

MTA Fillapex'in *In Vitro* Genotoksitesinin Değerlendirilmesinin Sistematik İncelemesi

MTA Fillapex *In Vitro* Genotoxicity Assessment: A Systematic Review

^{1b} Soley ARSLAN^a, ^{1b} Yakup ÜSTÜN^b, ^{1b} Nazife TAŞÇIOĞLU^c, ^{1b} Sebahat Melike DURUKAN^a,
^{1b} Burak SAĞSEN^b, ^{1b} Müge Gülcihan ÖNAL^c, ^{1b} Munis DÜNDAR^c

^aErciyes Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi, Restoratif Diş Tedavisi ABD, Kayseri, Türkiye

^bErciyes Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi, Endodonti ABD, Kayseri, Türkiye

^cErciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik ABD, Kayseri, Türkiye

ÖZET Amaç: MTA Fillapex ve AH Plus kanal dolum patlarının, insan hücrelerindeki genotoksik ve sitotoksik etkileri ve insan kan lenfositlerindeki potansiyel genotoksik etkileri ve genotoksosite mekanizmasının işleyişi hakkında yeterli bilgi bulunmamaktadır. Bu sebepler göz önünde bulundurularak, çalışmamızda mevcut materyallerin genotoksosite ve sitotoksosite etkinliği araştırmak amacıyla Sitokinez-Bloke Mikronükleus Sitom yönteminin kullanımı ile ulaşılması hedeflenen etkilerin araştırılması amaçlanmıştır. **Gereç ve Yöntemler:** Yaşları 20-35 arasında değişen sağlıklı, herhangi bir rutin ilaç kullanımı ve bağımlılığı bulunmayan 10 bireyden 10 mL kan alındı. Bu örneklerle elde edilen lenfosit kültürlerine değişik konsantrasyonlarda MTA Fillapex ve AH Plus kanal dolgu patları eklendi. Bulunan mikronükleuslu binükleer hücreler, gözlenen metafaz sayıları, nükleoplazmik köprülü [nucleoplasmic bridged (NPB)] ve nükleer tomurcuklu hücreler sayıldı. Preparatlarda 1.000 adet hücre sayıldıktan sonra apoptotik ve nekrotik hücrelerin mevcudiyeti de kayıt altına alındı. **Bulgular:** Veriler, parametrik olmayan Wilcoxon T-testi ile değerlendirildi. MTA Fillapex patı doz artışıyla beraber toksisitesinde de artış gözlenmiştir. Fakat NPB hücrelerin parametresi hariç tüm parametrelerde, pozitif kontrole göre anlamlı seviyede daha az seviyelerde toksisite saptanmıştır. NPB hücrelere ait bulgular incelendiğinde, MTA Fillapex grubu ile pozitif kontrol arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir farka rastlanmamıştır. AH Plus polimerizasyon süresi boyunca toksisite göstermiştir. **Sonuç:** MTA Fillapex patı, insan kan hücreleri üzerinde AH Plus macununa göre daha az sitotoksik ve genotoksik etki göstermiştir.

ABSTRACT Objective: There is a few information about the genotoxic and cytotoxic effects of MTA Fillapex and AH Plus canal filling pastes in human pulp and pulp blood cells. And even that we know the there are some cytotoxic effects on the blood cells there is not enough data about the mechanism of these effects. Considering these reasons, in our study, it was aimed to investigate genotoxic and cytotoxic efficiency of the available materials by using the Cytokinesis-Blocked Micronucleus Cytome method. **Material and Methods:** 10 mL blood was obtained from ten healthy persons aged 20-35 years who did not use pharmaceuticals or were addicted to them on a regular basis. To the lymphocyte cultures derived from these samples, various quantities of MTA Fillapex and AH Plus channel fillers were applied. Micronucleus binuclear cells found, observed metaphase numbers, nucleoplasmic bridged (NPB) and nuclear bud cells were counted. After counting 1,000 cells in the samples, the presence of apoptotic and necrotic cells was also recorded for the statistical data. **Results:** Data were evaluated with non-parametric the Wilcoxon T-test. When the findings were evaluated, it was observed that the toxicity of MTA Fillapex increased with the dose. However, in all parameters except the NPB cells parameter, significantly less toxicity was detected compared to the positive control. After we observe data about NPB cells we found that there is no statistically significant difference between the MTA Fillapex group and positive control group also AH Plus study group showed toxicity during the polymerization period. **Conclusion:** MTA Fillapex paste showed less cytotoxic and genotoxic effect than AH Plus paste on the human blood cells.

Anahtar Kelimeler: MTA Fillapex; AH Plus; genotoksosite; Sitokinez-Bloke Mikronükleus Sitom analizi

Keywords: MTA Fillapex; AH Plus; genotoxicity; Cytokinesis-Block Micronucleus Cytome assay

Endodontik tedavi, kök kanal sisteminde mevcut pulpa, doku artıklarının, mikroorganizmalarının elimine edilmesini ve ardından hermetik bir şekilde doldurulmasını amaçlar. İdeal bir kanal dolgu patı, sertleştikten sonra mükemmel sızdırmazlık,

boyutsal stabilite, yeterli çalışma süresi sağlamak için geniş bir sertleşme zamanı, doku sıvılarında çözünmezlik, kanal duvarlarına yeterli yapışma ve biyouyumluluk gibi birçok özelliğe sahip olmalıdır.¹

Correspondence: S. Melike DURUKAN
Erciyes Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi, Restoratif Diş Tedavisi ABD, Kayseri, Türkiye
E-mail: drknmlk@gmail.com



Peer review under responsibility of Türkiye Klinikleri Journal of Dental Sciences.

Received: 08 Jun 2021

Received in revised form: 28 Sep 2021

Accepted: 29 Sep 2021

Available online: 05 Oct 2021

2146-8966 / Copyright © 2022 by Türkiye Klinikleri. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Kanal dolgu patları, kök kanal tedavisinin başarısında oldukça önemli bir role sahiptir. Yapılan birçok çalışmada temel hedef, kullanılacak dolgu patı miktarını azaltarak, istenen ölçüde periapikal dokularda hermetik tıkaçlama ve sızdırmazlık sağlamaktır.²

Kanal dolgu patları, çinko oksit öjenol, kalsiyum hidroksit, cam iyonomer, silikon, rezin ve biyoseramik esaslı temel kimyasal bileşiklerine göre farklı kategorilere ayrılabilir.³

AH Plus (Dentsply Maillefer, Ballaigues, İsviçre), endodontide yaygın olarak kullanılan epoksi rezin esaslı bir kanal dolgu maddesidir. Kök kanal duvarlarına iyi yapışmanın yanı sıra iyi sızdırmazlık, iyi derecede radyoopasite, kolay kullanım, iyi direnç, boyutsal stabilite, yüksek akış ve düşük çözünürlük özelliklerini sunar. Periodontal dokularda, başlangıçta hafif bir inflamatuvar reaksiyona neden olsa da tatmin edici biyoyoumluluğa sahiptir. Oluşan bu inflamatuvar yanıtın sebebi olarak polimerizasyon esnasında meydana gelen (minimum düzeylerde) formaldehit salınımı ile ilişkili olabileceği ya da AH Plus bileşiminde bulunan başka bir sitotoksik organik bileşen olan bisfenol A kaynaklı olabileceği düşünülmektedir.⁴

Mineral trioksit agregat (MTA), 1993 yılında Torabinejad ve ark. tarafından endodontide tanıtıldı. Retrograd dolgu prosedürleri, kök ve furkasyon perforasyonları sırasında doğrudan pulpanın kapatılmasında ve ayrıca kök oluşumu yetersiz kalmış dişlerin tedavisinde kullanılmıştır.⁵ Kalsiyum oksit, MTA'nın ana bileşenlerinden biridir ve varlığında kalsiyum hidroksit yüksek alkali pH'ye neden olarak MTA'nın antimikrobiyal etkinliğinde kayda değer bir rol oynamaktadır.^{6,7} Alkali pH, bazı mikroorganizmaların protein yapıları üzerinde yıkıcı bir etkiye sahiptir, bu da bazı hücre zarı enzim inaktivasyonunu ve biyolojik aktivitenin kaybını teşvik eder, ardından membran bütünlüğü hasarı oluşur.⁸ Ek olarak MTA, organik dokularla temas ettiğinde alkali pH (10,2-12,5) mineralize doku oluşumunu da sağlar.⁹ Yüksek pH, alkalik fosfataz enziminin ekspresyonunu aktive eder ve uyarır, mineralize dokunun oluşumunu ve birikmesini teşvik eder ve daha sonra düşük inflamatuvar reaksiyonla fibröz bir kapsül oluşumuna izin verir.⁹

1999 yılında Holland ve ark., MTA'nın dolgu malzemesi olarak kullanılmasını önerdi.⁸ Bununla birlikte Holland ve ark. tarafından tarif edilen tüm özellikler ve aktiviteler, bir kök kanal sızdırmazlık maddesi olarak kullanıldığında, tatmin edici fiziksel özelliklere sahip olan beyaz MTA simanını tanımlamaktadır. Daha sonraları MTA'nın kök kanal dolgu malzemesi olarak kullanımından yola çıkarak, MTA içerikli kök kanal dolgu patı MTA Fillapex (MTA Fillapex; Angelus, Londrina, Brezilya) piyasaya sürülmüştür. Bu MTA içerikli kök kanal patının ve diğer kök kanal patları ile karşılaştırıldığında sitotoksik ve biyolojik özelliklerinin bilinmesi önemlidir.

Kök kanal dolgu patları için biyolojik uyumluluk önemli bir gerekliliktir. Birçok çalışma, genel toksikolojik ve lokal doku irritasyonu özellikleri üzerine odaklanmıştır. Fakat kök kanal patlarının mutajenite ve karsinojenite testleri hakkında sınırlı bilgi vardır.

Endodontide kullanılan dolgu malzemelerinin, antibakteriyel özelliklere ve optimal biyoyoumluluğa sahip olmaları gereklidir.¹⁰ Ayrıca iyileşmeyi teşvik etmeli ve hermetik bir dolgu sağlamalıdır. Bu maddelerin biyoyoumluluğu, periapikal dokular ile uzun süre doğrudan temas hâlinde oldukları için oldukça büyük öneme sahiptir.¹¹ Biyoyoumlu ajanlar, doku iyileşmesini iyileştirmekle kalmaz, aynı zamanda yararlı dokuyu da organize eder.¹²

Günümüzde kullanılan dental materyallerin biyoyoumluluğunun değerlendirilmesinde, sitotoksisite ve genotoksisite çalışmaları yaygın olarak araştırmalara dâhil edilmektedir.^{12,13} Hücre fonksiyonunun *in vitro* analizi, bu amaç için ilk yaklaşımdır.¹⁴ Genotoksisitenin değerlendirilmesi, biyoyoumluluğun da değerlendirilmesinde büyük öneme sahiptir.¹⁵

Genotoksik etkilerin belirlenmesi için çeşitli çalışma sistemleri geliştirilmiştir. Hayvan çalışmaları, insan metabolizmasını yansıtmak için oldukça doğru olabilir; ancak maliyetli ve zaman alıcıdır.

Bu nedenle *in vitro* genotoksisite testleri, önemli bir kanserojen gösterge olan DNA kopmaları, gen mutasyonu, kromozomal kopmaları ve DNA onarım kabiliyetindeki değişiklikler gibi hücrelerin genetik materyaline zarar veren ürünleri ve bileşenleri saptamak için tasarlanmıştır.¹⁶

Bunlardan mikronükleus deneyi; kromozom mutasyonlarını, klastojenisiteyi ve anojenisiteyi saptamak için kullanılabilir,¹⁷ çünkü kromozomlar ve bunların fragmanları, hücre döngüsünün interfazında mikronükleus oluşumuna yol açabilir.¹⁸

Mikronükleus tekniğinin gelişimine kısaca bakacak olursak, 1950'li yıllarda bitki hücrelerinde kromozom hasarının ölçülmesinde,¹⁸ 1970'li yıllarda hayvan hücrelerinde ve daha sonra kültüre edilmiş insan lenfositlerinde kimyasal karsinojenleri belirlemeye yönelik bir test olarak kullanılmaya başlanmıştır.

Daha sonraları Fenech ve Morley tarafından geliştirilen sitokinezi-blok metodu, bazı kinetik problemlerin ortadan kalkmasını ve tekniğin uygulanmasındaki güvenilirliğin artmasını sağlamıştır. Bu metod, küf mantarlarının metabolitlerinden biri olan sitokalazin-B [cytochalasin B (Cyt-B)] ile mitoz geçiren hücrelerde sitokinezi durdurma esasına dayanmaktadır.¹⁹

Standart lenfosit kültürlerine uygun konsantrasyonda Cyt-B ilavesi ile çekirdek bölünmesini tamamlamış, ancak sitoplazmik bölünmesini gerçekleştirilememiş çift çekirdekli hücreler kolaylıkla tanınarak sayılabilmekte ve mikronükleus bulunduran hücrelerin oranı saptanabilmektedir.

Sitokinez-Bloke Mikronükleus Sitom [Cytokinesis-Blocked Micronucleus Cytome (CBMN)] yöntemi, DNA ya da kromozom seviyesinde lezyonları belirlemek için çeşitli hücre tiplerine uygulanabilen ve periferik kan lenfositlerde mikronükleus frekansını değerlendirmek için yaygın olarak kullanılan bir genotoksikite metodudur.¹² Bin tane binükleer hücre sayılırken mikronükleus, nükleoplazmik köprü [nucleoplasmic bridge (NPB)] ve nükleer tomurcuk [nuclear bud (NBud)] skorları kaydedilir. Mikronükleuslar, bölünen hücrelerde kromozom parçalarını ya da anafazda geri kalma sonucu oluşan tüm kromozomları içerebilirler. Bölünen hücrelerde mikronükleus, tamir edilemeyen ya da yanlış tamir edilen DNA lezyonlarından, mitoz bölünme sırasındaki kusurlardan kaynaklanan hatalı kromozom ayrılmalarından oluşur.

Ayrıca CBMN yöntemi, son yıllarda iyileştirilmiş ve CBMN-Cyt yöntemi geliştirilmiştir. Bu yön-

tem; DNA hasarı, sitostazi ve sitotoksikite ölçümü için detaylı bir sistemdir.^{1,13} Bu sistemde; DNA hasarı olayları, skorlanan binükleer hücrelerde kromozom kırık ve/veya tüm kromozom kaybının işareti olarak mikronükleusları, DNA yanlış tamiri ve/veya telomer uç birleşimlerinin işareti olarak NPB'leri, amplifiye DNA'nın ve/veya DNA tamir komplekslerinin eliminasyonunun işareti olarak NBud'ları içermektedir. Sitotoksik etkiler, 1.000 tane tek çekirdekli (mononükleer) hücre sayılırken, aynı zamanda nekrotik ve apoptotik hücre oranları ile ölçülmektedir.

MTA Fillapex'in, insan hücrelerindeki genotoksik ve sitotoksik etkileri üzerine yapılan çalışma olmayıp, insan kan lenfositlerindeki potansiyel genotoksik etkileri ve genotoksikite mekanizması bilinmemektedir. Bu çalışmada, genotoksikite ve sitotoksikite etkinliğini araştırmak amacıyla CBMN-Cyt yönteminin kullanımını amaçlanmıştır.

Araştırmamızda, 0 hipotezimiz; MTA Fillapex'in insan kan lenfositleri üzerinde genotoksik etkisinin olmayacağı, sitotoksik etkisinin ise AH Plus'a göre daha az olacağıdır.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışmada, CBMN-Cyt yöntemi kullanılarak, MTA Fillapex ve AH Plus kanal dolgu patlarının, kan lenfositleri üzerindeki genotoksik ve sitotoksik etkileri araştırıldı.

Çalışmamız, Helsinki Deklarasyonu Prensipleri'ne uygun olarak yapılmıştır.

1. KAN ÖRNEKLERİNİN ALINMASI

Çalışmaya, 20-35 yaşları arasında 10 sağlıklı birey dâhil edildi. Çalışma, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (etik kurul onay tarihi: 08.12.2010 ve 16 no.lu toplantı kararı). Çalışma dâhilindeki bireylerden kan örnekleri toplanmadan önce onam formu alınmıştır. Bu kişiler, herhangi bir sistemik rahatsızlığı, zararlı alışkanlığı bulunmayan sağlıklı bireylerden seçildi.

Çalışmaya dâhil olan 10 kişinin 10 mL'lik steril ve 0,1-0,2 cc heparin içeren enjektörler kullanılarak periferik kanları alındı. Daha sonra örneklerin, bekletilmeden 2 saat içinde kültür ortamlarına ekimi yapıldı.

2. KÜLTÜR TEKNİĞİ

Önceden 37 °C'ye getirilmiş olan 5 cc medyum içeren kültür tüplerine, 12 damla (0,4 mL) kan ilave edildi. Her bir kişi için 11 tüpe ekim yapıldı. Tüpler hafifçe karıştırılarak 37 °C'lik etüvde 24. saatte MTA Fillapex ve AH Plus solüsyonları, çözücü kontrol-dimetil sülfoksit, pozitif kontrol-mitomisin C (MMC) eklendi, 44. saatte Cyt-B eklemek koşuluyla 72 saat kültüre edildi.

2.1. Cyt-B'nin Hazırlanması ve Eklenmesi

1 mg Cyt-B (6762, Sigma Aldrich, Merck, Almanya), 1 mL dimetil sülfoksitte çözdürüldü ve total 5 mL olacak şekilde medyuma sulandırılarak hazırlandı. Çıkarımın 44. saatinde kültür tüpleri etüvden çıkartılarak, steril ortamda her bir tüpe 75 µL (final konsantrasyonu: 3 µg/mL) Cyt-B ilave edilerek tekrar etüve konuldu.

2.2. MTA Fillapex'in Hazırlanması ve Eklenmesi

0,25 g karıştırılmış MTA Fillapex, 5 mL dimetil sülfoksit ile çözülerek stok solüsyon hazırlandı. Stoktan 1 mL alınarak, üzerine 9 mL dimetil sülfoksit eklenerek stok solüsyon sulandırıldı. Farklı konsantrasyonlar için 1. sulandırılan solüsyondan 25 µL, 50 µL, 75 µL ve 100 µL MTA Fillapex solüsyonları kültür- lere eklendi.

2.3. AH Plus'in Hazırlanması ve Eklenmesi

0,25 g karıştırılmış AH Plus, 5 mL dimetil sülfoksit ile çözülerek stok solüsyon hazırlandı. Stoktan 1 mL alınarak, üzerine 9 mL dimetil sülfoksit eklenerek stok solüsyon sulandırıldı. Farklı konsantrasyonlar için 1. sulandırılan solüsyondan 25 µL, 50 µL, 75 µL ve 100 µL AH Plus solüsyonları kültür- lere eklendi.

2.4. Pozitif Kontrolün Hazırlanması ve Eklenmesi

Pozitif kontrol olarak MMC (M0503, Sigma Aldrich, Merck, Almanya) kullanıldı. 2 mg MMC, 10 mL steril distile su ile çözülerek stok solüsyon hazırlandı. Stok solüsyondan 0,1 mL alınarak, üzerine 0,9 mL steril distile su eklendi. Hazırlanan bu solüsyon, -20°C'de saklandı ve hazırlanan bu solüsyondan, final konsantrasyonu 0,5 µM olacak şekilde kültür- lere 42 µL MMC eklendi.

2.5. Çözücü Kontrolün Hazırlanması ve Eklenmesi

Her bir kişi için 1 tüpe, çözücü kontrol olarak 20 µL dimetil sülfoksit eklendi. Preparatlar hazırlandı ve %6'lık Giemsa'da boyandı.

3. LAMLARIN İNCELENMESİ

3.1. Preparat Hazırlama

Lamlar temizlenerek içinde %70'lik metanol bulunan şaleye yerleştirilip, soğuyuncaya kadar buzdolabı buzlukunda bekletildi. Daha sonra şaleden çıkarılan lamlar iyice kurulandı. Pastör pipeti ile fiksatifli hücre içeren kültür tüplerine pipetaj yapılarak, hücre süspansiyonundan Pastör pipeti yardımıyla lamlara yakın mesafeden (1-2 cm yukarıdan) 9-10 damla damlatıldı, hücrelerin lam üzerine iyice dağılması sağlandı, kurumaya bırakıldı. Her kültür tüpü için ayrı Pastör pipeti kullanılarak, farklı preparatlar hazırlandı ve lamlar ayrı ayrı kodlandı.

3.2. Preparatların Boyanması ve Saklanması

94 mL Sørensen boya tamponu (pH=7,0) üzerine 6 mL Giemsa boyası (48900, Merck, Almanya) eklenerek, Giemsa boyası hazırlandı. Kurumuş olan preparatlar, yeni hazırlanan %6'lık Giemsa'da 8 dk boyandıktan hemen sonra 2 kez distile su ile yıkılarak kurumaya bırakıldı.

3.3. Lamların İncelenmesi

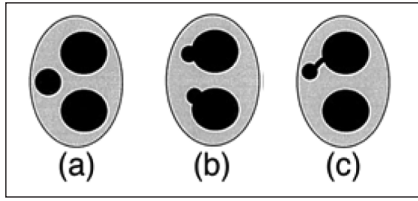
Hazırlanan preparatlarda ışık mikroskopunda x40 büyütmede:

DNA hasarı için; 1.000 binükleer hücre sayıldı ve bulunan mikronükleus, NBud ve NPB sayıları kaydedildi.

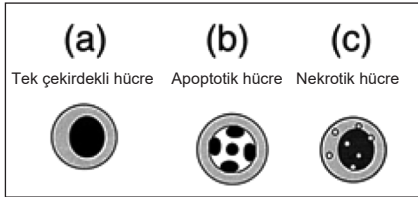
Hücre çoğalması için; 1.000 mononükleer hücre sayılırken bulunan binükleer, multinükleer hücreler skorlandı ve nükleer bölünme indeksi formülü kullanılarak, nükleer bölünme indeksi hesaplandı.

Hücre ölümü için; 1.000 mononükleer hücre sayılırken gözlenen apoptotik ve nekrotik hücreler skorlandı.

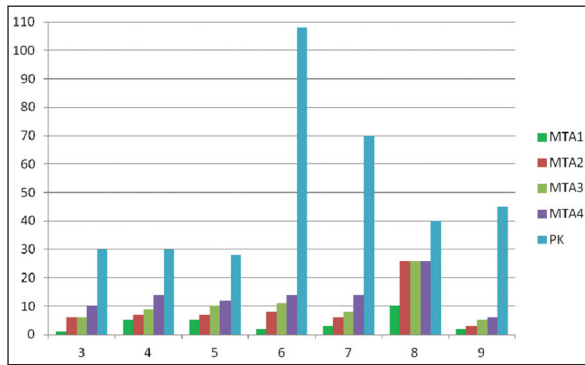
Her bir kültür için 1.000 binükleer hücrede mikronükleus, NPB ve NBud sayıları kaydedilirken, görülen metafaz sayıları da kaydedildi. Prometafaz ve metafaz evresindeki 1, 2, 3 ve 4 çekirdekli hücreler, metafaz olarak kaydedildi (Şekil 1, Şekil 2).



ŞEKİL 1: a) Bir mikronükleus bulunduran binükleer hücre; b) Nükleer tomurcuk olan binükleer hücre; c) Nükleoplazmik köprü ile bağlı nükleer tomurcuk bulunduran binükleer hücre.



ŞEKİL 2: a) Canlı bir mononükleer hücre; b) Erken evre apoptozdaki mononükleer hücre; c) Erken evre nekrotik hücre.



ŞEKİL 3: MTA Fillapex ve pozitif kontrol gruplarının nükleer tomurcuk hücrelere ait değerleri. Dikey eksen, hücre kültürü sonucu nükleer tomurcuk hücre oranlarını, yatay eksen ise örneklerin elde edildiği ve sayım yapılabilen bireyleri temsil etmektedir.

VERİ ANALİZİ

Çalışmanın istatistik değerlendirmeleri, IBM SPSS 17.0 programı kullanılarak yapılmıştır. İstatistiksel test olarak parametrik olmayan Wilcoxon testi uygulanmıştır. Anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ olarak belirlenmiştir. İstatistiksel değerlendirmede genotoksisite parametrelerinden mikronükleus, NPB ve NBud değerleri dikkate alındı.

BULGULAR

Genotoksisite parametrelerinden olan mikronükleusun değerleri pozitif kontrol ile MTA Fillapex'in

farklı dozları kullanılan hücre kültürü grupları arasında istatistiksel anlamlı farklılık vardır ($p < 0,001$). Pozitif kontrol grubunda daha fazla hasar gözlemlenmiştir.

Diğer genotoksisite parametresi olan NBud değerleri pozitif kontrol grubu ile MTA Fillapex'in farklı dozları kullanılan hücre kültürü grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0,05$). NBud değerleri açısından MTA Fillapex'in 1 ve 2. dozları ve pozitif kontrol karşılaştırıldığında (sırasıyla $p < 0,012$ ve $p < 0,014$) istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

MTA Fillapex'in dozları arttıkça, daha fazla hasar verdiği anlaşılmıştır (Şekil 3).

Sitotoksisite parametrelerinden olan apoptotik ve nekrotik hücre değerlendirmelerinde, pozitif kontrol grubu ile MTA'nın farklı dozları kullanılan hücre kültürü grupları arasında karşılaştırma yapıldığında, apoptotik ve nekrotik değerleri MTA Fillapex'in 1 ve 2. dozlarında sırasıyla $p < 0,017$ ve $p < 0,025$; $p < 0,038$ ve $p < 0,028$ istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

AH Plus patının değerlendirmelerinde, mikronükleus parametresi esas alındığında pozitif kontrol karşısında anlamlı sonuç elde edilmiştir ($p < 0,005$). Fakat yalnızca 3 örnekte sayım yapılabilmemiş olması ve diğer örneklerde herhangi bir canlı hücreye dahi rastlanamamış olması sebebi ile istatistiksel analiz değerlendirmesinde kullanılamamıştır. Tüm bu nedenler göz önüne alınarak Tablo 1 ve Şekil 3'te izlenen veriler, MTA bulguları ve pozitif kontrol gruplarının karşılaştırılması ile elde edilmiştir.

TARTIŞMA

Bu çalışmanın amacı, insan periferik kan lenfositleri üzerinde MTA Fillapex'in *in vitro* indüklenen genotoksik ve sitotoksik hasarını değerlendirmektir. Araştırma, CBMN-Cyt kullanılarak gerçekleştirildi. Araştırmamız, insan kan lenfositlerinde, MTA Fillapex ve AH Plus kanal dolgu patlarının farklı konsantrasyonlardaki genotoksik ve sitotoksik etkisinin CBMN-Cyt yöntemi kullanılarak çalışıldığı ilk araştırma olarak diğer çalışmalardan farklılık göstermektedir.

Çalışmamızda öne sürdüğümüz gibi farklı konsantrasyonlarda hücre kültür gruplarında incelenen

TABLO 1: MTA Fillapex ve pozitif kontrol gruplarına ait doz ile birlikte hücre kültüründe izlenen hücre oranları.

	Mikronükleus			Nükleer tomurcuk			Apoptotik			Nekrotik		
	Pozitif kontrol	Mineral triokisit agregat	p değeri	Pozitif kontrol	Mineral triokisit agregat	p değeri	Pozitif kontrol	Mineral triokisit agregat	p değeri	Pozitif kontrol	Mineral triokisit agregat	p değeri
1. doz	47,5	7,1	0,005	10,1	4,5	0,012	24,5	9,4	0,017	17,3	6,5	0,038
2. doz		10,8	0,005		5,5	0,014		13,6	0,025		6,7	0,028
3. doz		10,7	0,005		5,9	0,102		21	0,386		11,3	0,153
4. doz		13,2	0,005		7,5	0,444		34,5	1,000		14,8	0,646

Her bir referans hücre grubuna ait veri, MTA Fillapex'in uygulama dozuna göre elde edilen hücre oranları ile karşılaştırılarak yapılmıştır.

lenfositler üzerindeki genotoksik etki; mikronükleus, NBud (nükleer tomurcuk), parametreleri açısından MTA Fillapex, AH Plus ve pozitif kontrol (MMC) gruplarına göre oldukça düşük değerler göstererek hipotezimizi kanıtlamıştır (Tablo 1).

Ancak yine çalışmamızda elde edilen sonuçlar göz önüne alındığında, genotoksisitenin başka bir parametresi olan NPB değerleri; pozitif kontrol grubu ile MTA Fillapex'in farklı dozları kullanılan hücre kültürü grupları arasında karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı farka rastlanmamıştır.

Yine çalışmamızda öne sürdüğümüz noktalardan biri de MTA Fillapex'in hücre hasarına sebep olmayacağı yönündedir, ancak MTA Fillapex'in dozları arttıkça, daha fazla hasar verdiğini anlaşılmıştır (Şekil 3).

Sitotoksisite açısından değerlendirildiğinde, apoptotik ve nekrotik hücre oluşumları, MTA Fillapex'in 1 ve 2. dozlarında gözlenmiştir.

Bu sitotoksisitenin sebebi patın içeriğindeki mevcut salisilat rezin gibi bileşiklere bağlanabilir.²⁰ Ayrıca diğer çalışmalarda da rezin salisilat içeriğinin, hücrelerde apoptozise neden olduğunu ve rezin salisilatın miktarına doğru orantılı olarak hücre ölümlerinin arttığını belirtmişlerdir.^{21,22} Mevcut araştırmamızda, MTA Fillapex'in dozundaki artışla birlikte hem sitotoksisitesinde hem de genotoksisitesinde artış olduğunu gözlemledik.

Sitotoksisite parametrelerinden apoptotik ve nekrotik hücre değerlendirmelerinde, pozitif kontrol grubu ile MTA'nın farklı dozları kullanılan hücre kültürü grupları arasında karşılaştırma yapıldığında

apoptotik ve nekrotik değerleri, MTA'nın 1 ve 2. dozlarında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Tablo 1).

AH Plus patının değerlendirmelerinde, mikronükleus parametresi esas alındığında pozitif kontrol karşısında anlamlı sonuç elde edilmiştir ($p < 0,005$). Fakat yalnızca 3 örnekte sayım yapılabilmektedir.

AH Plus diğer örneklerde hücre gözlenmemiştir. Bu noktada elde edilen sonuçların, bireysel farklılıklardan kaynaklanabileceği düşünülmüştür.

Geçmiş çalışmalarda, pulpa kapaklama materyallerinin kan lenfositleri üzerindeki sitotoksik ve genotoksik etkilerinin incelemesinde sıklıkla "Comet Assay (single cell-gel)" ve mikronükleus deneyi (Micronucleus Assay) analizleri kullanılmıştır. Ancak çalışmamızda detaylı inceleme yapmak amaçlı kullandığımız CBMN-Cyt analizine dair herhangi bir kaynak tespit edilememiştir.

Mevcut analiz yöntemlerinin, CBMN-Cyt analizine göre avantaj ve dezavantajlarıyla birlikte farklılıkları mevcuttur.

Mikronükleus deneyi; kromozom mutasyonlarını, klastojenisiteyi ve anojenisiteyi saptamak için kullanılabilir,¹⁷ çünkü kromozomlar ve bunların fragmanları, hücre döngüsünün interfazında mikronükleus oluşumuna yol açabilir.¹⁸

Bin ve ark.nın yapmış olduğu çalışmada, tamir materyali olarak kullanılan beyaz MTA ve kanal dolgu patı maddesi olan MTA Fillapex'in biyouyumluluğu, canlı hücre sayısını mitokondriyal aktivitesinin bir fonksiyonu olarak belirleyen 3-4,5-dimetil-tiyazolil-2,5-difeniltetrazolyum bromür

(MTT) sitotoksisite testi ile değerlendirildi.²³ Sonuçlar, beyaz MTA'nın biyouyumlu bir materyal olarak kabul görebileceğine dair bulgular sunmuştur. Biyouyumlu bulunmasının sebebi test edilen tüm seyreltmeler için hücre canlılığı oranlarının %50'nin üzerinde değerlerde tespit edilmiş olmasıdır. Bu veriler, önceki çalışmalarda sunulan verilerle tutarlı bulunmuştur.^{24,25}

Bin ve ark.na göre en sitotoksik siman, hücre sağkalım oranlarını ciddi şekilde azaltan MTA Fillapex idi (1:4). Bununla birlikte MTA Fillapex'in artan seyreltilmiş hücre canlılığı seviyesini görebildiğimiz 1:2 ve 1:4 daha az seyreltilmiş konsantrasyonlarda bile 48 saat sonra en iyi davranışı geliştirdiği gözlenmiştir.

Önceden yapılmış mikronükleus deneyi ve CBMN-Cyt analizi olmaması nedeniyle test edilen materyallerle elde edilen sonuçları tartışmak zordur. Bununla birlikte bu sonuçlar, MTA Fillapex tarafından sunulan sitotoksik davranışın bileşiminde bulunan salisilat gibi rezin bileşenlerinin bir sonucu olabileceğini düşündürmektedir.

İnsan lenfositlerinin, MTA'nın beyaz ve standart formu ile maruz bırakıldığı tek hücreli jel (kuyruklu yıldız) tahlilinde genotoksik etkiler yaratmadığı tespit edilmiştir. Ayrıca tüm tedaviler, herhangi bir konsantrasyon-etki ilişkisi göstermemiştir.²⁶ Glenda ve ark.nın kuyruk momenti verilerine dayanarak, bu çalışmanın sonuçları kullanılan deney koşullarında alkalin tek hücreli jel (kuyruklu yıldız) tahlilinin, MTA'nın 2 formu (beyaz ve standart) ile tüm konsantrasyonlarında muamele edildiği bir testten sonra DNA hasarının varlığını tespit etmediğine dikkat çekmiştir.²⁶ Bu bulgular, MTA'nın iyi bir biyouyumluluk gösteren yayımlanmış verilerini desteklemiştir.²⁷

Tek hücreli jel (kuyruklu yıldız) bileşiminin, mutajenik potansiyeli mutlaka öngörmediğini vurgulamak önemlidir.

Bu noktada MTA çeşitleri ve AH Plus patı üzerinde yapılmış *in vitro* genotoksisite ve sitotoksisite testlerinin, CBMN-Cyt analizi kadar kesin sonuçlar veremediği gözlenmiş olup; çalışmamızın kabul edilebilirliği desteklenmiştir.

Jafari ve ark.nın araştırmasında, kanal patlarının toksisitesinin, patın konsantrasyonuna, karıştırmadan

sonra geçen süreye, test tipine, kullanılan hücre tipine veya sızdırmazlık maddesinin taze olup olmamasına bağlı olarak yapılan çok sayıda *in vitro* çalışmada farklı sonuçlar bildirildiğini savunmuştur.²⁸ Yaptıkları araştırmada, MTA Fillapex ve AH Plus'ın farklı karıştırma zamanlarında "Mossman's Tetrazolium Assay (MTT)" ile fibroblastik hücreler üzerindeki sitotoksik etkisini incelemişlerdir. Araştırmamız ile benzer 24 saat, 48 saat, 72 saatlik uygulama aralıkları ile MTA Fillapex ve AH Plus kanal dolgu patlarının sitotoksik etkileri, apatit kanal dolgu patı ile karşılaştırılmış olup; elde edilen sonuçlarda MTA Fillapex ve AH Plus'ın benzer sitotoksik etkilerinin ilk 24 saatlik sertleşme süresinde gösterdiği, ayrıca 48 saat sonra hızla artan sitotoksik etkinin görüldüğünü tespit etmişlerdir. Apatit bazlı kanal dolgu patının düşük sitotoksisitesi, kemik ve diş çevre dokuları ile uyumlu olmasına bağlanabilir.

Collado-González ve ark., periodontal ligament kaynaklı kök hücreler üzerinde kanal dolgu malzemelerinin sitotoksisitesini incelemiştir.²⁹ Bu araştırmada, MTA Fillapex'in ve silikon bazlı GuttaFlow Bioseal, Guttaflow 2 gibi kanal dolgu patlarının kök hücreler üzerindeki sitotoksik etkisine MTT ile bakılmıştır. Uygulama prosedürü, çalışmamıza benzer olacak şekilde (1:1, 1:2, 1:4) farklı konsantrasyonlar ve farklı sertleşme zamanları ile (24 saat, 48 saat) hazırlanmıştır. Elde edilen sonuçlar, Jafari ve ark.nın yapmış olduğu araştırmaya benzer sonuçlar göstermiştir.²⁸ MTA Fillapex ve AH Plus'ın benzer sitotoksik etkilerinin ilk 24 saatlik aralıkta görüldüğü, yine 48 saat sonra belirgin artış ile sitotoksik etkisini periodontal ligament kaynaklı kök hücreler üzerinde artırdığı tespit edilmiştir.

AH Plus kanal dolgu patının sitotoksik etkileri birçok çalışmada incelenmiştir.^{29,30} Bu çalışmalarda, AH Plus patının hem karıştırıldıktan hemen sonra hem de sertleşmesini tamamladıktan sonra sitotoksik özellik gösterdiğini iddia eden çalışmalar olmuştur. Spahl ve ark., AH Plus'ın taze karıştırılmış ve 24 saat beklenmiş örneklerinin belirgin sitotoksisite gösterdiğini, 72 saat sonunda ise sitotoksisitesinde belirgin azalma olduğunu göstermişlerdir.³⁰ AH Plus'ın bu sonuçları, patın polimerizasyonunu başlatan epoksi rezin ve amin tepkimesi ile açığa çıkan formaldehit salınımı olarak düşünülmüştür.^{31,32} Bunun yanında

rezin bazlı materyallerin mutajenik bir bileşeni olan bisfenol A diglisidil eterde de sitotoksik etkiler gözlenmiş olabilir.³³

Bir başka faktörde, elle karıştırılan patta oluşan porözitelerin reaksiyona girmemiş komponentlerin salınımına neden olabilmeleridir.³⁴ Yukarıda belirttiğimiz gibi polimerizasyonunu tamamlamış AH Plus patının sitotoksitesinde düşüş olduğu gösterilmiştir. Çalışmamızda, hücreler üzerinde biyomalzemenin uygulama saatleri 24, 48 ve 72. saatlerde olmuştur ve sadece 3 denekten alınan kan örneklerinde hücre sayımı yapılabilmektedir, diğer deneklerde canlı hücreye rastlanmamıştır. MTA içerikli patların genotoksitesite ve sitotoksitesitesini değerlendiren bir çalışmada, AH Plus'ın ve MTA Fillapex'in hücre canlılığını önemli ölçüde azalttığı ve mikronükleus oluşumuna neden olduğu belirtilmiştir.

Çalışmamızda da bu çalışmadaki gibi genotoksik değişiklikler gözlenmiştir [mikronükleus, gene amplifikasyonları (NBud), disentrik kromozomlar (NPB) ve MTA Fillapex'in dozlarındaki artışla genotoksik oluşumlar artmaktadır (NBud)]. Ayrıca pozitif kontrol grubunda (MMC kullanılmış grup), MTA Fillapex'in 1 ve 2. dozlarından anlamlı derecede daha fazla mikronükleus oluşumu tespit edilmiştir. Sitotoksitesite açısından değerlendirildiğinde apoptotik ve nekrotik hücre oluşumları, MTA Fillapex'in 1 ve 2. dozlarında gözlenmiştir. Bu sitotoksitesitenin sebebi, patın içeriğindeki salisilat rezin gibi bileşikler ile ilişkilendirilebilir.²⁶ Benzer çalışmalarda da rezin salisilat içeriğinin hücrelerde apoptoze neden olduğunu ve rezin salisilatın miktarına doğru orantılı olarak hücre ölümlerinin arttığını belirtmişlerdir.²⁶ Araştırmamızda, MTA Fillapex'in kullanım konsantrasyonundaki artışla birlikte sitotoksitesite ve genotoksitesitesinde artış olduğu tespit edilmiştir.

Yapılan araştırmalar incelendiğinde, güncel kanal dolgu patları üzerinde yapılacak araştırmaların devamlılığı daha net sonuçların çıkması ile sonuçlanacaktır. Bu nedenle özellikle sitotoksik testlerden ziyade hem sitotoksik hem genotoksik etkilerin yeni

nesil testlerle incelendiği araştırmalara yoğunlaşılması gerekmektedir.

SONUÇ

Sonuç olarak araştırmamızın 0 hipotezi, elde edilen sonuçlar ışığında kabul görmüş olup, MTA Fillapex'in AH Plus'tan ilk sertleşme anında kan lenfositlerinde düşük sitotoksik ve genotoksik etki gösterdiği tespit edilmiştir.

MTA Fillapex, pozitif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 1, 2, 3 ve 4. dozlarda da kan lenfositlerinin genotoksik belirteçleri olan mikronükleus, NBud, NPB açısından düşük genotoksik etki göstermiş olup, genotoksik etki genel anlamda 48 ve 72 saatlik sertleşme sürelerinde artış ile kendini göstermiştir.

Yine benzer sonuçlar, sitotoksik belirteçlerden apoptotik ve nekrotik hücrelerin tespitinin MTA Fillapex gurubunda ilk sertleşme aralığında düşük seyir izlerken, ilerleyen zaman aralıklarında pozitif kontrol ile benzer sitotoksik etki göstermiştir.

Finansal Kaynak

Bu çalışma, Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (TSA-12-3622) tarafından desteklenmiştir.

Çıkar Çatışması

Bu çalışma ile ilgili olarak yazarların ve/veya aile bireylerinin çıkar çatışması potansiyeli olabilecek bilimsel ve tıbbi komite üyeliği veya üyeleri ile ilişkisi, danışmanlık, bilirkişilik, herhangi bir firmada çalışma durumu, hissedarlık ve benzer durumları yoktur.

Yazar Katkıları

Fikir/Kavram: Yakup Üstün, Soley Arslan, Burak Sağsen; **Tasarım:** Münis Dündar, Soley Arslan, Yakup Üstün; **Denetleme/Danışmanlık:** Nazife Taşcıoğlu, Soley Arslan Münis Dündar; **Veri Toplama ve/veya İşleme:** Yakup Üstün, Münis Dündar, Soley Arslan; **Analiz ve/veya Yorum:** Nazife Taşcıoğlu, Soley Arslan, Yakup Üstün, Müge Güllühan Önal; **Kaynak Taraması:** Sebahat Melike Durukan; **Makalenin Yazımı:** Sebahat Melike Durukan, Soley Arslan, Yakup Üstün; **Eleştirel İnceleme:** Burak Sağsen, Yakup Üstün, Soley Arslan; **Kaynaklar ve Fon Sağlama:** Nazife Taşcıoğlu, Yakup Üstün, Soley Arslan; **Malzemeler:** Yakup Üstün, Nazife Taşcıoğlu, Soley Arslan.

KAYNAKLAR

- Jafari F, Jafari S, Etesamnia P. Genotoxicity, bioactivity and clinical properties of calcium silicate based sealers: a literature review. *Iran Endod J.* 2017;12(4):407-13. [PubMed] [PMC]
- Al-Haddad A, Abu Kasim NH, Che Ab Aziz ZA. Interfacial adaptation and thickness of bioceramic-based root canal sealers. *Dent Mater J.* 2015;34(4):516-21. [Crossref] [PubMed]
- Al-Haddad A, Che Ab Aziz ZA. Bioceramic-based root canal sealers: a review. *Int J Biomater.* 2016;2016:9753210. [Crossref] [PubMed] [PMC]
- Leonardo MR, Bezerra da Silva LA, Filho MT, Santana da Silva R. Release of formaldehyde by 4 endodontic sealers. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1999; 88(2):221-5. [Crossref] [PubMed]
- Torabinejad M, Watson TF, Pitt Ford TR. Sealing ability of a mineral trioxide aggregate when used as a root end filling material. *J Endod.* 1993;19(12):591-5. [Crossref] [PubMed]
- Roberts HW, Toth JM, Berzins DW, Charlton DG. Mineral trioxide aggregate material use in endodontic treatment: a review of the literature. *Dent Mater.* 2008;24(2):149-64. [Crossref] [PubMed]
- Parirokh M, Torabinejad M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review—Part I: chemical, physical, and antibacterial properties. *J Endod.* 2010;36(1):16-27. [Crossref] [PubMed]
- Holland R, de Souza V, Nery MJ, Otoboni Filho JA, Bernabé PF, Dezan Júnior E. Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tubes filled with mineral trioxide aggregate or calcium hydroxide. *J Endod.* 1999;25(3):161-6. [Crossref] [PubMed]
- Hauman CH, Love RM. Biocompatibility of dental materials used in contemporary endodontic therapy: a review. Part 1. Intracanal drugs and substances. *Int Endod J.* 2003; 36(2):75-85. [Crossref] [PubMed]
- Jaberiansari Z, Naderi S, Tabatabaei FS. Cytotoxic effects of various mineral trioxide aggregate formulations, calcium-enriched mixture and a new cement on human pulp stem cells. *Iran Endod J.* 2014;9(4):271-6. [PubMed] [PMC]
- Saygili G, Saygili S, Tuglu I, Davut Capar I. In vitro cytotoxicity of GuttaFlow Bioseal, GuttaFlow 2, AH-Plus and MTA Fillapex. *Iran Endod J.* 2017;12(3):354-9. [PubMed] [PMC]
- Braz MG, Camargo EA, Salvadori DM, Marques ME, Ribeiro DA. Evaluation of genetic damage in human peripheral lymphocytes exposed to mineral trioxide aggregate and Portland cements. *J Oral Rehabil.* 2006;33(3): 234-9. [Crossref] [PubMed]
- Accorinte Mde L, Holland R, Reis A, Bortoluzzi MC, Murata SS, Dezan E Jr, et al. Evaluation of mineral trioxide aggregate and calcium hydroxide cement as pulp-capping agents in human teeth. *J Endod.* 2008;34(1):1-6. [Crossref] [PubMed]
- Mantellini MG, Botero TM, Yaman P, Dennison JB, Hanks CT, Nör JE. Adhesive resin induces apoptosis and cell-cycle arrest of pulp cells. *J Dent Res.* 2003;82(8):592-6. [Crossref] [PubMed]
- Zeferino EG, Bueno CE, Oyama LM, Ribeiro DA. Ex vivo assessment of genotoxicity and cytotoxicity in murine fibroblasts exposed to white MTA or white Portland cement with 15% bismuth oxide. *Int Endod J.* 2010;43(10):843-8. [Crossref] [PubMed]
- Ding SJ, Kao CT, Chen CL, Shie MY, Huang TH. Evaluation of human osteosarcoma cell line genotoxicity effects of mineral trioxide aggregate and calcium silicate cements. *J Endod.* 2010;36(7):1158-62. [Crossref] [PubMed]
- Ribeiro DA, Sugui MM, Matsumoto MA, Duarte MA, Marques ME, Salvadori DM. Genotoxicity and cytotoxicity of mineral trioxide aggregate and regular and white Portland cements on Chinese hamster ovary (CHO) cells in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006;101(2):258-61. [Crossref] [PubMed]
- Widel M, Kolosza Z, Jedruś S, Lukaszczyk B, Raczek-Zwierzycka K, Swierniak A. Micronucleus assay in vivo provides significant prognostic information in human cervical carcinoma; the updated analysis. *Int J Radiat Biol.* 2001;77(5):631-6. [Crossref] [PubMed]
- Fenech M, Morley A. Solutions to the kinetic problem in the micronucleus assay. *Cytobios.* 1985;43(172-173):233-46. [PubMed]
- Olsson B, Sliwowski A, Langeland K. Intraosseous implantation for biological evaluation of endodontic materials. *J Endod.* 1981; 7(6):253-65. [Crossref] [PubMed]
- Stanley HR. Local and systemic responses to dental composites and glass ionomers. *Adv Dent Res.* 1992;6:55-64. [Crossref] [PubMed]
- Torabinejad M, Hong CU, Pitt Ford TR, Kettering JD. Cytotoxicity of four root end filling materials. *J Endod.* 1995;21(10):489-92. [Crossref] [PubMed]
- Bin CV, Valera MC, Camargo SE, Rabelo SB, Silva GO, Balducci I, et al. Cytotoxicity and genotoxicity of root canal sealers based on mineral trioxide aggregate. *J Endod.* 2012;38(4):495-500. [Crossref] [PubMed]
- Camargo SE, Camargo CH, Hiller KA, Rode SM, Schweikl H, Schmalz G. Cytotoxicity and genotoxicity of pulp capping materials in two cell lines. *Int Endod J.* 2009;42(3):227-37. [Crossref] [PubMed]
- Chen CL, Kao CT, Ding SJ, Shie MY, Huang TH. Expression of the inflammatory marker cyclooxygenase-2 in dental pulp cells cultured with mineral trioxide aggregate or calcium silicate cements. *J Endod.* 2010;36(3):465-8. [Crossref] [PubMed]
- da Silva GN, Braz MG, de Camargo EA, Salvadori DM, Ribeiro DA. Genotoxicity in primary human peripheral lymphocytes after exposure to regular and white mineral trioxide aggregate. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006;102(5):e50-4. [Crossref] [PubMed]
- Menezes R, Bramante CM, Letra A, Carvalho VG, Garcia RB. Histologic evaluation of pulpotomies in dog using two types of mineral trioxide aggregate and regular and white Portland cements as wound dressings. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2004;98(3):376-9. [Crossref] [PubMed]
- Jafari F, Aghazadeh M, Jafari S, Khaki F, Kabiri F. In vitro cytotoxicity comparison of MTA Fillapex, AH-26 and apatite root canal sealer at different setting times. *Iran Endod J.* 2017;12(2):162-7. [PubMed] [PMC]
- Collado-González M, Tomás-Catalá CJ, O-ate-Sánchez RE, Moraleda JM, Rodríguez-Lozano FJ. Cytotoxicity of GuttaFlow Bioseal, GuttaFlow2, MTA Fillapex, and AH Plus on human periodontal ligament stem cells. *J Endod.* 2017;43(5):816-22. [Crossref] [PubMed]
- Spahl W, Budzikiewicz H. Qualitative analysis of dental resin composites by gas and liquid chromatography/mass spectrometry. *Fresen J Anal Chem.* 1994;350:684-91. [Crossref]
- Gulati N, Chandra S, Aggarwal PK, Jaiswal JN, Singh M. Cytotoxicity of eugenol in sealer containing zinc-oxide. *Endod Dent Traumatol.* 1991;7(4):181-5. [Crossref] [PubMed]
- Kolokouris I, Kotsaki-Kovatsi VP, Economides N, Pouloupoulos A, Rozos G, Vlemmas I. Influence of zinc oxide and eugenol sealer on concentration of zinc, calcium and copper in rat tissues. *Endod Dent Traumatol.* 1998;14(5): 210-3. [Crossref] [PubMed]
- Nencka D, Walia HD, Austin BP. Histologic evaluation of the biocompatibility of Diaket. *J Dent Res.* 1995;74:101.
- Spångberg L. Biological effects of root canal filling materials. 4. Effect in vitro of solubilised root canal filling materials on HeLa cells. *Odontol Revy.* 1969;20(3):289-99. [PubMed]