

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ



**MTA FİLLAPEX'İN İN VİTRO GENOTOKSİSİTESİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Proje No: TSA-12-3622

NORMAL ARAŞTIRMA PROJESİ

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:
Doç. Dr. Burak SAĞSEN
Endodonti AnaBilim Dalı

Araştırmacının Adı Soyadı
Birimi/Bölümü

KASIM 2014

KAYSERİ

TEŐEKKÖR

Bu alıŐma ERÖ BAP BİRİMİ tarafından desteklenmiŐtir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZET	1
ABSTRACT	1
1. GİRİŞ	2
2. AMAÇ VE KAPSAM	2-3
3. GEREÇ YÖNTEM	3-6
4. BULGULAR	6
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	7-8

Özet:

Giriş: Bu çalışmanın amacı MTA Fillapex ve AH Plus patlarının genotoksisitelerinin Sitokinez-Bloke Mikronukleus Sitom (CBMN Cyt) yöntemi ile değerlendirilmesidir.

Materyal Metod: 20 - 35 yaş arasında sağlıklı 10 bireyden 10 mL kan alındı. ve bu örneklerle elde edilen lenfosit kültürlerine değişik konsantrasyonlarda MTA Fillapex ve AH Plus kanal dolgu patları eklenecek ve bulunan mikronukleuslu (MN) binükleer hücreler, gözlenen metafaz sayıları, nükleoplazmik köprü (NPB) ve nükleer tomurcuklu (NBud) hücreler sayıldı. 1000 adet hücre preparatlarda sayıldı ve apoptik ve nekrotik hücreler de kaydedildi.

Veriler parametrik olmayan Wilcoxon T-testi ile değerlendirilmiştir.

MTA Fillapex patı doz artışıyla beraber toksisitesinde de artış gözlenmiştir. Fakat NBP parametresi hariç tüm parametrelerde pozitif kontrole göre anlamlı seviyede az toksisite göstermiştir. NBP parametresinde MTA Fillapex ile PK arasında istatistiksel farka rastlanmamıştır. AH Plus polimerizasyon süresi boyunca toksisite göstermiştir.

Sonuç: MTA Fillapex patı AH plus patına göre daha az sitotoksiktir.

Abstract

Intoduction: The aim of the present study was to evaluate the genotoxicity and cytotoxicity of MTA Fillapex and AH Plus root canal sealers with Cytokinesis-block micronucleus cytome assay.

Material - Method: 10 mL of blood was taken from healthy volunteers and lymphocytes cultures were obtained from those samples. Different concentrations of MTA Fillapex and AH Plus root canal sealers were added to cultures and after then the cells with micronucleus (MN), with binucleus, the number of metaphases, nucleoplasmic bridge (NBP) and nucleoplasmic buds (NBud) were counted. A thousand cells were counted through the preparats and apophic, necrotic cells were counted.

Datas were analysed by non parametric Wilcoxon T-test.

MTA Fillapex root canal sealer's toxicity was raised by the increase of dosage. But except NBP parameter MTA Fillapex showed significantly less toxicity then positive control group. For NBP parameter there was no significant difference between MTA Fillapex and positive control. AH Plus sealer showed toxicity during the polymerisation period.

Results MTA Fillapex paste showed less cytotoxicity than AH Plus paste.

GİRİŞ

Endodontik tedavi kök kanal sisteminde mevcut pulpa, doku artıklarının, mikroorganizmalarının elimine edilmesini ve de ardından hermetik bir şekilde doldurulmasını amaçlar. Kök kanal dolgu patları için biyolojik uyumluluk önemli bir gerekliliktir; patlar apikal ve periapikal dokularla direkt kontakt halindedir. Bir çok çalışma genel toksikolojik ve lokal doku irritasyonu özellikleri üzerine odaklanmıştır. Fakat kök kanal patlarının mutajenite ve karsinojenite testleri hakkında sınırlı bilgi vardır.

AMAÇ VE KAPSAM

Periodontal dokularla kök kanal patlarının sıkı ilişkisinden dolayı, teknik özelliklerine ilave olarak canlı dokular üzerine etkisi de bilinmelidir. Önceki çalışmalar patların bazı gruplarının (çinko oksit ojenol (ZnOE), resin, polimer ve silikon esaslı) ayrılabilir monomer, inorganik ve organik bileşenlerinin salınmasından dolayı lokal ve sistemik yan etkiler oluşturduklarını göstermektedir (1,2).

Örneğin, Serena ve ark.(3) ZnOE içerikli patların kompleman sistemini aktive ettiğini ve inflamatuvar reaksiyon oluşturduğunu rapor etmişlerdir. Spesifik olmayan doku uyumluluğu testleri ojenol bazlı patların belirgin doku irritasyonu sağladığını göstermiştir (4). Bundan başka, tavşanların mandibuler kemikleri içine implante edildiklerinde ZnOE bazlı patların değişik organlarda Zn'nun normal konsantrasyonunu etkiledikleri gösterilmiştir (5). Nencka ve ark. (6) Ratların tibialarına polivinil bazlı patı implante etmişler ve 3 günden sonra şiddetli inflamatuvar reaksiyon oluştuğunu göstermişlerdir. Spangberg ve ark. (7) Diaketin ex vivo oldukça toksik olduğunu bulmuşlardır. Hatta, Olsson ve ark. (8) uzun zaman periyotlarından sonra Diaketin orta derecede doku reaksiyonuna neden olduğunu rapor etmişlerdir. Bununla birlikte, polivinil-bazlı patların kabul edilebilir biyouyumluluk gösterdiği göz önünde bulundurulmaktadır. Rezin bazlı materyallerin pulpa inflamasyonuna sebep olduğu bulunmuştur (9).

Bir çok çalışmada ex vivo değişik hücre kültürleri üzerinde kök kanal patlarının sitotoksitesi rapor edilmiştir. Torabinejad ve ark. (10) SuperEBA ve IRM nin sınırlı sitotoksitesini rapor etmişken, Briseno ve Willershausen (11) aynı materyalleri kullanarak insan gingival fibroblastlarında şiddetli sitotoksitite rapor etmişlerdir. Takara ve ark. (12) Diaket ve AH-26

nın rat kemik hücrelerinde hücre döngüsünde aksamaya neden olduğunu rapor etmişlerdir. Asrari ve Lobner (13) SuperEBA ve Diaketin fare serebral kortikal hücrelerinde önemli nörotoksisiteye neden olduğunu tespit etmişlerdir. Yapılan çalışmaların çoğu sititoksisite üzerine odaklanmıştır, buna karşın biyoyumluluğu etkileyen önemli faktörlerden biri olarak genotoksisite üzerine yayınlanmış pek fazla bilgi yoktur. Genotoksisite zararı hücre ölümüne neden olmayıldı fakat hücre genetiğindeki zarar dokunun kendi kendini tamir potansiyelini önemli oranda azaltabilir veya uzun dönemde neoplazi gelişimine sebep olabilir.

İn vitro genotoksisite testleri hücrelerin DNA'sında kırılmaya, gen mutasyonuna, kromozomal kırılmalara ve DNA tamir yeteneğinde bozulmalara neden olan komponentlerin belirlenmesi için yapılan testlerdir.

GEREÇ VE YÖNTEM

MTA Fillapex'in insan hücrelerindeki genotoksik ve sitotoksik etkileri üzerine yapılan çalışma olmayıp, insan kan lenfositlerindeki potansiyel genotoksik etkileri ve genotoksisite mekanizması bilinmemektedir.

Bu çalışmada Sitokinez-Bloke Mikronukleus Sitom (CBMN Cyt) Yöntemi kullanılarak genotoksik ve sitotoksik etki araştırıldı. Bu yüzden, çalışmamızda, *in vitro* şartlarda insan lenfosit kültürlerine değişik konsantrasyonlarda MTA Fillapex eklenecek ve bulunan mikronukleuslu (MN) binükleer hücreler kaydedildi. Aynı preparatlarda, MN'lu binükleer hücreler sayılırken, gözlenen metafaz sayıları, nükleoplazmik köprülü (NPB) ve nükleer budlu (NBud) hücre sayıları da kaydedilecek ve ayrıca 1000 tane bir çekirdekli (mononükleer) hücre sayılırken aynı zamanda iki çekirdekli, üç çekirdekli, dört çekirdekli (binükleer, trinükleer ve tetranükleer) her bir hücre kaydedilecek ve Nükleer Bölünme İndeksi (NDI) oranları da hesaplanıldı. 1000 tane bir çekirdekli hücre sayılırken aynı zamanda apoptotik yada nekrotik hücre sayıları kaydedildi. Bulunan MN sıklığı ve ilgili hücre kriterleri ve NDI oran sonuçları kullanılarak, patların insan kan lenfositleri üzerindeki genotoksik ve sitotoksik etkileri araştırıldı.

Çalışma için, 20-35 yaşları arasında her iki cinsiyetten sağlıklı 10 kişinin 10 ml'lik steril ve 0.1- 0.2 cc heparin içeren enjektörler kullanılarak periferik kan örnekleri alındı. Bu kişiler, sigara ve alkol kullanmayan, az miktarda (1-3 fincan) çay içen, kahve alışkanlığı olmayan, son altı ayda şiddetli enfeksiyon yada viral hastalık geçirmeyen, herhangi bir ilaç kullanmayan, bilinen genotoksik kimyasal bir ajana maruz kalmamış olan, farklı bir beslenme alışkanlığı olmayan, hipertansiyon, diyabet, kalp, kanser gibi herhangi bir hastalığı

olmayan ve ailede kanser öyküsü olmayan sağlıklı kişilerden seçildi. Çalışmaya katılan kişiler gönüllü personelden seçilecek ve kişilere çalışmanın amacı anlatılarak yazılı onayları alındı.

1. Kan Örneklerinin Alınması

Sağlıklı 10 kişinin, 10 ml'lik steril ve 0.1- 0.2 cc heparin içeren enjektörler kullanılarak periferik kanları alındı. Daha sonra kan örneklerinin, bekletilmeden 2 saat içinde kültür ortamlarına ekimi yapıldı.

2. Kültür Tekniği

Önceden 37 °C'ye getirilmiş olan 5 cc medyum içeren kültür tüplerine steril ortamda, alınan kan örneklerinin 3-4 damlası dışarı atıldıktan sonra 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 (DMSO), pozitif kontrol(MMC) eklendi, 44. saatte Cyt-B eklenmek koşuluyla 72 saat kültüre edildi.

Cyt-B' nin Hazırlanması ve Eklenmesi: 1 mg Cyt-B (Sigma, 6762), 1 ml dimetil sülfoksitte (DMSO) 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: 3µg/ml) Cyt-B ilave edilerek tekrar etüve konuldu.

MTA Fillapex'in Hazırlanması ve Eklenmesi: 0,25 gr karıştırılmış MTA FILLAPEX 5 ml DMSO ile çözülerek stok solüsyon hazırlandı. Stoktan 1 ml alınarak üzerine 9 ml DMSO eklenerek stok solüsyon sulandırıldı. Farklı konsantrasyonlar için, 1.sulandırılan solüsyondan 25 µl, 50 µl,75 µl ve100 µl MTA FILLAPEX solüsyonları kültürlerle eklendi.

AH Plus'ın Hazırlanması ve Eklenmesi 0,25 gr karıştırılmış AH Plus 5 ml DMSO ile çözülerek stok solüsyon hazırlandı. Stoktan 1 ml alınarak üzerine 9 ml DMSO eklenerek stok solüsyon sulandırıldı. Farklı konsantrasyonlar için, 1.sulandırılan solüsyondan 25 µl, 50 µl ,75 µl ve100 µl AH Plus solüsyonları kültürlerle eklendi.

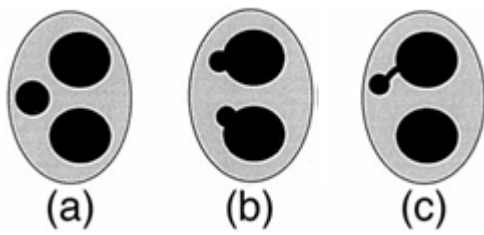
Pozitif Kontrolün Hazırlanması ve Eklenmesi: Pozitif kontrol olarak mitomisin c (MMC; Sigma, M-0503) kullanıldı. 2 mg MMC 10 ml steril distile su ile çözülerek stok solüsyon hazırlandı. Stok solüsyondan 0.1 ml alınarak üzerine 0.9 ml steril distile su eklendi. Hazırlanan bu solüsyon -20°C de saklandı ve hazırlanan bu solüsyondan final konsantrasyonu 0.5 µM olacak şekilde kültürlerle 42 µl MMC eklendi.

Çözücü Kontrolün Eklenmesi: Her bir kişi için 1 tüpe, çözücü kontrol olarak 20 µl DMSO eklendi.

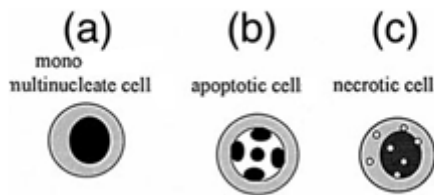
MN elde etmek için kullanılan Fenech metoduna göre ve bazı modifikasyonlarla çıkartım işlemleri yapıldı. Preparatlar hazırlandı ve %6'lık giemsada boyandı.

3. Lamaların İncelenmesi

CBMN yöntemi, DNA ya da kromozom seviyesinde lezyonları belirlemek için çeşitli hücre tiplerine uygulanabilen ve periferik kan lenfositlerde MN frekansını değerlendirmek için yaygın olarak kullanılan bir genotoksisite metodudur (14). 1000 tane binükleer hücre sayılırken MN, NBud ve NPB skorları kaydedilir. MN'lar, bölünen hücrelerde kromozom parçalarını ya da anafazda geri kalma sonucu oluşan tüm kromozomları içerebilirler. Bölünen hücrelerde MN, 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 ve bu yöntem DNA hasarı, sitostazi ve sitotoksisite ölçümü için detaylı bir sistemdir (15,1). Bu sistemde; DNA hasarı olayları, skorlanan binükleer hücrelerde kromozom kırık ve/veya tüm kromozom kaybının işareti olarak MN'ları, DNA yanlış tamiri ve/ya da telomer uç birleşimlerinin işareti olarak NPB'leri, amplifiye DNA'nın ve/ya da DNA tamir komplekslerinin eliminasyonunun işareti olarak NBud'ları içermektedir. Sitotoksik etkiler, 1000 tane tek çekirdekli (mononükleer) hücre sayılırken aynı zamanda nekrotik ve apoptotik hücre oranları ile ölçülmektedir.



Şekil 3.1(a) Bir mikronükleus bulunduran binükleer hücre (b) NBud olan binükleer hücre (c) NPB ile bağlı NBud bulunduran binükleer hücre



Şekil 3.4. (a) Canlı bir mononükleer hücre (b) erken evre apoptozdaki mononükleer hücre (c) erken evre nekrotik hücre

Çalışmanın istatistik değerlendirmeleri 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 MN, NPB ve NBud değerleri dikkate alındı.

BULGULAR

Genotoksisite parametrelerinden olan mikronukleusun (MN) değerleri pozitif kontrol (PK) ile MTA Fillapex'in farklı dozları kullanılan hücre kültürü grupları arasında istatistiksel anlamlı farklılık vardır ($p < 0,001$). PK grubunda daha fazla hasar gözlemlenmiştir.

Diğer genotoksisite parametresi olan Nbud değerleri PK grubu ile MTA'nın farklı dozları kullanılan hücre kültürü grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.05$). Nbud değerleri açısından MTA'nın 1. ve 2. dozları ve PK karşılaştırıldığında, (sırasıyla $p < 0.012$ ve $p < 0.014$) istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. MTA Fillapex'in dozları arttıkça daha fazla hasar verdiğini anlaşılmıştır.

Genotoksisitenin başka bir parametresi olan NPB değerleri; PK grubu ile MTA Fillapex'in farklı dozları kullanılan hücre kültürü grupları arasında karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı farka rastlanmamıştır.

Sitotoksisite parametrelerinden olan apoptotik (AP) ve nekrotik (NKR) hücre değerlendirmelerinde PK (pozitif kontrol) grubu ile MTA'nın farklı dozları kullanılan hücre kültürü grupları arasında karşılaştırma yapıldığında AP ve NKR değerleri MTA'nın 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 MN parametresi esas alındığında PK' a karşısında anlamlı sonuç elde edilmiştir ($p < 0.005$). Fakat esasen yalnızca 3 örnekte sayım yapılabilmektedir. Diğer örneklerde hiç hücre gözlenmemiştir.

TARTIŞMA VE SONUÇ

AH Plus kanal dolgu patının sitotoksik etkileri birçok çalışmada incelenmiştir¹⁻⁴. Bu çalışmalarda AH Plus patının hem karıştırıldıktan hemen sonra hem de sertleşmesini tamamladıktan sonra sitotoksik özellik gösterdiğini iddia eden çalışmalar olmuştur. Mandal ve ark.¹ AH Plus'ın taze karıştırılmış ve 24 saat beklenmiş örneklerinin belirgin sitotoksikite gösterdiğini, 72 saat sonunda ise sitotoksikitesinde belirgin düşme olduğunu göstermişlerdir. AH Plus bizim çalışmamızda da Mandal ve ark.¹ çalışması ile uyumlu olarak genotoksikite göstermiştir. AH Plus'ın bu sonuçları patın polimerizasyonunu başlatan epoksi rezin ve amin tepkimesi ile açığa çıkan formaldehit salınımı olarak düşünülmüştür⁵. Bunun yanında rezin bazlı materyallerin mutajenik bir bileşeni olan Bisfenol A diglisidil eter'de sonucunda da sitotoksik etkiler gözlenmiş olabilir⁶. Bunun dışında bir başka faktörde elle karıştırılan patta oluşan porozitelerin reaksiyona girmemiş komponentlerin salınımına neden olabilmeleridir⁷. Yukarıda belirttiğimiz gibi polimerizasyonunu tamamlamış AH Plus patının sitotoksikitesinde düşüş olduğu gösterilmiştir. Bizim çalışmamızda ekim saatleri 24. saat, 44. saat ve 72. saatlerde olmuştur ve sadece 3 denekten alınan kan örneklerinde hücre sayımı yapılabilmıştır diğer deneklerde canlı hücreye rastlanmamıştır. Bu sonucunda kişilerde gözlenen bireysel farklılıklardan ötürü oluşabileceğini düşünmekteyiz.

MTA içerikli patların genotoksikite ve sitotoksikitesini değerlendiren bir çalışmada AH Plus'ın ve MTA Fillapex'in hücre canlılığını önemli ölçüde azalttığı ve mikronükleus oluşumuna neden olduğu belirtilmiştir⁸. Bizim çalışmamızda da bu çalışmadaki gibi genotoksik değişiklikler gözlenmiştir (mikronükleus (MN), gene amplifikasyonları (NBud), disentrik kromozomlar (NPB)) ve MTA Fillapex'in dozlarındaki artışla genotoksik oluşumlar artmaktadır (NBud). Ayrıca, pozitif kontrol grubunda (Mitomisin C kullanılmış grup) MTA Fillapex'in 1. ve 2. dozlarından anlamlı derecede daha fazla MN oluşumu tespit edilmiştir.

Sitotoksikite açısından değerlendirildiğinde apoptik ve nekrotik hücre oluşumları MTA Fillapex'in birinci ve ikinci dozlarında gözlenmiştir. Bu sitotoksikitenin sebebi patın içeriğindeki mevcut salisilat rezin gibi bileşiklere bağlanabilir⁸. Ayrıca diğer çalışmalarda

da rezin salisilat içeriğinin hücrelerde apaoptozise neden olduğunu ve rezin salisilatın miktarına doğru orantılı olarak hücre ölümlerinin arttığını belirtmişlerdir ^{9, 10}. Bizde bu çalışmamızda MTA Fillapex'in dozunda artışla beraber hem sitotoksitesinde hem de genotoksitesinde artış olduğunu tespit ettik.

SONUÇ

MTA Fillapex ve AH Plus kanal dolgu patları 72 saat içinde genotoksite ve sitotoksite göstermektedirler. AH Plus patı taze karıştırılmış iken sitotoksiktir.

KAYNAKLAR

1. Spahl W, Budzikiewicz H. Qualitative analysis of dental rasi composites by gas and liquid chromatographyhass spectrometry. Fresen J Anal Chem 1994; 350: 684-691.
2. Geurtsen W, Leyhausen G. Biological aspects of root canal filling materials-histocompatibility, cytotoxicity, and mutagenicity. Clin Oral Invest 1997; 1: 5-11.
3. Serena TP, Vesely J, Boackle RJ. Complement activation as a possible in vitro indication of the inflammatory potential of endodontic materials. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 1988;65: 354-357.
4. Gulati N, Chandra S, Aggarwal PK, Jaiswal JN, Singh M. Cytotoxicity of eugenol in sealer containing zinc oxide. Endod Dent Traumatol 1991; 7: 181-185.
5. Kolokuris I, Katsaki-Kovatsi VP, Economides N, Poulouloulos A, Razos 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: 210-213.
6. Nencka D, Walia HD, Austin BP. Histologic evaluation of the biocompatibility of Diaket. J Dent Res 1995; 74: 101.
7. Spangberg L. Biological effects of root-canal filling materials on HeLa cells. Odontologisk Revy 1969; 20: 289-299.
8. Olsson B, Siwkowski A, Langeland K. Intraosseus implantation for biological evaluation of endodontic materials. J Endod 1981, 7: 253-265.
9. Stanley HR. Local and systemic responses to dental composites and glass ionomers. Advances in dental Research 1992; 6. 55-64.
10. Torabinejad M, Hong Cu, Pitt Ford TR, Kettering JD. Cytotoxicity of four root and filling materials. J Endod 1995; 21: 489-492.
11. Briseno BM, Willershausen B. Root canal sealer cytotoxicity on human gingival fibroblasts: 2. Silicone-and resin-based sealers. J Endod 1991; 17: 537-540.
12. Takahara K, Onodera A, matsumoto K. Toxicity of root canal sealers on rat bone cells in primary culture. Endod Dent Traumatol 1990; 6: 200-207.
13. Asrari M, Lobner D. In vitro neurotoxic evaluation of root-end-filling materials. J Endod 2003; 29: 743-746.
14. Fenech M, Morley AA, Measurement of micronuclei in lymphocytes. Mutat. Res. 1985, 147:29-36.

15. Fenech M, The cytokinesis-block micronucleus technique: A detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. *Mutat. Res.* 1993, 285:35-44.
16. Mandal P, Zhao J, Sah SK, Huang Y, Liu J. In vitro cytotoxicity of guttaflow 2 on human gingival fibroblasts. *J Endod* 2014;40(8):1156-9.
17. Miletic I, Anic I, Karlovic Z, et al. Cytotoxic effect of four root filling materials. *Endod Dent Traumatol* 2000;16(6):287-90.
18. Miletic I, Devcic N, Anic I, et al. The cytotoxicity of RoekoSeal and AH plus compared during different setting periods. *J Endod* 2005;31(4):307-9.
19. Huang TH, Ding SJ, Hsu TZ, Lee ZD, Kao CT. Root canal sealers induce cytotoxicity and necrosis. *J Mater Sci Mater Med* 2004;15(7):767-71.
20. Cohen BI, Pagnillo MK, Musikant BL, Deutsch AS. An in vitro study of the cytotoxicity of two root canal sealers. *J Endod* 2000;26(4):228-9.
21. Heil J, Reifferscheid G, Waldmann P, Leyhausen G, Geurtsen W. Genotoxicity of dental materials. *Mutat Res* 1996;368(3-4):181-94.
22. Mutal L, Gani O. Presence of pores and vacuoles in set endodontic sealers. *Int Endod J* 2005;38(10):690-6.
23. Bin CV, Valera MC, Camargo SE, et al. Cytotoxicity and genotoxicity of root canal sealers based on mineral trioxide aggregate. *J Endod* 2012;38(4):495-500.
24. Stark LA, Din FV, Zwacka RM, Dunlop MG. Aspirin-induced activation of the NF-kappaB signaling pathway: a novel mechanism for aspirin-mediated apoptosis in colon cancer cells. *FASEB J* 2001;15(7):1273-5.
25. Mahdi JG, Alkarrawi MA, Mahdi AJ, Bowen ID, Humam D. Calcium salicylate-mediated apoptosis in human HT-1080 fibrosarcoma cells. *Cell Prolif* 2006;39(4):249-60.