

T.C.
GENELKURMAY BAŐKANLIĐI
GÜLHANE ASKERİ TIP AKADEMİSİ KOMUTANLIĞI
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
DİŐHEKİMLİĐİ BİLİMLERİ MERKEZİ
RESTORATİF DİŞ TEDAVİSİ VE ENDODONTİ
ANABİLİM DALI BAŐKANLIĐI

**OSTEOKALSİN VE OSTEONEKTİN mRNA GEN
EKSPRESYONU DÜZEYİ İNCELENEREK, MİNERAL
TRİOKSİT AGREGAT VE PORTLAND SİMAN'IN DİŞ
DENTİN REJENERASYONU ÜZERİNE ETKİLERİNİN
KARŞILAŞTIRILMASI**

Zeynep ÖNCEL TORUN
Diş.Tbp.Kd Ütđm.

Restoratif Diş Tedavisi
DOKTORA TEZİ

ANKARA

2011

T.C.
GENELKURMAY BAŐKANLIĐI
GÜLHANE ASKERİ TIP AKADEMİSİ KOMUTANLIĞI
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
DİŐHEKİMLİĐİ BİLİMLERİ MERKEZİ
RESTORATİF DİŞ TEDAVİSİ VE ENDODONTİ
ANABİLİM DALI BAŐKANLIĐI

**OSTEOKALSİN VE OSTEONEKTİN mRNA GEN
EKSPRESYONU DÜZEYİ İNCELENEREK, MİNERAL
TRİOKSİT AGREGAT VE PORTLAND SİMAN'IN DİŞ
DENTİN REJENERASYONU ÜZERİNE ETKİLERİNİN
KARŞILAŞTIRILMASI**

Zeynep ÖNCEL TORUN
Diş.Tbp.Kd Ütđm.

Gülhane Askeri Tıp Akademisi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'nün
Restoratif Diş Tedavisi Programı
İçin Öngördüğü
DOKTORA TEZİ
Olarak HazırlanmıŐtır

TEZ DANIŞMANI
Yaşar Meriç TUNCA
Prof.Diş Tbp.Kd.Alb.

ANKARA
2011

Gülhane Askeri Tıp Akademisi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne:

"Osteokalsin ve osteonektin mRNA gen ekspresyonu düzeyi incelenerek mineral trioksit agregat ve portland simanın diş dentin rejenerasyonu üzerine etkilerinin karşılaştırılması" konulu bu çalışma jürimiz tarafından Restoratif Diş Tedavisi ve Endodonti Anabilim Dalı'nda Restoratif Diş Tedavisi Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı : Prof.Diş Tbp.Kd.Alb.Yaşar Meriç TUNCA, GATA


Üye : Prof.Diş Tbp.Kd.Alb.Veli ASLANALP, GATA

Üye : Prof.Diş Tbp.Kd.Alb.Tuncer ÖZEN, GATA

Üye : Prof.Dr. Veli DURMAZ, Hacettepe Üniversitesi

Üye : Doç.Hv.Diş Tbp.Kd.Yzb.Ö.Cumhur AYDIN, GATA

ONAY : Diş Tbp.Kd.Ütğm. Zeynep ÖNCEL TORUN'un 30.06.2011 tarihinde savunduğu bu tez Akademi Kurulu'nca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve kabul edilmiştir.


Ufuk DEMİRKILIC
Prof.Tbp.Tuğgeneral
GATA Sağ.Bil.Enst. Md.

TEŞEKKÜR

“Osteokalsin ve Osteonektin mRNA Gen Ekspresyonu Düzeyi İncelenerek Mineral Trioksit Agregat ve Portland Simanın Diş Dentin Rejenerasyonu Üzerine Etkilerinin Karşılaştırılması” isimli bu projemiz GATA Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından AR-2010/71 proje numarası ile desteklenerek gerçekleştirilmiştir.

Doktora eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerinden istifade ettiğim, tez aşamasında beni yönlendiren danışman hocam Prof. Dr. Yaşar Meriç TUNCA'ya,

Tezimin gerçekleştirilmesi esnasında tecrübelerini bana aktaran ve yardımlarını esirgemeyen Ana Bilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Veli ASLANALP hocama,

Doktora çalışmam sırasında verdiği destekten dolayı Dt. Şeyda ERŞAHAN'a,

Doktora eğitimim süresince emeği geçen Restoratif Diş Tedavisi ve Endodonti Anabilim Dalı Öğretim üyelerine ve mesayi arkadaşlarıma,

Tez çalışmamın istatistiksel olarak değerlendirilmesinde büyük emeği olan istatistik uzmanı Öğ. Yb. Mesut AKYOL'a

Tez çalışması boyunca bana gösterdiği sabır ve anlayıştan dolayı sevgili eşim Dr.Deniz TORUN'a;

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Osteokalsin ve Osteonektin Genlerinin mRNA Ekspresyonu Düzeyi İncelenerek, MTA(Mineral Trioxide Aggregate) Ve PC (Portland Cement)'nin Diş Dentin Rejenerasyonu Üzerine Etkilerinin Karşılaştırılması, Mineral trioksit agregat (MTA) diş ve çevre dokular arasındaki bağlantı noktalarını örtülemek için geliştirilmiş bir materyaldir. Günümüzde MTA mükemmel örtüleme özelliği ve biyouyumluluğu sayesinde geniş çevrelerce kabul görmüş bir materyal olup, kök perforasyonlarının tamiri, süt dişlerinin apeksifikasyonu ve konservatif pulpa tedavileri gibi diş hekimliğinin çeşitli alanlarında çok amaçlı olarak kullanılmaktadır. MTA'nın biyouyumluluğu ile ilgili günümüze kadar birçok in vivo ve in vitro çalışma yapılmıştır. Ancak MTA'nın sert doku mineralizasyonu ile bağlantılı genlerin ekspresyonuna etkisi hakkında yeterince bilgi bulunmamaktadır (osteokalsin-OK and osteonektin-ON). Bu çalışmamızda BMTA, GMTA ve PS varlığında dental pulpa fibroblast hücrelerinde osteonektin (OK) ve osteokalsin (ON) ekspresyonunu real time PCR yöntemi ile değerlendirerek, BMTA, GMTA ve PS'nin sert doku mineralizasyonu üzerindeki etkilerini incelemeyi hedefledik. Çalışma sonucunda deney materyallerinin tümünde farklı derecelerde de olsa ON ekspresyonu izlenirken, OK ekspresyonu kontrol grupları dahil deney materyallerinin hiç birisinde gözlenmedi. Bu sonuçlar PS ve MTA'nın dental pulpa fibroblast hücrelerinde odontoblastik dönüşümü sağlayarak doku mineralizasyonuna katkı sağladıklarını ve doku mineralizasyonu yönünden biyouyumluluklarını doğrulamış ve pulpa kuafaj materyali olarak kullanılabileceklerini göstermiştir. Dental pulpa fibroblast hücrelerinde OK ekspresyonu tespit edilememiş olması ise bu dokuda ilgili proteinin sentezlenmediğini göstermekte olup histolojik ve immünohistokimyasal çalışmalar ile sonucun doğrulanması gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler : Mineral trioksit agregat, Portland siman, Dental pulpa fibroblast, Osteokalsin, Osteonektin

Destekleyen Kurumlar : GATA Bilimsel Araştırma Kurulu

Yazar Adı : Diş.Tbp.Kd.Ütğm. Zeynep ÖNCEL TORUN

Danışman : Prof. Diş Tbp. Kd. Alb. Yaşar Meriç TUNCA

SUMMARY

Comparison of the dentin regeneration properties of mineral trioxide aggregate (MTA) and portland cement (PC) with assessing osteocalcin and osteonectin mRNA expression rates, Mineral trioxide aggregate (MTA) was developed to seal communications between a tooth and its external surfaces. Currently, it is being used not only in root perforations but also in conservative pulpal treatments, in obturation of the apical portion of immature teeth, and in retrograde obturations; it is widely accepted for its biocompatibility and excellent sealing capacity. Biocompatibility of MTA has been previously investigated by many in vitro and in vivo studies. However, there is little or no information available about the MTA's expression of mineralization-related genes (osteocalcin-OC and osteonectin-ON). The effects of gMTA, wMTA and PC on odontoblastic differentiation were indexed by the expression of odontoblastic/osteoblastic markers (OK, ON), as determined by reverse-transcription polymerase chain reaction analysis. The current study investigated the effectiveness of Portland Cement (PC) and mineral trioxide aggregate (gMTA, wMTA) in inducing the differentiation of human dental pulp cells (HDPCs) into odontoblast like cells in vitro. Although osteonectin mRNA was expressed in all cultures, suggestive of the potential for odontoblast formation, osteocalcin was not expressed in any of the groups. These results suggest that MTAs and PC are biocompatible, allows the expression of mineralization related genes on HDPCs, and has the potential to be used as a proper pulp-capping material. Non-expression of OC shows that it has not been synthesized in tissue. Additional histologic and immunohistochemical analyses are needed to clarify the OC transcription role of MTA in odontoblasts.

Keywords : Mineral trioksit aggregate, Portland cement, human dental pulp fibroblasts, Osteocalcin, Osteonektin

Supporting Institutions : GATA Bilimsel Araştırma Kurulu

Author : Zeynep ÖNCEL TORUN

Councillor : Prof.Dr.Yaşar Meriç TUNCA

İÇİNDEKİLER	SAYFA
ONAY	ii
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
İNGİLİZCE ÖZET	v
İÇİNDEKİLER	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR	viii
ŞEKİLLER	x
TABLolar	xi
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	3
2.1.Mineral Trioksit Agregat.....	3
2.1.1. Kimyasal Özellikleri.....	4
2.1.2. Fiziksel Özellikleri.....	5
2.1.3. Antibakteriyel ve Antifungal Özellikler.....	7
2.1.4. Sızdırmazlık Özelliği.....	8
2.1.5. Biyouyumluluk Özelliği.....	9
2.1.6. MTA'nın Klinik Kullanım Alanları.....	11
2.2. Portland Siman.....	12
2.3. Osteokalsin.....	13
2.4. Osteonektin.....	14
GEREÇ VE YÖNTEM	15
3.1. Hücre Kültürünün Oluşturulması.....	15
3.2.MTA ve PS'nin Hazırlanışı.....	16
3.3 Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT- PCR).....	16
3.3.1 RT-PCR Öncesi Hücre Kültürü.....	16
3.3.2 RNA İzolasyonu.....	17
3.4.3 cDNA Sentezi.....	18
3.3.4 Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR).....	19
3.3.5. RT-PCR Kullanılan Primerler.....	23
3.4 İstatistiksel Analizler.....	23
3.9 Kullanılan Kimyasallar ve Ticari Kitler.....	24

3.10 Kullanılan Cihazlar.....	25
BULGULAR	26
4.1 Dental Pulpa Fibroblast Hücrelerinde MTA ve PS Varlığında Osteonektin Geni mRNA Ekspresyonu.....	26
4.2 Dental Pulpa Fibroblast Hücrelerinde MTA ve PS Varlığında Osteokalsin Geni mRNA Ekspresyonu	44
TARTIŞMA	45
SONUÇ VE ÖNERİLER	55
KAYNAKLAR	57

SİMGELER VE KISALTMALAR

$2\text{CaO}\cdot\text{SiO}_2$: Dikalsiyum Silikat
$3\text{CaO}\cdot\text{SiO}_2$: Trikalsiyum Silikat
$3\text{CaO}\cdot\text{Al}_2\text{O}_3$: Trikalsiyum Aluminat
$4\text{CaO}\cdot\text{Al}_2\text{O}_3\cdot\text{Fe}_2\text{O}_3$: Tetrakalsiyum Aluminofirit
Al_2O_3	: Aluminyum Oksit
BGLAP	: “Bone gamma-carboxyglutamate (gla) protein”
Bi_2O_3	: Bizmut Oksit
BMP–2	: “Bone Morphogenetic Protein–2
BMTA	: Beyaz MTA
CaO	: Kalsiyum Oksit
$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$: Hidroksiapatit
$\text{CaSO}_4\cdot 4\text{H}_2\text{O}$: “Gypsum”
cDNA	: Komplementer DNA
dH ₂ O	: Distile Su
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle's Medium
EDTA	: Etilen Daimin Tetraasetik Asit
ERRM	: “Endosequence Root Repair Material”
Fe_2O_3	: Demir Oksit
G6PD	: “Glukoz 6 Fosfat Dehidrogenaz”
gDNA	: Genomik DNA
GMTA	: Gri MTA
IL–4	: İnterlökin 4
IL–10	: İnterlökin 10
IQR	: Çeyreklikler Arası Genişlik (Interquartile Range)
KH	: Kalsiyum Hidroksit
KMD	: Kemik Mineral Dansitesi
KS	: Kalsiyum Silikat
MgCl_2	: Magnezyum Klorür
mRNA	: Mesajcı Ribonükleik Asit
MTA	: Mineral Trioksit Agregat

MTT	: Metilentetrazolyum
OK	: Osteokalsin
ON	: Osteonektin
PGE ₂	: Prostaglandin E ₂
PS	: Portland Siman
RNA	: Ribonükleik Asit
RT-PCR	: Real Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SEM	: Scanning electron microscopy
SiO	: Silisyum
SiO ₂	: Silika
SPARC	: "Secreted Protein, Acidic, Cysteine-rich

Şekil 3.1: RNA izolasyonu için yapılan hücre kültürü ve dental pulpa fibroblast hücrelerinin invert ışık mikroskopundaki görüntüsü.....	17
Şekil 3.2 Çalışmada kullanılan Lightcycler software 4.0 Vers. programı ile rölatif standart eğri.....	20
Şekil 3.3 Çalışmada kullanılan Lightcycler software 4.0 Vers. programı ile oluşturulan rölatif “ <i>melting curve</i> ” analizi.....	21
Şekil 3.4 Çalışmada kullanılan Lightcycler software 4.0 Vers. programı ile oluşturulan hedefe ait amplifikasyon eğrisi.....	22
Şekil 3.5 Çalışmada kullanılan Lightcycler software 4.0 Vers. programı ile oluşturulan referansa ait amplifikasyon eğrisi.....	22
Şekil 4.1 PS grubunda farklı dilüsyon, hücre kültür süresi (zaman) ve materyal hazırlama türüne (Materyal) göre ON değerlerinin grafiksel analizi.....	35
Şekil 4.2. GMTA grubunda farklı dilüsyon, hücre kültür süresi (zaman) ve materyal hazırlama türüne (Materyal) göre ON değerlerinin grafiksel analizi	36
Şekil 4.3. BMTA grubunda farklı dilüsyon, hücre kültür süresi (zaman) ve materyal hazırlama türüne (Materyal) göre ON değerlerinin grafiksel analizi.....	38
Şekil 4.4. 1/1 Dilüsyonda, hücre kültür süresi (zaman) ve materyal hazırlama türünde (Materyal) deney gruplarına göre ON değerlerinin grafiksel analizi.....	39
Şekil 4.5. 1/2 Dilüsyonda, hücre kültür süresi (zaman) ve materyal hazırlama türünde (Materyal) deney gruplarına göre ON değerlerinin grafiksel analizi.....	41
Şekil 4.6. 1/4 Dilüsyonda, hücre kültür süresi (zaman) ve materyal hazırlama türünde (Materyal) deney gruplarına göre ON değerlerinin grafiksel analizi.....	42
Şekil 4.7. 1/10 Dilüsyonda, hücre kültür süresi (zaman) ve materyal hazırlama türünde (Materyal) deney gruplarına göre ON değerlerinin grafiksel analizi	44

TABLULAR	SAYFA
Tablo 3.1. cDNA sentezi reaksiyon bileşenleri.....	19
Tablo 3.2. RT-PCR reaksiyon bileşenleri.....	20
Tablo 4.1. Gruplara göre ON değerleri (genel).....	26
Tablo 4.2. Gruplarda materyal hazırlama türüne göre ON değerleri.....	26
Tablo 4.3. Materyal hazırlama türünde gruplara göre ON değerleri.....	27
Tablo 4.4. Gruplarda hücre kültür süresine göre ON değerleri.....	28
Tablo 4.5. Hücre kültürü süresinde gruplara göre ON değerleri.....	28
Tablo 4.6. Gruplarda dilüsyonlara göre ON değerleri.....	29
Tablo 4.7. Dilüsyonlarda gruplara göre ON değerleri.....	30
Tablo 4.8. Deney gruplarında farklı dilüsyon ve hücre kültürü sürelerine göre ON değerleri.....	31
Tablo 4.9. Deney gruplarında farklı dilüsyon ve materyal hazırlama türüne (Materyal) göre ON değerleri.....	33
Tablo 4.10. PS grubunda farklı dilüsyon, hücre kültür süresi (zaman) ve materyal hazırlama türüne (Materyal) göre ON değerleri.....	34
Tablo 4.11. GMTA grubunda farklı dilüsyon, hücre kültür süresi (zaman) ve materyal hazırlama türüne (Materyal) göre ON değerleri.....	36
Tablo 4.12. BMTA grubunda farklı dilüsyon, hücre kültür süresi (zaman) ve materyal hazırlama türüne (Materyal) göre ON değerleri.....	37
Tablo 4.13. 1/1 Dilüsyonda, hücre kültür süresi (zaman) ve materyal hazırlama türünde (Materyal) deney gruplarına göre ON değerleri.....	39
Tablo 4.14. 1/2 Dilüsyonda, hücre kültür süresi (zaman) ve materyal hazırlama türünde (Materyal) deney gruplarına göre ON değerleri.....	40
Tablo 4.15. 1/4 Dilüsyonda, hücre kültür süresi (zaman) ve materyal hazırlama türünde (Materyal) deney gruplarına göre ON değerleri.....	41
Tablo 4.16. 1/10 Dilüsyonda, hücre kültür süresi (zaman) ve materyal hazırlama türünde (Materyal) deney gruplarına göre ON değerleri.....	43

GİRİŞ

Pulpa kaplaması, pulpa yaralanmalarında açıkta kalan vital pulpada dentin formasyonunu kolaylaştırmak için dental materyaller ile yapılan bir tedavi yaklaşımıdır. Kaplama materyallerinin uygulanmasındaki temel amaç pulpa hücrelerinin dentinojenik potansiyellerini uyarabilmektir (1).

Osteokalsin (OK) ve osteonektin (ON) kemik ve dentininin yapısında bulunan major non-kollajen proteinlerdir (2,3). Temel olarak osteoblastik hücrelerden sentezlenmekte olan bu proteinler sert dokunun mineralizasyonunda görev alırlar. Dental pulpa hücrelerinin, özellikle doku yaralanması veya hasarı ile ilişkili dentinogenezis süresince odontoblastlara dönüşme ve mineralize matriks üretebilme potansiyeli mevcut olup yapılan çalışmalarda bu hücrelerin ekstraselüler matrikse ait kollajen ve non-kollajen yapıdaki proteinleri sentezleyebildikleri gösterilmiştir.

Mineral trioksit agregat (MTA) diş ve çevre dokular arasındaki bağlantı noktalarını örtülemek için geliştirilmiş bir materyaldir. Günümüzde MTA mükemmel örtüleme özelliği ve biyouyumluluğu sayesinde geniş çevrelerce kabul görmüş bir materyal olup, kök perforasyonlarının tamiri, süt dişlerinin apeksifikasyonu ve konservatif pulpa tedavileri gibi diş hekimliğinin çeşitli alanlarında çok amaçlı olarak kullanılmaktadır. MTA'nın biyouyumluluğu ile ilgili günümüze kadar birçok in vivo ve in vitro çalışma yapılmıştır. Biyouyumluluk bir materyalin kendine özgü uygulanması sonrasında uygun konak doku cevabı oluşturabilmesi olup MTA ile ilgili yapılan bu çalışmaların büyük kısmında fare lenfoma hücreleri, insan endotelial hücreleri, hamster ovarian hücreleri, SaOS-2 osteosarkom hücreleri ve insan osteosarkom hücreleri gibi gerçek diş dokusu dışında dokular kullanılmıştır. Kullanılan hücrelerin büyük çoğunluğu kanser hücresi olmaları nedeniyle hızlı çoğalma ve ölümsüzlük özelliklerine sahiptirler. Bu nedenle bu hücrelerden yapılan biyouyumluluk çalışmaları gerçek insan dokularından elde edilebilecek sonuçlardan farklılıklar gösterebilir.

Bu çalışmada, diş hekimliğinde pulpa kaplaması amacıyla da kullanılmakta olan MTA'nın dental pulpa fibroblast hücreleri üzerinde osteojenik etkilerini in vitro olarak değerlendirmeyi hedefledik. Bu amaçla OK

ve ON proteinlerine ait genlerin moleküler düzeyde ifade şekli olan mesajcı ribonükleik asit (mRNA) düzeylerini real time polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) yöntemi ile değerlendirerek MTA ve PS varlığında dental pulpa fibroblast hücrelerinin dentinogenezis üzerindeki farklılıklarını karşılaştırmayı amaçladık.

GENEL BİLGİLER

Periyodonsiyum, dişi çevreleyen ve destekleyen doku tabakası olup, oluşumu içinde sement, periodontal ligament ve alveolar kemik yer almaktadır. Dental pulpa, apikal foramen ve yan kanallar aracılığı ile periyodonsiyum ile bağlantı halindedir (4). Mine, dentin ve gingival eklentiler ise oral florayı periyodonsiyum ve pulpadan ayıran oluşumlardır.

Dental pulpa ve periapikal dokuların mikroorganizmalar ve irritan maddeler ile teması, başarısız bir restoratif ve endodontik tedavinin ana nedenlerini oluşturmaktadır (5–7). İdeal bir retrograd veya ortograd dolgu materyali, kök kanal sistemi ile onu çevreleyen dokular arasında yer alan bağlantı yollarını kapatabilmelidir (8). Bunun dışında toksik, karsinojenik, genotoksik özellik göstermemeli, doku sıvılarında çözünmemeli, nem varlığında kapatma özelliği çok etkilenmemeli, radyopak, biyouyumlu ve boyutsal olarak sabit olmalıdır.

Günümüze kadar kök kanal sistemi ile onu çevreleyen dokular arasında yer alan bağlantı yollarının kapatılabilmesi için birçok materyal kullanılmıştır. Amalgam, çinko-oksit-ejenol bazlı simanlar (super-EBA, IRM), kavit, kompozit rezinler ve cam iyonomerler bunlara örnek olarak verilebilir. Bu materyallerin çoğu ideal özellikleri karşılamamakta olup, temel dezavantajları, mikrosızıntı, değişen oranlarda toksisite ve neme karşı hassasiyet göstermeleridir (4).

2.1 Mineral Trioksit Agregat

Mevcut restoratif materyallerin ideal özellikleri tam olarak karşılamıyor olması, mineral trioksit agregatın (MTA) geliştirilmesine olanak sağlamıştır. Başlangıçta kök ucu dolgu materyali olarak kullanılmaya başlanan MTA, son zamanlarda kök kanal dolgu materyali, pulpa kaplaması, pulpotomi, apeksogenezis, apikal bariyer formasyonu ve kök perforasyon tamiri amacıyla da kullanılmaktadır (8).

2.1.1 Kimyasal Özellikleri

Toz şeklinde olan MTA'nın içeriğinde, trikalsiyum silikat ($3\text{CaO}\cdot\text{SiO}_2$), dikalsiyum silikat ($2\text{CaO}\cdot\text{SiO}_2$), trikalsiyum alüminat ($3\text{CaO}\cdot\text{Al}_2\text{O}_3$), tetrakalsiyum alüminoforit ($4\text{CaO}\cdot\text{Al}_2\text{O}_3\cdot\text{Fe}_2\text{O}_3$) ve bizmut oksit (Bi_2O_3) bulunmakta olup, temel yapısını kalsiyum, silisyum (SiO) ve bizmut oksit oluşturmaktadır (9).

Günümüzde MTA ticari olarak 2 formda bulunmaktadır; Gri MTA (GMTA), beyaz MTA (BMTA). Yapılan çalışmalar, GMTA'nın renk değiştirme potansiyeli nedeniyle geliştirilen BMTA'nın daha az miktarda demir, alüminyum ve magnezyum içerdiğini göstermektedir (10). GMTA temel olarak dikalsiyum ve trikalsiyum silikat ile bizmut oksitten oluşurken, BMTA trikalsiyum silikat ve bizmut oksitten oluşmaktadır (11). Her iki MTA tipi ağırlık açısından kabaca %75 portland çimentosu, %20 bizmut oksit ve %5 alçı taşından oluşmaktadır (12).

MTA tozu su ile karıştırıldığında öncelikli olarak kalsiyum hidroksit (KH) ve kalsiyum silikat (KS) sulu bileşeni oluşur ve sonuçta yetersiz şekilde kristalize ve poröz solid bir jele dönüşür (13). Kalsiyum çökeltilerinin oluşması nedeniyle KS oranı azalır. Çökelti oluşturan kalsiyum, KH üretir ki bu MTA'nın hidrasyon sonrası yüksek alkalinitesinin nedenidir. Bununla birlikte KH'nin kaynağı ile ilgili tartışmalar devam etmektedir. Camileri ve diğ. (14) KH'nin dikalsiyum ve trikalsiyum silikat kaynaklı olduğuna inanırken, Dammaschke ve diğ. (15) KH'nin trikalsiyum alüminat hidrojenasyonu kökenli olduğunu belirtmişlerdir.

Bizmut, MTA'nın radyoopaklığını sağlamakla birlikte, MTA hidrasyonu sonrası KH'nin çökmesini etkileyen faktörlerden birisidir (13). Bizmut oksit asidik ortamda çözünmektedir. Bu nedenle MTA'nın enflamatuvar dokularda olduğu gibi asidik ortama konulması bizmut oksit salınımına dolayısıyla da MTA'nın biyouyumluluğunda azalmaya yol açmaktadır (13, 16).

2.1.2 Fiziksel Özellikleri

MTA tozunun hidrasyonu, koloidal yapıda bir jel oluşmasına yol açar ki bu daha sonra sert bir yapıya dönüşür. Karışımın özelliği toz/sıvı oranı, karıştırma metodu, kondanzasyon için kullanılan basınç, nem, MTA tipi, depolama koşulları, pH, kullanılan cihaz, karıştırma ile uygulama arasında geçen süre, materyalin kalınlığı ve ısıya göre değişkenlik göstermektedir. Tüm bu faktörlerin hepsinin standard şekilde kontrol edilmesinin mümkün olmaması nedeniyle, MTA'nın fiziksel özelliklerine yönelik olarak yapılan çalışmalar farklılıklar göstermektedir.

Sertleşme Süresi

MTA, tozun steril su ile 3:1 oranında karıştırılması ile hazırlanmaktadır. MTA'nın sertleşme süresi ortalama 165 ± 5 dakika olup, bu süre amalgam, Super-EBA, IRM gibi materyallerle karşılaştırıldığında uzundur (17). Yapılan bu çalışmada amalgamın sertleşme süresi 4 dakika \pm 30 saniye, Süper-EBA'da 9 dakika \pm 30 saniye, IRM'de ise 6 dakika \pm 30 saniye olarak tespit edilmiştir. Bununla birlikte GMTA'nın sertleşme süresi BMTA'ya göre belirgin şekilde uzundur (9, 18).

Genleşme

Değişik tipte MTA'ların genleşme özelliğini ortaya koymak için yapılan çalışmalarda farklı sonuçlar elde edilmiştir. Yapılan bir çalışma BMTA'nın GMTA'ya göre biraz daha fazla genleştiğini göstermiştir (9, 18). Materyal yüzeylerinin Hank'in dengeli tuz çözeltisi veya steril su ile kaplanarak yapılan karşılaştırmalı bir çalışmada ise GMTA her iki koşulda da BMTA'ya göre daha fazla genleşme göstermiştir (19). Yapılan bu çalışmalar, MTA tiplerinin kompozisyonundaki farklılıkların ve çevresel faktörlerin genleşme üzerinde etkili olduğunu göstermektedir.

Çözünürlük

Çözünürlük üzerine yapılan çalışmalar farklılıklar göstermektedir. Storm ve diğ. (19)' un yaptığı çalışmada BMTA'nın çözünürlüğünün GMTA'ya göre daha belirgin olduğu ifade edilmektedir. Bununla birlikte BMTA'nın PS ile karşılaştırıldığı çalışmalarda değişik sonuçlar elde edilmiştir (19, 20). Yapılan tüm bu çalışmalar, toz-su oranı, MTA tipi, immersiyon süresi gibi faktörlerin çözünürlük üzerinde etkili olduğunu ortaya koymaktadır (19–21).

Baskı Kuvvetlerine Karşı Direnç

MTA'nın baskı kuvvetlerine karşı direnci Super-EBA, IRM ve amalgam ile karşılaştırıldığında ilk 24 saatte belirgin şekilde düşüktür. Ancak üçüncü haftanın sonunda aralarında belirgin bir farklılık kalmamaktadır (17). MTA'nın tipi, MTA'nın depolama koşulları, MTA ile karıştırılan sıvının tipi ve pH'sı, maruz kalınan basıncın şiddeti gibi etkenler baskı kuvvetlerine karşı direnci belirleyen önemli faktörlerdir (19, 22–25).

pH

MTA'nın pH değeri karıştırma sonrası 10,2 iken, bu değer 3 saat sonra 12,5 seviyesine yükselmektedir (17). GMTA ve BMTA'nın pH değerleri karşılaştırıldığında ise, BMTA'nın karışımdan 60 dakika sonra daha yüksek pH değerine sahip olduğu gösterilmiştir (18). MTA'nın bu yüksek pH değerleri, sürekli kalsiyum salınımı ve KH formasyonuna bağlıdır.

Radyoopasite

MTA radyopak özelliğini içeriğinde bulunan bizmut oksitten almaktadır (13). Yapılan çalışmalarda MTA'nın radyoopasitesi 7.17 mm kalınlığında ki alüminyum ile eşdeğer olarak bulunmuştur (17). Bu değer Super-EBA ve IRM ile karşılaştırıldığında daha yüksektir (Cam iyonomer siman <3 mm, Kalzinol, Super- EBA ve IRM 5-8 mm, guta perka 6.1 mm)(26). BMTA ve GMTA içinde eşit miktarda bizmut oksit kullanılıyor olmasına rağmen BMTA'nın daha yüksek radyoopasiteye sahip olduğu ve

bununda muhtemelen içeriklerinde yer alan materyallerin farklılıklarından kaynaklandığı rapor edilmiştir (9, 18).

Partikül Büyüklüğü

Bir çok çalışmada BMTA, GMTA ve PS'nin partikül büyüklüğü ve şekli karşılaştırılmıştır. Bu çalışmalarda BMTA'nın partikül büyüklüğünün, diğer ikisiyle karşılaştırıldığında daha ince olduğu, GMTA ve PS'nin ise birbirine çok benzer olduğu gösterilmiştir (27–29).

2.1.3 Antibakteriyel ve Antifungal Özellikler

Yapılan birçok çalışma MTA'nın bazı mikroorganizmalar üzerinde sınırlı antimikrobiyal etkisi olduğunu göstermektedir. Fakultatif ve zorunlu anaerob bakteriler ile yapılan bir çalışmada, MTA'nın "*Streptococcus fecalis*", "*Staphylococcus aureus*" ve "*Bacillus subtilis*" gibi bazı fakultatif bakteriler üzerinde ve zorunlu anaerobların hiçbirisi üzerinde etkili olmadığı gösterilmiştir (30).

Estrela ve diğ. (31) tarafından yapılan bir çalışmada MTA, KH, PS, Sealapex ve Dycal materyallerinin antimikrobiyal özellikleri karşılaştırılmış ve KH'nin antimikrobiyal etkinliğinin diğerlerine göre daha iyi olduğu gösterilmiştir.

BMTA ve GMTA'nın antifungal etkileri üzerine yapılan çalışmalarda da farklılıklar görülmektedir. Bazı çalışmalar BMTA ve GMTA'nın antifungal etki gösterebildiğini bildirirken, bazılarıda GMTA'nın sınırlı etkili olduğu veya hiç etkili olmadığı ifade etmektedir. Örneğin, Al-Nazhan ve diğ. (32) tarafından in vitro olarak yapılan bir çalışmada taze olarak hazırlanan ve 24 saatte sertleşmiş MTA'nın "*Candida albicans*" üzerinde antifungal etki oluşturabildiği gösterilmiştir. Al-Hezaimi ve diğ. (33) tarafından BMTA ile "*Candida albicans*" üzerinde yapılan bir çalışmada ise MTA konsantrasyonunun antifungal etki üzerinde önemli bir faktör olduğunu göstermektedir.

Sonuç olarak incelenen literatürler MTA'nın antibakteriyel ve antifungal etkinliğinin olduğunu, toz-sıvı oranının azaltılmasının bu etkiyi olumsuz olarak etkilediğini ortaya koymaktadır (8).

2.1.4 Sızdırmazlık Özelliği

Endodontik tedavide başarısızlık, çoğu zaman irritan maddelerin patolojik olarak etkilenmiş kök kanallarından periradiküler dokulara sızması sonucu gerçekleşmektedir. Bu nedenle başarılı bir endodontik tedavi için kullanılan materyalin kapama özelliği çok iyi olmalı, bakteriler başta olmak üzere irritan maddelerin geçişine olanak vermemelidir. Boyalar (metilen mavisi, fuksin, rodamin B, gümüş nitrat vb.), sıvı filtrasyonu, protein sızıntısı, bakteriyel sızıntı gibi çeşitli yöntemler uygulanarak, MTA'nın farklı kullanım şekillerine göre sızdırmazlık özelliğini ortaya koyan birçok çalışma yapılmıştır.

—Kök ucu dolgu materyali olarak kullanıldığında;

- a) MTA'nın diğer dolgu materyalleri ile karşılaştırıldığında boya penetrasyonuna daha dirençli olduğu, dentinal duvar kalınlığı, boyanın pH'sı, boyanın tipi, şelasyon yapıcı ajanlarla uygulama öncesi ön işlem, çevre koşulları, MTA'nın boya içine yerleştirilmeden önceki sertlik durumu gibi faktörlerin bu direnç üzerinde etkili olduğu gösterilmiştir (34–41).
- b) Sıvı filtrasyonu çalışmaları MTA'nın amalgam ve Super EBA'ya göre daha üstün olduğunu göstermiştir (42–45).
- c) Valois ve Costa (46) tarafından sığır albümini kullanılarak yapılan bir çalışmada MTA kalınlığının kapatma özelliği üzerine olan etkisi incelenmiştir. Bu çalışmaya göre 4 mm kalınlığındaki MTA'nın, daha ince kalınlıklara göre daha az sızdırma yaptığı tespit edilmiştir. Yine diğer bir çalışmada pH'nın protein sızıntısı üzerine olan etkisi incelenmiş ve bazik pH'da saklanan dişlerin, asidik pH'da saklanana göre sızdırmaya karşı daha dirençli olduğu tespit edilmiştir (47).
- d) MTA ile ilgili birçok bakteriyel sızıntı çalışması yapılmıştır. Bu çalışmaların çoğu MTA'nın amalgam ve Super EBA ile karşılaştırıldığında bakteriyel penetrasyona daha dirençli olduğunu göstermiştir (48–51). Endotoksin, gram negatif bakteri hücre duvarının bir bileşeni olup, endotoksinlere

—Perforasyon tamir materyali olarak kullanıldığında;

- a) Yapılan birçok çalışma MTA perforasyon tamir materyali olarak kullanıldığında boya penetrasyonuna direncinin daha fazla olduğunu göstermiştir (53–55). Bununla birlikte MTA'nın uzun sertleşme süresi, önemli bir dezavantaj olarak karşımıza çıkmaktadır.
- b) Sıvı filtrasyon çalışmaları, MTA'nın perforasyon tamir materyali olarak kullanıldığında diğer materyallere karşı bir üstünlük sağlamadığının göstermişlerdir (56).
- c) *Fusobacterium nucleatum* kullanılarak yapılan bir bakteriyel sızıntı çalışmasında, MTA'nın amalgama göre daha iyi olduğu gösterilmiştir (57). MTA ve PC'yi karşılaştıran diğer bir çalışmada ise iki materyal arasında önemli bir fark bulunamamıştır (58).

Sonuç olarak tüm yapılan çalışmaları değerlendirdiğimizde MTA'nın belli bir oranda mikro sızıntı gösterdiğini, diğer retrograd dolgu maddelerinden amalgam ve çinko oksit öjenol simanı ile karşılaştırıldığında çok daha üstün özellikler gösterdiğini söyleyebiliriz.

2.1.5 Biyouyumluluk Özelliği

Biyouyumluluk, malzeme ve vücut sıvılarının kimyasal etkileşimi ve bu etkileşimin fizyolojik sonuçlarının vücuda ne kadar zarar verip vermediğidir. Bir malzemenin biyouyumlu olması için bulunduğu canlıdaki fizyolojik ortam tarafından kabul edilmesi gerekir. Diğer bir deyişle materyalin kendine özgü uygulamaları sonrası, uygun konak doku cevabı oluşturabilmesi gerekmektedir.

Endodontik tedavi sürecinde kök kanalının doldurulmasında kullanılan materyaller, periapikal bağ dokusu ile temas halindedir. Kullanılan materyalin biyouyumluluğunun düşük olması, temas bölgesinde enflamatuar

reaksiyonların gelişmesine ve tedavide başarısızlığa yol açabilmektedir. Bu nedenle konservatif pulpa ve endodontik tedavilerde kullanılacak materyaller, lokal etki oluşturarak pulpal ve periodontal dokularda irritasyon oluşturmamalı, sistemik dolaşıma geçerek sistemik toksisiteye ve alerjik reaksiyonlara neden olmamalıdır.

Günümüze kadar MTA'nın biyouyumluluğu ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır. Yapılan bu çalışmaların bazılarında kullanılan hücre tipi, çalışma süresi, materyalin hazırlanma şekli gibi faktörlere bağlı farklı sonuçlar gözlenmekle birlikte MTA'nın genel olarak biyouyumluluğunun yüksek olduğunu görmekteyiz.

Kettering ve Torabinejad'ın (59) Salmonella typhimuriumu kullanarak yaptıkları standart Ames mutajenite testinde, MTA'nın mutajen olmadığı gösterilmiştir.

Yine fare beyni kortikal hücrelerinde, MTA, diaket, amalgam ve Super EBA'nın nörotoksitesinin karşılaştırıldığı bir çalışmada, MTA dışında tüm materyallerin nörotoksik olduğu gösterilmiştir (60).

Masuda ve diğ. (61) tarafından fareler üzerinde yapılan bir çalışmada MTA'nın mikrosirkulasyon üzerinde bir yan etkisi olmadığı, uygulamadan 4 hafta sonra mikrosirkulasyonun tam olarak gerçekleştiği ve yeni damar oluşumu gösterilmiştir. Yine Tunca ve diğ. (62) tarafından 2007 yılında fareler üzerinde yapılan bir çalışmada MTA'nın, doz bağımlı olarak damar kontraksiyonunu arttırdığı gösterilmiştir.

Çeşitli hücre kültür yöntemleri ile yapılan birçok çalışmada MTA'nın en az sitotoksik dental materyallerden biri olduğu gösterilmiştir. Torabinejad ve diğ. (63)'ün 4 farklı materyali karşılaştırarak yaptığı çalışmada taze karıştırılmış ve sertleşmiş MTA ile amalgamın Super EBA ve IRM'ye göre daha az sitotoksik olduğunu göstermiştir. MTA, Super EBA ve amalgamın karşılaştırıldığı diğer bir çalışmada taze karıştırılmış MTA'nın diğer ikisine göre daha az sitotoksik olduğu saptanmıştır (64).

Haglund ve diğ. (65)'in fare fibroblast ve makrofaj hücrelerini kullanarak, taze karıştırılmış ve sertleşmiş MTA, IRM, amalgam ve retroplast materyallerini karşılaştırdıkları çalışmada, tüm kök ucu dolgu maddelerinin,

fare fibroblast ve makrofajlarının büyümesini inhibe ettiği, amalgam ve MTA'nın hücre büyümesine etkilerinde belirgin bir farklılık bulunmadığını saptamışlardır.

Camp ve diğ. (66)'nin Geristore, MTA, amalgam ve Super EBA gibi değişik kök ucu dolgu materyallerinin insan periodontal ve gingival fibroblast hücreleri ile bağlanmalarını inceledikleri çalışmada en iyi bağlanma Geristore'da gözlenmiştir.

Kimyasal bileşimlerinin farklılık göstermesi nedeniyle BMTA ve GMTA'yı karşılaştırmak üzere yapılan bir çalışmada, BMTA, GMTA 1 ve 28 gün süreyle osteoblast hücre kültüründe muamele edilmiş, 1günlük uygulamanın biyouyumluluğunun, 28 günlük uygulamaya göre daha iyi olduğu gösterilmiştir (16).

MTA varlığında değişik tipte sitokin ve biyolojik markırların sentezini inceleyen çok sayıda hücre kültürü çalışması mevcuttur. Huang ve diğ. (67)'nin enflamatuar sitokinlerin sentezi üzerine yaptıkları çalışmada MTA varlığında IL-4 ve IL-10 düzeyinin Super EBA ve KH bazlı materyale (Life) göre daha fazla olduğunu göstermişlerdir.

Pistorius ve diğ. (68)'in gingival fibroblast hücrelerini kullanarak MTA, amalgam ve inert titanyum alaşım kullanımında hücrel PGE₂ sentezini karşılaştırdıkları çalışmada, amalgamın PGE₂ sentezini azalttığını, MTA ve inert titanyum alaşımın ise arttırdığını göstermişlerdir.

2.1.6 MTA'nın Klinik Kullanım Alanları

Pulpa kaplaması, kök ucu kapatılması ve furkal perforasyonların tamiri gibi çeşitli klinik uygulamalarda alternatif olarak kullanılmasına rağmen MTA ilk olarak kök kanal ucu dolgu materyali olarak kullanılmıştır (69). Biyouyumluluk, iyi örtüleme yeteneği, dental pulpa ve periradiküler dokuların rejenerasyonunu artırma kapasitesi MTA'nın klinik kullanımındaki temel özellikler olarak karşımıza çıkmaktadır.

MTA'nın klinikte kullanım alanlarını aşağıdaki gibi sınıflandırabiliriz (69);

- a) İyatrojenik perforasyonların kanal içi tamiri
- b) Rezorpsiyon tedavisi
- c) Cerrahi ve cerrahi olmayan yaklaşımlarda dolgu maddesi olarak
- d) Vital pulpa tedavisinde kaplama maddesi olarak
- e) Apeksifikasyon sırasında apikal bariyer oluşturmak için
- f) Kanal tedavili dişlerde uygulanan internal ağartmada bariyer olarak.

2.2 Portland Siman

MTA'nın temel yapısını oluşturması, maliyetinin daha az ve daha kolay ulaşılabilir olması gibi sebeplerden dolayı, Portland siman (PS) MTA'ya bir alternatif olarak büyük ilgi görmüştür (70). Funteas ve diğ. (71)'in MTA ve PS'yi karşılaştırdıkları çalışmada, PS'de bizmut oksit (Bi_2O_3) saptanamaması dışında her iki materyal arasında büyük benzerlik olduğu gösterilmiştir.

Kalsiyum oksit (CaO), silika (SiO_2), aluminyum oksit (Al_2O_3) ve demir oksit (Fe_2O_3), PS'nin temel ham maddelerini oluşturmaktadır (15). Hazırlanma aşamasında, bu bileşenler istenilen oranda karıştırılıp, öğütüldükten sonra $1400\text{--}1600\text{ }^\circ\text{C}$ 'ye kadar ısıtılırlar. Simanın sertleşme süresinin kontrol edilebilmesi için "gypsum" ($\text{CaSO}_4\cdot 4\text{H}_2\text{O}$) eklenir. Trikalsiyum silikat ($3\text{CaO}\cdot\text{SiO}_2$), dikalsiyum silikat ($2\text{CaO}\cdot\text{SiO}_2$), trikalsiyum aluminat ($3\text{CaO}\cdot\text{Al}_2\text{O}_3$) ve tetrakalsiyum aluminoferrit ($4\text{CaO}\cdot\text{Al}_2\text{O}_3\cdot\text{Fe}_2\text{O}_3$) ortaya çıkan son ürünün içeriğini oluşturur.

PS'nin biyouyumluluğuna yönelik olarak yapılan çalışmalarda oldukça olumlu sonuçlar vermiştir. Abdullah ve diğ. (72)'nin SaOS-2 osteosarkoma hücrelerinde cam iyonomer, MTA, PS'yi kullanarak karşılaştırmalı olarak yaptığı biyouyumluluk çalışmasında, PS'nin toksik olmadığını ve kemik iyileşmesine olumlu etkileri olduğunu göstermişlerdir. Saidon ve diğ. (73)'ün domuz mandibulasında MTA ve PS'nin sitotoksik etkilerini in vitro olarak karşılaştırdıkları çalışma ile her iki materyalinde benzer biyouyumluluk

gösterdiğini ortaya koymuşlardır. Ribeiro ve diğ. (74)'ün PS MTA'nın fare lenfoma hücrelerinde in vitro olarak yaptıkları çalışmada, her iki materyalin de sitotoksik olmadıkları bildirilmiştir.

PS ve MTA'nın fiziksel ve biyouyumluluk özelliklerine yönelik yapılan tüm bu çalışmalar sonucunda, her iki materyalin benzer biyolojik ve yapısal özelliklere sahip olduğunun gösterilmesi, MTA'nın pahalı bir materyal olması PS'nin klinik uygulamalarda MTA'ya alternatif olabileceği fikrini ortaya çıkarmıştır.

2.3 Osteokalsin

Osteokalsin (OK), osteoblastlar tarafından sentezlenen kemik ve dentinin yapısında bulunan non-kollajenöz yapıda bir proteindir. "Bone gamma-carboxyglutamate (gla) protein" (BGLAP) olarak da bilinen OK, BGLAP geni tarafından kodlanmakta olup bu gen insanda birinci kromozomun uzun kolunda (1q25-1q31) bulunmaktadır (75,76). OK vücutta kemik mineralizasyonu ve kalsiyum iyon dengeside rol alması dışında bazı metabolik süreçlerde de rol alır (77). Örneğin OK, vücutta bir hormon gibi hareket ederek pankreas beta hücrelerinden insülin salınımını artırırken, aynı zamanda yağ hücrelerinden insülin duyarlılığını arttıran adinopektin salınımını uyarır.

OK, daha öncede belirtildiği gibi osteoblastlara spesifik olan birkaç proteinden birisi olup, hormonlara ait bir çok özelliğe sahiptir. Hücre spesifik bir molekül olup, pre-pro molekül olarak sentezlenip genel dolaşıma salınır (77).

OK, kalsiyum iyonunu kemik matriksine bağlayan bir protein olup gelişen kemikte kemik oluşumuna katkıda bulunur. Kemik formasyonunun bir biyomarkırı olarak kullanılmakta olup kemik hastalıklarının değerlendirilmesinde kullanılır. Örneğin osteoporoz hastalarında tedavi sürecinde OK'nın artmış serum düzeyi, kemik mineral dansitesinde (KMD) iyileşmenin bir göstergesi olarak kullanılmaktadır.

Ivanovski ve diğ. (2) gingival ve periodontal ligament fibroblastları üzerinde kemikle ilişkili makromoleküllerin ifade şekillerini inceledikleri

çalışmada, periodontal ligament hücrelerinin osteoblastik özelliklere sahip olduğunu, ekstraselüler matrikse ait sert ve yumuşak konnektif dokuyu oluşturabildiğini ifade etmişlerdir. Gingival fibroblast hücrelerinde ise bu özellik saptanamamıştır.

2.4 Osteonektin

Osteonektin (ON), non-kollajenöz yapıda bir glikoprotein olup, kemik formasyonu süresince osteoblastlar tarafından sentezlenmektedir. ON, **SPARC** (secreted protein, acidic, cysteine-rich) olarak bilinmekte olup 5 nci kromozomun uzun kolunun q31.1 –q32 bölgesinden kodlanmaktadır (78).

Mineralizasyonun başlangıç döneminde ve mineral kristal formasyonunda rol aldığı bilinmektedir (79). Kalsifikasyonun, Ca^{+2} tuzlarının kollajen fibriller üzerine çökmesi ile başlamakta olup bunu proteoglikanlar ve Ca^{+2} bağlamada yüksek afinitesi olan glikoproteinler (osteonektin) başlatır.

ON, kemik yapısında bulunan hidroksiapatit [(kalsiyum tuzu) $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$] ve kollajene seçici olarak bağlanma gösterir (80). Sementogenezis süresince, ON fibroblast, sementoblast ve sementosit hücreleri tarafından sentezlenir (81). ON'nin dentinogenezis ve sementogenezis süresince ekspresyonu, ilgili dokunun kalsifikasyonu ile yakından ilişkilidir.

Martinez ve Araújo (3)'ün dental pulpa ve gingival fibroblast hücrelerinde ekstraselüler matriks proteinlerinin ifade şeklini inceledikleri in vitro çalışmada pulpal fibroblast hücrelerinin osteonektin yönünden pozitif olduğunu ortaya koymuştur. Bu bulgu dental pulpa fibroblast hücrelerinin fizyolojik uyarılar ile odontoblastlara dönüşebildiğini ve dolayısıyla sert doku mineralizasyonunda, dentin formasyonunda fonksiyon görebildiğini göstermektedir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma GATA Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü Diş Hastalıkları ve Tedavisi AD.'ndan Prof. Dr. Yaşar Meriç TUNCA'nın yöneticiliğinde, Tıbbi Genetik BD'dan Prof. Dr. Yusuf TUNCA, Uzm. Dr. Deniz TORUN, Uzm. Dr. Salih KOZAN, GATA Araştırma ve Geliştirme Merkezinden Biyolog Meral SARPER ve Biyolog Pınar ELÇİ'nin katılımı ve Gülhane Askeri Tıp Akademisi Komutanlığı Araştırma Bilimsel Kurulu (AR-2010/71 numaralı ve 11 Ekim 2010 tarihli proje) desteği ile gerçekleştirilmiştir. Çalışma Gülhane Askeri Tıp Akademisi Etik Kurulu tarafından 21 Şubat 2011 tarihinde (No:167) onaylanmıştır. Çalışma Mart 2011- Haziran 2011 tarihleri arasında Araştırma Bilimsel Kurulu'nun 15.000 TL'lik bütçe desteği ile sarf malzemeleri alınarak yapılmıştır.

3.1 Hücre Kültürünün Oluşturulması

Bu çalışmada periodontal olarak sağlıklı, ortodontik çekim endikasyonu olan gönüllü hastaların dişlerine ait dental pulpa dokusu kullanılmıştır. Doğrudan çalışmaya yönelik olarak herhangi bir kişiden diş çekimi yapılmamıştır. Gönüllü bireylerden elde edilen doku örnekleri taşıma solüsyonuna alındıktan sonra laboratuara getirilmiş ve steril petri kabına alındıktan sonra yıkama yapılarak hücre kültürü için hazır hale getirilmiştir. Doku örnekleri 25 cm²'lik doku kültür kaplarına (flask) aktarıldıktan sonra üzerine %10 fetal kalf serumu, %1 penisilin-streptomisin ve %2 L-glutamin içeren 3 ml DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Biological Industries, 25115, Kibbutz Beit Haemak, Israel) besiyeri ilave edildi. Doku kültür kabının ağzı hafif açık bırakılarak, %5 CO₂ varlığında ve 37 °C' de etüve hücrelerin üremesi için kaldırıldı. Üç günde bir, hücre kültür besiyeri tazelenerek hücrelerin üremesi invert ışık mikroskobu altında kontrol edildi. Yeterli üreme elde edildikten sonra flask içinde bulunan 3 ml besiyeri alındı. Flask zeminine yapışan hücrelerin kap yüzeyinden kalkmaları için 1,5 ml tripsin-EDTA konularak 5 dakika süreyle 37 °C'de bekletildi. Hafif pipetaj ile hücrelerin birbirinden iyice ayrılması sağlandı. Doku kültür kabına 3 ml. lik DMEM besiyeri eklenerek tripsin-EDTA'nın aktivitesi inhibe edildi. Altıncı pasajlamadan sonra elde edilen dental pulpa fibroblast hücrelerinin bir kısmı

daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere stok olarak kullanıldı ve hücre kültür işlemine devam edildi.

3.2 MTA ve PS'nin Hazırlanışı

Çalışmada MTA ve PS taze hazırlanmış ve sertleşmiş olmak üzere iki şekilde hazırlandı. Taze olan örneği hazırlamak için GMTA, BMTA ve PS üretici firmanın talimatları doğrultusunda (100 mg) steril su ile hazırlandıktan sonra 2 mg/well olacak şekilde 15 ml.'lik falkon tüpü içine konuldu. Daha sonra üzerlerine 300, 600, 900 ve 2700 µl DMEM eklendi. Sertleşmiş materyal hazırlanırken GMTA, BMTA ve PS yine üretici firmanın talimatları doğrultusunda (100 mg) steril su ile hazırlandıktan sonra 0,3 x 0,5 mm. çapında moldlar içine aktarıldı ve 37 °C'de 72 saat süreyle tutularak sertleşmesi sağlandı. Sertleşmesini tamamlayan materyaller 2 mg/well olacak şekilde 15 ml.'lik falkon tüpü içine konduktan sonra üzerlerine 300, 600, 900 ve 2700 µl DMEM eklendi. Taze ve sertleşmiş materyaller daha sonra 37 °C'de 24 saat süreyle tutularak materyallerin sıvı içine kimyasal salınım yapması sağlandı. Solüsyonlar daha sonra 0,2 µl'lik filtrelerden geçirildi ve böylece iki farklı şekilde hazırlanmış 1:1, 1:2, 1:4 ve 1:10'luk dilüsyonlarda solüsyonlar elde edilmiş oldu. Elde edilen solüsyonlar daha sonra ultraviyole ışık altında tutuldu.

3.3 Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)

3.3.1 RT-PCR Öncesi Hücre Kültürü

24'lük doku kültür kapları içine hücre kültürü ile çoğaltılan dental pulpa fibroblast hücreleri ekilerek üzerlerine 1 ml. DMEM solüsyonu eklendi. Örnekler yaklaşık 1×10^6 hücre oluşana ve tüm yüzeyi kaplayana kadar %5 CO₂ varlığında ve 37 °C' de etüvde tutuldu. Besiyeri her üç günde bir değiştirilerek hücre çoğalması invert ışık mikroskobunda izlendi (Şekil 3.1). Yeterli hücre üremesi sağlandıktan sonra her bir örnekten altı kuyucuk olacak şekilde sertleşmiş ve taze BMTA, GMTA ve PS' ye ait :1, 1:2, 1:4 ve 1:10'luk dilüsyonlardan 200 µl eklendi ve tekrar %5 CO₂ varlığında ve 37 °C' de etüve kaldırıldı. 24 ve 72nci saatlerin sonunda doku kültür kabının tabanına yapışmış halde bulunan hücreler RNA izolasyonu için 1.5 ml.lik ependorf

tüplerine alındı. Bu işlem için öncelikli olarak flask zeminine yapışan hücrelerin kap yüzeyinden kalkmaları için 500 µl tripsin-EDTA konularak 5 dakika süreyle 37 °C'de bekletildi. Hafif pipetaj ile hücrelerin birbirinden iyice ayrılması sağlandı. Doku kültür kabına yine 500 µl fetal kalf serumu eklenerek tripsin-EDTA'nın aktivitesi inhibe edildi. Daha sonra örnekler 1.5 ml.lik ependorf tüplerine alınarak 1300 rpm'de 5 dakika süreyle santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üstte kalan süpernatant uzaklaştırılarak örnekler üzerine 500 µl PBS eklenerek -80 °C'de RNA izolasyonu yapılana kadar bekletildi.



Şekil 3.1: RNA izolasyonu için yapılan hücre kültürü ve dental pulpa fibroblast hücrelerinin invert ışık mikroskobundaki görüntüsü

3.3.2 RNA İzolasyonu

RNA izolasyonu AxyPrep Multisource Total RNA Miniprep Kit (Axygen Biosciences, ABD) kullanılarak yapıldı. RNA izolasyonunda daha önce hücre kültürü sonrası PBS içinde saklanan hücre örnekleri kullanıldı. Hücreler yaklaşık 2.000 x g'de 5 dakika santrifüj edildi. Supernatant atıldıktan sonra tüp içinde kalan pellet üzerine 400 µl hücre lizis tamponu (Buffer R-I) eklenip hücreler homojenize edildi. Daha sonra 150 µl nötralizasyon tamponu (Buffer R-II) eklendi ve 15-30 saniye vortekslendi. Daha sonra 12.000 x g'de 5 dakika süreyle santrifüj edilerek DNA ve protein yapılarının çökmesi RNA molekülünün ise asılı kalması sağlandı. Santrifüj sonrası supernatant 1.5 ml'lik mikro tüplere aktarıldı. Tüpler üzerine 250 µl izopropanol eklenerek vortekslendi. Daha sonra materyal "*spin column*" içine aktararak 6.000 x

g'de 1 dakika süreyle santrifüj edildi. 500 µl yıkama tamponu (Buffer W1A) eklenerek 12.000 x g'de 1 dakika süreyle santrifüj edildi. 700 µl "desalting" tamponu (Buffer W2) eklenip 12.000 x g'de 1 dakika süreyle santrifüj edildi. Bu yıkama işlemi bir kez daha tekrar edildikten sonra 12.000 x g'de boş olarak tüpler çevirilerek rezidüel yıkama solüsyonlarının uzaklaşması sağlandı. Daha sonra "columlar" temiz 1.5 ml'lik mikro tüp içine aktararak üzerine 70 µl "elüsyon" tamponu (Buffer TE) eklendi ve 1 dakika süreyle oda ısısında bekletildi. 12.000 x g'de 1 dakika süreyle santrifüj edilerek "spin kolum" üzerinde bağlı olan RNA molekülünün temiz mikro tüp içine geçmesi sağlandı. Elde edilen RNA molekülü bir sonraki çalışmaya kadar -80 °C'de muhafaza edildi.

3.4.3 cDNA Sentezi

RNA molekülünden gen ekspresyon çalışması yapılabilmesi için öncelikli olarak tek zincirli RNA molekülünün revers transkriptaz enzimi ile çift zincirli hale getirilmesi gerekmektedir. Bu amaçla cDNA sentezinde "RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit" (Fermentas Life Sciences) kullanıldı. 0,2 ml.'lik reaksiyon tüplerine RNA, oligo (dT) primer ve steril su eklendi ve 65 C° de 10 dakika tutularak primer ve RNA'nın denatürasyonu sağlandı. Sonrasında reaksiyon tüplerine Tablo 3.1' de yer alan diğer bileşenler eklenerek cDNA sentez işlemi 42 C° de 60 dakikada tamamlandı. Sentez sırasında Oligo (dT) primerler kullanıldığı için sadece mRNA' lar cDNA' ya çevrildi. Reaksiyon sonrası elde edilen cDNA'lar -20 C° de saklandı.

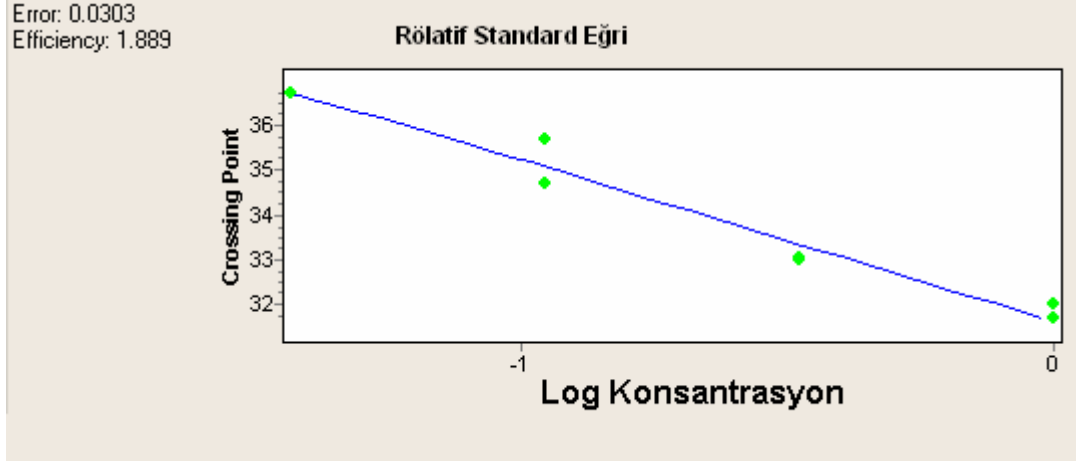
Tablo 3.1. cDNA sentezi reaksiyon bileşenleri.

Reaksiyon Bileşenleri	1 Örnek için
Total RNA	0.1-5 µg
“DEPC-Treated” su	9 µl
Oligo (dT) Primer	1 µl
5X Buffer	4 µl
RNase İnhibitör	1µl
Deoksinükleotid Mix (dNTPs)	2 µl
M-MuLV Reverse Transcriptase	1 µl
TOPLAM	20 µl

3.3.4 Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)

cDNA sentezini takiben yapılan kantitatif RT-PCR yöntemi hızı ve kolaylığı nedeniyle gen ekspresyon analizlerinde en fazla tercih edilen yöntemdir. Yöntem olarak rölatif kantitasyon yöntemi kullanıldı. Rölatif kantitasyon işlemi için SYBR Green I kullanıldı. Bu işlem için Light Cyler FastStart DNA Master SYBR Green I kiti (Roche-Almanya) kullanıldı. Çalışmada olabilecek metotsal hataları düzeltmek maksadı ile ekspresyonunun hücreler arasında farklı olmadığı varsayılan “*glukoz 6 fosfat dehidrogenaz*” (G6PD) geni referans gen olarak kullanıldı.

Rölatif kantitasyon yönteminde endojen referans kullanılarak (G6PD), reaksiyona eklenen total RNA miktarındaki olabilecek farklılıklara karşın ekspresyon düzeyi ölçülmek istenen hedef mRNA'nın normalizasyonu sağlandı. cDNA sentezi ve RT-PCR işlemlerinin, verimliliğinin normalizasyonu için rölatif standart eğri kullanıldı. Bu eğrinin çizilmesi için normal örneklerden izole edilen RNA 1, 1/3, 1/9 1/27 1/81 dilusyon halinde hazırlandı. Bu dilusyonlar kullanılarak kantitatif RT-PCR gerçekleştirildi. Reaksiyon sonrası Lightcycler software 4.0 Vers. programı kullanılarak rölatif standart eğri hazırlandı (Şekil 3.2).



Şekil 3.2 Çalışmada kullanılan Lightcycler software 4.0 Vers. programı ile rölatif standart eğri.

Reaksiyon, aşağıda belirtilen sikluslar ve reaksiyon bileşenleri (Tablo 3.2) kullanılarak yapıldı.

- Başlangıç siklusu → Denatürasyon : 95 C° de 10 dk.
- Amplifikasyon siklusu → Denatürasyon : 95 C° de 10 sn.
Bağlanma : 61 C° de 05 sn.
Uzama : 72 C° de 10 sn.

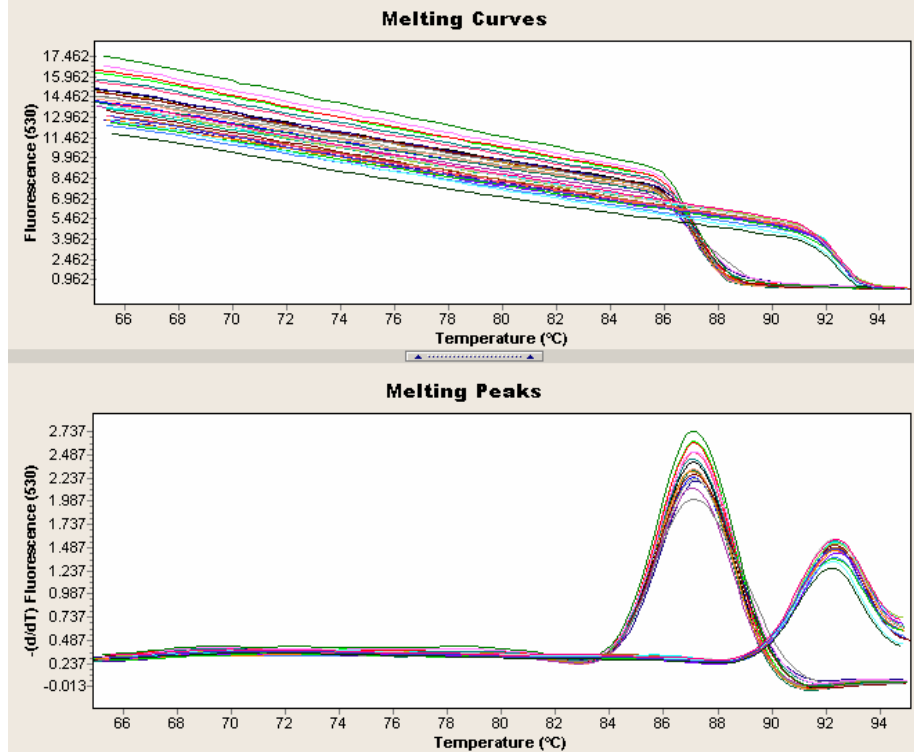
Amplifikasyon siklusunda belirtilen üç basamak 45 kez tekrar edildi.

- "Melting curve" siklus → 65 C° den 0.1 C°/sn yükselecek şekilde 95C° ye çıkarılması
- Soğutma siklus → 40 C° de cihazın soğutulması

Tablo 3.2. RT-PCR reaksiyon bileşenleri.

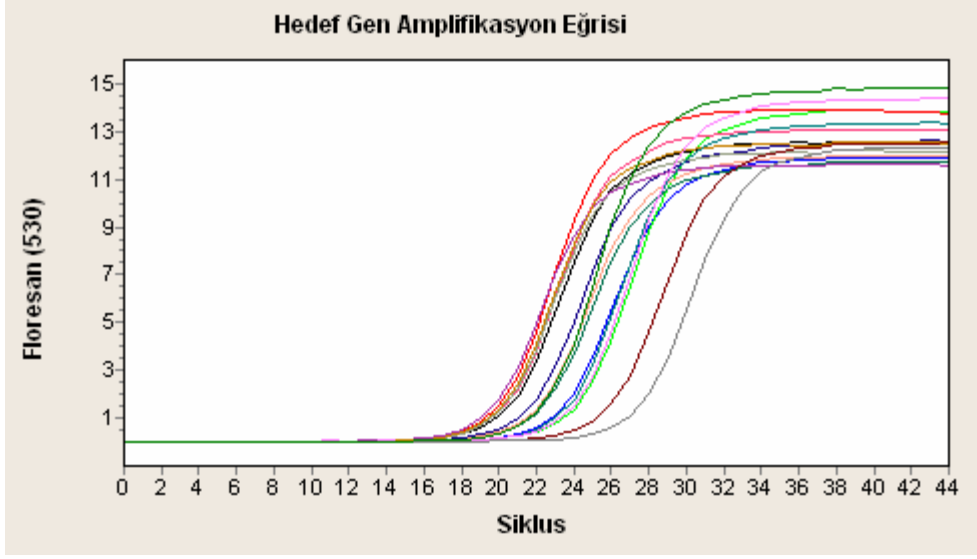
RT-PCR Reaksiyon Bileşenleri	1 reaksiyon
Forward primer	1.25 µl
Reverse primer	1.25 µl
SYBR Green I Miks	2.0 µl
MgCl ₂	2.0 µl
dH ₂ O	11.5µl
gDNA	2.0 µl
Total Volüm	20.0 µl

Kurulan her reaksiyonda “melting curve” analizi ile genotiplendirme yapılarak RT-PCR’nun spesifikliği değerlendirildi (Şekil 3.3).

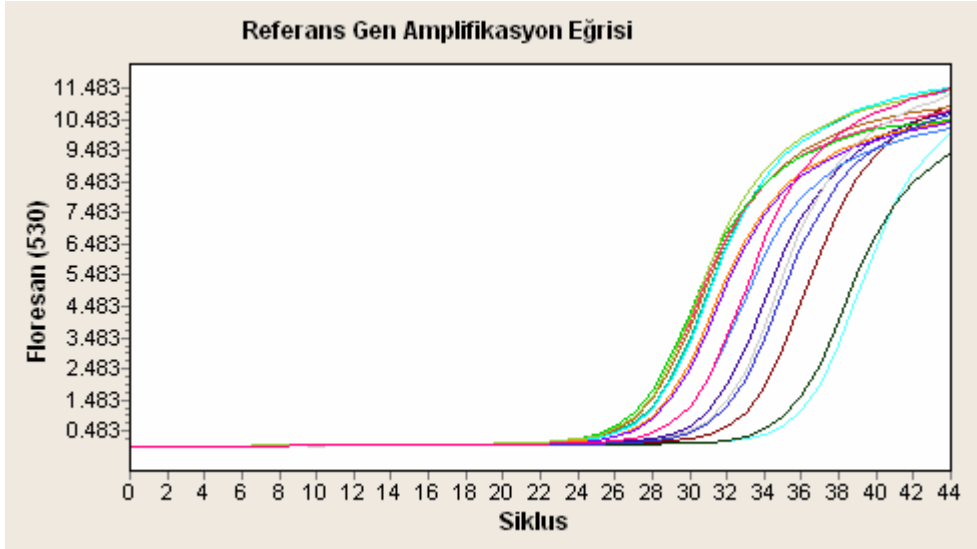


Şekil 3.3 Çalışmada kullanılan Lightcycler software 4.0 Vers. programı ile oluşturulan rölatif “melting curve” analizi.

Her bir reaksiyon için “melting curve” analizi ile RT-PCR’ın spesifikliğine bakıldıktan sonra kantitatif incelemeye geçildi (Şekil 3.4, 3.5). Lightcycler software Vers. 4.0 programı kullanılarak hedef mRNA normalizasyon oranları tespit edildi. Program örneklere ait amplifikasyon eğrilerinden normalizasyon oranlarını otomatik olarak hesapladı.



Şekil 3.4 Çalışmada kullanılan Lightcycler software 4.0 Vers. programı ile oluşturulan hedefe ait amplifikasyon eğrisi. Yatay çizgi siklus sayısı, dikey çizgi amplikasyona bağlı floresan artışını göstermektedir.



Şekil 3.5 Çalışmada kullanılan Lightcycler software 4.0 Vers. programı ile oluşturulan referansa ait amplifikasyon eğrisi. Yatay çizgi siklus sayısı, dikey çizgi amplikasyona bağlı floresan artışını göstermektedir.

3.3.5. RT-PCR Kullanılan Primerler :

- **G6PD Primer Dizini:** Primerler, Primer “Blast Software” kullanılarak dizayn edildi. Primer dizileri;

G6PD “Forward”: 5'- AGC CCC CGG AAA CGG TCG TA -3'

G6PD “Reverse”: 5'- GGA TCC CGC ACA CCT GGG TC -3'

G6PD geni mRNA gen bankası erişim numarası, NM_000402.3 ve PCR ürünü büyüklüğü 119 baz çifti idi.

- **Osteonektin (ON) Primer Dizini:** Primerler, Primer “Blast Software” kullanılarak dizayn edildi. Primer dizileri;

ON “Forward”: 5'- CGC ATG CGG GAC TGG CTC AA -3'

ON “Reverse”: 5'- ACG GGG TGG TCT CCT GCC TC -3'

ON geni mRNA gen bankası erişim numarası, NM_003118.2 ve PCR ürününün büyüklüğü 143 baz çifti idi.

- **Osteokalsin (OK) Primer Dizini:** Primerler, Primer “Blast Software” kullanılarak dizayn edildi. Primer dizileri;

OK “Forward”: 5'- CAG CCA CCG AGA CAC CAT GAG A -3'

OK “Reverse”: 5'- GCG CCT GGG TCT CTT CAC TAC CT -3'

OK geni mRNA gen bankası erişim numarası, NM_199173.4 ve PCR ürününün büyüklüğü 169 baz çifti idi.

3.4 İstatistiksel Analizler:

Hücrelerden elde edilen Osteonektin ölçüm değerlerinin normal dağılıma uygunluğu grafiksel olarak ve Shapiro-Wilk testi ile incelendi. Osteonektin değerlerinin normal dağılıma uymadıkları görüldüğünden tanımlayıcı istatistikler ortanca (Çeyreklikler Arası Genişlik – ÇAG, Interquartile Range – IQR) olarak gösterildi. Deney grupları arasındaki farklılıkları kontrol etmek için Kruskal-Wallis non-parametrik varyans analizine başvuruldu. Gruplar arasında farklılık bulunduğunda farkın kaynağını

belirleyebilmek amacı ile Bonferroni düzeltilmeli Mann-Whitney testi post-hoc ikili karşılaştırmalar için kullanıldı. Materyal hazırlanma şekli (taze – sert) ve ölçüm zamanı (24 – 72 saat) arasındaki farklılıklar Mann-Whitney testi ile araştırıldı. Deney gruplarında dilüsyondan kaynaklanan farklılıkları bulabilmek amacı ile Kruskal-Wallis non-parametrik varyans analizine başvuruldu. Dilüsyonlar arasında farklılık bulunduğu farkın kaynağını belirleyebilmek amacı ile Bonferroni düzeltilmeli Mann-Whitney testi post-hoc ikili karşılaştırmalar için kullanıldı. Tüm istatistiksel analiz ve hesaplamalar MS-Excel 2003 ve SPSS for Win. Ver. 15.0 (SPSS Inc., Chicago, ILL., USA) paket programları ile yapıldı. İstatistiksel kararlarda $p \leq 0.05$ seviyesi anlamlı farklılığın göstergesi olarak kabul edildi.

3.9 Kullanılan Kimyasallar ve Ticari Kitleler

1. RNA izolasyon kiti (Axygen Biosciences, ABD)
2. cDNA Sentez Kiti (Fermentas Life Sciences-EU)
3. Light Cycler FastStart DNA Master SYBR Green I kiti (Roche-Almanya)
4. Primer sentezleri (metabion-Almanya)
5. Agaroz (Serva-Almanya)
6. Yükleme tamponu (Bioron-Almanya)
7. Etidyum bromür
8. 100 bç moleküler ağırlık belirteci (Bioron, Almanya)
9. Etanol (Merck- Almanya)
10. DMEM (Biological Industries, Israel)
11. Fetal Kalf Serum (PAA LAb.-Almanya)
12. Tripsin-EDTA (Biological Industries, Israel)
13. PBS (Biological Industries, Israel)
14. Penisilin-sterptomisin (Biological Industries, Israel)
15. L-Glutamin (Gibco-İngiltere)

3.10 Kullanılan Cihazlar

2. Santrifüj cihazı (ICE 4R-ABD)
3. Minisantrifüj cihazı (Sigma-ABD)
4. Masaüstü vorteks cihazı (Retsch Mixer-Almanya)
5. "Thermal Cycler" (Biorad-ABD)
6. "Light Cycler 1.5 Real Time PCR (Roche-İsviçre)
7. Yatay elektroforez cihazı (Serva-Almanya)
8. UV transilüminatör (Synegene-ABD)
9. Isı bloğu (Boeco-Almanya)
10. Hassas terazi (Precisa-İsviçre)
11. Mikropipet (Nichiryo-Japonya)
12. Manyetik karıştırıcı (Corning-Almanya)
13. Laminar Flow (Bilser-Türkiye)
14. -80°C Derin Dondurucu (Revco-ABD)
15. Buzdolabı (Arçelik-Türkiye)
16. Derin dondurucu (Arçelik-Türkiye)

BULGULAR

4.1 Dental Pulpa Fibroblast Hücrelerinde MTA ve PS Varlığında

Osteonektin Geni mRNA Ekspresyonu

Dental pulpa fibroblast hücrelerinde taze ve sertleşmiş PS, GMTA, BMTA ile yaptığımız osteonektin çalışmasında gerek materyaller arasında gerekse bu materyallerin dilüsyonları arasında farklı sonuçlar elde ettik.

Deney gruplarında ölçülen en düşük osteonektin seviyesi 0.001 iken en yüksek seviye 0.990 olarak ölçüldü. Osteonektin seviyesi ortancası 0.480 (IQR=0.348) olarak hesaplandı. ON seviyesi PS grubunda en düşük 0.001 iken BMTA grubunda 0.170 ve GMTA grubunda ise 0.140 olarak bulundu. Gruplara göre ON değerleri Tablo 4.1’de verilmiştir.

Tablo 4.1. Gruplara göre ON değerleri (genel)

Grup	En az	En çok	Ortanca	IQR	χ^2	p
PORTLAND SİMAN	0.001	0.990	0.575	0.340		
GRİ MTA	0.140	0.930	0.405	0.350	4.431	0.109
BEYAZ MTA	0.170	0.990	0.490	0.348		

Tablo 4.1’e göre; deney grupları arasında ON ortancaları istatistiksel olarak farksızdır ($\chi^2=4.431$; $p=0.109$).

Deney gruplarında materyal hazırlanma şekline (taze – sert) göre ON değerleri incelendiğinde en yüksek ortancanın PS grubunda sert materyalde, en küçük ortancanın ise BMTA grubunda sert materyalde olduğu görüldü. Gruplarda materyal hazırlama türüne göre ON ortancaları Tablo 4.2’de gösterilmiştir.

Tablo 4.2. Gruplarda materyal hazırlama türüne göre ON değerleri

Grup	Materyal Hazırlama Türü	En az	En çok	Ortanca	IQR	Z	p
PORTLAND SİMAN	Taze	0.210	0.990	0.680	0.275	3.991	<0.001
	Sert	0.001	0.810	0.430	0.545		
GRİ MTA	Taze	0.180	0.930	0.415	0.395	0.763	0.445
	Sert	0.140	0.930	0.405	0.310		
BEYAZ MTA	Taze	0.170	0.990	0.525	0.495	0.175	0.861
	Sert	0.220	0.950	0.490	0.255		

PS grubunda ON değeri ortancası sert materyal türünde taze materyal türüne göre daha düşüktür ($Z=3.991$; $p<0.001$). GMTA ve BMTA grubunda taze ve sert materyallerin ON ortancaları istatistiksel olarak farksızdır (sırasıyla $Z=0.763$; $p=0.445$ ve $Z=0.175$; $p=0.861$) (Tablo 4.2).

Materyal hazırlama türüne göre bakıldığında taze materyalde en yüksek ortanca PS grubunda iken sert materyal grubunda ise en yüksek ON ortancası BMTA grubunda ölçüldü (Tablo 4.3)

Tablo 4.3. Materyal hazırlama türünde gruplara göre ON değerleri

Materyal Hazırlama Türü	Grup	En az	En çok	Ortanca	IQR	χ^2	p
Taze	PORTLAND SİMAN	0.210	0.990	0.680	0.275	7.566	0.023
	GRİ MTA	0.180	0.930	0.415	0.395		
	BEYAZ MTA	0.170	0.990	0.525	0.495		
Sert	PORTLAND SİMAN	0.001	0.810	0.430	0.545	5.515	0.063
	GRİ MTA	0.140	0.930	0.405	0.310		
	BEYAZ MTA	0.220	0.950	0.490	0.255		

Taze materyallerde PS, GMTA ve BMTA gruplarında ON ortancası istatistiksel olarak farklıdır ($\chi^2=7.666$; $p=0.023$) (Tablo 4.3). Farklılığın hangi gruptan kaynaklandığı araştırıldığında; PS ile GMTA grupları arasındaki farklılık anlamlı iken ($Z=2.753$; $p=0.006$), PS ile BMTA ($Z=1.660$; $p=0.097$) ve GMTA ile BMTA ($Z=0.969$; $p=0.332$) gruplarında ON ortancası arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemli değildir. Taze materyalde ON ortancasına göre sıralama yapıldığında en yüksek ON ortancası PS grubunda iken en düşük PS ortancası GMTA grubundadır.

Sert materyallerde deney gruplarında ON ortancaları istatistiksel olarak farksızdır ($\chi^2=5.515$; $p=0.063$).

Deney gruplarında hücre kültür süresine (24 – 72 saat) göre ON değerleri incelendiğinde en yüksek ortancanın BMTA grubunda 24 saatte, en küçük ortancanın ise GMTA grubunda 72 saatte olduğu görüldü. Gruplarda hücre kültür süresine göre ON ortancaları Tablo 4.4'de gösterilmiştir.

Tablo 4.4. Gruplarda hücre kültür süresine göre ON değerleri

Grup	Süre (Saat)	En az	En çok	Ortanca	IQR	Z	p
PORTLAND SİMAN	24	0.001	0.990	0.495	0.738	0.310	0.190
	72	0.330	0.980	0.605	0.248		
GRİ MTA	24	0.280	0.930	0.620	0.425	5.270	<0.001
	72	0.140	0.450	0.290	0.155		
BEYAZ MTA	24	0.220	0.990	0.690	0.250	4.714	<0.001
	72	0.170	0.750	0.405	0.165		

PS grubunda ON değeri ortancası hücre kültür süresine göre anlamlı farklılık göstermemektedir ($Z=0.310$; $p=0.190$) (Tablo 4.4). GMTA grubunda 24 saatlik hücre kültürlerinin ON ortancası 72 saatlik ON ortancasından istatistiksel olarak da anlamlı miktarda daha yüksektir ($Z=0.520$; $p<0.001$). Benzer şekilde BMTA grubunda da 24 saatlik hücre kültürlerinin ON ortancası 72 saatlik ON ortancasından istatistiksel olarak da anlamlı miktarda daha yüksektir ($Z=0.520$; $p<0.001$).

Hücre kültür süresine göre bakıldığında 24 saatlik materyalde en yüksek ortanca BMTA grubunda iken 72 saatlik materyal grubunda ise en yüksek ON ortancası PS grubunda ölçüldü (Tablo 4.5)

Tablo 4.5. Hücre kültürü süresinde gruplara göre ON değerleri

Hücre Kültür Süresi	Grup	En az	En çok	Ortanca	IQR	χ^2	p
24 Saat	PORTLAND SİMAN	0.001	0.990	0.495	0.738	6.923	0.031
	GRİ MTA	0.280	0.930	0.620	0.425		
	BEYAZ MTA	0.220	0.990	0.690	0.250		
72 Saat	PORTLAND SİMAN	0.330	0.980	0.605	0.248	34.749	<0.001
	GRİ MTA	0.140	0.450	0.290	0.155		
	BEYAZ MTA	0.170	0.750	0.405	0.165		

24 saatlik hücre kültür süresinde PS, GMTA ve BMTA gruplarından en az birinin ON ortancası istatistiksel olarak diğerlerinden farklıdır ($\chi^2=6.923$; $p=0.031$). Farklılığın hangi gruptan kaynaklandığı araştırıldığında; PS ile BMTA grupları arasındaki farklılık anlamlı iken ($Z=2.455$; $p=0.014$), PS ile

GMTA (Z=1.764; p=0.078) ve GMTA ile BMTA (Z=1.114; p=0.265) gruplarında ON ortancası arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemli değildir.

72 saatlik hücre kültür süresinde PS, GMTA ve BMTA gruplarından en az birinin ON ortancası istatistiksel olarak diğerlerinden farklıdır ($\chi^2=34.749$; $p<0.001$). Farklılığın hangi gruptan kaynaklandığı araştırıldığında; PS ile GMTA (Z=5.445; $p<0.001$), PS ile BMTA (Z=3.837; $p<0.001$) ve GMTA ile BMTA (Z=2.806; $p=0.005$) gruplarının tamamında ON ortancası arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak da önemlidir.

Deney gruplarında dilüsyonlara göre ON değerleri incelendiğinde en yüksek ortancanın PS grubunda 1/2 dilüsyonda, en küçük ortancanın ise GMTA grubunda 1/10 dilüsyonda olduğu görüldü. Gruplarda dilüsyonlara göre ON ortancaları Tablo 4.6'da gösterilmiştir.

Tablo 4.6. Gruplarda dilüsyonlara göre ON değerleri

Grup	Dilüsyon	En az	En çok	Ortanca	IQR	χ^2	p
PORTLAND SIMAN	1 / 1	0.010	0.670	0.510	0.153	4.550	0.208
	1 / 2	0.090	0.890	0.665	0.263		
	1 / 4	0.005	0.930	0.430	0.495		
	1 / 10	0.001	0.990	0.635	0.753		
GRİ MTA	1 / 1	0.150	0.900	0.405	0.410	2.212	0.530
	1 / 2	0.180	0.930	0.425	0.555		
	1 / 4	0.230	0.930	0.445	0.425		
	1 / 10	0.140	0.680	0.345	0.370		
BEYAZ MTA	1 / 1	0.210	0.990	0.465	0.460	1.245	0.742
	1 / 2	0.310	0.950	0.625	0.535		
	1 / 4	0.170	0.820	0.505	0.280		
	1 / 10	0.220	0.950	0.475	0.208		

Tüm deney gruplarının tüm dilüsyonlarında ON ortancaları istatistiksel olarak farksızdır ($p>0.05$) (Tablo 4.6).

Dilüsyonlara göre bakıldığında 1/4 dışındaki tüm dilüsyonlarda PS grubunun ON ortancası diğer gruplardan daha yüksektir ancak gruplar arasında tüm dilüsyonlarda ON ortancası istatistiksel olarak farksızdır (Tablo 4.7).

Tablo 4.7. Dilüsyonlarda gruplara göre ON değerleri

Dilüsyon	Grup	En az	En çok	Ortanca	IQR	χ^2	p
1/1	PORTLAND SİMAN	0.010	0.670	0.510	0.153	0.957	0.620
	GRİ MTA	0.150	0.900	0.405	0.410		
	BEYAZ MTA	0.210	0.990	0.465	0.460		
1/2	PORTLAND SİMAN	0.090	0.890	0.665	0.263	2.384	0.304
	GRİ MTA	0.180	0.930	0.425	0.555		
	BEYAZ MTA	0.310	0.950	0.625	0.535		
1/4	PORTLAND SİMAN	0.005	0.930	0.430	0.495	0.667	0.716
	GRİ MTA	0.230	0.930	0.445	0.425		
	BEYAZ MTA	0.170	0.820	0.505	0.280		
1/10	PORTLAND SİMAN	0.001	0.990	0.635	0.753	0.318	0.206
	GRİ MTA	0.140	0.680	0.345	0.370		
	BEYAZ MTA	0.220	0.950	0.475	0.208		

Deney gruplarında, farklı dilüsyonlarda hücre kültürü sürelerine (Süre) göre ON değerlerindeki değişim incelendi (Tablo 4.8). PS grubundaki tüm dilüsyonlarda 24 ve 72 saat hücre kültür süreleri arasında ON ortancaları istatistiksel olarak farksızdır ($p>0.05$).

GMTA grubunda tüm dilüsyonlarda 24 saatlik hücre kültürü süresinde ölçülen ON ortancası 72 saatlik hücre kültürü süresinde ölçülen ON ortancasından istatistiksel olarak da anlamlı miktarda daha yüksektir ($p<0.05$).

BMTA grubunda ise 1/10 dilüsyon dışındaki tüm dilüsyonlarda 24 saatlik hücre kültürü süresinde ölçülen ON ortancası 72 saatlik hücre kültürü süresinde ölçülen ON ortancasından istatistiksel olarak da anlamlı miktarda daha yüksektir ($p<0.05$). 1/10 dilüsyonda ise 24 – 72 saat ölçümlerindeki ON ortancası istatistiksel olarak benzerdir ($Z=1.121$; $p=0.310$)

Tablo 4.8. Deney gruplarında farklı dilüsyon ve hücre kültürü sürelerine göre ON değerleri

Grup	Dilüsyon	Süre	En az	En çok	Ortanca	IQR	Z	p	
PORTLAND SIMAN	1 / 1	24 Saat	0.010	0.600	0.495	0.568	0.641	0.589	
		72 Saat	0.430	0.670	0.530	0.165			
	1 / 2	24 Saat	0.090	0.890	0.705	0.500	0.480	0.699	
		72 Saat	0.370	0.740	0.665	0.145			
	1 / 4	24 Saat	0.005	0.850	0.240	0.736	1.281	0.240	
		72 Saat	0.330	0.930	0.470	0.353			
	1 / 10	24 Saat	0.001	0.990	0.325	0.913	0.801	0.485	
		72 Saat	0.410	0.980	0.700	0.330			
	GRİ MTA	1 / 1	24 Saat	0.400	0.900	0.645	0.410	2.647	0.004
			72 Saat	0.150	0.410	0.275	0.110		
1 / 2		24 Saat	0.420	0.930	0.715	0.398	2.722	0.004	
		72 Saat	0.180	0.430	0.225	0.168			
1 / 4		24 Saat	0.440	0.930	0.680	0.453	2.651	0.004	
		72 Saat	0.230	0.450	0.370	0.100			
1 / 10		24 Saat	0.280	0.680	0.585	0.370	2.009	0.041	
		72 Saat	0.140	0.380	0.275	0.173			
BEYAZ MTA		1 / 1	24 Saat	0.480	0.990	0.765	0.270	2.882	0.002
			72 Saat	0.210	0.450	0.355	0.203		
	1 / 2	24 Saat	0.580	0.950	0.870	0.280	2.562	0.009	
		72 Saat	0.310	0.750	0.370	0.238			
	1 / 4	24 Saat	0.490	0.820	0.625	0.278	2.402	0.015	
		72 Saat	0.170	0.630	0.405	0.325			
	1 / 10	24 Saat	0.220	0.950	0.595	0.453	1.121	0.310	
		72 Saat	0.370	0.570	0.440	0.110			

Deney gruplarında, farklı dilüsyonlarda materyal hazırlama türüne (Materyal) göre ON değerlerindeki değişim incelendi (Tablo 4.9). GMTA ve BMTA gruplarındaki tüm dilüsyonlarda taze ve sert materyaller arasında ON ortancaları istatistiksel olarak farksızdır ($p>0.05$).

PS grubunda 1/2 ve 1/4 dilüsyonlarda taze materyallerde ölçülen ON ortancası sert materyallerde ölçülen ON ortancasından istatistiksel olarak da anlamlı miktarda daha yüksektir (sırasıyla $Z=2.082$; 0.041 ve $Z=2.242$; $p=0.026$). 1/1 ve 1/10 dilüsyonlarda taze ve sert materyallerden elde edilen ON ortancaları istatistiksel olarak farksızdır (sırasıyla $Z=1.761$; $p=0.093$ ve $Z=1.922$; $p=0.065$).

Tablo 4.9. Deney gruplarında farklı dilüsyon ve materyal hazırlama türüne (Materyal) göre ON değerleri

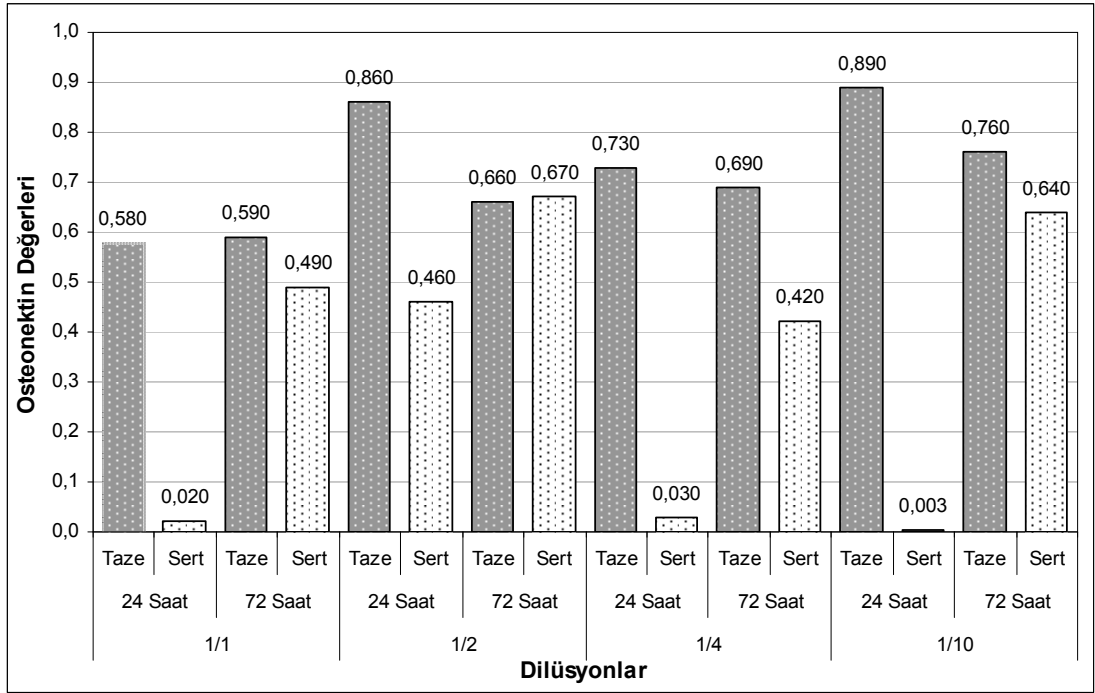
Grup	Dilüsyon	Materyal	En az	En çok	Ortanca	IQR	Z	p	
PORTLAND SIMAN	1 / 1	Taze	0.430	0.670	0.585	0.165	1.761	0.093	
		Sert	0.010	0.570	0.470	0.523			
	1 / 2	Taze	0.620	0.890	0.755	0.218	2.082	0.041	
		Sert	0.090	0.690	0.550	0.375			
	1 / 4	Taze	0.210	0.930	0.710	0.443	2.242	0.026	
		Sert	0.005	0.440	0.300	0.401			
	1 / 10	Taze	0.410	0.990	0.825	0.408	1.922	0.065	
		Sert	0.001	0.810	0.290	0.680			
	GRİ MTA	1 / 1	Taze	0.240	0.900	0.510	0.548	0.802	0.485
			Sert	0.150	0.570	0.405	0.210		
1 / 2		Taze	0.180	0.930	0.515	0.593	0.961	0.394	
		Sert	0.200	0.830	0.330	0.390			
1 / 4		Taze	0.350	0.890	0.425	0.195	0.000	1.000	
		Sert	0.230	0.930	0.445	0.588			
1 / 10		Taze	0.220	0.640	0.320	0.330	0.643	0.589	
		Sert	0.140	0.680	0.375	0.435			
BEYAZ MTA		1 / 1	Taze	0.210	0.990	0.615	0.585	0.480	0.699
			Sert	0.220	0.710	0.465	0.303		
	1 / 2	Taze	0.310	0.920	0.460	0.595	0.961	0.394	
		Sert	0.400	0.950	0.710	0.393			
	1 / 4	Taze	0.170	0.820	0.530	0.598	0.160	0.937	
		Sert	0.340	0.660	0.505	0.193			
	1 / 10	Taze	0.410	0.950	0.535	0.383	1.441	0.180	
		Sert	0.220	0.580	0.440	0.240			

PS grubunda farklı dilüsyonlarda, hücre kültür süresi ve materyal hazırlama türüne göre ON değerleri ortancası belirlendi. Her bir alt grupta sadece 3 örnek olduğundan Çeyreklikler Arası Sapma (IQR) değerleri hesaplanamadı. Denek sayısının azlığı nedeni ile çok farklı ortancaya sahip taze ve sert materyaller arasındaki farklılıklar bile istatistiksel olarak anlamlı fark olarak bulunamadı (Tablo 4.10). Örnek sayısının azlığı nedeni ile istatistiksel olarak fark gözlenmemiş olsa da PS grubunda farklı dilüsyonlarda, hücre kültür süresi ve materyal hazırlama türüne göre ON değerleri grafik üzerinde incelendiğinde aslında gruplar arasında anlamlı fark olduğu görülmektedir (Şekil 4.1).

Tablo 4.10. PS grubunda farklı dilüsyon, hücre kültür süresi (zaman) ve materyal hazırlama türüne (Materyal) göre ON değerleri

Dilüsyon	Zaman	Materyal	En az	En çok	Ortanc a	IQR*	Z	p
1 / 1	24	Taze	0.460	0.600	0.580	N/A	1.528	0.200
		Sert	0.010	0.530	0.020	N/A		
	72	Taze	0.430	0.670	0.590	N/A	0.655	0.700
		Sert	0.450	0.570	0.490	N/A		
1 / 2	24	Taze	0.770	0.890	0.860	N/A	1.964	0.100
		Sert	0.090	0.640	0.460	N/A		
	72	Taze	0.620	0.740	0.660	N/A	0.218	1.000
		Sert	0.370	0.690	0.670	N/A		
1 / 4	24	Taze	0.210	0.850	0.730	N/A	1.528	0.200
		Sert	0.005	0.270	0.030	N/A		
	72	Taze	0.500	0.930	0.690	N/A	1.964	0.100
		Sert	0.330	0.440	0.420	N/A		
1 / 10	24	Taze	0.630	0.990	0.890	N/A	1.964	0.100
		Sert	0.001	0.020	0.003	N/A		
	72	Taze	0.410	0.980	0.760	N/A	0.218	1.000
		Sert	0.560	0.810	0.640	N/A		

* N/A: Çeyreklikler arası sapma değeri hesaplanamamıştır (n=3 olduğundan).



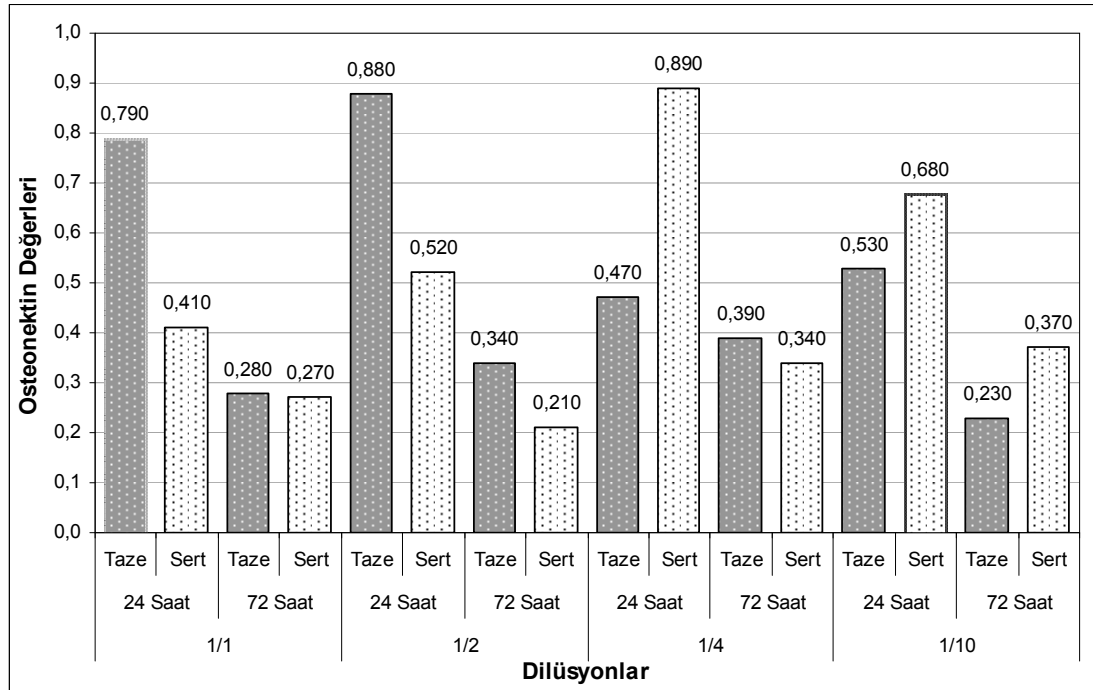
Şekil 4.1 PS grubunda farklı dilüsyon, hücre kültür süresi (zaman) ve materyal hazırlama türüne (Materyal) göre ON değerlerinin grafiksel analizi

GMTA grubunda da farklı dilüsyonlarda, hücre kültür süresi ve materyal hazırlama türüne göre ON değerleri ortancası belirlendi. PS grubuna benzer şekilde her bir alt grupta sadece 3 örnek olduğundan Çeyreklikler Arası Sapma (IQR) değerleri hesaplanamadı. Denek sayısının azlığı nedeni ile çok farklı ortancaya sahip taze ve sert materyaller arasındaki farklılıklar bile istatistiksel olarak anlamlı fark olarak bulunamadı (Tablo 4.11). Örnek sayısının azlığı nedeni ile istatistiksel olarak fark gözlenmemiş olsada GMTA grubunda farklı dilüsyonlarda, hücre kültür süresi ve materyal hazırlama türüne göre ON değerleri grafik üzerinde incelendiğinde aslında gruplar arasında anlamlı fark olduğu görülmektedir (Şekil 4.2).

Tablo 4.11. GMTA grubunda farklı dilüsyon, hücre kültür süresi (zaman) ve materyal hazırlama türüne (Materyal) göre ON değerleri

Dilüsyon	Zaman	Materyal	Ortanc				Z	p
			En az	En çok	a	IQR*		
1 / 1	24	Taze	0.720	0.900	0.790	N/A	1.964	0.100
		Sert	0.400	0.570	0.410	N/A		
	72	Taze	0.240	0.300	0.280	N/A	0.218	1.000
		Sert	0.150	0.410	0.270	N/A		
1 / 2	24	Taze	0.600	0.930	0.880	N/A	1.528	0.200
		Sert	0.420	0.830	0.520	N/A		
	72	Taze	0.180	0.430	0.340	N/A	0.655	0.700
		Sert	0.200	0.240	0.210	N/A		
1 / 4	24	Taze	0.450	0.890	0.470	N/A	0.443	0.700
		Sert	0.440	0.930	0.890	N/A		
	72	Taze	0.350	0.400	0.390	N/A	0.655	0.700
		Sert	0.230	0.450	0.340	N/A		
1 / 10	24	Taze	0.320	0.640	0.530	N/A	0.664	0.700
		Sert	0.280	0.680	0.680	N/A		
	72	Taze	0.220	0.320	0.230	N/A	0.655	0.700
		Sert	0.140	0.380	0.370	N/A		

• N/A: Çeyreklikler arası sapma değeri hesaplanamamıştır (n=3 olduğundan).



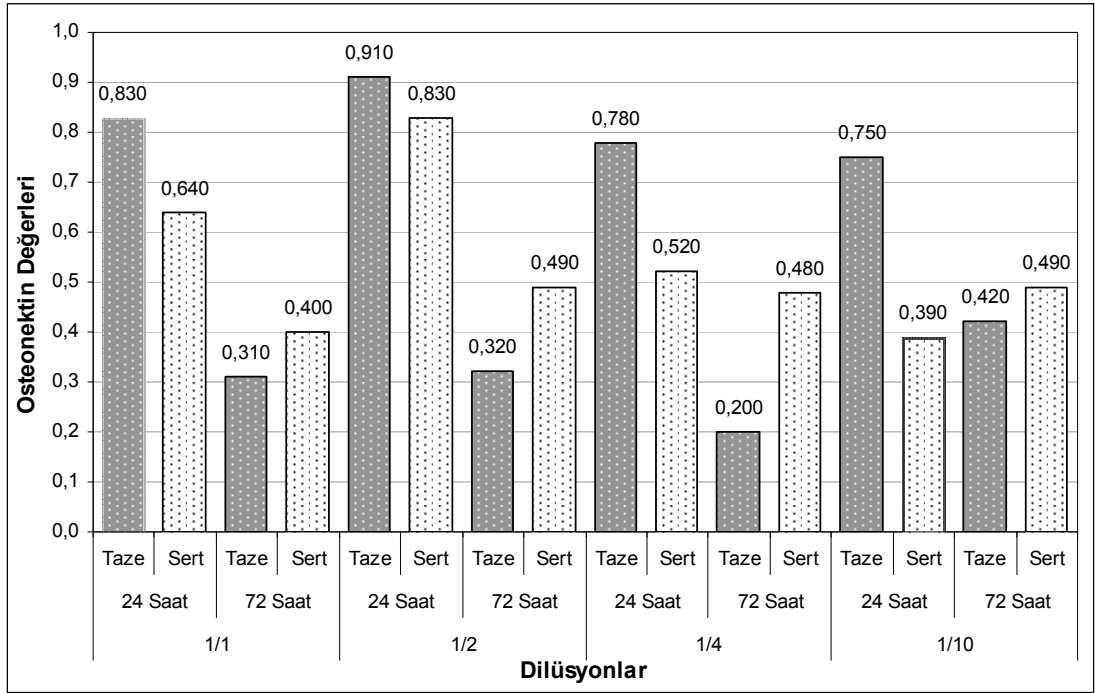
Şekil 4.2. GMTA grubunda farklı dilüsyon, hücre kültür süresi (zaman) ve materyal hazırlama türüne (Materyal) göre ON değerlerinin grafiksel analizi

BMTA grubunda da farklı dilüsyonlarda, hücre kültür süresi ve materyal hazırlama türüne göre ON değerleri ortancası belirlendi. PS ve GMTA gruplarına benzer şekilde Her bir alt grupta sadece 3 örnek olduğundan Çeyreklikler Arası Sapma (IQR) değerleri hesaplanamadı. Denek sayısının azlığı nedeni ile çok farklı ortancaya sahip taze ve sert materyaller arasındaki farklılıklar bile istatistiksel olarak anlamlı fark olarak bulunamadı (Tablo 4.12). Örnek sayısının azlığı nedeni ile istatistiksel olarak fark gözlenmemiş olsada BMTA grubunda farklı dilüsyonlarda, hücre kültür süresi ve materyal hazırlama türüne göre ON değerleri grafik üzerinde incelendiğinde aslında gruplar arasında anlamlı fark olduğu görülmektedir (Şekil 4.3).

Tablo 4.12. BMTA grubunda farklı dilüsyon, hücre kültür süresi (zaman) ve materyal hazırlama türüne (Materyal) göre ON değerleri

Dilüsyon	Zaman	Materyal	En az	En çok	Ortanc		Z	p
					a	IQR*		
1 / 1	24	Taze	0.820	0.990	0.830	N/A	1.964	0.100
		Sert	0.480	0.710	0.640	N/A		
	72	Taze	0.210	0.410	0.310	N/A	0.218	1.000
		Sert	0.220	0.450	0.400	N/A		
1 / 2	24	Taze	0.580	0.920	0.910	N/A	1.528	0.200
		Sert	0.670	0.950	0.830	N/A		
	72	Taze	0.310	0.340	0.320	N/A	0.655	0.700
		Sert	0.400	0.750	0.490	N/A		
1 / 4	24	Taze	0.590	0.820	0.780	N/A	0.443	0.700
		Sert	0.490	0.660	0.520	N/A		
	72	Taze	0.170	0.470	0.200	N/A	0.655	0.700
		Sert	0.340	0.630	0.480	N/A		
1 / 10	24	Taze	0.610	0.950	0.750	N/A	0.664	0.700
		Sert	0.220	0.580	0.390	N/A		
	72	Taze	0.410	0.460	0.420	N/A	0.655	0.700
		Sert	0.370	0.570	0.490	N/A		

* N/A: Çeyreklikler arası sapma değeri hesaplanamamıştır (n=3 olduğundan).



Şekil 4.3. BMTA grubunda farklı dilüsyon, hücre kültür süresi (zaman) ve materyal hazırlama türüne (Materyal) göre ON değerlerinin grafiksel analizi

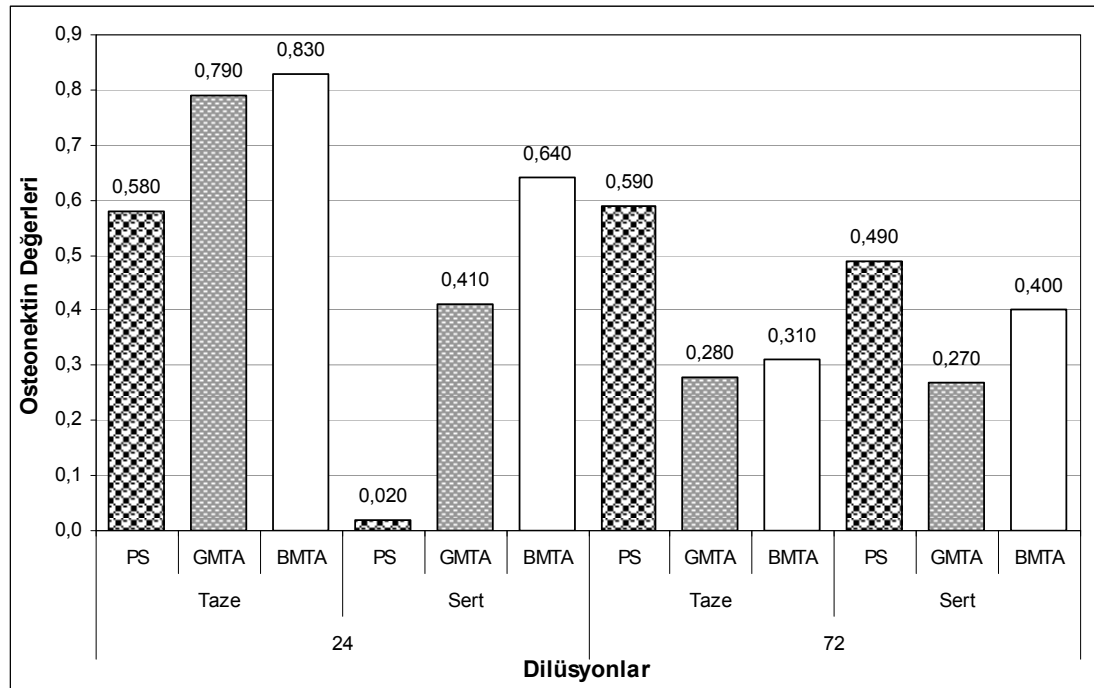
Farklı dilüsyonlarda, hücre kültür süresi ve materyal hazırlama türünde deney gruplarına göre ON değerleri ortancaları belirlendi. 1/1 Dilüsyonda elde edilen ON değerleri Tablo 4.13'de gösterilmiştir.

1/1 dilüsyonda, tüm hücre kültür sürelerinde ve tüm materyal hazırlama türlerinde deney grupları ON ortancaları istatistiksel olarak farksızdır ($p > 0.05$) (Tablo 4.13). İstatistiksel olarak fark gözlenmemiş olsada 1/1 dilüsyonda, tüm hücre kültür sürelerinde ve tüm materyal hazırlama türlerinde deney grupları ON ortancaları grafik üzerinde incelendiğinde aslında gruplar arasında anlamlı fark olduğu görülmektedir (Şekil 4.4).

Tablo 4.13. 1/1 Dilüsyonda, hücre kültür süresi (zaman) ve materyal hazırlama türünde (Materyal) deney gruplarına göre ON değerleri

Zaman	Materyal	Grup	En az	En çok	Ortanc a	IQR*	χ^2	p
24	Taze	PS	0.460	0.600	0.580	N/A	5.956	0.051
		GMTA	0.720	0.900	0.790	N/A		
		BMTA	0.820	0.990	0.830	N/A		
	Sert	PS	0.010	0.530	0.020	N/A	3.822	0.148
		GMTA	0.400	0.570	0.410	N/A		
		BMTA	0.480	0.710	0.640	N/A		
72	Taze	PS	0.430	0.670	0.590	N/A	5.600	0.061
		GMTA	0.240	0.300	0.280	N/A		
		BMTA	0.210	0.410	0.310	N/A		
	Sert	PS	0.450	0.570	0.490	N/A	5.132	0.077
		GMTA	0.150	0.410	0.270	N/A		
		BMTA	0.220	0.450	0.400	N/A		

* N/A: Çeyreklikler arası sapma değeri hesaplanamamıştır (n=3 olduğundan).



Şekil 4.4. 1/1 Dilüsyonda, hücre kültür süresi (zaman) ve materyal hazırlama türünde (Materyal) deney gruplarına göre ON değerlerinin grafiksel analizi

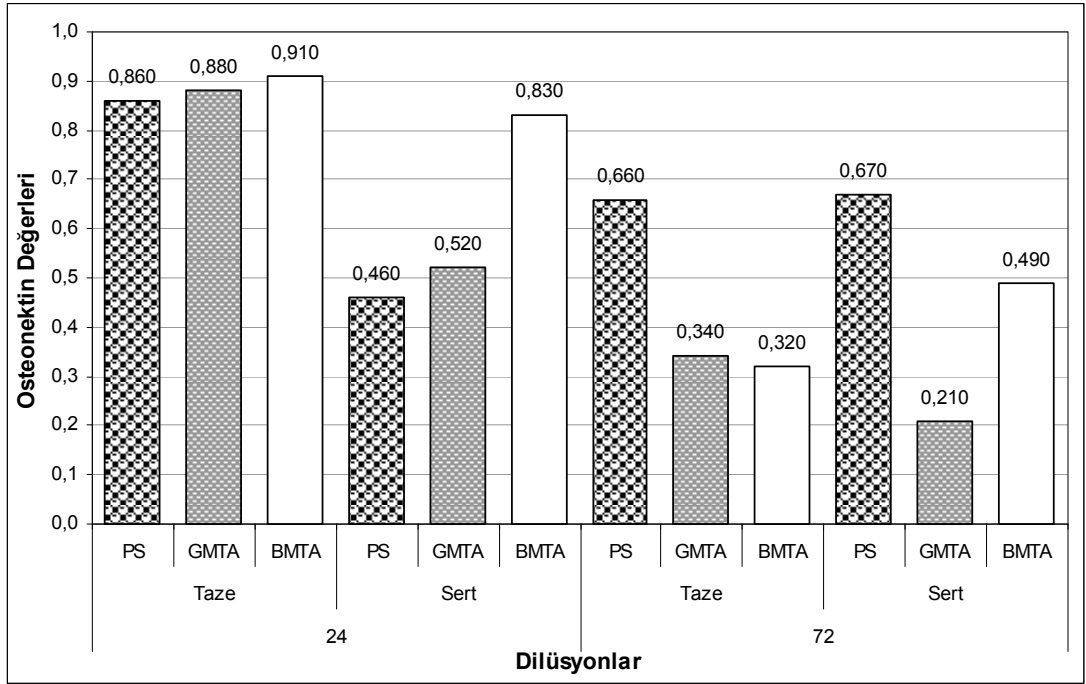
1/2 Dilüsyonda farklı hücre kültür süresi ve materyal hazırlama türünde deney gruplarına göre ON değerleri ortancaları Tablo 4.14'de gösterilmiştir.

Tablo 4.14. 1/2 Dilüsyonda, hücre kültür süresi (zaman) ve materyal hazırlama türünde (Materyal) deney gruplarına göre ON değerleri

Zaman	Materyal	Grup	Ortanc				χ^2	p
			En az	En çok	a	IQR*		
24	Taze	PS	0.770	0.890	0.860	N/A	0.267	0.875
		GMTA	0.600	0.930	0.880	N/A		
		BMTA	0.580	0.920	0.910	N/A		
	Sert	PS	0.090	0.640	0.460	N/A	4.235	0.120
		GMTA	0.420	0.830	0.520	N/A		
		BMTA	0.670	0.950	0.830	N/A		
72	Taze	PS	0.620	0.740	0.660	N/A	5.535	0.063
		GMTA	0.180	0.430	0.340	N/A		
		BMTA	0.310	0.340	0.320	N/A		
	Sert	PS	0.370	0.690	0.670	N/A	5.422	0.066
		GMTA	0.200	0.240	0.210	N/A		
		BMTA	0.400	0.750	0.490	N/A		

* N/A: Çeyreklikler arası sapma değeri hesaplanamamıştır (n=3 olduğundan).

1./1 dilüsyonda olduğu gibi 1/2 dilüsyonda, tüm hücre kültür sürelerinde ve tüm materyal hazırlama türlerinde deney grupları ON ortancaları istatistiksel olarak farksızdır ($p>0.05$). İstatistiksel olarak fark gözlenmemiş olsada 1/2 dilüsyonda, tüm hücre kültür sürelerinde ve tüm materyal hazırlama türlerinde deney grupları ON ortancaları grafik üzerinde incelendiğinde aslında gruplar arasında fark olduğu görülmektedir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. 1/2 Dilüsyonda, hücre kültür süresi (zaman) ve materyal hazırlama türünde (Materyal) deney gruplarına göre ON değerlerinin grafiksel analizi

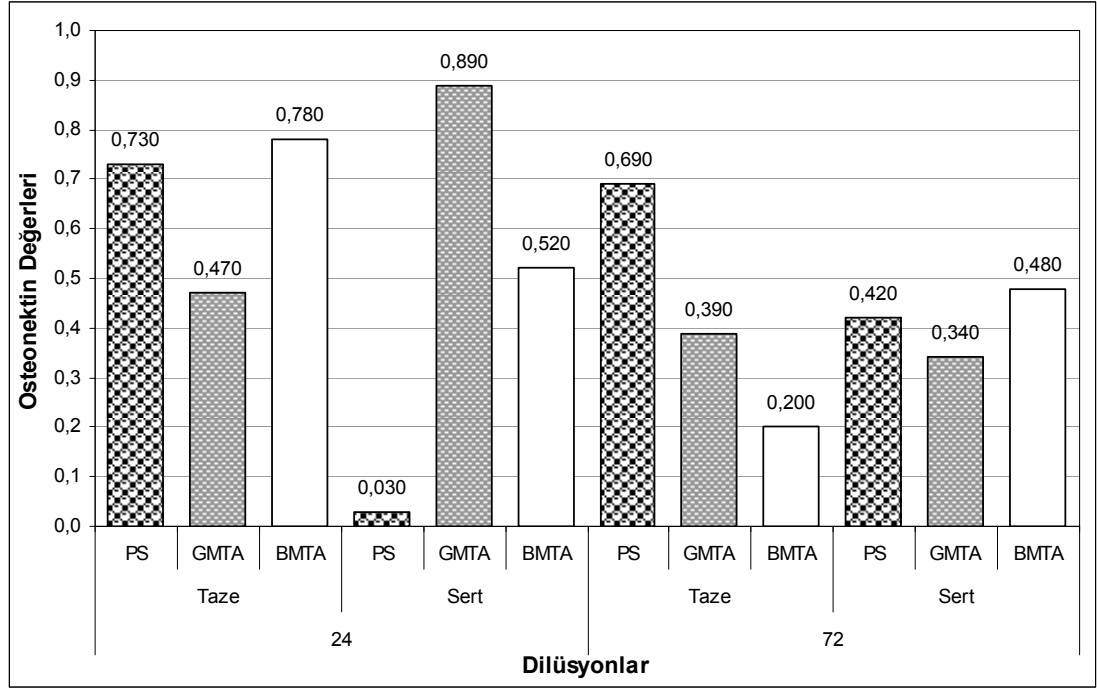
1/4 Dilüsyonda farklı hücre kültür süresi ve materyal hazırlama türünde deney gruplarına göre ON değerleri ortancaları Tablo 4.15'te gösterilmiştir.

Tablo 4.15. 1/4 Dilüsyonda, hücre kültür süresi (zaman) ve materyal hazırlama türünde (Materyal) deney gruplarına göre ON değerleri

Zaman	Materyal	Grup	Ortanc				χ^2	p
			En az	En çok	a	IQR*		
24	Taze	PS	0.210	0.850	0.730	N/A	0.267	0.875
		GMTA	0.450	0.890	0.470	N/A		
		BMTA	0.590	0.820	0.780	N/A		
	Sert	PS	0.005	0.270	0.030	N/A	5.600	0.061
		GMTA	0.440	0.930	0.890	N/A		
		BMTA	0.490	0.660	0.520	N/A		
72	Taze	PS	0.500	0.930	0.690	N/A	5.600	0.061
		GMTA	0.350	0.400	0.390	N/A		
		BMTA	0.170	0.470	0.200	N/A		
	Sert	PS	0.330	0.440	0.420	N/A	2.084	0.353
		GMTA	0.230	0.450	0.340	N/A		
		BMTA	0.340	0.630	0.480	N/A		

* N/A: Çeyreklikler arası sapma değeri hesaplanamamıştır (n=3 olduğundan).

1./1 ve 1./2 dilüsyonlarda olduğu gibi 1./4 dilüsyonda da, tüm hücre kültür sürelerinde ve tüm materyal hazırlama türlerinde deney grupları ON ortancaları istatistiksel olarak farksızdır ($p>0.05$). İstatistiksel olarak fark gözlenmemiş olsada 1./2 dilüsyonda, tüm hücre kültür sürelerinde ve tüm materyal hazırlama türlerinde deney grupları ON ortancaları grafik üzerinde incelendiğinde aslında gruplar arasında fark olduğu görülmektedir (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. 1./4 Dilüsyonda, hücre kültür süresi (zaman) ve materyal hazırlama türünde (Materyal) deney gruplarına göre ON değerlerinin grafiksel analizi

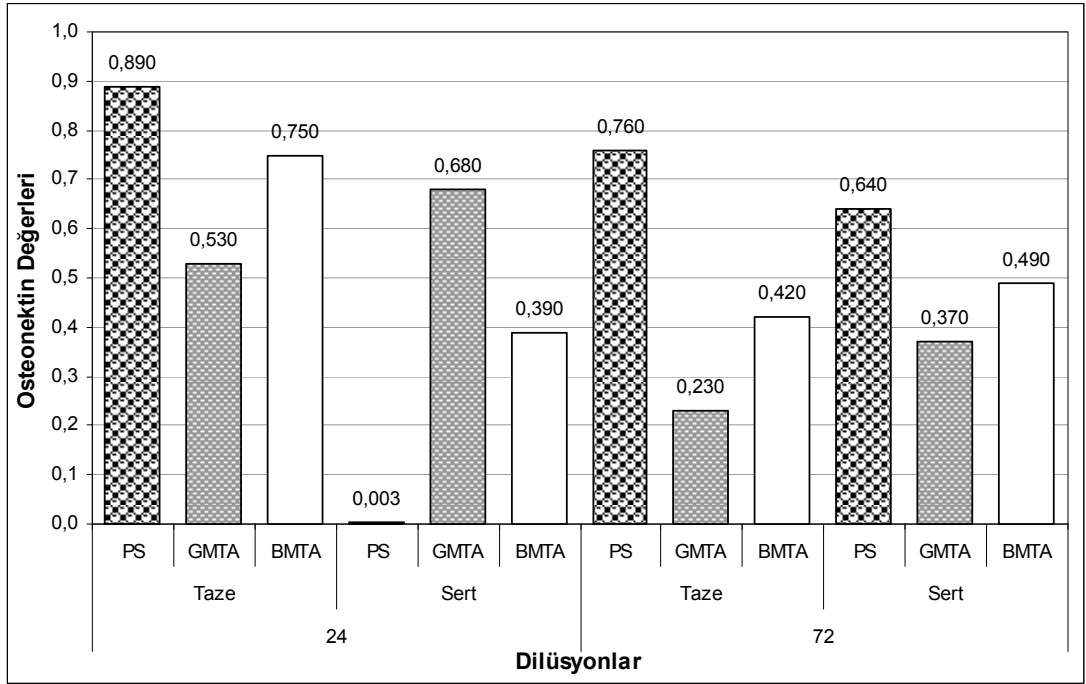
1./10 Dilüsyonda farklı hücre kültür süresi ve materyal hazırlama türünde deney gruplarına göre ON değerleri ortancaları Tablo 4.16'da gösterilmiştir.

Tablo 4.16. 1/10 Dilüsyonda, hücre kültür süresi (zaman) ve materyal hazırlama türünde (Materyal) deney gruplarına göre ON değerleri

Zaman	Materyal	Grup	En az	En çok	Ortanc a	IQR*	χ^2	p
24	Taze	PS	0.630	0.990	0.890	N/A	3.467	0.177
		GMTA	0.320	0.640	0.530	N/A		
		BMTA	0.610	0.950	0.750	N/A		
	Sert	PS	0.001	0.020	0.003	N/A	6.006	0.050
		GMTA	0.280	0.680	0.680	N/A		
		BMTA	0.220	0.580	0.390	N/A		
72	Taze	PS	0.410	0.980	0.760	N/A	5.804	0.055
		GMTA	0.220	0.320	0.230	N/A		
		BMTA	0.410	0.460	0.420	N/A		
	Sert	PS	0.560	0.810	0.640	N/A	5.401	0.067
		GMTA	0.140	0.380	0.370	N/A		
		BMTA	0.370	0.570	0.490	N/A		

* N/A: Çeyreklikler arası sapma değeri hesaplanamamıştır (n=3 olduğundan).

1./1, 1/2, 1/4 dilüsyonlarda olduğu gibi 1/10 dilüsyonda da, tüm hücre kültür sürelerinde ve tüm materyal hazırlama türlerinde deney grupları ON ortancaları istatistiksel olarak farksızdır ($p>0.05$). Dikkat çeken nokta ise 24 saatlik hücre kültür süresinde Sert materyalde deney grupları arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlılık sınırında bulunmasıdır. Yapılan ikili post-hoc karşılaştırmalar sonucunda hiçbir grup diğerlerinden farklı bulunamadığından gruplar arasında fark olmadığı sonucuna varılmıştır. İstatistiksel olarak fark gözlenmemiş olsada 1/10 dilüsyonda, tüm hücre kültür sürelerinde ve tüm materyal hazırlama türlerinde deney grupları ON ortancaları grafik üzerinde incelendiğinde aslında gruplar arasında fark olduğu görülmektedir (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. 1/10 Dilüsyonda, hücre kültür süresi (zaman) ve materyal hazırlama türünde (Materyal) deney gruplarına göre ON değerlerinin grafiksel analizi

4.2 Dental Pulpa Fibroblast Hücrelerinde MTA ve PS Varlığında Osteokalsin Geni mRNA Ekspresyonu

Dental pulpa fibroblast hücrelerinde taze ve sertleşmiş PS, GMTA, BMTA ile yaptığımız osteokalsin çalışmasında, gerek bu materyallerle yapılan hücre kültürlerinde gerekse bu materyallerin kullanılmadığı hücre kültürlerinde osteokalsin ekspresyonu gözlenmemiştir.

TARTIŞMA

İdeal bir pulpa kaplama materyali biyouyumlu olmalı, düşük toksisite ve mineralizasyonu kolaylaştırıcı özellikler göstermelidir. Pulpa kaplama materyali olarak da kullanılmakta olan MTA ve PS'nin biyouyumluluğu ile ilgili günümüze kadar in vivo ve in vitro birçok çalışma yapılmıştır (61, 84–96). Yapılan bu çalışmaların bazılarında kullanılan hücre tipi, çalışma süresi, materyalin hazırlanma şekli gibi faktörlere bağlı farklı sonuçlar gözlenmekle birlikte MTA ve PS'nin genel olarak biyouyumluluğunun yüksek olduğu ortaya konmuştur. MTA ve PS'nin biyouyumluluğu üzerine yapılan çalışmaların büyük kısmında insan dental dokusu dışında farklı hücre serileri kullanılmıştır. Çalışmamızda insan dental pulpa fibroblast hücrelerini in vitro olarak kullanarak MTA ve PS varlığında dentin mineralizasyonunun önemli bir göstergesi olan OK ve ON genlerinin ekspresyon düzeylerini analiz ederek mineralizasyonda fonksiyon gören bu proteinlerdeki değişimi moleküler düzeyde göstermeyi hedefledik. İnsan dental pulpa fibroblast hücrelerini kullanmamızdaki amaç, MTA ve PS'nin pulpa kaplama materyali olarak kullanıldığında gerçekte etkileşim içinde olacağı hücrelerin mineralizasyona katkılarını değerlendirebilmektir.

MTA'nın PS'ye göre daha pahalı bir materyal olması nedeniyle PS'nin MTA'ya alternatif olup olamayacağına yönelik olarak birçok çalışma yapılmıştır. Dammerschke ve diğ. (15) X-ray fotoelektron spektroskopisi, yöntemi ile MTA ve PS'nin kimyasal ve fiziksel özelliklerini incelemiştir. Bu çalışmada küçük ve homojen yapıda partikül büyüklüğüne sahip olan MTA ile karşılaştırıldığında farklı büyüklüklerde partikül boyutuna sahip olan PS'nin pahalı olmasına rağmen MTA'ya bir alternatif oluşturamayacağını ifade etmişlerdir. Küçük partikül büyüklüğünün likid ile karıştırıldığında materyalin temas yüzeyini artırması, daha erken dönemde sertleşme sağlaması ve kolay işlenebilir olması bunun önemli bir nedenidir. Min ve diğ. (1) ise PS'nin kültüre edilmiş pulpa hücreleri üzerinde sitotoksik etki göstermediğini bununla birlikte mineralizasyonu arttırdığını göstererek pulpa kaplaması için potansiyel bir materyal olduğunu göstermişlerdir. Bu iki örnekten de

anlaşılacağı üzere farklı çalışma tasarımları MTA ve PS'nin birbirlerine karşı alternatif oluşturabilme özellikleri hakkında çelişkili sonuçlar vermektedir.

Günümüze kadar MTA ve PS'nin biyouyumlulukları hücrel ekspresyon, hücre büyümesi gibi çeşitli yöntemler kullanılarak araştırılmıştır. Hücrel proliferasyonu göstermeye yönelik olarak en sık kullanılan yöntem elektron mikroskobu taraması (scanning electron microscopy-SEM) ve bunu takiben uygulanan enzim çalışmalarıdır. Hücre kültürlerinde SEM'in temel kullanım amacı kullanılan materyal ile ortam arasındaki reaksiyonların gözlemlenmesidir. Enzim çalışmaları ise SEM'den sonra en sık kullanılan yöntemdir. Bu çalışmalarda kullanılan materyal üzerinde büyümekte olan hücrelerin metabolik aktiviteleri ölçülmektedir. Materyallerin hücrel proliferasyon özelliklerini gösterme amaçlı olarak kullanılan bir diğer yöntem de MTT (Metilentetrazolyum) yöntemidir. MTT yöntemi kalorimetrik bir yöntem olup MTT düzeyini düşüren enzimlerin aktivitesini ölçerek hücre canlılığı hakkında bilgi vermektedir.

Koh ve diğ. (92) MG-63 hücre serisini kullanarak SEM yöntemi ile yaptıkları çalışmada MTA'nın hücrel aktivasyondaki uyarıcı etkilerini inceleyerek, hücrel etkilerini ortaya koymaya çalışmışlardır. Bu çalışmanın sonucunda MTA'nın hücre davranışını değiştirerek hücre büyümesini uyardığını dolayısıyla biyouyumlu bir materyal olduğunu göstermişlerdir.

Haglund ve diğ. (65) L929 fare fibroblast ve makrofaj hücrelerini kullanarak MTA başta olmak üzere farklı kök ucu dolgu materyallerinin hücre büyümesi, morfolojisi ve sitokin üretimi üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. MTA'nın yüksek pH'sı nedeniyle ilk hazırlanma ve sertleşme sürecinde komşu hücrelerde lizise ve proteinlerde orta derecede denatürasyona yol açtığını, sertleşme sürecini tamamladıktan sonra ise uygun bir biyouyumluluk gösterdiğini, hücre morfolojisini etkilemediğini, yüzeyinde sement formasyonu ve periodontal ligament fibrillerinin oluşumunu göstermişlerdir. Bu şekilde MTA'nın osteoblastlarda biyolojik cevabı uyardığı ve hücre yapışması için biyouyumlu bir yüzey sağladığını ortaya koymuşlardır. Bununla birlikte diğer çalışmalardan farklı olarak MTA'nın sitokinler üzerindeki uyarıcı etkisini

gösterememişler ve bunu kullandıkları hücre tipinin farklılığı ile ilişkilendirmişlerdir.

Perez ve diğ. (93) MG-63 osteosarkom ve primer osteoblast hücrelerini kullanarak SEM analizi ile bu hücrelerin BMTA ve GMTA yüzeyine yapışma farklılıklarını ve MTA'nın bu hücreler üzerindeki osteojenik etkilerini incelemişlerdir. Çalışmanın sonucunda başlangıçta primer osteoblastların BMTA yüzeyine bağlandığını ancak onüçüncü gün sonunda materyal yüzeyinde canlı hücre kalmadığını, MG-63 hücrelerinin mineralize nodül oluşturmadığını göstermişlerdir.

Balto HA (94) SEM analizi ile insan periodontal ligament fibroblast hücrelerinin MTA yüzeyine yapışma özelliklerini ve morfolojisini incelediği çalışmada negatif kontrollerde normal hücre morfolojisi gözlemlerken, MTA uygulanan gruplarda hücre morfolojisinin bozulduğunu ve bağlanmanın olmadığını ortaya koymuştur.

Osorio RM ve diğ. (84) insan gingival fibroblast ve L929 fare fibroblast hücrelerini kullanarak MTA başta olmak üzere amalgam, galyum GF2, super EBA gibi kök ucu dolgu materyallerinin hücre canlılığı üzerindeki etkilerini MTT yöntemi ile incelemişlerdir. Bu çalışmanın sonucunda MTA'nın kök ucu dolgu materyali olarak en iyi sonucu verdiğini ve sitotoksik olmadığını göstermişlerdir.

Keiser ve diğ. (64) benzer şekilde taze/sertleşmiş MTA, super EBA ve amalgamın insan periodontal ligament hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkilerini incelemişler ve MTA'nın bu materyaller içinde en az toksik materyal olduğunu göstermişlerdir.

Pelliccioni ve diğ. (95) Saos-2 hücrelerini kullanarak yaptıkları çalışmada MTA'yı super EBA ve amalgam ile karşılaştırarak MTT yöntemi ve enzim çalışmaları ile hücre canlılığı üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. Bu çalışmanın sonucunda MTA'nın kemik üreten hücrelerle iyi bir etkileşim içinde olduğunu ve in vitro biyouyumluluğunun yüksek olduğunu ortaya koymuşlardır.

Camilleri ve diğ. (96) insan osteosarkom hücre serisini kullanarak, MTA ve PS'nin hücre çoğalması ve büyümesini alamar mavisi ile kantitatif

olarak, MTT yöntemi ile de indirekt olarak incelemişlerdir. Bu çalışmaların sonucunda materyallerle direk temas edecek şekilde ekim yapıldığında hücre büyümesinin zayıf olduğunu ortaya koymuşlardır. Bununla birlikte hidrasyon reaksiyonu sırasında oluşan kalsiyum hidroksitin hücre çoğalmasını uyardığını göstermişlerdir.

Bu çalışmalarda görüldüğü gibi çalışma dizaynı ve kullanılan hücre serileri test edilen materyallerin biyouyumluluk özellikleri ile ilgili farklı sonuçların elde edilmesine neden olmaktadır. Bu durum farklı hücre yapılarının fizyolojik uyarılara cevabının değişkenliğinden ileri gelmektedir.

Bu çalışmamızda test materyallerini hazırlanma şekli, hücre kültür süresi ve dilüsyon özelliklerine göre kendi içlerinde ve birbirleri ile karşılaştırarak, farklı parametrelerin mineralizasyon üzerindeki etkilerini analiz etmeyi hedefledik.

Dental pulpa fibroblast hücrelerinde, farklı dilüsyonlarda taze ve sertleşmiş BMTA, GMTA, PS'den elde ettiğimiz solüsyonlarla yaptığımız çalışma sonuçlarına genel olarak baktığımızda tüm materyallerde 0,001–0,990 normalizasyon değerleri arasında osteonektin ekspresyonu gözlemledik ve ortanca değerleri arasında fark bulamadık ($\chi^2=4.431;p=0.109$). Bu bulgu farklı dilüsyon ve sürelerde tüm materyallerin farklı seviyelerde de olsa osteonektin sentezini uyararak dentin mineralizasyonuna katkıda bulunduğunu göstermektedir.

Bonson ve diğ. (97) MTA'yı kullanarak periodontal ligament ve gingival fibroblast hücreleri üzerinde yaptıkları çalışmada benzer şekilde MTA'nın osteonektin sentezini arttırdığını göstermişlerdir. Bu çalışmadan farklı olarak bizim çalışmamızda dental pulpa fibroblast hücreleri ve PS kullanılmış olup PS, BMTA ve GMTA'nın dental pulpa fibroblast hücrelerinde mineralizasyonu farklı derecelerde de olsa uyardığını söyleyebiliriz.

Materyallerin hazırlanış şekline (taze-sert) göre örnekleri kendi içinde ve birbirleri ile karşılaştırdığımızda BMTA ve GMTA'nın taze veya sert olmasının ON sentezi üzerinde farklılık oluşturmadığını ($p>0.05$), sert olarak hazırlanan materyallerde her üç materyal arasında fark olmamasına rağmen PS'de sert materyalin ON sentezinin tazeye göre daha fazla düşürdüğünü

($p < 0.001$) tespit ettik. BMTA ve GMTA'da taze ve sert olarak hazırlanan materyallerin ON sentezi üzerinde farklılık oluşturmaması, pulpa kaplama materyali olarak kullanıldıklarında bu materyallerin erken ve geç dönemde yani materyalin ilk uygulanması esnasında ve sertleşme sürecinde mineralizasyon üzerindeki etkinliklerinin değişkenlik göstermediğini, daha stabil materyaller olduğunu düşündürmektedir.

Biyouyumluluk ile ilgili yapılan çalışmalarda materyallerin hazırlanma şekli farklı sonuçların elde edilmesine yol açmıştır.

Alanezi ve diğ. (98) ERRM'nin ("endosequence root repair material") ile BMTA ve GMTA ile sitotoksik etkilerini karşılaştırdıkları çalışmada, sert ve taze olarak hazırladıkları materyallerde hücre canlılığı üzerinde BMTA ve GMTA arasında farklılık saptayamamışlardır. Bu sonuç bizim bulgumuzu destekler niteliktedir. PS'de ise ON sentezinin sert materyalde taze hazırlanmış materyale göre daha düşük olması materyalin pulpa kaplama materyali olarak kullanıldığında, sertleşme sürecinde mineralizasyonu erken döneme göre daha fazla baskıladığını göstermektedir. Bu durum sertleşme süresince PS'den çevreye salınan kimyasal materyallerin dental pulpa fibroblast hücrelerinin onarıcı dentin formasyonu üzerindeki etkilerini negatif olarak etkiliyor olmasından kaynaklanıyor olabilir.

Tani-Ishii ve diğ. (99) MC3T3-E1 osteoblastik hücre serilerinde (fare osteoblastik hücre serisi) MTA, amalgam ve dycal varlığında kemik ekstraselüler matriks proteinlerinin ekspresyon düzeylerini inceledikleri çalışmada üretici firmanın talimatlarına göre hazırladıkları her bir materyali 2 mm çap ve 1 mm yüksekliğindeki silikon plastik kalıplara koyarak 48 saat süreyle sertleşmeye bırakmışlardır. Çalışmanın sonucunda MTA'nın kontrol gruplarına göre (MTA uygulanmamış) tip1 kollajen, OK ve BSP mRNA düzeylerini arttırdığını göstermişlerdir. Bu çalışmada bizim çalışmamızdan farklı olarak sadece sertleşmiş materyal kullanılmış olması taze ve sert olarak hazırlanmış materyaller arasında karşılaştırma yapmamızı engellemektedir. Bununla birlikte sertleşmiş materyalde ekstraselüler matriks proteinlerinin ekspresyonunun izlenmesi bizim çalışmamızda da gözlemlendiği gibi MTA'nın mineralizasyonu uyardığı bulgusunu desteklemektedir.

Bu çalışmada deney gruplarında kullandığımız taze ve sert materyallerin 1/1, 1/2, 1/4, 1/10'lük dilüsyonlarını oluşturarak, farklı dilüsyonların ON sentezi üzerindeki etkilerini değerlendirmeyi hedefledik. Deney gruplarında taze veya sert materyallerden oluşturulan dilüsyonların ON sentezi üzerinde bir değişkenlik oluşturmadığını tespit ettik. Bu bulgu konsantrasyon değişikliklerinin bu materyallerin ON sentezi üzerinde dolayısıyla dentin mineralizasyonu üzerinde etkili olmadığını göstermiştir ($p>0.05$). Sadece PS'ye ait taze ve sert materyallerden hazırlanmış olan 1/2 ve 1/4'lük dilüsyonlar arasında farklılık olmasını ise rastlantısal olarak yorumladık.

Alanezi ve diğ. (98) BMTA ve GMTA'yı kullanarak yaptıkları sitotoksitesite çalışmasında materyalleri üretici firmanın talimatları doğrultusunda sert ve taze olarak hazırlayarak ilgili materyalleri farklı miktarlarda solüsyonlarla (300, 600 ve 1000 µl) inkübe etmişlerdir. İlgili materyallere ait farklı dilüsyonlarla hücre canlılığını değerlendirdikleri bu çalışmada farklı dilüsyonların hücre canlılığı üzerinde fark oluşturmadığını göstermişlerdir. Bu çalışmanın temeli bizim çalışmamızla farklılık gösterse de farklı dilüsyonların hücresel tepkilerde farklılık oluşturmaması bizim bulgumuzu destekler niteliktedir.

24 ve 72 saatlik hücre kültürleri oluşturarak materyallerin ON sentezi üzerindeki erken ve geç dönem etkilerini ortaya koymaya çalıştık. Elde ettiğimiz veriler hücre kültür süresi uzadıkça tüm materyallerde, ON sentezinin azaldığını gösterdi ($p<0.05$). Deney gruplarında oluşturmuş olduğumuz dilüsyonların hücre kültür sürelerine göre ON sentezi üzerine olan etkilerini karşılaştırdığımızda ise PS'de 24 ve 72 saatlik hücre kültürleri arasında fark olmadığını ($p>0.05$), GMTA ve BMTA'da ise 72 saatlik hücre kültüründe ON sentezinin azaldığını tespit ettik ($p<0.05$). Bu bulgu hücre kültür süresi uzadıkça özellikle GMTA ve BMTA'nın dental pulpa fibroblast hücrelerinde dentin mineralizasyonunu negatif yönde uyardığını göstermektedir. PS'de ise 24 ve 72 saatlik gruplar arasında istatistiksel olarak fark görünmemesine rağmen aslında hücre kültür süresi uzadıkça ON sentezinin arttığını görmekteyiz. Bu sonuç uzun dönemde dentin

mineralizasyonu için PS'nin BMTA ve GMTA'ya göre daha iyi bir alternatif olabileceğini düşündürmektedir.

Chen ve diğ. (100) MG63 hücrelerinde MTA ve kalsiyum silikat simanın kemik markırları üzerindeki etkilerini inceledikleri çalışmada MTA'nın kollajen, alkalin fosfat, osteokalsin, kemik sialoprotein ve osteopontin gibi kemikleşme belirteçlerini hücre kültür süresi uzadıkça artırdığını göstermişlerdir.

Yasuda ve diğ. (88) ise fare dental pulpa hücrelerini kullanarak MTA, Dycal ve adeziv rezin simanı karşılaştırdığı çalışmada, MTA'nın 72 saat sonra bile sitotoksite göstermediği, dental pulpa hücrelerini ve BMP-2 (bone morphogenetic protein-2) düzeyini arttırarak mineralizasyonu arttırdığını göstermişlerdir.

Tani-Ishii ve diğ. (99) MC3T3-E1 osteoblastik hücre serilerinde (fare osteoblastik hücre serisi) MTA, amalgam ve dycal varlığında 24, 48 ve 96 saat süreli hücre kültürleri oluşturarak kemik ekstraselüler matriks proteinlerinin ekspresyon düzeylerini inceledikleri çalışmada MTA'nın 24 saatlik hücre kültürü sonunda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında (MTA uygulanmamış) tip 1 kollajen ve OK mRNA ekspresyonunu arttırdığını belirtmişlerdir. Aynı çalışmada 96 saatlik hücre kültüründe ise kontrol grubu ile MTA uygulanan gruplarda tip 1 kollajen, OK ve BSP mRNA ekspresyon düzeylerinin aynı olduğu gösterilmiştir.

Min ve diğ. (1) PS varlığında insan kaynaklı pulpa hücrelerinin cevabını inceledikleri in vitro çalışmalarında 7 günlük hücre kültürünü takiben PS'nin ON ve dentin sialoprotein düzeylerini arttırdığını göstermişlerdir. Bu da PS'nin mineralizasyon üzerinde uyarıcı etkisi olduğunu göstermiştir.

Bu çalışmaların sonuçları PS ve MTA'nın mineralizasyonu arttırıcı etkileri dikkate alındığında temel olarak çalışmamızla benzerlik göstermekle birlikte hücre kültür süreleri ve elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında farklılıklar dikkati çekmektedir. Hücre kültür süreleri ve elde edilen ekspresyon düzeyleri dikkate alındığında farklı sonuçlar elde edilmiş olmasının nedeni kullanılan hücre serilerinin ve bakılan kemik markırlarının aynı olmaması olabilir. Örneğin MG63 hücre serisi insan osteosarkom

hücreleri olup bir tür kanser hücreleridir. Atipik ve hızlı şekilde çoğalan bu kanser hücreleri biyolojik uyarılara gerçek ve sağlıklı insan dokularına göre daha farklı cevaplar verebilir. Aynı şekilde MC3T3-E1 osteoblastik hücre serisi fareye ait bir doku örneği olup fizyolojik uyarılara insan dokularından farklı yanıtlar verebilir. Min ve diğ. ise bu çalışma ile benzer şekilde insan dental pulpa dokusunu kullanmıştır. Dental pulpa dokusu genel olarak fibroblast, farklılaşmamış mezenkimal hücreler ve odontoblastlardan oluşmaktadır. Min ve diğ. tüm pulpa dokusunu hücresel ayırım yapmadan kullanırken bizim çalışmamızda sadece dental pulpa fibroblast hücreleri kullanılmıştır. Pulpa dokusu içinde bulunan odontoblastlar ve farklılaşmamış mezenkimal hücreler iki çalışma arasındaki farklılığın ana nedeni olabilir.

Deney gruplarını dilüsyonlara, hücre kültür süresi ve materyal hazırlanış şekline göre birbirleri ile karşılaştırdığımızda örnekleme sayısının azlığı nedeniyle (her grup için n=3) ON düzeylerinin ortanca değerleri arasında istatistiksel olarak fark bulunamamıştır ($p>0.05$). İstatistiksel olarak fark olmamasına rağmen tüm dilüsyonlarda, hücre kültür sürelerinde ve materyal hazırlama türlerinde deney gruplarının ON ortancaları grafik üzerinde incelendiğinde aslında gruplar arasında anlamlı fark olduğu görülmektedir. Deney gruplarında farklı dilüsyonlar hazırlamamızdaki amaç, hazırlanan karışımlarda toz/sıvı oranının ON sentezi üzerindeki etkilerini dolayısıyla dentin mineralizasyonu üzerindeki farklılıklarını görebilmektir. Elde ettiğimiz sonuçlar 1/1 ve 1/2'lik dilüsyonun diğer dilüsyonlara göre daha dengeli ve ON sentezi üzerinde daha etkili olduğunu göstermektedir. PS, GMTA ve BMTA'dan 1/1 ve 1/2 dilüsyonda taze ve sert olarak hazırlanan örneklerin erken dönemde (24 saatlik hücre kültürü) daha yüksek seviyede ON sentezini sağladığını ve ON sentezi üzerindeki etkinliklerinin BMTA>GMTA>PS şeklinde sıralandıklarını görmekteyiz. 72 saatlik hücre kültüründe ise PS'nin neden olduğu ON sentezi özellikle sert materyalde belirgin artış gösterirken BMTA ve GMTA'ya bağlı ON sentezinde ise düşüşler dikkati çekmektedir. Bu farklılıklar materyallerin farklı kimyasal bileşimi ve buna bağlı hücrelerle farklı etkileşimlerinden kaynaklanıyor olabilir. Bu sonuç daha öncede söylediğimiz gibi uzun dönemde dentin

mineralizasyonu için PS'nin BMTA ve GMTA'ya göre daha iyi bir alternatif olabileceğini düşündürmektedir.

Çalışmamızda aynı deney gruplarında 24 ve 72 saatlik hücre kültürü sonrasında OK düzeylerini ölçerek bu materyallerin doku mineralizasyonu üzerine olan etkilerini daha fazla detaylandırmayı amaçlamıştık. Ancak gerek kontrol gruplarında gerekse deney gruplarını uyguladığımız hücre serilerinde osteokalsin ekspresyonunu gözlemleyemedik.

Dental pulpa dokusu kullanılarak PS'nin osteoblastik özelliklerinin incelendiği bir çalışmada OK ekspresyonunu gösterilmiştir (1). Daha önce de belirttiğimiz gibi dental pulpa odontoblast, farklılaşmamış mezenkimal hücreler ve fibroblastlardan oluşmaktadır. Pulpanın odontoblast gibi temel olarak mineralizasyonda fonksiyon gören bir hücreyi ihtiva etmesi ilgili çalışmadaki OK ekspresyonunun kaynağını açıkça göstermektedir. Bizim çalışmamızda bu çalışmadan farklı olarak sadece dental pulpa fibroblast hücreleri kullanılmıştır.

Abdullah ve diğ. (72) Saos-2 hücre serisini (osteojenik sarkom) kullanarak PS ve MTA ile yaptıkları çalışmada ELISA yöntemi ile OK düzeyini incelemişler ve gerek PS'nin gerekse MTA'nın yüksek düzeyde OK üretimine neden olduklarını göstermişlerdir. Bu çalışmada kullanılan hücre serisi kanser hücrelerinden oluşmaktadır.

Hakki ve diğ. (101) sementoblast hücreleri (OCCM-30) ile MTA'nın hücre canlılığı ve mineralizasyon ile ilişkili genlerin ekspresyonu üzerindeki etkilerini inceledikleri çalışma da MTA varlığında OK ekspresyonunu gösterebilmişlerdir.

Thomson ve diğ. (85) da benzer şekilde sementoblast hücrelerinin MTA varlığında bağlanma, büyüme ve mineralize doku oluşturabilme özelliklerinin olumlu yönde değiştiğini ve OK eksprese edebildiklerini ortaya koymuşlardır.

Çalışmamızda gerek kontrol gruplarında gerekse PS ve MTA uygulanan gruplarda OK ekspresyonu elde edememiş olsak da yukarıdaki örneklerden anlaşılacağı gibi farklı doku ve hücre örneklerinde MTA ve PS varlığında OK ekspresyonunun gösterildiği çalışmalar yer almaktadır.

Proteinlerin dokulara göre üretim şekilleri ve miktarları farklılıklar gösterebilmektedir. Farklı dokularda bulunan bütün hücreler vücutta üretilmekte olan proteinlerin tümüne ait genetik kodları taşımaktadırlar. Ancak gelişim sürecinde yapı ve fonksiyonlarına göre hücrelerde, bu genetik kodların bir kısmı çeşitli mekanizmalarla susturularak dokular arası farklılıklar oluşturulmaktadır. Bu sonuç bizlere dental pulpa fibroblast hücrelerinde osteokalsin sentezinin gelişimsel olarak olmadığını düşündürmüştür. Ancak bu sonuç histolojik ve immünohistokimyasal çalışmalarla da detaylandırılarak doğrulanmalıdır.

SONUÇ VE ÖNERİLER

Dental pulpa fibroblast hücrelerinde MTA ve PS'nin ON ve OK sentezi üzerindeki etkilerini incelediğimiz çalışmamız sonucunda;

1. PS, GMTA ve BMTA osteonektin sentezini uyarmıştır.
2. Deney gruplarında ölçülen en düşük ON seviyesi 0.001 normalizasyon değeri ile PS'de ölçülmüştür.
3. Deney gruplarında en yüksek ON seviyesi 0.990 normalizasyon değeri ile BMTA ve PS'de ölçülmüştür.
4. GMTA ve BMTA'nın taze veya sert olarak hazırlanması ON ekspresyonu üzerinde farklılığa neden olmazken ($p > 0.05$), taze olarak hazırlanan PS ON sentezini sert olarak hazırlanana göre daha fazla arttırmaktadır ($p < 0.05$).
5. Taze olarak hazırlanan PS, BMTA ve GMTA'ya göre ON sentezini daha fazla uyarmaktadır ($\chi^2=7.666$; $p=0.023$).
6. 24 ve 72 saatlik hücre kültür süreleri dikkate alındığında ON ekspresyonu PS'de farklılık göstermezken ($Z=0.310$; $p=0.190$), GMTA ve BMTA'da ON sentezi 72 saatlik hücre kültüründe azalmaktadır (sırasıyla $Z=0.520$; $p < 0.001$ ve $Z=0.520$; $p < 0.001$).
7. 24 saatlik hücre kültürü sonrasında en yüksek ON ekspresyonu 0.690 ortanca değeri ile BMTA'da, 72 saatlik hücre kültüründe ise 0.605 ortanca değeri ile PS'de izlenmiştir.
8. PS, BMTA ve GMTA'ya ait 1/1, 1/2, 1/4 ve 1/10'lük dilüsyonlar ON ekspresyonu üzerinde farklılık oluşturmamaktadır ($p > 0.05$).

9. Dental pulpa fibroblast hücrelerinde osteokalsin ekspresyonu tespit edilememiştir.

Dental pulpa fibroblast hücrelerinde osteokalsin ekspresyonu tespit edilememiş olup bu sonuç histolojik ve immünohistokimyasal çalışmalarla da doğrulanmalıdır.

Çalışma sonuçlarına genel olarak baktığımızda, PS, GMTA ve BMTA doku mineralizasyonu yönünden biyouyumlu olarak görülmekte olup daha fazla sayıda örnek, daha uzun süreli hücre kültürleri ve in vivo çalışmalar ile bu materyallerin doku mineralizasyonu üzerindeki etkileri daha iyi olarak ortaya konabilir.

PS'nin ON sentezinde en az GMTA ve BMTA kadar etkili olması ve MTA'ya göre daha ucuz ve kolay bulunan bir materyal olması nedeniyle diş hekimliği uygulamalarında bir alternatif olarak dikkate alınabileceğini göstermektedir. Bu amaçla diş hekimliğinde kullanılacak ticari formlara dönüştürülmesinin yararlı olacağını düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Min, KS., Kim, HI., Park, HJ., Pi, SH., Hong, CU., Kim, EC., Human pulp cells response to Portland cement in vitro, *J Endod.*, 33(2), 163-6, 2007.
2. Ivanovski, S., Haase, HR., Bartold, PM., Expression of bone matrix protein mRNAs by primary and cloned cultures of the regenerative phenotype of human periodontal fibroblasts., *J Dent Res.*, 80(7), 1665-71, 2001.
3. Martinez, EF., Araújo, VC., In vitro immunoexpression of extracellular matrix proteins in dental pulpal and gingival human fibroblasts, *Int Endod J.*, 37(11),749-55, 2004.
4. Torabinejad, M., Chivian, N., Clinical applications of mineral trioxide aggregate, *J Endodon.*, 25(3), 197-205, 1999.
5. Hoen, MM., Pink, FE., Contemporary endodontic retreatments: an analysis based on clinical treatment findings, *J Endod.*, 28, 834–6, 2002.
6. Siqueira, JF., Roças, IN., Clinical implications and microbiology of bacterial persistence after treatment procedures, *J Endod.*, 34,1291–301, 2008.
7. Ng, YL., Mann, V., Rahbaran, S., Lewsey, J., Gulabivala, K., Outcome of primary root canal treatment: systematic review of the literature: part 2— influence of clinical factors, *Int Endod J.*, 41, 6–31, 2008.
8. Parirokh, M., Torabinejad, M., Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review--Part I: chemical, physical, and antibacterial properties, *J Endod.*, 36(1),16-27, 2010.
9. Islam, I., Chng, HK., Yap, AU., Comparison of the physical and mechanical properties of MTA and portland cement, *J Endod.*, 32(3),193-7, 2006.
10. Asgary, S., Parirokh, M., Eghbal, MJ., Brink, F., Chemical differences between white and gray mineral trioxide aggregate, *J Endod.*, 31,101–3, 2005.

11. Camileri, J., Montesin, FE., Brady, K., Sweeney, R., Curtis, RV., Ford, TR., The constitution of mineral trioxide aggregate, *Dent Mater.*, 21, 297–303, 2005.
12. Ferris, DM., Baumgartner, JC., Perforation repair comparing two types of mineral trioxide aggregate, *J Endod.*, 30, 422-4, 2004.
13. Camileri, J., Hydration mechanisms of mineral trioxide aggregate, *Int Endod J.*, 40, 462–70, 2007.
14. Camileri, J., Characterization of hydration products of mineral trioxide aggregate, *Int Endod J.*, 41, 408–17, 2008.
15. Dammaschke, T., Gerth, HU., Zuchner, H., Schafer, E., Chemical and physical surface and bulk material characterization of white ProRoot MTA and two Portland cements, *Dent Mater.*, 21, 731–8, 2005.
16. Camileri, J., Montesin, FE., Papaioannou, S., McDonald, F., Pitt Ford, TR., Biocompatibility of two commercial forms of mineral trioxide aggregate, *Int Endod J.*, 37, 699–704, 2004.
17. Torabinejad, M., Hong, CU., McDonald, F., Pitt Ford, TR., Physical and chemical properties of a new root-end filling material, *J Endod.*, 21, 349–53, 1995.
18. Chng, HK., Islam, I., Yap, AU., Tong, YW., Koh, ET., Properties of a new root-end filling material, *J Endod.*, 31, 665–8, 2005.
19. Storm, B., Eichmiller, FC., Tordik, PA., Goodell, GG., Setting expansion of gray and white mineral trioxide aggregate and Portland cement, *J Endod.*, 34, 80–2, 2008.
20. Danesh, G., Dammaschke, T., Gerth, HU., Zandbiglari, T., Schafer, E., A comparative study of selected properties of ProRoot mineral trioxide aggregate and two Portland cements, *Int Endod J.*, 39, 213–9, 2006.
21. Fridland, M., Rosado, R., Mineral trioxide aggregate (MTA) solubility and porosity with different water-to-powder ratios, *J Endod.*, 29, 814–7, 2003.

22. Watts, JD., Holt, DM., Beeson, TJ., Kirkpatrick, TC., Rutledge, RE., Effects of pH and mixing agents on the temporal setting of tooth-colored and gray mineral trioxide aggregate, *J Endod.*, 33, 970–3, 2007.
23. Chogle, S., Mickel, AK., Chan, DM., Huffaker, K., Jones, JJ., Intracanal assessment of mineral trioxide aggregate setting and sealing properties, *Gen Dent.*, 55, 306–11, 2007.
24. Nekoofar, MH., Adusei, G., Sheykhrezae, MS., Hayes, SJ., Bryant, ST., Dummer, PM., The effect of condensation pressure on selected physical properties of mineral trioxide aggregate, *Int Endod J.*, 40, 453–61, 2007.
25. Holt, DM., Watts, JD., Beeson, TJ., Kirkpatrick, TC., Rutledge, RE., The anti-microbial effect against enterococcus faecalis and the compressive strength of two types of mineral trioxide aggregate mixed with sterile water or 2% chlorhexidine liquid, *J Endod.*, 33, 844–7, 2007.
26. Shah, PM., Chong, BS., Sidhu, SK., Ford TR., Radiopacity of potential root-end filling materials, *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.*, 81, 476–9, 1996 .
27. Camileri, J., Montesin, FE., Brady, K., Sweeney, R., Curtis, RV., Ford, TR., The constitution of mineral trioxide aggregate, *Dent Mater.*, 21, 297–303, 2005.
28. Asgary, S., Parirokh, M., Eghbal, MJ., Stowe, S., Brink, F.. A qualitative X-ray analysis of white and grey mineral trioxide aggregate using compositional imaging, *J Mater Sci Mater Med.*, 17, 187–91, 2006.
29. Komabayashi, T., Spangberg, LS., Comparative analysis of the particle size and shape of commercially available mineral trioxide aggregates and Portland cement: a study with a flow particle image analyzer, *J Endod.*, 34, 94–8, 2008.
30. Torabinejad, M., Hong, CU., Pitt Ford, TR., Kettering JD. Antibacterial effects of some root end filling materials, *J Endod.*, 21, 403–6, 1995.

31. Estrela, C., Bammann, LL., Estrela, CR., Silva, RS., Pecora, JD., Antimicrobial and chemical study of MTA, Portland cement, calcium hydroxide paste, Sealapex and Dycal, *Braz Dent J.*, 11, 3–9, 2000.
32. Al-Nazhan, S., Al-Judai, A., Evaluation of antifungal activity of mineral trioxide aggregate, *J Endod.*, 29, 826–7, 2003.
33. Al-Hezaimi, K., Al-Hamdan, K., Naghshbandi, J., Oglesby, S., Simon, JH., Rotstein, I., Effect of white-colored mineral trioxide aggregate in different concentrations on *Candida albicans* in vitro, *J Endod.*, 31, 684–6, 2005.
34. Abedi, HR., Van Mierlo, BL., Wilder-Smith, P., Torabinejad, M., Effects of ultrasonic root-end cavity preparation on the root apex, *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.*, 80(2), 207-13, 1995.
35. Roy, CO., Jeansonne, BG., Gerrets, TF., Effect of an acid environment on leakage of root-end filling materials, *J Endod.*, 27(1), 7-8, 2001.
36. Tanomaru Filho, M., Figueiredo, FA., Tanomaru, JM., Effect of different dyesolutions on the evaluation of the sealing ability of Mineral Trioxide Aggregate, *Braz Oral Res.*, 19(2), 119-22, 2005.
37. Vogt, BF., Xavier, CB., Demarco, FF., Padilha, MS., Dentin penetrability evaluation of three different dyes in root-end cavities filled with mineral trioxide aggregate (MTA), *Braz Oral Res.*, 20(2), 132-6, 2006.
38. Wu, MK., Kontakiotis, EG., Wesselink, PR., Decoloration of 1% methylene blue solution in contact with dental filling materials, *J Dent.*, 26(7), 585-9, 1998.
39. Kubo, CH., Gomes, AP., Mancini, MN., In vitro evaluation of apical sealing in root apex treated with demineralization agents and retrofiled with mineral trioxide aggregate through marginal dye leakage, *Braz Dent J.*, 16(3), 187-91, 2005.
40. Pichardo, MR., George, SW., Bergeron, BE., Jeansonne, BG., Rutledge, R., Apical leakage of root-end placed SuperEBA, MTA, and Geristore restorations in human teeth previously stored in 10% formalin, *J Endod.*, 32(10), 956-9, 2006.

41. Tobón-Arroyave, SI., Restrepo-Pérez, MM., Arismendi-Echavarría, JA., Velásquez-Restrepo, Z., Marín-Botero, ML., García-Dorado, EC., Ex vivo microscopic assessment of factors affecting the quality of apical seal created by root-end fillings, *Int Endod J.*, 40(8), 590-602, 2007.
42. Bates, CF., Carnes, DL., del Rio, CE., Longitudinal sealing ability of mineral trioxide aggregate as a root-end filling material, *J Endod.*, 22(11), 575-8, 1996.
43. Yatsushiro, JD., Baumgartner, JC., Tinkle, JS., Longitudinal study of the microleakage of two root-end filling materials using a fluid conductive system, *J Endod.*, 24(11), 716-9, 1998.
44. Wu, MK., Kontakiotis, EG., Wesselink, PR., Long-term seal provided by some root-end filling materials, *J Endod.*, 24(8), 557-60, 1998.
45. Fogel, HM., Peikoff, MD., Microleakage of root-end filling materials, *J Endod.*, 27(7), 456-8, 2001. Erratum in: *J Endod.*, 27(10), 634, 2001.
46. Valois, CR., Costa ED, Jr., Influence of the thickness of mineral trioxide aggregate on sealing ability of root-end fillings in vitro, *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.*, 97(1), 108-11, 2004.
47. Saghiri MA., Lotfi, M., Saghiri, AM., Vosoughhosseini, S., Fatemi, A., Shiezadeh, V., Ranjkesh, B., Effect of pH on sealing ability of white mineral trioxide aggregate as a root-end filling material, *J Endod.*, 34(10), 1226-9, 2008.
48. Torabinejad, M., Rastegar, AF., Kettering, JD., Pitt Ford, TR., Bacterial leakage of mineral trioxide aggregate as a root-end filling material, *J Endod.*, 21(3), 109-12, 1995.
49. Fischer, EJ., Arens, DE., Miller, CH., Bacterial leakage of mineral trioxide aggregate as compared with zinc-free amalgam, intermediate restorative material, and Super-EBA as a root-end filling material, *J Endod.*, 24(3), 176-9, 1998.

50. Ferik Luketić, S., Malčić, A., Jukić, S., Anić, I., Segović, S., Kalenić, S., Coronal microleakage of two root-end filling materials using a polymicrobial marker, *J Endod.*, 34(2), 201-3, 2008.
51. Maltezos, C., Glickman, GN., Ezzo, P., He, J., Comparison of the sealing of Resilon, Pro Root MTA, and Super-EBA as root-end filling materials: a bacterial leakage study, *J Endod.*, 32(4), 324-7, 2006.
52. Tang, HM., Torabinejad, M., Kettering, JD., Leakage evaluation of root end filling materials using endotoxin, *J Endod.*, 28(1), 5-7, 2002.
53. Lee, SJ., Monsef, M., Torabinejad, M., Sealing ability of a mineral trioxide aggregate for repair of lateral root perforations, *J Endod.*, 19(11), 541-4, 1993.
54. Daoudi, MF., Saunders, WP., In vitro evaluation of furcal perforation repair using mineral trioxide aggregate or resin modified glass ionomer cement with and without the use of the operating microscope, *J Endod.*, 28(7), 512-5, 2002.
55. Hardy, I., Liewehr, FR., Joyce, AP., Agee, K., Pashley, DH., Sealing ability of One-Up Bond and MTA with and without a secondary seal as furcation perforation repair materials, *J Endod.*, 30(9), 658-61, 2004.
56. Weldon JK, Jr., Pashley, DH., Loushine, RJ., Weller, RN., Kimbrough, WF., Sealing ability of mineral trioxide aggregate and super-EBA when used as furcation repair materials: a longitudinal study, *J Endod.*, 28(6), 467-70, 2002.
57. Nakata, TT., Bae, KS., Baumgartner, JC., Perforation repair comparing mineral trioxide aggregate and amalgam using an anaerobic bacterial leakage model, *J Endod.*, 24(3), 184-6, 1998.
58. De-Deus, G., Petruccelli, V., Gurgel-Filho, E., Coutinho-Filho, T., MTA versus Portland cement as repair material for furcal perforations: a laboratory study using a polymicrobial leakage model, *Int Endod J.*, 39(4), 293-8, 2006.

59. Kettering, JD., Torabinejad, M., Investigation of mutagenicity of mineral trioxide aggregate and other commonly used root-end filling materials, *J Endod.*, 21(11), 537-42, 1995.
60. Asrari, M., Lobner, D., In vitro neurotoxic evaluation of root-end-filling materials, *J Endod.*, 29(11), 743-6, 2003.
61. Masuda, YM., Wang, X., Hossain, M., Unno, A., Jayawardena, JA., Saito, K., et al. Evaluation of biocompatibility of mineral trioxide aggregate with an improved rabbit ear chamber, *J Oral Rehabil.*, 32(2), 145-50, 2005.
62. Tunca, YM., Aydin, C., Ozen, T., Seyrek, M., Ulusoy, HB., Yildiz, O., The effect of mineral trioxide aggregate on the contractility of the rat thoracic aorta, *J Endod.*, 33(7), 823-6, 2007.
63. Torabinejad, M., Hong, CU., Pitt Ford, TR., Kettering, JD., Cytotoxicity of four root end filling materials, *J Endod.*, 21(10), 489-92, 1995.
64. Keiser, K., Johnson, CC., Tipton, DA., Cytotoxicity of mineral trioxide aggregate using human periodontal ligament fibroblasts, *J Endod.*, 26(5), 288-91, 2000.
65. Haglund, R., He, J., Jarvis, J., Safavi, KE., Spangberg, LS., Zhu, Q., Effects of root-end filling materials on fibroblasts and macrophages in vitro, *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.*, 95(6), 739-45, 2003.
66. Camp, MA., Jeansonne, BG., Lallier, T., Adhesion of human fibroblasts to root-end-filling materials, *J Endod.*, 29(9), 602-7, 2003.
67. Huang, TH., Yang, CC., Ding, SJ., Yeng, M., Kao, CT., Chou, MY., Inflammatory cytokines reaction elicited by root-end filling materials, *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.*, 73(1), 123-8, 2005.
68. Pistorius, A., Willershausen, B., Briseño Marroquin, B., Effect of apical root-end filling materials on gingival fibroblasts, *Int Endod J.*, 36(9), 610-5, 2003.

69. Koçak, S., Yeni Geliştirilen Deneş Materyalin ve Mineral Trioksit Agregat'ın Biyouyumluluklarının İn Vivo Olarak Değerlendirilmesi, Diş Hastalıkları Ve Tedavisi Anabilim Dalı Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2009.
70. Islam, I., Chng, HK., Yap, AU., X-ray diffraction analysis of mineral trioxide aggregate and Portland cement, *Int Endod J.*, 39(3), 220-5, 2006.
71. Funteas, UR., Wallace, JA., Fochtman, EW., A comparative analysis of Mineral Trioxide Aggregate and Portland cement, *Aust Endod J.*, 29(1), 43-4, 2003.
72. Abdullah, D., Ford, TR., Papaioannou, S., Nicholson, J., McDonald F., An evaluation of accelerated Portland cement as a restorative material, *Biomaterials*, 23(19), 4001-10, 2002.
73. Saidon, J., He, J., Zhu, Q., Safavi, K., Spångberg, LS., Cell and tissue reactions to mineral trioxide aggregate and Portland cement, *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.*, 95(4), 483-9, 2003.
74. Ribeiro, DA., Duarte, MA., Matsumoto, MA., Marques, ME., Salvadori, DM., Biocompatibility in vitro tests of mineral trioxide aggregate and regular and white Portland cements, *J Endod.*, 31(8), 605-7, 2005.
75. Puchacz, E., Lian, JB., Stein, GS., Wozney, J., Huebner, K., Croce, C., Chromosomal localization of the human osteocalcin gene, *Endocrinology*, 124(5), 2648-50, 1989.
76. NCBI BGLAP bone gamma-carboxyglutamate (gla) protein Gene Entrez Results; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/632> [Erişim tarihi: 12 Mayıs 2010].
77. Lee, NK., Sowa, H., Hinoi, E., Ferron, M., Ahn, JD., Confavreux, C., Dacquin, R., Mee, PJ., McKee, MD., Jung, DY., Zhang, Z., Kim, JK., Mauvais-Jarvis, F., Ducy, P., Karsenty, G., Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton, *Cell*, 10, 130(3), 456-69, 2007.
78. NCBI Osteonectin Gene Entrez Results; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6678> [Erişim tarihi: 16 Mayıs 2010].

79. Min, KS., Lee, SI., Lee, Y., Kim, EC., Effect of radiopaque Portland cement on mineralization in human dental pulp cells, *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.*, 108(4), e82-6, 2009.
80. Temrine, JD., Kleinman, HK., Whitson, SW., Conn, KM., McGarvey, ML., Martin, GR., Osteonectin, a bone-specific protein linking mineral to collagen, *Cell*, 26(1 Pt 1), 99-105, 1981.
81. Reichert, T., Störkel, S., Becker, K., Fisher, LW., The role of osteonectin in human tooth development: an immunohistological study, *Calcif Tissue Int.*, 50(5), 468-72, 1992.
82. Martinez, EF., Araújo, VC. In vitro immunoexpression of extracellular matrix proteins in dental pulpal and gingival human fibroblasts, *Int Endod J.*, 37(11), 749-55, 2004.
83. Goldberg, M., Lasfargues JJ., Pulpo-dentinal complex revisited, *J Dent.*, 23(1), 15-20, 1995.
84. Osorio, RM., Hefti, A., Vertucci, FJ., Shawley, AL., Cytotoxicity of endodontic materials, *J Endod.*, 24(2), 91-6, 1998.
85. Thomson, TS., Berry, JE., Somerman, MJ., Kirkwood, KL., Cementoblasts maintain expression of osteocalcin in the presence of mineral trioxide aggregate, *J Endod.*, 29(6), 407-12, 2003.
86. Andelin, WE., Shabahang, S., Wright, K., Torabinejad, M., Identification of hard tissue after experimental pulp capping using dentin sialoprotein (DSP) as a marker, *J Endod.*, 29(10), 646-50, 2003.
87. Ham, KA., Witherspoon, DE., Gutmann, JL., Ravindranath, S., Gait, TC., Opperman, LA., Preliminary evaluation of BMP-2 expression and histological characteristics during apexification with calcium hydroxide and mineral trioxide aggregate, *J Endod.*, 31(4), 275-9, 2005.
88. Yasuda, Y., Ogawa, M., Arakawa, T., Kadowaki, T., Saito, T., The effect of mineral trioxide aggregate on the mineralization ability of rat dental pulp cells: an in vitro study, *J Endod.*, 34(9), 1057-60, 2008.

- 89.** Simon, S., Cooper, P., Smith, A., Picard, B., Ifi, CN., Berdal, A., Evaluation of a new laboratory model for pulp healing: preliminary study, *Int Endod J.*, 41(9), 781-90, 2008.
- 90.** Min, KS., Park, HJ., Lee, SK., Park, SH., Hong, CU., Kim, HW., Lee, HH., Kim, EC., Effect of mineral trioxide aggregate on dentin bridge formation and expression of dentin sialoprotein and heme oxygenase-1 in human dental pulp, *J Endod.*, 34(6), 666-70, 2008.
- 91.** Sarkar, NK., Caicedo, R., Ritwik, P., Moiseyeva, R., Kawashima, I., Physicochemical basis of the biologic properties of mineral trioxide aggregate, *J Endod.*, 31(2), 97-100, 2005.
- 92.** Koh, ET., Torabinejad, M., Pitt Ford, TR., Brady, K., McDonald, F., Mineral trioxide aggregate stimulates a biological response in human osteoblasts, *J Biomed Mater Res.*, 5;37(3), 432-9, 1997.
- 93.** Pérez, AL., Spears, R., Gutmann, JL., Opperman, LA., Osteoblasts and MG-63 osteosarcoma cells behave differently when in contact with ProRoot MTA and White MTA, *Int Endod J.*, 36(8), 564-70, 2003.
- 94.** Balto, HA., Attachment and morphological behavior of human periodontal ligament fibroblasts to mineral trioxide aggregate: a scanning electron microscope study, *J Endod.*, 30(1), 25-9, 2004.
- 95.** Pelliccioni, GA., Ciapetti, G., Cenni, E., Granchi, D., Nanni, M., Pagni, S., Giunti, A., Evaluation of osteoblast-like cell response to Proroot MTA (mineral trioxide aggregate) cement, *J Mater Sci Mater Med.*, 15(2), 167-73, 2004.
- 96.** Camilleri, J., Montesin, FE., Di Silvio, L., Pitt Ford, TR., The chemical constitution and biocompatibility of accelerated Portland cement for endodontic use, *Int Endod J.*, 38(11), 834-42, 2005.
- 97.** Bonson, S., Jeansonne, BG., Lallier, TE., Root-end filling materials alter fibroblast differentiation, *J Dent Res.*, 83(5), 408-13, 2004.

- 98.** Alanezi, AZ., Jiang, J., Safavi, KE., Spangberg, LS., Zhu, Q., Cytotoxicity evaluation of endosequence root repair material, *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.*, 109(3), 122-5, 2010.
- 99.** Tani-Ishii, N., Hamada, N., Watanabe, K., Tujimoto, Y., Teranaka, T., Umemoto, T., Expression of bone extracellular matrix proteins on osteoblast cells in the presence of mineral trioxide, *J Endod.*, 33(7), 836-9, 2007.
- 100.** Chen, CL., Huang, TH., Ding, SJ., Shie, MY., Kao, CT., Comparison of calcium and silicate cement and mineral trioxide aggregate biologic effects and bone markers expression in MG63 cells, *J Endod.*, 35(5), 682-5, 2009.
- 101.** Hakki, SS., Bozkurt, SB., Hakki, EE., Belli, S., Effects of mineral trioxide aggregate on cell survival, gene expression associated with mineralized tissues, and biomineralization of cementoblasts, *J Endod.*, 35(4), 513-9, 2009.