,117). Biyouyumluluk ve sızdırmazlık

özelliklerinin bu denli gelişmiş olması sebebiyle MTA ile yapılan çalışmalar sonucunda mevcut retrograt dolgu materyallerine göre ‘altın standart’ olarak kabul edilmiştir (118).

2.5.1. MTA'nın Kimyasal İçeriği

MTA esas olarak; trikalsiyum silikat ($3\text{CaO}\cdot\text{SiO}_2$, C_3S), trikalsiyum aluminat ($3\text{CaO}\cdot\text{Al}_2\text{O}_3$, C_3A), trikalsiyum oksit (Ca_2O_3) ve silikat oksit (SiO_2) partiküllerini içeren bir materyaldir (119). Bu bileşiklere ek olarak bazı mineral oksitler de MTA'nın kimyasal ve fiziksel özelliklerine katkıda bulunmak amacıyla MTA yapısına eklenmiştir. Örneğin yapıya eklenen bizmut oksit MTA'ya radyoopasite sağlamaktadır (104,119). Yapılan Elektron Prob Mikro Analizi MTA yapısındaki ana iyonların dış yapısında da temel iyon olarak bulunan kalsiyum ve fosfor olduğunu göstermiştir (120).

Ticari olarak piyasaya sunulan ilk MTA gri renkli ‘ProRoot MTA’dır (Dentsply/Tulsa Dental, Tulsa, OK, USA). Gri renkli MTA'nın yapısındaki demir bileşenlerinden dolayı dişlerde renklenmeye sebep olması üreticileri beyaz renkli MTA arayışına itmiştir. Böylelikle 2002 yılında diş renginde olan ‘Beyaz MTA’ WMTA (White MTA, Dentsply, Tulsa Dental Products, Tulsa, OK, USA) üretici firma tarafından piyasaya sunulmuştur. Beyaz renkteki MTA'nın demir bağlayıcı bir mineral olan tetrakalsiyum alüminoferrit ($4\text{CaO}\cdot\text{Al}_2\text{O}_3\cdot\text{Fe}_2\text{O}_3$) gibi demir bileşenlerini içermediği, daha küçük partikül boyutuna sahip olduğu bildirilmiştir (121,122). Sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda da Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM) görüntüleri ve elektron mikroanalizlerine göre gri ve beyaz MTA arasında Al_2O_3 , MgO ve FeO konsantrasyonlarının farklı olduğu bildirilmiştir (123,124). Gri MTA da renklenmeye sebep olan bileşenin FeO bileşeni olduğu da belirtilmiştir (123).

MTA'nın kimyasal yapısı temel olarak Portland siman ile benzerdir. Çalışmalarda MTA'nın ağırlık olarak kabaca %75 Portland siman, %20 bizmut oksit ve %5 alçı taşından oluştuğu bildirilmiştir (121). Ancak Portland siman MTA'ya oranla çok daha fazla ağır metal içermektedir ve daha az saflaştırma işleminden

geçerek üretilmektedir. Yapılan bir çalışmada MTA'nın içeriğinde bizmut oksit bulundurması ve potasyum içermemesinin MTA ve Portland simanın kimyasal yapısındaki esas farkı oluşturduğu bildirilmiştir (125). Ayrıca MTA Portland simana göre daha uzun bir çalışma zamanına sahiptir (125). MTA'nın daha küçük ortalama partikül boyutuna sahip olduğu da bildirilmiştir (116,126).

MTA'nın ana yapısında kalsiyum hidroksit bulunmaz; ancak sertleşme reaksiyonları sonucunda oluşan kalsiyum oksit doku sıvılarıyla teması sonucunda kalsiyum hidroksit oluşturmaktadır. Oluşan bu yapının dokularda sert doku oluşumunu uyaran fibronectini tetiklediği bilinmektedir (1-3). Fibronectin oluşumunun sert doku oluşumunun ilk basamağı olduğu bildirilmiştir. Sert doku oluşumunda apatit kristallerinin etrafında biriken fibronectin hücrelerin adezyonunu ve farklılaşmasını sağlar (110). İnsan osteoblastlarında yapılan bir çalışmada MTA'nın osteoblastlarda sitokin salınımını uyardığı bildirilmiştir (127). MTA'nın sert doku oluşumunu tetiklemesindeki mekanizmaların MTA'nın biyouyumluluğu, alkanitesi ve iyi tıkama yeteneğiyle ilgili olabileceği de belirtilmiştir (1,119,128,129).

2.5.2. MTA'nın Fiziksel Özellikleri

MTA, 3:1 toz/likit oranında partiküllerin steril su ile karıştırılmasıyla hazırlanmaktadır. MTA tozunun farklı çözücülerde hazırlanmasının; fiziksel özelliklerini değiştirebildiği, sertleşme zamanı ve baskı dayanımı gibi özelliklerinde farklılıklar oluşturduğu görülmüştür (130).

MTA'nın sertleşme reaksiyonu da Portland simanın sertleşme reaksiyonu gibi hidratasyon reaksiyonu ile başlamaktadır. Bu reaksiyonun gerçekleşebilmesi için ortamdaki çözücüler yeterli miktarda su içermelidir (105). Materyal uygulandıktan sonra üzerinde nemli bir pamuk peletin geçici olarak bekletilmesi önerilir. MTA yaklaşık olarak 3-4 saat içerisinde sertleşerek kolloidal jel halden katı hale ulaşır. Bu süreçte ortamdaki nem sertleşme reaksiyonuna yardımcı olmaktadır (119,124,131).

Yapılan çalışmalarda MTA'nın başlangıç sertleşme süresi yaklaşık olarak 165 dk olarak belirtilmiştir (115). Bu süre amalgam, Super EBA, IRM gibi materyallerle kıyaslanmış ve MTA sertleşme süresinin çok daha uzun olduğu görülmüştür. Ayrıca

gri renkli MTA'nın sertleşme süresinin de beyaz renkli MTA'ya göre daha uzun olduğu görülmüştür (126). MTA için bu uzun sertleşme süresi büyük bir dezavantaj oluşturmaktadır. Bazı araştırmalarda ise MTA'nın daha uzun sürede sertleşmesinin sertleşme sırasındaki boyut kaybını minimuma indirebileceği için mikro sızıntı açısından bir avantaj olabileceği belirtilmiştir (132).

MTA'nın çözünürlüğünü inceleyen araştırmalarda çözünürlüğünün çok az olduğunu veya hiç oluşmadığını belirtilmiştir (114). Fakat yapılan bazı çalışmalar MTA çözünürlüğünün uzun dönemde arttığını bildirmiştir (133,134). MTA'dan Ca^{+2} salınımı olması materyalin çözünürlüğünü artıran bir etkidir. MTA'dan Ca^{+2} salınımı materyalin toz/likit oranını artırdığı için çözünürlük ve porözite de artmaktadır (133). MTA'nın yapısında bulunan bizmut oksitin kalsiyumla tepkimeye girerek materyalin çözünürlüğünü azalttığı bilinmektedir (135).

MTA kuvvetlere karşı direnci incelendiğinde; hazırlandıktan sonraki ilk 24 saatte en düşük basınç direncini gösterdiği, nem varlığında 21. güne kadar basınç direncinin arttığı gözlenmiştir. MTA hazırlandıktan sonraki 21. günde basınç direncinin 67 MPa olduğu belirtilmiştir (136). Aynı çalışmada MTA mikrosertliği ve hidrasyonunun pH'ın düşük olduğu iltihabi ortamlardan etkilendiği de dile getirilmiştir. MTA, amalgam, Super EBA ve Intermediate Restoratif Materyal (IRM) materyallerini kıyaslayan bir çalışmada hazırlandığı ilk 24 saatte MTA'nın direncinin ilk 24 saatte en düşük olduğu gösterilmiş; ancak 21. günde aralarında önemli bir fark bulunmadığı belirtilmiştir (119). Yapılan bir başka çalışmada WMTA'nın %37'lik fosforik asitle teması sonrasında direncinin önemli ölçüde azaldığı; bu nedenle kompozit restorasyonların yapılması için WMTA yerleştirildikten sonra en az 96 saat beklenmesi gerektiği belirtilmiştir (137). Bununla birlikte; MTA'nın çekme kuvvetlerine direncinin düşük olması sebebiyle fonksiyonel kuvvet alan bölgelere yerleştirilmemelidir (104,119). Ayrıca MTA'nın basınca karşı gösterdiği direncin MTA'nın tipi, MTA'nın saklanma koşulları, uygulanan kondensasyon basıncı, MTA'nın likit içeriği ve likidin pH değeri gibi faktörlerden etkilendiği de literatürdeki çalışmalarda belirtilmiştir (126,138).

MTA'nın pH değeri incelendiğinde; karıştırıldıktan hemen sonra 10.2 olan pH değerinin 3 saat sonra 12.5'a yükseldiği belirtilmiştir (119). MTA'nın yüksek pH değerini uzun dönem koruması MTA'nın kalsiyum salınımıyla ilgili olabileceği

belirtmiştir (133). Yapılan çalışmalarda MTA'nın kalsiyum hidroksite yakın pH değerinin MTA'nın da kalsiyum hidroksit gibi sert doku oluşumunu indüklemeye özelliğini artırdığını belirtmiştir (104,119,139).

Diş hekimliğinde kullanılan materyallerin radyografide görülebilmesi ve değerlendirilebilmesi için belirli bir radyoopasiteye sahip olması gerekmektedir (140,141). Uluslararası Standartlar Teşkilatı (ISO)'nun belirttiği üzere restoratif materyallerin aynı kalınlıktaki alüminyumla eşdeğer veya daha fazla radyoopasiteye sahip olması istenmektedir (142). MTA'nın kimyasal yapısına bizmut oksit eklenmiş ve belirli bir radyoopasiteye sahip olması sağlanmıştır. MTA'nın ortalama radyoopasite değeri incelendiğinde 7,17 mm eşdeğer kalınlıktaki alüminyumla aynı olduğu belirtilmiştir (119). Beyaz MTA ve Gri MTA'nın radyopasitelerinin değerlendirildiği çalışmalarda Beyaz MTA'nın radyoopasite değerinin daha yüksek olduğu belirtilmiştir (126,143).

2.5.3. MTA'nın Biyouyumluluğu

Spesifik bir materyalin dokular üzerine uygulanması sonucu konakta uygun doku cevabı oluşturması biyouyumluluk olarak tanımlanabilir (144). Diş hekimliğinde kullanılan dental materyallerin biyouyumluluğu yapılan hayvan çalışmalarıyla in vivo ve hücre kültürü çalışmalarıyla in vitro olarak incelenmektedir. MTA'nın kullanımından itibaren MTA hakkında yapılan pek çok çalışma da MTA'nın biyouyumluluğunu değerlendirmiştir. Bu çalışmalar MTA'nın biyouyumlu bir materyal olduğunu ortaya çıkarmıştır (104,111). Yapılan çalışmalarda MTA'nın doku tarafından iyi tolere edilebilen bir materyal olduğu, iyileşme için iyi bir ortam oluşturarak sert doku oluşumunu indüklediği belirtilmiştir (104,139).

Super EBA, IRM, amalgam, cam iyonomer siman ve gutta perka ile MTA'nın biyouyumluluğunu değerlendiren çalışmalar MTA'nın daha üstün sonuçlar verdiğini göstermiştir (145,146).

Torabinejad ve arkadaşlarının maymunlar üzerinde yaptıkları bir çalışmada MTA ve amalgamın periapikal dokulardaki iltihabi doku reaksiyonu ve sert doku oluşturma potansiyelini karşılaştırmışlardır. MTA yerleştiren örneklerin çoğunda

iltihabi reaksiyon gözlenmezken, amalgam yerleştirilen örneklerin tamamında iltihabi doku reaksiyonu gözlenmiştir. Sert doku oluşumu açısından incelendiğinde ise MTA yerleştirilen örneklerde sert doku oluşumu izlenirken, amalgam yerleştirilen örneklerde sert doku oluşumu izlenmemiştir (111).

Guinea piglerde yapılan bir başka çalışmada ise MTA, amalgam, IRM ve Süper EBA materyalleri mandibula tibiaya yerleştirilmiş ve doku reaksiyonları incelenmiştir. Çalışma sonunda MTA'nın iltihabi reaksiyon açısından daha başarılı bir materyal olduğu belirtilmiştir (147).

Farelerde dental pulpa hücreleri üzerinde Yasuda ve ark.'nın yaptığı çalışmada Dycal, adeziv rezin siman ve MTA karşılaştırılmıştır. Çalışmada elde edilen sonuçlara göre MTA'nın sitotoksisite göstermediği; aynı zamanda pulpa hücrelerinin mineralizasyonu ve kemik morfogenezik protein-2 (BMP-2) oluşumunun arttığı belirtilmiştir. Çalışmada Dycal kullanılan gruplarda hücre ölüm oranının yüksek olduğu gözlenirken, adeziv rezin siman grubunun sitotoksisite üzerine etkisi saptanmamıştır (148).

2.5.4. MTA'nın Sert Doku Oluşturma Potansiyeli İle İlgili Yapılmış Araştırmalar

MTA tozunun yapısında temel olarak trikalsiyum silikat, trikalsiyum alüminat, trikalsiyum oksit ve silikat oksit bulunduğu bilinmektedir (119). MTA ana yapısında kalsiyum hidroksit içermese de hidratasyon reaksiyonu sonucunda kalsiyum hidroksit ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) olduğu çeşitli analizlerle gösterilmiştir (1,2,128). Damasche ve ark.'nın 2005 yılında yaptığı bir çalışmada kalsiyum hidroksit oluşumunun MTA tozundaki trikalsiyum alüminatın hidrojen ile bir araya gelmesi sonucu olduğu bildirilmiştir (124). 2008 yılında yapılan bir çalışmada ise MTA tozunun yapısındaki dikalsiyum ve trikalsiyum silikatın su ile tepkimesi sonucu kalsiyum hidroksit olduğu belirtilmiştir (149).

Kalsiyum hidroksit MTA'nın ana hidratasyon ürünüdür ve MTA karıştırılıp hazırlanmasından sonra ortamda 7. güne dek sürekli artış gösterir. Oluşan kalsiyum

hidroksit zamanla dokulardaki karbondioksitle reaksiyona girerek azalmaya başlasa da MTA'dan kalsiyum hidroksit salınımı ilk bir yıl boyunca devam eder (150). Oluşan kalsiyum hidroksitin dokularda sert doku oluşumunu uyaran fibronektini tetiklediği bilinmektedir (1-3,128). Aynı zamanda MTA'nın kalsiyum hidroksit gibi yüksek pH'a sahip olması, biyouyumlu bir materyal olması ve sızdırmaz bir materyal olmasının da sert doku oluşumunu etkileyebileceği belirtilmiştir (1,128,129,147).

Sarkar ve ark.'nın yaptığı çalışmada MTA'nın osteojenik aktivitesi MTA'dan salınan serbest kalsiyum (Ca^{++}) iyonlarının çevre dokudaki fosfat (PO_4^{3-}) gruplarıyla birleşmesi sonucu hidroksiapatit ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) kristalleri oluşturmasıyla açıklanmıştır (151).

Yapılan bazı hücre kültürü çalışmalarında MTA'nın bazı sitokinlerin ve biyolojik markerların salınımında etkili olduğu gösterilmiştir. Enflamasyonda görevli olan interlökin (IL)-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, IL-10 ve kemik yapımında etkili olduğu bilinen OPN, OCN, BSP, ALP ve BMP-2 gibi proteinler bunlara örnek olarak verilebilir (145,152). 2005 yılında yapılan bir çalışmada MTA, Super EBA ve kalsiyum hidroksit içerikli bir kaide materyalinin inflamatuvar sitokinler üzerindeki etkileri incelenmiş ve MTA grubunda IL-4 ve IL-10 miktarının diğer gruplara göre anlamlı derecede yüksek olduğu bildirilmiştir (145).

Bonson ve ark.'nın yaptığı çalışmada hücre kültürü ortamında kök ucu dolgu materyali olarak kullanılan MTA ve Hibrit İyonomer Kompozit Resin'in diş eti ve periodontal ligament (PDL) fibroblastlarında proliferasyonlarını ve sert doku oluşumuna etkilerini incelemişlerdir (153). Gingival fibroblastlar gingival bağ dokusunun bütünlüğünü korurken, özelleşmiş fonksiyonlara sahip periodontal ligament (PDL) fibroblastları periodontal ligament lif bağlantılarının oluşumu ve sürdürülmesinin yanı sıra komşu alveolar kemik ve sementumun onarımı, yeniden şekillenmesi ve rejenerasyonundan sorumludur (154). Çalışma sonucunda MTA'nın hem PDL hem de gingival fibroblastlarda ALP aktivitesini önemli düzeyde aktiflediği belirtilmiştir. Hibrit İyonomer Kompozit Resin'in ise gingival fibroblastlarda bu aktiviteyi göstermediği; PDL fibroblastlarında ise MTA'ya göre çok da az oranda ALP aktivitesini artırdığı bildirilmiştir (153). ALP fosfat salgılayan bir proteindir; aktivitesi kemik oluşumunun önemli bir göstergesi ve osteoblastların fenotipik belirteci olarak kabul edilir (155).

MTA (FillApex MTA-Angelus), cam iyonomer siman (Kavitan Plus-SpofaDental), dual cure kompozit rezinin (Core-It SpiDent) ve polikarboksilat siman (Adhesor Carbofine -SpofaDental)'ın rat kalvaryumlarına yerleştirilmesiyle yapılan bir çalışmada materyallerin inflamasyon ve kemik iyileşmesi üzerindeki etkileri incelenmiştir. 2 hafta aralıklarla 12 hafta boyunca dokulardaki inflamatuvar değişiklikler ve doku reaksiyonları takip edilmiştir. Çalışmanın 6. haftasında elde edilen sonuçlara göre MTA, polikarboksilat ve cam iyonomer siman gruplarında adeziv kompozit grubuna göre daha hafif bir inflamasyon düzeyi izlenmiş; çalışma sonunda ise materyaller arasında inflamasyon düzeyi açısından anlamlı bir fark bulunamamıştır. 10. haftada yapılan incelemeye göre MTA ve polikarboksilat grubunda diğer gruplara göre daha az inflamatuvar reaksiyon ve daha fazla fibroz doku kalınlığı olduğu belirtilmiştir (156).

İnsan mandibular molar dişlerde sınıf II furkasyon defektlerinde yapılan bir klinik çalışmada MTA (Dentsply, Tulsa Dental, OK, ABD) ve Kalsiyumla Zenginleştirilmiş Karışım (CEM)'i (Yektazyst Dandan, Tahrán, İran) kollojen bir membran (Bio-Gide Perios, Geistlich, Wolhusen, İsviçre) ile kaplayarak kullanmış ve bu materyallerin defektler üzerindeki etkinlikleri incelenmiştir. Toplamda 40 adet defekt 6 ay süre ile takip edilmiş ve sonrasında periodontal sond yardımıyla horizontal ve vertikal klinik ataçman seviyesi ile birlikte furkasyon defekt derinliği değerlendirilmiştir. Çalışma sonucunda her iki grupta da benzer şekilde cep derinliğinde önemli bir azalma olduğu belirtilmiştir. Ayrıca her iki grupta da sert doku oluşumu değerlendirilmiş ve hem horizontal hem vertikal olarak kemik kazancı olduğu tespit edilmiştir. MTA ve CEM simanın kemik üzerinde kullanılarak yapılan önceki çalışmalarda da her iki materyalin de kemik oluşumu, osteokondüksiyon ve rejenerasyon potansiyeline sahip olduğu gösterilmiştir (157-159).

MTA ve CEM simanın osteojenik aktiviteleri her iki materyalin de ortama büyük miktarda kalsiyum iyonu salarak çevre dokudaki fosfat grupları ile hidroksiapatit oluşturmaya bağlanmıştır. Oluşan bu hidroksiapatit tabakasının kemik metabolizmasında sorumlu kalsiyum ve fosfor iyonlarını salmasının yanı sıra biyouyumlu, düşük toksisiteye sahip osteojenik bir potansiyeli de olduğu başka çalışmalarda da bildirilmiştir (151,158,160-163).

MTA ve CEM simanın sert doku oluşturma potansiyelleri için yüksek pH değerine sahip olmaları, blastik hücreleri çekme ve sement oluşumu için elverişli bir ortam sağlama potansiyeli, fibroblastlar tarafından ALP ekspresyonunu indüklemeye potansiyeli, kemik ve sement üzerinde iletken etki oluşturma, adhezyon ve hücre proliferasyonunu indüklemeye kapasitesi ve osteoblastlar tarafından OCN ve diğer interlökinlerin ekspresyonu gibi farklı mekanizmalardan bahsedilmektedir (151,164, 165).

2019 yılında Fakheran ve ark.'nın yaptığı çalışmada Beagle köpeklerin çenelerinde dehissens tipi defektler oluşturulmuş ve RetroMTA, RetroMTA + Beta-trikalsiyum fosfat ile doldurulmuş ve üzerleri kollojen membran ile örtülmüştür (166). Kontrol gruplarından birisi sadece membran ile örtülürken, diğer kontrol grubu ise tamamen boş bırakılmıştır. Daha önceki çalışmalarda da MTA'nın periodontal rejenerasyondaki başarısı ve kemik oluşumunu indüklemeye potansiyeli göz önünde bulundurularak yapılan bu çalışma sonucunda; RetroMTA'nın uygulandığı defektlerin 4/8'inde %100 kemik oluşumu, RetroMTA + β -TCP uygulanan defektlerin 5/8'inde %100 kemik oluşumu görülürken kontrol gruplarının hiçbirinde %100 kemik oluşumu izlenmemiştir (167,168). Önceki çalışmalarla da gösterilmiş olan MTA'nın kemik rejenerasyonundaki başarısı bu çalışma sonunda elde edilen sonuçlarla da desteklenmiştir (168-170).

2.5.5. MTA'nın Dezavantajları

MTA yüksek biyouyumluluk, iyi antibakteriyel özellik, çevre dokularda sert doku oluşumunu uyatabilecek bir pH'a sahip olması, dokular için sitotoksik olmaması gibi özellikleri, hem laboratuvar hem klinik çalışmalarda gösterdiği yüksek başarı oranları sebebiyle diş hekimliğinde vital pulpa tedavileri gibi çeşitli tedavilerde altın standart olarak kullanılmaktadır (104,139,147).

MTA'nın tüm bu biyolojik ve klinik başarılı özelliklerine rağmen uzun sertleşme süresi, manipülasyonundaki zorluklar, yerleştirilen dişlerde renklenmeye neden olması, yüksek maliyet gibi çeşitli dezavantajları vardır (171). Ayrıca yüksek alkanitesinin kök dentin sertliğini etkilediği de bildirilmiştir (172).

Torabinejad ve ark.'nın yaptıklarını çalışmalarında MTA'da oluşan renk değişikliğinin materyalin sahip olduğu bileşenler, kan kontaminasyonu, dokuda kullanılan irriganın türü, çevre koşulları ve ışık gibi faktörlerden etkilenebileceği bildirilmiştir.

Piyasaya ilk sunulan gri renkli ProRoot MTA'nın dişlerde renklenmeye sebebiyet vermesi sonucu beyaz renkli ProRoot MTA (White MTA, Dentsply, Tulsa Dental Products, Tulsa, OK, USA) piyasaya sürülmüştür (123). Sonrasında piyasaya sürülen hem gri hem de beyaz renkli MTA Angelus da dişlerde renk değişikliğine sebebiyet vermiştir (173). Başlarda renk değişiminden demir ve mangan elementleri sorumlu tutulsa da son araştırmalar bizmut oksitinin renk değişimine neden olan ana element olduğunu göstermiştir (114,174-176). Yapılan bir çalışma MTA'nın radyoopasitesini artırmak için içeriğindeki bizmut oksit seviyesinin artırılmasının renk değişikliği seviyesinde önemli bir etkiye sahip olmadığını belirtmiştir (175).

Yapılan çalışmalar sonucunda kan kontaminasyonunun MTA'da renk değişikliğine sebebiyet verebileceği gösterilmiştir (177,178). Bizmut oksit içermeyen Portland siman ve beyaz renkli ProRoot MTA da kan kontaminasyonunun ardından renk değişimi bildirilmiştir (177).

Ayrıca diş üzerinde kullanılan irrigan materyallerin de MTA'da renk değişikliği yapabildiği gösterilmiştir. Voveraityte ve ark.'nın yaptığı çalışmaya göre diş tübüllerinde kalmış olan artık sodyum hipokloritin (NaOCl) beyaz renkli ProRoot MTA'da renk değişikliği yapabildiği gösterilmiştir (179). Bunun yanında Biodentine ve Neo MTA Plus, NaOCl veya su ile temas halinde laboratuvar koşullarında renk değiştirme etkisine sahip değildir (179).

MTA'nın bahsedilen dezavantajlarının üstesinden gelmek üzere piyasaya pek çok farklı siman sunulmuştur. Torabinejad ve ark.'nın 2018 yılında yayınladığı makalelerinde bu simanların kalsiyum salınımı yapması, elektrik iletkenliğine sahip olması, kalsiyum hidroksit üretimi ve apatit kristal formasyonunu indüklemeleri gibi özelliklerinden dolayı ortak biyoaktivite özelliği gösterdiği bildirilmiş ve 'Biyoaktif Endodontik Siman' olarak adlandırmışlardır (114,115,180).

2.5.6. NeoMTA Plus

NeoMTA Plus (Avalon Biomed Inc., Bradenton, Florida, ABD) kendisinden önce piyasaya sunulmuş olan diğer MTA'ların dezavantajlarını ortadan kaldırmak için piyasaya sürülen kalsiyum silikat esaslı bir biyoaktif endodontik simandır.

Ana bileşenleri trikalsiyum silikat ve dikalsiyum silikat olmak üzere ince bir toz ve su bazlı bir jelden oluşmaktadır. Materyal bizmut oksit içermez ve dişte renklenme yapmaması için formülize edilmiştir. Üretici firmanın açıklamasına göre NeoMTA Plus diğer mevcut toz/sıvı MTA ürünlerine kıyasla üstün kullanım özelliklerine sahiptir. Pürüzsüz kıvamı sayesinde paketlenen ve yerleştirildiği yerde kalabilen bir siman olarak tanımlanmıştır. Ürünün farklı viskozitelerle karıştırılabileceği ve bu sayede farklı klinik endikasyonlara sahip olduğu belirtilmiştir. Uzun bir raf ömrüne sahip olması ve kolay manipülasyonundan dolayı ekonomik bir materyal olarak piyasaya sürülmüştür. Direkt veya indirek kuafaj tedavilerinde kullanıldığında sonrasında hastalarda çok az hassasiyet olduğu veya hiç olmadığı da bildirilmiştir (181).

Biyoaktif bir materyal olması sebebiyle pulpa kuafajı tedavilerinde, kaide astarı olarak, pulpatomi materyali olarak, kök ucu dolgusunda, apeksifikasyon tedavisinde, perforasyon tamirinde, kök rezorpsiyonu tedavisinde, sızdırmazlık amaçlanan tedavilerde ve endodontik obtürasyon amaçlı kullanımının endike olduğu belirtilmiştir. Materyalin 3 dakikadan daha kısa sürede yıkama direncine ulaşarak restoratif prosedürün devamına izin verebileceği belirtilmiştir. Macun kıvamında karıştırıldığında ise 20 dakikalık çalışma süresi ve 50 dakikalık sertleşme süresine sahip olduğu üretici talimatlarında bildirilmiştir (181).

Beyaz ProRoot MTA ile kıyaslandığında NeoMTA Plus'ın yapısında bizmut oksit yerine Tantalum Oksit, kalsiyum sülfat dihidrat yerine kalsiyum sülfat içermektedir. NeoMTA Plus yapısında ProRoot MTA'dan farklı olarak Silika (SiO_2) içermektedir. Her iki materyalde de trikalsiyum silikat ve dikalsiyum silikat materyaller için ortak ve ana yapısını oluşturduğu için materyaller arasında belirleyici fark radyopasite verici ajanlar olmuştur (182).

Materyale radyopasite katması için eklenen bizmut oksit aynı zamanda materyalin hidrasyonunda da rol alır. Fakat aynı zamanda bu materyalin dental tedaviler sonrası dişlerde renk değişikliğine sebep olduğu bilinmektedir. NeoMTA Plus materyalinde bizmut oksit yerine radyopasite verici ajan olarak tantalum oksit (Ta_2O_5) içeren bir trikalsiyum silikat simandır (183,184).

MTA Plus, NeoMTA Plus ve Biodentine kullanılarak materyallerin apeksi açık dişlerdeki kalsiyum hidroksit oluşturma başarısını değerlendiren bir çalışmada materyallerin hidrasyonlarının kalsiyum hidroksit oluşumuyla sonuçlandığı; doku sıvılarıyla temas ettiklerinde de kalsiyum fosfat oluşturma potansiyeli gösterdikleri bildirilmiştir. Fakat radyopasite verici ajan olarak bizmut oksitin kullanıldığı MTA Plus grubunda materyalin NaOCl teması sonrasında renk değişimi izlenirken, radyopasite verici ajan olarak tantalum oksit içeren NeoMTA Plus ve zirkonyum oksit içeren Biodentine grubunda renklenme oluşumu gözlenmemiştir. Aynı zamanda hem NeoMTA Plus grubu hem Biodentine grubu yeterli radyoopasiteyi göstermiş ve materyallerin hidrasyonunda herhangi bir problemle karşılaşılmamıştır. Çalışmadaki diğer materyaller gibi NeoMTA Plus da dentin köprüsü oluşumu ve kök devamlılığın sağlanmasında gerekli kalsiyum hidroksit salınmasında başarılı bulunmuş ve açık apeksli dişlerin tedavisinde başarılı bir şekilde kullanılabileceği belirtilmiştir (179).

Ayrıca piyasaya ilk sürülen MTA'ların uzun sertleşme süresi, yüksek maliyeti ve zor kullanım özellikleri gibi dezavantajlarının giderilmesi için materyalin formülasyonunda bazı değişikliklere gidilmiş ve farklı maddeler eklenmiştir. Yapılan bu bilişimsel modifikasyonlar malzemenin fiziksel ve kimyasal özelliklerini dolayısıyla biyolojik özelliklerini değiştirmiştir (115,185-187).

Örneğin; NeoMTA Plus ve MTA Plus'ın endodontik kullanımda fiziksel ve kimyasal özellikleri karşılaştırılmış ve apatit kristali oluşturma kapasiteleri incelenmiştir. Çalışmada yapılan analizler sonucunda hem MTA Plus hem de NeoMTA Plus'ın ince bir toz trikalsiyum silikat (alit), dikalsiyum silikat (belit), kalsiyum sülfat (anhidrit olarak) içerdiğini ortaya çıkarmıştır. Çalışmadaki materyallerde radyopasite verici ajan olarak NeoMTA Plus tantal oksit içerirken, MTA Plus konvansiyonel MTA'larda da olduğu gibi bizmut oksit içermektedir. Aynı zaman da NeoMTA Plus'ın sahip olduğu su bazlı jel sertleşme ve film oluşturunucular için polimerler içerir fakat tuz içermez (188). Çalışmada farklı radyopasite içerici

ajanlar kullanılan materyallerin her ikisinin de yeterli radyoopasiteye sahip olduğu görülmüştür. Bununla birlikte; NeoMTA Plus daha fazla ve daha uzun süreli kalsiyum ve hidroksil iyon salınımı göstermiş, kalsiyum fosfat tabakası oluşturma özelliğini korumuştur.

Yine aynı çalışmaya göre materyalin yüzey alanının yüksek olması daha küçük partikül boyutu ve daha hızlı sertleşme süresi ile ilişkilidir. NeoMTA Plus'ın sertleşme süresinin ProRoot MTA'ya göre daha hızlı olduğu gösterilmiştir (182).

Düşük sülfat miktarı daha kısa sertleşme süreleri ile ilişkilidir, çünkü kalsiyum sülfatlar toz prekürsörlerin hızlı bir şekilde kurumasını önlemek için sertleşme zamanını düzenler (29).

2.5.7. NeoMTA 2

NeoMTA 2, öncülü NeoMTA Plus (NuSmile Avalon Biomed, Bradenton, FL) olan ikinci nesil kök ve pulpa tedavi materyalidir. Her iki materyal de renk değiştirme potansiyelinin üstesinden gelmek için bizmut oksit yerine radyopaklaştırıcı ajan olarak tantal oksit (Ta_2O_5) içeren yeni bir trikalsiyum silikat bazlı materyalden oluşur (115,189). Üstün kullanım özellikleri sağlayan su bazlı bir jel ile karıştırılır. Karıştırma toz-sıvı oranı, kullanım endikasyonuna bağlı olarak değişebilir; kanal dolum materyali olarak ince kıvamlı veya pulpa kuafajı , perforasyon onarım materyali gibi işlemlerde koyu kıvamda hazırlanabilir (190). NeoMTA 2 piyasaya yeni sürülen bir materyal olduğundan hakkındaki literatür bilgisi sınırlıdır. Bununla birlikte; NeoMTA 2'nin biyolojik etkileri ve biyomineralizasyon potansiyelini Bio-C Repair (Angelus, Londrina, PR, Brezilya) ve öncülü NeoMTA Plus ile karşılaştıran bir çalışma, NeoMTA 2 ve NeoMTA Plus arasındaki farkları görmemize yardımcı olmaktadır (191).

Materyallerin sahip olduğu malzeme bileşimini görmemizi sağlayan EDX analizi; NeoMTA 2'nin çalışmadaki diğer materyallere göre daha yüksek Ca^{+2} varlığı göstermiştir. Yapılan SEM-EDS analizi ise NeoMTA 2 ve NeoMTA Plus için üretici tarafından belirtilmeyen alüminyum (Al^{+3}) ve kükürt (S^{-2}) bulunurken, Bio-C Repair için yalnızca (Al^{+3}) varlığı göstermiştir. Ca^{+2} salınımının hidroksil apatit oluşumunu

ve mineralizasyon sürecinde önemli olan ALP ve BMP-2 salınımını uyardığı belirtilmiştir (183).

Tablo 2.1: NeoMTA Plus ve NeoMTA 2 içerikleri (183)

NeoMTA Plus			NeoMTA 2	
Element	Ağırlık %	Atomik %	Ağırlık %	Atomik %
C	16,55	28,88	18,98	35,29
O	36,64	48,00	24,04	33,54
Al	0,31	0,24	0,31	0,25
Si	4,34	3,24	5,17	4,11
S	0,50	0,32	0,68	0,47
Ca	34,96	18,28	46,25	25,77
Ta	6,39	0,74	4,57	0,56

Çalışmada materyallerin biyomineralizasyon potansiyelleri Alirazin Red S boyaması kullanılarak belirlenmiştir. Çalışmaya göre NeoMTA 2 en yüksek mineralizasyon potansiyelini gösteren materyal olmuştur. Çalışmada tantal ve zirkonyum varlığının, insan pulpa kök hücrelerinde osteo/odontojenik farklılaşmasını desteklediği bildirilmiştir (192). NeoMTA 2'nin selefi NeoMTA Plus'a göre sergilediği daha yüksek mineralleşme potansiyeli, daha yüksek oranda tantalit ve farklı polimerlerle ilişkili olabileceği belirtilmiştir.

2.6. Biodentine

MTA'nın uzun sertleşme süresi kullanımındaki zorluklar, renklenmeye sebebiyet vermesi gibi bahsedilen dezavantajları piyasaya MTA'ya benzer özellikler içeren fakat dezavantajlarını ortadan kaldırmaya yönelik kalsiyum silikat esaslı pek çok materyalin sunulmasını sağlamıştır. MTA'dan sonra 2009 yılında dentin yerine geçebilen materyal olarak piyasaya sunulan "Biodentine" (Septodont, Saint Maur des Fosses, Fransa) bu materyaller arasında en çok dikkat çekenlerdendir (193).

2.6.1. Biodentine'in Kimyasal Yapısı

Biodentine kapsül içerisindeki toz ve pipet içerisinde bulunan likitten oluşur. Toz olan kısım MTA'ya benzer şekilde esas olarak trikalsiyum silikat, dikalsiyum silikat içerir. Biodentine yapısında bulunan trikalsiyum silikatın MTA'ya göre partikül boyutunun daha büyük olduğu ve MTA'da monoklinik formda bulunurken Biodentine'de triklinik formda olduğu bildirilmiştir (185). Toz yapıda bulunan zirkonyum oksit ise materyalin radyoopasitesini sağlamaktadır. Likit yapısında ise hızlandırıcı özellik sağlayan kalsiyum klorit ve suyu indirgeme özelliğine sahip hidrolize edilebilir bir polimer içermektedir (194,195). Bu polimerin materyalin viskozitesini azaltarak uygulanmasını kolaylaştırdığı bildirilmiştir (195).

Biodentine yapısında bulunan kalsiyum kloritin yanı sıra partikül boyutunun büyümüş olması ve likit kısmın azaltılması materyali öne çıkan hızlı sertleşme özelliğini kazandırmıştır. Solüsyon halindeyken materyal kalsiyum hidroksit salınımı ile karakterizedir (195). Aynı zamanda trikalsiyum silikat esaslı materyallerin sentetik doku sıvılarıyla temaslarında hidroksiapatit oluşturduğu bilinmektedir (196).

Biodentine'in hazırlanması pipet içindeki likitten toz kapsül içerisine 5 damla eklenmesi ve trituatörde 30 sn karıştırılmasıyla gerçekleşmektedir. Toz ve likitin karıştırılmasıyla oluşan tepkime sonucunda trikalsiyum silikatın içinde bulunduğu bir sementöz faz ve zirkonyum oksitin içinde bulunduğu radyopasite oluşturan bir faz oluşmaktadır. Toz yapıdaki kalsiyum karbonat çevresinde reaksiyonların oluşabilmesine elverişli bir ortam sağlayan bir nükleasyon alanı olarak görev yapmaktadır. Böylelikle hidrasyonun arttığı ve daha yoğun bir mikroyapı üretiminin mümkün kılındığı bildirilmiştir (185,197).

Biodentine'in hidratasyon reaksiyonu MTA'nın hidratasyon reaksiyonuna benzemektedir. Bu reaksiyon sonucunda kalsiyum silikat jel ve kalsiyum hidroksit oluşmaktadır.

Biodentine karıştırıldıktan sonra 6 dakika civarı çalışma süresine sahiptir. Başlangıç sertleşmesi 9-12 dakika gerçekleşirken son sertleşme 45 dakikada gerçekleşmektedir. 2014 yılında yapılan bir çalışmada diğer biyoseramik esaslı materyallere göre en kısa sürede sertleşen biyoseramik materyalin Biodentine olduğu belirtilmiştir (198).

Biodentine sertleştikten sonra yapısında trikalsiyum silikat, kalsiyum karbonat, zirkonyum oksit ve kalsiyum hidroksit bulunduğu bilinmektedir ve bu sayede Biodentine sertleşmesinin ardından kalsiyum hidroksit salınımı yapar (199). Kalsiyum hidroksit salınımının sekonder dentin oluşumu üzerine etkili olduğu bilindiğinden Biodentine dentin yerine geçebilecek uygun bir materyal olarak belirtilmiştir (200).

2.6.2. Biodentine'in Fiziksel Özellikleri

Biodentine'in radyoopasitesi toz içeriğine eklenen zirkonyum oksit tarafından sağlanır (201). Zirkonyum oksit tercih edilmesinin nedeni biyouyumlu bir materyal olması, çevre dokuları etkilemeyen ve çevre dokulardan etkilenmeyen biyo-inert bir materyal olması ve korozyona dirençli bir materyal olmasından kaynaklanmaktadır (201). Biodentine'in radyopasite değerinin 3.5 mm alüminyuma eşit olduğu belirtilirken MTA için bu değer 7.17 mm'dir (202,203). Diğer biyoseramik esaslı materyallerde değerlendirildiğinde Biodentine'in içlerinde en düşük değeri gösterdiği belirtilmiştir.

Biodentine'in çiğneme kuvvetlerine karşı direnci değerlendirildiğinde Vickers sertlik, bükülme dayanımı ve elastik modülü gibi özelliklerinin dentine benzer değerlerde olduğu bildirilmiştir (204). Sertleşmesinin ardından 24 saat içinde 200 MPa'ya ulaştığı bilinen basma dayanımı değeri bir ay sonrasında 300 MPa'ya ulaşır. Dentin için bu değer ise 297 MPa'dır (205). Yapılan bir çalışmada Biodentine'in basma dayanımı değerlendirilmiş ve çalışmada diğer materyallere göre daha yüksek basma dayanımı gösterdiği bildirilmiştir. Kuvvetlere karşı bu şekilde

dirençli olması ise araştırmacılar tarafında materyalin toz/likit oranı ile ilişkilendirilmiştir (185). Materyalin likiti içerisinde bulunan suda çözülebilir polimerin bu durumdan sorumlu olduğu düşünülmektedir (195). Ayrıca bu düşük likit oranının materyalin MTA'ya göre daha düşük oranda porözite göstermesiyle de ilişkilendirilmiştir (206).

Bağlanma dayanımı değerlendirildiğinde 24 saat sonra bağlanma değerinin maksimuma ulaştığı bilinmektedir. 2014 yılında yapılan bir çalışmada materyalin kana olan maruziyet sonrasında bağlanma dayanımı ve sertleşme reaksiyonunun etkilenmediği bildirilmiştir (207).

Farklı irrigasyon solüsyonlarının MTA ve Biodentine'in dentine bağlanma dayanımı üzerindeki etkileri incelenen bir çalışmada MTA Biodentine kıyasla daha az bağlanma dayanımı göstermiştir (208).

Biodentine'in 12, 5 olan pH değeri sayesinde kalsiyum ve silikon iyon salınımı yaptığı ve bu sayede dentin- sement ara yüzeyinde bir 'mineral infiltrasyon bölgesi' adı verilen ve sızdırmazlığı sağlamaya yardımcı bir ara tabaka oluşturduğu bulunmuştur (206).

Ayrıca Biodentine'in HA kristalleri oluşturduğu, böylelikle materyal ve dentin ara yüzeyinde sızdırmaz bir alan oluşturabildiği ve bu yeteneği sayesinde iyi bir marjinal adaptasyon gösterebildiği de bilinmektedir. Ayrıca bir çalışmada Biodentine'in optimum sızdırmazlık özelliğinin tükürükteki fosfat iyonları ve materyal içeriğindeki kalsiyum silikatın apatit çökeltisi oluşturmasından kaynaklanabileceği belirtilmiştir (209).

Materyalin sahip olduğu yüksek pH değerinin mikroorganizmalara etki ederek büyümelerini engellediği ve dentinde dezenfeksiyona yardımcı olduğu da bilinmektedir (205).

Zirkonyum oksitin renk bozulmasına sebebiyet vermemesi ve daha da önemlisi materyalin hidrasyonunu etkilememesi nedeniyle Biodentine'in MTA'ya kıyasla daha az koronal renk değişikliğine sebep olduğu öne sürülmüştür (174,179,210,211). Ayrıca MTA'dan farklı olarak Biodentine'in doğal diş rengine

daha yakın olması ve diş sert dokularında materyalin yarı saydam olmasının neden olduğu renk bozulmasının önüne geçme gibi avantajlara sahiptir (212).

Biodentine'in renk değişimini inceleyen bir sistematik derlemede kanla teması sonucunda Biodentine'de renk değişikliği olmasının oldukça olası olduğu bildirilmiştir. Materyalin diş sert dokularda sebep olabileceği renklenme içinse bu konuda MTA'dan daha başarılı olduğu ancak Biodentine'in sebep olduğu renklenme yoğunluğu ve sıklığıyla ilgili net bir sonuca ulaşamadığı bildirilmiştir (213).

Yine MTA ve Biodentine'in renk stabilitesinin karşılaştırıldığı bazı çalışmalarda Biodentine'in 6 aya kadar renk stabilitesini koruduğu ve daha az renklenmeye sebep olduğu da bildirilmiştir (214). Başka bir çalışmada ise Biodentine'in renklenmeye sebebiyet vermediği için estetik bölgelerde kullanılabileceği belirtilmiştir (194).

2.6.3. Biodentine'in Biyouyumluluğu

MTA'nın çeşitli dezavantajlarını ortadan kaldırmak üzere üretilen materyallerden biri olan Biodentine'in homojen, mükemmel sızdırmazlık gösteren, yüksek biyouyumluluk ve biyoaktivite gösteren bir materyal olduğu belirtilmektedir (176, 206).

Biodentine'in vital pulpa tedavilerinde; pulpa ile temas ettiğinde hücrelerin çoğalmasını, migrasyonunu ve tutunmasını sağladığı ve böylelikle başarılı sonuçlara ulaşıldığı bilinmektedir (215). Ayrıca fare pulpa hücrelerinde yapılan bir çalışmada Biodentine'in pulpal hücrelerin odontoblastlara farklılaşmasını uyardığı görülmüştür (216).

Biodentine'in furkasyon veya kök perforasyonlarını onarmak için kullanıldığında TGF-B1 salınımını artırır. Bu sayede erken mineralizasyonu uyararak anjiyogenezi, progenitör hücrelerin bölgeye ulaşmasını, hücrelerin farklılaşma potansiyelini artırarak iyileşme için uygun bir ortam sağladığı belirtilmiştir (207).

PDL hücreleri üzerinde yapılan bir çalışmada Biodentine'in grubunda MTA'ya göre daha fazla hücrenin hayatta kaldığı ve çoğaldığı gösterilmiştir. Bu durumda Biodentine'in içeriğindeki zirkonyum oksitin daha az toksik olmasının etkili olabileceği belirtilmiştir (217).

2.6.4. Biodentine'in Sert Doku Oluşturma Potansiyeli ile ilgili yapılmış araştırmalar

Kalsiyum silikat simanlar kanla kontaminasyonda rezorbe olmayan, hafif bozunabilirlik ve düşük çözünübilirliğe sahip, uygun fiziksel ve kimyasal özellikleri olan biyoaktif materyaller olduklarından günümüzde kök ucu rezeksiyonu, furkasyon ve kök perforasyonun tamirinde, apeksifikasyon tedavisi gibi kemikle ilişkili dental işlemlerde altın standart olarak kullanılmaktadır (218-222). Biyolojik açıdan sert doku oluşumunu uyaracak Ca^{+2} ve OH^- gibi iyon salınımı yapabilmeleri, kalsiyum fosfat ve kalsiyum apatiti çekirdeklendirebildikleri, osteojenik potansiyeli aktifleyerek kemik iliği stromal hücreleri, orofasiyal kemik iliği mezenşim kök hücreleri ve osteoblastlar gibi mineralizasyonda görevli hücrelerin farklılaşmasını sağlayabildikleri ve böylelikle mineral doku rejenerasyonunda önemli bir rol oynadıkları bilinmektedir (221,223).

Biodentine'in vital pulpa tedavisi ve kök perforasyonu gibi dental uygulamalarda sert doku oluşumunu indüklediği çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (207,216). Yapılan çeşitli çalışmalarda Biodentine'in periapikal cerrahi veya replantasyon sırasında kök ucu dolgu materyali olarak kullanımının ardından olumlu sonuçlar bildirmiştir (224,225).

Yine servikal kök rezorpsiyonu, internal kök rezorpsiyonu ve enflamatuvar eksternal kök rezorpsiyonu olan dişlerde Biodentine kullanımı sonrası kök rezorpsiyonlarının tedavisinde başarıyla kullanıldığını gösteren çeşitli çalışmalar mevcuttur (226,227).

Çeşitli vaka raporlarında tamamlanmamış vertikal kök kırığında Biodentine'in başarılı bir şekilde kullanıldığı gösterilmiştir (228-230). Yine pek çok çalışmada sementin açıldığı veya rezorpsiyon kaynaklı defektlerde de başarılı bir şekilde kullanıldığı gösterilmiştir. (Tablo 3).

ProRoot MTA, MTA Plus ve Biodentine'in tavşan tibial kemik defektlerinde osteoindüktif potansiyelini incelemek amacıyla yapılmış olan bir çalışmada Biodentine'in diğer materyallerle birlikte anjiyogenezi indüklediği, kemikte neoformasyon gösterdiği ve nekroz oluşumuna yol açmadığı gösterilmiştir. Enerji Dağıtıcı X-ışını analizi (ESEM-EDX) adı verilen bir yöntemle Biodentine grubunda yeni oluşan kemikte yüksek mineralizasyon derecesi olduğu gösterilmiştir. Çalışma sonunda Biodentine'in belirgin osteoindüktivite ve mineralizasyon özelliklerine sahip olduğu belirtilmiştir.

Yapılan histolojik analizler kemik içerisine yerleştirilen Biodentine, MTA Plus ve ProRoot MTA'nın kemik neoformasyonunu, osteoblast farklılaşmasını ve anjiyogenezi indüklediğini göstermiştir. Çalışmada MTA Plus ve ProRoot MTA'nın osteoprogenitör hücrelerin yerleşimi, osteoblastların farklılaşması ve kemik büyüme süreci için uygun bir iskele sağladığı gözlenirken, Biodentine farklı olarak yeni oluşan kemik ile yer değiştirmiştir (231).

2.7. Kollajen Membran

Periodontal rejeneratif tedavi yeni sement oluşumu, yeni periodontal ligament oluşumu ve yeni alveoler kemik oluşumunu içeren periodontal rejenerasyonun tamamlanmasını amaçlar. Bu tedavilerin çoğu ağırlıklı olarak yeni ataçman oluşumu ve yeni kemik oluşumunu içeren periodontal onarımla gerçekleşir. Bununla birlikte, periodontal rejenerasyonun yönlendirilmiş doku rejenerasyonu (YDR) ilkeleri kullanılarak indüklenebileceğine dair kanıtlar mevcuttur (232-234). YDR seçici hücre çoğalmasına dayanır, yani yarayı ilk çoğaltan hücre tipi rejenere dokunun doğasını belirler. Epitel büyümesini önlemek ve rejeneratif potansiyele sahip hücrelerin defekt bölgesini yeniden doldurması için yer açmak amacıyla periodontal defektin üzerini bir membran örter (235,236). Yönlendirilmiş kemik rejenerasyonu (YKR) da aynı prensibe dayanır ve kemiğin yenilenmesi için kemik ortamında izole bir alan yaratır (237). 20 yılı aşkın süredir yönlendirilmiş doku rejenerasyonu tedavilerinde kollojen membranların kullanıldığı bilinmektedir.

YKR üzerinde yapılan birçok çalışmada da membran kullanılan grupların kullanılmayan gruplara göre daha başarılı sonuçlar verdiği gösterilmiştir (238,239) Dental implant uygulaması öncesi yapılan alveoler kemik sırtı rekonstrüksiyonunda defekt bölgesinin üzerine yerleştirilen membran bölgeyi çevredeki yumuşak dokulardan izole eder. Bölgede öncelikli olarak kemik progenitör hücreleri, osteoblastlar ve diğer rejeneratif faktörlerin popülasyonunu teşvik eder (240).

Kullanılan membranlar üretilen malzenin kimyasal yapısına göre; sentetik polimerler e-politetrafloroetilen, polilaktik asit, poliglikolik asit, sentetik ve doğal kollajen, metaller (titanyum) ve inorganik bileşikler (kalsiyum sülfat) olarak sınıflandırılabilir (241). Aynı zamanda materyalin rezorbe olmasına göre rezorbe olan veya olmayan olarak da sınıflandırılabilir. Kollajen membranlar hem YDR hem de YKR prosedürlerinde kullanılan en popüler bariyerdir. Bu amaçla kullanılan kollajen özellikle domuz ve sığır olmak üzere farklı hayvan türlerinden elde edilebilir (242).

Kollajen, göç eden epitel hücreleri için bir bariyer görevi görebileceğinden, erken vasküler büyüme için fibriler bir iskele görevi gördüğünden ve PDL fibroblastları için kemotaktik olduğundan YDR için uygun görünmektedir (243). Yapılan klinik çalışmalarda, kemik içi defektlere greftle veya greftsiz olarak uygulanan kollajen membranın başarılı kemik rejenerasyonu sağladığı bildirilmiştir (242,244).

Bio-Gide (Geistlich Pharma, İsviçre) çapraz bağlı olmayan doğal bir kollajen membrandır. Bio-Gide, yumuşak dokuya bakan ve bir doku bariyeri görevi gören kompakt bir tabaka ve kemik dokusu entegrasyonuna izin vermek için süngerimsi ve gözenekli olan ikinci bir tabakaya sahip iki tabakalı bir bariyerdir (245). Üretici firmanın açıklamalarına göre insan kollajenine yüksek benzerlik gösteren ürün aynı zamanda yüksek biyouyumluluk gösterir. Hidrofilik özelliği yüksek olan ürünün greft ve çevreleyen kemiğe adaptasyonunun iyi olduğu belirtilmiştir. Gerilme kuvvetlerine dayanımının iyi olduğu ve suturela fiksasyona izin verdiği de firma tarafından belirtilmiştir (246).

Wistar ratlar üzerinde yapılan bir çalışmada çapraz bağlı birçok membran kullanılmış ve bu membranların vaskülerizasyon, doku integrasyonu ve yabancı

hücre reaksiyonları değerlendirilmiştir. Çalışma sonucunda en yüksek doku entegrasyonu ve vaskülerizasyonunu Bio-Gide'ın gösterdiği sonucuna ulaşılmıştır (247).

Bu çalışmada yeni geliştirilen NeoMTA 2 materyalinin kök veya furkal perforasyonlarda kemikle temasında kullanımının kemik iyileşmesi üzerindeki etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Wistar ratlarda oluşturulan kritik boyutlu kemik defektlerine yerleştirilen materyallerin kemik iyileşmesi ve sert doku oluşumu üzerindeki etkilerinin incelenmesi, böylelikle yeni geliştirilen NeoMTA 2'nin kemikte temasında gözlenecek değişikliklerin literatüre katkı sağlaması amaçlanmıştır.

Başlangıç hipotezimiz, çalışmaya dahil edilen materyaller arasında kemik iyileşmesi yönünden bir fark bulunmayacağı yönündedir.

3. GEREÇ ve YÖNTEMLER

Çalışmanın etik kurul onayı Afyonkarahisar Kocatepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan (AKUHADYEK) alınmıştır. (49533702/17 sayılı karar) Çalışma, Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 22.DUS.004 nolu proje olarak desteklenmiştir.

Bu çalışma; deneysel, histolojik ve immühistokimyasal olarak üç bölüm altında gerçekleştirilmiştir. Deneysel kısmı, Afyon Kocatepe Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde, histolojik ve immünohistokimyasal değerlendirmesi ise Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda yapılmıştır.

3.1. Deney Hayvanları

Çalışmayı Afyon Kocatepe Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde bulunan wistar cinsi, ortalama ağırlıkları 200-250 gr arasında değişen, ortalama 6-8 haftalık (1,5-2 aylık) erkek wistar albino ratlar oluşturdu. Ratlar rastgele örnekleme yöntemi ile seçilerek 6 grupta eşit sayıda olacak şekilde toplam n=42 hayvan kullanıldı.

3.2. Oluşturulan Çalışma Gruplarının Tanımı

Deney hayvanları her grup da 7 adet deney hayvanı bulunacak şekilde 6 gruba ayrıldı. Kontrol grubunda bulunan deney hayvanlarına normal diyet (standart rat yemi) ve normal içme suyu verildi. Oda ısısı 22 ± 2 °C' de sabit tutuldu. Bulundukları odanın nem oranı % 30-45 arasında tutularak, odanın havalandırılması filtre edilerek, kontaminasyon riski önlendi. Ratlar kafeslerde grup olarak ve altlarında talaş olacak şekilde barındırıldı.

Ratlar arasından rastgele seçilen her bir grupta yedişer rat olacak şekilde altı grup oluşturuldu;

1. Kontrol Grubu
2. Membran Grubu
3. MTA grubu
4. MTA + Membran Grubu
5. Biodentine Grubu

6. Biodentine + Membran Grubu

Tablo 3.1: Deney grupları ve denek sayısı dağılımı

Gruplar	Grup Başına Hayvan adedi
Kontrol	7
Membran	7
MTA	7
MTA + Membran	7
Biodentine	7
Biodentine + Membran	7

3.3.Cerrahi prosedür

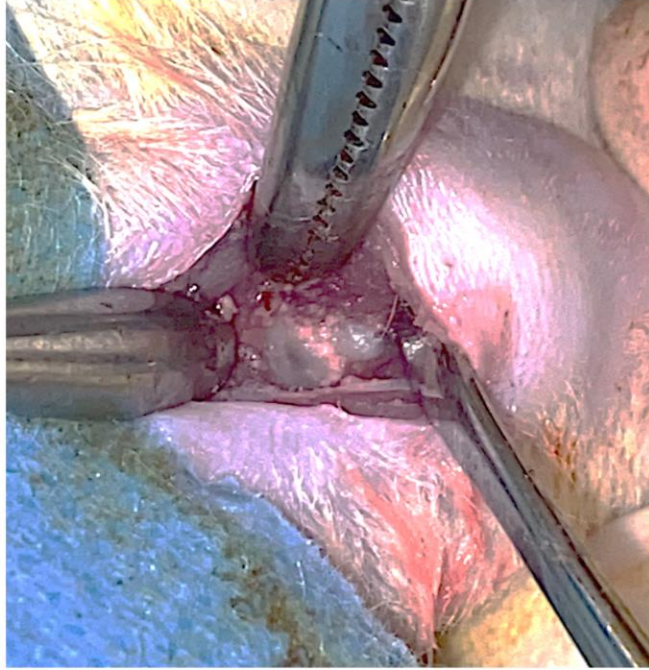
Rat mandibulalarının bukkal yüzeyi cerrahi eksizyonla muko-periosteal flep kaldırılarak açığa çıkarıldı. Sabit salin irrigasyonu altında 300 rpm'de çalışan frezler ve Gracey küretler aracılığıyla mandibula bukkal yüzeyinde dehissens tipi defektler oluşturuldu. Neo Mta Plus (Avalon Biomed Inc., Bradenton, FL, ABD) ve Biodentine (Septodont, Saint Maur des Fosses, France) üretici talimatlarına göre siman camı üzerinde karıştırıldı. Hazırlanan MTA paslanmaz çelik bir spatula yardımıyla manuel olarak defekt üzerine yerleştirildi. Kontrol grubundaki defektler kendiliğinden iyileşmelerinin takip edilmesi amacıyla boş bırakıldı. Materyaller yerleştirildikten sonra flepler dikkatli bir şekilde yeniden konumlandırıldı ve 4-0 ipek sütür ile dikildi. Sütürler operasyondan 2 hafta sonra uzaklaştırıldı. İyileşme süresini gözlemlemek için günlük kontroller yapıldı ve yara iyileşmelerinde görülen ilerleme dönemsel kaydedildi.



Şekil 3.1: Operasyon sahasının povidon iode solüsyonu ile asepsisinin sağlanması



Şekil 3.2: Deri ve deri altı ensizyonu



Şekil 3.3: Kritik boyutlu kemik defektinin hazırlanması



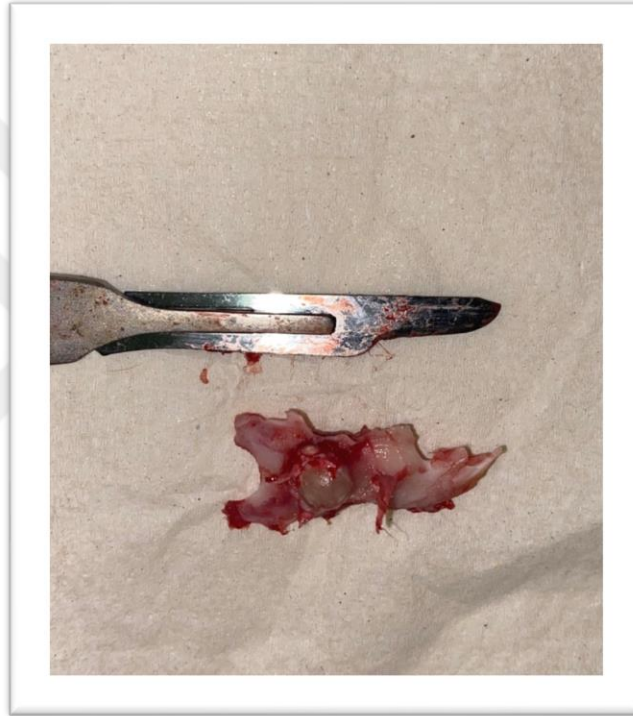
Şekil 3.4: MTA'nın kritik boyutlu kemik defektine yerleştirilmesi



Şekil 3.5: Operasyon sahasının 4/0 ipek iplikle suture edilmesi

3.4.Sakrifikasyon

12 haftalık deney süresinin sonunda hayvanlara %10'luk Ketamin (45 mg/kg Ketazol, İnterhas, Ankara, Türkiye) ve %2'lik Ksilazin (5 mg/kg, Alfazyne, Egevet, İzmir, Türkiye) intra-peritoneal olarak enjekte edilerek anestezi sağlandı, denekler yeterli derinlikte anestezi sağlandıktan sonra intrakardiyak kan alınması yöntemiyle sakrifiye edildi. Histolojik değerlendirme ve immunohistokimyasal boyamalar için sıçanların mandibula kemikleri toplandı.



Şekil 3.6: Sakrifikasyon sonrası toplanan mandibula örneği

3.5. Dokuların Histolojik Aşama İçin Hazırlanması

Elde edilen örnekler, %10'luk tamponlanmış formalin solüsyonunda 48 saat fikse edildi. Histolojik inceleme için kesitler 65^o'de etüv içinde deparafinize edilip, sırasıyla 30'ar dakika ksilol ve alkolde bekletildikten sonra çeşme suyunda yıkandı ve hematoksilen (H&E) solüsyonunda bekletildi.



Şekil 3.7: Tespit solüsyonuna alınan mandibula örneği

3.5.1. Tespit ve Dekalsifikasyon

Kemik doku örnekleri tamponlu nötral formalin solüsyonunda 48 saat tespit edildi. Tespit aşamasını takiben dokular %15'lik EDTA solüsyonu 1 ay süre ile tespit edildi.

3.5.2. Doku Takibi

Dokular bir gece akan musluk altında yıkandı. Dokular sırasıyla %80, %70 ve %50 dereceli alkol serisinden birer saat aralıklarla geçirilerek suyu uzaklaştırıldı (dehidrasyon). Daha sonra sırasıyla Ksilen 1, Ksilen 2, Ksilen 3 solüsyonlarına yerleştirilerek dokular ksilende parlatıldı. 56-58 °C'de eriyen parafinin ksilen ile yer değiştirerek dokuya nüfuz etmesi sağlandı ve dokular parafine gömüldü. Kesit alma işlemi için jelatinli lamalar hazırlandı. 5 dakika jelatin solüsyonunda bekletilen lamalar

1 gece kurutuldu. Mikrotom ile 6 µ'luk kesitler alındı. Jelatin ile kaplı lamlara çekildi. Oda ısısında kurumaya bırakıldı.



Şekil 3.8: Dehidratasyon işlemi için dokuların alkol serilerinden geçirilmesi



Şekil 3.9: Parafin blok hazırlanan dokuların görüntüsü



Şekil 3.10: Hazırlanan parafin bloklardan mikrotom ile kesit alınması



Şekil 3.11: Alınan kesitlerin jelatinli lamlara çekilmesi

3.6. Değerlendirme Yöntemleri

3.6.1. Histoloji

Elde edilen kesitler inceleme için Masson Goldner üçlü boyama yöntemi kullanılarak boyanmıştır. Boyanan kesitler entellan ile kapatıldı. Kesitler kemik iyileşmesi, yeni kemik oluşumu açısından iki gözlemci tarafından mikroskop (Olympus BX50) altında incelendi Olympus DP25 dijital kamera ile fotoğraflandı.

Orijinal yöntemler öncelikle kollajen ve kas liflerini ayırt etmek için kullanılmıştır. Kullanılan boyalar farklı moleküler boyutlara sahiptir ve her bir dokunun farklı şekilde boyanmasını sağlar.

Masson-Goldner boyama tekniği formalinle sabitlenmiş materyal kullanılarak gerçekleştirilebilir. Çekirdeğin Weigert'in demir hematoksileniyle boyanmasını takiben kas, sitoplazma ve eritrositler gibi bileşenler azofloksin ve orange-G solüsyonu ile boyanır. Bağ dokusu daha sonra light green SF solüsyonu kullanılarak karşı boyanır (248).

Tablo 3.2: Masson Goldner Trikróm ile Dokular ve Boyanan Renkler

Doku	Boyanan renk
Çekirdekler	Koyu kahverengi - siyah
Sitoplazma	Kiremit kırmızısı
Kaslar	Parlak kırmızı
Bağ Dokusu	Yeşil
Eritrositler	Parlak turuncu

3.6.1.1. Kimyasallar

- Hematoksilin krist (Hematoxylin crystals) (Merck, 70225752)
- Demir-3-Klorür (Merck, 1.03946. 2500)
- Hidroklorik asit (HCl) (Best Kimyasalları)
- Masson Goldner Boya Kiti (Sigma-Aldrich, 100485)
- Entellan (Merck, 1.07961.0100)

3.6.1.2. Solüsyonlar

Weigert Hematoksilen Solüsyonu

Solüsyon A

- Hematoksilen krist :1 g
- %95 Alkol :100 ml

Solüsyon B

- Distile su :90 ml
- Demir-3-Klorür :1 ml
- HCl :1 ml

A ve B solüsyonları eşit miktarlarda karıştırıldı.

Masson Goldner Üçlü Boya Kiti

- Reagent 1, Azofloksin solüsyonu :
- Reagent 2, Tungstoposphoric asid orange G solüsyonu
- Reagent 3, Ligth green SF solüsyon
- Reagent 4, %10 Asetik asit

3.6.2. İmmünohistokimyasal Yöntem

İmmünohistokimyasal yöntem olarak İndirekt Streptavidin-Biotin Peroksidaz yöntemi uygulandı. Primer antikor olarak VEGF Ab-1 (NeoMarker RB-222-P) ve Osteopontin (Santa Cruz Biotechnologysc-21742) 1/50 oranında dilüe edilerek kullanıldı. Zıt boyama olarak Hematoksilen (H) boyama yapıldı. Boyanan kesitler etellan ile kapatıldı. İmmünohistokimyasal değerlendirme; hedef dokunun boyanıp boyanmamasına, hedef doku yapılarının hangi bölümlerinin boyandığına ve oluşan boyanma yoğunluğuna bakılarak yapıldı.

Elde edilen kesitler deparafinize ve rehidrate etmek amacıyla ksilen ve azalan derecede alkol serilerinden geçirildi. Antijen retrievel (antijenlerin açığa çıkarılması) işlemi için 20 dk Tripsin (37°C'de) uygulandı. Fosfat tampon solüsyonu (PBS) ile yıkanan kesitler endojen peroksidaz aktivitesinin giderilmesi için H₂O₂ (Merck, 1.08600.2500) (%35) 10 dk uygulandı. Kesitler yeniden PBS ile yıkandı. Normal preparatlara primer antikor, negatif kontrol preparatlarına ise sadece antikor dilüent konuldu. +4°C'de 1 gece (16 saat) inkübe edildi. Yeniden PBS ile yıkanan kesitler

10 dk Biotinlenmiş sekonder antikorda (Biotinylated Goat Anti-Polyvalent Broad Spectrum, Thermo TP-015-BN) bekletildi. Sonrasında PBS yıkama yapılan kesitlere 10 dk. Horseradish peroksidaz enzim (Streptavidin Peroxidase, Thermo TS-015-HR) uygulandı. Yine PBS ile yıkanan kesitler 3 dk DAB substrat-kromojen solüsyonunda (Vector 4100) bekletildi. 5 dk distile suda beklenerek yıkanan kesitlere sonrasında Hematoksilen (Bestlab, BS-001) ile zıt boyama yapıldı. Boyama sonrası alkol ve ksilen serilerinden geçirilen kesitler etellan kullanılarak kapatıldı.

Çalışmada, incelenen kesitlerde grup içi varyasyonlar nedeniyle semi-kantitatif değerlendirme yapıldı. İmmunreaksiyonlar; negatif, zayıf, orta ve şiddetli olarak tanımlandı.

3.6.2.1. Kimyasallar

- Tripsin (Sigma, T4709-5G)
- Hidrojen peroksit (%35) (Merck, 1.08600.2500)
- Serum Bloking (Large Volume Ultra V Block, Thermo TA-015-UB)
- Antikor dilüent (Zymed 00-3118)
- Primer antikor
 - VEGF Ab-1 (NeoMarker RB-222-P)
 - Osteopontin (Santa Cruz Biotechnology , sc-21742)
- Sekonder antikor (Biotinylated Goat Anti-Polyvalent Broad Spectrum, Thermo TP-015-BN),
- Horseradish peroksidaz enzimi (Streptavidin Peroxidase, Thermo TS-015-HR),
- Substrat-kromojen (DAB) (Vector 4100)
- PBS (Phosphate buffer solution= fosfat tampon solüsyonu)
- Hematoksilen ((Bestlab, BS-001))
- %100 Alkol (Merck, 1.00986.2500)

3.6.2.1. Solüsyonlar

PBS

- Sodyum klorid, NaCl :7,20 g
- Sodyum dihidrojen fosfat, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$:0,43 g
- Disodyum dihidrojen fosfat, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$:1,48 g
- Distile su :1000 ml

Tripsin enzim solüsyonu

Tripsin stok solüsyonu (-20 °C)

- Tripsin :50 mg
- Distile su :10 ml

CaCl stok solüsyonu (+4 °C)

- CaCl :50 mg
- Distile su :10 ml

Çalışma Solüsyonu (pH: 7.4)

- Tripsin stok solüsyonu : 1 ml
- CaCl stok solüsyon : 1 ml
- Distile su : 8 ml

Hidrojen Peroksit

- Distile su :64 ml
- %35'lik hidrojen peroksit :4 ml

Primer Antikor (IGF-I, IGF-IR)

VEGF: 1/50

- VEGF primer antikor :1µl
- Antikor dilüent solüsyonu :49 µl

Osteopontin: 1/50

- Osteopontin primer antikor :1µl
- Antikor dilüent solüsyonu :49µl

Substrat- Kromojen Solüsyonu

- Distile su :5 ml
- Buffer stok solüsyon :2 damla
- DAB substrat reagent :4 damla
- Hidrojen peroksid :2 damla



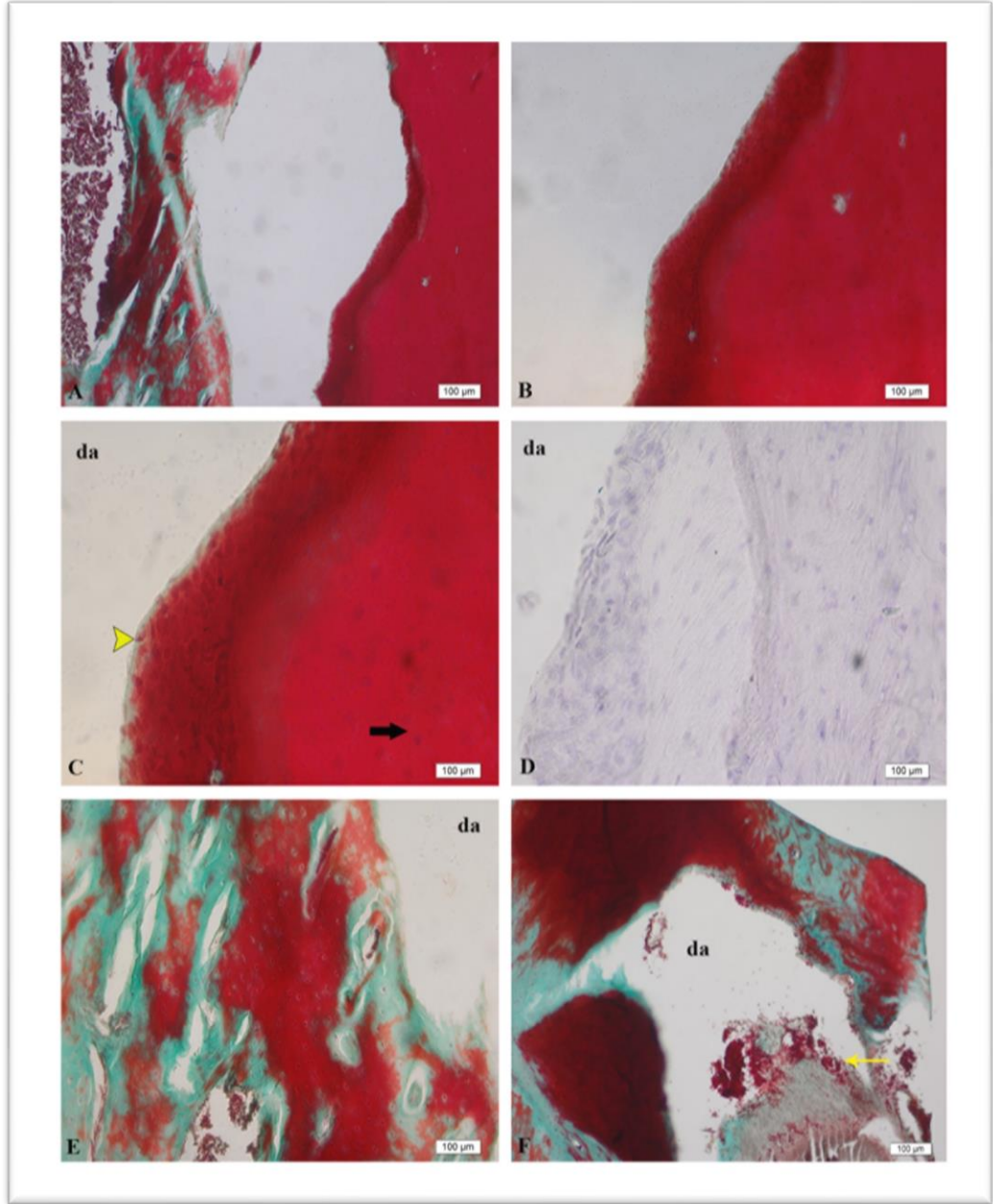
4. BULGULAR

4.1 Klinik Bulgular

Deneyisel çalışma sırasında ratların cerrahi operasyonu iyi tolere ettiği görölmüştür. Deney süresinde membran grubundaki bir rat kaybedilmiştir. Bunun dışında ratların beslenmeleri için ağırlıkları kontrol edilmiş ve beslenmede bir problem yaşamadıkları görölmüştür. Operasyona bağlı herhangi bir enfeksiyon gerçekleşmemiştir. Deneklerin genel sağlık durumlarının iyi olduğu görölmüştür.

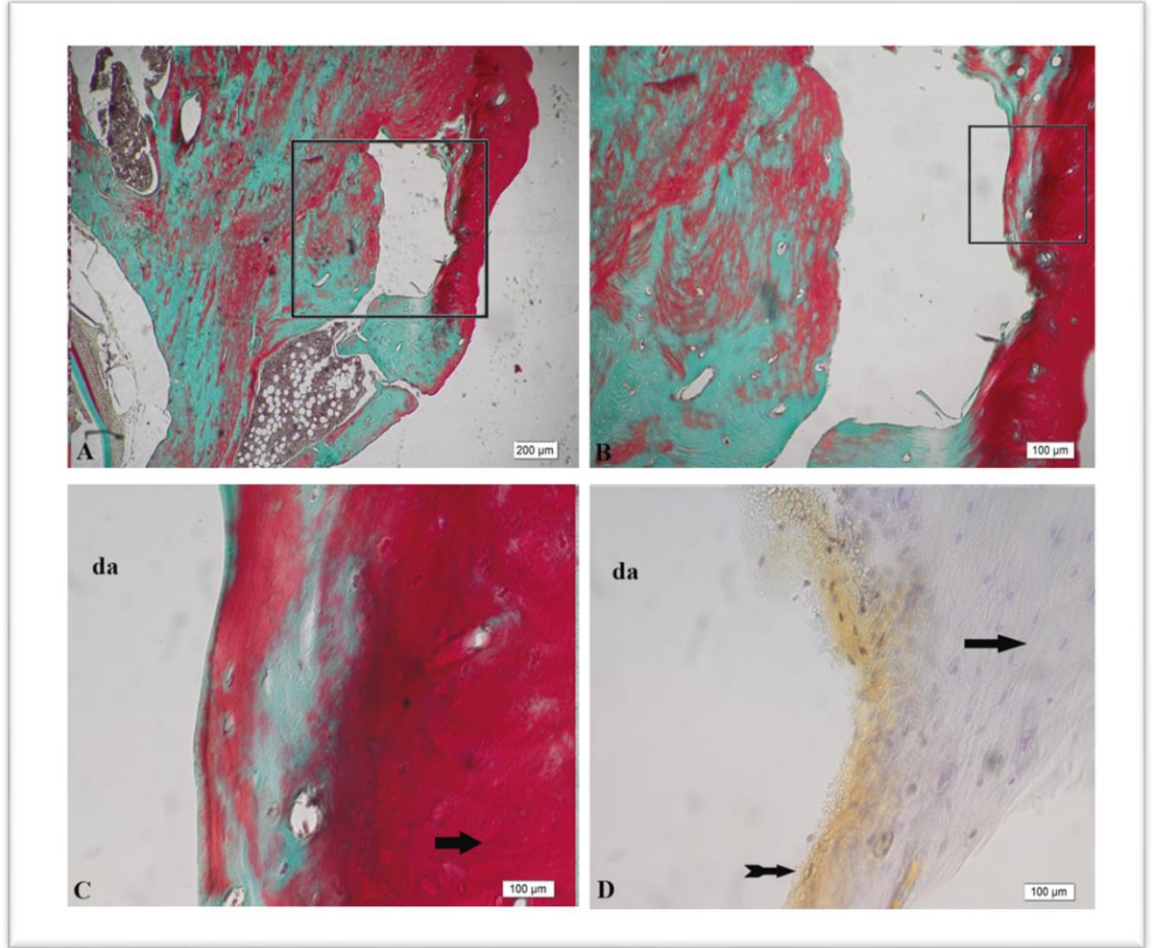
4.2 Histolojik Değerlendirme

Kontrol Grubu: Kontrol grubunda defekt alanları tamamen kapanmamıştı (Şekil 4.1). Kontrol grubunda defekt alanını dolduran materyal kullanılmadığından defekt alanının boşluk şeklinde varlığını sürdürdüğu gözlemlendi. Defekt alanının çevresinde bol miktarda kırmızı renkte kemik neoformasyonları gözlemlendi. Bazı kesitlerde defekt alanlarının çevresinde süngerimsi kemik oluşumu gözlemlendi. İmmunohistokimya boyamasında, osteopontin pozitif alanlar yeni ekspresyon alanlarını gösterdi. Kontrol grubunda bazı kesitlerde defekt alanının iç yüzünü bir bölümünü sınırlandıran yangı hücre toplulukları saptandı.



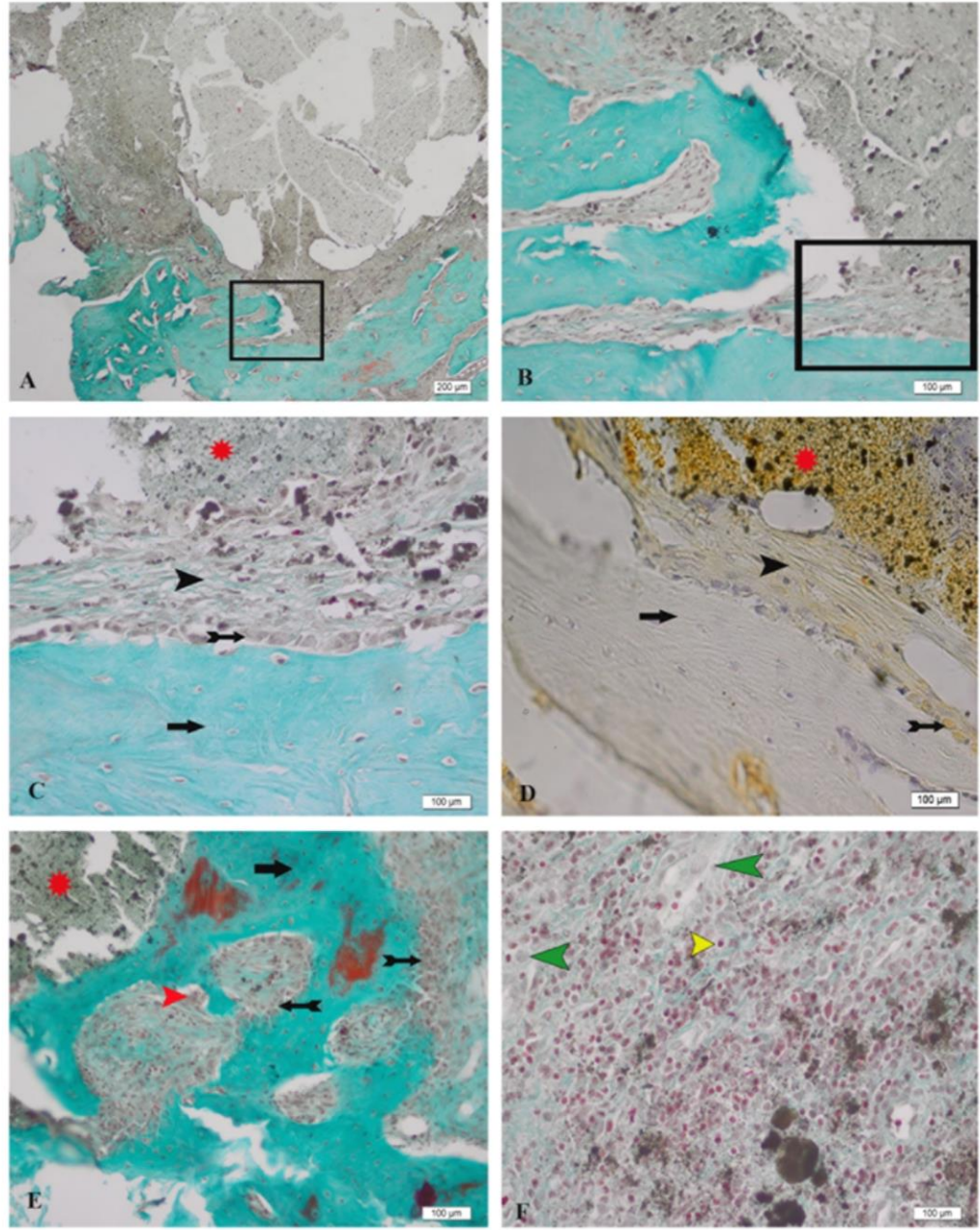
Şekil 4.1: Kontrol Grubunda Masson Goldner Trikom boyaması (A, B, C, E, F) ve Osteopontin İmmunreaksiyonları (D). (*da*: Defekt alanı, *siyah ok*: kemik doku, *sarı ok başı*: yangı hücresi, *sarı ok*: eritrosit)

Membran Grubu: Bu grupta da kontrolde olduğu gibi defekt alanının varlığını devam ettirdiği görüldü (Şekil 4.2). Membrana ait yapılar belirlenemedi. Bununla birlikte bazı kesitlerde defekt alanlarında yağ hücrelerinden zengin gevşek bağ dokusu parçaları gözlemlendi. Defekt alanlarının çevresinde yer alan kemik-bağ doku arayüzündeki hücrelerde OPN işaretlemesinde orta şiddette reaksiyon görüldü.



Şekil 4.2: Membran Grubunda Masson Goldner Trikrom boyaması (A, B, C, E, F) ve Osteopontin İmmunreaksiyonları (D). (**da:** Defekt alanı, **siyah ok:** kemik doku, **kuyruklu ok:** osteogenez alanlarında kemik-bağ doku arasında yer alan hücreler)

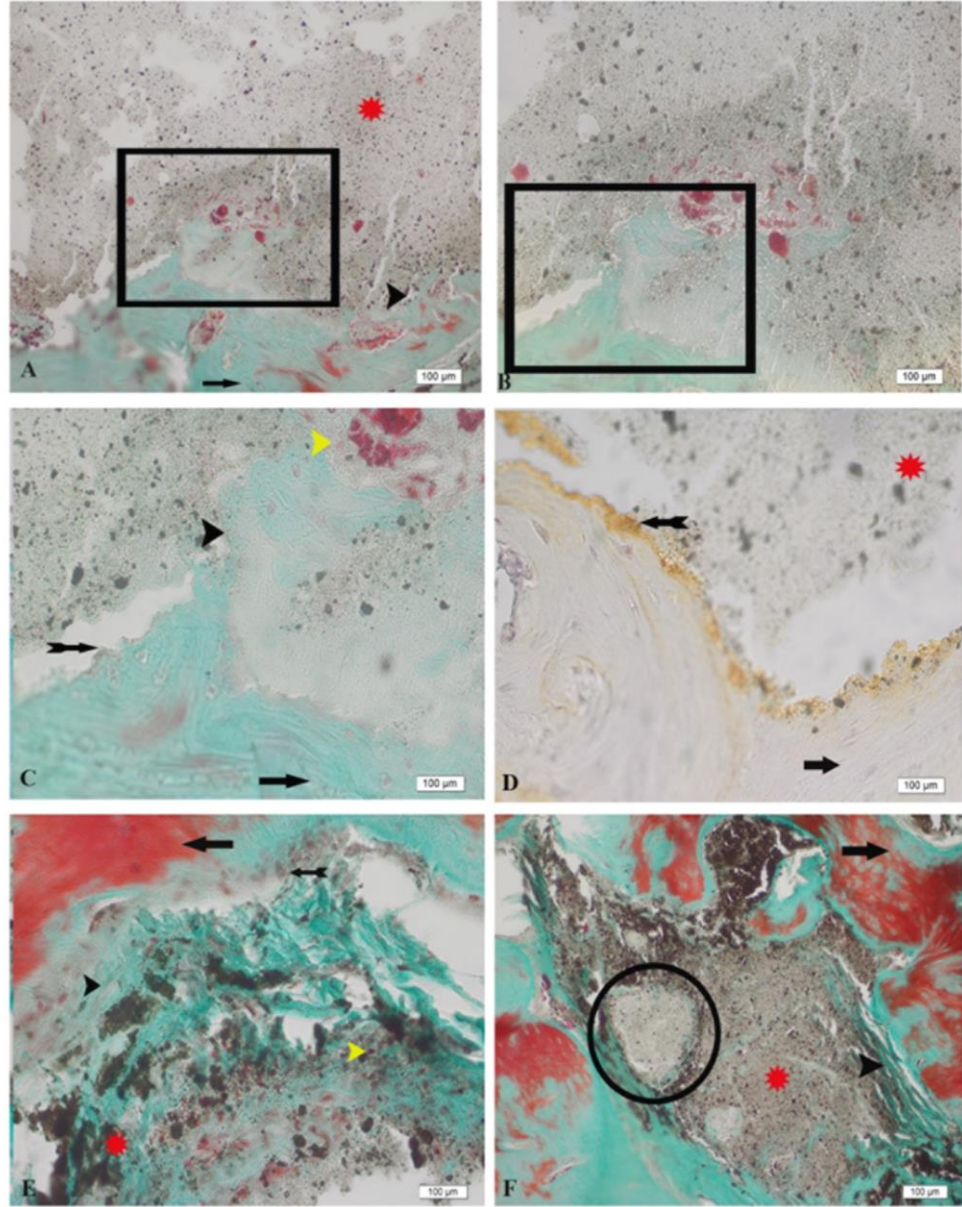
MTA grubu: Kemik defekt alanlarında MTA kolaylıkla belirlendi (Şekil 4.3-B). MTA incelendiğinde içeriğinde diğer alanlara göre daha koyu boyanan parçacıklar şeklinde küçük MTA bileşenleri görüldü. Kemik dokusu ve MTA'nın direkt temasının olduğu osseintegrasyonlar mevcuttu. Yer yer MTA ile kemik doku arasında bir bağ dokusu gözlemlendi (Şekil 4.3. C). Bu bağ dokunun, MTA'yı ve çevredeki kemik dokuyu sıkı bir şekilde birbirine bağladığı saptandı. Bağ dokusu MTA içlerine doğru girdiği belirlendi. MTA'yı çevreleyen kapsülde kollajen iplikler düzenli seyrederken, MTA içlerine giren bağ dokusunun ağ benzeri yapılar yaptığı görüldü. Bağ dokusunun, MTA'nın iç kısımlarında MTA'nın etrafını küçük parçalar halinde sardığı ve küçük MTA alanları oluşturduğu gözlemlendi. MTA'nın iç kısımlarında küçük parçalar halinde kemik alanlarının olduğu gözlemlendi. (Şekil 4.3. C). İmmunohistokimya boyamalarda, kemik doku ve MTA arasında yer alan bağ dokusuna ait hücrelerde zayıf şiddette immunreaksiyon gözlemlendi. Kemik-biomateryal arasında yer alan hücrelerde de zayıf ile orta arasında değişen şiddette osteopontin reaksiyonu belirlendi. (Şekil 4.3. D). Masson Goldner Trikrom boyamasında da kemik yüzeyinde belirlenen bu hücrelerin osteogenez sürecinde yer alan osteoblast ve/veya osteoklast hücrelerine benzer morfolojide oldukları görüldü. Çoğunluğunu plazma hücrelerinin oluşturduğu inflamatuvar hücreler belirlendi (Şekil 4.3. F). Kırmızı boyanan eritrositleri içeren yeni damar görüldü.



Şekil 4.3: MTA Grubunda Masson Goldner Trikróm boyaması (A, B, C, E, F) ve Osteopontin İmmünreaksiyonları (D). (*Siyah ok:* kemik doku, *siyah ok başı:* materyali çevreleyen bağ doku, *kuyruklu ok:* osteogenez alanlarında kemik doku yüzeyinde yer alan hücreler, *kırmızı yıldız:* MTA materyali, *sarı ok başı:* plazma hücresi, *yeşil ok başı:* makrofaj, *kırmızı ok başı:* osteoklast)

Biodentine Grubu: Kemik defekt alanları belirlendi. Açık gri boyanan Biodentine içerisinde siyah renkte boyanan bileşikler mevcuttu. Osseointegrasyon alanlarının yanı sıra kemik (Şekil 4.4 - A,B) ve Biodentine arasında bağ dokunun bulunduğu bölgeler mevcuttu. Bağ doku, Biodentine'in içlerine girdiği görüldü. Bağ dokusu iplikleri arasında siyah Biodentine parçaları yer aldığı saptandı. (Şekil 4.4 -E) Bazı kesitlerde Biodentine'in bağ doku ile sarılı küçük alanlara ayrıldığı gözlemlendi. Bu alanlarda siyah Biodentine parçalarının daha az olduğu görüldü. (Şekil 4.4 -F). Biodentine'in çevresinden içeriye doğru kemik büyümeleri belirlendi. Bu kemik dokuların yüzeyinde yer alan hücrelerde Osteopontin immunreaksiyonu gözlemlendi. Defekt alanında inflamatuvar hücrelerle birlikte eritrositler gözlemlendi (Şekil 4.4 - E)

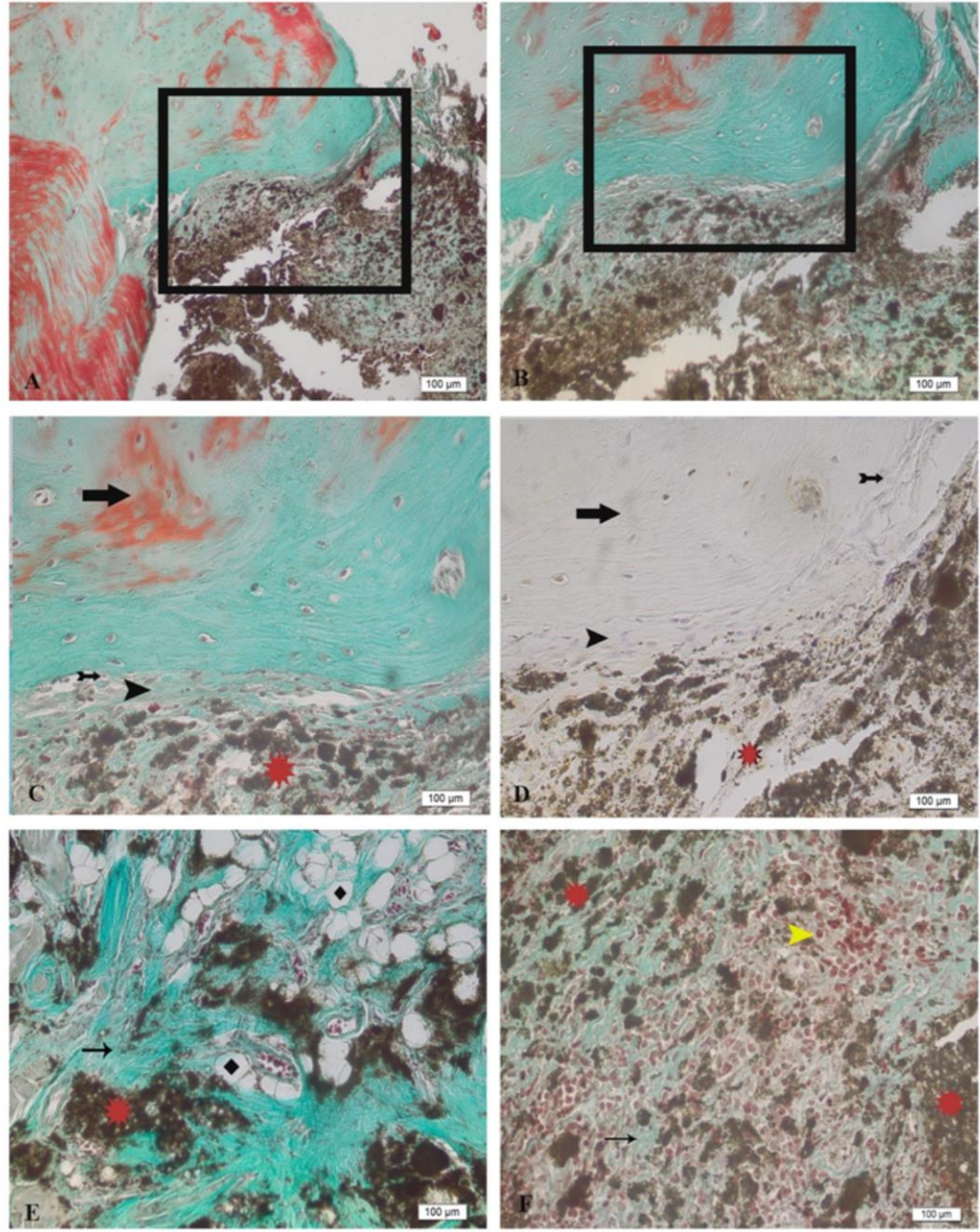




Şekil 4.4: Biodentine Grubunda Masson Goldner Trikrom boyaması (A, B, C, E, F) ve Osteopontin İmmünreaksiyonları (D). (**Siyah ok:** kemik doku, **kuyruklu ok:** osteogenez alanlarında kemik yüzeyinde yer alan hücreler , **kırmızı yıldız:** Biodentine materyali, **sarı ok başı:** plazma hücresi, **daire:** bağ doku ile parçalara ayrılmış Bioedentine alanları)

MTA-Membran: Defekt alanı MTA'nın varlığı ile kolayca belirlendi. MTA'nın etrafı kemik doku bazı alanlarda bağ doku ile çevrili olduğu görüldü. Çevrede yer yeni kırmızı boyanan kemik neoformasyonları mevcuttu. Kemik doku sınırındaki hücrelerden negatif ile zayıf arasında değişen osteopontin immunreaksiyonu saptandı. MTA'nın arasında yer alan yoğun bağ doku dikkat çekti. Bu bağ dokusu kesitlerde yağ hücrelerinden zengin gevşek bağ doku özelliğindeydi. Bağ dokularının içinde yangı hücreleri görüldü.

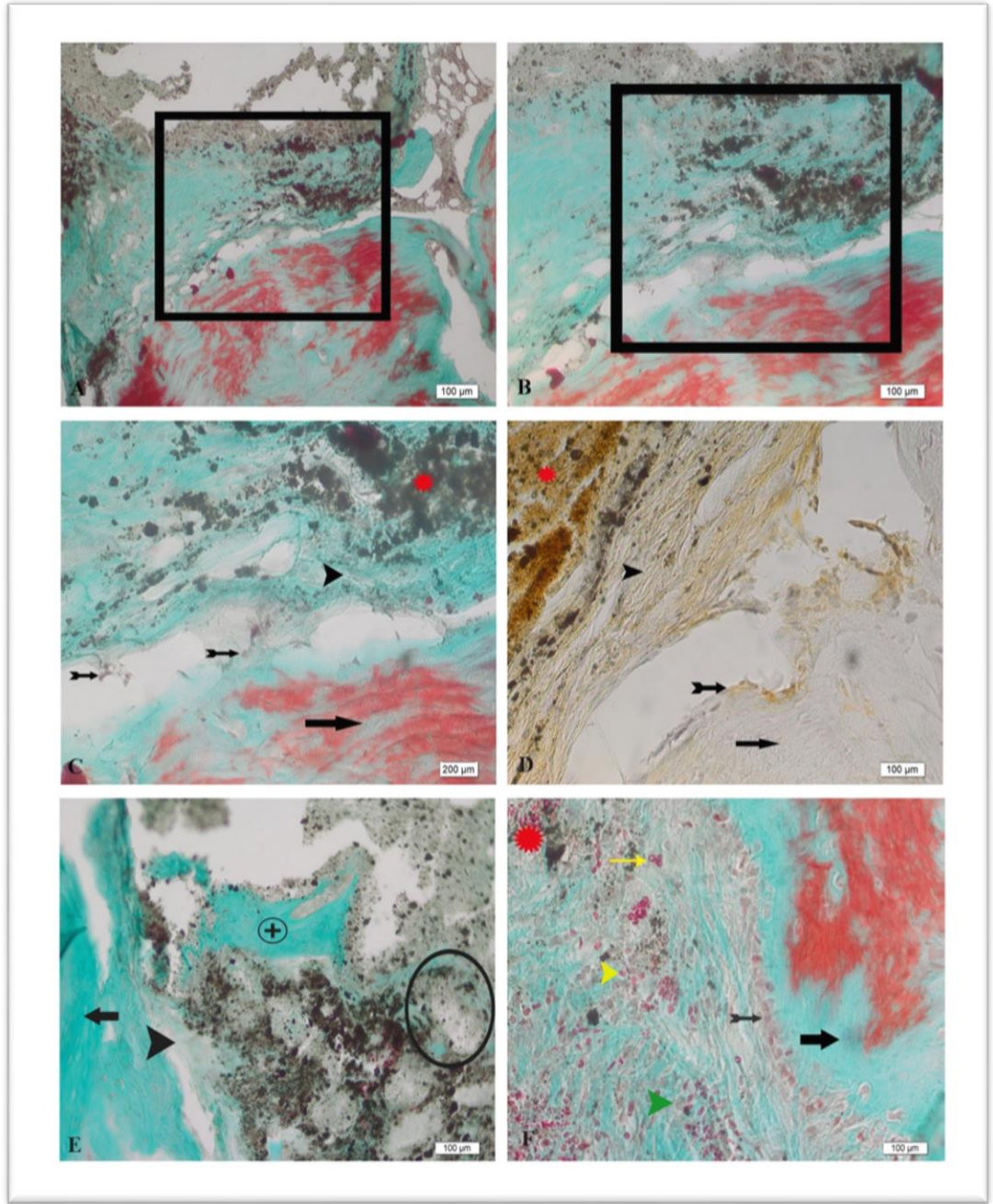




Şekil 4.5: MTA-Membran Grubunda Masson Goldner Trikrom boyaması (A, B, C, E, F) ve Osteopontin İmmünreaksiyonları (D). (**Siyah ok:** kemik doku, **kuyruklu ok:** osteoblast, **kırmızı yıldız:** MTA materyali, **kuyruklu ok:** yeni oluşan kemik alanlarında kemik-bağ doku sınırında yer alan hücreler, **siyah ok başı:** materyali çevreleyen bağ doku, **sarı ok başı:** plazma hücresi, **ince siyah ok:** materyal içerisine uzanan bağ doku, **baklava dilimi:** yağ hücreleri)

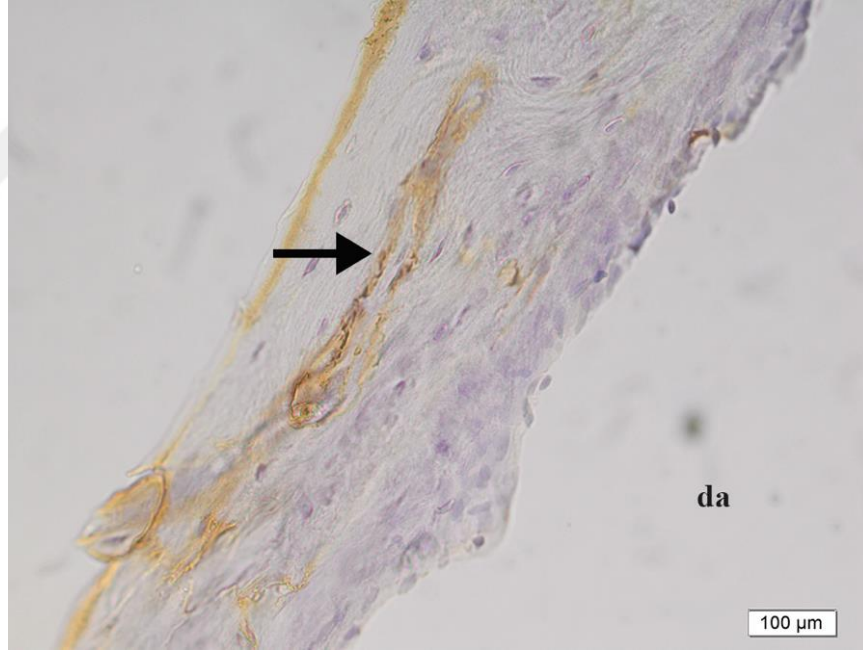
Biodentine - Membran: Defekt alanında açık gri alanlar ve siyah parçalar şeklinde Biodentine gözlendi. Biodentine'in aralarına bağ dokusunun girmiş olduğu belirlendi. Küçük kemik oluşumları saptandı. Osteopontin immun boyamasında kemik yüzeyindeki hücreler orta şiddette reaksiyon gösterdi. Bağ dokusunda da osteopontin immunreaksiyonları saptandı. Bazı kesitlerde yangı hücreleri varlığını sürdürdüğü gözlendi.



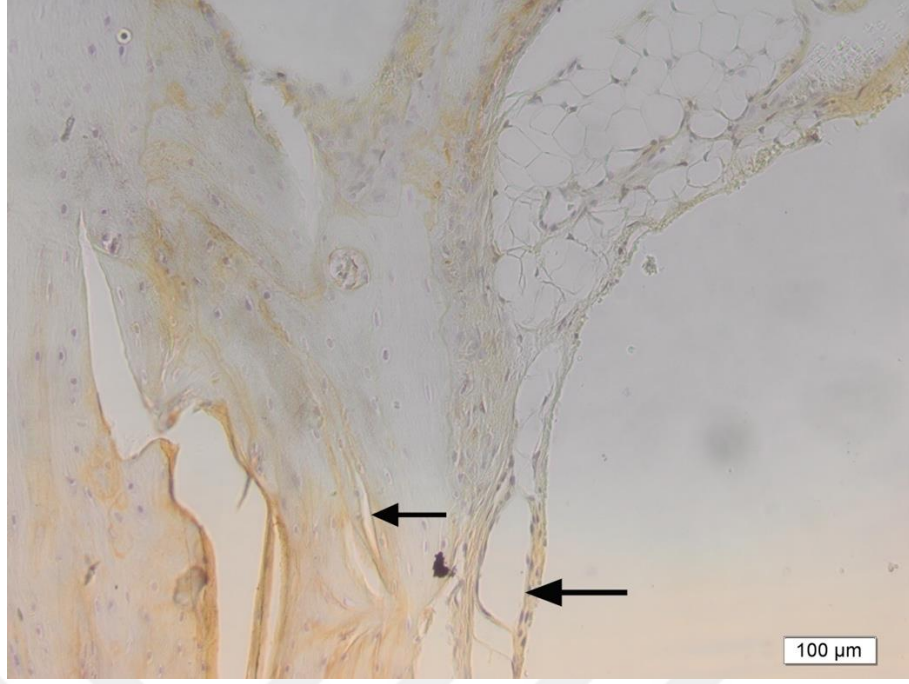


Şekil 4.6: Biodentine-Membran Grubunda Masson Goldner Trikrom boyaması (A, B, C, E, F) ve Osteopontin İmmünreaksiyonları (D). (**Siyah ok:** kemik doku, **kuyruklu ok:** osteogenez alanlarında kemik-bağ dokusu arasında yer alan hücreler, **kırmızı yıldız:** MTA materyali, **siyah ince ok:** materyal içine uzanan bağ doku, **sarı ok :** eritrosit, **sarı ok başı:** plazma hücresi, **yeşil ok başı:** makrofaj, **artı işareti:** yeni oluşan kemik adası, **daire:** bağ doku ile parçalara ayrılmış biodentin alanları).

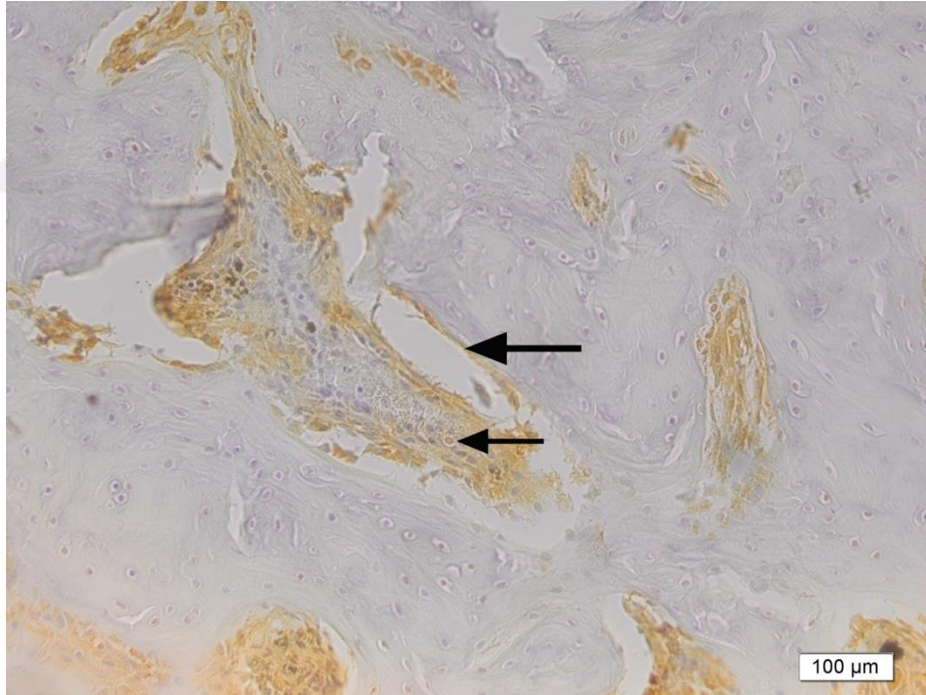
İncelenen kesitlerde grup içi varyasyonlar söz konusuydu. Bununla birlikte kontrol grubunda biomateryal bulunmayan defekt alanı tamamen kapanamamıştı. 3 aylık iyileşme süresi içerisinde defekt alanının kendiğinden kapanmadığı gözlemlendi. Membran grubunda membrana ait kalıntı görülmedi, genellikle defekt alanının varlığını sürdürdüğü gözlemlendi. MTA ve Biodentine’de osteointegrasyonlar diğer gruplara oranla fazlaydı. Bu materyallerin membranla birlikte kullanıldığı gruplarda ise bağ dokunun materyal içinde daha yoğun olduğu dikkat çekti. OPN boyamasında kontrol grubunda reaksiyon belirlenemezken reaksiyonun en fazla Biodentine grubunda olduğu belirlendi. VEGF boyanması defekt alanı ve çevresinde damar endotel hücrelerinde gözlemlendi. Reaksiyon tüm gruplarda genellikle orta şiddette belirlendi.



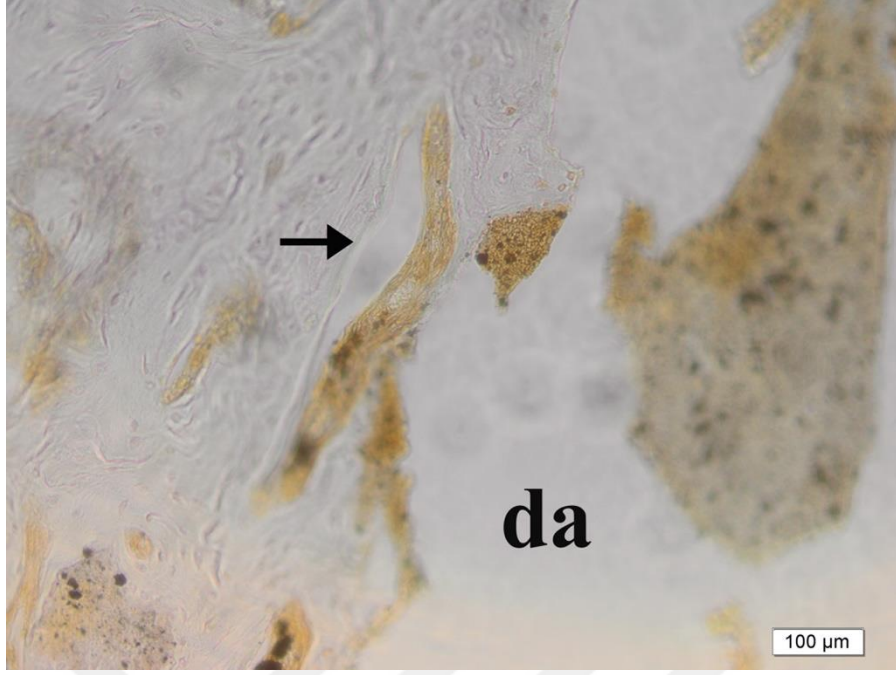
Şekil 4.7: Kontrol grubuna ait VEGF immunreaksiyonu



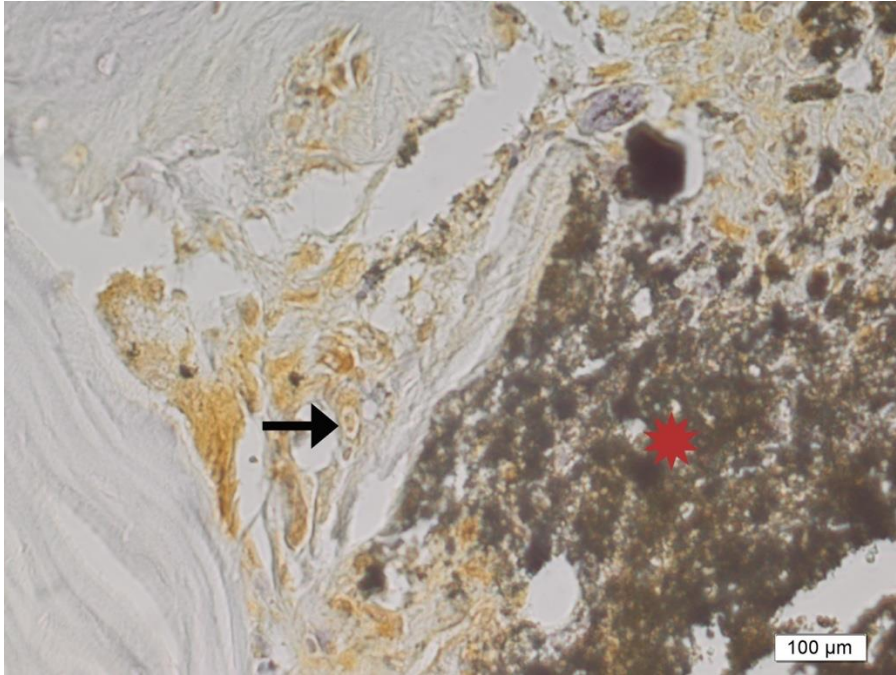
Şekil 4.8: Membran grubuna ait VEGF immunreaksiyonu



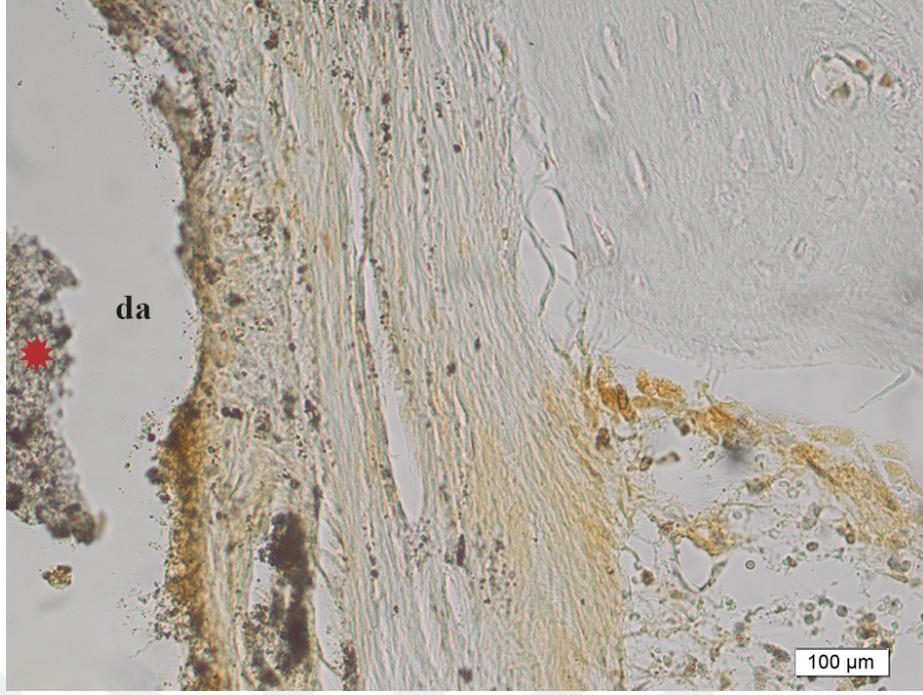
Şekil 4.9: MTA grubuna ait VEGF immunreaksiyonu



Şekil 4.10: Biodentine grubuna ait VEGF immunreaksiyonu



Şekil 4.11: MTA-Membran grubuna ait VEGF immunreaksiyonu



Şekil 4.12: Biodentine-Membran grubuna ait VEGF immunreaksiyonu

5. TARTIŞMA

Kemiğin hücresel bileşenleri osteojenik prekürsör hücreler, osteoblastlar, osteoklastlar, osteositler ve kemik iliğinin hematopoetik elemanlarından oluşur (249,250). Osteoprogenitör hücreler kemiğin resorptif olmayan tüm yüzeylerinde bulunur ve periosteumun derin katmanını oluştururlar. Osteoblastlar olgun, metabolik olarak aktif, kemik oluşturan hücrelerdir (249). Daha sonra mineralizasyona uğrayan ve kemiğe sağlamlığını ve sertliğini veren mineralize olmayan organik matriks olan osteoid salgırlar. Kemik oluşturma aktiviteleri tamamlanmak üzereyken, bazı osteoblastlar osteositlere dönüştürülürken diğerleri astar hücreleri olarak kemiğin periosteal veya endosteal yüzeylerinde kalır (249). Osteoblastlar ayrıca osteoklastlar tarafından kemik rezorpsiyonunun aktivasyonunda da rol oynar. Osteositler, kemik matriksi içinde hapsolmuş olgun osteoblastlardır. Her osteositten bir sitoplazmik ağ, silindirik kanaliküllerden kan damarlarına ve diğer osteositlere kadar uzanır (250). Bu hücreler, hücre dışı kalsiyum ve fosfor konsantrasyonunun kontrolünde ve ayrıca yerel ortama yanıt olarak hücreden hücreye etkileşimler yoluyla adaptif yeniden modelleme davranışında yer alır (250). Osteoklastlar, hormonal ve hücresel mekanizmalar tarafından kontrol edilen çok çekirdekli, kemik yıkımı yapan hücrelerdir (251). Çalışmamızda elde edilen kesitler hem Masson-Goldner Trikrom boyaması hem de OPN primer antikor immünohistokimyasal değerlendirmesiyle gösterilebilen osteoblast ve osteoklast varlığı değerlendirilmiş, kemik iyileşmesi üzerindeki etkileri incelenmiştir.

Kemik dokunun iyileşmesi ve rejenerasyonu tıp ve diş hekimliğinde büyük bir öneme sahiptir. Kemik iyileşmesi ve rejenerasyonunda kullanılacak yeni materyallerin olası etkilerinin değerlendirilebilmesi, optimize edilip edilmediğinin anlaşılması ve kliniklerde güvenle kullanılabilmesi için öncelikle hayvan modellerinde deneyler yapılması gereklidir. Literatür incelendiğinde bu amaçla yapılmış pek çok köpek, kedi, tavşan, rat modellerinin kullanıldığı çalışmalar olduğu görülmektedir (252-258). Köpek, koyun gibi büyük hayvanlar ile deneyler gerçekleştirilmesi; insanlarda oluşacak defektlerin boyutu ve yük taşıma kapasitesi açısından daha iyi bir modelleme oluşturacak olsa da büyük olmaları ve daha pahalı olmaları dezavantajlarıdır (259, 260). Daha küçük bir hayvan seçimi Laboratuvar Hayvanları Refah Yasası'na uygun olarak kullanılan laboratuvar hayvanını azaltma,

değiştirme ve iyileştirme ilkelerine izin verir (261). Aynı zaman da genotip (ırk veya tür), cinsiyet, yaş, ağırlık ve yetiştirme koşullarının daha rahat kontrol edilebilmesine olanak sağlar (261).

Daha ekonomik olması, bakımlarının kolay olması, deneylerin tekrarlanabilir olması açısından çalışmalarda sıçan ve fare gibi kemirgenler sıklıkla tercih edilmektedir (262). Deconde ve ark. çalışmalarında doku mühendisliğindeki gelişmelerin mandibular rekonstrüktif tekniklere yeni alternatifler oluşturacağını ve bunun için tekniklerin öncesinde uygun hayvan modelinde kullanılması gerektiğini ratlar üzerinde yaptıkları çalışmalarında belirtmişlerdir (263). Nascimento ve ark. MTA Angelus'un kalsiyum hidroksit kombinasyonu ile kullanılması kemik iyileşmesindeki etkisini görmek amacıyla Wistar ratlarda oluşturdukları kemik defektlerinde çalışmışlardır (264). Aynı şekilde Pinherio ve ark. MTA yerleştirilmiş kemik defektlerinde LED fototerapinin etkinliğini incelemek için yine ratlar üzerinde çalışmışlardır (265).

Çalışmamızda kullanılacak deney hayvanı sayısının fazla olması, daha kolay ulaşılabilmesi, bakımlarının daha kolay ve daha az maliyetli olması, enfeksiyonlara karşı dirençli olmaları sebebiyle çalışmamızda Wistar ratlar kullanılmıştır. Dişi ratlarda menstrual siklus sıklığının fazla olması ve hormonal değişikliklerin sık yaşanmasının kemik iyileşmesini etkileyebileceği düşünüldüğünden erkek Wistar ratlar tercih edilmiştir (266). Literatür incelendiğinde ratlarda yaşamlarının ilk üç ayında kemik yapımının hızlı olduğu, ratların yaşları arttıkça kemik iyileşmesinin azaldığı görülmüştür (267, 268). Bu sebeple çalışmamızda 6-8 haftalık ratlar kullanılmıştır.

Kemik iyileşmesinde defekt oluşan bölgenin büyüklüğünün önemli olduğu bilinmektedir. Aynı zamanda materyallerin kemik iyileşmesi üzerindeki etkilerini değerlendirebilmek için standart boyutta defektlerin kullanılması gerekmektedir. Kritik boyutlu kemik defekti (KBD) bir hayvanın yaşamı boyunca kendiliğinden iyileşemeyecek en küçük boyutlu defekt olarak tanımlanabilir. Ratlarda mandibulada oluşturulacak KBD minimumum çapı için literatürde farklı bilgiler bulunmaktadır. Rat mandibulalarında oluşturulacak defekt boyutları bazı kaynaklarda 4 mm, bazı kaynaklarda ise 5 mm olarak belirlenmiştir (269-272). Bizim çalışmamızda rat mandibulalarında 5 mm çapında kritik boyutlu kemik defekti oluşturulmuştur.

Güncel diş hekimliğinde kalsiyum silikat esaslı materyaller oldukça yaygın bir kullanıma sahiptir. Bu materyallerin kimyasal içerikleri değişiklik göstermekle birlikte öne çıkan özellikleri biyoaktif olmalarıdır (115). Biyoaktivite; materyalin canlı dokuyla etkileşiminde kalsiyum iyonlarının salınmasına, elektrik iletkenliği, kalsiyum hidroksit üretimi, sement ve dentin duvarı arasında interfasiyal bariyer formasyonu ve fosfat tamponlu salın gibi sentetik doku sıvısı ortamında yüzey üzerinde apatit kristal formasyonu anlamına gelmektedir (115)

Periradiküler kemiği ilgilendiren dental tedaviler sırasında kritik olan noktalardan biri periapikal meduller kemiğin vereceği biyolojik tepkidir. Geniş apeksli dişlerde, kök veya furkasyon perforasyonlarının tamirinde kullanılan materyaller kemikle temas edebilir ve hatta kemik dokuya taşabilir. Bu durumda kemik dokuda toksik etkiler, iltihabi durumlar veya yabancı cisim reaksiyonları görülebilir. Kalsiyum silikat simanlar sıvı veya kanla kontaminasyonda degradasyona, düşük çözünürlüğe sahip rezorbe olmayan materyallerdir (273,274). Bu nedenle apikal rezeksiyon tedavilerinden sonra retrograt dolgu materyali olarak, kök perforasyon tamiri ve apeksifikasyon tedavisi gibi kemik dokuyla ilişkili tedavilerde altın standart olarak kullanılmaktadırlar. Ca^{+2} gibi iyon salma kabiliyetleri sebebiyle kemik iliği stromal hücreleri, kemik iliği mezenşimal hücreleri ve osteoblastlar gibi mineralizasyonda görevli hücrelerin farklılaşmasını uyararak mineral doku rejenerasyonunda görev aldıkları bilinmektedir (162, 221). Aynı zamanda pulpa proliferasyonunu, iyon salınımı ve sert doku oluşumunu indüklediği bilinmektedir (275).

1990'lı yıllardan bu yana diş hekimliğinde aktif olarak kullanılan MTA trikalsiyum silikat içerikli bir dental restoratif tamir materyalidir. Modern diş hekimliğinde MTA dişin canlılığını korumaya yönelik vital pulpa tedavilerinde; biyoaktivite, biyouyumluluğu, hidrofilik ve düşük çözünürlükteki yapısı nedeniyle altın standart olarak kullanılmaktadır (276). Kök ve furkasyon perforasyonlarının tamirinde, apeksifikasyonda, rejeneratif endodontik tedavilerde ve kök ucu retrograt dolgu materyali olarak yaygın olarak kullanılmaktadır. Zaman içerisinde MTA'nın düşük basınç dayanımına sahip olması kaynak, dişlerde renk değişikliğine neden olması, karıştırma ve manipülasyon zorlukları ve uzun sertleşme süresi gibi faktörler sebebiyle araştırmacılar MTA'nın sahip olduğu dezavantajları gidermeye çalışmıştır (171, 277).

NeoMTA 2 MTA'nın bahsedilen dezavantajlarının üstesinden gelmek için piyasaya yeni sürülmüş materyallerden biridir. NeoMTA Plus'ın güncellenmiş formu olarak aynı üretici firma tarafından piyasaya sürülmüştür. Öncülü NeoMTA Plus gibi bizmut oksitin dişlerde oluşturduğu renk değişikliğinden kaçınmak için radyoopasite verici ajan olarak tantalum oksit (Ta_2O_5) içeren trikalsiyum silikat bazlı bir materyaldir. Likit kısmının MTA'nın daha kolay karıştırılmasını sağlamasıyla üstün kullanım özellikleri sunduğu belirtilmiş ve üretici firma tarafından bu şekilde pazarlanmıştır (184, 277). Karışımın toz-sıvı oranının değiştirilmesiyle farklı kıvamlarda çeşitli endikasyonlarda kullanılabilir.

NeoMTA 2'nin piyasaya yeni sürülmüş bir materyal olması nedeniyle hakkındaki literatür bilgisi sınırlıdır (277). Biyomineralizasyon kapasitesini gösteren sınırlı sayıda çalışmaya rağmen, apeksifikasyon ve furkal perforasyon gibi kemikle direk temasında kemik iyileşmesi üzerindeki etkisini gösteren literatür çalışmasına rastlanmamıştır. Çalışmamızın amacı diş hekimlerinin kullanımına sunulan bu materyalin kemikle direk temasta kullanımında kemik iyileşmesi üzerindeki etkisinin incelenmesidir.

Biodentine “dentin yerine geçen materyal” veya “dentin onarım materyali” olarak tanıtılan ve MTA'nın bazı dezavantajlarının üstesinden geldiği iddia edilen kalsiyum silikat bazlı bir simandır (194). MTA'ya benzer şekilde toz bileşimini esas olarak trikalsiyum silikat ve dikalsiyum silikatın oluşturduğu materyalde radyopasite verici ajan olarak MTA'dan farklı olarak zirkonyum oksit kullanılmıştır (206, 278). Biodentine içeriğindeki zirkonyum oksitin dişlerde renk değişimine yol açmaması, Biodentine'in hızlı sertleşme süresine sahip olması, mükemmel sızdırmazlık kabiliyetine sahip olması, yüksek basınç dayanımı, yüksek biyouyumluluk ve biyoaktivite göstermesi sebebiyle Biodentine günümüz diş hekimliği uygulamalarında başarıyla kullanılan bir materyaldir (174, 176, 179, 206).

Biodentine, MTA ile karşılaştırıldığında pulpada benzer şekilde mineralizasyon sürecini başlattığı bildirilmiştir (279). De Rossi ve ark. çalışmalarında Biodentine ve MTA'nın pulpotomi sonrası mineralize doku köprüsü oluşumunu kolaylaştırdığını belirtmiştir (280). Tang ve ark. köpekler üzerinde yürüttükleri çalışmalarında periradiküler cerrahi sonrası Biodentine ve ProRoot MTA'nın kök ucu örtme kabiliyeti ve apikal kemik üzerinde kemik iyileşmesine etkilerini incelemiştir. Araştırmacılar Biodentine'in ProRoot MTA'ya kıyasla örtme becerisinin daha yüksek olduğunu belirtmiştir. Bu sonucun Soundappan ve ark.'nın

kök ucu dolgu materyali olarak kullanıldığında Biodentine'in marjinal adaptasyonunun daha az bulunduğu araştırmayla çeliştiği belirtilse de Biodentine'in yeterli kök ucu örtme kabiliyetine sahip olduğu belirtilmiştir. Çalışma sonucunda Biodentine ve ProRoot MTA'nın periradiküler cerrahi sonrasında kemik iyileşmesini desteklediği belirtilmiştir (281). Mohamed RW ve ark., kalsiyum silikat bazlı materyallerin osteojenik ve anjiyojenik rejenerasyonu desteklediği bilgisinden yola çıkarak kalsiyum silikat içerikli beyaz MTA Angelus, Biodentine ve TotalFill BC RRM PUTTY (FKG Dentaire, LaChaux-de-Fonds, İsviçre)'i insan kemik iliği mezenşimal kök hücreleri üzerinde in vitro olarak çalışmışlardır. Araştırmacılar bu çalışmalarında materyallerin osteojenik ve anjiyojenik etkilerini incelemek üzere ALP, Kollajen 1 alfa (COL1A), osteoprotegerin (OPG), Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü A (VEGFA) ve Fibroblast Büyüme Faktörü 1'i (FGF1) kodlayan genler üzerindeki etkilerini değerlendirmiştir. Çalışma sonucunda Biodentine'in çok kısa bir süre içerisinde diğer materyallerin aksine ALP'nin gen ekspresyonunu arttırdığı bildirilmiştir (282). Totalfill ve Biodentine OPG ekspresyonu aktivitesini artırırken MTA'nın OPG üzerinde belirgin bir etkisi olmamıştır. Ancak MTA COL1A1 ekspresyonunu artırmıştır. Çalışma sonucunda Biodentine'in MTA Angelus'a kıyasla osteojenik faktörlerin transkripsiyonunu artırma konusunda daha başarılı bulunduğu bildirilmiştir (282). Bu çalışmanın sonuçları Biodentine ve MTA'nın kemik iyileşmesini artırdığını ortaya koyan çalışmamızla uyumludur. Çalışmamızda Biodentine grubunun osteojenik potansiyeli gösteren OPN aktivitesini en çok artıran grup olduğu belirlenmiştir. Bu sonuç, ProRoot MTA'nın Biodentine'e kıyasla insan kemik iliği mezenşimal hücreleri üzerinde ALP mRNA ve ALP protein ekspresyonunda Biodentine'den daha başarılı olduğunu bildiren Margunato ve ark.'nın in-vitro çalışmasıyla çelişmektedir (283). Bunun sebebi her iki çalışmada kullanılan immunohistokimyasal analizlerin ve osteojenik potansiyelin belirteci olarak seçilen proteinlerin farklı olmasından kaynaklanıyor olabilir.

Camilleri ve ark. yürüttükleri çalışmalarında radyopasite verici ajan olarak bizmut oksit içeren MTA materyalinin Saos-2 osteosarkoma hücre hattının hücre proliferasyonunu azalttığı veya inhibe ettiği gösterilmiş, bizmut oksitin hücreler için sitotoksik etki gösterdiği ortaya konulmuştur (284). Çalışmalarında bizmut oksit içeriğinin niyobyum oksit ile değiştirilmesinin Saos-2 osteoblastik hücre hattında hücre canlılığını desteklediğini belirtmiştir.

İnsan kemik iliği hücre canlılığı açısından MTA Angelus ve Biodentine'in karşılaştırılması sonucunda Biodentine'in MTA Angelus'tan daha başarılı olduğu sonucuna ulaşmıştır (282). Çalışmacılar bu sonucun ortaya çıkmasında MTA Angelus'un bizmut oksit içeriğinden kaynaklanabileceğini belirtmiştir. Bu çalışmada da radyoopasite verici ajan olarak tantalum oksit kullanılan NeoMTA 2'nin, bizmut oksit içerikli eski jenerasyon MTA'lara göre hücre canlılığında pozitif rolü olacağı öngörülmüştür (285). Çalışmamız sonunda NeoMTA 2 kullanılan mandibular kemik defektlerinde osteogenezi gösteren OPN ile boyanmış alanların varlığı ve bu alanlarda immunreaksiyon gösteren hücrelerin görülmesi bu öngörümüzü destekler niteliktedir.

Masson-Goldner trikrom boyama, kemik histolojisinde yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir ve morfolojik tanımlamanın yanı sıra farklı renklendirme ile doku tanımlamasına izin verir (286). Üç farklı boyama solüsyonunun bir kombinasyonu kullanılarak kas lifleri, kollajen lifler, fibrin ve eritrositler seçici olarak görselleştirilebilir. Bu boyama kollajen lifleri üzerinde de etkilidir. Çekirdeklerin rengini kahve siyahına, kas liflerinin, kreatinin ve sitoplazmanın rengini parlak kırmızıya, kollajen ve mukusun rengini mavimsi yeşil eritrositlere sarı/turuncuya çevirir (287). Masson-Goldner trikrom boyamanın, vasküler bileşenin ve damar içi ve damar dışı kırmızı kan hücrelerinin miktarının optimal değerlendirmesi için çok hassas ve spesifik olduğu da kanıtlanmıştır (288). Çalışmamızda yeni kemik oluşum alanlarını gösterebilmek için Masson-Goldner trikrom boyama yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntem sayesinde yeni oluşan kemik alanları ve eski kemik farklı boyandığı için ayırt edilebilmektedir. Çalışmamızda Masson-Goldner trikrom tekniğiyle boyanan kesitlerde yeni oluşan kemik neoformasyonları kırmızı renge boyanarak ayırt edilebilmiştir. Materyal yerleştirilen gruplarda MTA ve Biodentine sahip oldukları içeriklerinden ötürü siyah renkte boyanarak kesitlerde görünmüştür. MTA grubunda bağ dokusunun materyal içine doğru uzandığı, düzenli uzanan kollajen iplikler kesitlerde kolaylıkla ayırt edilebilmiştir. Materyal içerisinde bağ dokusunun sardığı alanlarda küçük kemik kalluslarının oluşumu da ayırt edilebilmektedir. Aynı şekilde Biodentine grubunda da bağ dokusunun materyal içerisine doğru uzandığı kesitlerde kolaylıkla görülebilmektedir. Materyal içerisine uzanan yeni kemik oluşumu da ayırt edilebilmektedir. Masson-Goldner trikrom boyamada MTA ve Biodentine içeren gruplarda materyal içerisine uzanan bağ dokusu bulgusu dikkat çekicidir. Bağ doku

hücrelerinin osteojenik farklılaşması sonucunda materyal içerisinde intramembranöz kemikleşmenin gerçekleşmiş olabileceği düşünülmüştür. Kemik iyileşmesinin bağ dokusuyla ilgili olduğu ve osteoblastların çoğalmasıyla gerçekleştiği daha önce birçok çalışmada ortaya koyulmuştur (289, 290). Rentsch ve ark., yaptıkları çalışmalarında koyun tibialarına yerleştirilen implantlar sonrası kemik iyileşmesini hücrel olarak tanımlayabilmek için histopatolojik ve immünohistokimyasal incelemeler yapmışlardır (286). Çalışmalarında Hematoksilen-Eozin, Masson-Goldner trikrom, Movat's pentakrom ve Alcian mavisi gibi genel histolojik boyama yöntemleri kullanmışlardır. Masson Goldner trikrom boyama sonrasında yeni kemik oluşan lamellar kemiği, kollejen fibrilleri çalışmamızda olduğu gibi net bir şekilde gösterebilmişlerdir. Çalışma sonucunda materyalin iç kısımlarında, bağ dokusu hücrelerinin osteojenik farklılaşmasını gösteren küçük kemikli matriks adacıkları olduğu belirtmiştir. Bu yorum, çalışmamızda materyal içerisine uzanan yeni bağ doku hücrelerinin osteojenik farklılaşma sonrasında intramembranöz kemikleşmeyi uyarabileceği düşüncesini destekler niteliktedir.

Kemiğin yeniden yapılanmasında rol alan esas hücreler osteoblast ve osteoklastlardır. Osteoklastlar hasarlı kemiğin yıkımını sağlarken, osteoblastlar da defekt alanında yeni kemik oluşumunu gerçekleştirir (291). Kemiğin yeniden şekillenmesi sırasında osteoblast ve kemik astar hücreleri birtakım sinyaller oluşturur ve osteoklastların aktivasyonunu başlatır. Osteoklastların kemiği rezorbe edip görevlerini tamamlamasının ardından apoptozis uğramasıyla kemik rezorpsiyonu için oluşan asidik ortam tersine döner. Osteoblastlar yeni kemik matriksi sentezini ve oluşan rezorpsiyon boşluğunun mineralizasyonu için bölgeye çağrılır (292). Bu iki hücre de osteogenez sürecinde aktif görev alırlar ve osteopontin ile pozitif reaksiyon veren hücrelerin başında gelirler. Bu yüzden kemik iyileşmesini göstermek için osteopontin reaksiyonun gösterilmesi önemli bir bulgudur. Histolojik boyamalar da kemik iyileşmesi açısından önemli detaylar sunar. Çalışmamızda Masson-Goldner trikrom boyaması ile osteogenez alanları belirlenirken, kontrol grubu dışındaki gruplara ait kesitlerin bazılarında defekt alanının çevresinde osteogenezde rol aldığı düşünülen hücreler gözlenmiştir. İncelenen kesitlerin kesit derinliğiyle ilgili standardizasyon sağlanamadığından hücre sayımı yapılamamıştır. Bu çalışmamızın eksik yönlerinden biri olarak kabul edilebilir. Ancak histolojik incelemede kontrol grubu dışındaki gruplarda osteopontin reaksiyonunun varlığının gösterilebilmiş olması kemik iyileşmesinin gerçekleştiğinin bir göstergesidir. Kontrol grubunda bu

hücrelerin varlığı gösterilememiş olsa da incelenen kesitlerde Masson-Goldner trikrom boyamasında kemik neoformasyonu olan alanlar gösterilebilmiştir. Kontrol grubunda osteoblast varlığı gösterilememiş olsa da incelenen kesitlerde Masson-Goldner trikrom boyamasında kemik neoformasyonu olan alanlar gösterilebilmiştir. Kontrol grubunda osteoblastların gösterilememesinin sebebi incelenen kesit derinliğinin farklılığına bağlanabilir. Kontrol grubunda defekt bölgesinin tamamen kapanmaması da bu grupta iyileşmenin daha az olduğu şeklinde yorumlanabilir. Fakat NeoMTA 2 ve Biodentine gruplarında defekt alanında materyal olması ve kontrol grubunda herhangi bir materyal bulunmaması sebebiyle de arada bu şekilde bir farklılık oluşabileceği düşünülmüştür.

Kemik iyileşmesinin aşamaları, kemik gelişiminin erken aşamalarına paraleldir. Kemik iyileşmesinin en kritik dönemi, yaralanmanın ortaya çıkmasını takiben inflamasyon ve revaskülarizasyonun meydana geldiği ilk 1-2 haftadır (10). Makrofajlar kemik hasarı oluştuğunda çeşitli büyüme faktörleri, kemokin ve sitokin salınımı yaparak mezenşimal kök hücreler, fibroblastlar ve osteoprojenitör hücrelerin toplanmasını başlatır (293). Kemik iyileşmesinin ilerleyen aşamalarında da osteoklastların oluşturduğu kemik rezorpsiyonu sonrası ortamdaki kalıntıları temizleyen makrofaj benzeri hücreler yeni kemik yapımı için uygun bir ortam oluşumunu sağlar. Makrofajların osteoblast farklılaşması ve proliferasyonunu desteklediği bilinmektedir (294, 295). Masson-Goldner trikrom boyaması sonrası elde ettiğimiz verilerde kontrol grubunda kısmen, diğer gruplarda ise belirgin bir şekilde enflamasyon hücrelerinin varlığı gösterilmiştir.

Ayrıca plazma hücreleri, eritrositler de bu boyamayla elde edilen kesitlerde gösterilebilmektedir. Eritrositlerin kesitlerde gösterilebilmesi yeni oluşan kan damarlarının varlığını göstermektedir. Rentsch ve ark.'nın yaptıkları çalışmada da Massen-Goldner Trikrom boyamasıyla elde ettikleri kesitlerinde de pembe boyanan eritrositlerin varlığı gösterilmiş ve bu sayede çalışmada oluşturulan kemik defekt alanlarında damarlanmanın varlığının kesin olarak saptanabileceği belirtilmiştir (286). Gentile ve ark.'da Goldner'ın Masson trikrom boyamasının, vasküler bileşenin ve damar içi ve damar dışı kırmızı kan hücrelerinin miktarının optimal değerlendirmesi için çok hassas ve spesifik olduğunu çalışmalarında belirtmiştir (288). VEGF vasküler gelişim ve anjiyogenezin düzenlenmesinde en önemli büyüme faktörlerinden biridir. Kemik doku damarlanması ileri düzeyde gelişmiş bir yapıdır ve damarlanmanın oluşması osteogenezde oldukça önemli bir rol oynar. Dolayısıyla

VEGF hem iskelet gelişiminde hem de doğum sonrasında kemik onarımında kritik önemdedir (296), (297, 298). Aynı zamanda enflamatuar hücrelerin ortama dahil edilmesi ve mezenkimal kök hücrelerin sayısının azaltılması gibi olaylar da kemik onarımı ve rejenerasyonunda görülmektedir (299). VEGF'nin kemik onarımı ve rejenerasyonunun çeşitli aşamalarına katıldığı bildirilmiştir (91).

Kemik iyileşmesi ve anjiyogenezdeki rolü göz önüne alınarak kemik iyileşmesindeki anjiyogenezisi gösterebilmek amacıyla immünohistokimyasal incelemede kullanıldığımız primer antikorumuz VEGF'dir. Bu çalışmada elde edilen sonuçlara göre tüm gruplarda defekt alanında VEGF antikoruna karşı orta şiddette reaksiyon gelişmiştir. Tüm gruplarda defekt alanı ve çevresinde damar endotel hücrelerinde VEGF boyanması görülmüştür. Bu sonuç oluşturulan defekt alanlarında kemik iyileşmesinde önemli rol oynayan anjiyogenezin gerçekleştiğini göstermektedir. Kemik iyileşmesinde anjiyogenez oluşumu; hem bölgeye iyileşmeyi başlatacak enflamatuar hücrelerin gelebilmesi hem de çeşitli osteojenik faktörlerin bölgeye salınabilmesi açısından önemlidir. Elde ettiğimiz sonuçlara göre gruplarımız arasında herhangi bir materyalin kullanılıp kullanılamaması defekt alanında anjiyogenezin oluşumu açısından bir fark oluşturmamıştır. Çalışmamızda incelenen tüm gruplarda VEGF ekspresyonunun aynı şekilde olduğu gözlenmiştir. Cha ve ark.'nın Beagle köpeklerde farklı biyomateryaller kullanarak kronikleşmiş implant çevresi dehissens tip defektlerde de VEGF bakılmıştır. Çalışma sonuçları bizim çalışmamızda olduğu gibi VEGF boyanmasında gruplar arasında bir farklılık bildirmemiştir (300). Çalışmamızda VEGF ekspresyonunun gruplar arasında farklılık göstermemesi, anjiogenez belirteci olan diğer antikorlarda nasıl bir farklılık oluşturacağı düşüncesini uyandırmıştır. Ayrıca immunreaksiyonun defekt oluşumundan 3 ay sonra değerlendirilmiş olması bu sonuca ulaşmamıza sebep olmuş olabilir.

Literatür incelendiğinde kemik iyileşmesinde anjiogenezin etkinliğini araştıran pek çok çalışma mevcuttur. Örneğin Shen ve ark. anjiyojenik bir faktör olan Epidermal Büyüme Faktörü İlişkili Protein 6 (EGFL6)'nın kemik onarımı ve rejenerasyonuna olan etkisini in vivo olarak inceleyebilmek için sıçan tibialarında deneysel olarak oluşturulan distraksiyon osteogenezin modelinde defekt bölgesine enjekte etmiş ve hem anjiogenezi hem osteogenezin olumlu olarak etkilediğini belirtmişlerdir (301). Stuari ve ark. ise rapid maxiller ekspansiyon apareyi kullanımı sonrası kemik oluşumunda bazik FGF-2 ve VEGF kullanarak anjiogenezi

değerlendirmişlerdir (302). Gelecek çalışmalarda FGF ve EGFL6 gibi anjiyojenik diğer antikorların da kullanılarak kemik iyileşmesinde anjiogenezin değerlendirilmesi, daha net sonuçlara ulaşmamıza yardımcı olabilir. Carmona ve ark. MTA'nın canlı dokuda oluşturduğu enflamatuar süreç ve bunun biyomineralizasyonla ilişkisini incelemek için çekilmiş insan dişlerinden elde edilen dentin tüplerine ProRoot MTA yerleştirmiş ve fare sırt bölgesine subkutan dokuya yerleştirmişlerdir (303). Çalışmanın immünohistokimyasal incelemesinde enflamasyonda görevli olan Miyeloperoksidaz (MPO) ve siklooksijenaz 2 (Cox-2), anjiyogenezen sorumlu olan VEGF primer antikorları kullanılmıştır. Çalışma sonucunda yazarlar VEGF düzeyinin inflamasyonun erken safhalarında arttığını, VEGF ekspresyonunun çoğu zaman yüksek seviyelerde kaldığını bildirmişlerdir. VEGF ekspresyonunun onarım sürecini indüklemek için anjiyogenezi devam ettirdiği düşünülmüştür. Çalışma sonucunda yazarlar biyomineralizasyon sürecinin akut enflamasyonla eş zamanlı ortaya çıktığını bildirmişlerdir (303). Çalışma aynı zamanda MTA'nın iyileşme için gerekli enflamatuar ortamı dolayısı ile yara iyileşmesi için uygun bir ortam oluşumunu tetiklediğini ifade etmiştir. Literatür incelendiğinde NeoMTA 2 ve Biodentine'in kemik üzerinde VEGF boyamasını yapan başka bir çalışma ile karşılaşılmamıştır. Çalışmamız bu yönüyle ilk olma özelliğine sahiptir. Literatür incelendiğinde kemik iyileşmesinde anjiogenezin etkinliğini araştıran pek çok çalışma mevcuttur. Örneğin Shen ve ark. anjiyojenik bir faktör olan Epidermal Büyüme Faktörü İlişkili Protein 6 (EGFL-6)'nın kemik onarımı ve rejenerasyonuna olan etkisini in vivo olarak inceleyebilmek için sıçan tibialarında deneysel olarak oluşturulan distraksiyon osteogenezin modelinde defekt bölgesine enjekte etmiş ve hem anjiogenezi hem osteogenezin olumlu olarak etkilediğini belirtmişlerdir (301). Stuanı ve ark. ise rapid maxiller ekspansiyon RME apareyi kullanımı sonrası kemik oluşumunda bazik FGF-2 ve VEGF kullanarak anjiogenezi değerlendirmişlerdir (302).

OPN, kemiğin yeniden şekillenmesini destekleyen, kollajen olmayan bir kemik matriks proteinidir. OPN'nin biyomineralizasyondaki rolü osteoklast ve osteoblast hücre bağlanmasını artırmaktır. OPN, kemik ve dentin de dahil olmak üzere mineralize dokularda yüksek oranda eksprese edilir. Literatür incelendiğinde Biodentine ve piyasada bulunan MTA'ların çeşitli çalışmalarda OPN ile mineralizasyon kapasitesinin değerlendirildiği görülmüştür. Örneğin; Silva ve ark. piyasaya sürülen kalsiyum silikat bazlı siman olan Bio-C Pulpo (Angelus)'u

inflatuar yanıtı ve mineral birikimini indükleme yeteneğini değerlendirmek için Wistar ratların dorsal bağ dokusuna yerleştirilen materyallerin OCN, OPN ve BSP için histolojik ve immünohistokimyasal analiz yoluyla Beyaz MTA Angelus ile karşılaştırmıştır (304). Bio-C Pulpo ve Beyaz MTA Angelus için OCN, OPN ve BSP'nin immün ekspresyonunu 60 ve 90 gün sonra daha yoğun bulunmuştur, bunun nedeni bu proteinlerin geç osteojenik belirteçler olarak kabul edilmesi olabilir (305). Kemik belirteçleri, kemik oluşumunu yansıtan osteoblast türevi proteinlerdir (306). Daha önce yapılan çalışmalar kalan vital pulpa dokusu ile restoratif materyal arasında sert bir doku bariyerini indükleyici bir biomateryalin pulpotomi için tercih edilmesi gerektiğini göstermektedir (307, 308). Bu bağlamda, mineralize dokuların organik matriksinin protein bileşenleri OCN, OPN ve BSP gibi mineralizasyon belirteçleriyle işaretlenebilir. Çalışmamızın immünohistokimya aşamasında alınan kesitlerde osteopontin ekspresyonu incelenmiştir. Elde ettiğimiz sonuçlara göre defekte hiçbir materyal yerleştirilmeyen kontrol grubunda hiç OPN ekspresyonu gözlenmezken, Biodentine grubu ise en fazla OPN ekspresyonu gösteren grup olmuştur. Diğer gruplarımızda orta şiddette OPN reaksiyonu izlenmiştir. Çalışmamızda elde edilen veriler, kalsiyum hidroksit salan materyallerin; OCN, OPN, ALP gibi osteojenik belirteçlerin ekspresyonunu indüklediğini ortaya koyan önceki çalışmalarla desteklenmektedir (306,309).

OPN, erken bir T-lenfosit olan kemik sialoprotein I olarak bilinir. Fosfoprotein 1 tarafından salgılanan aktivasyon faktörüdür ve osteoblastlarda tanımlanan bir proteindir. OCN, kemik gama-karboksiglutamik asit içeren protein olarak bilinir ve kemik ve dentinde bulunan kollajen olmayan bir proteindir (310,311). RUNX ailesi transkripsiyon faktörü 2, OPN ve OCN boyaması mineralizasyon alanlarını gösterebilir. OPN ve OCN farklılaşma sürecinin ilerleyen aşamalarında ifade edildiğinden mineralizasyonun hangi aşamaya ulaştığının belirlenmesine olanak tanır (310). RUNX ailesi transkripsiyon faktörü 2, OPN ve OCN'yi tespit etmek için uygulanan immünohistokimyasal teknik, negatif kontrolde boyanma olmamasının da gösterdiği gibi, bu proteinlerin tespitinde yüksek özgüllük göstermiştir. RUNX ailesi transkripsiyon faktörü 2 için immün etiketleme immünoreaktif hücrelerin çekirdeği ile sınırlıyken, OCN ve OPN için immünoreaktif hücrelerin sitoplazması ve az miktarda ekstraselüler matriks ile sınırlı bulunmuştur. Hücre dışı matrikste gözlenen etiketleme, immünoreaktif hücrelerin sitozolik bölmesinde sentezlenen ve daha sonra biyomineralizasyon sürecinde spesifik işlevini

yerine getirmek için hücre dışı matrikse salgılanan OCN ve OPN'den oluşur (312). Okasha ve ark. köpek dişlerinde oluşturdukları perforasyonlarda deneysel bir trikalsiyum silikat perforasyon materyali MTA Angelus ve Biodentine ile OPN immünohistokimyasal yönden karşılaştırılmıştır (313). Grupların bir kısmında gecikmiş furkal perforasyon tamirini taklit edebilmek amacıyla materyal yerleşimi bir ay sonrasında yapılmıştır. Çalışma sonucunda test edilen materyaller arasında anlamlı bir farklılık bulunamamıştır. Çalışmada anlamlı bir farklılık olmasa da Biodentine MTA'dan daha yüksek immünopozitif alan fraksiyonu göstermiştir. Bu sonuç OPN boyamasında en fazla reaksiyonun Biodentine grubunda bulunan bizim çalışmamızla da uyumludur. Yossef ve ark. Biodentine, ProRoot MTA, Emdogain ve Ca(OH)_2 'nin dental pulpa kök hücreleri üzerindeki odantojenik (dentin sialoprotein), osteojenik (ALP ve OPN) ve anjiyojenik (VEGF) etkilerini gen ekspresyonunu ölçerek değerlendirmiştir. OPN gen ekspresyonu incelendiğinde 7. Günde MTA, Ca(OH)_2 ve Emdogain kontrole göre OPN ekspresyonunu artırmış; ancak 14. Günde OPN ekspresyonu yalnızca Biodentine grubu ve Ca(OH)_2 grubunda kontrole kıyasla önemli derecede artış göstermiştir. VEGF ekspresyonu incelendiğinde 7. Günde Biodentine ve Emdogain tarafından yukarı regüle edildiği görülmüş, 14. Günde ise MTA, Biodentine ve Emdogain grubunun VEGF ekspresyonunu kontrole kıyasla artırdığı görülmüştür (193). VEGF ekspresyonuna bakıldığında sonucun çalışmamızla uyumlu olduğu, NeoMTA 2 ve Biodentine'in VEGF ekspresyonunu artırarak doku rejenerasyonunu artırdığı görülmektedir (193). MTA'nın koheziv kırılma paterni ve immedat restorasyonlarda makaslama kuvvetlerine düşük dayanımı MTA'nın perforasyon onarımı gibi tedavilerde periradiküler boşluğa ekstrüde olması ve bu bölgede iyileşmenin bozulması, periodontal ataçmanın oluşamaması gibi durumlara neden olabilir. Bu nedenle çeşitli çalışmalarda perforasyon bölgesine MTA'nın sıkıştırılabilmesi ve ekstüde olmasını engellemek için bir bariyer membranlar kullanımı önerilmiştir (314, 315). YKR tedavileri kapsamında epitel hücrelerinin defekt alanına gelmesini önlemek ve rejenerasyonda görevli hücrelerin defekt alanına gelebilmesini sağlamak üzere defekt üzerinde bariyer membran yerleştirilmektedir. Diş hekimliğinde implant yerleştirilmesinde lateral pencere uygulamalarında oldukça sık kullanılan rezorbe olabilen membranlar, daha iyi kemik oluşumu ve daha az implant kaybı sonuçları vermiştir (316-318). Çalışmamızda MTA ve Biodentine materyallerinin defekt alanından ekstüde olmasını önlemek amacıyla Bio-Gide (Geistlich Pharma, İsviçre) kollajen membran

kullanılmıştır. Bio-Gide kollajen membranın iki katmanlı yapısı sayesinde kemiğe dönük olan gözenekli yüzeyinden rejenere edici hücrelerin hareketine izin verirken, yoğun yapıdaki dış yüzeyi ise istenmeyen hücre ve dokuların defekt içerisine geçmesini engelleyen yapısı, ıslandığında yapısal bütünlüğünü koruyabilmesi, biyouyumlu bir materyal olması ve yıllarca başarılı kullanımı nedeniyle çalışmamızda kollajen membran olarak tercih edilmiştir. Mohamed ve ark. furkasyon perforasyonu tamirinde MTA'nın trombosit kaynaklı matriksle kullanılıp kullanılmamasının sonuçlarını radyografik ve immünohistokimyasal olarak incelemişlerdir (319). Endodontik rejenerasyonda sıklıkla kullanılan PRF perforasyon onarım malzemesini sıkıştırabilecek bir matriks olarak kullanılmıştır. Bu çalışmada MTA üçüncü nesil bir trombosit matriks kaynağı olan ve PRF'ye göre daha fazla hücre proliferasyonu ve osteoblastik aktivite gösterdiği belirtilen Konsantre Büyüme Faktörleri (CGF) ile kombine kullanılmıştır. Köpek dişlerinde deneysel perforasyon oluşturulan çalışma sonucunda elde edilen bilgilere göre ağız ortamına açık bırakılmayıp kontaminasyonu engellenen gruplarda MTA, hem MTA+PRF hem MTA+CGF grubuna kıyasla OPN immünohistokimya değerlendirmesinde anlamlı derecede daha düşük değerler göstermiştir. MTA grubu, trombosit içerikli bariyer kullanan gruplara göre anlamlı olmayan derecede daha düşük immünohistokimyasal reaksiyon göstermiştir. MTA grubunda fokal sement birikimi gözlemlenirken, MTA + PRF ve MTA + CGF grubunda sürekli sement köprüsü olduğu görülmüştür. Ayrıca yalnızca MTA koyulan gruplarda, bariyerle kullanılan gruplara göre inflamatuvar hücre sayısının önemli ölçüde daha fazla olduğu görülmüştür. Bu durum PRF ve CGF'nin otolog kökeninden kaynaklı antienflamatuvar aktivitesi olabileceğini düşündürmüştür. Daha önce yapılan birkaç çalışma da MTA+PRP ve MTA+PRF kullanımının yalnızca MTA kullanımına göre daha az inflamatuvar hücre sayısı gösterdiğini bildirmiştir (320, 321). Bu bilgiler ışığında çalışmamız hem MTA hem Biodentine'i kemik defektlerinde kollojen bir membran kullanarak sabitlemiş ve etkilerini değerlendirmiştir. Çalışma sonunda elde ettiğimiz bilgilere göre Biodentine ve MTA'nın kollajen membranla birlikte kullanımı sonucu bağ dokunun materyal içerisinde daha yoğun bulunması dikkat çekicidir. Membran kullanılan gruplarda bağ dokunun materyal içerisine yoğun bir şekilde uzanması, intramembranöz kemikleşmeye bağlı olarak materyal içerisinde içindeki kemik oluşumlarının varlığı bağ doku hücrelerinin osteojenik farklılaşması sonucunda şekillenebileceğini düşündürdü. Rentsch ve ark., çalışmalarında

materyalin iç kısımlarında, bağ dokusu hücrelerinin osteojenik farklılaşmasını gösteren küçük kemikli matris adacıkları olduğu belirttiler (286).



6. SONUÇ ve ÖNERİLER

1. Çalışmamızda oluşturulan kritik boyutlu kemik defektlerinde en başarısız iyileşmenin kontrol grubunda olduğu görülmüş, bu gruptan elde edilen kesitlerde hiç bir boyamada osteoblast varlığı gösterilememiştir.
2. Çalışmamızda immünohistokimya incelemesinde OPN ekspresyonu açısından en belirgin reaksiyon Biodentine grubunda gerçekleşmiştir. Kontrol grubunda hiç bir kesitte OPN ekspresyonu gözlenemezken, MTA içeren gruplarda bu reaksiyon orta şiddette görülmüştür.
3. Kemik iyileşmesinde anjiyogenezi incelemek için bakılan VEGF ekspresyonunda gruplar arasında herhangi bir farklılık görülmemiştir. Bu sonuç cerrahi operasyon sonrası bölgedeki anjigonezin kullanılan materyalden bağımsız olarak gerçekleşmesine bağlanmıştır.
4. Oluşturulan kritik boyutlu kemik defektlerinin yerlerinin daha net saptanması ve boyutlarındaki değişimin alansal olarak ölçümü için Micro-CT aracılığıyla benzer bir değerlendirme yapılması önerilir.
5. İlerleyen çalışmalarda kemik iyileşmesini değerlendirmek için OPN ve VEGF gibi farklı antikorlara yer verilmesi önerilir.

7. KAYNAKLAR

1. Ford T, Torabinejad M, Abedi H, Bakland L, Kariyawasam S. Using Mineral Trioxide Aggregate as a pulp-capping material. J Am Dent Assoc 1996; 127(10): 1491–4. Available
2. Faraco IM, Holland R. Response of the pulp of dogs to capping with mineral trioxide aggregate or a calcium hydroxide cement. Dent Traumatol. 2001; 17(4): 163–6.
3. Seux D, Couble ML, Hartmann DJ, Gauthier JP, Magloire H. Odontoblast-like cytodifferentiation of human dental pulp cells in vitro in the presence of a calcium hydroxide-containing cement. Arch Oral Biol 1991; 36(2): 117–28.
4. Junquiera LC, Carneiro J. Basic Histology: Text & Atlas, McGraw-Hill Medical, 2006: 141–159 p.
5. Gartner LP, Hiatt JL. Color textbook of histology (2nd ed), Saunders, 2001: 134–154.
6. Bancroft JD. Theory and Practice of Histological Techniques (4th ed), 1996: 309–39.
7. Kierszenbaum AL. Histology and Cell Biology, 2006. 118–145 p.
8. Kierszenbaum AL, Tres L. Histology and Cell Biology: an introduction to pathology (5th ed) E-Book, 2015: 120-140.
9. Gartner LP, Hiatt JL. Color Textbook of Histology, 2001: 134–154 p.
10. Kalfas IH. Principles of Bone Healing, Neurosurg Focus, 10(4), 2001: 1–4.
11. Elsevier M, St.Louis. Histology and Cell Biology: An Introduction to Pathology (1st ed), 2002: 131.
12. Junquiera LC, Carneiro J. Basic Histology (10th ed), McGraw-Hill, New York, 2003: 144-146.
13. Capulli M, Paone R, Rucci N. Osteoblast and osteocyte: games without frontiers. Arch Biochem Biophys 2014; 561: 3–12.
14. Buckwalter JA, Glimcher MJ, Cooper RR, Recker R. Bone biology. I: Structure, blood supply, cells, matrix, and mineralization. Instr Course Lect. 1996; 45: 371–86.
15. Väänänen HK, Zhao H, Mulari M, Halleen JM. The cell biology of osteoclast function. J Cell Sci. 2000 ; 113(3): 377–81.
16. Brinker MR, Lipton HL, Cook SD, Hyman AL. Pharmacological regulation

- of the circulation of bone. J Bone Joint Surg Am. 1990 ;72(7): 964–75.
17. Eşrefoğlu M. Genel Histoloji (1.st ed), Malatya, 2009: 196–188.
 18. Gartner LP, Hiatt JL. Color Textbook of Histology (3rd ed.), chapter 7, 2007 :136-156.
 19. Gartner LP, Hiatt JL. Color Textbook of Histology (2nd ed.) Pennsylvania, Philadelphia: W.B. Saunders Company, 2001: 134–154 p.
 20. Niklaus P. Lang, Jan Lindhe. Clinical Periodontology and Implant Denstry (6th ed.), Nobel Tıp Kitapevleri, Ankara, 2017.
 21. Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil I, Alobera-Gracia MA, Del-Canto-Pingarrón M, Blanco-Jerez L. Physiological bases of bone regeneration I. Histology and physiology of bone tissue. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2006; 11(1): E47-51.
 22. Sikavitsas VI, Temenoff JS, Mikos AG. Biomaterials and bone mechanotransduction. Biomaterials. 2001; 22(19): 2581–93.
 23. Şirin S. Deneysel olarak meydana getirilen kemik defektlerine yerleştirilen farklı tipteki yapay kaynaklı greft materyallerinin kemikleşmesinde hiperbarik oksijen uygulamasının etkilerinin incelenmesi (Doktora tezi), İ Ü Sağlık Bilimleri Enstitüsü; 2005.
 24. Akay M. Genel Histoloji (5. Baskı), Palme Yayınevi, Ankara, 2001.
 25. Junqueira LC, Mescher AL. Junqueira's Basic Histology, McGraw-Hil, 2005.
 26. Cowin CS. Integrated bone tissue physiology: Anatomy and physiology (2 nd ed), Bone Mech Hand, 2001.
 27. Aykın Ş, Çakmak G, Cila E. Kemik greftleri ve kemik greftlerinin yerini tutabilecek maddeler. Türk Ortop ve Travmatoloji Birliği Derneği Derg 2004; (3): 11–24.
 28. Wozney Jm, Rosen V, Byrne M, Celeste Aj, Moutsatsos I, Wang Ea. Growth factors influencing bone development. J Cell Sci 1990 ;: 149–56.
 29. Çay HM, Sezer N. Kemik yapısı ve kemik döngüsü üzerine bir derleme a rewiev over bone structure and turnover. Fiz Tıp 2002; 5(3): 177–84.
 30. Bernard GW. Healing and repair of osseous defects. Dent Clin North Am 1991; 35(3): 469–77.
 31. Junquiera LC, Carneiro J, R. OK. Paperback use pre-formatted date that complies with legal requirement from media matrix, 1998.
 32. McKinley TO, Bay BK. Trabecular bone strain changes associated with

- subchondral stiffening of the proximal tibia. *J Biomech* 2003; 36(2): 155–63.
33. Erkoçak A. Genel Histoloji. Ankara: Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Yayınları; 1980: 236-257.
 34. Carranza FA, Newman MG, Takei HH. Carranza's Clinical Periodontology (9th ed), USA, Saunders Co, 2002: 812–819.
 35. Erdoğan D, Hatipoğlu M, Ilgaz C. Genel Histoloji, Hatipoğlu Yayınevi, Ankara, 1999: 107–117.
 36. Aslanbey D. Veteriner Ortopedi ve Travmatoloji, (3th ed), Medisan Yayın Serisi, (19), 1996: 184–194 .
 37. Ross HM, Pawlina W. Histology: A Text and Atlas: With Correlated Cell and Molecular Biology (6th ed), Macmillan C., Philadelphia, 2011: 218-244.
 38. Hollinger OJ, Buck CD, Bruder PS. Biology of Bone Healing: Its Impact on Clinical Therapy (1st ed), In Lynch S, Genco RJ, Marx RE (Eds), Tissue Engineering: Applications in Maxillofacial Surgery and Periodontics, Quintessence Publishing, 1999.
 39. Downey PA, Siegel MI. Bone biology and the clinical implications for osteoporosis. *Phys Ther* 2006; 86(1): 77–91.
 40. Bostrom MPG, Yang X, Koutras I. Biologics in bone healing. *Curr Opin Orthop* 2000; 11(5): 403–12.
 41. Rodan GA. Introduction to bone biology. *Bone* 1992; 13: 3–6.
 42. Caplan I PD. The cellular and molecular biology of bone formation. *Bone Miner Res* 1987; 117.
 43. Lee MW, Kim DS, Yoo KH, Kim HR, Jang IK, Lee JH, et al. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cell gene expression patterns vary with culture conditions. *Blood Res* 2013; 48(2): 107.
 44. Haghighi P. Structure, function and adaptation of compact bone. *Skeletal Radiol.* 1989; 18(7): 506–506.
 45. Pieri F, Lucarelli E, Corinaldesi G, Iezzi G, Piattelli A, Giardino R, et al. Mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma enhance bone formation in sinus grafting: a histomorphometric study in minipigs. *J Clin Periodontol* 2008; 35(6): 539–46.
 46. Marks SC, Popoff SN. Bone cell biology: The regulation of development, structure, and function in the skeleton. *Am J Anat* 1988; 183(1): 1–44.
 47. Arıkan H, Korona stimülasyonunun ağız cerrahisi girişimlerinde iyileşme

- sürecinin etkisinin deneysel araştırılması, (Doktora tezi), İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2000.
48. Kafkas İH. Kemik İyileşmesinin Temelleri. Neurosurgical Focus, vol 10, 2001.
 49. Lindhe J, Lang NP. Clinical Periodontology and Implant Dentistry (6 th Ed), Ankara Nobel Tıp Kitapevleri, 2017.
 50. Çevik T. Ratlarda Oluşturulan Kritik Boyutlu Kemik Defektlerine Sığır Kaynaklı Deproteinize Kemik Greftiyle Birlikte Uygulanan Sistemik Resveratrolün Yeni Kemik Oluşumu Üzerine Olan Etkilerinin Deneysel Olarak İncelenmesi(Uzmanlık tezi), Cumhuriyet Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Ağız Diş Ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı, 2016.
 51. Tanaka E, Miyawaki Y, del Pozo R, Tanne K. Changes in the biomechanical properties of the rat interparietal suture incident to continuous tensile force application. Arch Oral Biol 2000; 45(12): 1059–64.
 52. Sibel Serin K. Mikroskopi Düzeyinde Kırık İyileşmesi. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası 2002; 55(2): 1.
 53. Gaw A, Packard CJ, Shepherd J. Statins: the HMG CoA reductase inhibitors in perspective (1 st ed), CRC Press, London, 1999; 120.
 54. Akca KE, Nikotin Verilen Sıçanlarda C Vitamini Uygulamasının Kemik İyileşmesi Üzerine Olan Etkisinin Histopatolojik Ve İmmünohistokimyasal Olarak İncelenmesi, Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi, Ağız Diş ve Çene Cerrahisi Ana Bilim Dalı, 2017: 11-13.
 55. Çetin Ç, Kemik defektlerinin iyileşmesinde non-rezorbe biyomateryaller ile trombosit zengin plazma (PRP) ve yönlendirilmiş doku rejenerasyonu (YDR)'nun etkilerinin deneysel olarak araştırılması (Doktora tezi), Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2008.
 56. Çiloğlu OR, Overektomi uygulanmış sıçanların tibialarında oluşturulan kemik defektinde sistemik parathormon tedavisinin ve lokal kemik greftlerinin kemik yapımı üzerine etkilerinin karşılaştırılması, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2008.
 57. Cotran RS, Kumar V, Robbins SL. Robbins's pathologic basis of disease (5 th ed). WB Saunders Co, London, 1994.

58. Cruess RL. Healing of bone, tendon and ligament. In: Fractures (2nd ed.) Philadelphia, Lippincott Co, 1984: 147–167.
59. Lindhe Ö, Brandt I, Schou Christiansen J, Ingebrigtsen K. Irreversible binding of o,p'-DDD in interrenal cells of Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Chemosphere* 2003; 50(9): 1249–53.
60. Miloro M, Ghali GE, Larsen PE, Waite PD. Peterson's Principles of Oral and Maxillofacial Surgery (2nd ed.) London, BC Decker Inc, 2004.
61. Araújo MG, Silva CO, Misawa M, Sukekava F. Alveolar socket healing: what can we learn? *Periodontol* 2000 2015; 68(1): 122–34.
62. Ozaki A, Tsunoda M, Kinoshita S, Saura R. Role of fracture hematoma and periosteum during fracture healing in rats: interaction of fracture hematoma and the periosteum in the initial step of the healing process. *J Orthop Sci* 2000; 5(1): 64–70.
63. Schindeler A, McDonald MM, Bokko P, Little DG. Bone remodeling during fracture repair: The cellular picture. *Semin Cell Dev Biol* 2008; 19(5): 459–66.
64. Miller PD. Skeletal health and bone strength: DXA and beyond growth for the journal of clinical densitometry. *J Clin Densitom* 2008; 11(1): 1–5.
65. Thibodeau GA, Patton KT. Anatomy and Physiology (5th ed.) China, Mosby Inc., 2003: 190–202.
66. Junquiera LC, Carneira J. Basic histology, Temel Histoloji. Y A, Solakoğlu S, editors. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri, 2006: 141–159.
67. Junquiera LC, Carneira J., Kelle RO. Temel Histoloji, Barış Kitabevi Ltd.Şti., 1998: 100–145.
68. Gartner LP, James LH. Color Atlas of Histology (3rd ed.), Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins,. Chapter 4, 2000: 73.
69. Marsell R. Biology of fracture, In: Browner B, Jupiter J, Levine A, Trafton P (Eds), *Skeletal Trauma*, Philadelphia, Saunders, 2003: 29-74.
70. Buckwalter JA, Glimcher MJ, Cooper RR, Recker R. Bone biology. II: Formation, form, modeling, remodeling, and regulation of cell function. *Instr Course Lect* 1996; 45: 387–99.
71. Tekelioğlu M. Genel tıp histolojisi, Güneş Kitabevi, Ankara, 1993.
72. Anderson MLC, Dhert WJA, de Bruijn JD, Dalmeijer RAJ, Leenders H, van Blitterswijk CA, et al. Critical size defect in the goat's os ilium. *Clin Orthop*

- Relat Res 1999; 364: 231–9.
73. Aaboe M, Pinholt EM, Hjørtting-Hansen E. Healing of experimentally created defects: a review. *Br J Oral Maxillofac Surg* 1995; 33(5): 312–8.
 74. Bosch C, Melsen B, Vargervik K. Importance of the critical-size bone defect in testing bone-regenerating materials. *J Craniofac Surg* 1998; 9(4): 310–6.
 75. JC K, JO. H. Animal models in bone research. *Bone Grafts & Bone Substitutes*. HB M, AH R, editors. Philadelphia: WB Saunders Company; 1992. 133–146.
 76. Aaboe M, Pinholt EM, Hjørtting-Hansen E. Unicortical critical size defect of rabbit tibia is larger than 8 mm. *J Craniofac Surg* 1994; 5(3): 201–3.
 77. Schmitz JP, Hollinger JO. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clin Orthop Relat Res* 1986;(205): 299–308.
 78. Hollinger JO, Kleinschmidt JC. The critical size defect as an experimental model to test bone repair materials. *J Craniofac Surg* 1990; 1(1): 60–8.
 79. Aybar Odstreil A, Territoriale E, Missana L. An experimental model in calvaria to evaluate bone therapies. *Acta Odontol Latinoam* 2005; 18(2): 63–7.
 80. Dodde R, Yavuzer R, Bier UC, Alkadri A, Jackson IT. Spontaneous bone healing in the Rabbit. *J Craniofac Surg* 2000; 11(4): 346–9.
 81. Cooper GM, Mooney MP, Gosain AK, Campbell PG, Losee JE, Huard J. Testing the critical size in calvarial bone defects: Revisiting the concept of a critical-size defect. *Plast Reconstr Surg* 2010; 125(6): 1685–92.
 82. Gielkens PFM, Schortinghuis J, de Jong JR, Raghoobar GM, Stegenga B, Bos RRM. Vivosorb[®], Bio-Gide[®], and Gore-Tex[®] as barrier membranes in rat mandibular defects: an evaluation by microradiography and micro-CT. *Clin Oral Implants Res* 2008; 19(5): 516–21.
 83. Schortinghuis J, Ruben JL, Meijer HJ, Bronckers ALJ, Raghoobar GM, Stegenga B. Microradiography to evaluate bone growth into a rat mandibular defect. *Arch Oral Biol* 2003; 48(2): 155–60.
 84. Coultas L, Chawengsaksophak K, Rossant J. Endothelial cells and VEGF in vascular development. *Nature* 2005; 438(7070): 937–45.
 85. Zelzer E, McLean W, Ng Y-S, Fukai N, Reginato AM, Lovejoy S, et al. Skeletal defects in VEGF120/120 mice reveal multiple roles for VEGF in skeletogenesis. *Development* 2002; 129(8): 1893–904.

86. Hoeben A, Landuyt B, Highley MS, Wildiers H, Van Oosterom AT, De Bruijn EA. Vascular Endothelial Growth Factor and angiogenesis. *Pharmacol Rev.* 2004; 56(4): 549–80.
87. Maes C, Kobayashi T, Selig MK, Torrekens S, Roth SI, Mackem S, et al. Osteoblast precursors, but not mature osteoblasts, move into developing and fractured bones along with invading blood vessels. *Dev Cell* 2010; 19(2): 329–44.
88. AI-Aql ZS, Alagl AS, Graves DT, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Molecular mechanisms controlling bone formation during fracture healing and distraction osteogenesis. *J Dent Res* 2008; 87(2): 107–18.
89. Ferguson C, Alpern E, Miclau T, Helms JA. Does adult fracture repair recapitulate embryonic skeletal formation? *Mech Dev* 1999; 87(1–2): 57–66.
90. Bruder SP, Fink DJ, Caplan AI. Mesenchymal stem cells in bone development, bone repair, and skeletal regeneration therapy. *J Cell Biochem.* 1994; 56(3): 283–94.
91. Simon AM, Manigrasso MB, O'Connor JP. Cyclo-oxygenase 2 function is essential for bone fracture healing. *J Bone Miner Res* 2002; 17(6): 963–76.
92. Thi MM, Suadican SO, Spray DC. Fluid flow-induced soluble vascular endothelial growth factor isoforms regulate actin adaptation in osteoblasts. *J Biol Chem* 2010; 285(40): 30931–41.
93. Nakai T, Yoshimura Y, Deyama Y, Suzuki K, Iida J. Mechanical stress up-regulates RANKL expression via the VEGF autocrine pathway in osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Mol Med Rep* 2009; 2(2): 229–34.
94. Zelzer E, Mamluk R, Ferrara N, Johnson RS, Schipani E, Olsen BR. VEGFA is necessary for chondrocyte survival during bone development. *Development* 2004; 131(9): 2161–71.
95. Wang Y, Wan C, Deng L, Liu X, Cao X, Gilbert SR, et al. The hypoxia-inducible factor α pathway couples angiogenesis to osteogenesis during skeletal development. *J Clin Invest* 2007; 117(6): 1616–26.
96. Matsubara H, Hogan DE, Morgan EF, Mortlock DP, Einhorn TA, Gerstenfeld LC. Vascular tissues are a primary source of BMP2 expression during bone formation induced by distraction osteogenesis. *Bone* 2012; 51(1): 168–80.
97. Hu K, Olsen BR. The roles of vascular endothelial growth factor in bone repair and regeneration. *Bone* 2016; 91:30–8.

98. Ivanovski S, Haase HR, Bartold PM. Expression of bone matrix protein mRNAs by primary and cloned cultures of the regenerative phenotype of human periodontal fibroblasts. *J Dent Res* 2001; 80(7): 1665–71.
99. Gaballah O, Abd-elmotelb M, Gaber R. Distribution of osteopontin in normal dog periodontium (Immunohistochemical study). *Life Sci J* 2018; 15: 25–31.
100. Gericke A, Qin C, Spevak L, Fujimoto Y, Butler WT, Sørensen ES, et al. Importance of phosphorylation for osteopontin regulation of biomineralization. *Calcif Tissue Int* 2005; 77(1): 45–54.
101. Rittling SR, Matsumoto HN, Mckee MD, Nanci A, An X-R, Novick KE, et al. Mice lacking osteopontin show normal development and bone structure but display altered osteoclast formation In Vitro. *J Bone Miner Res* 1998; 13(7): 1101–11.
102. Cosme-Silva L, Gomes-Filho JE, Benetti F, Dal-Fabbro R, Sakai VT, Cintra LTA, et al. Biocompatibility and immunohistochemical evaluation of a new calcium silicate-based cement, Bio-C Pulpo. *Int Endod J* 2019; 52(5): 689–700.
103. Parirokh M, Torabinejad M. Mineral Trioxide Aggregate: a comprehensive literature review-part I: chemical, physical, and antibacterial properties. Vol. 36, *Journal of Endodontics*. *J Endod* 2010 16–27.
104. Schwartz Rs, Mauger M, Clement Dj, Walker Wa. Mineral Trioxide Aggregate: a new material for endodontics. *J Am Dent Assoc* 1999; 130(7): 967–75.
105. Roberts H, Toth J, Berzins D, Charlton D. Mineral trioxide aggregate material use in endodontic treatment: A review of the literature. *Dent Mater* 2008; 24(2): 149–64.
106. Torabinejad M, Chivian N. Clinical applications of mineral trioxide aggregate. *J Endod* 1999; 25(3): 197–205.
107. Juárez Broon N, Bramante CM, Assis GF de, Bortoluzzi EA, Bernardineli N, Moraes IG de, et al. Healing of root perforations treated with Mineral Trioxide Aggregate (MTA) and Portland cement. *J Appl Oral Sci* 2006; 14(5): 305–11.
108. Menezes R, Bramante CM, Letra A, Carvalho VGG, Garcia RB. Histologic evaluation of pulpotomies in dog using two types of mineral trioxide aggregate and regular and white Portland cements as wound dressings. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004; 98(3): 376–9.

109. Holland R, de Souza V, Murata SS, Nery MJ, Bernabé PF, Otoboni Filho JA, et al. Healing process of dog dental pulp after pulpotomy and pulp covering with mineral trioxide aggregate or Portland cement. *Braz Dent J* 2001; 12(2): 109–13.
110. Holland R, Arlindootobonifilho J, Desouza V, Juvenalnery M, Felicioestradabernabe P, Dezanjunior E. Mineral Trioxide Aggregate repair of lateral root perforations. *J Endod* 2001; 27(4): 281–4.
111. Kettering JD, Torabinejad M. Investigation of mutagenicity of mineral trioxide aggregate and other commonly used root-end filling materials. *J Endod* 1995; 21(11): 537–9.
112. Koh E, Pittford T, Kariyawasam S, Chen N, Torabinejad M. Prophylactic treatment of dens evaginatus using mineral trioxide aggregate. *J Endod* 2001; 27(8): 540–2.
113. Yoshino P, Nishiyama CK, Modena KC da S, Santos CF, Sipert CR. In vitro cytotoxicity of White MTA, MTA Fillapex® and Portland Cement on human periodontal ligament fibroblasts. *Braz Dent J* 2013; 24(2): 111–6.
114. Torabinejad M, Parirokh M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review--part II: leakage and biocompatibility investigations. *J Endod* 2010; 36(2): 190–202.
115. Parirokh M, Torabinejad M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review--part I: chemical, physical, and antibacterial properties. *J Endod* 2010; 36(1): 16–27.
116. Abdullah D, Ford TRP, Papaioannou S, Nicholson J, McDonald F. An evaluation of accelerated Portland cement as a restorative material. *Biomaterials* 2002; 23(19): 4001-10.
117. 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(8): 564–70.
118. Von Arx T. Apical surgery: a review of current techniques and outcome. *Saudi Dent J* 2011; 23(1): 9–15.
119. Torabinejad M, Hong C, McDonald F, Pittford T. Physical and chemical properties of a new root-end filling material. *J Endod*. 1995; 21(7): 349–53.
120. Dominguez M, Witherspoon D, Gutmann J, Opperman L. Histological and scanning electron microscopy assessment of various vital pulp-therapy

- materials. *J Endod* 2003; 29(5): 324–33.
121. Ferris D, Baumgartner J. Perforation repair comparing two types of mineral trioxide aggregate. *J Endod* 2004; 30(6): 422–4.
 122. Tselnik M, Baumgartner J, Marshall J. Bacterial leakage with mineral trioxide aggregate or a resin-modified glass ionomer used as a coronal barrier. *J Endod* 2004; 30(11): 782–4.
 123. Asgary S, Parrokh M, Eghbal M, Brink F. Chemical differences between white and gray mineral trioxide aggregate. *J Endod* 2005; 31(2): 101–3.
 124. Dammaschke T, Gerth HUV, Züchner H, Schäfer E. Chemical and physical surface and bulk material characterization of white ProRoot MTA and two Portland cements. *Dent Mater* 2005; 21(8): 731–8.
 125. Islam I, Chng HK, Yap AUJ. X-ray diffraction analysis of mineral trioxide aggregate and Portland cement. *Int Endod J* 2006; 39(3): 220–5.
 126. Islam I, Kheng Chng H, Jin Yap AU. Comparison of the physical and mechanical properties of MTA and Portland cement. *J Endod* 2006; 32(3): 193–7.
 127. Cehreli Z, Turgut M, Olmez S, Dagdeviren A, Atilla P. Short term human primary pulpal response after direct pulp capping with fourth-generation dentin adhesives. *J Clin Pediatr Dent* 2001; 25(1): 65–71.
 128. Pitt Ford TR, Torabinejad M, McKendry DJ, Hong C-U, Kariyawasam SP. Use of mineral trioxide aggregate for repair of furcal perforations. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology* 1995; 79(6): 756–63.
 129. Torabinejad M, Higa RK, McKendry DJ, Pitt Ford TR. Dye leakage of four root end filling materials: effects of blood contamination. *J Endod* 1994; 20(4): 159–63.
 130. Kogan P, He J, Glickman GN, Watanabe I. The effects of various additives on setting properties of MTA. *J Endod* 2006; 32(6): 569–72.
 131. Lee SJ, Monsef M, Torabinejad M. Sealing ability of a mineral trioxide aggregate for repair of lateral root perforations. *J Endod* 1993 [cited 2021 May 23]; 19(11): 541–4.
 132. Demirkaya K, Aslanalp V. Çeşitli endodontik materyallerin kemik yapımı ve biyouyumlarının deneysel olarak incelenmesi, Doktora tezi, GATA / Sağlık Bilimleri Enstitüsü / Diş Hastalıkları ve Tedavisi Ana Bilim Dalı, Ankara,

2006; 10.

133. Fridland M, Rosado R. Mineral trioxide aggregate (MTA) solubility and porosity with different water-to-powder ratios. *J Endod* 2003; 29(12): 814–7.
134. Shie M-Y, Huang T-H, Kao C-T, Huang C-H, Ding S-J. The effect of a physiologic solution pH on properties of white mineral trioxide aggregate. *J Endod* 2009; 35(1): 98–101.
135. Camilleri J. Hydration mechanisms of mineral trioxide aggregate. *Int Endod J* 2007; 40(6): 462–70.
136. Lee Y. Effects of physiological environments on the hydration behavior of mineral trioxide aggregate. *Biomaterials* 2004; 25(5): 787–93.
137. Kayahan MB, Nekoofar MH, Kazandağ M, Canpolat C, Malkondu O, Kaptan F, et al. Effect of acid-etching procedure on selected physical properties of mineral trioxide aggregate. *Int Endod J* 2009; 42(11): 1004–14.
138. Chogle S, Mickel AK, Chan DMK, Huffaker K, Jones JJ. Intracanal assessment of mineral trioxide aggregate setting and sealing properties. *Gen Dent* 2007; 55(4): 306–11.
139. Schmitt D, Lee J, Bogen G. Multifaceted use of ProRoot MTA root canal repair material. *Pediatr Dent* 2001; 23(4): 326–30.
140. Attar N, Tam LE, McComb D. Flow, strength, stiffness and radiopacity of flowable resin composites. *J Can Dent Assoc* 2003; 69(8): 516–21.
141. Chan DC, Titus HW, Chung KH, Dixon H, Wellinghoff ST, Rawls HR. Radiopacity of tantalum oxide nanoparticle filled resins. *Dent Mater* 1999; 15(3): 219–22.
142. Geneva I, Organization, for, Standardization. *Dentistry-Polymer based fillings, restorative and luting materials*, 2000.
143. Chng HK, Islam I, Yap AUJ, Tong YW, Koh ET. Properties of a new root-end filling material. *J Endod* 2005; 31(9): 665–8.
144. Hauman CHJ, Love RM. Biocompatibility of dental materials used in contemporary endodontic therapy: a review. Part 1. Intracanal drugs and substances. *Int Endod J* 2003; 36(2): 75–85.
145. 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(1): 140–5.
146. Souza NJA, 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(1): 40–7.
147. Torabinejad M, Pitt Ford TR, Abedi HR, Kariyawasam SP, Tang H-M. Tissue reaction to implanted root-end filling materials in the tibia and mandible of guinea pigs. *J Endod* 1998; 24(7): 468–71.
 148. Yasuda Y, Ogawa M, Arakawa T, Kadowaki T, Saito T. The effect of mineral trioxide aggregate on the mineralization ability of rat dental pulp cells: an in vitro study. *J Endod* 2008; 34(9): 1057–60.
 149. Camilleri J. Characterization of hydration products of mineral trioxide aggregate. *Int Endod J* 2008; 41(5): 408–17.
 150. Chedella SC V, Berzins DW. A differential scanning calorimetry study of the setting reaction of MTA. *Int Endod J* 2010; 43(6): 509–18.
 151. Sarkar NK, Caicedo R, Ritwik P, Moiseyeva R, Kawashima I. Physicochemical basis of the biologic properties of mineral trioxide aggregate. *J Endod* 2005; 31(2): 97–100.
 152. Tomson PL, Grover LM, Lumley PJ, Sloan AJ, Smith AJ, Cooper PR. Dissolution of bio-active dentine matrix components by mineral trioxide aggregate. *J Dent* 2007 Aug; 35(8): 636–42.
 153. Bonson S, Jeansonne BG, Lallier TE. Root-end filling materials alter fibroblast differentiation. *J Dent Res* 2004; 83(5): 408–13.
 154. 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 Jan; 16(1): 73–88.
 155. Kuru L, Griffiths GS, Petrie A, Olsen I. Alkaline phosphatase activity is up regulated in regenerating human periodontal cells. *J Periodontal Res* 1999; 34(2): 123–7.
 156. Gulie Kui A, Berar A, Lascu L, Bolfa P, Bosca B, Miha C, et al. The influence of root-end filling materials on bone healing – an experimental study. *Med Pharm Reports* 2014 12;87(4):263–8.
 157. Da Silva GF, Guerreiro-Tanomaru JM, Sasso-Cerri E, Tanomaru-Filho M, Cerri PS. Histological and histomorphometrical evaluation of furcation perforations filled with MTA, CPM and ZOE. *Int Endod J* 2011; 44(2): 100–

- 10.
158. Zhu Q, Haglund R, Safavi KE, Spangberg LS. Adhesion of human osteoblasts on root-end filling materials. *J Endod* 2000; 26(7): 404–6.
159. Ghanbari HO, Taheri M, Abolfazli S, Asgary S, Gharechahi M. Efficacy of MTA and CEM cement with collagen membranes for treatment of class II furcation defects. *J Dent (Tehran)* 2014; 11(3): 343–54.
160. Rahimi S, Mokhtari H, Shahi S, Kazemi A, Asgary S, Eghbal M-J, et al. Osseous reaction to implantation of two endodontic cements: Mineral trioxide aggregate (MTA) and calcium enriched mixture (CEM). *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2012; 17(5): e907-11.
161. Bonson S, Jeansonne BG, Lallier TE. Root-end filling materials alter fibroblast differentiation. *J Dent Res* 2004; 83(5): 408–13.
162. Perinpanayagam H, Al-Rabeah E. Osteoblasts interact with MTA surfaces and express Runx2. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology* 2009 Apr; 107(4): 590–6.
163. Thomson TS, Berry JE, Somerman MJ, Kirkwood KL. Cementoblasts maintain expression of osteocalcin in the presence of mineral trioxide aggregate. *J Endod* 2003 [cited 2021 May 23]; 29(6): 407–12.
164. Shabahang S, Torabinejad M, Boyne PP, Abedi H, McMillan P. A comparative study of root-end induction using osteogenic protein-1, calcium hydroxide, and mineral trioxide aggregate in dogs. *J Endod* 1999; 25(1):1–5.
165. Koh ET, McDonald F, Pitt Ford TR, Torabinejad M. Cellular response to mineral trioxide aggregate. *J Endod* 1998; 24(8): 543–7.
166. Fakheran O, Birang R, Schmidlin PR, Razavi SM, Behfarnia P. Retro MTA and tricalcium phosphate/retro MTA for guided tissue regeneration of periodontal dehiscence defects in a dog model: a pilot study. *Biomater Res* 2019; 23(1): 14.
167. Ribeiro DA, Duarte MAH, Matsumoto MA, Marques MEA, Salvadori DMF. Biocompatibility in vitro tests of mineral trioxide aggregate and regular and white Portland cements. *J Endod* 2005; 31(8): 605–7.
168. Main C, Mirzayan N, Shabahang S, Torabinejad M. Repair of root perforations using mineral trioxide aggregate: a long-term study. *J Endod* 2004; 30(2): 80–3.
169. Baek S-H, Lee WC, Setzer FC, Kim S. Periapical bone regeneration after

- endodontic microsurgery with three different root-end filling materials: amalgam, SuperEBA, and mineral trioxide aggregate. *J Endod* 2010; 36(8): 1323–5.
170. Katsamakidis S, Slot DE, Van der Sluis LWM, Van der Weijden F. Histological responses of the periodontium to MTA: a systematic review. *J Clin Periodontol* 2013; 40(4): 334–44.
 171. Pornamazeh T, Yadegari Z, Ghasemi A, Sheykh-Al-Eslamian SM, Shojaeian S. In vitro cytotoxicity and setting time assessment of calcium-enriched mixture cement, retro Mineral Trioxide Aggregate and Mineral Trioxide Aggregate. *Iran Endod J* 2017; 12(4): 488–92.
 172. White JD, Lacefield WR, Chavers LS, Eleazer PD. The effect of three commonly used endodontic materials on the strength and hardness of root dentin. *J Endod* 2002; 28(12): 828–30.
 173. Ioannidis K, Mistakidis I, Beltes P, Karagiannis V. Spectrophotometric analysis of coronal discolouration induced by grey and white MTA. *Int Endod J* 2013; 46(2): 137–44.
 174. Vallés M, Mercadé M, Duran-Sindreu F, Bourdelande JL, Roig M. Influence of light and oxygen on the color stability of five calcium silicate-based materials. *J Endod* 2013; 39(4): 525–8.
 175. Marciano MA, Costa RM, Camilleri J, Mondelli RFL, Guimarães BM, Duarte MAH. Assessment of color stability of white mineral trioxide aggregate angelus and bismuth oxide in contact with tooth structure. *J Endod* 2014; 40(8): 1235–40.
 176. Berger T, Baratz AZ, Gutmann JL. In vitro investigations into the etiology of mineral trioxide tooth staining. *J Conserv Dent* 2014; 17(6): 526–30.
 177. Lenherr P, Allgayer N, Weiger R, Filippi A, Attin T, Krastl G. Tooth discoloration induced by endodontic materials: a laboratory study. *Int Endod J* 2012; 45(10): 942–9.
 178. Felman D, Parashos P. Coronal tooth discoloration and white mineral trioxide aggregate. *J Endod* 2013; 39(4): 484–7.
 179. Camilleri J. Staining Potential of Neo MTA Plus, MTA Plus, and Biodentine used for pulpotomy procedures. *J Endod* 2015; 41(7): 1139–45.
 180. Torabinejad M, Parirokh M, Dummer PMH. Mineral trioxide aggregate and other bioactive endodontic cements: an updated overview – part II: other

- clinical applications and complications. *International Endodontic Journal* 2018; 51: 284–317.
181. <https://nusmile.com/pages/neomta2>. Erişim tarihi: 12.09.2023
 182. Jiménez-Sánchez M del C, Segura-Egea JJ, Díaz-Cuenca A. Higher hydration performance and bioactive response of the new endodontic bioactive cement MTA HP repair compared with ProRoot MTA white and NeoMTA plus. *J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater* 2019; 107(6): 2109–20.
 183. Gandolfi MG, Siboni F, Primus CM, Prati C. Ion Release, Porosity, Solubility, and Bioactivity of MTA Plus Tricalcium Silicate. *J Endod* 2014; 40(10): 1632–7.
 184. Avalon Biomed. NeoMTAPlus Directions for use. <ftp://ftp.endoco.com/links/AvalonMTAPlusDFU.pdf> [accessed October 2018].
 185. 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(5): 580–93.
 186. Ber BS, Hatton JF, Stewart GP. Chemical modification of proroot mta to improve handling characteristics and decrease setting time. *J Endod* 2007; 33(10): 1231–4.
 187. Huang T-H, Shie M-Y, Kao C-T, Ding S-J. The effect of setting accelerator on properties of mineral trioxide aggregate. *J Endod* 2008; 34(5): 590–3.
 188. Govindaraju L, Jeevanandan G, Subramanian EMG. Clinical evaluation of quality of obturation and instrumentation time using two modified rotary file systems with manual instrumentation in primary teeth. *J Clin Diagnostic Res* 2017 [cited 2020 Sep 6]; 11(9): ZC55–8.
 189. Rodríguez-Lozano FJ, Collado-González M, López-García S, García-Bernal D, Moraleda JM, Lozano A, et al. Evaluation of changes in ion release and biological properties of NeoMTA-Plus and Endocem-MTA exposed to an acidic environment. *Int Endod J* 2019 Mar; iej.13107.
 190. McMichael GE, Primus CM, Opperman LA. Dentinal Tubule Penetration of Tricalcium Silicate Sealers. *J Endod* 2016; 42(4): 632–6.
 191. Rodríguez-Lozano FJ, Lozano A, López-García S, García-Bernal D, Sanz JL, Guerrero-Gironés J, et al. Biomineralization potential and biological properties of a new tantalum oxide (Ta₂O₅)–containing calcium silicate cement. *Clin Oral Investig* 2022; 26(2): 1427–41.

192. Abou ElReash A, Hamama H, Grawish M, Saeed M, Zaen El-Din AM, Shahin MA, et al. A laboratory study to test the responses of human dental pulp stem cells to extracts from three dental pulp capping biomaterials. *Int Endod J* 2021; 54(7): 1118–28.
193. Youssef A-R, Emara R, Taher MM, Al-Allaf FA, Almalki M, Almasri MA, et al. Effects of mineral trioxide aggregate, calcium hydroxide, biodentine and Emdogain on osteogenesis, Odontogenesis, angiogenesis and cell viability of dental pulp stem cells. *BMC Oral Health* 2019; 19(1): 133.
194. Kaup M, Schäfer E, Dammaschke T. An in vitro study of different material properties of Biodentine compared to ProRoot MTA. *Head Face Med* 2015; 11(1): 16.
195. Malkondu Ö, Kazandağ MK, Kazazoğlu E. A Review on Biodentine, a Contemporary Dentine Replacement and Repair Material. *Biomed Res Int* 2014; 2014: 1–10.
196. 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(7): 632–41.
197. Camilleri J, Grech L, Galea K, Keir D, Fenech M, Formosa L, et al. Porosity and root dentine to material interface assessment of calcium silicate-based root-end filling materials. *Clin Oral Investig* 2014; 18(5): 1437–46.
198. Mandeep Kaur HS. Biodentine: A Promising Dentin substitute. *JBR J Interdiscip Med Dent Sci* 2014; 02(05).
199. Grech L, Mallia B, Camilleri J. Investigation of the physical properties of tricalcium silicate cement-based root-end filling materials. *Dent Mater* 2013; 29(2): 20–8.
200. Raskin A, Eschrich G, Dejoui J, About I. In vitro microleakage of Biodentine as a dentin substitute compared to Fuji II LC in cervical lining restorations. *J Adhes Dent* 2012; 14(6): 535–42.
201. Piconi C, Maccauro G. Zirconia as a ceramic biomaterial. *Biomaterials* 1999; 20(1): 1–25.
202. <https://www.septodont.fr/1-3-380-144/DENTISTERIE-RESTAURATRICE/MATERIAU-BIOACTIF/MATERIAU-BIOACTIF/Biodentine> Erişim tarihi: 12.09.2023
203. Camilleri J, Montesin FE, Brady K, Sweeney R, Curtis R V, Ford TRP. The

- constitution of mineral trioxide aggregate. *Dent Mater* 2005; 21(4): 297–303.
204. Rajasekharan S, Martens LC, Cauwels RGEC, Verbeeck RMH. Biodentine™ material characteristics and clinical applications: a review of the literature. *Eur Arch Paediatr Dent* 2014; 15(3): 147–58.
 205. Arora DV. Bioactive dentin replacement. *IOSR J Dent Med Sci*. 2013;12(4):51–7.
 206. Kaur M, Singh H, Dhillon JS, Batra M, Saini M. MTA versus Biodentine: review of literature with a comparative analysis. *J Clin Diagn Res* 2017; 11(8): ZG01–5.
 207. S P, Ranjan M. Review on Biodentine-a bioactive dentin substitute. *IOSR J Dent Med Sci* 2014; 13(1): 13–7.
 208. 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(3): 380–4.
 209. Koubi S, Elmerini H, Koubi G, Tassery H, Camps J. Quantitative evaluation by glucose diffusion of microleakage in aged calcium silicate-based open-sandwich restorations. *Int J Dent* 2012; 2012: 105863.
 210. Al-Hiyasat AS, Ahmad DM, Khader YS. The effect of different calcium silicate-based pulp capping materials on tooth discoloration: an in vitro study. *BMC Oral Health* 2021 Jul 2 ;21(1): 330.
 211. Madani Z, Alvandifar S, Bizhani A. Evaluation of tooth discoloration after treatment with mineral trioxide aggregate, calcium-enriched mixture, and Biodentine® in the presence and absence of blood. *Dent Res J (Isfahan)* 2019; 16(6): 377–83.
 212. Kahler B, Rossi-Fedele G. A Review of Tooth Discoloration after Regenerative Endodontic Therapy. *J Endod* 2016; 42(4): 563–9.
 213. Slaboseviciute M, Vasiliauskaite N, Drukteinis S, Martens L, Rajasekharan S. Discoloration potential of Biodentine: a systematic review. *Mater (Basel, Switzerland)* 2021; 14(22).
 214. Yoldaş SE, Bani M, Atabek D, Bodur H. Comparison of the potential discoloration effect of Bioaggregate, Biodentine, and White Mineral Trioxide Aggregate on Bovine Teeth: In Vitro Research. *J Endod* 2016; 42(12): 1815–8.
 215. Luo Z, Li D, Kohli MR, Yu Q, Kim S, He W-X. Effect of Biodentine™ on the

- proliferation, migration and adhesion of human dental pulp stem cells. *J Dent* 2014; 42(4): 490–7.
216. Zanini M, Sautier JM, Berdal A, Simon S. Biodentine induces immortalized murine pulp cell differentiation into odontoblast-like cells and stimulates biomineralization. *J Endod* 2012; 38(9): 1220–6.
 217. Küçükkaya S, Görduysus MÖ, Zeybek ND, Müftüoğlu SF. In vitro cytotoxicity of calcium silicate-based endodontic cement as root-end filling materials. *Scientifica (Cairo)* 2016; 2016: 9203932.
 218. Gandolfi MG, Iacono F, Agee K, Siboni F, Tay F, Pashley DH, et al. Setting time and expansion in different soaking media of experimental accelerated calcium-silicate cements and ProRoot MTA. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009; 108(6): e39-45.
 219. Prati C, Gandolfi MG. Calcium silicate bioactive cements: biological perspectives and clinical applications. *Dent Mater* 2015; 31(4): 351–70.
 220. Nekoofar MH, Oloomi K, Sheykhrezae MS, Tabor R, Stone DF, Dummer PMH. An evaluation of the effect of blood and human serum on the surface microhardness and surface microstructure of mineral trioxide aggregate. *Int Endod J* 2010; 43(10): 849–58.
 221. Gandolfi MG, Siboni F, Botero T, Bossù M, Riccitiello F, Prati C. Calcium silicate and calcium hydroxide materials for pulp capping: biointeractivity, porosity, solubility and bioactivity of current formulations. *J Appl Biomater Funct Mater* 2015; 13(1): 43–60.
 222. Fridland M, Rosado R. MTA solubility: a long term study. *J Endod* 2005; 31(5): 376–9.
 223. Perinpanayagam H, Al-Rabeah E. Osteoblasts interact with MTA surfaces and express Runx2. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009; 107(4): 590–6.
 224. Pawar AM, Kokate SR, Shah RA. Management of a large periapical lesion using BiodentineTM as retrograde restoration with eighteen months evident follow up. *J Conserv Dent* 2013; 16(6): 573–5.
 225. Caron G, Azérad J, Faure M-O, Machtou P, Boucher Y. Use of a new retrograde filling material (Biodentine) for endodontic surgery: two case reports. *Int J Oral Sci* 2014; 6(4): 250–3.
 226. Baranwal A. Management of external invasive cervical resorption of tooth

- with Biodentine: A case report. *J Conserv Dent* 2016; 19(3): 296.
227. Salzano S, Tirone F. Conservative Nonsurgical Treatment of Class 4 Invasive Cervical Resorption: A Case Series. *J Endod* 2015; 41(11): 1907–12.
 228. Hadrossek PH, Dammaschke T. New treatment option for an incomplete vertical root fracture--a preliminary case report. *Head Face Med* 2014; 10: 9.
 229. Floratos SG, Kratchman SI. Surgical management of vertical root fractures for posterior teeth: report of four cases. *J Endod* 2012; 38(4): 550–5.
 230. Taschieri S, Tamse A, Del Fabbro M, Rosano G, Tsesis I. A new surgical technique for preservation of endodontically treated teeth with coronally located vertical root fractures: a prospective case series. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2010; 110(6): e45-52.
 231. Gandolfi MG, Iezzi G, Piattelli A, Prati C, Scarano A. Osteoinductive potential and bone-bonding ability of ProRoot MTA, MTA Plus and Biodentine in rabbit intramedullary model: Microchemical characterization and histological analysis. *Dent Mater* 2017; 33(5): e221–38.
 232. Karring T, Nyman S, Gottlow J, Laurell L. Development of the biological concept of guided tissue regeneration animal and human studies. *Periodontol 2000* 1993; 1(1): 26–35.
 233. Sculean A, Nikolidakis D, Schwarz F. Regeneration of periodontal tissues: combinations of barrier membranes and grafting materials - biological foundation and preclinical evidence: a systematic review. *J Clin Periodontol* 2008; 35(8 Suppl): 106–16.
 234. Bosshardt DD, Sculean A. Does periodontal tissue regeneration really work? *Periodontol 2000* 2009; 51(1): 208–19.
 235. Melcher AH. On the repair potential of periodontal tissues. *J Periodontol* 1976; 47(5): 256–60.
 236. Lindhe J, Socransky SS, Nyman S, Haffajee A, Westfelt E. “Critical probing depths” in periodontal therapy. *J Clin Periodontol* 1982; 9(4): 323–36.
 237. Hämmerle CHF, Jung RE. Bone augmentation by means of barrier membranes. *Periodontol 2000* 2003;33: 36–53.
 238. Janner SFM, Bosshardt DD, Cochran DL, Chappuis V, Huynh-Ba G, Jones AA, et al. The influence of collagen membrane and autogenous bone chips on bone augmentation in the anterior maxilla: a preclinical study. *Clin Oral Implants Res* 2017; 28(11): 1368–80.

239. Zitzmann NU, Naef R, Schärer P. Resorbable versus nonresorbable membranes in combination with Bio-Oss for guided bone regeneration. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1997; 12(6): 844–52.
240. Bornstein MM, Heynen G, Bosshardt DD, Buser D. Effect of two bioabsorbable barrier membranes on bone regeneration of standardized defects in calvarial bone: a comparative histomorphometric study in pigs. *J Periodontol* 2009; 80(8): 1289–99.
241. Higuchi J. Recent advances in GTR/GBR barrier membranes design for periodontal regeneration. *Biomed J Sci Tech Res* 2019; 16(1): 11818–20.
242. Stoecklin-Wasmer C, Rutjes AWS, da Costa BR, Salvi GE, Jüni P, Sculean A. Absorbable collagen membranes for periodontal regeneration: a systematic review. *J Dent Res* 2013; 92(9): 773–81.
243. Pitaru S, Tal H, Soldinger M, Azar-Avidan O, Noff M. Collagen membranes prevent the apical migration of epithelium during periodontal wound healing. *J Periodontal Res* 1987; 22(4): 331–3.
244. Reynolds MA, Aichelmann-Reidy ME, Branch-Mays GL, Gunsolley JC. The efficacy of bone replacement grafts in the treatment of periodontal osseous defects. A systematic review. *Ann Periodontol* 2003; 8(1): 227–65.
245. Sheikh Z, Qureshi J, Alshahrani AM, Nassar H, Ikeda Y, Glogauer M, et al. Collagen based barrier membranes for periodontal guided bone regeneration applications. *Odontology* 2017; 105(1): 1–12.
246. <https://www.geistlich-pharma.com/dental/products/membranes/bio-gide>
Erişim Tarihi: 12.09.2023
247. Rothamel D, Schwarz F, Sager M, Herten M, Sculean A, Becker J. Biodegradation of differently cross-linked collagen membranes: an experimental study in the rat. *Clin Oral Implants Res* 2005; 16(3): 369–78.
248. <https://www.sigmaaldrich.com/TR/en/product/mm/100485>. Erişim tarihi: 01.09.2023
249. Vasudea N, Mishra S. Inderbir Singh's Textbook of Human Histology: With Color Atlas and Practical Guide, JP Medical Ltd, 2016.
250. Recker R. Embryology, anatomy, and microstructure of bone, New York, Raven, 1992: 219–240.
251. Dee R. Bone healing, in Dee R, Mango E, Hurst E, (eds): Principles of Orthopaedic Practice, McGraw-Hill, New York, 1988: 68–73.

252. Al-Hezaimi K, Salameh Z, Al-Fouzan K, Al Rejaie M, Tay FR. Histomorphometric and micro-computed tomography analysis of pulpal response to three different pulp capping materials. *J Endod* 2011; 37(4): 507–12.
253. Holstein JH, Garcia P, Histing T, Kristen A, Scheuer C, Menger MD, et al. Advances in the establishment of defined mouse models for the study of fracture healing and bone regeneration. *J Orthop Trauma* 2009; 23(5 Suppl): S31-8.
254. Choi HJ, Kim JM, Kwon E, Che J-H, Lee J-I, Cho S-R, et al. Establishment of efficacy and safety assessment of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells (hATMSCs) in a nude rat femoral segmental defect model. *J Korean Med Sci* 2011; 26(4): 482–91.
255. Iris B, Zilberman Y, Zeira E, Galun E, Honigman A, Turgeman G, et al. Molecular imaging of the skeleton: quantitative real-time bioluminescence monitoring gene expression in bone repair and development. *J Bone Miner Res* 2003 Mar; 18(3): 570–8.
256. Asgary S, Parirokh M, Eghbal MJ, Ghoddusi J. SEM evaluation of pulp reaction to different pulp capping materials in dog's teeth. *Iran Endod J* 2006; 1(4): 117–23.
257. Leites AB, Baldissera EZ, Silva AF, Tarquinio S, Botero T, Piva E, et al. Histologic response and tenascin and fibronectin expression after pulp capping in pig primary teeth with mineral trioxide aggregate or calcium hydroxide. *Oper Dent* 2011; 36(4): 448–56.
258. Santamaria-Jr M, Bagne L, Zaniboni E, Santamaria MP, Jardini MAN, Felonato M, et al. Diabetes mellitus and periodontitis: Inflammatory response in orthodontic tooth movement. *Orthod Craniofac Res* 2020; 23(1): 27–34.
259. Xi Q, Bu R-F, Liu H-C, Mao T-Q. Reconstruction of caprine mandibular segmental defect by tissue engineered bone reinforced by titanium reticulum. *Chinese J Traumatol = Zhonghua chuang shang za zhi* 2006; 9(2): 67–71.
260. Marukawa E, Asahina I, Oda M, Seto I, Alam M, Enomoto S. Functional reconstruction of the non-human primate mandible using recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2002; 31(3): 287–95.
261. Manassero M, Viateau V, Matthys R, Deschepper M, Vallefucio R,

- Bensidhoum M, et al. A novel murine femoral segmental critical-sized defect model stabilized by plate osteosynthesis for bone tissue engineering purposes. *Tissue Eng Part C Methods* 2013; 19(4): 271–80.
262. Medrado ARAP, Pugliese LS, Reis SRA, Andrade ZA. Influence of low level laser therapy on wound healing and its biological action upon myofibroblasts. *Lasers Surg Med* 2003; 32(3): 239–44.
 263. DeConde AS, Lee MK, Sidell D, Aghaloo T, Lee M, Tetradis S, et al. Defining the critical-sized defect in a rat segmental mandibulectomy model. *JAMA Otolaryngol Neck Surg* 2014; 140(1): 58.
 264. Do Nascimento C, Issa JPM, Iyomasa MM, Regalo SCH, Siéssere S, Pitol DL, et al. Bone repair using mineral trioxide aggregate combined to a material carrier, associated or not with calcium hydroxide in bone defects. *Micron* 2008; 39(7): 868–74.
 265. Pinheiro ALB, Soares LGP, Cangussú MCT, Santos NRS, Barbosa AFS, Júnior LS. Effects of LED phototherapy on bone defects grafted with MTA, bone morphogenetic proteins and guided bone regeneration: a Raman spectroscopic study. *Lasers Med Sci* 2012 21; 27(5): 903–16.
 266. McGovern JA, Griffin M, Hutmacher DW. Animal models for bone tissue engineering and modelling disease. *Dis Model Mech* 2018; 11(4).
 267. Glowacki J, Kaban LB, Murray JE, Folkman J, Mulliken JB. Application of the biological principle of induced osteogenesis for craniofacial defects. *Lancet (London, England)* 1981; 1(8227): 959–62.
 268. Misawa Y, Kageyama T, Moriyama K, Kurihara S, Yagasaki H, Deguchi T, et al. Effect of age on alveolar bone turnover adjacent to maxillary molar roots in male rats: A histomorphometric study. *Arch Oral Biol* 2007; 52(1): 44–50.
 269. Cooper GM, Mooney MP, Gosain AK, Campbell PG, Losee JE, Huard J. Testing the critical size in calvarial bone defects: revisiting the concept of a critical-size defect. *Plast Reconstr Surg* 2010; 125(6): 1685–92.
 270. Gielkens PFM, Schortinghuis J, de Jong JR, Raghoobar GM, Stegenga B, Bos RRM. Vivosorb, Bio-Gide, and Gore-Tex as barrier membranes in rat mandibular defects: an evaluation by microradiography and micro-CT. *Clin Oral Implants Res* 2008; 19(5): 516–21.
 271. Schortinghuis J, Ruben JL, Meijer HJA, Bronckers ALJJ, Raghoobar GM, Stegenga B. Microradiography to evaluate bone growth into a rat mandibular

- defect. Arch Oral Biol 2003; 48(2): 155–60.
272. Baldik Y, Talu U, Altinel L, Dawley S, Wallis K. Nitrik oksitin kemik iyileşmesi üzerine olan etkisinin radyolojik incelenmesi : Sıçanlarda deneysel çalışma. Acta Orthop Traumatol Turc 2000; 34: 190-197
 273. Nair PNR, 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(2): 128–50.
 274. Parirokh M, Torabinejad M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review--Part III: Clinical applications, drawbacks, and mechanism of action. J Endod 2010; 36(3): 400–13.
 275. Baek S-H, Plenck H, Kim S. Periapical tissue responses and cementum regeneration with amalgam, SuperEBA, and MTA as root-end filling materials. J Endod 2005; 31(6): 444–9.
 276. Simon S, Rilliard F, Berdal A, Machtou P. The use of mineral trioxide aggregate in one-visit apexification treatment: a prospective study. Int Endod J 2007; 40(3): 186–97.
 277. Rodríguez-Lozano FJ, Lozano A, López-García S, García-Bernal D, Sanz JL, Guerrero-Gironés J, et al. Biomineralization potential and biological properties of a new tantalum oxide (Ta₂O₅)-containing calcium silicate cement. Clin Oral Investig 2022; 26(2): 1427–41.
 278. Camilleri J. Color stability of white mineral trioxide aggregate in contact with hypochlorite solution. J Endod 2014; 40(3): 436–40.
 279. Daltoe OM, Silva P FW, Faccioli LH, Hernandez-G PM, De-Rossi A, Silva BLA. Expression of mineralization markers during pulp response to Biodentine and Mineral Trioxide Aggregate. J Endod 2016 [cited 2021 Oct 19]; 42(4): 596–603.
 280. De Rossi A, Silva LAB, Gatón-Hernández P, Sousa-Neto MD, Nelson-Filho P, Silva RAB, et al. Comparison of pulpal responses to pulpotomy and pulp capping with biodentine and mineral trioxide aggregate in dogs. J Endod 2014; 40(9):1362–9.
 281. Tang J-J, Shen Z-S, Qin W, Lin Z. A comparison of the sealing abilities between Biodentine and MTA as root-end filling materials and their effects on bone healing in dogs after periradicular surgery. J Appl Oral Sci 2019; 27: 93.

282. Mohammed RWA, Manal M, Bårdsen A, Bletsa A. Tricalcium silicate cements: osteogenic and angiogenic responses of human bone marrow stem cells. *Eur J Oral Sci* 2019; 127(3): 261–8.
283. Margunato S, Taşlı PN, Aydın S, Karapınar Kazandağ M, Şahin F. In vitro evaluation of ProRoot MTA, Biodentine, and MM-MTA on human alveolar bone marrow stem cells in terms of biocompatibility and mineralization. *J Endod* 2015; 41(10): 1646–52.
284. 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(10): 699–704.
285. Mestieri LB, Tanomaru-Filho M, Gomes-Cornélio AL, Salles LP, Bernardi MIB, Guerreiro-Tanomaru JM. Radiopacity and cytotoxicity of Portland cement associated with niobium oxide micro and nanoparticles. *J Appl Oral Sci* 2014; 22(6): 554–9.
286. Rentsch C, Schneiders W, Manthey S, Rentsch B, Rammelt S. Comprehensive histological evaluation of bone implants. *Biomater* 2014; 4(1): e27993.
287. Luna LG, *Histopathologic methods and color atlas of special stains and tissue artifacts*, Johnson Printers, Downers Grove, IL, 1992, 151–152.
288. Gentile G, Tambuzzi S, Andreola S, Zoja R. Histotopography of haemorrhagic infiltration in the hanging cutaneous furrow: Where to look for haemorrhagic infiltration in hanging. *Med Sci Law* 2022; 62(1): 52–9.
289. Altunatmaz K. Kırık İyileşmesinin Biyolojisi Ve Biyolojik Osteosentez. *İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 2004; 30: 141–7.
290. Aaboe M, Pinholt EM, Hjørtting-hansen E, Solheim E, Praetorius F. Guided tissue regeneration using degradable and nondegradable membranes in rabbit tibia. *Clin Oral Implants Res* 1993; 4(4): 172–6.
291. Furuya M, Kikuta J, Fujimori S, Seno S, Maeda H, Shirazaki M, et al. Direct cell-cell contact between mature osteoblasts and osteoclasts dynamically controls their functions in vivo. *Nat Commun* 2018; 9(1): 1–12.
292. Yang N, Liu Y. The Role of the Immune Microenvironment in Bone Regeneration. *Int J Med Sci* 2021; 18(16): 3697–707.
293. Wu AC, Raggatt LJ, Alexander KA, Pettit AR. Unraveling macrophage contributions to bone repair. *Bonekey Rep* 2013; 2:373.
294. Fromigué O, Marie PJ, Lomri A. Bone morphogenetic protein-2 and

- transforming growth factor-beta2 interact to modulate human bone marrow stromal cell proliferation and differentiation. *J Cell Biochem* 1998; 68(4): 411–26.
295. Blom AB, van Lent PLEM, Holthuysen AEM, van der Kraan PM, Roth J, van Rooijen N, et al. Synovial lining macrophages mediate osteophyte formation during experimental osteoarthritis. *Osteoarthr Cartil* 2004; 12(8): 627–35.
 296. Coultas L, Chawengsaksophak K, Rossant J. Endothelial cells and VEGF in vascular development. *Nature* 2005; 438(7070): 937–45.
 297. Maes C, Kobayashi T, Selig MK, Torrekens S, Roth SI, Mackem S, et al. Osteoblast precursors, but not mature osteoblasts, move into developing and fractured bones along with invading blood vessels. *Dev Cell* 2010; 19(2): 329–44.
 298. Zelzer E, McLean W, Ng Y-S, Fukai N, Reginato AM, Lovejoy S, et al. Skeletal defects in VEGF(120/120) mice reveal multiple roles for VEGF in skeletogenesis. *Development* 2002; 129(8): 1893–904.
 299. Bruder SP, Fink DJ, Caplan AI. Mesenchymal stem cells in bone development, bone repair, and skeletal regeneration therapy. *J Cell Biochem* 1994; 56(3):283–94.
 300. Cha J, Pla R, Vignoletti F, Jung U, Sanz-Esporrin J, Sanz M. Immunohistochemical characteristics of lateral bone augmentation using different biomaterials around chronic peri-implant dehiscence defects: An experimental in vivo study. *Clin Oral Implants Res* 2021; 32(5): 569–80.
 301. Shen J, Sun Y, Liu X, Zhu Y, Bao B, Gao T, et al. EGFL6 regulates angiogenesis and osteogenesis in distraction osteogenesis via Wnt/ β -catenin signaling. *Stem Cell Res Ther* 2021; 12(1): 415.
 302. Stuari AS, Silvano PRÁ, Arnez MFM, Mira PC da S, Gorita MC, Monteiro PM, et al. VEGF and FGF-2 released in palatal suture after rapid maxillary expansion (RME). *Braz Dent J* 2021; 32(1): 98–103.
 303. Reyes-Carmona JF, Santos AS, Figueiredo CP, Baggio CH, Felipe MCS, Felipe WT, et al. host–mineral trioxide aggregate inflammatory molecular signaling and biomineralization ability. *J Endod* 2010; 36(8): 1347–53.
 304. Queiroz MB, Inada RNH, Lopes CS, Guerreiro-Tanomaru JM, Sasso-Cerri E, Tanomaru-Filho M, et al. Bioactive potential of Bio-C Pulpo is evidenced by presence of birefringent calcite and osteocalcin immunoexpression in the rat

- subcutaneous tissue. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2022; 110(10): 2369–80.
305. Blanquer A, Musilkova J, Barrios L, Ibáñez E, Vandrovцова M, Pellicer E, et al. Cytocompatibility assessment of Ti-Zr-Pd-Si-(Nb) alloys with low Young's modulus, increased hardness, and enhanced osteoblast differentiation for biomedical applications. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2018; 106(2): 834–42.
 306. Chen C-L, Huang T-H, Ding S-J, Shie M-Y, Kao C-T. Comparison of calcium and silicate cement and mineral trioxide aggregate biologic effects and bone markers expression in MG63 cells. *J Endod* 2009;c35(5):c682–5.
 307. Eghbal MJ, Asgary S, Baglue RA, Parirokh M, Ghoddusi J. MTA pulpotomy of human permanent molars with irreversible pulpitis. *Aust Endod J* 2009; 35(1):4–8.
 308. Fransson H, Wolf E, Petersson K. Formation of a hard tissue barrier after experimental pulp capping or partial pulpotomy in humans: an updated systematic review. *Int Endod J* 2016 ; 49(6): 533–42.
 309. Viana Viola N, Maria Guerreiro-Tanomaru J, Ferreira da Silva G, Sasso-Cerri E, Tanomaru-Filho M, Cerri PS. Biocompatibility of an experimental MTA sealer implanted in the rat subcutaneous: Quantitative and immunohistochemical evaluation. *J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater* 2012; 100B(7): 1773–81.
 310. An S, Gao Y, Ling J. Characterization of human periodontal ligament cells cultured on three-dimensional biphasic calcium phosphate scaffolds in the presence and absence of L-ascorbic acid, dexamethasone and β -glycerophosphate in vitro. *Exp Ther Med* 2015; 10(4): 1387–93.
 311. Theodoro LH, Caiado RC, Longo M, Novaes VCN, Zanini NA, Ervolino E, et al. Effectiveness of the diode laser in the treatment of ligature-induced periodontitis in rats: a histopathological, histometric, and immunohistochemical study. *Lasers Med Sci* 2015; 30(4): 1209–18.
 312. Gomes-Filho JE, de Moraes Costa MMT, Cintra LTA, Duarte PCT, Takamiya AS, Lodi CS, et al. Evaluation of rat alveolar bone response to Angelus MTA or experimental light-cured mineral trioxide aggregate using fluorochromes. *J Endod* 2011; 37(2): 250–4.
 313. Okasha H, Abu-Seida AM, Hashem AA, El Ashry SH, Nagy MM.

- Inflammatory response and immunohistochemical characterization of experimental calcium silicate-based perforation repair material. *Int J Exp Pathol* 2022; 103(4): 156–63.
314. Tawfik HE, Abu-Seida AM, Hashem AA, El-Khawlani MM. Treatment of experimental furcation perforations with mineral trioxide aggregate, platelet rich plasma or platelet rich fibrin in dogs' teeth. *Exp Toxicol Pathol* 2016; 68(6): 321–7.
 315. Zou L, Liu J, Yin S, Li W, Xie J. In vitro evaluation of the sealing ability of MTA used for the repair of furcation perforations with and without the use of an internal matrix. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2008; 105(6): e61-5.
 316. Choi K-S, Kan JYK, Boyne PJ, Goodacre CJ, Lozada JL, Rungcharassaeng K. The effects of resorbable membrane on human maxillary sinus graft: a pilot study. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2009; 24(1): 73–80.
 317. Pjetursson BE, Tan WC, Zwahlen M, Lang NP. A systematic review of the success of sinus floor elevation and survival of implants inserted in combination with sinus floor elevation. *J Clin Periodontol* 2008; 35: 216–40.
 318. Tawil G, Mawla M. Sinus floor elevation using a bovine bone mineral (Bio-Oss) with or without the concomitant use of a bilayered collagen barrier (Bio-Gide): a clinical report of immediate and delayed implant placement. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2001; 16(5): 713–21.
 319. Mohamed DA-A, Abdelwahab SA, Mahmoud RH, Taha RM. Radiographic and immuno-histochemical evaluation of root perforation repair using MTA with or without platelet-rich fibrin or concentrated growth factors as an internal matrix in dog's teeth: in vivo animal study. *Clin Oral Investig* 2023; 27: 510
 320. Shaheen SD, Niazy MA, Jamil WE, Abu-Seida AM. Pulp tissue response to platelets rich plasma, platelets rich fibrin and mineral trioxide aggregate as pulp capping materials. *Al-Azhar Dent J Girls* 2021; 8(4): 561–70.
 321. Dohan DM, Choukroun J, Diss A, Dohan SL, Dohan AJJ, Mouhyi J, et al. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. part II: platelet-related biologic features. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology* 2006; 101(3): e45–50.

EKLER

EK-1: ETİK KURUL ONAYI



T.C.
AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
(AKUHADYEK)

Sayı: 49533702/102
Konu: AKUHADYEK-124-21-Referans nolu araştırma
Dr. Öğr. Üyesi Özgür DOĞAN
AFSÜ Diş Hekimliği Fakültesi

Tarih : 04/10/2022

Üniversitemiz Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'na sunmuş olduğunuz "Yeni Geliştirilen MTA (Mineral Trioksit Agregat) Maddesinin Kemik İyileşmesinde Mandibular Kemik Defekti Modelinde Ratlarda Radyografik Ve Histopatolojik Yönden Değerlendirilmesi" isimli daha önceden onay almış olan araştırma projesi "Yeni Geliştirilen MTA (Mineral Trioksit Agregat) Maddesinin Kemik İyileşmesinde Mandibular Kemik Defekti Modelinde Ratlarda Histopatolojik Ve Immunohistokimyasal Yönden Değerlendirilmesi" şeklinde değiştirilmesi kurumumuz tarafından uygun görülmüştür.

Görevi	Adı	İmza	Görevi	Adı	İmza
Başkan					
Üye					
Üye					
Üye					
Üye					

Gazlıgöl yolu üzeri A.N.S kampüsü 03200 AFYONKARAHİSAR