



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü



ÜÇ FARKLI MİNERAL TRİOKSİT AGREGAT SİMANININ PROENFLAMATUVAR SİTOKİN DÜZEYLERİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Doktora Tezi

Esengül ÜNGÜDER

Endodonti Anabilim Dalı

İzmir
2020

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

**ÜÇ FARKLI MİNERAL TRİOKSİT AGREGAT
SİMANININ PROENFLAMATUVAR SİTOKİN
DÜZEYLERİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Esengül ÜNGÜDER

Danışman
Doç. Dr. Mehmet Emin KAVAL

Endodonti Anabilim Dalı
Doktora Programı

İzmir
2020

Tez Değerlendirme Kurulu Üyeleri

(Adı Soyadı)

(İmza)

Başkan : Doç. Dr. Mehmet Emin Kaval

(Danışman)

Üye : Prof. Dr. Mehmet Kemal Çalışkan

Üye : Prof. Dr. Pelin Güneri

Üye : Prof. Dr. Ayşe Nalbantsoy

Üye : Prof. Dr. Sema Belli

Üye : Prof. Dr. Ayşe Diljin Keçeci

Doktora Tezinin kabul edildiği tarih:

Önsöz

Minaral Trioksit Agregat (MTA), endodontik uygulamalarda sıklıkla tercih edilen bir materyal olup, *in vivo* ve *in vitro* birçok araştırmaya konu olmuştur. Bu materyalin yüksek klinik yararlılığının yanında donma reaksiyonunun uzun sürmesi ve nemli ortam gerektirmesi, diş ve çevre dokularda renklenmeye neden olması gibi dezavantajları, materyalin özelliklerinin geliştirilmesi yönünde çalışmaları gündeme getirmiş ve daha üstün özellikleri olan MTA varyasyonları için girişimlerde bulunulmuştur.

MTA Repair HP içeriğinde yapılan değişiklikler aracılığı ile plastik özellik katılmış manipülasyon kolaylığı sağlayan yeni bir biyoseramiktir. Bio MTA+ ise donma süresinin kısa olması ile dikkat çeken bir materyaldir. MTA Repair HP ve Bio MTA+'ın biyolojik özelliklerinin değerlendirildiği çalışmalar sınırlıdır. Bu yüzden yeni geliştirilmiş bu MTA preparatlarının ProRoot MTA ile birlikte insan makrofaj hücreleri üzerinde oluşturdıkları proenflamatuvar sitokin seviyelerinin değerlendirildiği ve sitotoksitelerinin karşılaştırıldığı bu çalışmanın, dental literatüre katkısı olacağı kanaatindeyim. Bu çalışmanın benzer konularda çalışmak isteyen meslektaşlarıma katkıda bulunması benim için en büyük gurur kaynağı olacaktır.

İzmir, 20.08.2020

Esengül ÜNGÜDER

Özet

Üç farklı Mineral Trioksit Agregat simanının proenflamatuvar sitokin düzeyleri üzerindeki etkisinin değerlendirilmesi

Çalışmamızın amacı, ProRoot MTA, MTA Repair HP ve Bio MTA+ simanlarının proenflamatuvar sitokin düzeyleri üzerindeki etkisinin değerlendirilmesi ve materyallerin sitotoksitelerinin karşılaştırılmasıdır.

Test materyalleri üretici firmaların önerileri doğrultusunda karıştırıldı ve hazırlanan simanlar standart silindirik kalıplara yerleştirildi. Örnekler 37⁰ C’de 48 saat inkübe edildikten sonra gama sterilizasyonuna tabi tutuldu.

Analizler için THP-1 orijinli insan monosit hücre hattı kullanıldı. Hücreler phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) ile farklılaştırıldı. Bir grup hücre ek olarak enflamasyonun başlatılması için lipopolisakkarit (LPS) ile de muamele edildi. Bu işlemi takiben, MTA siman blokları ile insan makrofaj hücrelerinin etkileşimi sağlandı ve 24 saat inkübe edildi. Makrofaj hücrelerinin ürettiği enflamatuvar sitokin yoğunlukları ELISA kiti ile ölçüldü. Bu amaçla TNF- α , IL-1 β , IL-6 mediyatörleri analiz edildi. Çalışmada ayrıca test edilen MTA tiplerinin MTT yöntemiyle sitotoksik etkileri belirlendi. Veriler iki yönlü varyans analizi, Tukey çoklu karşılaştırma analizi, Kruskal Wallis testi ve Dunn’s çoklu karşılaştırma testi ile istatistiksel olarak değerlendirildi.

Bu çalışmadan elde edilen veriler doğrultusunda 72. saatin sonunda makrofaj canlılık değerleri ProRoot MTA 95,782 $\mu\text{g/ml}^{****}$, MTA Repair HP 65,274 $\mu\text{g/ml}^*$, Bio MTA+ 68,012 $\mu\text{g/ml}^*$ ve Pozitif kontrol grubu 58,767 $\mu\text{g/ml}^{****}$ şeklinde gözlemlendi. LPS ile muamele edilmiş hücrelerin yer aldığı sitotoksite analizinde ProRoot MTA 77.101 $\mu\text{g/ml}$, MTA Repair HP 69,211 $\mu\text{g/ml}$, Bio MTA+ 39,134 $\mu\text{g/ml}$, Pozitif kontrol grubu 88,438 $\mu\text{g/ml}$ salınımda bulundu.

72. saatte gözlenen IL-1 β değerleri Kontrol Grubu 9,857 pg/ml, ProRoot 30,082 pg/ml**, MTA Repair HP 22,503 pg/ml ve Bio MTA+ 58,660 pg/ml gözlemlendi. IL-6 seviyesi tüm gruplarda benzer oranda düşük iken, 24. saatte MTA Repair HP sitokin salınımını istatistiksel olarak anlamlı oranda baskıladı ($P<0,05:*$, $P<0,01:**$, $P<0,001:***$, $P<0,0001:****$). 72. saatte salınan TNF- α değerleri Kontrol Grubu 6,214 gp/ml, ProRoot 23,025 pg/ml**, MTA Repair HP 7,260 pg/ml ve Bio MTA+ 8,738 pg/ml şeklinde oldu ($P<0,05:*$, $P<0,01:**$, $P<0,001:***$, $P<0,0001:****$). LPS

mevcudiyeti sitokin salınım miktarını ortamda siman bulunmasından bağımsız olarak arttırdı.

Değerlendirilen süre sonunda makrofaj hücrelerinin sağ kalım oranları yüksekten düşüğe doğru sırasıyla ProRoot MTA, Bio MTA+, MTA Repair HP ve Pozitif kontrol grubu olarak, LPS ile muamele edilmiş hücrelerin sağ kalım oranları ise Pozitif kontrol grubu, ProRoot MTA, MTA Repair HP ve Bio MTA+ olarak bulundu. 72. saatte gözlenen en yüksek IL-1 β değerleri sırasıyla Bio MTA+, ProRoot MTA, MTA Repair HP ve Kontrol grubu, IL-6 değerleri Bio MTA+, MTA Repair HP, ProRoot MTA ve Kontrol grubu, TNF- α seviyeleri ise ProRoot MTA, Bio MTA+, MTA Repair HP ve Kontrol grubu şeklinde gözlemlendi. LPS ile farklılaştırılmış hücrelerden elde edilen en yüksek IL-1 β değerleri sırasıyla Bio MTA+, MTA Repair HP, ProRoot MTA ve Kontrol grubu, IL-6 değerleri Kontrol grubu, ProRoot MTA, MTA Repair HP ve Bio MTA+, TNF- α değerleri ise MTA Repair HP, ProRoot MTA, Kontrol grubu ve Bio MTA+ olarak belirlendi.

Donma süresinin oldukça kısa olduğu bilinen MTA Repair HP materyalinin, optimum düzeydeki biyouyumluluğu ve antienflamatuvar özelliği göz önünde bulundurulduğunda, klinik uygulamalarda avantaj sağlayacağını öngörmekteyiz. Hücresel düzeyde elde edilen bu verilerin daha iyi anlaşılması için klinik çalışmalar ile desteklenmesi gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: MTA; IL-1 β ; IL-6; TNF- α ; proenflamatuvar sitokin

Abstract

Evaluation of the effects of three different Mineral Trioxide Aggregate cements on proinflammatory cytokine levels

The aim of this study was to compare the cytotoxicity of ProRoot MTA, MTA Repair HP and Bio MTA+ and to evaluate the effects of these materials on proinflammatory cytokine levels of human monocytes.

MTA cements were prepared according to their manufacturers' instructions, were placed in standard cylinder-shaped moulds and were incubated 24 hours at 37°C. THP-1 (human monocyte cells) cell lines were used for the assays. THP-1 cells were differentiated into macrophages by 24-hour incubation with phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA). Then, a group of cells was activated by lipopolysaccharide (LPS). The cytotoxic effects of the samples were evaluated by colorimetric determination of mitochondrial reductase activity in viable cells at 24th, 48th and 72nd hours. In the second phase of the study, supernatants of cells used in cytotoxicity test were utilized to test the proinflammatory potential of the tested materials. IL-1 β , IL-6 and TNF- α levels in supernatants were determined using enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) kits. The data were examined with Two way ANOVA, Tukey's Multiple Comparison Test, Kruskal Wallis test and Dunnett's Multiple Comparison Test (P=0,05).

Macrophage viability values at the end of 72 hours were observed as 95.782 μ g/ml**** for ProRoot MTA, 65.274 μ g/ml for MTA Repair HP *, 68.012 μ g/ml* for Bio MTA+ and 58.767 μ g/ml**** for positive control group (P<0,05:*, P<0,01:**, P<0,001:***, P<0,0001:****). In the cytotoxicity analysis involving LPS-treated cells, values observed as 77.101 μ g/ml for ProRoot MTA, 69.211 μ g/ml for MTA Repair HP, 39.134 μ g/ml for Bio MTA+, and 88.438 μ g/ml for positive control group. IL-1 β values observed at 72 hours were 9.857 pg/ml in the control group, 30.082 pg/ml* in ProRoot, 22.503 pg/ml** in MTA Repair HP and 58.660 pg/ml* in Bio MTA+ (P <0,05: *, P <0,01: **, P <0,001: ***, P <0,0001: ****). While IL-6 levels were similarly low in all groups, MTA Repair HP statistically significantly suppressed cytokine secretion at 24th hour. The TNF- α values secreted at 72 hours were 6.214 pg/ml for the control group, 23.025 pg/ml** for ProRoot, 7.260 pg/ml for MTA Repair HP and 8.738 pg/ml for Bio MTA+ (P <0,05: *, P <0,01: **, P <0,001: ***, P <0,0001: ****).

****). The presence of LPS increased the amount of the cytokine secretion regardless of cements.

At the end of the evaluation period, the survival rates of macrophage cells were sorted in a descending order starting from high to low as ProRoot MTA, Bio MTA+, MTA Repair HP and positive control group, respectively. The survival rates of LPS-treated cells were ranked as positive control group, ProRoot MTA, MTA Repair HP and Bio MTA+. The highest IL-1 β values observed at 72 hour were listed in order as Bio MTA+, ProRoot MTA, MTA Repair HP and the control group, whereas the IL-6 values were ranked from the highest as the control group, ProRoot MTA, MTA Repair HP and Bio MTA+. TNF- α levels were ranged as ProRoot MTA, Bio MTA+, MTA Repair HP, and the control group. The highest IL-1 β values obtained from LPS differentiated cells were aligned as Bio MTA+, MTA Repair HP, ProRoot MTA and the control group. IL-6 values were ranked in a descending order as the control group, ProRoot MTA, MTA Repair HP and Bio MTA+, but TNF- α values were listed in order as Bio MTA+MTA Repair HP, ProRoot MTA and the control group. It is anticipated that MTA Repair HP, which is known to have a very short setting time, will provide an advantage in clinical applications, considering its optimum biocompatibility and anti-inflammatory properties. In order to provide a better understanding of the in vitro results of the present study, further clinical studies are required.

Keywords: MTA; IL-1 β ; IL-6; TNF- α ; proinflammatory cytokine

İçindekiler

Önsöz.....	II
Özet.....	III
Abstract.....	V
İçindekiler	VII
Tablolar Dizini	IX
Şekiller Dizini.....	X
Grafikler Dizini	XI
Kısaltma Listesi.....	XIII
1. Giriş.....	1
2. Genel Bilgiler	3
2.1. İmmün Sistem (Bağışıklık Sistemi)	3
2.1.1. Makrofaj Biyolojisi ve Etki Mekanizmaları	3
2.1.2. Enflamasyon.....	4
2.1.3. Enflamatuvar Yanıtta Makrofajların Rollerini.....	4
2.1.4. Proenflamatuvar Sitokinler	5
2.1.4.1. İnterlökin-1 β (IL-1 β).....	5
2.1.4.2. İnterlökin-6 (IL-6).....	6
2.1.4.3. Tümör Nekroz Faktörü- α (TNF- α).....	6
2.2. Dental Materyallerin İmmün Yanıt Mekanizmalarının ve Sitotoksitelerinin <i>in vitro</i> Araştırılması	7
2.2.1. Monosit Hücrelerinin Farklılaştırılması	7
2.2.1.1. Sitokin Seviyesinin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler	8
2.2.1.2. Sitotoksitite Değerlendirme Yöntemleri.....	9
2.3. Pulpal Enflamasyonda Sitokinlerin Rolü.....	9
2.4. Diş Periapikal Dokularının Savunma Mekanizması	10
2.5. Mineral Trioksit Agregat (MTA)	10
2.5.1. ProRoot MTA	11
2.5.2. MTA Repair HP.....	12
2.5.3. Bio MTA+	13
3. Gereç ve Yöntem.....	14
3.1. Çalışma Grupları	15
3.1.1. MTT Testi Grupları.....	15

3.1.2.	ELISA Analizi Grupları	16
3.2.	Siman Blokların Hazırlanması	17
3.3.	Hücre Kültürü Ve Devamlılığı	18
3.3.1.	İnsan Monosit Hücre Hattının Hazırlanması	18
3.3.2.	Hücre Bakımı ve Pasajlama	19
3.3.3.	Hücre Sayımı.....	19
3.3.4.	THP-1 Hücre Hattının Farklılaştırılması	19
3.4.	Sitotoksosite Deneyi	20
3.5.	ELISA Analizi	21
3.5.1.	Makrofaj Hücrelerinin Ürettiği Proenflamatuvar Sitokin Yoğunluklarının Ölçülmesi	21
3.5.2.	ELISA Analizi Sonuçlarının Değerlendirilmesi.....	22
4.	Bulgular.....	24
4.1.	Sadece PMA İle Farklılaştırılmış THP-1 Hücrelerin Kullanıldığı Analizlerin Bulguları	24
4.1.1.	Sitotoksosite Analizi.....	24
4.1.2.	ELISA Analizi	27
4.1.2.1.	IL-1 β Analizi.....	28
4.1.2.2.	IL-6 Analizi.....	31
4.1.2.3.	TNF- α Analizi.....	34
4.2.	LPS İle Muamele Edilmiş Makrofaj Hücrelerin Kullanıldığı Analizlerin Bulguları.....	37
4.2.1.	Sitotoksosite Analizi.....	37
4.2.2.	ELISA Analizi	38
4.2.2.1.	IL-1 β Analizi.....	39
4.2.2.2.	IL-6 Analizi.....	40
4.2.2.3.	TNF- α Analizi.....	41
4.3.	Ters Faz Mikroskobu Bulguları	41
5.	Tartışma	47
6.	Sonuç ve Öneriler	58
7.	Kaynaklar	60
	Teşekkür.....	76
	Özgeçmiş	78

Tablolar Dizini

Tablo 1: Tez çalışmasında kullanılan MTA'ların kimyasal içerikleri	15
Tablo 2: MTT analizi kültür kabı görünümü (24s PMA/ 48s PMA/ 72s PMA/ 24s LPS)	16
Tablo 3: ELISA analizi kültür kabı görünümü (IL-1 β /IL-6/TNF- α)	17
Tablo 4: Sadece PMA ile farklılaştırılmış THP-1 hücrelerinden elde edilen MTT testi bulgularının saat periyotlarına göre gruplar arası karşılaştırılması (P<0,05:*, P<0,01:**, P<0,001:***, P<0,0001:****)	25
Tablo 5: Makrofaj hücrelerinin MTT verilerinin grup içi karşılaştırılması (P<0,05:*, P<0,01:**, P<0,001:***, P<0,0001:****)	26
Tablo 6: IL-1 β ELISA testi sonucunda elde edilen değerlerin grup ortalamaları ve standart sapma değerleri (P<0,05:a, P<0,01:b, P<0,001:c, P<0,0001:d)	28
Tablo 7: Makrofaj hücrelerinin IL-1 β ELISA analizi bulgularının grup içi saatler arası karşılaştırılması (P<0,05:*, P<0,01:**, P<0,001:***, P<0,0001:****).....	31
Tablo 8: IL-6 için grupların ortalama ve standart sapma değerleri (P<0,05:a, P<0,01:b, P<0,001:c, P<0,0001:d)	31
Tablo 9: Makrofaj hücrelerinin IL-6 ELISA analizi bulgularının grup içi saatler arası karşılaştırılması (P<0,05:*, P<0,01:**, P<0,001:***, P<0,0001:****).....	34
Tablo 10: TNF- α ELISA testi sonucunda elde edilen değerlerin grup ortalamaları ve standart sapma değerleri (P<0,05:a, P<0,01:b, P<0,001:c, P<0,0001:d)	34
Tablo 11: Makrofaj hücrelerinin TNF- α ELISA analizi bulgularının grup içi saatler arası karşılaştırılması (P<0,05:*, P<0,01:**, P<0,001:***, P<0,0001:****).....	37

Şekiller Dizini

Şekil 1: Siman blokların hazırlandığı ortam	17
Şekil 2: Çalışmada kullanılan Klas II Laminar Akış Kabin	18
Şekil 2: Çalışmada kullanılan mikroskop	20
Şekil 3: Çalışmada kullanılan ELISA okuyucu	22
Şekil 4: LPS ile muamele görmüş THP-1 hücrelerinin siman bloklar ile inkübe edildikten sonra 10X büyütme ile ters faz mikroskoptaki görüntüleri (a) Kontrol Grubu, (b) ProRoot MTA, (c) MTA Repair HP, (d) Bio MTA+, (e) Pozitif Kontrol Grubu	43
Şekil 5: PMA ile işlem görmüş THP-1 hücrelerinin siman bloklar ile 24 saat inkübe edildikten sonra 10X büyütme ile ters faz mikroskoptaki görüntüleri (a) Kontrol Grubu, (b) ProRoot MTA, (c) MTA Repair HP, (d) Bio MTA+, (e) Pozitif Kontrol Grubu ...	44
Şekil 6: PMA ile işlem görmüş THP-1 hücrelerinin siman bloklar ile 48 saat inkübe edildikten sonra 10X büyütme ile ters faz mikroskoptaki görüntüleri (a) Kontrol Grubu, (b) ProRoot MTA, (c) MTA Repair HP, (d) Bio MTA+, (e) Pozitif Kontrol Grubu ...	45
Şekil 7: PMA ile işlem görmüş THP-1 hücrelerinin siman bloklar ile 72 saat inkübe edildikten sonra 10X büyütme ile ters faz mikroskoptaki görüntüleri (a) Kontrol Grubu, (b) ProRoot MTA, (c) MTA Repair HP, (d) Bio MTA+, (e) Pozitif Kontrol Grubu	46

Grafikler Dizini

Grafik 1: 24, 48 ve 72. saatlerde sadece PMA ile farklılaştırılmış THP-1 hücrelerinin yer aldığı gruplarda MTT testi sonucunda elde edilen canlılık değerleri ve bu değerlerin kontrol grubu ile karşılaştırılması ($P<0,05:*$, $P<0,01:**$, $P<0,001:***$, $P<0,0001:****$)	25
Grafik 2: Makrofaj hücrelerinin MTT testi verilerinin gösterilmesi	27
Grafik 3: Makrofaj hücrelerinin MTT verilerinin saat dilimlerine göre karşılaştırılması	27
Grafik 4: 24, 48 ve 72. saatlerde sadece PMA ile farklılaştırılmış hücrelerin yer aldığı gruplardan elde edilen IL-1 β ELISA testi verileri ve bu verilerin saat periyotlarına göre kontrol grubunun aynı saat grubu ile karşılaştırılması a) Verilerin ProRoot MTA grubu ile karşılaştırılması b) Verilerin MTA Repair HP grubu ile karşılaştırılması ($P<0,05:*$, $P<0,01:**$, $P<0,001:***$, $P<0,0001:****$)	29
Grafik 5: Makrofaj hücrelerinin IL-1 β ELISA analizi verilerinin karşılaştırmalı gösterimi	29
Grafik 6: Makrofaj hücrelerinden elde edilen IL-1 β salınımı verilerinin saat dilimlerine göre gösterilmesi	30
Grafik 7: 24, 48 ve 72. saatlerde sadece PMA ile farklılaştırılmış hücrelerin yer aldığı gruplarda IL-6 ELISA testi bulguları ve bu verilerin saat periyotlarına göre kontrol grubu ile karşılaştırılması a) Verilerin ProRoot MTA grubu ile karşılaştırılması b) Verilerin MTA Repair HP grubu ile karşılaştırılması ($P<0,05:*$, $P<0,01:**$, $P<0,001:***$, $P<0,0001:****$)	32
Grafik 8: Makrofaj hücrelerinin IL-6 ELISA analizi verilerinin karşılaştırmalı gösterimi	33
Grafik 9: Makrofaj hücrelerinden elde edilen IL-6 salınımı verilerinin saat dilimlerine göre gösterilmesi	33
Grafik 10: 24, 48 ve 72. saatlerde sadece PMA ile farklılaştırılmış hücrelerin yer aldığı gruplarda TNF- α ELISA testi bulguları ve bu verilerin saat periyotlarına göre kontrol	

grubu ile karşılaştırılması a) Verilerin ProRoot MTA grubu ile karşılaştırılması b) Verilerin MTA Repair HP grubu ile karşılaştırılması ($P<0,05:*$, $P<0,01:**$, $P<0,001:***$, $P<0,0001:****$)	35
Grafik 11: Makrofaj hücrelerinin TNF- α ELISA analizi verilerinin karşılaştırmalı gösterimi	36
Grafik 12: Makrofaj hücrelerinden elde edilen IL-6 salınımı verilerinin saat dilimlerine göre gösterilmesi	36
Grafik 13: 24. saatte LPS ile muamele edilmiş hücrelerin yer aldığı gruplarda MTT testi sonucunda elde edilen canlılık değerleri ve kontrol grubu ile karşılaştırılması a) ProRoot grubu ile karşılaştırma b) MTA Repair HP grubu ile karşılaştırma c) Bio MTA+ grubu ile karşılaştırma ($P<0,05:*$, $P<0,01:**$, $P<0,001:***$, $P<0,0001:****$)	38
Grafik 14: 24. saatte (LPS ile muamele edilmiş ve edilmemiş hücrelerin yer aldığı gruplarda) elde edilen canlılık değerlerinin karşılaştırılması	39
Grafik 15: LPS ile muamele edilmiş hücrelerin yer aldığı gruplardan elde edilen IL-1 β ELISA testi bulguları ve bu verilerin kontrol grubu ile karşılaştırılması a) Verilerin ProRoot MTA grubu ile karşılaştırılması b) Verilerin MTA Repair HP grubu ile karşılaştırılması ($P<0,05:*$, $P<0,01:**$, $P<0,001:***$, $P<0,0001:****$)	40
Grafik 16: LPS ile muamele edilmiş hücrelerin yer aldığı gruplardan elde edilen IL-6 ELISA testi bulguları ve bu verilerin kontrol grubu ile karşılaştırılması a) Verilerin ProRoot MTA grubu ile karşılaştırılması b) Verilerin MTA Repair HP grubu ile karşılaştırılması ($P<0,05:*$, $P<0,01:**$, $P<0,001:***$, $P<0,0001:****$)	41
Grafik 17: LPS ile muamele edilmiş hücrelerin yer aldığı gruplardan elde edilen TNF- α ELISA testi bulguları ve bu verilerin kontrol grubu ile karşılaştırılması a) Verilerin ProRoot MTA grubu ile karşılaştırılması b) Verilerin MTA Repair HP grubu ile karşılaştırılması ($P<0,05:*$, $P<0,01:**$, $P<0,001:***$, $P<0,0001:****$)	42

Kısaltma Listesi

MTA	:	Mineral Trioksit Aggregat
IRM	:	<i>Intermediate Restorative Material</i>
ELISA	:	<i>Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay</i>
IL-1 β	:	İnterlökin 1 beta
IL-6	:	İnterlökin 6
TNF- α	:	Tümör nekroz faktörü alfa
MTT testi	:	3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide testi
RRM	:	Kök Tamir Materyali (<i>Root repair material</i>)
HP	:	Yüksek Plastik Özellik (<i>High Plasticity</i>)
TGF	:	Tümör Büyüme Faktörü (<i>Tumor Growth Factor</i>)
PDGF	:	Trombosit kaynaklı büyüme faktörü (<i>Platelet-derived growth factor</i>)
PMA	:	Phorbol 12-miristat 13-asetat
LPS	:	Lipopolisakkarit
RT-PCR	:	Ters Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu
4META/ MMA-TBB	:	4-methacryloxyethyl trimellitate anhydride/methacrylate- tri-n-butyl borane
ACTT	:	<i>American Type Culture Collection</i>
Rpm	:	Dakikadaki devir sayısı (<i>Revolutions per Minute</i>)
FBS	:	Fetal sığır serumu (<i>Fetal bovine serum</i>)
pg/ μ l	:	Pikogram/mikrolitre

$\mu\text{g}/\mu\text{l}$: Mikrogram/mikrolitre



1. Giriş

Mineral Trioksit Agregat (MTA), vital pulpa tedavileri (Çalışkan & Güneri, 2016, Çalışkan, 2006) perforasyon tamiri (Kaval ve ark., 2018), açık apeksli dişlerde apikal bariyer oluşturulması (Kandemir Demirci ve ark., 2020) ve rejeneratif endodontik tedavi uygulamalarında (Kaval ve ark., 2017, Kandemir Demirci ve ark., 2020) sıklıkla tercih edilen bir biyomateriyaldir. Doku ile direkt temasta olan bu materyalin biyouyumlu olması ve immün reaksiyonu yönlendirmesi tedavinin başarısını doğrudan etkiler. *In vivo* ve *in vitro* çalışmalar ile MTA'nın yüksek biyouyumluluğa sahip bir materyal olduğunu bildirmiştir (Koh ve ark., 1998). MTA'nın osteoblast aktivitesini arttırdığı (Koh ve ark., 1997), cam iyonomer siman ve IRM (Intermediate restorative material) gibi restoratif materyallere göre daha az sitotoksik özelliğe sahip olduğu rapor edilmiştir (Kettering & Torabinejad, 1995).

MTA simanı yukarıda bahsedilen klinik avantajlarına rağmen, donma süresinin uzun olması ve donma esnasında nemli ortam gerektirmesi, dişlerde renklenmeye neden olması gibi dezavantajlara sahiptir. Bu nedenle MTA simanının temel içeriği korunmak kaydıyla, fiziksel ve kimyasal özelliklerinin iyileştirilmesi amacıyla çeşitli varyasyonları kullanıma sunulmuştur. Bu preparatlardan birisi olan MTA Repair HP'ye (Angelus Odontologica Industries, Londrina, PR, Brezilya), radyopaklaştırıcı olarak bizmut oksit yerine kalsiyum tungstat eklenmiş ve likit kısmı modifiye edilmiştir (Christopher J Tomás-Catalá ve ark., 2018). Diğer bir preparat olan Bio MTA+ (Cerkamed, Stalowa Wola, Polonya), kalsiyum katalizörü içeren özel likiti ile karıştırılarak hazırlanmaktadır. Bio MTA+ 'ın artırılmış yüzey pürüzlülüğü ve rezin matrisi içermemesi hidroksiapatitin daha iyi birikmesine neden olabilmektedir (Voicu ve ark., 2019).

Endodontik kökenli periradiküler enflamasyon, IL-1 β , IL-6, TNF- α gibi proenflamatuvar mediatörler ile karakterizedir (Deller-Quinn & Perinpanayagam, 2009). IL-1 ve TNF- α ' nın kemik yıkımında rol aldığı ortaya konulmuştur (Artese, Piattelli, Quaranta, Colasante, & Musani, 1991). Ayrıca kemik rezorpsiyonundan sorumlu osteoklast oluşumu sırasında osteoblastlar IL-6 üretmektedir (Nishimoto ve ark., 2010). Bu durum göz önünde bulundurulduğunda IL-1 β , IL-6 ve TNF- α oluşumunu inhibe eden materyallerin kullanılması periapikal doku iyileşmesini olumlu yönde etkileyecektir.

Deller-Quinn ve Perinpanayagam (2009) yaptıkları çalışmada ProRoot MTA'nın (Dentsply Tulsa Dental Specialties, Konstanz, Almanya) hücresel yanıtı olumlu yönde desteklediğini göstermiştir. Ciasca ve arkadaşları (2012), insan osteoblast hücreleri üzerinde ProRoot MTA ve Endosequence RRM'nin sitotoksitesini değerlendirdikleri ve proenflamatuvar sitokin üretimini araştırdıkları çalışmada ProRoot MTA'nın, daha az IL-1 salınımı gösterdiğini ve IL-6 salınımı göstermediğini ortaya koymuşlardır. Bununla birlikte literatür incelendiğinde MTA Repair HP ve BioMTA+'nın proenflamatuvar sitokin değerlerini üzerindeki etkisini araştıran bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışmada üç farklı Mineral Trioksit Agregat simanının (Bio MTA+, MTA Repair HP ve ProRoot MTA) proenflamatuvar sitokin düzeyleri üzerindeki etkisi değerlendirilecektir. Hipotezimiz MTA Repair HP ve BioMTA+'nın proenflamatuvar sitokin düzeyleri üzerindeki etkisinin, ProRoot MTA ile benzer olduğu yönündedir.

2. Genel Bilgiler

Mineral Trioksit Agregat (MTA), vital pulpa tedavileri, perforasyon tamiri, açık apeksli dişlerde apikal bariyer oluşturulması ve rejeneratif endodontik tedavi uygulamalarında sıklıkla tercih edilen bir biyomateryaldir (Parirokh ve ark., 2018). Doku ile direkt temasta olan bu materyalin biyouyumlu olması ve immün reaksiyonu yönlendirmesi tedavinin başarısını doğrudan etkiler. Yeni materyallerin konak dokuda oluşturdukları proenflamatuvar sitokin yoğunluklarının ve sitotoksikite miktarlarının bilinmesi, güvenle kullanılan materyallere alternatif olabilmeleri bakımından değerli veriler sunmaktadır.

2.1. İmmün Sistem (Bağışıklık Sistemi)

Bağışıklık sistemi birçok yapısal elemanı olan, karmaşık, doku bütünlüğünü korumayı amaçlayan bir mekanizmadır (Sattler & Kennedy-Lydon, 2017). En temel anlatımı ile bağışıklık, vücuda giren (veya verilen) patojen veya apatojenik maddeye (mikroorganizma, toksin, kompleks yapıdaki moleküller, vs) karşı vücudun gösterdiği dirençtir. Doğuştan gelen (doğal) ve sonradan kazanılan (edinsel) olmak üzere iki farklı bağışıklık mekanizması mevcuttur. Doğal bağışıklık, hastalık oluşturmaya yetecek miktarda patojene karşı vücudun tepkisidir (Leonard, 1999). Doğal bağışıklık, tehditle karşılaşıldıktan birkaç dakika sonra akut enflamasyonu başlatır. Tehdit kalktıktan sonra saatler içinde (en fazla 72 saat içerisinde) enflamatuvar yanıt sona erer (Franceschi & Campisi, 2014). Kronik enflamasyon ise haftalar, aylar hatta yıllar boyunca devam edebilir. Vücutta uzun süre varlığını sürdüren iltihap, doku hasarına ve hastalığına yol açabilir (Carlberg ve ark., 2016; G. Y. Chen & Nuñez, 2010).

2.1.1. Makrofaj Biyolojisi ve Etki Mekanizmaları

Makrofajlar, mikroorganizmalara yanıt olarak hem doğal ve hem de sonradan kazanılan bağışıklıkta önemli bir rol oynarlar (Gordon & Taylor, 2005). Doku makrofajları, yaşlanan hücrelerin uzaklaştırılmasında ve enflamasyon sonrası doku rejenerasyonu yoluyla doku homeostazının korunmasında görev yaparlar (Dijkstra ve ark., 1985). Denge durumunda (sağlıklı durumda) birçok makrofaj tipinin yenilenmesi ve devamlılığının sağlanmasında bölgesel çoğalma yeterli iken, travma veya

enfeksiyon gibi enflamatuvar durumlarda, ilgili dokuda bulunan makrofaj popülasyonunu artırmak için dolaşımdaki monositlerden yardım alınmaktadır (Van Furth ve ark., 1985). Makrofajlar kemokinler, enzimler, araşidonik asit metabolitleri, reaktif radikaller (Haynes ve ark., 2004), matris-remodelling proteazları, pro-anjiyojenik büyüme faktörleri ve sitokinler gibi enflamasyonun çeşitli aşamalarında görev yapan ürünler sentezleyebilirler (Sunderkotter ve ark., 1994). Bu ürünler immün yanıtı artırabilecekleri gibi (antienflamatuvar) enflamasyonu da destekleyebilen (proenflamatuvar) multifaktöryel bir görev skalasına sahiptirler (Gordon, 2003; Mosser, 2003; Stout & Suttles, 2004). Her bir biyolojik süreç için gerekli olan salınım düzeyleri ve fonksiyonlar arasındaki denge, sitokinler, stres hormonları ve düzenleyici diğer faktörler tarafından koordine edilmektedir (Stout & Suttles, 2005).

2.1.2. Enflamasyon

Enflamasyon, hasarlı veya ölü hücre, iritan kimyasal madde, patojen mevcudiyeti ve yaralanma gibi çeşitli uyaranlara karşı konak tarafından başlatılan karmaşık bir yanıttır (Chen & Nuñez, 2010). Ayrıca, konağın sağlığını koruması için gerekli fizyolojik bir süreçtir (Hancock, Haney, & Gill, 2016). Enflamasyonun birincil görevi zararlı uyaranları ortadan kaldırmak, daha fazla yaralanma oluşmasını engellemek, iyileşme sürecini başlatmak ve hasarlı dokuyu normal fizyolojik işlevine geri döndürmektir (Mino & Takeuchi, 2013).

2.1.3. Enflamatuvar Yanıtta Makrofajların Roller

Dokuda bakteri veya bakteriyel ürün bulunması ya da hasar meydana gelmesi doku tarafından iritan olarak algılanır. Akut enflamatuvar sürecin başlangıcında, kan monositleri nötrofilleri takiben hasarlı dokuya ulaşır. Ortamda bulunan iritanlar, tümör nekroz faktörü alfa (TNF- α), interlökin 1 beta (IL-1 β) ve interlökin 6 (IL-6) gibi proenflamatuvar sitokinlerin üretilmesine, histaminlerin, prostaglandinlerin (Murphy & Weaver, 2016) ve metaloproteinazların salınmasına sebep olur (Diegelmann & Evans, 2004). Bu kimyasallardan bazıları vazodilatasyona sebep olarak, nötrofiller ve monositler gibi çeşitli lökositlerin ve fagositik hücrelerin sürece dâhil olmasına sebep olurlar. Böylece iritan madde ve bakteriler etkisiz hale getirilir (Murphy & Weaver, 2016). Akut faz proteinleri, glukokortikoidler, tümör büyüme faktörü- β (TGF- β), IL-

10 ve apoptotik nötrofillerin fagositozu iritasyona sebep olan etkenin ortadan kaldırılmasına sebep olmaktadır. Böylece iritasyon alanındaki bakteriler azalmakta, enflamatuvar aktiviteye ihtiyaç kalmadığı anlaşılmaktadır. Makrofajların proenflamatuvar aktivitelerinin azalması sonucunda, antienflamatuvar aktivite ve doku rejenerasyonu başlamaktadır (Diegelmann & Evans, 2004).

2.1.4. Proenflamatuvar Sitokinler

Sitokinler bugüne kadar birçok farklı şekilde sınıflandırılmıştır. Enflamasyondaki görevlerine göre yapılan sınıflandırmada, enflamasyonu teşvik eden sitokin grubuna proenflamatuvar sitokinler adı verilmiştir (Dinarello, 2000). İnterferonlar, TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8 ve IL-17 bu gruba dâhil mediatörlerdir. Proenflamatuvar sitokinler oldukça güçlü bir etkiye sahiptir (Dinarello, 1997; Gallis ve ark., 1989). Bu yüzden görevlerini tamamladıklarında aktiviteleri sonlandırılmazsa, patojenlerle yetinmeyip konakçı dokuya zarar verebilirler (Dinarello, 2000).

Dental materyaller endikasyon bölgesine yerleştirildiklerinde komşu canlı doku tarafından iritan olarak algılanabilir, enflamatuvar yanıt oluşturabilir ve proenflamatuvar sitokin üretimine sebep olabilirler (Diomedea ve ark., 2014). Endodontik kökenli periradiküler enflamasyon, proenflamatuvar mediatörlerden IL-1 β , IL-6 ve TNF- α ile karakterizedir (Deller-Quinn & Perinpanayagam, 2009). TNF- α , IL-1 β ve IL-6 sinerjik hareket eden mediatörlerdir (Ragab ve ark., 2002) ve genellikle kademeli olarak salınırlar. İlk olarak TNF- α ardından IL-1 β ve daha sonra IL-6 salınımı meydana gelir. (Dinarello, 1997; Gallis ve ark., 1989). Ayrıca IL-1 β ve TNF- α seviyeleri ile hastalık şiddeti arasında korelasyon vardır (Schweizer ve ark., 1988). Tüm bu veriler doğrultusunda tez çalışmamızda klinikte yaygın olarak kullanılan üç farklı biyomateryalin proenflamatuvar sitokin seviyelerini üzerindeki etkisinin değerlendirilmesine karar verilmiştir.

2.1.4.1. İnterlökin-1 β (IL-1 β)

IL-1 ailesinin (IL-1 α , IL-1 β , IL-18, IL-33 ve IL-36) proenflamatuvar sitokinleri enflamatuvar süreci düzenler. Konakçıyı bir enflamatuvar reaksiyon başlatması için uyarmaları sebebi ile “alarminler” olarak da adlandırılırlar (Sims & Smith, 2010). IL-1 α ve IL-1 β enflamatuvar yanıtı sınırlamak ve antienflamatuvar yanıtı desteklemek için

otofaji başlatabilirler (Zhang ve ark., 2015). IL-1 ayrıca periapikal kemik rezorpsiyonunu simüle eden ana mediatördür (Wang & Stashenko, 1993). IL-1 β esas olarak monositler ve makrofajlar gibi immün hücreleri tarafından hücre hasarı veya enfeksiyon durumunda salınmaktadır (Copray ve ark., 2001). Lokal ve sistemik enflamasyonun ana sitokindir (Ito ve ark., 2015). IL-1 β , vücudun antijene spesifik bağışıklık tepkisini uyaran doğal bir madde gibi görev görür. (Zhang ve ark., 2015). Öte yandan IL-1 veya IL-1 ve TNF- α kombinasyonu tarafından uyarılan prostaglandin E₂ seviyesinde görülen artış, ağrı eşiğini düşmesine ve ağrı oluşumuna sebep olur (Schweizer ve ark., 1988).

2.1.4.2. İnterlökin-6 (IL-6)

IL-6 immün yanıtın düzenlenmesi, hematopoez, enflamasyon, hücre sağ kalımı, apoptoz, hücre proliferasyonu ve onkogeneze gibi birçok alanda rol oynayan bir pleiotropik sitokindir (Kimura & Kishimoto, 2010). Enflamasyonun başlaması ve sona ermesinde önemli bir role sahiptir (Hunter & Jones, 2015). Hem proenflamatuvar hem de antienflamatuvar etki gösterebilmektedir (Opal & DePalo, 2000). Araştırmacılar, IL-6'nın hangi etkiyi göstereceğinin aktivasyon çeşidi (trans-sinyalleşme aracılı veya klasik aktivasyon) ile bağlantılı olduğunu bildirmişlerdir (Scheller ve ark., 2011). IL-6, T hücresi proliferasyonunu uyarır (Gauldie ve ark., 1987), IL-4 ile birlikte Th2 immün yanıt oluşumuna katılır (Scheller ve ark., 2011). Tüm bu özelliklerinin yanında, B hücresi farklılaşmasını ve antikör salınımını uyararak humoral bağışıklık yanıtının oluşmasında önemli bir role sahiptir (Kimura & Kishimoto, 2010). IL-1 ve TNF- α ile sinerjik etki gösteren bu sitokin, akut faz proteinlerinin salınmasına ve nötrofil takviyesine neden olur (Scheller ve ark., 2011).

2.1.4.3. Tümör Nekroz Faktörü- α (TNF- α)

TNF- α aktif makrofajlar tarafından üretilen, multifaktoriyel fonksiyonları olan pleiotropik bir sitokindir (Steeve, ve ark., 2004). Endotoksinler enflamatuvar yanıt ile ilişkili birçok hastalıkta, hastalığın ilerlemesini hızlandırmak için TNF- α üretimini uyarır. Çünkü bu mediatör, osteoklastlar, epitelyal hücreler, T lenfoblastik lösemi hücreleri, iskelet kası hücreleri ve vasküler düz kas hücreleri dâhil olmak üzere birçok hücrede otofaji başlamasına sebep olur (Lin ve ark., 2013). TNF- α hücre içi

mekanizmalar yoluyla prototipik bir proenflamatuvar sinyal yolu olarak kabul edilen NF- κ B'yi (Nükleer Faktör- κ B) aktive etmesi sebebiyle enflamasyon sırasında üretilen en önemli osteoklast aktive edici sitokinlerden biridir (Steeve ve ark., 2004). Bu bilgiler doğrultusunda TNF- α salınımını uyaran materyallerin enflamasyon oluşturma eğiliminde oldukları söylenebilir.

2.2. Dental Materyallerin İmmün Yanıt Mekanizmalarının ve

Sitotoksitelerinin *in vitro* Araştırılması

Amerikan Endodontistler Derneği, yeni materyallerin kullanıma sunulmadan önce biyolojik ve klinik çalışmalara tabi tutulmasını önermektedir. Klinik başarı kullanılan materyalin özellikleri ile doğrudan ilişkilidir. Bu yüzden mevcut materyaller arasında özellikleri daha üstün olanlar tercih edilmektedir. Periapikal dokular veya pulpa dokusu ile direkt temas halinde olacak malzemelerin düşük sitotoksite, yüksek biyouyumluluk sergilemesi önemlidir (Willershausen ve ark., 2013). Endodontik ve restoratif materyallerin biyouyumluluk ve sitotoksitelerinin *in vitro* olarak değerlendirilmesi için, primer hücre kültürleri veya belirli hücre hatlarından faydalanılmaktadır (Trubiani ve ark., 2012a; Trubiani ve ark., 2012b).

Kanal patlarının sitotoksik potansiyellerini araştıran geçmiş çalışmalarda V79 hücreleri (Camargo ve ark., 2014), HeLa hücreleri (Miletić ve ark., 2005), insan periferik lenfosit hücreleri (Brzovic ve ark., 2009), THP-1 orijinli monosit hücreleri (Brackett ve ark., 2011), L929 fare fibroblast hücreleri ve insan primer dental pulpa hücreleri (Karapinar-Kazandağ ve ark., 2011) kullanılmıştır. Bu tez çalışmasında THP-1 orijinli insan monosit hücre hattı kullanılmıştır.

2.2.1. Monosit Hücrelerinin Farklılaştırılması

Makrofaj gelişimi sırasında kanla taşınan monositlerin doku makrofajına geçişi önemli bir adımdır (van Furth & Cohn, 1968). *In vitro* olarak, monositin makrofaja farklılaşması, serum faktörleri ile uyarılabilir. Farklılaşmanın *in vivo* ortamı simüle ettiği bildirilmiştir (McCullough ve ark., 1999). Monositik hücrelerin farklılaşmasını, olgunlaşmasını ve aktivasyonunu birçok maddenin etkileyebildiği bildirilmiştir (Rutherford ve ark., 1993).

Phorbol 12-miristat 13-asetat (PMA) protein kinaz C aktivatörüdür. Fonksiyonlarından biri immünomodülatör sitokin salınımı olan makrofajın fonksiyonlarını uyarmaktır (Asseffa ve ark., 1993).

Lipopolisakkarit (LPS), gram-negatif bakterilerin dış zarının önemli bir bileşenidir. (Rietschel ve ark., 1994). İnsanlar enfeksiyon nedeniyle sürekli düşük seviyede LPS'ye maruz kalmaktadırlar. Bugüne dek birçok hücrenin LPS'ye yanıt olarak sitokin ürettiği belirlenmiştir. Sıçan makrofaj hücre hatları, THP-1 ve U937 gibi monosit hücre hatları, monositler gibi insan hücreleri LPS uyarısı ile meydana gelen sitokin üretiminin test edildiği hücrelerden bazılarıdır (Rossol ve ark., 2011). LPS, özellikle monositlerin ve makrofajların güçlü bir aktivatörüdür. IL-1, IL-6 ve TNF- α da dâhil olmak üzere birçok sitokin salınımını uyarmaktadır (Meng & Lowell, 1997).

2.2.1.1. Sitokin Seviyesinin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler

Viral, bakteriyel veya kanser antijenlerine karşı immün yanıtı uyarmak suretiyle oluşan tepkinin *in vitro* olarak belirlenmesi, test edilecek ilacın veya materyalin biyolojik özellikleriyle ilgili kıymetli veriler sunar. Antijene özgü T hücresi immün cevabını doğru bir şekilde tespit eden ve düzeyini belirleyen analizler, immün uyarılma ile oluşan fizyolojik sürecin anlaşılması ve biyoyumluluğu yüksek materyaller üretilmesi için gereklidir (Tassignon ve ark., 2005). Fonksiyonel olarak aktif antijene spesifik T hücrelerini incelemek için yaygın olarak kullanılan yaklaşım, sitokinlerin saptanmasına dayanır. ELISA analizi, ELISPOT analizi, Flow sitometrisi ve Ters Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu sitokin düzeyini ölçmekte kullanılan yöntemlerden bazılarıdır (Clay ve ark., 2001).

Biyolojik sıvılardaki moleküllerin varlığını ve konsantrasyonunu belirlemeye yarayan, enzim ile işaretli bir konjugat ve substratı kullanılarak, meydana gelen renk değişimi yoluyla antijen-antikor reaksiyonlarının gösterildiği kantitatif analitik yöntemlere enzime bağlı immünosorban testi (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay: ELISA) denir. Peptitler/proteinler, hormonlar, vitaminler ve ilaçlar çok düşük konsantrasyonda olsalar dahi, onlar için geliştirilen antikor veya antijenlere karşı yüksek bir özgüllük sergilerler. Çünkü bir antikorum kendi antijeni dışında bir moleküle bağlanması neredeyse imkânsızdır (Hornbeck, 1992). Bu çalışmada kullanılan yöntem olan, sandviç tip ELISA, ilgili proteinin iki antikora bağlanmasından dolayı bu adı almıştır (Aydin, 2015).

2.2.1.2. Sitotoksite Değerlendirme Yöntemleri

Dental materyallerin çeşitli hücreler üzerindeki sitotoksik etkilerini belirlemek için kullanılan birçok yöntem mevcuttur (Schweikl & Schmalz, 1996). MTT testi (3-(4,5-dimethylthiazolyl-2-yl)- 2,5-diphenyltetrazolium bromide) kolorimetrik bir testtir. Bu test tipinin en önemli avantajı, örneklerin işlenme hızı sebebiyle gün içinde daha fazla test yapılması sağlamasıdır. MTT hücre canlılığı ve proliferasyonunu analiz etmek için sıklıkla kullanılan bir testtir. Eritrosit hücreleri hariç metabolik olarak aktif tüm hücreler tarafından bölünebilmesi yöntemin yaygın olarak kullanılabilmesini sağlamıştır. Homojen bir hücre popülasyonu kullanıldığında hesaplanan formazan miktarı, doğru orantı yapılarak büyük hücre gruplarına uyarlanabilir (Keiser ve ark., 2000). MTT analizi mitokondriyal dehidrojenaz aktivitesindeki değişimleri değerlendirerek materyalin hücrenin canlılığı üzerindeki etkisini belirler. Test, asit-izopropanol ilavesinden birkaç dakika sonra okunabilir. Ayrıca sonuçta elde edilen renk, oda sıcaklığında birkaç saat stabil kalır. Esasen kantitatif fonksiyonel bir test olmasına rağmen sonuçlar görsel olarak da belirgin olduğundan, hızlı kalitatif sonuçlara ihtiyaç duyulduğu durumlarda da kullanışlıdır (Mosmann, 1983).

2.3. Pulpal Enflamasyonda Sitokinlerin Rolü

Pulpa dokusu sinirler, damarlar, odontoblastlar, fibroblastlar, farklılaşmamış mezenkimal kök hücreler (MSC'ler) ve bağışıklık hücrelerinden oluşan, etrafı diş sert dokularıyla kaplı bir dokudur. Derin çürük veya dental travmalar sebebiyle hasar görebilmektedir. Pulpanın bakteriyel kontaminasyonu nötrofillerin infiltrasyonu ile (Bergenholtz, 1990; McLachlan ve ark., 2004) enflamatuvar reaksiyon başlatabilir (Massler, 1967). Çürük ile ekspozite pulpaya sahip asemptomatik dişlerin tedavisinde vital tedaviler uygulanır. Vital pulpa tedavisinin başarısı ise pulpa dokusunun enflamatuvar durumu ile doğru orantılıdır. Pulpa dokusunu değerlendirmek için kullanılan en etkili yöntem dokunun histolojik olarak incelenmesidir (Çalışkan ve ark., 2003). Ancak bu yöntemin diagnostik amaçla kullanılması oldukça zor ve deneysel düzeydedir. Pulpanın durumu değerlendirilirken sıklıkla klinik semptomlar ve radyografik bulgular göz önünde bulundurulmaktadır. Fakat bu yaklaşım pulpa

dokusunun enflamatuvar durumu ile ilgili net bir bilgi sağlamamaktadır (Seltzer, 1972). Diğer yandan, enfekte pulpa dokusunun yoğun miktarda makrofaj içerdiği bilinmektedir (Bruno ve ark., 2010). Pulpal enfeksiyon varlığında yaygın olarak gözlenen bakteriyel LPS de sitokin üretimini uyarma eğilimindedir (Hong ve ark., 2004; Stashenko, 1990). Dolayısıyla immün ve enflamatuvar yanıtın düzenlenmesinde önemli role sahip sitokinlerin bölgedeki seviyelerinin belirlenmesi, bakteriyel enfeksiyonun durumu ile ilgili veri sağlayabilir (Degré, 1996).

2.4. Diş Periapikal Dokularının Savunma Mekanizması

Enfekte olmuş kök kanallarında kolonize olan bakteriler ve bakteri artıkları periapikal dokuya taşıma eğilimindedir. Konak doku ise iritan olarak algıladığı bu artıklar ile karşılaştığı anda savunma sistemini devreye sokarak enflamatuvar yanıt oluşturur. Enflamatuvar süreç, patojenlerin enfekte kök kanallarından periapekse geçişini önlemek için direkt olarak periradiküler alanda gerçekleşir. Fakat bu güçlü yanıt çelişkili bir biçimde periapikal dokuda meydana gelen hasardan da sorumludur. Kök kanallarından periapekse taşan iritanlar, kök kanallarının mekanik ve kimyasal olarak temizlenmesi ve üç boyutlu sızdırmazlık sağlayan bir materyal ile obturasyonu ile başarılı bir şekilde elimine edilebilmektedir (Takahashi, 1998). Açık apeksli dişlerde apikal bariyer sağlamak amacıyla sıklıkla biyouyumlu simanlardan yararlanılmaktadır. Endikasyon alanına uygulanan siman direkt olarak periapeks ile temasta olabilmektedir. Apikal doku ile yakın ilişkide olan materyallerin biyouyumlu özellik sergilemesi gerektiği bilinmektedir. Sitotoksik özellik gösteren materyaller periapikal dokulara zarar verebilir, şiddetli enflamatuvar yanıt oluşturabilir ve alveolar kemik rezorpsiyonunu uyarabilirler (Al-Hiyasat ve ark., 2010).

2.5. Mineral Trioksit Agregat (MTA)

Mineral Trioksit Agregat (MTA), vital pulpa tedavileri (Çalışkan & Güneri, 2016, Çalışkan, 2006) perforasyon tamiri (Kaval ve ark., 2018), açık apeksli dişlerde apikal bariyer oluşturulması (Kandemir Demirci ve ark., 2020) ve rejeneratif endodontik tedavi uygulamalarında (Kandemir Demirci ve ark., 2020) sıklıkla tercih edilen bir biyomateriyaldir. Doku ile direkt temasta olan bu materyalin biyouyumlu olması ve immün reaksiyonu olumsuz etkilememesi tedavinin başarısını doğrudan etkiler. *In*

vivo ve *in vitro* çalışmalar ile MTA'nın yüksek biyouyumluluğa sahip bir materyal olduğunu bildirmiştir (Koh ve ark., 1998). MTA'nın osteoblast aktivitesini arttırdığı (Koh ve ark., 1997), cam iyonomer siman ve IRM (Intermediate restorative material) gibi restoratif materyallere göre daha az sitotoksik özelliğe sahip olduğu rapor edilmiştir (Kettering & Torabinejad, 1995). 2007 yılında farklı hücre çeşitleri üzerinde yapılan *in vitro* çalışmalar ile MTA'nın 4META/ MMA-TBB (4-methacryloxyethyl trimellitate anhydride/ methacrylate- tri-n-butyl borane) rezin ve IRM gibi diğer kök ucu dolgu materyallerine oranla daha düşük sitotoksikite gösterdiği ortaya koyulmuştur (Yoshimine ve ark., 2007). *İn vivo* çalışmalarda da laboratuvar testleri ile örtüşen veriler elde edilerek bu materyalin biyouyumlu olduğu doğrulanmıştır (Cintra ve ark., 2006, 2013).

MTA simanı klinik avantajlarına rağmen, donma süresinin uzun olması ve donma sırasında nemli ortam gerektirmesi, dişlerde renklenmeye neden olması, manipülasyon zorluğu gibi dezavantajlara sahiptir. Bu nedenle simanın temel içeriği korunarak, özelliklerinin iyileştirilmesi amacıyla çeşitli varyasyonları kullanıma sunulmuştur.

Canlı doku ile yakın temasta olan biyomateryaller ile bölgedeki hücreler arasında bir takım reaksiyonlar meydana gelmesi kaçınılmazdır. Yeni materyallerin konak dokuda oluşturdukları proenflamatuvar sitokin yoğunluklarının ve sitotoksikite miktarlarının bilinmesi, güvenle kullanılan materyallere alternatif olabilmeleri adına değerli veriler sunacaktır. Aşağıda tez çalışmasında kullanılan mineral trioksit agregat simanların bilinen özellikleri incelenmektedir.

2.5.1. ProRoot MTA

ProRoot MTA, 1998 yılında ABD Gıda ve İlaç İdaresi tarafından tanıtılmasından bu yana, endodontik uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır (Torabinejad ve ark., 1995). ProRoot MTA'nın formülü, gri renkli MTA içeriğinin temel bileşenlerinden (trikalsiyum silikat, bizmut oksit, dikalsiyum silikat, trikalsiyum alüminat, tetrakalsiyum alüminoferrit ve kalsiyum sülfat dehidrat), tetrakalsiyum alüminoferritin çıkarılması ile elde edilmiştir. Hem gri hem de beyaz Portland simanları aynı hammaddeden üretilir (Ferris & Baumgartner, 2004). ProRoot MTA tanıtıldığı zamandan bu yana, özellikleri ve klinik uygulama alanlarının incelendiği çok sayıda çalışmada yer almıştır. ProRoot ile ilgili yapılan ilk araştırmalar, o dönemde kullanılan

diğer materyallere oranla daha üstün sızdırmazlık (Torabinejad ve ark., 1995; Wu ve ark., 1998) ve biyouyumluluk sergilediğini, (Koh ve ark., 1998; Torabinejad ve ark., 1997) ve periradiküler dokuların rejenerasyonunu uyarmada daha etkili olduğu göstermiştir (Shabahang ve ark., 1999). Materyal aynı zamanda antimikrobiyal etkinlik (Stowe ve ark., 2004; Torabinejad ve ark., 1995), radyoopasite, boyutsal stabilite ve neme dayanıklılık gibi silikat simanlarda aranan özellikler sergilemektedir (Pitt Ford ve ark., 1996). Fakat tüm avantajlarının yanında uzun donma süresi, dişte renklenmeye sebep olması, yüksek maliyetli (Tanalp ve ark., 2012) ve manipülasyonu zor bir materyal olması gibi dezavantajları bildirilmiştir (Parirokh & Torabinejad, 2010; Tanalp ve ark., 2012). Bu özelliklerin iyileştirilmesi amacıyla yeni materyal araştırmaları devam etmektedir.

2.5.2. MTA Repair HP

MTA Repair HP 2016 yılında kullanıma sunulmuş bir biyoseramik materyaldir (Aguiar 2019). MTA Repair HP'nin likit kısmı toz kısmı ile karıştırıldığında materyale plastik özellik kazandırmaktadır ve henüz üretici firma tarafından açıklanmamıştır. Yeni materyalde, kimyasal ve biyolojik özelliklerin korunması ile birlikte, manipülasyonu kolaylaştırmak amacıyla içeriksel bazı yapısal değişiklikler ve düzenlemeler yapılmıştır. Yapılan en belirgin değişiklik MTA'ya radyoopak özellik kazandırmak için bizmut oksit yerine dişte renk değişikliğine sebep olmayan kalsiyum tungstat ilave edilmesidir (Cintra ve ark., 2017; Silva ve ark., 2016). Kalsiyum tungstat'ın, erken dönemde kalsiyum salınımının artmasına katkıda bulunduğu (Hungaro Duarte ve ark., 2012), biyomineralizasyonu desteklediği ve materyalin dayanıklılığına katkıda bulunduğu gösterilmiştir. Plastik özellik ise marjinal adaptasyonun ve dolayısıyla materyalin mukavemetinin artmasına sebep olmaktadır (Amoroso-Silva ve ark., 2014).

HP'nin biyolojik özelliklerini araştıran az sayıda çalışma mevcuttur. Materyalin biyouyumluluğu ve biyomineralizasyonu test edildiği bir çalışmada, ümit vaat eden sonuçlar sergilediği ortaya koyulmuştur (Cintra ve ark., 2017). HP insan pulpa kök hücreleri (hDPSC) üzerinde sitotoksik etkiye sahip değildir (C. J. Tomás-Catalá ve ark., 2017), insan fibroblast hücrelerinin ise canlılık oranlarını artırabilmektedir. Aynı çalışmanın ratlar üzerinde yapılan *in vivo* aşamasında Angelus MTA ile benzer

biyoyumluluk ve biyomineralizasyon sergilemiştir (Cintra ve ark., 2017). Ratlar üzerinde yapılan başka bir çalışma da HP'nin mineralizasyon aktivasyonu ile zaman içinde enflamatuvar hücrelerin azalmasına sebep olduğunu ve yara iyileşmesinde katkıda bulunduğunu göstermiştir (Benetti ve ark., 2018).

2.5.3. Bio MTA+

Bio MTA+'ın toz kısmı sıvı kısmı ile karıştırıldığında, kıvam olarak plastik hamura benzeyen yumuşak bir ürün elde edilmektedir. Bu özellik materyale geleneksel MTA'ya kıyasla uygulama kolaylığı avantajı sağlar. Ayrıca materyalin 4 dakika çalışma süresine sahip olması ve 2 saatin sonunda tamamen sertleşmesi diğer bir olumlu özelliğidir (<https://cerkamed.com/product/bio-mta-plus/>).

Yapılan bir çalışma Bio MTA+'ın yüzey pürüzlülüğünün fazla olduğunu ortaya koymuştur. Bu, materyalin canlı doku ile direkt temasta olduğunda biyoaktivitenin artmasına, hücre tutulumunda artış olmasına sebep olmaktadır (Voicu ve ark., 2019). Materyallerin retrograd obtürasyon kalitesinin değerlendirildiği bir çalışmada Bio MTA+, Biodentine ile benzer sonuçlar sergilerken Fuji IX'ten üstün bulunmuştur (Bioçanın ve ark., 2018). Materyalin fiziksel ve kimyasal özelliklerinin ProRoot MTA ile kıyaslandığı bir çalışmada, donma süresinin daha kısa olduğu, pH değerinin daha düşük olduğu ve salin çözeltisinde daha az çözündüğü bildirilmiştir (Zarra, Lambrianidis, Vasiliadis, & Gogos, 2018). Bio MTA+'ın biyolojik özellikleri ile ilgili çalışma bulunmamaktadır.

Tez çalışmamızın amacı ProRoot MTA, MTA Repair HP ve Bio MTA+'ın proenflamatuvar sitokin düzeyleri üzerindeki etkisini değerlendirilmesidir.

3. Gereç ve Yöntem

Tez çalışmamız, “Tıp ve Sağlık Bilimleri” kategorisi, “Doktora Tez Projesi” türünde yapılan başvurunun değerlendirilmesi neticesinde Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından desteklenmiştir. (Proje ID: 20965)

Çalışma üç farklı Mineral Trioksit Agregat simanının proenflamatuvar sitokin düzeyleri üzerindeki etkilerini değerlendirmek amacıyla *in vitro* olarak tasarlandı. Testlerde kullanılacak MTA örnekleri üretici firmaların önerileri doğrultusunda Ege Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi’nde hazırlandı. MTA’ların içerikleri aşağıda gösterilmektedir (Tablo 1). Hücre kültürü ve ELISA analizleri ise Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü İmmünobiyoteknoloji ve Biyoaktivite Tarama Laboratuvarında gerçekleştirildi.

Tez çalışmamızda Bio MTA+, MTA Repair HP ve ProRoot MTA siman blokları ile insan makrofaj hücrelerinin etkileşimi sağlandı. Siman blokların makrofaj hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri MTT yöntemi ile belirlendi. Hücreler tarafından üretilen sitokin konsantrasyonları ise yüksek hassasiyet gösteren Sandviç tip ELISA kiti ile saptandı. Bu amaçla TNF- α , IL-1 β ve IL-6 mediyatörleri analiz edildi.

Materyal	Üretici Bilgisi	Kimyasal içerik
ProRoot MTA	Dentsply Tulsa Dental Specialties, Konstanz, Almanya	Toz: Trikalsiyum silikat, dikalsiyum silikat, bizmut oksit, trikalsiyum alüminat, kalsiyum sülfat dehidrat ve kalsiyum alüminoferrit Likit: distile su
MTA Repair HP	Angelus Odontologica Industries, Londrina, Parana, Brezilya	Toz: Trikalsiyum silikat, dikalsiyum silikat, trikalsiyum alüminat, kalsiyum oksit, kalsiyum tungstat Likit: su ve plastikleştirici

Bio MTA +	Cerkamed, Stalowa Wola, Polonya	Toz: Kalsiyum oksit, hidroksiapatit, silikon, demir, alüminyum, sodyum, potasyum, bizmut, magnezyum, zirkonyum oksitleri, kalsiyum fosfat Likit: Distile su, kalsiyum katalizörü
------------------	---------------------------------------	---

Tablo 1: Tez çalışmasında kullanılan MTA'ların kimyasal içerikleri

3.1. Çalışma Grupları

Çalışmamızda PMA ile farklılaştırılmış THP-1 hücreleri ve bu farklılaştırma işlemini takiben LPS ile indüklenen proenflamatuvar mikroçevrede test örnekleri ile muamele sonucunda sitotoksikite ve proenflamatuvar sitokin salınım değerlerini ölçmek için analizler yapıldı. MTT testi ve ELISA analizi için gruplarda üç tekrar sayısı uygulandı.

3.1.1. MTT Testi Grupları

MTA'ların sadece PMA ile makrofaja farklılaştırılmış THP-1 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri 24, 48 ve 72. saatlerde değerlendirilmiştir. Simanların PMA ile farklılaştırıldıktan sonra LPS ile muamele edilmiş hücreler üzerindeki sitotoksikite ise sadece 24. saatte değerlendirilmiştir.

PMA 24. saat, PMA 48. saat, PMA 72. saat ve LPS 24. saat olmak üzere toplam 4 adet kültür kabı hazırlandı. Her kültür kabı, siman içermeyen negatif kontrol grubu, doxorubicin içeren pozitif kontrol grubu ve MTA bloklarının ilave edildiği üç farklı gruptan oluşturuldu (Tablo 2). Aşağıda gruplar gösterilmektedir.

Grup 1: Kontrol (K)

Grup 2: Pozitif Kontrol (+K)

Grup 3: ProRoot MTA (PR)

Grup 4: MTA Repair HP (HP)

Grup 5: Bio MTA+ (Bio+)

K 1	K 2	K 3	+K 1	+K 2	+K 3
PR 1	PR 2	PR 3	HP 1	HP 2	HP 3
Bio+ 1	Bio+ 2	Bio+ 3	-	-	-

Tablo 2: MTT analizi kültür kabı görünümü (24s LPS/ 24s PMA/ 48s PMA/ 72s PMA)

3.1.2. ELISA Analizi Grupları

THP-1 orijinli makrofaj hücrelerinin LPS varlığında test örnekleminin IL-1 β , IL-6 ve TNF- α mediyatörlerine karşı ürettikleri sitokin konsantrasyonlarını analiz etmek için MTT analizinde kullanılan hücrelerin süpernatantları kullanıldı. Kültür kabı görüntüsü Tablo 3’de gösterilmiştir. Aşağıda ELISA analizi grupları gösterilmektedir.

Grup 1: LPS ile indüklenmiş grup (K + Pr + HP + B)

Grup 2: 24. saat PMA grubu (K+ Pr+ HP+ B)

Grup 3: 48. saat PMA grubu (K+ Pr+ HP+ B)

Grup 4: 72. saat PMA grubu (K+ Pr+ HP+ B)

Std 1	LPS K1	LPS HP3	24S PR2	48S K1	48H HP3	72S PR2
Std 2	LPS K2	LPS Bio+1	24S PR3	48S K2	48S Bio+1	72S PR3
Std 3	LPS K3	LPS Bio+2	24S HP1	48S K3	48S Bio+2	72S HP1
Std 4	LPS PR1	LPS Bio+3	24S HP2	48S PR1	48S Bio+3	72S HP2
Std 5	LPS PR2	24S K1	24S HP3	48S PR2	72S K1	72S HP3
Std 6	LPS PR3	24S K2	24S Bio+1	48S PR3	72S K2	72S Bio+1

Std 7	LPS HP1	24S K3	24S Bio+2	48S HP1	72S K3	72S Bio+2
Std 8	LPS HP2	24S PR1	24S Bio+3	48S HP2	72S PR1	72S Bio+3

Tablo 3: ELISA analizi kültür kabı görünümü (IL-1 β / IL-6/ TNF- α)

3.2. Siman Blokların Hazırlanması

Çalışmada kullanılacak örneklerin boyutlarının standardizasyonu için 5 mm çapta ve 2 mm kalınlıkta silikon kalıplar oluşturuldu.

Çalışmamızda ProRoot MTA, MTA Repair HP ve Bio MTA+ simanları test edildi. Simanlar aseptik şartlar altında üretici firmaların önerileri doğrultusunda hazırlandı ve standart kalıplara yerleştirildi. Örnekler, 24 saat boyunca, 37 °C’de, %100 nem içeren etüvde bekletildi. Siman bloklar makrofaj hücreleri ile etkileşime geçmeden önce 37 Gray gama radyasyonu (CIS BIO International Fransa, IBL 437C tip ünite) ile sterilize edildi.



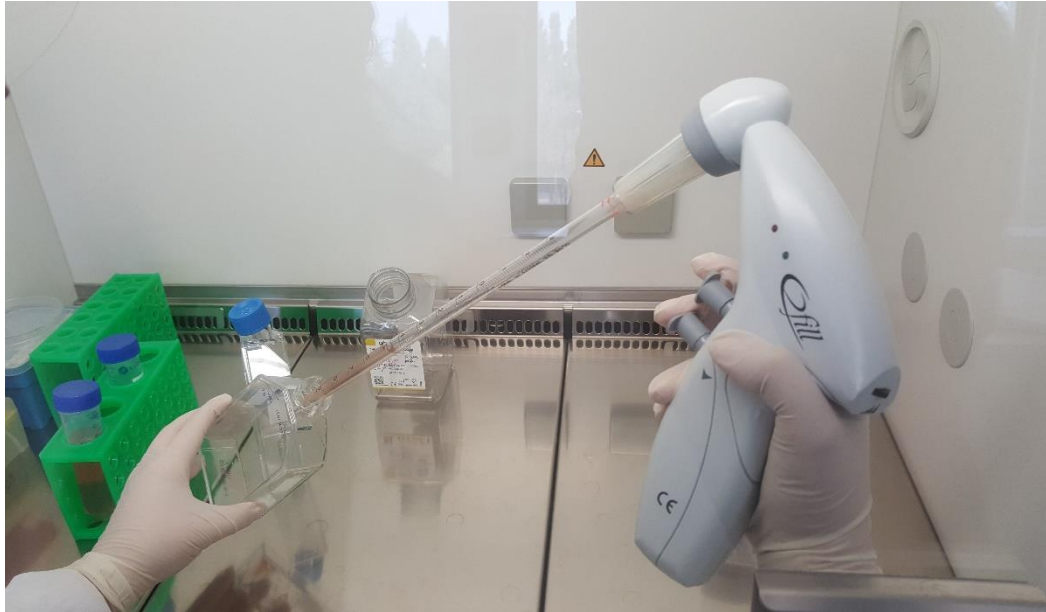
Şekil 1: Siman blokların hazırlandığı ortam

3.3. Hücre Kültürü Ve Devamlılığı

3.3.1. İnsan Monosit Hücre Hattının Hazırlanması

ACTT'den (The Global Bioresource Center) temin edilen THP-1 orijinli insan monosit hücre hattı Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü İmmünoyoteknoloji laboratuvarında sıvı azot içerisinde muhafaza edildi. Deneye başlamadan önce hücreler 37 °C su banyosunda çözöldü. 3 ml kültür ortamıyla 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj (Micro 200R) edildi. Hücre pelleti 12 ml ortam ile 72 cm²'lik T-tip deney tüpüne (ThermoFisher Scientific, ABD) alınarak, 37 °C'de, %5 CO₂ içeren inkübatörde kültür devamlılığı sağlandı.

THP-1 hücreleri, RPMI 1640 (%10 FBS ve %0.1 penisilin/streptomisin) besi ortamı (Gibco, ABD) ile kombine kullanıldı. Gerekli aşamalar Klas II Laminar Akışlı Kabin (ThermoFisher Scientific, ABD) içerisinde gerçekleştirildi.



Şekil 2: Çalışmada kullanılan Klas II Laminar Akışlı Kabin

3.3.2. Hücre Bakımı ve Pasajlama

THP-1 hücreleri çözdürülerek deney tüplerine alındı. Süspanse özellik gösteren THP-1 hücre yoğunluğu %70'in (yaklaşık olarak) altında ise ortam değişikliği yapıldı.

Ortam değişimi işlemi sırasında kültür ortamı 15 ml'lik santrifüj tüpüne alınarak 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Hücre pelleti tekrar taze ortamla deney tüpüne alındı.

Kültür yoğunluğu %70'e ulaştığında pasajlama işlemi gerçekleştirildi. Kültür ortamı 15 ml'lik santrifüj tüpüne alınarak 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Ardından süpernatant uzaklaştırılarak pellet halindeki hücreler uygun oranda seyreltilerek deney tüpüne alındı.

3.3.3. Hücre Sayımı

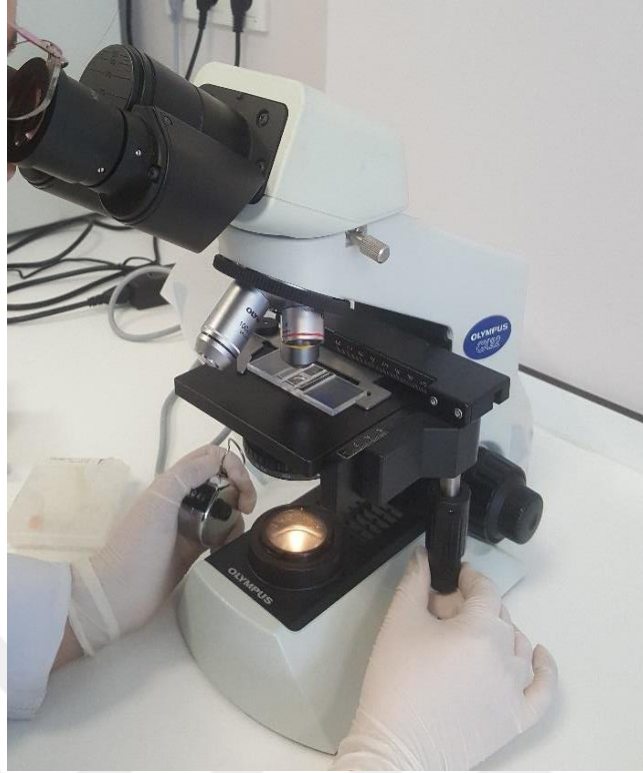
Hücre sayımı için kültür ortamından örnek alındı. Alınan örnek 1/10 oranında seyreltilerek Nuebauer lamına eklendi ve mikroskop aracılığı ile incelendi. İlgili alandaki hücreler sayıldı ve aşağıdaki formül uygulanarak hücre sayısı hesaplandı.

$$\frac{\text{TOPLAM HÜCRE SAYISI}}{\text{SAYIM YAPILAN BÜYÜK KARE SAYISI}} \times \text{SEYRELTME FAKT.} \times \text{LAMEL HACMİ} = \text{KÜLTÜR KONSANTRASYONU}$$

Lamel hacmi: 10^4 mm^3

3.3.4. THP-1 Hücre Hattının Farklılaştırılması

Başlangıç konsantrasyonu 10^6 hücre/ml olacak şekilde, 500 µl THP-1 hücresi 24 kuyucuklu kültür kaplarına ekildi. Monosit hücrelerini makrofaja farklılaştırmak için her kuyucuğa 15 ng/ml PMA (Sigma, ABD) ilave edilerek 48 saat inkübe edildi. Ardından ilgili gruba 10 ng/ml *E. coli*'den (*Escherichia coli* O55:B5, Sigma, St. Louis, MO, ABD) izole edilmiş LPS (Sigma, ABD) ilave edildi.



Şekil 3: Çalışmada kullanılan mikroskop

3.4. Sitotoksosite Deneyi

Hem PMA hem de ilave olarak LPS ile farklılaştırılmış hücrelerin bulunduğu kuyucuklardaki süpernatantlar, 2 kere kültür ortamı ile yıkamak suretiyle uzaklaştırıldı. Her kuyucuğa 500 µl ortam ilave edildi. Ardından MTA'lar ile inkübasyon sürelerinin sonunda süpernatantlar uzaklaştırıldı ve ELISA analizi için -86 °C dondurucuda (ThermoFisher, Scientific, ABD) saklandı. Test edilecek MTA'ların sitotoksik etkileri MTT testi (MTT Cell Growth Kit; Chemicon, Rosemont, IL, ABD) ile belirlenmek üzere kuyucuklara 250 µl ortam ve 50 µl 2,5 mg/ml konsantrasyonda MTT solüsyonu eklenerek 4 saat hücreler ile inkübe edildi. İnkübasyon süresinin sonunda kültür ortamı uzaklaştırıldı. MTT solüsyonu ile canlı hücrelerde oluşan formazan kristallerini çözmek için 300 µl dimetil sülfoksit (Gilbo, ABD) eklendi. Ardından her örnekten 150 µl solüsyon 96 kuyucuklu her biri 0,32 cm² alanlı kültür kaplarına aktarıldı. Değerler mikropleyt okuyucu (ELx800™ Absorbance Microplate Reader, BioTek Instruments, Winooski, VT, ABD) aracılığı ile 570 nm

dalga boyunda okutuldu. Canlılık değeri oranları, elde edilen absorbands değerleri doğrultusunda aşağıdaki denkleme yerleştirilerek hesaplandı.

$$\text{Canlılık(\%)} = \frac{\text{Madde Eklenen Hücrelerin Absorbans Değeri}}{\text{Kontrol Hücrelerinin Absorbans Değeri}} \times 100$$

3.5. ELISA Analizi

3.5.1. Makrofaj Hücrelerinin Ürettiği Proenflamatuvar Sitokin Yoğunluklarının Ölçülmesi

Deney gruplarında enflamatuvar sitokin yoğunlukları üretici ELISA kitleri (BosterBio, CA, ABD) kullanılarak ölçüldü. Bu amaçla TNF- α , IL-1 β , IL-6 mediyatörleri analiz edildi.

Deneye başlanmadan önce +4 $^{\circ}\text{C}$ 'de buzdolabında (Arçelik, Türkiye) muhafaza edilen ELISA kitleri ve MTT testinden hemen önce ayrılıp dondurulmuş süpernatantların oda sıcaklığına gelmesi beklendi. Süpernatantlar soğutmalı santrifüjde (Mikro 200R) (Hettich, GmbH, Almanya) 2000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi.

96 kuyucuklu kültür kaplarının ilgili kuyucuklarına 100'er μl standart, süpernatant ve kontrol solüsyonu ilave edildi. Kuyucuklara ayrıca 100 μl örnek seyreltici tampon solüsyon ilave edildi. Ardından kültür kapları 90 dakika 37 $^{\circ}\text{C}$ ' de inkübe edildi. Süre sonunda boşaltıldı ve kuyucuklara üretici önerileri doğrultusunda hazırlanmış 100 μl Biotinlenmiş Anti –Human IL-1 β , IL-6 veya TNF- α antikoruna eklendi. Hücre kapları 60 dakika 37 $^{\circ}\text{C}$ ' de inkübe edildi. Sonra sıvılar boşaltıldı, kuyucuklar üçer kez 300 μl yıkama tampon solüsyonu ile yıkandı ve 100 μl Avidin- Biotin Peroksidaz Karışımı tüm kuyucuklara ilave edildi. 30 dakika 37 $^{\circ}\text{C}$ ' de inkübasyon süresinin ardından gözler boşaltıldı ve hücre kapları 5 kez 300 μl yıkama tampon solüsyonu ile yıkandı. Her kuyucuğa 90 μl Renk Oluşturma Reaktifi eklendi ve karanlık ortamda 15–25 dk 37 $^{\circ}\text{C}$ ' de inkübe edildiler. Optimal inkübasyon süresine ampirik olarak, standartların bulunduğu kuyucuklardaki renk değişimine bakılarak karar verildi. Son olarak her kuyucuğa 100 μl Duraklatma Solüsyonu ilave edildi ve reaksiyonlar durduruldu.

3.5.2. ELISA Analizi Sonuçlarının Değerlendirilmesi

ELISA test sonuçları, reaksiyon durdurulduktan hemen sonra 450 nm dalgaboyunda ELISA Okuyucu ile değerlendirildi. Elde edilen ELISA test sonuçlarında inhibisyonlar %70 -%100 arasında ise yüksek, %40 -%69 arasında ise orta, %20 -%39 arasında ise düşük ve %20'den daha az ise anlamlı olarak kabul edildi.



Şekil 4: Çalışmada kullanılan 96 gözlü mikrolept okuyucu

3.6. İstatistiksel Analizler

Deneyler tamamlandıktan sonra elde edilen veriler istatistiksel değerlendirmeye alındı. Verilerinin istatistiksel değerlendirmesinde GraphPad Prism 8.0.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, ABD) programı kullanıldı.

Verilerin ortalama ve standart sapma değerleri incelendi. Verilerin grup içi saatler arası ve belli bir saat diliminde gruplar arası değerlendirilmesinde iki yönlü ANOVA testi ve ardından Tukey testi (Tukey's Multiple Comparisons Test) kullanıldı.

24. saatte elde edilen verilerin karşılaştırılması için Kruskal Wallis Testi ve sonrasında birden çok grubun tek bir grupla kıyaslanmasında Dunn oklu karşılaştırma testinden (Dunn's Multiple Comparison Test) faydalanıldı. $P < 0,05$ veya daha küçük değerler anlamlı olarak kabul edildi.



4. Bulgular

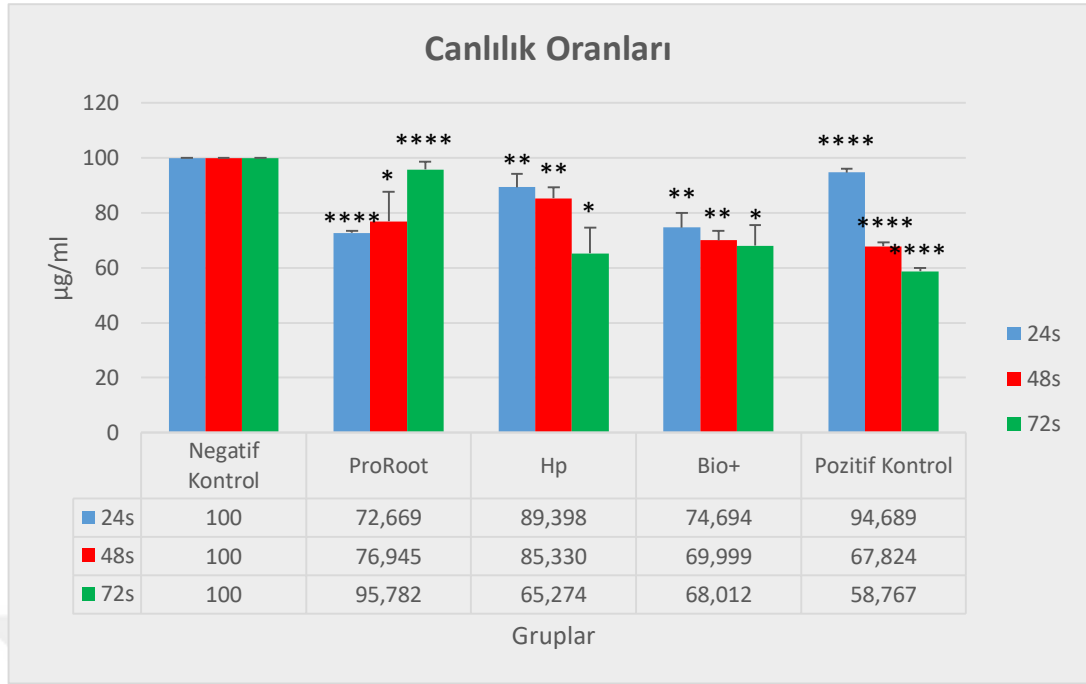
4.1. Sadece PMA İle Farklılaştırılmış THP-1 Hücrelerin Kullanıldığı Analizlerin Bulguları

4.1.1. Sitotoksisite Analizi

MTA'ların THP-1 insan monosit hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkisini değerlendirmek için yapılan deneylerde 72. saatin sonunda elde edilen değerler yüksekten düşüğe sırasıyla ProRoot MTA, Bio MTA+, MTA Repair HP ve Pozitif kontrol grubu şeklinde gözlendi (Grafik 1).

Makrofajların saat dilimlerine göre sağ kalım oranları kıyaslandığında en yüksek değerler 24. ve 48. saatte MTA Repair HP, 72. saatte ProRoot MTA grubunda gözlendi. 24, 48 ve 72. saatlerde en sitotoksik değerleri gösteren simanlar ise sırasıyla ProRoot MTA, Bio MTA+, MTA Repair HP oldu. Pozitif kontrol grubu ile kıyaslandığında 24. saatte MTA grupları daha fazla hücre ölümüne sebep olurken 48 ve 72. saatlerde tüm gruplar pozitif kontrol grubundan daha biyouyumlu özellik gösterdi. Ayrıca tüm gruplar zaman içerisinde daha sitotoksik davranma eğiliminde iken, ProRoot MTA'nın biyouyumluluğu artan bir grafik çizmesi dikkat çekti. (Grafik 1).

MTA Repair HP 72 saatte ProRoot MTA'ya kıyasla anlamlı oranda hücre canlılığında azalmaya sebep oldu. Bio MTA+ 48. saatte hem ProRoot MTA hem MTA Repair HP'ye kıyasla hücre sağ kalımını olumsuz etkilemiştir (Tablo 4).



Grafik 1: 24, 48 ve 72. saatlerde sadece PMA ile farklılaştırılmış THP-1 hücrelerinin yer aldığı gruplarda MTT testi sonucunda elde edilen canlılık değerleri ve bu değerlerin kontrol grubu ile karşılaştırılması ($P < 0,05$:*, $P < 0,01$:**, $P < 0,001$:***, $P < 0,0001$:****)

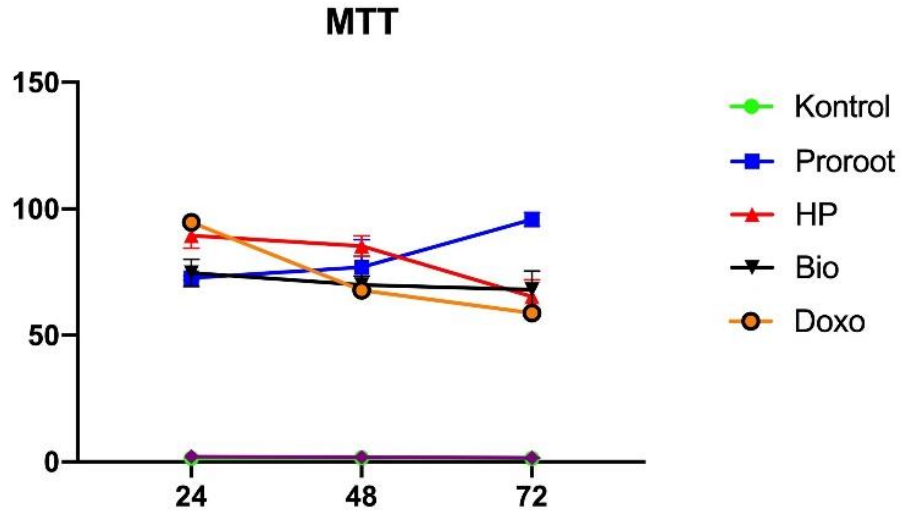
	PR			HP			Bio+			+Kontrol		
	24s	48s	72s	24s	48s	72s	24s	48s	72s	24s	48s	72s
Negatif Kontrol	4*	1*	4*	2*	2*	1*	2*	2*	1*	4*	4*	4*
PR				-	-	1*	-	1*	-	4*	-	2*
HP							-	1*	-	-	1*	-
Bio+										-	-	-

Tablo 4: Sadece PMA ile farklılaştırılmış THP-1 hücrelerinden elde edilen MTT testi bulgularının saat periyotlarına göre gruplar arası karşılaştırılması ($P < 0,05$:*, $P < 0,01$:**, $P < 0,001$:***, $P < 0,0001$:****)

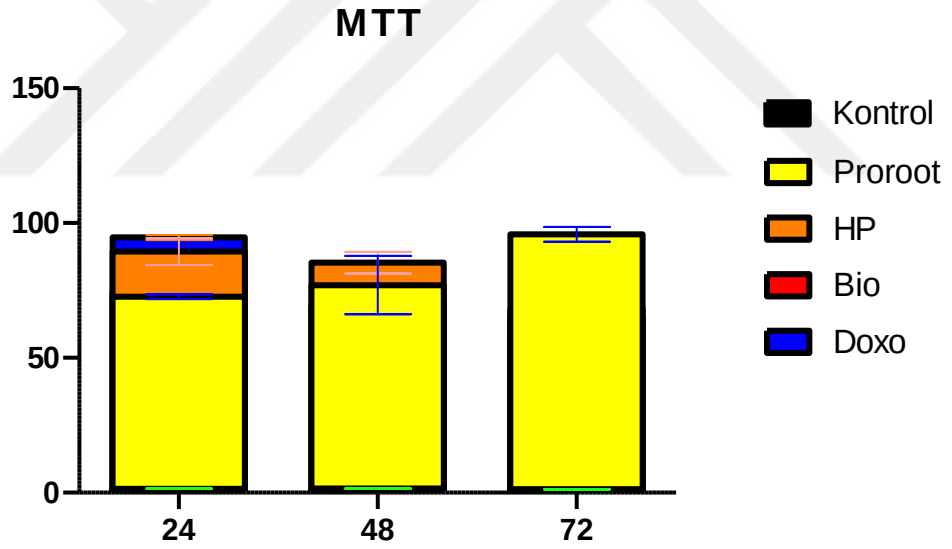
Makrofaj hücrelerinden elde edilen MTT verilerinin grup içi karşılaştırılması hem ProRoot MTA ve hem de MTA Repair HP'nin 24 ve 72.saat verileri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğunu ortaya koymuştur. Kontrol ve Bio MTA+ gruplarında hiçbir saat mukayesesinde istatistiksel olarak anlamlı fark izlenmedi (Tablo 5).

	Saatler	Ortalama farklar	Anlamlılık	Düzenlenmiş P Değeri
Negatif Kontrol	24 vs. 48	-0,01467	Hayır	0,9911
	24 vs. 72	0,2160	Hayır	0,0694
	48 vs. 72	0,2307	Hayır	0,2015
PR	24 vs. 48	-4,275	Hayır	0,8181
	24 vs. 72	-23,11	Evet**	0,0076
	48 vs. 72	-18,84	Hayır	0,1980
HP	24 vs. 48	4,068	Hayır	0,7463
	24 vs. 72	24,13	Evet**	0,0024
	48 vs. 72	20,06	Hayır	0,1468
Bio+	24 vs. 48	4,695	Hayır	0,6772
	24 vs. 72	6,683	Hayır	0,6715
	48 vs. 72	1,988	Hayır	0,7902
Pozitif Kontrol	24 vs. 48	26,82	Evet*****	<0,0001
	24 vs. 72	35,90	Evet***	0,0005
	48 vs. 72	9,083	Evet*	0,0270

Tablo 5: Makrofaj hücrelerinin MTT verilerinin grup içi karşılaştırılması (P<0,05:*, P<0,01:**, P<0,001:***, P<0,0001:*****)



Grafik 2: Makrofaj hücrelerinin MTT testi verilerinin gösterilmesi



Grafik 3: Makrofaj hücrelerinin MTT verilerinin saat dilimlerine göre karşılaştırılması

4.1.2. ELISA Analizi

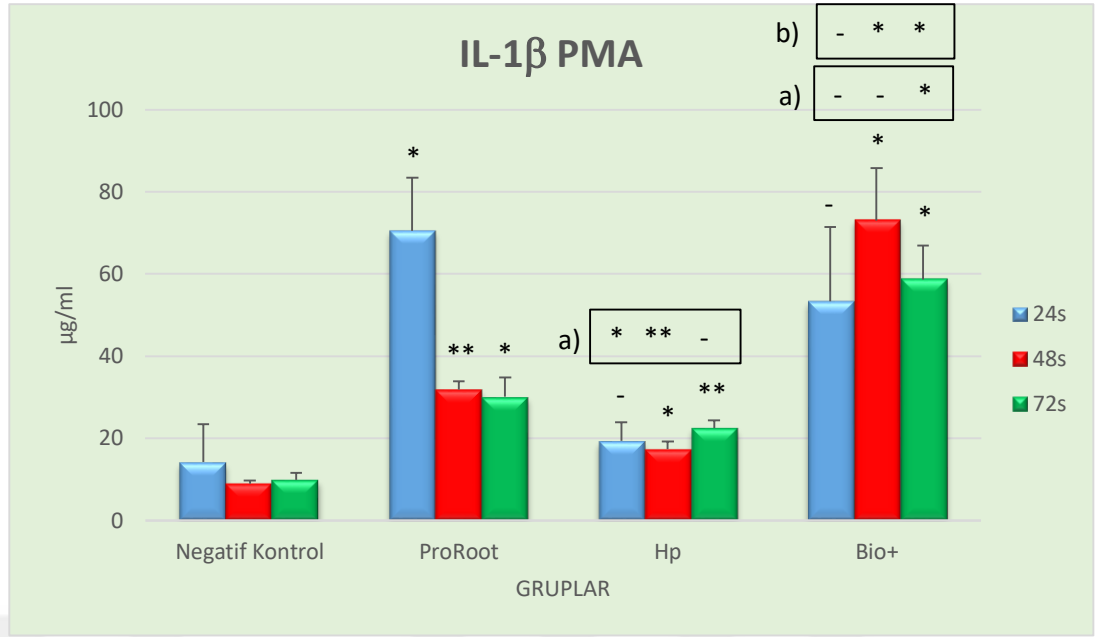
4.1.2.1. IL-1 β Analizi

Çalışmada kullanılan simanların tamamı IL-1 β salınımını uyararak kontrol grubundan yüksek değerler sergiledi. Aşağıda IL-1 β analizi sonucunda elde edilen veriler gösterilmektedir (Tablo 6).

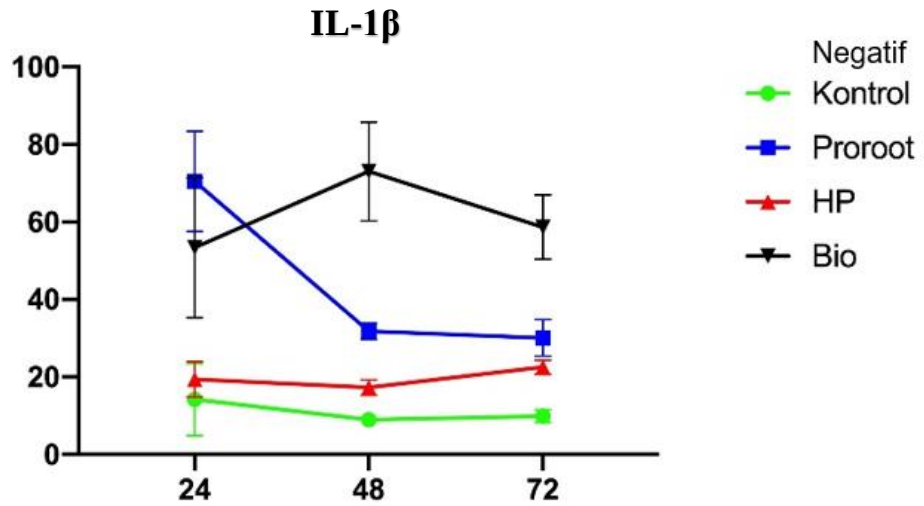
	24s	48s	72s
Negatif Kontrol	14,189 ($\pm$ 9,286)	8,949 ($\pm$ 0,813)	9,857 ($\pm$ 1,679)
PR	70,448 ^a ($\pm$ 12,911)	31,801 ^b ($\pm$ 0,813)	30,082 ^a ($\pm$ 4,714)
HP	19,355 ($\pm$ 4,567)	17,268 ^a ($\pm$ 1,981)	22,503 ^b ($\pm$ 1,820)
Bio+	53,339 ($\pm$ 18,036)	73,005 ^a ($\pm$ 12,677)	58,660 ^a ($\pm$ 8,274)

Tablo 6: IL-1 β ELISA testi sonucunda elde edilen değerlerin grup ortalamaları, standart sapma değerleri ve bu verilerin saat periyotlarına göre kontrol grubu ile karşılaştırılması (P<0,05: a, P<0,01: b, P<0,001: c, P<0,0001: d)

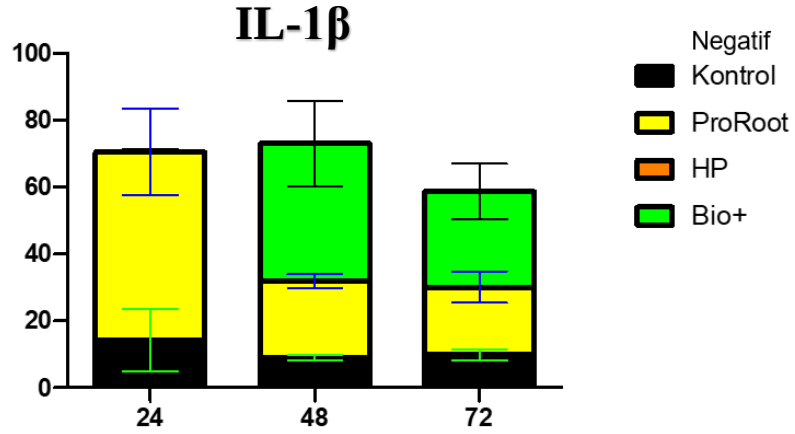
ProRoot MTA 24. saatte diğer saat dilimlerine oranla çok yüksek seviyede bir IL-1 β salınımı gösterirken, zaman içinde salınımı azaldı. MTA Repair HP diğer iki siman grubuna kıyasla tüm saat dilimlerinde çok daha düşük miktarda IL-1 β salınmasına sebep oldu. Bio MTA+ ise 72. saatte tüm gruplardan istatistiksel olarak anlamlı oranda daha yüksek IL-1 β salınımı gösterdi (Grafik 4).



Grafik 4: 24, 48 ve 72. saatlerde sadece PMA ile farklılaştırılmış hücrelerin yer aldığı gruplardan elde edilen IL-1β ELISA testi verileri ve bu verilerin saat periyotlarına göre kontrol grubunun aynı saat grubu ile karşılaştırılması a) Verilerin ProRoot MTA grubu ile karşılaştırılması b) Verilerin MTA Repair HP grubu ile karşılaştırılması (P<0,05:*, P<0,01:**, P<0,001:***, P<0,0001:****)



Grafik 5: Makrofaj hücrelerinin IL-1β ELISA analizi verilerinin karşılaştırmalı gösterimi



Grafik 6: Makrofaj hücrelerinden elde edilen IL-1 β salınımı verilerinin saat dilimlerine göre gösterilmesi

Makrofaj hücrelerinin IL-1 β ELISA analizi bulgularının grup içi saatler arası karşılaştırıldığında sadece MTA Repair HP grubunun 48 ve 72. saat mukayesesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlemlendi ($P < 0,001:***$) (Tablo 7).

	Saatler	Ortalama farklar	Anlamlılık	Düzenlenmiş P Değeri
Negatif Kontrol	24 vs. 48	5,240	Hayır	0,6209
	24 vs. 72	4,332	Hayır	0,7133
	48 vs. 72	-0,9080	Hayır	0,7436
PR	24 vs. 48	38,65	Hayır	0,0840
	24 vs. 72	40,37	Hayır	0,1017
	48 vs. 72	1,719	Hayır	0,6375
HP	24 vs. 48	2,087	Hayır	0,8563
	24 vs. 72	-3,148	Hayır	0,7132
	48 vs. 72	-5,235	Evet***	0,0003
Bio+	24 vs. 48	-19,67	Hayır	0,5953
	24 vs. 72	-5,321	Hayır	0,8688
	48 vs. 72	14,35	Hayır	0,4836

Tablo 7: Makrofaj hücrelerinin IL-1 β ELISA analizi bulgularının grup içi saatler arası karşılaştırılması (P<0,05:*, P<0,01:**, P<0,001:***, P<0,0001:****)

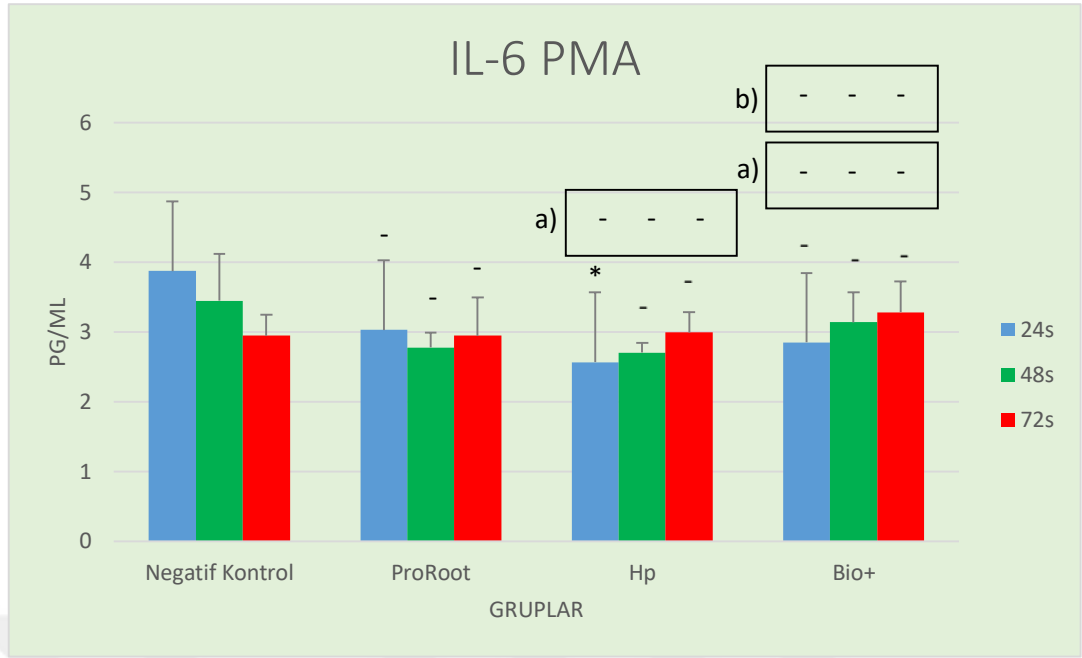
4.1.2.2. IL-6 Analizi

Çalışmada analiz edilen tüm proenflamatuvar sitokinler arasında en az IL-6 mediatörünün salındığı gözlenmiştir. Makrofaj hücrelerinin simanlar ile inkübasyonları sonucu sergiledikleri ortalama IL-6 salınım düzeyleri aşağıda gösterilmektedir (Tablo 8).

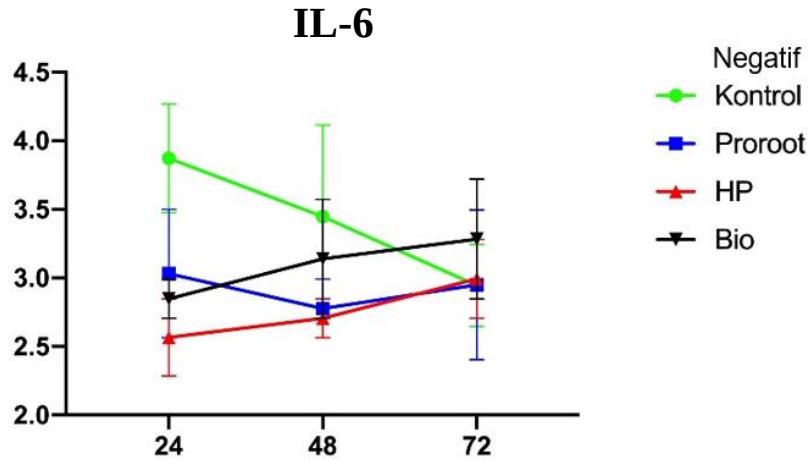
	24s	48s	72s
Negatif	3,872 $\pm$ 0,396	3,446 $\pm$ 0,66785	2,945 $\pm$ 0,29896
Kontrol			
PR	3,031 $\pm$ 0,468	2,777 $\pm$ 0,213	2,948 $\pm$ 0,546
HP	2,566 $\pm$ 0,28052 ^a	2,705 $\pm$ 0,14154	2,993 $\pm$ 0,287
Bio+	2,847 $\pm$ 0,14251	3,139 $\pm$ 0,4335	3,283 $\pm$ 0,43651

Tablo 8: IL-6 ELISA testi sonucunda elde edilen değerlerin grup ortalamaları, standart sapma değerleri ve bu verilerin saat periyotlarına göre kontrol grubu ile karşılaştırılması (P<0,05: a, P<0,01: b, P<0,001: c, P<0,0001: d)

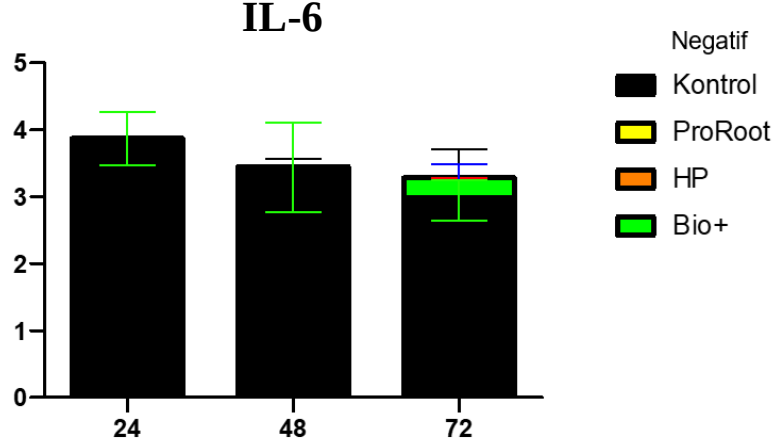
Sadece PMA ile farklılaştırılmış hücrelerin IL-6 verileri incelendiğinde tüm siman gruplarında 24 ve 48. saatlerde kontrol grubundan daha düşük miktarda sitokin salındığı görüldü. İstatistiksel olarak anlamlı bir fark olmamasına rağmen 72. saatte simanların Kontrol grubuna oranla bir miktar daha yüksek IL-6 salınmasına sebep olduğu gözlemlendi (Grafik 7).



Grafik 7: 24, 48 ve 72. saatlerde sadece PMA ile farklılaştırılmış hücrelerin yer aldığı gruplarda IL-6 ELISA testi bulguları ve bu verilerin saat periyotlarına göre kontrol grubu ile karşılaştırılması a) Verilerin ProRoot MTA grubu ile karşılaştırılması b) Verilerin MTA Repair HP grubu ile karşılaştırılması ($P<0,05$ *, $P<0,01$ **, $P<0,001$ ***, $P<0,0001$ ****)



Grafik 8: Makrofaj hücrelerinin IL-6 ELISA analizi verilerinin karşılaştırmalı gösterimi



Grafik 9: Makrofaj hücrelerinden elde edilen IL-6 salınımı verilerinin saat dilimlerine göre gösterilmesi

Makrofaj hücrelerinin IL-6 analizi bulguları grup içi saatler arası karşılaştırıldığında hiçbir grupta istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. (Tablo 9).

	Saatler	Ortalama farklar	Anlamlılık	Düzenlenmiş P Değeri
Negatif Kontrol	24 vs. 48	0,4253	Hayır	0,7681
	24 vs. 72	0,9270	Hayır	0,2003
	48 vs. 72	0,5017	Hayır	0,2787
PR	24 vs. 48	0,2537	Hayır	0,8133
	24 vs. 72	0,08267	Hayır	0,7956
	48 vs. 72	-0,1710	Hayır	0,9202
HP	24 vs. 48	-0,1390	Hayır	0,8480
	24 vs. 72	-0,4270	Hayır	0,5173
	48 vs. 72	-0,2880	Hayır	0,1345
Bio+	24 vs. 48	-0,2913	Hayır	0,3773
	24 vs. 72	-0,4357	Hayır	0,5173
	48 vs. 72	-0,1443	Hayır	0,9565

Tablo 9: Makrofaj hücrelerinin IL-6 ELISA analizi bulgularının grup içi saatler arası karşılaştırılması (P<0,05:*, P<0,01:**, P<0,001:***, P<0,0001:****)

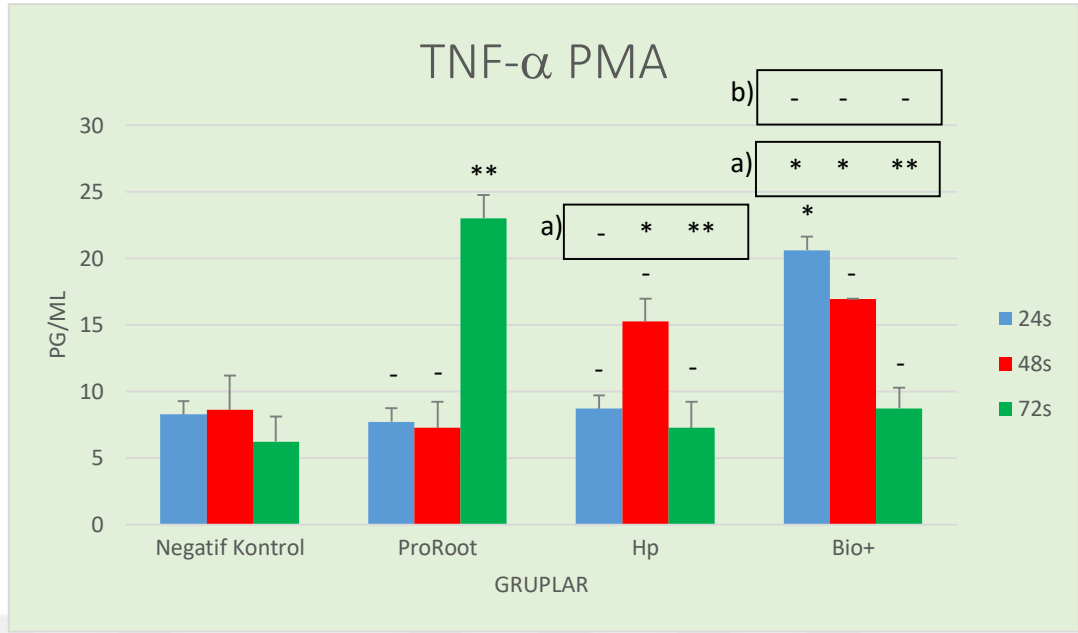
4.1.2.3. TNF- α Analizi

Sadece PMA ile farklılaştırılmış THP-1 hücrelerinin TNF- α analizi verileri incelendiğinde kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı farklılıklara az rastlandığı gözlenmiştir. Analiz sonucunda elde edilen verilerin ortalamaları aşağıda gösterilmektedir (Tablo 10).

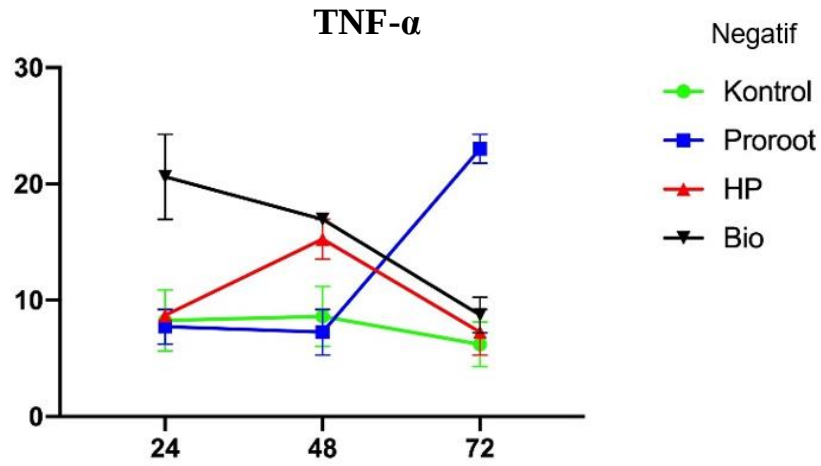
	24s	48s	72s
Negatif	8,264 $\pm$ 2,623	8,608 $\pm$ 2,570	6,214 $\pm$ 1,912
Kontrol			
PR	7,728 $\pm$ 1,495	7,258 $\pm$ 1,965	23,025 $\pm$ 1,761 ^b
HP	8,712 $\pm$ 0,511	15,253 $\pm$ 1,717	7,260 $\pm$ 1,965
Bio+	20,619 $\pm$ 3,649 ^a	16,970 $\pm$ 0,002	8,738 $\pm$ 1,533

Tablo 10: TNF- α ELISA testi sonucunda elde edilen değerlerin grup ortalamaları, standart sapma değerleri ve bu verilerin saat periyotlarına göre kontrol grubu ile karşılaştırılması (P<0,05: a, P<0,01: b, P<0,001: c, P<0,0001: d)

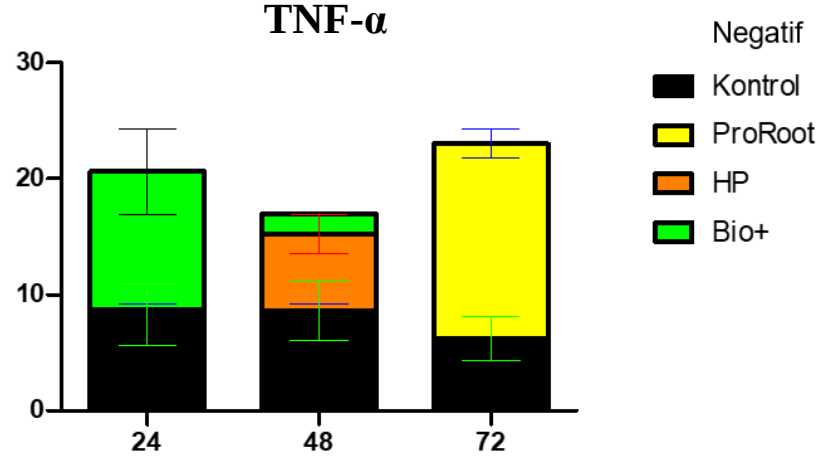
Sadece PMA ile farklılaştırılmış hücrelerden elde edilen TNF- α ELISA testi bulguları en yüksek değerlerin 24 ve 48. saatte Bio MTA+ grubunda, 72. saatte ise ProRoot MTA grubunda görüldüğünü ortaya koydu. ProRoot MTA grubunda 48. saate kadar izlenen değerler Kontrol grubundan düşük iken 72. saatte oldukça yüksek değerler sergilemesi ilginçtir. (Grafik 10).



Grafik 10: 24, 48 ve 72. saatlerde sadece PMA ile farklılaştırılmış hücrelerin yer aldığı gruplarda TNF- α ELISA testi bulguları ve bu verilerin saat periyotlarına göre kontrol grubu ile karşılaştırılması a) Verilerin ProRoot MTA grubu ile karşılaştırılması b) Verilerin MTA Repair HP grubu ile karşılaştırılması ($P < 0,05$:*, $P < 0,01$:**, $P < 0,001$:***, $P < 0,0001$:****)



Grafik 11: Makrofaj hücrelerinin TNF- α ELISA analizi verilerinin karşılaştırmalı gösterimi



Grafik 12: Makrofaj hücrelerinden elde edilen IL-6 salınımı verilerinin saat dilimlerine göre gösterilmesi

Makrofaj hücrelerinin TNF- α ELISA analizi bulguları grup içi saatler arası karşılaştırıldığında 24 ve 72. saat ProRoot MTA verileri ve 48 ve 72. saat MTA Repair HP verileri arasında anlamlı farklılık gözlemlendi. (Tablo 11).

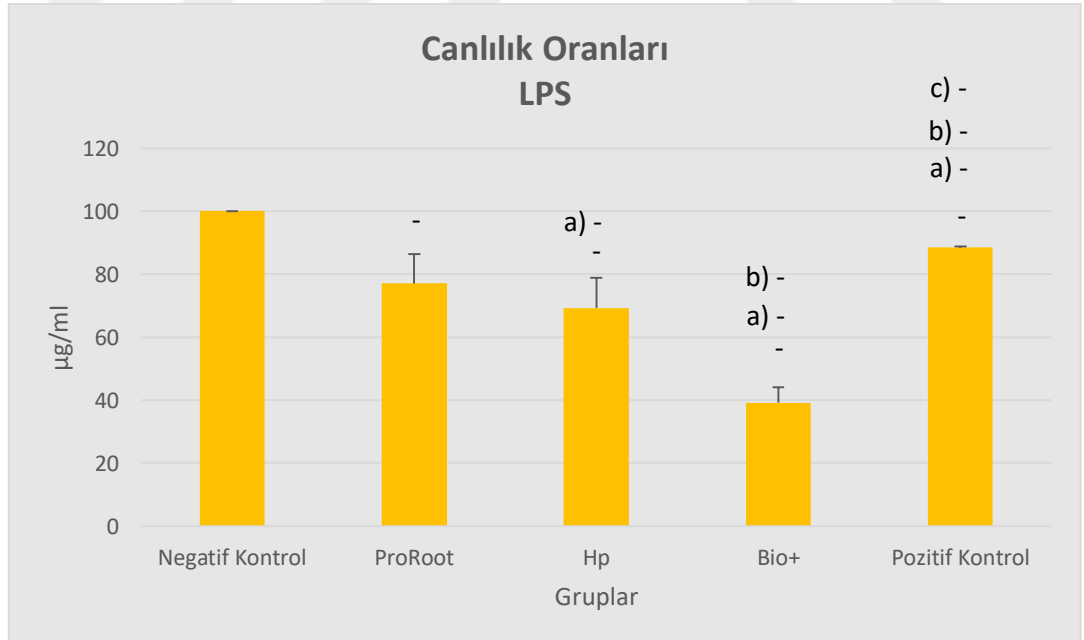
	Saatler	Ortalama farklar	Anlamlılık	Düzenlenmiş P Değeri
Negatif Kontrol	24 vs. 48	-0,3443	Hayır	0,9792
	24 vs. 72	2,049	Hayır	0,1568
	48 vs. 72	2,394	Hayır	0,2871
PR	24 vs. 48	0,4703	Hayır	0,9704
	24 vs. 72	-15,30	Evet****	<0,0001
	48 vs. 72	-15,77	Evet*	0,0246
HP	24 vs. 48	-6,541	Hayır	0,0660
	24 vs. 72	1,453	Hayır	0,6378
	48 vs. 72	7,993	Evet****	<0,0001
Bio+	24 vs. 48	3,649	Hayır	0,3779
	24 vs. 72	11,88	Hayır	0,1038
	48 vs. 72	8,233	Evet*	0,0207

Tablo 11: Makrofaj hücrelerinin TNF- α ELISA analizi bulgularının grup içi saatler arası karşılaştırılması (P<0,05:*, P<0,01:**, P<0,001:***, P<0,0001:****)

4.2. LPS İle Muamele Edilmiş Makrofaj Hücrelerin Kullanıldığı Analizlerin Bulguları

4.2.1. Sitotoksite Analizi

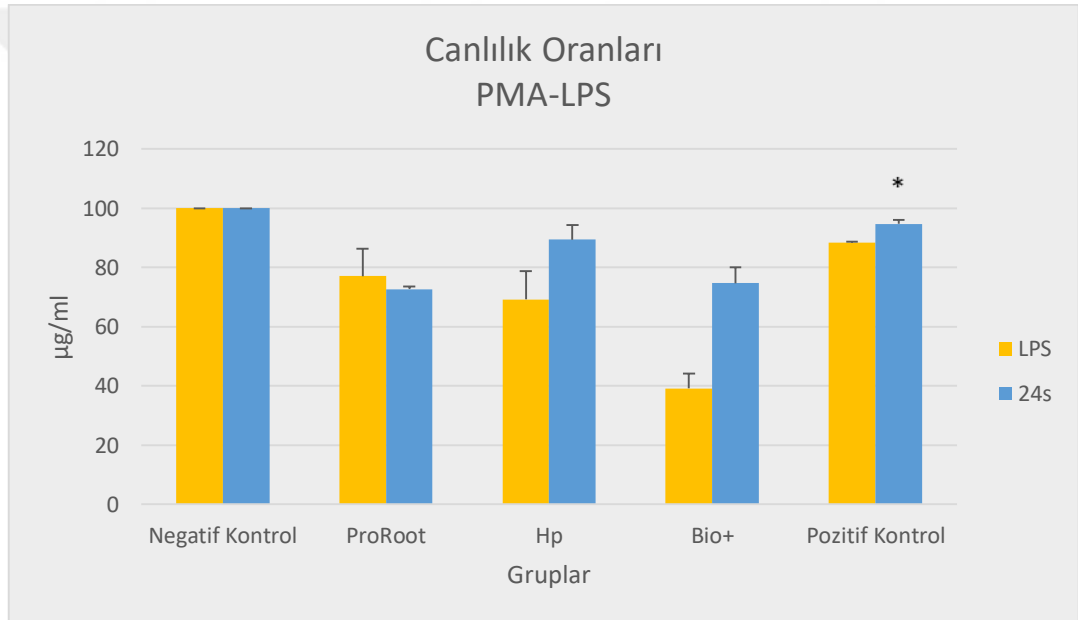
LPS ile muamele edilmiş hücrelerin yer aldığı gruplarda MTT analizi verilerine göre ProRoot MTA ve Pozitif Kontrol hücre canlılığı üzerinde herhangi bir etki göstermezken, MTA Repair HP canlılığı biraz azalttı. Bio MTA+ ise tüm gruplar arasında en sitotoksik değerleri ortaya koydu. Pozitif kontrol grubu simanlara oranla daha düşük miktarda hücre ölümüne sebep oldu (Grafik 13).



Grafik 13: 24. saatte LPS ile muamele edilmiş hücrelerin yer aldığı gruplarda MTT testi sonucunda elde edilen canlılık değerleri ve kontrol grubu ile karşılaştırılması a)

ProRoot grubu ile karşılaştırma b) MTA Repair HP grubu ile karşılaştırma c) Bio MTA+ grubu ile karşılaştırma ($P<0,05$ *, $P<0,01$ **, $P<0,001$ ***, $P<0,0001$ ****)

24 saat inkübe edilmiş hücrelerden elde edilen bulgular karşılaştırıldığında, ne LPS ile muamele edilen ve edilmeyen siman grupları arasında ne de aynı şekilde muamele edilmiş siman grupları arasında THP-1 hücrelerinin sağ kalımı üzerinde anlamlı bir fark izlenmedi. Kontrol ile Pozitif Kontrol grupları ve LPS Kontrol ile Pozitif Kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu gözlemlendi (Grafik 14).



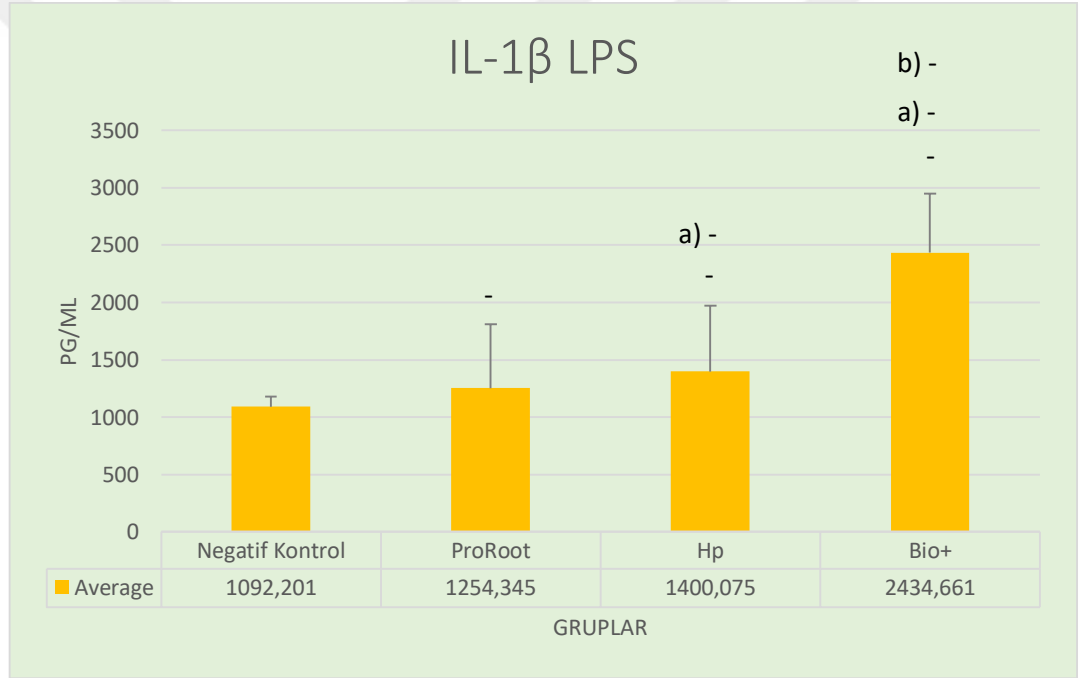
Grafik 14: 24. saatte (LPS ile muamele edilmiş ve edilmemiş hücrelerin yer aldığı gruplarda) elde edilen canlılık değerlerinin karşılaştırılması ($P<0,05$ *, $P<0,01$ **, $P<0,001$ ***, $P<0,0001$ ****)

4.2.2. ELISA Analizi

4.2.2.1. IL-1 β Analizi

MTA simanları ile inkübe edilmiş LPS ile muamele görmüş makrofaj hücreleri, sadece PMA ile farklılaştırılmış hücelere oranla çok daha yüksek miktarda IL-1 β salınımına sebep oldu. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklı IL-1 β salınımı ile karşılaşılmadı. Buna rağmen tüm siman gruplarında kontrol grubuna kıyasla IL-1 β salınımında artış gözlemlendi. IL-1 β seviyeleri düşükten yükseğe sırasıyla ProRoot MTA, MTA Repair HP ve Bio MTA+ olarak izlendi.

LPS ile muamele edilmiş veya edilmemiş tüm hücrelerde Bio MTA+'ın yüksek IL-1 β salınımına sebep olması dikkat çekti (Grafik 15).

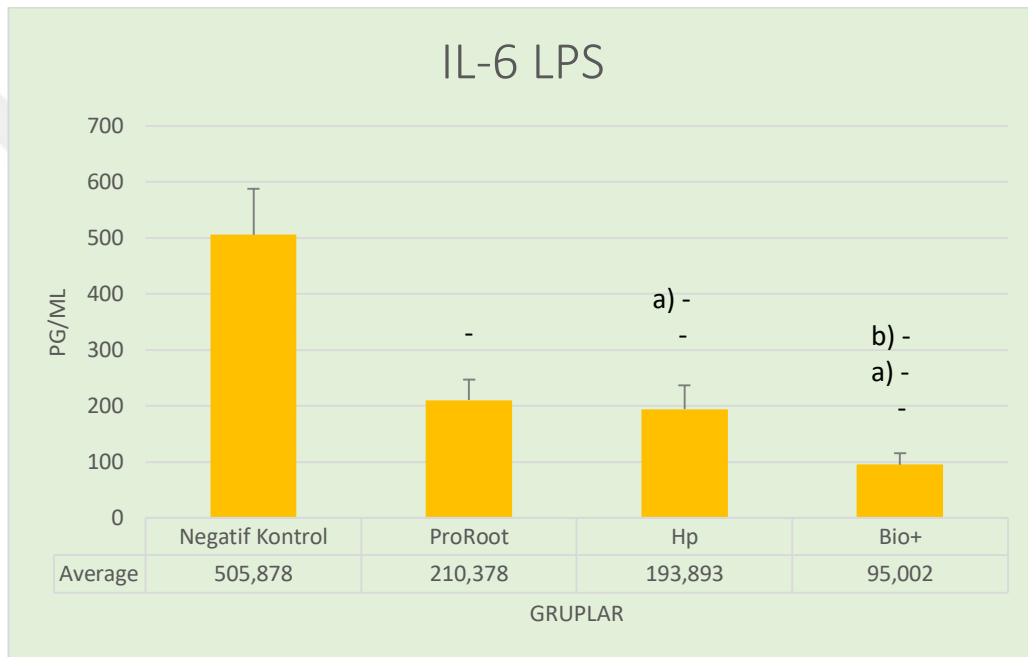


Grafik 15: LPS ile muamele edilmiş hücrelerin yer aldığı gruplardan elde edilen IL-1 β ELISA testi bulguları ve bu verilerin kontrol grubu ile karşılaştırılması a) Verilerin ProRoot MTA grubu ile karşılaştırılması b) Verilerin MTA Repair HP grubu ile karşılaştırılması (P<0,05:*, P<0,01:**, P<0,001:***, P<0,0001:****)

IL-1 β ELISA testi 24. saat bulgularının karşılaştırılması Kontrol grubu ile LPS Bio MTA+ grubu arasında ve MTA Repair HP grubu ile LPS Bio MTA+ grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunduğunu ortaya koydu.

4.2.2.2. IL-6 Analizi

LPS ile muamele görmüş hücreler, IL-1 β 'da olduğu kadar olmasa da yine sadece PMA ile farklılaştırılmış hücrelere kıyasla daha yüksek oranda IL-6 salınmasına sebep oldu. Kontrol grubu tüm MTA'lerden belirgin oranda daha yüksek sitokin salınmasına sebep olurken, siman gruplarındaki IL-6 salınım miktarı yüksekten düşüğe ProRoot MTA, MTA Repair HP ve Bio MTA+ şeklinde izlendi (Grafik 16).

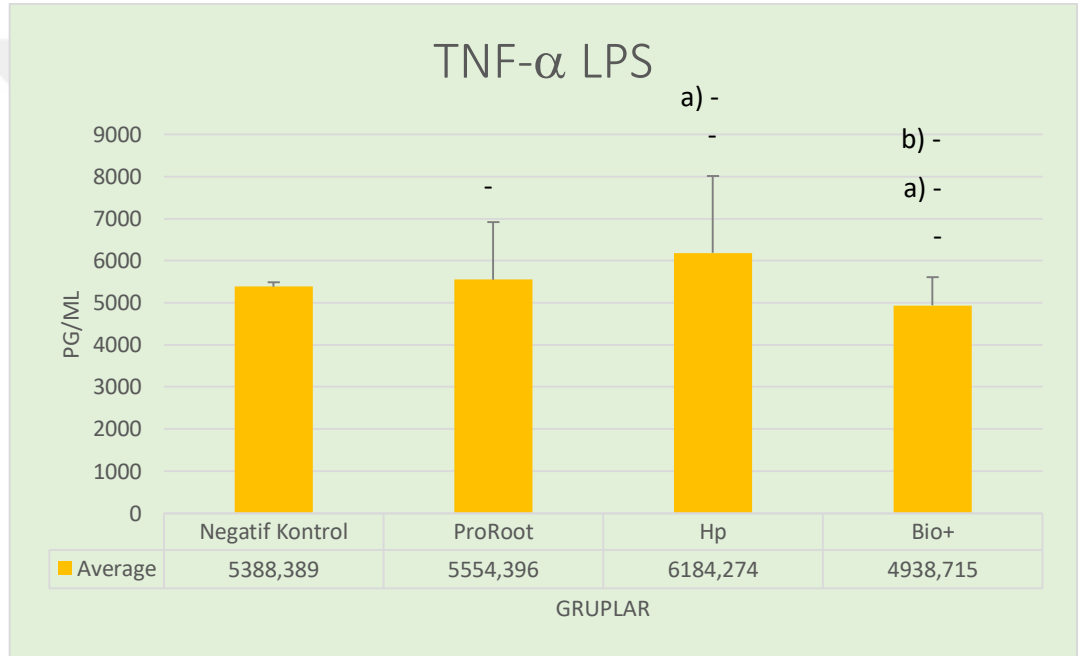


Grafik 16: LPS ile muamele edilmiş hücrelerin yer aldığı gruplardan elde edilen IL-6 ELISA testi bulguları ve bu verilerin kontrol grubu ile karşılaştırılması a) Verilerin ProRoot MTA grubu ile karşılaştırılması b) Verilerin MTA Repair HP grubu ile karşılaştırılması (P<0,05:*, P<0,01:**, P<0,001:***, P<0,0001:****)

24 saat IL-6 ELISA verilerinin mukayese edilmesi sonucunda MTA Repair HP ile LPS Kontrol grupları dışında hiçbir grup arasında anlamlı bir farklılık bulunmadığı ortaya koyuldu.

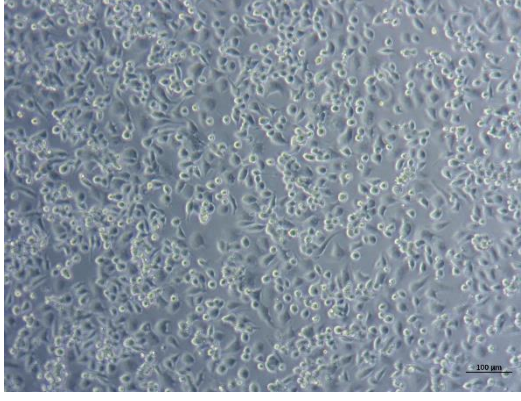
4.2.2.3. TNF- α Analizi

TNF- α tüm ELISA analizlerinde gözlenen salınımlardan oldukça yüksek oranda salındı. Tüm gruplar kontrol grubuna benzer yüksek değerler gösterdi. Bu durum, TNF- α salınım miktarının ortamda siman bulunmasından bağımsız olarak arttığına işaret etmektedir. LPS ile işlem görmüş hücrelerin sergilediği TNF- α düzeyleri yüksekten düşüğe sırasıyla MTA Repair HP, ProRoot MTA, Kontrol Grubu ve Bio MTA+ şeklindedir. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktur. (Grafik 17).

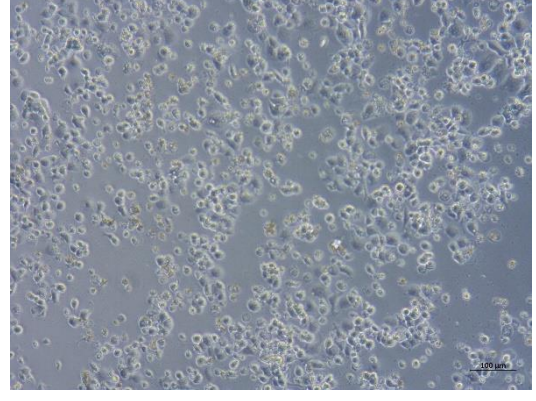


Grafik 17: LPS ile muamele edilmiş hücrelerin yer aldığı gruplardan elde edilen TNF- α ELISA testi bulguları ve bu verilerin kontrol grubu ile karşılaştırılması a) Verilerin ProRoot MTA grubu ile karşılaştırılması b) Verilerin MTA Repair HP grubu ile karşılaştırılması (P<0,05:*, P<0,01:**, P<0,001:***, P<0,0001:****)

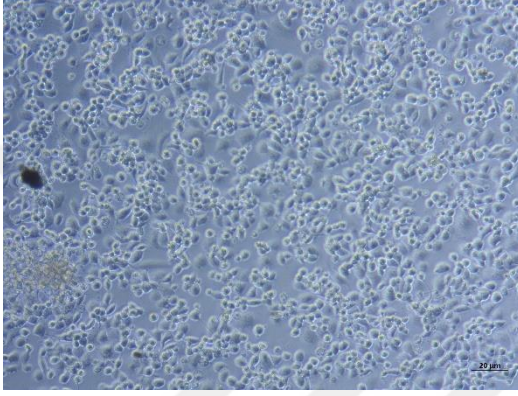
4.3. Ters Faz Mikroskobu Bulguları



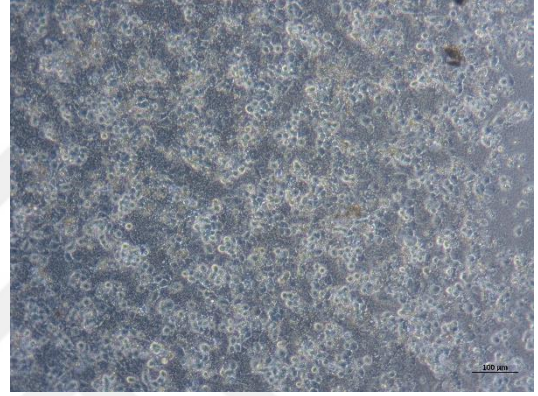
(a)



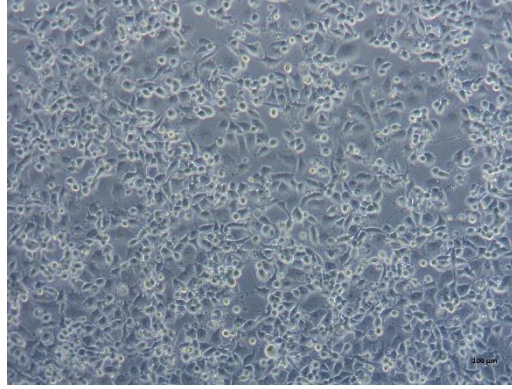
(b)



(c)



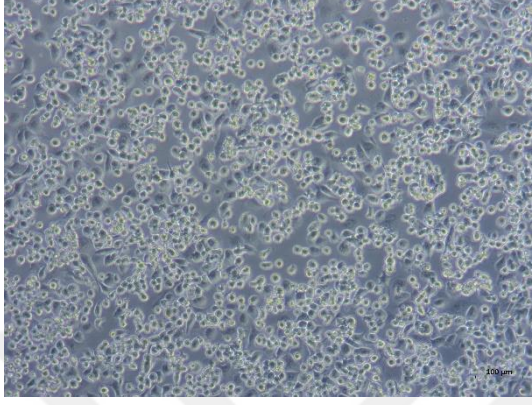
(d)



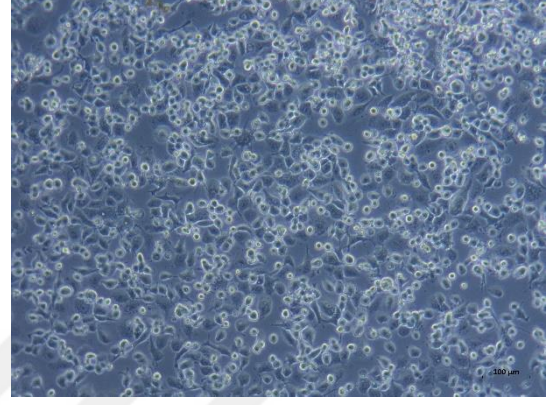
(e)

Şekil 4: LPS ile muamele görmüş THP-1 hücrelerinin siman bloklar ile inkübe edildikten sonra 10X büyütme ile ters faz mikroskoptaki görünüşleri (a) Kontrol Grubu, (b) ProRoot MTA, (c) MTA Repair HP, (d) Bio MTA+, (e) Pozitif Kontrol Grubu

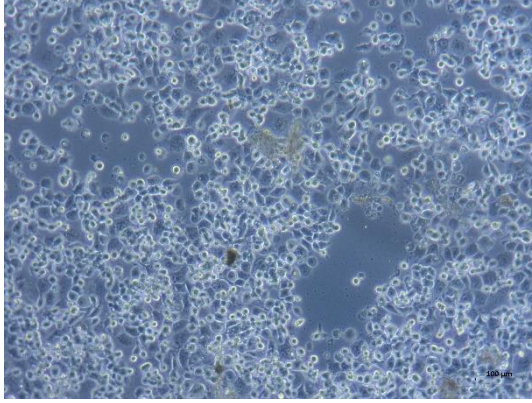
LPS ile indüklenmiş hücrelerin, simanlarla 24 saatlik inkübasyonu sonucunda elde edilen mikroskop görüntülerinde Bio MTA+'ın hücre tutulumunun azaldığı gözlenmiştir (Şekil 4).



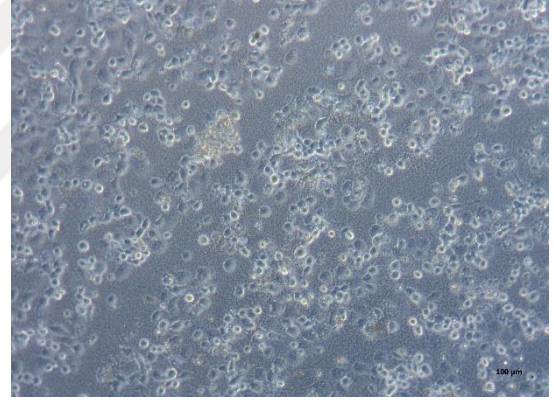
(a)



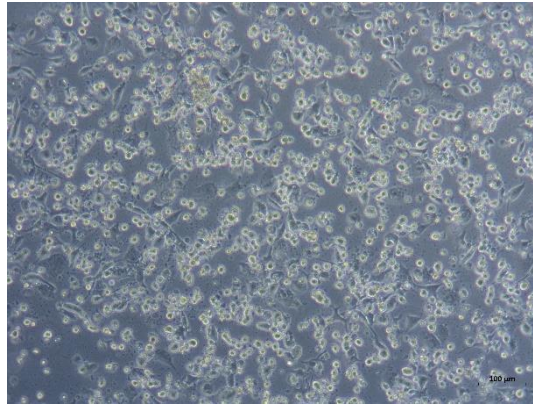
(b)



(c)



(d)

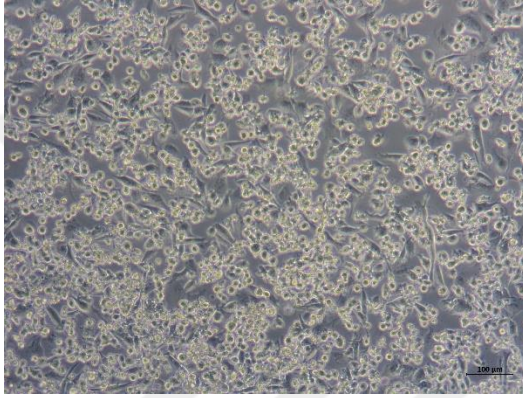


(e)

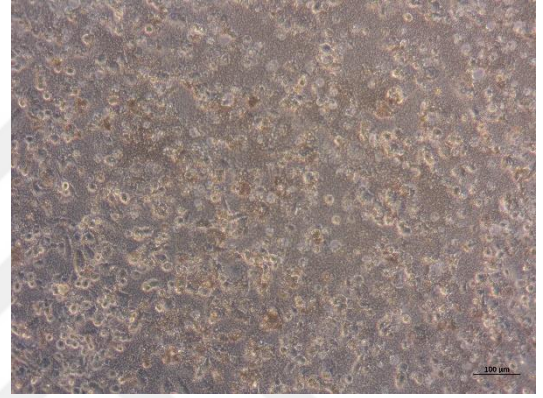
Şekil 5: PMA ile işlem görmüş THP-1 hücrelerinin siman bloklar ile 24 saat inkübe edildikten sonra 10X büyütme ile ters faz mikroskoptaki görünüşleri (a) Kontrol

Grubu, (b) ProRoot MTA, (c) MTA Repair HP, (d) Bio MTA+, (e) Pozitif Kontrol Grubu

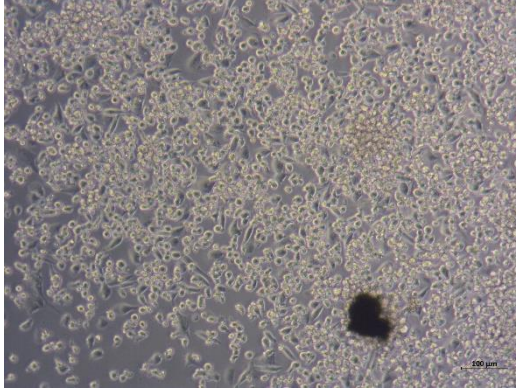
PMA ile farklılaştırılmış THP-1 hücrelerinin, simanlarla 24 saatlik inkübasyonu sonucunda elde edilen mikroskop görüntülerinde tüm gruplarda, makrofajların farklılaştığına işaret hücresel uzantılar görülmektedir (Şekil 5).



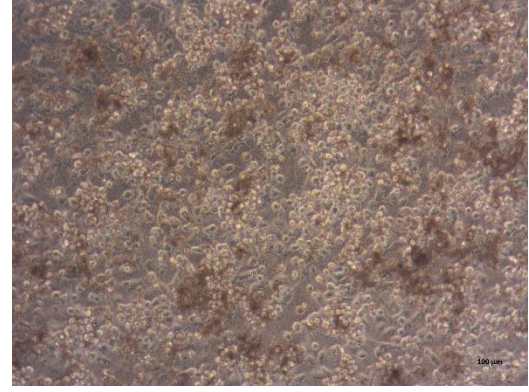
(a)



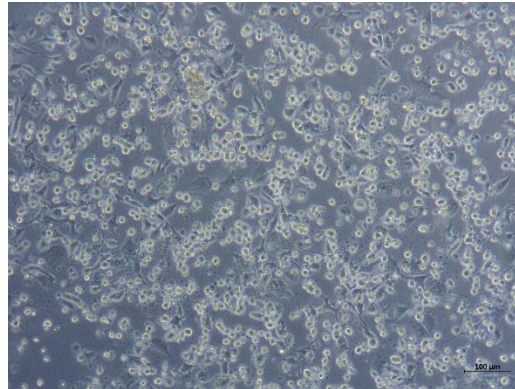
(b)



(c)



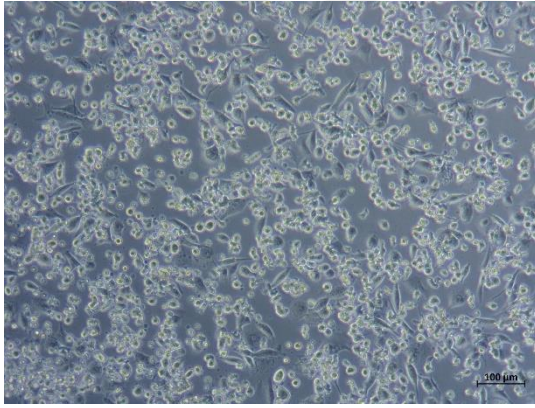
(d)



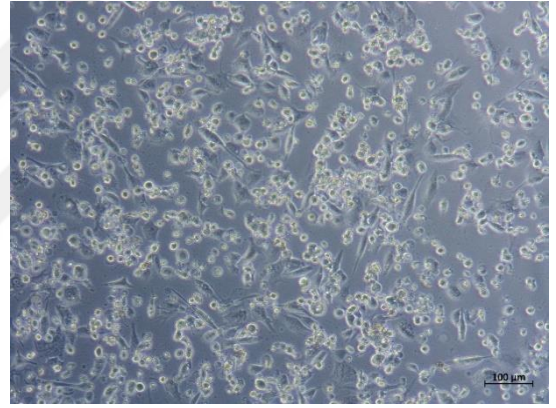
(e)

Şekil 6: PMA ile işlem görmüş THP-1 hücrelerinin siman bloklar ile 48 saat inkübe edildikten sonra 10X büyütme ile ters faz mikroskoptaki görüntüleri (a) Kontrol Grubu, (b) ProRoot MTA, (c) MTA Repair HP, (d) Bio MTA+, (e) Pozitif Kontrol Grubu

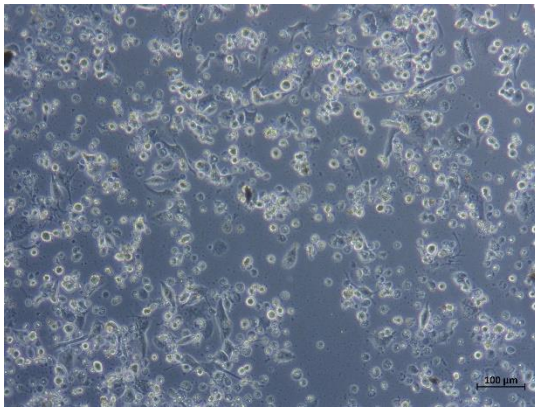
PMA ile farklılaştırılmış hücrelerin simanlar ile 48 saatlik inkübasyon süresi sonundaki görüntülerinde, siman gruplarında ve pozitif kontrol grubunda tutunan hücre sayısının azaldığı görülmektedir (Şekil 6).



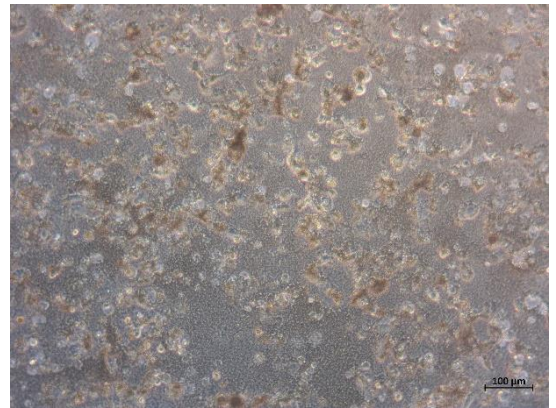
(a)



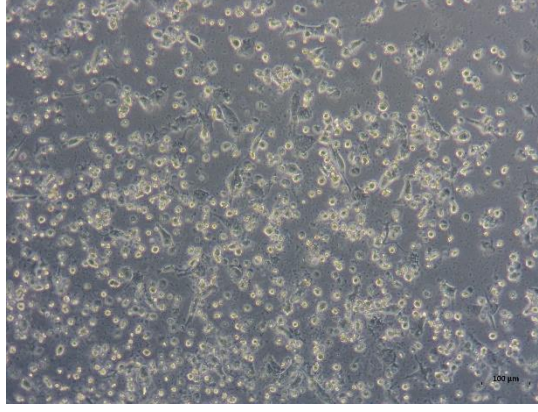
(b)



(c)



(d)



(e)

Şekil 7: PMA ile işlem görmüş THP-1 hücrelerinin siman bloklar ile 72 saat inkübe edildikten sonra 10X büyütme ile ters faz mikroskoptaki görünüşleri (a) Kontrol Grubu, (b) ProRoot MTA, (c) MTA Repair HP, (d) Bio MTA+, (e) Pozitif Kontrol Grubu

PMA ile farklılaştırılmış hücrelerin simanlar ile 48 saatlik inkübasyon süresi sonundaki görüntüleri incelendiğinde, pozitif kontrol grubunda hücre tutulumundaki azalma belirgin olarak görülmektedir.

5. Tartışma

Canlı doku ile direkt temasta olan materyallerin biyouyumlu olması ve immün reaksiyonu yönlendirmesi tedavinin başarısını doğrudan etkiler. MTA simanları da uygulandığı bölgeye bağlı olarak pulpa dokusu veya periapikal doku ile direkt temas içindedir. Temas bölgesinde hücreler ve biyomateryal arasında çeşitli reaksiyonlar meydana gelmektedir. Pulpal enflamatuvar süreçte, iritan uyarıcıyı ortadan kaldırmak için bir dizi immünokompetan hücrenin bölgeye çekildiği bilinmektedir. Makrofajlar, yabancı cisimlerle temasa geçen ve enflamatuvar sürecin patogenezinde rol oynayan ana hücreler arasındadır (Unanue, 1978; van Furth ve ark., 1972). Enflamasyon sürecinde patojene özgü reseptörlerin aktive olması IL-1 β , IL-6 ve TNF- α salınımını uyarmaktadır (Neiva ve ark., 2014). Endodontik enflamasyon sebebiyle oluşan klinik semptomlar ve radyografik bulguların çeşitli proenflamatuvar sitokinler ile ilişkisinin değerlendirildiği bir çalışmada, IL-6 ve TNF- α apikal lezyon ve eksuda mevcudiyeti ile ilişkili bulunmuştur (Martinho ve ark., 2012). IL-1 β ve TNF- α enflamasyon sırasında iş birliği içinde hareket etmektedir (Martinho ve ark., 2010) ve bu iki sitokin IL-6 ile birlikte osteoklast farklılaşmasında rol oynamaktadır (Ragab ve ark., 2002; Steeve ve ark., 2004). Bu verilerden yola çıkarak endodontik kökenli periradiküler enflamasyonun, IL-1 β , IL-6, TNF- α gibi proenflamatuvar mediatörler ile karakterize olduğu söylenebilir. Bu sebeple MTA simanlarının immünosimülatif etkilerinin ve sitotoksitelerinin bilinmesi önemlidir.

ProRoot çalışmamızda yer alan diğer simanlara kıyasla daha uzun süredir kullanımda olan ve sıklıkla tercih edilen bir materyaldir. Özellikleri *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda incelenmiştir; ancak HP ve Bio+'ın THP-1 monosit hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi ve proenflamatuvar sitokin oluşturma düzeyleri araştırılmamıştır. Bu sebeple tez çalışmamızda, üç farklı Mineral Trioksit Agregat simanının (ProRoot, HP ve Bio+) proenflamatuvar sitokin düzeyleri üzerindeki etkisi ve sitotoksiteleri *in vitro* olarak değerlendirilmiştir.

Bir materyalin sitotoksitesi değerlendirileceği zaman hangi yöntemin kullanılacağına, malzemenin kimyasal yapısı dikkate alınarak karar verilmelidir. MTA iyonik bileşenler açığa çıkarması muhtemel hidrofilik bir madde olduğundan, hücre geçirgenliğini etkilemeyen bir test tercih edilmesi gerekliliği söz konusudur (Schweikl & Schmalz, 1996). Bu nedenle bu çalışmada mitokondri dehidrojenaz aktivitesini ölçmek için MTT testinden faydalanılmıştır.

Çalışmada kullanılan MTA'ların kullanım kılavuzları incelendiğinde ProRoot'un 3 saatte, Bio+'ın 2 saatte tamamen sertleştiği, HP'nin ise 15 dk içinde sertleşmeye başladığı şeklinde ifadeler ile karşılaşılmıştır. En uzun donma süresine sahip ProRoot MTA'nın kullanıldığı geçmiş çalışmalarda olduğu gibi MTA'lar hücreler ile inkübe edilmeden 24 saat önce hazırlanıp nemli otoklavda bekletildi (Chang ve ark., 2014; Chung ve ark., 2019; Deller-Quinn & Perinpanayagam, 2009) .

Yapılan önceki çalışmalarda MTA simanlarının dental pulpa hücreleri, apikal papilla hücreleri veya insan mezenkim hücreleri üzerinde gonotoksik veya sitotoksik olmadığı rapor edilmiştir (Agrafioti ve ark., 2016; Bortoluzzi ve ark., 2015; De-Deus ve ark., 2009; Rechenberg, Galicia, & Peters, 2016). Mevcut çalışmanın ilk aşamasında iki yeni biyomateryalin ProRoot ile kıyaslanarak, THP-1 hücrelerinin canlılığı üzerinde oluşturdıkları etki araştırılmıştır. ProRoot'un makrofaj hücreleri üzerindeki etkisini araştıran çalışmalar, materyalin oldukça yüksek canlılık değerleri sergilediğini göstermiştir. (Haglund ve ark., 2003; Rezende ve ark., 2005). Mevcut çalışmada 72. saatte ProRoot'tan elde ettiğimiz veriler (%95.78) Rezende (%97<; fare periton makrofaj hücreleri) ve Haglund'un (%81,46; fare makrofaj hücre hattı RAW 264.7) canlılık verileri ile benzerdir. Hücre kültür ortamında yapılan güncel bir çalışmada 7.4 pH'da ProRoot ve HP'nin insan periyodontal ligament kök hücreleri (hPLSCs) üzerindeki sitotoksitesileri değerlendirilmiştir (Collado-González ve ark., 2019). 72 saatin sonunda ProRoot'un HP'den daha yüksek canlılık değerleri ortaya koyduğu bildirilmiştir. Çalışmamızda elde edilen veriler bu çalışmayı desteklemektedir. Çalışmamızda ProRoot hem zaman içinde azalan sitotoksitesite değerleri sergileyerek, hem de en yüksek sitotoksitesite değerini gösterdiği 24.saatte dahi hücre canlılığını olumsuz etkilemeyerek, makrofaj hücrelerine karşı üstün biyoyumluluk göstermiştir. Materyalların kimyasal içerikleri hücrelerin yaşam mücadelesi üzerinde olumlu ya da olumsuz şekilde etki gösterebilir. Çalışmalar, dental materyallerde Zn gibi bazı iyonların sitotoksik etki gösterdiğini ortaya koymuştur (Lee, Lee, Kim, & Kim, 2016). Strontiyum (Sr), alüminyum (Al) ve sülfür (S) iyonları da HP'nin sitotoksitesitesi ile ilişkilendirilmiştir (C. J. Tomás-Catalá ve ark., 2017). Başka bir çalışma wolfram (W) ve Al'u istenmeyen iyonlar olarak nitelendirmiş, dişte renk değişikliği ve toksiteye yol açabileceklerini bildirmiştir (Jiménez-Sánchez ve ark., 2019). İçeriğinde bu iyonları barındırmaması ya da düşük miktarda barındırması ise materyalin (ProRoot/Bio+) biyoyumluluğu ile ilişkilendirilebilir. Mevcut çalışmada HP'nin sitotoksitesitesi zaman

içinde artan bir grafik çizmiştir. 72. saatte pozitif kontrol grubundan daha yüksek canlılık değeri göstermesine rağmen, siman grupları ile kıyaslandığında en düşük değeri göstermiştir. Çalışmamızda elde edilen veriler yukarıdaki çalışmalar ile uyumludur.

Bio+ tozunun X-ışını kırınım analizi fazları incelendiğinde minerolojik yapısının esas olarak trikalsiyum silikat, dikalsiyum silikat ve bizmut oksitten oluştuğu bildirmiştir (Voicu ve ark., 2019). Bizmut oksit dental materyallerin sahip olması gereken temel özelliklerden biri olan radyoopasitenin sağlanması için gereklidir (Grazziotin-Soares ve ark., 2014). HP'ye radyoopak özelliğini ProRoot ve Bio+'tan farklı olarak toz kısmına ilave edilen kalsiyum tungstat vermektedir. Kanal patlarında radyoopak özellik veren bileşenin değiştirilmesi ile materyalin biyolojik özelliklerinde de değişiklik meydana geldiği bildirilmiştir (Gandolfi ve ark., 2010; Hungaro Duarte ve ark., 2012). ProRoot ve Bio+'ın radyoopasitesinden sorumlu bizmut oksitin, dişte renklenme meydana getirmesi (Marciano ve ark., 2014) ve hücre proliferasyonunu olumsuz etkilemesinin yanı sıra Portland simanına ilave edilmesinin insan pulpa hücreleri üzerinde erken dönemde sitotoksiteye sebep olduğu bildirilmiştir (Min ve ark., 2007). Portland simanına eklenen kalsiyum tungstat ise sitotoksik etki göstermemiştir (Gomes Cornélio ve ark., 2011). Çalışma verilerimiz sitotoksitenin doğrudan ve sadece radyoopak özellik veren bileşen ile ilgili olmadığını desteklemektedir. Çünkü bizmut oksit içeren Bio+ ve ProRoot, kalsiyum tungstat içeren HP'den daha düşük sitotoksik özellik göstermiştir. Özellikle Bio+ ile ilgili oldukça az veri olması materyali değerlendirmemizi zorlaştırmıştır. İçeriklerinin ve içerdikleri bileşenlerin materyalin özellikleri üzerindeki etkisinin daha iyi anlaşılması için HP ve Bio+ ile ilgili ilave çalışmalara ihtiyaç vardır.

Çalışmamızda yer alan bütün simanlar trikalsiyum silikat içeriklidir. HP Portland simanlarından farklı olarak, kalsiyum tungstat, kalsiyum oksit ve plastikleştirici gibi materyalin performansını geliştirecek bileşenler içermektedir. HP'nin diğer simanlar ile arasındaki farklardan biri olan plastikleştirici bileşenin özelliği bilinmesine rağmen, içeriği henüz üretici tarafından açıklanmamıştır. Bu bileşenin materyalin biyolojik özelliklerini nasıl etkilediği de henüz tam olarak bilinmemektedir. Bir tamir materyali olan Biodentine de, tozuna ilave edilmek üzere polimer ve polikarboksilattan oluşan bir plastikleştirici sıvı içermektedir (C. J. Tomás-Catalá ve ark., 2018). Bu ajanın materyalin biyoyumluluğunu etkilemediği yönünde bulgular rapor edilmiştir (Mori

ve ark., 2014). Silikat simanların biyouyumluluğunu ve biyomineralizasyon kapasiteleri üzerinde zamanın etkisini değerlendiren bir çalışmada, HP'nin ProRoot ve Angelus MTA ile benzer veriler sunduğu ve dolayısı ile materyalin sıvı kısmının, biyouyumluluğu üzerinde olumsuz bir etkisi olmadığı bildirilmiştir. Bu bulgular doğrultusunda manipülasyonun daha kolay olması sebebiyle diğer iki simana güvenli bir alternatif olabileceği ileri sürülmüştür (Benetti ve ark., 2018). Çalışmamızda IL-1 β analizinde HP, makrofaj hücrelerinin sitokin salınımını en az uyaran siman grubu olmuştur. Buna rağmen kontrol grubu ile kıyaslandığında 48 ve 72. saatlerde istatistiksel olarak anlamlı oranda sitokin salınımını artırdığı görülmektedir. Test materyallerinin ortamda bulunması, değerlendirilen bir diğer proenflamatuvar sitokin olan IL-6'nın salınımını etkilememiştir. TNF- α mediatörü ise HP'nin mevcudiyetinde 48. saatte belirgin bir artış gösterse de 72. saatte, tüm simanlardan daha düşük miktarda salınmıştır. HP'nin likit kısmı ile ilgili bilinmezlikleri ortadan kaldırmak, içeriği ve özelliklerini değerlendirmek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

Çalışmamızda kullanılan simanlardan biri olan HP'nin oldukça kısa bir zaman içinde sertleşmeye başlaması dikkat çekici bir özelliğidir. Bu MTA'nın donma süresinin ProRoot, MTA Vitalcem, da dâhil olmak üzere birçok biyomateryalden kısa olduğu bilinmektedir (Guimarães ve ark., 2018; Jiménez-Sánchez ve ark., 2019). HP'nin ProRoot'tan çok daha kısa sürede donmaya başlaması ProRoot'un yapısında bulunan kalsiyum sülfat dehidrat ile ilişkilendirilmiştir. Çünkü sülfat, tozun sıvı ile karışmasını geciktirdiği için sülfat içeriğinin düşük olması donma süresini kısaltmaktadır (Jiménez-Sánchez ve ark., 2019). Özellikle endodontik cerrahi uygulamalarında uzun donma süresine sahip olan simanların çözünme eğilimlerinin daha fazla olduğu bildirilmiştir (Gandolfi ve ark., 2011). Fakat yaklaşık 15 dakikada donmaya başladığı iddia edilen HP'nin fiziksel ve kimyasal özelliklerinin değerlendirildiği bir çalışmada, çözünürlük değerinin ISO standartlarının önerdiği değerden (%3) daha yüksek (%8) olduğu bildirilmiştir. Araştırmacılar yüksek çözünürlüğün, materyale plastik özellik katan, likit kısımda bulunan bileşenden kaynaklanıyor olabileceğini ileri sürmüşlerdir (Guimarães ve ark., 2018). Hipotezimizden farklı olarak HP'nin, PMA ile farklılaştırılan THP-1 hücrelerinin proenflamatuvar sitokin salınımını ProRoot ve Bio+'dan daha az uyardığı sonucuna varılmıştır.

Bio+ ile ilgili yapılan bir çalışmada araştırmacılar materyalin biyoaktivitesini, yüzey ve mikroyapısal özelliklerini ThereCal ile kıyaslayarak araştırmıştır. Bio+ rezin

içermediğinden, mineral agregat boyutlarının farklılık gösterdiği ve daha az dağıldıkları tespit edilmiştir. Bu da yüzey pürüzlülüğünün artmasına sebep olmuştur (Voicu ve ark., 2019). Önemli bir özellik olan yüzey pürüzlülüğü sadece yüzey dokusunu değil, aynı zamanda ideal düz bir yüzeyden vertikal sapmaları da yansıtmaktadır (Aksel ve ark., 2019). Biyolojik ortamla temas halinde olduğunda daha pürüzlü bir yüzey hücresel bağlanma, proliferasyon ve büyümeyi teşvik ederek daha uygun bir biyolojik tepkiye sebep olacak, dolayısıyla biyouyumluluğu arttıracaktır (Collado-González ve ark., 2017; Shi ve ark., 2012). Fakat diğer bir yandan, bakteriyel enfeksiyonun önlenmesi bakımından pörozitenin az olması istenmektedir (Bioçanın ve ark., 2018). Bununla birlikte, aşırı yüzey pürüzlülüğü, malzemelerin mukavemetini ve sızdırmazlık özelliklerini olumsuz etkileyebilir (Smith ve ark., 2007). Materyallerin yapısal ve yüzey özelliklerinin kök kanalının üç boyutlu doldurulması üzerindeki etkisini araştıran bir çalışma Bio+, Fuji X ve Biodentine'in pörozitelerini de değerlendirmiştir. Cıva intrüzyon pörozimetresi ve mikro CT görüntüleme tekniği ile yapılan değerlendirmede Bio+ ve Biodentine'in, Fuji IX'e göre daha düşük pörozite değerleri ortaya koyduğu rapor edilmiştir (Bioçanın ve ark., 2018). Başka bir çalışmada TheraCal'in muhtemelen Ca iyonlarının solüsyona daha yavaş diffüze olması sebebiyle Bio+'tan daha pürüzsüz bir yüzey yapısına sahip olduğu bildirilmiştir (Voicu ve ark., 2019). Tez çalışmamızda kullanılan MTA'ların pörozitelerini kıyaslayan bir çalışma bulunmamaktadır. IL-1 β analizi Bio+ grubunda 48 ve 72. saat verilerinin, TNF- α bulguları ise 24.saat verilerinin Kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı oranda yüksek olduğunu göstermiştir. Ayrıca bu iki mediatörden elde edilen veriler göz önünde bulundurulduğunda, Bio+'ın kıyaslandığı diğer iki MTA'ya göre de 72.saatte proenflamatuvar sitokin salınımını belirgin oranda arttırdığı görülmektedir.

Yapılan bir çalışmada Biodentine ve ProRoot'un benzer dentin köprüsü oluşturma kabiliyetinde oldukları ve vital pulpa tedavisi (kuafajı) sonrasında ikisinin de enflamatuvar pulpal yanıtı sebep olmadıkları bildirilmiştir (Nowicka ve ark., 2013). Benetti ve arkadaşları (2018) yaptıkları çalışmada 90 günlük periyotta rat denekler üzerinde MTA'ların biyomineralizasyon yetenekleri ile yara iyileştirme kapasitelerini değerlendirmiştir. Bu çalışmada HP, ProRoot ve Angelus MTA örnekleri tüplerin içerisinde ratların subkütan dokularına yerleştirilmiştir. Daha önce yapılan subkütan implantasyon çalışmalarının bulguları klinik çalışmalardan elde edilen veriler ile

doğru orantılı bulunmuştur. Bu yöntemin sunduğu verilerin klinik olarak anlamlı olduğu bilinmektedir (Arikan ve ark.,2016; Katge & Patil, 2017; Sumer ve ark., 2006). Çalışmada tüplerin etrafında oluşan fibröz kapsülün kalınlığı incelenerek enflamasyon ile ilgili bilgiler edilmiştir (Quinlan ve ark., 2002). Tüpler yerleştirildikten sonraki 7 ve 15. günlerde baskın olarak makrofajlar veya polimorfonükleer hücreler gözlenirken, daha geç zaman dilimlerinde (30, 60 ve 90. günlerde) erken dönemde gözlenen hücrelerin azaldığı ve az miktarda mononükleer hücrelerin izlendiği bildirilmiştir. Araştırmacılar MTA kökenli materyallerin özelliklerinin iyileştirilmesi amacıyla üretilen HP'nin klinik olarak sıklıkla kullanılan diğer iki materyal ile benzer biyouyumluluk ve biyomineralizasyon sergilemesini, bu iki simana alternatif olabileceği yönünde yorumlamıştır. Çalışmamızda HP tüm saatlerde IL-1 β salınımını ProRoot'tan daha az uyarmıştır. Ayrıca TNF- α verileri, HP'nin hiçbir saat diliminde Kontrol grubuna kıyasla anlamlı sitokin artışı göstermezken ProRoot'un 72. saatte ilgili sitokin salınımını tüm gruplardan fazla uyardığını ortaya koymuştur.

TNF- α proteininin enflamatuvar hücreler ve fibroblastlardaki kemotaksiyi devam ettirmedeki rolü literatürde vurgulanmaktadır (Birkedal-Hansen, 1993; Goetze ve ark., 1999). Silva ve arkadaşları ve Omidi ve arkadaşları, Angelus MTA, Biodentine ve negatif kontrol grubu arasında TNF- α üretiminde anlamlı bir fark olmadığını bildirmişlerdir (Omidi ve ark., 2020; Silva ve ark., 2016). Bu veriler çalışmamızda HP grubunun verileri ile örtüşmektedir. Fakat ProRoot grubunda 72. saatte (**p<0,01), Bio+ (*p<0,05) grubunda ise 24. saatte sitokin salınımında kontrol grubu ile kıyasla anlamlı oranda artış meydana geldiği için bu iki grup ile veriler örtüşmemektedir.

ProRoot, HP ve Bio+'ın LPS ile muamele edilmiş THP-1 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri ve hücrelerin bu materyaller ile karşılaştığı zaman saldıgı sitokin miktarını araştırmış bir çalışma bulunmamaktadır. Materyallerin makrofajlar üzerindeki sitotoksik ve proenflamatuvar etkisi araştırılırken enfeksiyon mevcudiyetinde salınan LPS üzerinde etkisini de değerlendirebilmek amacıyla analizlere LPS ile muamele edilmiş hücreler de dahil edilmiştir.

Ortamin pH değerinin değişmesi materyalin bazı özelliklerinin değişiklik göstermesine sebep olabilir. Yapılan bir çalışmada asidik pH'nın donma reaksiyonunu bozduğunu ve materyalin çözünmesine sebep olduğu bildirilmiştir (Shie ve ark., 2009). Chung ve arkadaşları (2019) dental materyal içermeyen LPS ile muamele edilmiş ve edilememiş hücrelerden oluşan grupların karşılaştırılması sonucu LPS

uygulamasının dental pulpa kök hücrelerinin canlılığını belirgin oranda düşürdüğünü ortaya çıkarmışlardır.

Çalışmamızın *in vitro* olarak tasarlanması bazı kısıtlamalara sebep olmuştur. Örneğin siman bloklar 24 saatlik sertleşme periyodunun ardından hücreler ile inkübe edilmek üzere solüsyonlara yerleştirilmiştir. Bu deney düzeneği ağız ortamını tam olarak taklit etmemektedir. Çünkü klinik uygulama sırasında MTA karıştırıldıktan hemen sonra endikasyon bölgesine yerleştirilmekte ve donma reaksiyonunu oral sıvılar ile temas içinde iken tamamlamaktadır. Donma reaksiyonunun ağız içinde tamamlanması materyalin daha az veya daha fazla çözünmesine ve dolayısıyla daha farklı bir enflamatuvar reaksiyon oluşturmaya sebep olabilir.

ProRoot ve HP'nin asidik ve normal ortama maruz bırakıldıktan sonra insan periodontal ligament kök hücreleri üzerindeki biyolojik etkilerini karşılaştıran güncel bir çalışma, iki materyalin de her iki ortamda kabul edilebilir oranda hücre ölümüne sebep olduğuna ve hücre bağlanmasına/birikimine izin verdiğini ortaya koymuştur (Collado-González ve ark., 2019). Çalışmamızda sadece PMA ile farklılaştırılmış hücrelerden elde edilen ProRoot 24. saat verileri ve LPS ProRoot sitotoksikite verileri bu çalışmayı destekler nitelikte benzerlik göstermektedir. Fakat HP grubu için sadece PMA ile farklılaştırılmış hücrelerin 24. saat verileri ile LPS ile işlem görmüş hücrelerin verileri arasında anlamlı farklılık gözlenmektedir. Hatta LPS ile işlem görmüş hücreler üzerinde HP orta derecede sitotoksik etki göstermiştir.

Materyaller asidik ortama maruz bırakıldıklarında yüzey pürüzlülükleri ve morfolojileri farklı oranlarda değişiklik gösterebilmektedir. HP'nin yapısında belirgin bir farklılık izlenmezken, asidik ortama maruz bırakıldığında ProRoot'un yüzeyinde prizmatik kristal yapılar oluştuğu bildirilmiştir (Collado-González ve ark., 2019). Bu uzantılar, hücrelerin materyalin üzerine kolonize olabileceği alanlar oluşturmaktadır. Buna rağmen yapılan bir diğer çalışmada, asidik ortamda yüzey özellikleri benzer biçimde değişiklik göstermesine rağmen iRoot BP Plus'ın aksine ProRoot'un, MC3T3-E1 hücreleri üzerinde sitotoksik etki gösterdiği bildirilmiştir (Tian ve ark., 2017). Bio+'ın asidik ortamda yüzey özelliklerinin nasıl etkilendiğini ile ilgili veri bulunmamaktadır. Çalışmamızda ProRoot ve HP'nin, LPS ile muamele edilmiş hücrelerden elde edilen canlılık değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir.

Yapılan bir çalışmada ProRoot ve Biodentine'in yüzey pürüzlülüğünün incelendiği bir çalışmada nemli ortamda 1.günde ProRoot'ta uzun sürede sertleşmesine bağlı olarak çözünme meydana geldiği ve pürüzlülüğünün azaldığı gözlenirken, kuru ortamda pürüzlülüğünün 3. güne kadar sabit olduğu 28. günden itibaren belirgin oranda azaldığı bildirilmiştir. Her iki malzemenin de ıslak koşullarda artan yüzey pürüzlülüğü eğiliminde olduğu bulunmuştur. Materyalin 3. gün donma reaksiyonunu tamamladığında fazla su, biyomateryallerin çözünmesini uzatarak kalan malzemenin daha gözenekli bir dış yüzeye sahip olmasına sebep olabilir. Bu, fizyolojik çözelti içinde depolandıktan sonra malzemelerin yüzeyi üzerinde küresel birikintilerin birikmesi ile ilişkili olabilir (Camilleri ve ark., 2014). Smith ve arkadaşları, asidik ortamın materyaller üzerindeki etkisini araştırmak amacıyla EDTA'ya (pH 7.4) ve Biopure MTAD'a (Mixture of Tetracycline isomer, Acid, Detergent) (pH 2) maruz bırakıldıktan sonra ProRoot'un yüzey özelliklerini incelemiştir. Biopure MTAD'a tabi tutulmuş örneklerde yüzey pürüzlülüğünde artış ve daha yüksek kalsiyum salınımı bildirilmiştir. Bununla birlikte, asidik pH malzemelerin yüzey pürüzlülüğünü etkilememiştir (Smith ve ark., 2007).

LPS ile işlem görmüş hücrelerin yer aldığı sitotoksikite verileri yüksekten düşüğe Pozitif kontrol grubu (88,438 µg/ml), ProRoot, HP, Bio+ şeklinde sıralanmaktadır. ProRoot, Pozitif kontrol grubuna benzer şekilde yüksek canlılık değerleri sergilerken, HP LPS ile işlem görmüş makrofaj hücrelerinin canlılığını korumada orta derece başarılı olabilmıştır. Bio+ ise oldukça düşük bir değer sergileyerek karşılaştırılan üç siman arasında asidik ortamda en sitotoksik materyal olarak bulunmuştur.

Pozitif kontrol grubunun LPS ile işlem görmüş hücreler ile 24 saatlik inkübasyonundan elde edilen canlılık verileri incelendiğinde hücre canlılığını azaltmadığı gözlenmiştir. Makrofaj hücreleri üzerinde ise 48. saatten itibaren hücrelerin canlılığını azaltmaya başlamıştır. Pozitif kontrol grubu olarak çalışmamıza dâhil ettiğimiz bu grubun makrofaj hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisini değerlendirmek için 48. saatten uzun inkübasyon sürelerinde değerlendirilmesi gerekmektedir.

Biyoaktif simanlar kuafaj sırasında, tamir materyali olarak veya retrograd dolgu maddesi olarak kullanılabilirler. Retrograd dolgu maddesi olarak kullanıldıklarında çoğunlukla asidik pH'da olan periapikal doku ile direkt temas içinde olurlar (Tian ve ark., 2017). LPS, klinik endodontik semptomların oluşumunda aktif

olarak rol alan bir bakteriyel bileşendir (Hong ve ark., 2004). Makrofajların bakteriyel LPS'ye maruz bırakılması, proenflamatuvar sitokinlerin salınmasına sebep olmaktadır. Ayrıca LPS aktif bir makrofajın ayırt edici özelliklerinden olan nitrit üretiminin artmasına ve artmış bakterisidal/tümörisidal aktiviteye yol açan bir sinyal iletim kaskadının başlamasına sebep olmaktadır. Bu sinyal yolunun düzenlenmesi, yabancı organizmalara karşı bağışıklık tepkisinin başlangıç aşamalarının kontrol edilmesi bakımından kritik önem taşır (Meng & Lowell, 1997). Bu yüzden, sadece PMA ile farklılaştırılmış THP-1 hücrelerinin yanı sıra LPS ile muamele edilmiş makrofajların da proenflamatuvar sitokin salınımlarının değerlendirilmesi, farklı endikasyon alanlarında oluşabilecek olası biyolojik tepkilerin anlaşılması ile ilgili anlamlı veriler sunacaktır.

Makrofajlar LPS ile karşılaştıklarında güçlü enflamatuvar araçlar salmak suretiyle yanıt verirler (Abreu ve ark., 2003; Arndt ve ark., 2004). Bu sebeple LPS ile işlem görmüş hücrelerin yer aldığı gruplarda, sadece PMA ile farklılaştırılmış hücrelerin bulunduğu gruplara oranla ortamda siman bulunmasından bağımsız olarak oldukça yüksek sitokin değerleri gözlenmiştir. LPS, makrofajlar üzerindeki bu dikkat çekici uyarıcı etkisinden dolayı ELISA metodunun kontrolünü sağlamak amacıyla (pozitif kontrol grubu olarak) da kullanılmaktadır (Haglund ve ark., 2003). LPS ile işlem görmüş hücrelerin pozitif kontrol grubu olarak kullanıldığı bir ELISA analizinde, hücrelerin LPS ile 24 saatlik inkübasyonunun IL-1 β ve IL-6 üretiminin başlaması için yeterli olduğu gösterilmiştir (Haglund ve ark., 2003). Çalışmamızda da, makrofaj hücrelerinin sitokin salınımını inceleyen geçmiş çalışmalarda olduğu gibi dental materyaller, hücreler ile 24 saat kültürlenmiştir (Lichtman ve ark., 1998; Patel ve ark., 1999; Scott ve ark., 1999).

Yapılan bir çalışmada LPS ile muamele edilmiş THP-1 hücrelerinin, kanal patına maruz bırakıldıktan sonra sitokin salınımının belirgin oranda baskılandığı gözlenmiştir (Brackett ve ark., 2009). LPS ile işlem görmüş THP-1 hücrelerinin çalışmada yer alan MTA'lar üzerinde sitokin salınımını nasıl etkilediğini araştıran bir çalışma bulunmamaktadır. Fakat geçmiş çalışmalar, insan dental pulpa kök hücrelerinin (hDPSCs) LPS ile işlem gördükleri zaman IL-8 ve IL-6 üretimini uyardıklarını göstermiştir (Nagaoka ve ark., 1996; Tokuda, 2001). Başka bir çalışmada ProRoot'un aynı hücrelerin IL-1 β salınımını arttırdığı belirtilmiştir (Lai ve ark., 2014). LPS ile işlem görmüş hücrelerin proenflamatuvar etkilerini araştıran bir çalışmada ProRoot ve

Endocem MTA'nın sitokin düzeylerini düşürdüğü bildirilmiştir (Kim ve ark., 2018). Buna rağmen güncel bir çalışma ProRoot ve Biodentine'in aynı hücreler üzerinde IL-6 ve IL-8 salınımı üzerinde bir etkisi olmadığını bildirmiştir (Chung ve ark., 2019). Çalışmamızda yukarıdaki çalışmalardan farklı olarak makrofaj hücreleri kullanılmıştır. Elde ettiğimiz veriler hiçbir grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmasa da IL-6 salınımının tüm simanlar tarafından baskılandığını göstermektedir (Kontrol: 505,878 pg/ml, ProRoot: 210,378 pg/ml, HP: 193,893 pg/ml, Bio+: 95,002 pg/ml). Dolayısıyla elde ettiğimiz veriler Kim ve arkadaşlarının verilerini desteklemektedir. (Kim ve ark., 2018).

Materyallerin kimyasal içerikleri biyolojik özelliklerini doğrudan etkilemektedir. Ca ve Si iyonu konsantrasyonlarının hücre bağlanması, çoğalması ve farklılaşması dahil olmak üzere hücre davranışında kritik öneme sahip olduğu bilinmektedir (Shie ve ark., 2012). Lai ve ekibi çalışmalarında içeriğine ve çözünürlüğüne bağlı olarak kalsiyum silikat simanlardan salınan Ca ve Si iyonu miktarının farklı olabileceğini tartışmışlardır (Lai vd., 2014). Ayrıca bu iyonların fazlası hücre apoptozunu indükleyebilir (Barry & Eastman, 1992; Shie ve ark., 2011). Si iyonu salınımı, enflamatuvar sitokinlerin üretimini indükleyerek hiperosmotikliğe neden olabilir (Chen ve ark., 2010). Bio+'ın ThereCal'a göre daha yavaş Ca iyon salınımı gerçekleştirdiği bildirilmiştir (Voicu ve ark., 2019). Tez çalışmamız, aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmasa da ortama Bio+ (2464,661 pg/ml) ilave edilmesinin Kontrol grubuna (1092,201 pg/ml) kıyasla IL-1 β salınımında artışa sebep olduğunu ortaya koymuştur. Fakat diğer yandan, TNF- α değerlerine bakıldığında kontrol grubundan (5388,389 pg/ml) daha düşük değer sergileyen tek grubun Bio+ (4938,715 pg/ml) olduğu gözlenmiştir. Benzer şekilde IL-6 salgısını da belirgin oranda baskılamıştır (Kontrol; 505,878 pg/ml, Bio+; 95,002 pg/ml). Mevcut çalışma ile karşılaştırılabilecek Bio+ ile ilgili yeterli araştırma olmaması değerlendirmeyi sınırlandırmıştır.

Çalışmamızda elde edilen bulgular LPS ile muamele edilmiş makrofajlar üzerinde ProRoot ve HP'nin IL-6 salınımını benzer oranda azalttığını, TNF- α salınımını ise benzer oranda artırdıklarını göstermiştir. Sitokin düzeyleri üzerinde yarattıkları değişikliklere rağmen çalışmamızda değerlendirilen MTA simanları 24 saatin sonunda

LPS ile işlem görmüş makrofaj hücrelerinin IL-1 β , IL-6 veya TNF- α üretimini istatistiksel olarak anlamlı oranda etkilememiştir.



6. Sonuç ve Öneriler

Tez çalışmasında elde ettiğimiz sonuçlar aşağıda gösterilmektedir.

- LPS mevcudiyeti proenflamatuvar sitokin salınımını belirgin biçimde uyardı.
- LPS ile işlem görmüş hücrelerin yer aldığı hiçbir grupta sitokin salınım miktarı istatistiksel olarak anlamlı oranda değişmedi.
- LPS ile muamele görmüş hücrelerin yer aldığı canlılık analizinde en yüksek canlılık değerleri sırasıyla ProRoot MTA, MTA Repair HP ve Bio MTA+ gruplarında bulundu.
- Makrofaj hücrelerinin sağ kalımı değerlendirildiğinde 72 saatin sonunda yüksekten düşüğe değerler sırasıyla ProRoot MTA, Bio MTA+, MTA Repair HP ve Pozitif kontrol gruplarında gözlemlendi.
- Makrofaj hücrelerinin IL-1 β salınımını en az uyaran MTA Repair HP oldu.
- Tüm gruplarda makrofajlar benzer oranda IL-6 salınımına sebep oldu.
- Makrofaj hücrelerinin 72. saatin sonunda TNF- α salınımını uyaran gruplar sırasıyla yüksekten düşüğe ProRoot MTA, Bio MTA+, MTA Repair HP ve Kontrol grubu olarak izlendi.

Bu çalışmanın sınırları dâhilinde MTA Repair HP ve BioMTA+'ın proenflamatuvar sitokin düzeyleri üzerindeki etkisinin, ProRoot MTA ile benzer olduğu şeklindeki hipotezimiz reddedildi.

Çalışmamız MTA Repair HP ve Bio MTA+'ın insan makrofaj hücreleri üzerindeki biyolojik etkilerinin değerlendirildiği ilk çalışmadır. Dolayısıyla ProRoot MTA, MTA Repair HP ve Bio MTA+'ın proenflamatuvar sitokin salınım düzeylerinin karşılaştırılması ve sitotoksitelerinin değerlendirilmesinin literatüre önemli katkı sağladığı kanaatindeyiz. MTA Repair HP, ProRoot MTA'dan düşük değerler sergilemesine rağmen hücre canlılığını olumsuz etkilememesi ve proenflamatuvar sitokinler üzerindeki etkinliği sebebiyle test edilen diğer simanlara kıyasla daha üstün bulunmuştur.

Donma süresinin oldukça kısa olduğu bilinen MTA Repair HP materyalinin, optimum düzeydeki biyoyumluluğu ve antienflamatuvar özelliği göz önünde bulundurulduğunda, klinik uygulamalarda avantaj sağlayacağını öngörmekteyiz.

Hücresel düzeyde elde edilen bu verilerin daha iyi anlaşılması için klinik çalışmalar ile desteklenmesi gerekmektedir.



7. Kaynaklar

- Abreu, M. T., Thomas, L. S., Arnold, E. T., Lukasek, K., Michelsen, K. S., & Arditi, M. (2003). TLR signaling at the intestinal epithelial interface. *Journal of Endotoxin Research*, 9(5), (s. 322–331).
- American Dental Association, Clinical practice guidelines handbook (2013 Update).
- Agrafioti, A., Taraslia, V., Chrepa, V., Lymperi, S., Panopoulos, P., Anastasiadou, E., & Kontakiotis, E. G. (2016). Interaction of dental pulp stem cells with biodentine and MTA after exposure to different environments. *Journal of Applied Oral Science*, 24(5), (s.481–486).
- Aguiar BA, Frota LMA, Taguatinga DT, et al. Influence of ultrasonic agitation on bond strength, marginal adaptation, and tooth discoloration provided by three coronary barrier endodontic materials. (2019). *Clinical Oral Investigations*, 23(11), (s.4113-4122).
- Aksel, H., Küçükkaya Eren, S., Askerbeyli Örs, S., & Karaismailoglu, E. (2019). Surface and vertical dimensional changes of mineral trioxide aggregate and biodentine in different environmental conditions. *Journal of Applied Oral Science*, 27, e20180093.
- Al-Hiyasat, A. S., Tayyar, M., & Darmani, H. (2010). Cytotoxicity evaluation of various resin based root canal sealers. *International Endodontic Journal*, 43(2), (s. 148–153).
- Amoroso-Silva, P. A., Marciano, M. A., Guimarães, B. M., Duarte, M. A. H., Sanson, A. F., & Moraes, I. G. (2014). Apical adaptation, sealing ability and push-out bond strength of five root-end filling materials. *Brazilian oral research*, 28(1), (s.1–6).
- Arikan, V., Sonmez, H., & Sari, S. (2016). Comparison of two base materials regarding their effect on root canal treatment success in primary molars with furcation lesions. 4 (s.447-453).
- Arndt, P. G., Suzuki, N., Avdi, N. J., Malcolm, K. C., & Worthen, G. S. (2004). Lipopolysaccharide-induced c-Jun NH2-terminal kinase activation in human neutrophils: Role of phosphatidylinositol 3-kinase and Syk-mediated pathways. *Journal of Biological Chemistry*, 279(12), (s.10883–10891).
- Artese, L., Piattelli, A., Quaranta, M., Colasante, A., & Musani, P. (1991). Immunoreactivity for interleukin 1 β and tumor necrosis factor- α and

- ultrastructural features of monocytes/macrophages in periapical granulomas. *Journal of Endodontics*, 17(10), (s.483–487).
- Asseffa, A., Dickson, L. A., Mohla, S., & Bremner, T. A. (1993). Phorbol myristate acetate-differentiated THP-1 cells display increased levels of MHC class I and class II mRNA and interferon-gamma-inducible tumoricidal activity. *Oncology Research*, 5(1), (s.11–18.)
- Aydin, S. (2015). A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides*, 72, 4–15.
- Barry, M. A., & Eastman, A. (1992). Endonuclease activation during apoptosis: The role of cytosolic Ca_2^+ and pH. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 186(2), (s.782–789).
- Benetti, F., Gomes-Filho, J. E., de Araújo Lopes, J. M., Barbosa, J. G., Jacinto, R. C., & Cintra, L. T. A. (2018). In vivo biocompatibility and biomineralization of calcium silicate cements. *European Journal of Oral Sciences*, 126(4), 326–333.
- Bergenholtz, G. (1990). Pathogenic mechanisms in pulpal disease. *Journal of Endodontics*, 16(2), (s.98–101).
- Biočanin, V., Antonijević, Đ., Poštić, S., Ilić, D., Vuković, Z., Milić, M., ... Đurić, M. (2018). Marginal gaps between 2 calcium silicate and glass ionomer cements and apical root dentin. *Journal of Endodontics*, 44(5), (s.816–821).
- Birkedal-Hansen, H. (1993). Role of cytokines and inflammatory mediators in tissue destruction. *Journal of Periodontal Research*, 28(6), (s.500–510).
- Bortoluzzi, E. A., Niu, L. N., Palani, C. D., El-Awady, A. R., Hammond, B. D., Pei, D. D., ... Tay, F. R. (2015). Cytotoxicity and osteogenic potential of silicate calcium cements as potential protective materials for pulpal revascularization. *Dental Materials*, 31(12), (s.1510–1522).
- Brackett, M. G., Lewis, J. B., Messer, R. L. W., Lei, L., Lockwood, P. E., & Wataha, J. C. (2011). Dysregulation of monocytic cytokine secretion by endodontic sealers. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 97B(1), (s.49–57).
- Brackett, M. G., Marshall, A., Lockwood, P. E., Lewis, J. B., Messer, R. L. W., Bouillaguet, S., & Wataha, J. C. (2009). Inflammatory suppression by endodontic sealers after aging 12 weeks in vitro. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*, 91(2), (s.839–844).

- Bruno, K. F., Silva, J. A., Silva, T. A., Batista, A. C., Alencar, A. H. G., & Estrela, C. (2010). Characterization of inflammatory cell infiltrate in human dental pulpitis. *International Endodontic Journal*, 43(11), (s.1013–1021).
- Brzovic, V., Miletic, I., Zeljezic, D., Mladinic, M., Kasuba, V., Ramic, S., & Anic, I. (2009). In vitro genotoxicity of root canal sealers. *International Endodontic Journal*, 42(3), (s.253–263).
- Camargo, C. H. R., Oliveira, T. R., Silva, G. O., Rabelo, S. B., Valera, M. C., & Cavalcanti, B. N. (2014). Setting time affects in vitro biological properties of root canal sealers. *Journal of Endodontics*, 40(4), (s.530–533).
- Camilleri, J., Grech, L., Galea, K., Keir, D., Fenech, M., Formosa, L., ... Mallia, B. (2014). Porosity and root dentine to material interface assessment of calcium silicate-based root-end filling materials. *Clinical Oral Investigations*, 18(5), (s.1437–1446).
- Carlberg, C., Ulven, S. M., Molnár, F., Carlberg, C., Ulven, S. M., & Molnár, F. (2016). Chronic inflammation and metabolic stress. *Nutrigenomics* içinde (s. 121–137). Springer, Heidelberg.
- Chang, S. W., Lee, S. Y., Kum, K. Y., & Kim, E. C. (2014). Effects of ProRoot MTA, bioaggregate, and micromega MTA on odontoblastic differentiation in human dental pulp cells. *Journal of Endodontics*, 40(1), (s.113–118).
- Chen, G. Y., & Nuñez, G. (2010). Sterile inflammation: Sensing and reacting to damage. *Nature Reviews Immunology*. 10, (s.826–837).
- Chung, M., Lee, S., Chen, D., Kim, U., Kim, Y., Kim, S., & Kim, E. (2019). Effects of different calcium silicate cements on the inflammatory response and odontogenic. *Materials*, 12(8), (s.1–13).
- Ciasca, M., Aminoshariae, A., Jin, G., Montagnese, T., & Mickel, A. (2012). A Comparison of the cytotoxicity and proinflammatory cytokine production of EndoSequence Root Repair Material and ProRoot Mineral Trioxide Aggregate in human osteoblast cell culture using reverse-transcriptase polymerase chain reaction. *Journal of Endodontics*, 38(4), (s.486–489).
- Cintra, L. T. A., Benetti, F., de Azevedo Queiroz, Í. O., de Araújo Lopes, J. M., Penha de Oliveira, S. H., Sivieri Araújo, G., & Gomes-Filho, J. E. (2017). Cytotoxicity, biocompatibility, and biomineralization of the new high-plasticity MTA material. *Journal of Endodontics*, 43(5), (s.774–778).

- Cintra, L. T. A., de Moraes, I. G., Estrada, B. P. F., Gomes-Filho, J. E., Bramante, C. M., Garcia, R. B., & Bernardinelli, N. (2006). Evaluation of the tissue response to MTA and MBPC: Microscopic analysis of implants in alveolar bone of rats. *Journal of Endodontics*, 32(6), (s.556–559).
- Cintra, L. T. A., Ribeiro, T. A. A., Gomes-Filho, J. E., Bernabé, P. F. E., Watanabe, S., Facundo, A. C. da S., ... Dezan-Junior, E. (2013). Biocompatibility and biomineralization assessment of a new root canal sealer and root-end filling material. *Dental Traumatology*, 29(2), (s.145–150).
- Clay, T. M., Hobeika, A. C., Mosca, P. J., Lyster, H. K., & Morse, M. A. (2001). Assays for monitoring cellular immune responses to active immunotherapy of cancer. *Clinical Cancer Research*, 7(5), (s.1127–1135).
- Collado-González, M., García-Bernal, D., Oñate-Sánchez, R. E., Ortolani-Seltenerich, P. S., Álvarez-Muro, T., Lozano, A., ... Rodríguez-Lozano, F. J. (2017). Cytotoxicity and bioactivity of various pulpotomy materials on stem cells from human exfoliated primary teeth. *International Endodontic Journal*, 50 (S2), (s.19–30).
- Collado-González, M., López-García, S., García-Bernal, D., Oñate-Sánchez, R. E., Tomás-Catalá, C. J., Moraleda, J. M., ... Rodríguez-Lozano, F. J. (2019). Biological effects of acid-eroded MTA Repair HP and ProRoot MTA on human periodontal ligament stem cells. *Clinical Oral Investigations*, 23(10), (s.3915–3924).
- Copray, J. C. V. M., Mantingh, I., Brouwer, N., Biber, K., Küst, B. M., Liem, R. S. B., ... Boddeke, H. W. G. M. (2001). Expression of interleukin-1 beta in rat dorsal root ganglia. *Journal of Neuroimmunology*, 118(2), (s.203–211).
- Çalışkan M. K., Öztop F., Çalışkan G. (2003). Histological evaluation of teeth with hyperplastic pulpitis caused by trauma or caries: case reports. *International Endodontic Journal*, 36(1), (s.64–70).
- Çalışkan M. K. (2006). *Endodontide Tanı ve Tedaviler*. İstanbul: Nobel Kitap Evi.
- Çalışkan M. K., Güneri P. (2017) Prognostic factors in direct pulp capping with mineral trioxide aggregate or calcium hydroxide: 2- to 6-year follow-up. *Clinical Oral Investigations*, 21(1), (s.357–367).
- De-Deus, G., Canabarro, A., Alves, G., Linhares, A., Senne, M. I., & Granjeiro, J. M. (2009). Optimal cytocompatibility of a bioceramic nanoparticulate cement in

- primary human mesenchymal cells. *Journal of Endodontics*, 35(10), (s.1387–1390).
- Degré, M. (1996). Cytokines and bacterial infections. *Biotherapy*, 8, s. 219–228.
- Deller-Quinn, M., & Perinpanayagam, H. (2009). Osteoblast expression of cytokines is altered on MTA surfaces. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, And Endodontics*, 108(2), (s.302–307).
- Diegelmann, R. F., & Evans, M. C. (2004). Wound healing: An overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Frontiers in Bioscience*, 9, (s.283–289).
- Dijkstra, C. D., Van Vliet, E., Döpp, E. A., van der Lelij, A. A., & Kraal, G. (1985). Marginal zone macrophages identified by a monoclonal antibody: characterization of immuno- and enzyme-histochemical properties and functional capacities. *Immunology*, 55(1), (s.23–30).
- Dinarello, C. A. (1997). Interleukin-1. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 8, (s.253–265).
- Dinarello, C. A. (2000). Proinflammatory cytokines. *Chest*, 118(2), (s.503–508).
- Diomedè, F., Caputi, S., Merciaro, I., Frisone, S., D’Arcangelo, C., Piattelli, A., & Trubiani, O. (2014). Pro-inflammatory cytokine release and cell growth inhibition in primary human oral cells after exposure to endodontic sealer. *International Endodontic Journal*, 47(9), (s.864–872).
- Ferris, D. M., & Baumgartner, J. C. (2004). Perforation repair comparing two types of mineral trioxide aggregate. *Journal of Endodontics*, 30(6), (s.422–424).
- Franceschi, C., & Campisi, J. (2014). Chronic inflammation (Inflammaging) and its potential contribution to age-associated diseases. *Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, 69(S1), (s.4-9).
- Gallis, B., Prickett, K. S., Jackson, J., Slack, J., Schooley, K., Sims, J. E., & Dower, S. K. (1989). IL-1 induces rapid phosphorylation of the IL-1 receptor. *The Journal of Immunology*, 143(10), (s.3235-3240).
- Gandolfi, M. G., Ciapetti, G., Taddei, P., Perut, F., Tinti, A., Cardoso, M. V., ... Prati, C. (2010). Apatite formation on bioactive calcium-silicate cements for dentistry affects surface topography and human marrow stromal cells proliferation. *Dental Materials*, 26(10), (s.974–992).
- Gandolfi, M. G., Taddei, P., Siboni, F., Modena, E., Ciapetti, G., & Prati, C. (2011). Development of the foremost light-curable calcium-silicate MTA cement as root-

- end in oral surgery. Chemical-physical properties, bioactivity and biological behavior. *Dental Materials*, 27(7), (s.e134-e157).
- Gauldie, J., Richards, C., Harnish, D., Lansdorp, P., & Baumann, H. (1987). Interferon beta 2/B-cell stimulatory factor type 2 shares identity with monocyte-derived hepatocyte-stimulating factor and regulates the major acute phase protein response in liver cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(20), (s.7251–7255).
- Goetze, S., Xi, X. P., Kawano, Y., Kawano, H., Fleck, E., Hsueh, W. A., & Law, R. E. (1999). TNF- α -induced migration of vascular smooth muscle cells is MAPK dependent. *Hypertension*, 33(1 II), (s.183–189).
- Gomes Cornélio, A. L., Salles, L. P., Campos Da Paz, M., Cirelli, J. A., Guerreiro-Tanomaru, J. M., & Tanomaru Filho, M. (2011). Cytotoxicity of Portland cement with different radiopacifying agents: A cell death study. *Journal of Endodontics*, 37(2), (s.203–210).
- Gordon, S. (2003). Alternative activation of macrophages. *Nature Reviews Immunology*, 3(1), (s.23–35).
- Gordon, S., & Taylor, P. R. (2005). Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nature Reviews Immunology*, 5(12), (s.953–964).
- Grazziotin-Soares, R., Nekoofar, M. H., Davies, T. E., Bafail, A., Alhaddar, E., Hübler, R., ... Dummer, P. M. H. (2014). Effect of bismuth oxide on white mineral trioxide aggregate: Chemical characterization and physical properties. *International Endodontic Journal*, 47(6), (s.520–533).
- Guimarães, B. M., Prati, C., Duarte, M. A. H., Bramante, C. M., & Gandolfi, M. G. (2018). Physicochemical properties of calcium silicate-based formulations MTA repair HP and MTA vitalcem. *Journal of Applied Oral Science*, 26, e2017115.
- Haglund, R., He, J., Jarvis, J., Safavi, K. E., Spångberg, L. S. W., & Zhu, Q. (2003a). Effects of root-end filling materials on fibroblasts and macrophages in vitro. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics*, 95(6), (s.739–745).
- Hancock, R. E. W., Haney, E. F., & Gill, E. E. (2016). The immunology of host defence peptides: Beyond antimicrobial activity. *Nature Reviews Immunology*, 16, (s.321–334).
- Haynes, L., Eaton, S. M., Burns, E. M., Rincon, M., & Swain, S. L. (2004).

- Inflammatory cytokines overcome age-related defects in CD4 T cell responses in vivo. *The Journal of Immunology*, 172(9), (s.5194–5199).
- Hong, C.Y., Lin, S.K., Kok, S.H., Cheng, S.J., Lee, M.S., Wang, T.M., ... Wang, J. S. (2004). The role of lipopolysaccharide in infectious bone resorption of periapical lesion. *Journal of Oral Pathology and Medicine*, 33(3), (s.162–169).
- Hornbeck, P. (1992). Enzyme-linked immunosorbent assays. *Current Protocols in Immunology*, 110(3), 2.1.1-2.1.2.
- Hungaro Duarte, M. A., Minotti, P. G., Rodrigues, C. T., Zapata, R. O., Bramante, C. M., Filho, M. T., ... Bombarda De Andrade, F. (2012). Effect of different radiopacifying agents on the physicochemical properties of white portland cement and white mineral trioxide aggregate. *Journal of Endodontics*, 38(3), (s.394–397).
- Hunter, C. A., & Jones, S. A. (2015). IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. *Nature Immunology*, 16(5), (s.448–457).
- Ito, Y., Kaneko, N., Iwasaki, T., Morikawa, S., Kaneko, K., & Masumoto, J. (2015). IL-1 as a target in inflammation. *Endocrine, metabolic & immune disorders drug targets*, 15(3), (s.206-211).
- Jiménez-Sánchez, M. del C., Segura-Egea, J. J., & Díaz-Cuenca, A. (2019). Higher hydration performance and bioactive response of the new endodontic bioactive cement MTA HP repair compared with ProRoot MTA white and NeoMTA plus. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*, 107(6), (s.2109–2120).
- Kandemir Demirci G., Kaval M. E., Güneri P., Çalışkan M. K. (2020). Treatment of immature teeth with nonvital pulps in adults: a prospective comparative clinical study comparing MTA with Ca(OH)₂. *International Endodontic Journal*, 53(1): (s.5-18).
- Kandemir Demirci G., Güneri P., Çalışkan M. K.(2020). Regenerative Endodontic Therapy with Platelet Rich Fibrin: Case Series. *Journal of Clinical Pediatric Dentistry*, 44(1), (s.15-19).
- Karapinar-Kazandağ, M., Bayrak, Ö. F., Yalvaç, M. E., Ersev, H., Tanalp, J., Şahin, F., & Bayirli, G. (2011). Cytotoxicity of 5 endodontic sealers on L929 cell line and human dental pulp cells. *International Endodontic Journal*, 44(7), (s.626–634).

- Katge, F. A., & Patil, D. P. (2017). Comparative analysis of 2 calcium silicate-based cements (Biodentine and Mineral Trioxide Aggregate) as direct pulp-capping agent in young permanent molars: A split mouth study. *Journal of Endodontics*, 43(4), (s.507–513).
- Kaval M. E., Güneri P., Çalışkan M.K. (2018). Regenerative endodontic treatment of perforated internal root resorption: a case report. *International Endodontic Journal*. 51(1), (s.128-137).
- Keiser, K., Chad Johnson, C., & Tipton, D. A. (2000). Cytotoxicity of mineral trioxide aggregate using human periodontal ligament fibroblasts. *Journal of Endodontics*, 26(5), (s.288–291).
- Kettering, J. D., & Torabinejad, M. (1995). Investigation of mutagenicity of mineral trioxide aggregate and other commonly used root-end filling materials. *Journal of Endodontics*, 21(11), (s.537–539).
- Kim, D.H., Jang, J.H., Lee, B.N., Chang, H.S., Hwang, I.N., Oh, W.M., ... Hwang, Y.C. (2018). Anti-inflammatory and mineralization effects of ProRoot MTA and Endocem MTA in studies of human and rat dental pulps in vitro and in vivo. *Journal of endodontics*, 44(10), (s.1534–1541).
- Kimura, A., & Kishimoto, T. (2010). IL-6: Regulator of Treg/Th17 balance. *European Journal of Immunology*, 40, (s.1830–1835).
- Koh, E. T., Torabinejad, M., Pitt Ford, T. R., Brady, K., & McDonald, F. (1997). Mineral trioxide aggregate stimulates a biological response in human osteoblasts. *Journal of Biomedical Materials Research*, 37(3), (s.432–439).
- Koh, E. T., McDonald, F., Pitt Ford, T. R., & Torabinejad, M. (1998). Cellular response to mineral trioxide aggregate. *Journal of Endodontics*, 24(8), (s.543–547).
- Lai, W. Y., Kao, C. T., Hung, C. J., Huang, T. H., & Shie, M. Y. (2014). An evaluation of the inflammatory response of lipopolysaccharide-treated primary dental pulp cells with regard to calcium silicate-based cements. *International Journal of Oral Science*, 6(2), (s.94–98).
- Lee, J. H., Lee, H. H., Kim, K. N., & Kim, K. M. (2016). Cytotoxicity and anti-inflammatory effects of zinc ions and eugenol during setting of ZOE in immortalized human oral keratinocytes grown as three-dimensional spheroids. *Dental Materials*, 32(5), (s.e93–e104).

- Leonard, B. E. (1999). Stress, immune function and health: the connection . *Human Psychopharmacology: Clinical and Experimental*, 14(7), (s.515–516).
- Lichtman, S. N., Wang, J., & Lemasters, J. J. (1998). LPS receptor CD14 participates in release of TNF- α in RAW 264.7 and peritoneal cells but not in Kupffer cells. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 275(1): (s.G39-G46).
- Lin, N. Y., Stefanica, A., & Distler, J. H. W. (2013). Autophagy: A key pathway of TNF-induced inflammatory bone loss. *Autophagy*, 9(8), (s.1253–1255).
- Marciano, M. A., Costa, R. M., Camilleri, J., Mondelli, R. F. L., Guimarães, B. M., & Duarte, M. A. H. (2014). Assessment of color stability of white mineral trioxide aggregate angelus and bismuth oxide in contact with tooth structure. *Journal of Endodontics*, 40(8), (s.1235–1240).
- Martinho, F. C., Chiesa, W. M. M., Leite, F. R. M., Cirelli, J. A., & Gomes, B. P. F. A. (2010). Antigenic activity of bacterial endodontic contents from primary root canal infection with periapical lesions against macrophage in the release of interleukin-1 β and tumor necrosis factor α . *Journal of Endodontics*, 36(9), (s.1467–1474).
- Martinho, F. C., Chiesa, W. M. M., Leite, F. R. M., Cirelli, J. A., & Gomes, B. P. F. A. (2012). Correlation between clinical/radiographic features and inflammatory cytokine networks produced by macrophages stimulated with endodontic content. *Journal of Endodontics*, 38(6), (s.740–745).
- Massler, M. (1967). Pulpal reactions to dental caries. *International Dental Journal*, 17(2), (s.441–460).
- McCullough, K. C., Basta, S., Knötig, S., Gerber, H., Schaffner, R., Kim, Y. B., ... Summerfield, A. (1999). Intermediate stages in monocyte-macrophage differentiation modulate phenotype and susceptibility to virus infection. *Immunology*, 98(2), (s.203–212).
- McLachlan, J. L., Sloan, A. J., Smith, A. J., Landini, G., & Cooper, P. R. (2004). S100 and cytokine expression in caries. *Infection and Immunity*, 72(7), (s.4102–4108).
- Meng, F., & Lowell, C. A. (1997). Lipopolysaccharide (LPS)-induced macrophage activation and signal transduction in the absence of Src-family kinases Hck, Fgr, and Lyn. *Journal of Experimental Medicine*, 185(9), (s.1661-1670).
- Miletić, I., Devčić, N., Anić, I., Borčić, J., Karlović, Z., & Osmak, M. (2005). The

- cytotoxicity of Roekoseal and AH plus compared during different setting periods. *Journal of Endodontics*, 31(4), (s.307–309).
- Min, K. S., Chang, H. S., Bae, J. M., Park, S. H., Hong, C. U., & Kim, E. C. (2007). The induction of heme Oxygenase-1 modulates bismuth oxide-induced cytotoxicity in human dental pulp cells. *Journal of Endodontics*, 33(11), (s.1342–1346).
- Mino, T., & Takeuchi, O. (2013). Post-transcriptional regulation of cytokine mRNA controls the initiation and resolution of inflammation. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 29, (s.49-60).
- Mori, G. G. arrid., Teixeira, L. M. orae., de Oliveira, D. L. ouzad., Jacomini, L. M. E., & da Silva, S. R. (2014). Biocompatibility evaluation of biodentine in subcutaneous tissue of rats. *Journal of Endodontics*, 40(9), (s.1485–1488).
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1–2), (s.55–63).
- Mosser, D. M. (2003). The many faces of macrophage activation. *Journal of Leukocyte Biology*, 73(2), (s.209–212).
- Murphy, K., & Weaver, C. (2016). *Janeway's immunobiology*. Garland Science, 9. bask1, (s.1–924).
- Nagaoka, S., Tokuda, M., Sakuta, T., Taketoshi, Y., Tamura, M., Takada, H., & Kawagoe, M. (1996). Interleukin-8 gene expression by human dental pulp fibroblast in cultures stimulated with *Prevotella intermedia* lipopolysaccharide. *Journal of Endodontics*, 22(1), (s.9–12).
- Neiva, K. G., Catalfamo, D. L., Holliday, S., Wallet, S. M., & Pileggi, R. (2014). Propolis decreases lipopolysaccharide-induced inflammatory mediators in pulp cells and osteoclasts. *Dental Traumatology*, 30(5), (s.362–367).
- Nishimoto, K., Nakagawa, K., Li, D., Kosaka, T., Oya, M., Mikami, S., ... Mukai, K. (2010). Adrenocortical zonation in humans under normal and pathological conditions. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 95(5), (s.2296–2305).
- Nowicka, A., Lipski, M., Parafiniuk, M., Sporniak-Tutak, K., Lichota, D., Kosierkiewicz, A., ... Buczkowska-Radlińska, J. (2013). Response of human dental pulp capped with biodentine and mineral trioxide aggregate. *Journal of*

- Endodontics, 39(6), (s.743–747).
- Omidi, S., Bagheri, M., Fazli, M., & Ahmadiankia, N. (2020). The effect of different pulp-capping materials on proliferation, migration and cytokine secretion of human dental pulp stem cells. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 23(6), (s.768–775).
- Opal, S. M., & DePalo, V. A. (2000). Anti-inflammatory cytokines. *Chest*, 117(4), (s.1162–1172).
- Parirokh, M., Torabinejad, M., & Dummer, P. M. H. (2018). Mineral trioxide aggregate and other bioactive endodontic cements: an updated overview - part I: vital pulp therapy. *International Endodontic Journal*, 51(2), (s.177–205).
- Parirokh, M., & Torabinejad, M. (2010). Mineral Trioxide Aggregate: A comprehensive literature review-part III: Clinical applications, drawbacks, and mechanism of action. *Journal of Endodontics*, 36, (s.400–413).
- Patel, R., Attur, M. G., Dave, M., Abramson, S. B., & Amin, A. R. (1999). Regulation of cytosolic COX-2 and prostaglandin E2 production by nitric oxide in activated murine macrophages. *The Journal of Immunology*, 162(7), (s.4191-4197).
- Ford, T. R., Torabinejad, M., Abedi, H. R., Bakland, L. K., & Kariyawasam, S. P. (1996). Using mineral trioxide aggregate: As a pulp-capping material. *Journal of the American Dental Association*, 127(10), (s.1491–1494).
- Quinlan, C. A., Zisterer, D. M., Tipton, K. F., & O’Sullivan, M. I. (2002). In vitro cytotoxicity of a composite resin and compomer. *International Endodontic Journal*, 35(1), (s.47–55).
- Ragab, A. A., Nalepka, J. L., Bi, Y., & Greenfield, E. M. (2002). Cytokines synergistically induce osteoclast differentiation: Support by immortalized or normal calvarial cells. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 283(3), (s.52-3).
- Rechenberg, D. K., Galicia, J. C., & Peters, O. A. (2016). Biological markers for pulpal inflammation: A systematic review. *Plos One*, 11(11), e0167289.
- Rezende, T. M. B., Vargas, D. L., Cardoso, F. P., Sobrinho, A. P. R., & Vieira, L. Q. (2005). Effect of mineral trioxide aggregate on cytokine production by peritoneal macrophages. *International Endodontic Journal*, 38(12), (s.896–903).
- Rietschel, E. T., Kirikae, T., Schade, F. U., Mamat, U., Schmidt, G., Loppnow, H., ... Brade, H. (1994). Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to

- activity and function. *The FASEB Journal*, 8(2), (s.217–225).
- Rossol, M., Heine, H., Meusch, U., Quandt, D., Klein, C., Sweet, M. J., & Hauschildt, S. (2011). LPS-induced cytokine production in human monocytes and macrophages. *Critical Reviews in Immunology*, 31(5), (s.379–446).
- Rutherford, M. S., Witsell, A., & Schook, L. B. (1993). Mechanisms generating functionally heterogeneous macrophages: Chaos revisited. *Journal of Leukocyte Biology*, 53(5), (s.602–618).
- Sattler, S., & Kennedy-Lydon, T. (2017). Chapter 1 : The role of the immune system beyond the fight against infection. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1003, (s.3-14).
- Scheller, J., Chalaris, A., Schmidt-Arras, D., & Rose-John, S. (2011). The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1813(5), (s.878–888).
- Schweikl, H., & Schmalz, G. (1996). Toxicity parameters for cytotoxicity testing of dental materials in two different mammalian cell lines. *European Journal of Oral Sciences*, 104(3), (s.292–299).
- Schweizer, A., Feige, U., Fontana, A., Müller, K., & Dinarello, C. A. (1988). Interleukin-1 enhances pain reflexes. Mediation through increased prostaglandin E2 levels. *Agents and Actions*, 25(3–4), (s.246–251).
- Scott, M. G., Gold, M. R., & Hancock, R. E. W. (1999). Interaction of cationic peptides with lipoteichoic acid and gram- positive bacteria. *Infection and Immunity*, 67(12), (s.6445–6453).
- Seltzer, S. (1972). Classification of pulpal pathosis. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*, 34(2), (s.269–287).
- Shabahang, S., Torabinejad, M., Boyne, P. P., Abedi, H., & McMillan, P. (1999). A comparative study of root-end induction using osteogenic protein-1, calcium hydroxide, and mineral trioxide aggregate in dogs. *Journal of Endodontics*, 25(1), (s.1–5).
- Shi, W., Mozumder, M., Zhang, H., Zhu, J., & Perinpanayagam, H. (2012). MTA-enriched nanocomposite TiO₂-polymeric powder coatings support human mesenchymal cell attachment and growth. *Biomedical materials*, 7(5), 055006.
- Shie, M. Y., Chang, H. C., & Ding, S. J. (2012). Effects of altering the Si/Ca molar ratio of a calcium silicate cement on in vitro cell attachment. *International*

- Endodontic Journal, 45(4), (s.337–345).
- Shie, M. Y., Ding, S. J., & Chang, H. C. (2011). The role of silicon in osteoblast-like cell proliferation and apoptosis. *Acta Biomaterialia*, 7(6), (s.2604–2614).
- Shie, M. Y., Huang, T. H., Kao, C. T., Huang, C. H., & Ding, S. J. (2009). The effect of a physiologic solution pH on properties of white Mineral Trioxide Aggregate. *Journal of Endodontics*, 35(1), (s.98–101).
- Silva, E. J., Carvalho, N. K., Zanon, M., Senna, P. M., DE-Deus, G., Zuolo, M. L., & Zaia, A. A. (2016). Push-out bond strength of MTA HP, a new high-plasticity calcium silicate-based cement. *Brazilian Oral Research*, 30(1), (s.1–5).
- Sims, J. E., & Smith, D. E. (2010). The IL-1 family: Regulators of immunity. *Nature Reviews Immunology*, 10, (s.89–102).
- Smith, J. B., Loushine, R. J., Weller, R. N., Rueggeberg, F. A., Whitford, G. M., Pashley, D. H., & Tay, F. R. (2007). Metrologic evaluation of the surface of white mta after the use of two endodontic irrigants. *Journal of Endodontics*, 33(4), (s.463–467).
- Stashenko, P. (1990). The role of immune cytokines in the pathogenesis of periapical lesions. *Dental Traumatology*, 6(3), (s.89–96).
- Steeve, K. T., Marc, P., Sandrine, T., Dominique, H., & Yannick, F. (2004). IL-6, RANKL, TNF-alpha/IL-1: Interrelations in bone resorption pathophysiology. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 15, s.49–60.
- Stout, R. D., & Suttles, J. (2004). Functional plasticity of macrophages: reversible adaptation to changing microenvironments. *Journal of Leukocyte Biology*, 76(3), (s.509–513).
- Stout, R. D., & Suttles, J. (2005). Immunosenescence and macrophage functional plasticity: Dysregulation of macrophage function by age-associated microenvironmental changes. *Immunological Reviews*, 205, (s.60–71).
- Stowe, T. J., Sedgley, C. M., Stowe, B., & Fenno, J. C. (2004). The effects of chlorhexidine gluconate (0.12%) on the antimicrobial properties of tooth-colored ProRoot mineral trioxide aggregate. *Journal of Endodontics*, 30(6), (s.429–431).
- Sumer, M., Muglali, M., Bodrumlu, E., & Guvenc, T. (2006). Reactions of connective tissue to amalgam, Intermediate Restorative Material, Mineral Trioxide Aggregate, and Mineral Trioxide Aggregate mixed with chlorhexidine. *Journal of Endodontics*, 32(11), (s.1094–1096).

- Sunderkotter, C., Steinbrink, K., Goebeler, M., Bhardwaj, R., & Sorg, C. (1994). Macrophages and angiogenesis. *Journal of Leukocyte Biology*, 55, s. 410–422.
- Takahashi, K. (1998). Microbiological, pathological, inflammatory, immunological and molecular biological aspects of periradicular disease. *International Endodontic Journal*, 31(5), (s.311–325).
- Tanalp, J., Karapinar-Kazandag, M., Ersev, H., & Bayirli, G. (2012). The status of mineral trioxide aggregate in endodontics education in dental schools in Turkey. *Journal of Dental Education*, 76(6), (s.752–758).
- Tassignon, J., Burny, W., Dahmani, S., Zhou, L., Stordeur, P., Byl, B., & De Groote, D. (2005). Monitoring of cellular responses after vaccination against tetanus toxoid: Comparison of the measurement of IFN- γ production by ELISA, ELISPOT, flow cytometry and real-time PCR. *Journal of Immunological Methods*, 305(2), (s.188–198).
- Tian, J., Zhang, Y., Lai, Z., Li, M., Huang, Y., Jiang, H., & Wei, X. (2017). Ion release, microstructural, and biological properties of iRoot BP Plus and ProRoot MTA exposed to an acidic environment. *Journal of Endodontics*, 43(1), (s.163–168).
- Tokuda, M. (2001). Regulation of interleukin-6 expression in human dental pulp cell cultures stimulated with prevotella intermedia lipopolysaccharide. *Journal of Endodontics*, 27(4), (s.273–277).
- Tomás-Catalá, C. J., Collado-González, M., García-Bernal, D., Oñate-Sánchez, R. E., Forner, L., Llena, C., ... Rodríguez-Lozano, F. J. (2017). Comparative analysis of the biological effects of the endodontic bioactive cements MTA-Angelus, MTA Repair HP and NeoMTA Plus on human dental pulp stem cells. *International Endodontic Journal*, 50, (s.e63–e72).
- Tomás-Catalá, Christopher J., Collado-González, M., García-Bernal, D., Oñate-Sánchez, R. E., Forner, L., Llena, C., ... Rodríguez-Lozano, F. J. (2018). Biocompatibility of new pulp-capping materials NeoMTA Plus, MTA Repair HP, and Biodentine on human dental pulp stem cells. *Journal of Endodontics*, 44(1), s.126–132.
- Torabinejad, M., Hong, C. U., Ford, T. R. P., & Kettering, J. D. (1995). Antibacterial effects of some root end filling materials. *Journal of Endodontics*, 21(8), (s.403–406).
- Torabinejad, M., Pitt Ford, T. R., McKendry, D. J., Abedi, H. R., Miller, D. A., &

- Kariyawasam, S. P. (1997). Histologic assessment of mineral trioxide aggregate as a root-end filling in monkeys. *Journal of Endodontics*, 23(4), 225–228.
- Torabinejad, M., Rastegar, A. F., Kettering, J. D., & Pitt Ford, T. R. (1995). Bacterial leakage of mineral trioxide aggregate as a root-end filling material. *Journal of Endodontics*, 21(3), (s.109–112).
- Trubiani, O., Cataldi, A., De Angelis, F., D’Arcangelo, C., & Caputi, S. (2012a). Overexpression of interleukin-6 and -8, cell growth inhibition and morphological changes in 2-hydroxyethyl methacrylate-treated human dental pulp mesenchymal stem cells. *International Endodontic Journal*, 45(1), (s.19–25).
- Trubiani, O., Toniato, E., Diiorio, D., Diomede, F., Merciaro, I., D’Arcangelo, C., & Caputi, S. (2012b). Morphological analysis and interleukin release in human gingival fibroblasts seeded on different denture base acrylic resins. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 25(3), (s.637–643).
- Unanue, E. R. (1978). The regulation of lymphocyte functions by the macrophage. *Immunological Reviews*, 40(1), (s.227–255).
- Van Furth, R., Diesselhoff-den Dulk, M. M., Sluiter, W., & Van Dissel, J. T. (1985). Mononuclear phagocytes: Characteristics, physiology and function. İçinde R. Van Furth (Ed.), *Journal of Medical Microbiology* 22(3), s.283-284.
- Van Furth, R., & Cohn, Z. A. (1968). The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. *The Journal of experimental medicine*, 128(3), (s.415–435).
- van Furth, R., Cohn, Z. A., Hirsch, J. G., Humphrey, J. H., Spector, W. G., & Langevoort, H. L. (1972). The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells. *Bulletin of the World Health Organization*, 46(6), (s.845–852).
- Voicu, G., Didilescu, A. C., Stoian, A. B., Dumitriu, C., Greabu, M., & Andrei, M. (2019b). Mineralogical and microstructural characteristics of two dental pulp capping materials. *Materials*, 12(11), s.1772-1785.
- Wang, C. -Y, & Stashenko, P. (1993). The role of interleukin-1 α in the pathogenesis of periapical bone destruction in a rat model system. *Oral Microbiology and Immunology*, 8(1), (s.50–56).
- Willershausen, I., Wolf, T., Kasaj, A., Weyer, V., Willershausen, B., & Marroquin, B. B. (2013). Influence of a bioceramic root end material and mineral trioxide aggregates on fibroblasts and osteoblasts. *Archives of Oral Biology*, 58(9),

(s.1232–1237).

Wu, M. K., Kontakiotis, E. G., & Wesselink, P. R. (1998). Long-term seal provided by some root-end filling materials. *Journal of Endodontics*, 24(8), (s.557–560).

Yoshimine, Y., Ono, M., & Akamine, A. (2007). In vitro comparison of the biocompatibility of Mineral Trioxide Aggregate, 4META/MMA-TBB resin, and Intermediate Restorative Material as root-end-filling materials. *Journal of Endodontics*, 33(9), (s.1066–1069).

Zarra, T., Lambrianidis, T., Vasiliadis, L., & Gogos, C. (2018). Effect of curing conditions on physical and chemical properties of MTA+. *International Endodontic Journal*, 51(11), (s.1279–1291).

Zhang, M., Kenny, S. J., Ge, L., Xu, K., & Schekman, R. (2015). Translocation of interleukin-1 β into a vesicle intermediate in autophagy-mediated secretion. *eLife*, 4:e11205.

Teşekkür

Doktora eğitimim süresince engin bilgileri ile gerek klinik gerekse akademik anlamda gelişmemde büyük emeği olan, desteğini her zaman hissettiğim, danışmanım Doç. Dr. Mehmet Emin Kaval'a,

Hem tez çalışmamda hem de Ege Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Endodonti Anabilim dalında birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum değerli hocam Prof. Dr. M. Kemal Çalışkan'a,

Tez izleme komitemde yer alan ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Pelin Güneri'ye,

Tez tüm aşamalarında değerli fikirleri ve tecrübesi ile bana yol gösteren, kendisinden çok şey öğrendiğim ve birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum değerli hocam Prof. Dr. Ayşe Nalbantsoy'a,

Doktora eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerinden yararlanma fırsatı bulduğum Ege Üniversitesi Endodonti Anabilim Dalı'nda bulunan değerli hocalarıma,

Doktora yolculuğumda kendisini tanıma fırsatı bulduğum için kendimi şanslı hissettiğim, ayrıca tez verilerimin istatistiksel analizinde yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Nejat Nizam'a,

Tezin laboratuvar aşamalarında tecrübesi ve yardımlarıyla destek veren, kıymetli vaktini ayıran minnetimi kelimelerle anlatamayacağım Büşra Çakır'a,

Tezin gerçekleştirilebilmesi için gerekli maddi desteği sağlayan Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne,

Hiç dile getirmeseler de benim için çok şey yaptıklarını bildiğim, hem fakültede hem dışarıda yolumu aydınlatan, üzerimde büyük emekleri olan çok sevdiğim ablalarım Dr. Gözde Kandemir, Dr. Burcu Şerefoglu ve Dr. Seniha Miçoğulları Kurt'a,

Hem fakültede hem de İzmir’de geçen her bir günümü daha keyifli hale getiren, beraber güldüğüm beraber ağladığım, bu fakültenin bana kattığı en özel insanlar, canım arkadaşlarım Merve Görür, Elçin Şahin, Ege Namsoy ve Fulya Karaoğlu’na,

Doktora eğitimim sırasında birlikte gülüp eğlendiğim Endodonti Anabilim Dalı’ndaki çalışma arkadaşlarıma ve çok değerli kürsü personeline,

Maddi, manevi destekleri ile her zaman yanımda olan, evlatları olmaktan gurur ve mutluluk duyduğum annem ve babama,

Yanına gelmemi istediği ilk günden beri elimi bırakmayan oyun ve yol arkadaşım, değerleri ve düşünceleri ile her yaşıma renk katan, ışık olan canım ablama,

Bana sarıldığı ilk günden bu yana hayatımı güzelleştiren, her ân’ı paylaşmaktan büyük mutluluk duyduğum, en büyük destekçim ve ailem olan, her şeyim İsmail’e sonsuz teşekkürler.

İzmir, 20.08.2020

Dt. Esengül Üngüder

Özgeçmiş

Diş Hekimliği eğitimime 2010 yılında Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti'nde yer alan Yakın Doğu Üniversitesi'nde başladım 2015 yılında “Endodontik Tedavide Kullanılan Yeni Biyoaktif Materyaller” konulu tez ile tamamladım 2016 yılında Ege Üniversitesi'nde Sağlık Bilimleri Enstitüsü Endodonti Anabilim Dalı'nda doktora eğitimime başladım ve eğitimim halen devam etmektedir.

E-mail adresi: esengulunguder@gmail.com

