

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

UZMANLIK TEZİ

**FARKLI KANAL DOLGU MADDELERİNİN
SİTOTOKSİSİTELERİNİN HÜCRE KÜLTÜRÜ
YÖNTEMİ İLE KARŞILAŞTIRMALI OLARAK
İNCELENMESİ**

İKBAL SENA ÇELEBİ KESKİN

**DANIŞMAN
PROF. DR. F. RAİF ERİŞEN**

**ENDODONTİ ANABİLİM DALI
ENDODONTİ PROGRAMI**

İSTANBUL-2020

TEZ ONAYI

(Bu sayfa yerine, başarılı geçen Tez Sınavı sonrası sınav tutanağı ekinde yer alan Tez Onay sayfası gelecektir.)



BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.



İKBAL SENA ÇELEBİ KESKİN

İTHAF

Aileme ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca; bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren ve her zaman destekleyen çok değerli sayın hocam ve tez danışmanım Prof. Dr. Raif Erişen'e,

Asistanlık süresi boyunca bana sağladıkları katkılar ve desteklerinden dolayı Endodonti Anabilim Dalı'nda görev yapan tüm hocalarıma ve uzmanlarıma,

Deney çalışmalarım boyunca benimle ilgilenen ve tez çalışmamı yapmamı sağlayan başta Prof. Dr. Seda Vatansever olmak üzere, doktora öğrencisi Hilal Kabadayı'ya,

İ.Ü. Diş Hekimliği Fakültesi Endodonti Anabilim Dalı'ndaki tüm asistan arkadaşlarıma ve çalışanlara,

Hayat boyu her zaman yanımda olan ve her türlü desteğini hiçbir zaman benden esirgemeyen aileme,

Tezimin hazırlanmasının her aşamasında sabır, anlayış ve özveriyle hep yanımda olan sevgili eşim Ahmet Keskin'e tüm kalbimle teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 29040

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ.....	İX
ŞEKİLLER LİSTESİ	X
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	Xİİ
ÖZET	XİV
ABSTRACT.....	XV
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kanal Tedavisi	3
2.1.1. Kök Kanallarının Doldurulması.....	3
2.1.2. Kök Kanal Dolgu Patları.....	4
2.1.2.1. Çinko Oksit Esaslı Patlar	6
2.1.2.2. Kalsiyum Hidroksitli Patlar.....	7
2.1.2.3. Polimerler	8
2.1.2.4. Cam İyonomer Esaslı Patlar	12
2.1.2.5. Biyoseramik Esaslı Patlar	12
2.2. Dental Materyallerin Biyouyumluluk Özellikleri	14
2.2.1. Biyouyumluluk ve Sitotoksisite	14
2.2.2. Dental Materyallerinin Biyouyumluluk Değerlendirmeleri.....	15
2.2.2.1. İn vitro Testler	16
2.2.2.2. İn vivo Testler	17
2.2.3. Hücre Kültürü	17
2.2.3.1. Periradikuler Dokular için Hücre Kültürü Çeşitleri	19
2.2.4. İn vitro Sitotoksisite Testleri.....	20
2.2.4.1. Direkt hücre kültürü	21
2.2.4.2. Ekstrakt yolu ile temas testi	21
2.2.4.3. Agar Difüzyon Testi.....	22

2.2.4.4. Filtre Difüzyon Testi	22
2.2.4.5. Dentin Bariyer Testi	22
2.2.4.6. Bariyer test metodu	23
2.2.5. Çalışmada Yer Alan Sitotoksiste Değerlendirme Yöntemleri	23
2.2.5.1. MTT Testi	23
2.2.5.2. TUNEL Testi	24
2.3. Hücre Hasarı	24
3. GEREÇ VE YÖNTEM	29
3.1. Çalışmada Kullanılan Materyaller ve İçerikleri	30
3.1.1. Çalışmada Kullanılan Materyaller	30
3.1.2. Çalışmada Kullanılan Materyallerin İçerikleri	30
3.2. Çalışmada Kullanılan Cihazlar, Aletler, Kimyasal ve Sarf Malzemeler	32
3.2.1. Cihaz ve Aletler	32
3.2.2. Kimyasal Malzemeler	35
3.2.3. Sarf Malzemeler	36
3.3. Kök Kanal Dolgu Maddesi Ekstraktlarının Hazırlanması	36
3.4. HPDLF Hücresi İçin Kültür Vasatı Hazırlama	37
3.5. HPDLF için Kültür Vasatı Hazırlama Uygulaması	38
3.6. HPDLF Hücresinin Deney İçin Hazırlanması	39
3.7. HPDLF Hücresi İçin Kültür Vasatı Değiştirme ve Pasajlama Uygulaması	39
3.7.1. HPDLF Hücresi İçin Kültür Vasatı Değiştirme Uygulaması	39
3.7.2. HPDLF Hücresi İçin Pasajlama Uygulaması	40
3.8. HPDLF Hücresi İçin Dondurma Vasatı Hazırlama ve Dondurma Uygulaması	40
3.8.1. HPDLF Hücresi İçin Dondurma Vasatı Hazırlama Uygulaması	40
3.8.2. HPDLF Hücresi İçin Dondurma Uygulaması	40
3.9. Hemositometri Yöntemi ile Hücre Sayımı	41
3.10. HPDLF Hücresinin İmmünohistokimyasal Deneyler ile Moleküler Karakterizasyon Analizleri	42
3.11. MTT Testinin Uygulama Prosedürü	44
3.12. Farklı Kök Kanal Dolgu Patı Uygulması Yapılmış HPDLF Hücresinin TUNEL Analizi ile Apoptoz Oranlarının Değerlendirilmesi	46
3.13. TUNEL Testinin Uygulama Prosedürü	46
4. BULGULAR	48

4.1. HPDLF Hücresinin Kültivasyonu.....	48
4.2. MTT Bulguları	51
4.3. TUNEL Bulguları	77
5. TARTIŞMA	82
KAYNAKLAR	99
ETİK KURUL KARARI	116
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	117
ÖZGEÇMİŞ	118



TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: Biyouyumluluk testlerinin avantaj ve dezavantajları.....	15
Tablo 3-1: Kök kanal dolgu maddeleri ve uygulama prosedürleri	30
Tablo 4-1: Farklı dilüsyonlardaki kanal patlarının ve kontrol vasatının (KV) HPDLF hücrelerinde 24. saat MTT düzeylerinin değerlendirilmesi.....	51
Tablo 4-2: Kanal patlarının farklı dilüsyonlarının ve kontrol vasatının (KV) HPDLF hücrelerinde 24. saat MTT düzeylerinin Post hoc değerlendirilme sonuçları	52
Tablo 4-3: Farklı dilüsyonlardaki kanal patlarının ve kontrol vasatının HPDLF hücrelerinde 24. saat MTT düzeylerinin Post hoc değerlendirilme sonuçları	54
Tablo 4-4: Farklı dilüsyonlardaki kanal patlarının ve kontrol vasatının (KV) HPDLF hücrelerinde 72. saat MTT düzeylerinin değerlendirilmesi.....	57
Tablo 4-5: Farklı dilüsyonlardaki kanal patlarının ve kontrol vasatının (KV) HPDLF hücrelerinde 72. saat MTT düzeylerinin Post hoc değerlendirilme sonuçları	58
Tablo 4-6: Kanal patlarının farklı dilüsyonlarının ve kontrol vasatının HPDLF hücrelerinde 72. saat MTT düzeylerinin Post hoc değerlendirilme sonuçları	60
Tablo 4-7: HPDLF Hücrelerinin 24. saat ve 72. saat MTT düzeylerinin değerlendirilmesi	62
Tablo 4-8: HPDLF hücrelerinde 24.saat ve 72.saatlerde TUNEL % düzeylerinin değerlendirilmesi	77
Tablo 4-9: HPDLF hücrelerinde 24. saat ve 72. saatlerde TUNEL % düzeylerinin Post hoc değerlendirilme sonuçları.....	78

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Hücre Ölümü	25
Şekil 3-1: Kök kanal dolgu maddeleri; Sealapex (A), Apexit Plus (B), AH Plus (C), TotalFill BC Sealer (D), MTA-Fillapex (E)	30
Şekil 3-2: Su Banyosu (Nüve ST 402).....	32
Şekil 3-3: Santrifüj Cihazı (Thermo Scientific 11210900).....	33
Şekil 3-4: Mikropipet Seti.....	33
Şekil 3-5: İnkübatör (Esco CCL-170B-8, Nuair, Nu 5510E)	34
Şekil 3-6: Laminar Air Flow Hava Akış Kabini (ESCO AC2-4E8).....	34
Şekil 3-7: Deneylerde kullanılan kök kanal patlarının hazırlanışı.....	36
Şekil 3-8: Deneylerde kullanılan kök kanal dolgu patı ekstraktları.....	37
Şekil 3-9: Hücre kültüründe kullanılan malzemeler; DMEM (A), FBS (B), Amfoterisin B (C), Penisilin-Streptomisin (D), Tripsin/EDTA (E), L-Glutamin(F), Gentamisin (G)...	38
Şekil 3-10: Toma Lamı	41
Şekil 3-11: Tripan Mavisi	42
Şekil 3-12: Karakterizasyonda Kullanılan Primer Antikorlar; AntiCD34(A), Antikollajen1 (B), AntiCD45 (C), AntiCD90 (D).....	43
Şekil 3-13: İmmunohistokimya Uygulmasında Kullanılan Malzemeler; Bloklama Solüsyonu (A), Biotinlenmiş Sekonder Antikor (B), HRP-Streptavidin (C), PBS Tablet (D), DAB kromojeni (E), Mayer's Hematoksileni (F)	44
Şekil 3-14: Spektrofotometre Cihazı (Biotek ELX800UV)	45
Şekil 3-15: 24 Saat Maruziyet sonrası MTT Uygulaması Yapılan HPDLF Hücresi (A, B) Görüntüleri.....	45
Şekil 3-16: 72 Saat Maruziyet sonrası MTT Uygulaması Yapılan HPDLF Hücresi (A, B) Görüntüleri.....	45
Şekil 3-17: TUNEL Uygulaması Sonrası Preperat Örnekleri.....	47
Şekil 4-1: HPDLF Hücresinin Görüntüsü. Ölçek:100nm	48
Şekil 4-2: HPDLF Hücresi Gruplarında Yer Alan Hücrelerin 3. Pasaj 2. Gün (A), 3.Pasaj 5.gün (B) ve 7. Pasaj (C) Görüntüleri / Ölçek: 100nm	49
Şekil 4-3: HPDLF hücrelerinde CD 45 (A), CD 90 (B), CD 34 (C), Kollajen1 (D) immunoreaktivitesi, Kontrol immunohistokimya boyaması (E). Ölçek 20 µm.	50

Şekil 4-4: HPDLF hücrelerinin 24 saat 1:0 (A), 1:1 (B), 1:2 (C), 1:4 (D), 1:8 (E) dilüsyonlarında Sealapex ve kontrol vasatı (F) uygulaması yapıldıktan sonra MTT görüntüleri. Ölçek: 100 µm.....	68
Şekil 4-5: HPDLF hücrelerinin 24 saat 1:0 (A), 1:1 (B), 1:2 (C), 1:4 (D), 1:8 (E) dilüsyonlarında Apexit Plus ve kontrol vasatı (F) uygulaması yapıldıktan sonra MTT görüntüleri. Ölçek: 100 µm.....	69
Şekil 4-6: HPDLF hücrelerinin 24 saat 1:0 (A), 1:1 (B), 1:2 (C), 1:4 (D), 1:8 (E) dilüsyonlarında AH Plus ve kontrol vasatı (F) uygulaması yapıldıktan sonra MTT görüntüleri. Ölçek: 100 µm.....	70
Şekil 4-7: HPDLF hücrelerinin 24 saat 1:0 (A), 1:1 (B), 1:2 (C), 1:4 (D), 1:8 (E) dilüsyonlarında TotalFill BC Sealer ve kontrol vasatı (F) uygulaması yapıldıktan sonra MTT görüntüleri. Ölçek: 100 µm.	71
Şekil 4-8: HPDLF hücrelerinin 24 saat 1:0 (A), 1:1 (B), 1:2 (C), 1:4 (D), 1:8 (E) dilüsyonlarında MTA-Fillapex ve kontrol vasatı (F) uygulaması yapıldıktan sonra MTT görüntüleri. Ölçek: 100 µm.....	72
Şekil 4-9: HPDLF hücrelerinin 72 saat 1:0 (A), 1:1 (B), 1:2 (C), 1:4 (D), 1:8 (E) dilüsyonlarında Sealapex ve kontrol vasatı (F) uygulaması yapıldıktan sonra MTT görüntüleri. Ölçek: 100 µm.....	73
Şekil 4-10: HPDLF hücrelerinin 72 saat 1:0 (A), 1:1 (B), 1:2 (C), 1:4 (D), 1:8 (E) dilüsyonlarında Apexit Plus ve kontrol vasatı (F) uygulaması yapıldıktan sonra MTT görüntüleri. Ölçek: 100 µm.....	74
Şekil 4-11: HPDLF hücrelerinin 72 saat 1:0 (A), 1:1 (B), 1:2 (C), 1:4 (D), 1:8 (E) dilüsyonlarında AH Plus ve kontrol vasatı (F) uygulaması yapıldıktan sonra MTT görüntüleri. Ölçek: 100 µm.....	75
Şekil 4-12: HPDLF hücrelerinin 72 saat 1:0 (A), 1:1 (B), 1:2 (C), 1:4 (D), 1:8 (E) dilüsyonlarında TotalFill BC Sealer ve kontrol vasatı (F) uygulaması yapıldıktan sonra MTT görüntüleri. Ölçek: 100 µm.	76
Şekil 4-13: HPDLF hücrelerinin optimal konsantrasyonda Sealapex (A), Apexit Plus (B), AH Plus (C), TotalFill BC Sealer (D), MTA-Fillapex (E) pat uygulaması 24 saat yapıldıktan sonra TUNEL immunoreaktivitesi ve Kontrol (F) TUNEL immunohistokimya boyaması. Ölçek: 20 µm.	80
Şekil 4-14: HPDLF hücrelerinin optimal konsantrasyonda Sealapex (A), Apexit Plus (B), AH Plus (C), TotalFill BC Sealer (D), MTA-Fillapex (E) pat uygulaması 72 saat	

yapıldıktan sonra TUNEL immunoreaktivitesi ve Kontrol (F) TUNEL immunohistokimya boyaması. Ölçek: 20 µm.	81
---	----



SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

HPDLF : İnsan periodontal ligament fibroblast

PDL : Periodontal ligament

MTA : Mineral trioksit agregat

MTT : 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid)

TUNEL : Terminal deoxynucleotidyl transferase (tdt)-mediated dUTP-biotin nick end-labeling

CBCT : konik ışınli bilgisayarlı tomografi

CRCS : Kalsibiyotik Kök Kanal dolgu patı

ISO : Uluslararası Standardizasyon Birliğı

HEMA : Poli(2-hidroksietil) metakrilat

UDMA : Diüretan dimetakrilat

BisGMA : Bisphenol A-glycidyl methacrylate BisGMA

% : Yüzde

EDTA : Etilen diamin tetra asidik asit

CO₂ : Karbondioksit

° : Derece

DNA : Deoksiribo nükleik asit

µm : Mikrometre

DMSO : Dimetil sülfoksit

ATP : Adenozin trifosfat

TNF : Tümör nekroz faktörü

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle's medium

FBS : Fötal bovin serumu

PBS : Fosfat Tamponlu Salin

DAB : 3,3'-Diaminobenzidine

µl : mikrolitre

KV: Kontrol vasatı

ÖZET

ÇELEBİ KESKİN, İ.S. (2020). Farklı kanal dolgu maddelerinin sitotoksitelerinin hücre kültürü yöntemi ile karşılaştırmalı olarak incelenmesi. İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi, Endodonti ABD. Yüksek Uzmanlık Tezi. İstanbul.

Endodontik tedavinin son aşaması olan kök kanallarının doldurulması esnasında kullanılan kök kanal dolgu patlarının periradiküler dokular ile biyouyumluluğu tedavinin başarısı açısından çok önemlidir. Çalışmanın amacı günümüzde kullanılan 5 farklı kök kanal dolgu patının (Sealapex, Apexit Plus, AH Plus, MTA-Fillapex, TotalFill BC Sealer) sitotoksitelerini peridodontal ligament fibroblast hücrelerinde MTT ve TUNEL testleri kullanılarak karşılaştırmalı olarak değerlendirmektir.

Çalışmada hücre grubu olarak dental pulpa kök hücresinden farklılaştırılan insan periodontal ligament fibroblast hücresi kullanıldı. Kök kanal dolgu patları karıştırılıp sertleşmeleri için 24 saat bekletildikten sonra ekstrat eldesi için 24 saat kültür vasatında bekletildi. Her bir pattan elde edilen ekstratlar 1:0, 1:1, 1:2, 1:4 ve 1:8 oranlarında dilüe edildi. Kültür vasatı kontrol grubu olarak kullanıldı. Hücreler (1×10^3) 96 gözlü ve 8 gözlü plaklara ekildi ve 48 saat 37°C’de inkübe edildi. Hücreler 24 saat ve 72 saat ekstrakta maruz bırakıldı. Hücre canlılığı ve hücre ölüm oranları MTT ve apoptoz oranları TUNEL ile değerlendirildi. İstatiksel analizler için Mann Whitney U ve Kruskal Wallis testleri kullanıldı.

Tüm materyaller 72. saatlik temasta 24. Saate göre daha yüksek oranda sitotoksite göstermiştir. Tüm gruplarda en yüksek sitotoksiteyi AH Plus, sırasıyla MTA-Fillapex, Apexit Plus, Sealapex ve en düşük sitotoksiteyi TotalFill BC Sealer göstermiştir.

Sonuç olarak diğer patlara göre daha düşük sitotoksik potansiyele sahip olduğu belirlenen TotalFill BC Sealer yüksek derecede biyouyumlu bir materyal olarak kabul edilebilir.

Anahtar Kelimeler: sitotoksite, hücre kültürü, MTT, TUNEL, kök kanal dolgu patı

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 29040

ABSTRACT

CELEBI KESKIN I.S. (2020). Comparative Evaluation of Cytotoxicity of Different Root Canal Sealers by Cell Culture Method. İstanbul University, Faculty of Dentistry, Department of Endodontics. Master Thesis. İstanbul.

The sealers are used to obturate the root canals, during the final stage of endodontic treatment. The success of the biocompatibility related to the treatment of root canal filling material with periradicular tissues is very important. The aim of this study is to compare the cytotoxic effect of 5 root canal sealers (Sealapex, Apexit Plus, AH Plus, MTA-Fillapex, TotalFill BC Sealer) on human periodontal ligament fibroblast.

In the study, human periodontal ligament fibroblast cell differentiated from dental pulp stem cell was used. The sealers were mixed and allowed to be prepared for 24 hours. After setting for 24 h to obtain the extract, the sealers were covered with culture medium. The extract from root canal sealers were diluted to 1:0, 1:1, 1:2, 1:4, 1:8 ratios. Culture medium was used as the control group. Cells (1×10^3) were seeded in each well of a 96-well and 8-well plates and incubated for 48 h at 37. Cells were then exposed to the extract medium for 24 h and 72 h. The viability of cell and death toll rates were assessed by MTT and rates of apoptosis by TUNEL.

In all materials, the toxicity of the material is higher when the material is exposed to 72 h compared to 24h. In all groups, the highest cytotoxicity appears in AH Plus; MTA-Fillapex; Apexit Plus; Sealapex, respectively and the lowest cytotoxicity was observed in TotalFill BC Sealer.

As a result it was considered that TotalFill BC Sealer had lowest cytotoxic potential when compared to other sealers so it can be considered as biocompatible.

Key Words: cytotoxicity, cell culture, MTT, TUNEL, root canal sealer

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No. 29040

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kök kanal tedavisi geri dönüşümlü olmayan hasarlı diş pulpasının tamamen çıkarılması ve ardından dişin dental arkta fonksiyonel bir bütün olarak kalabilmesi için kök kanal sisteminin biyomekanik olarak temizlenmesi, şekillendirilmesi ve doldurulmasını içerir. Kök kanal tedavisinin mantığı, avasküler olan devital pulpada hiçbir savunma mekanizmasının olmamasına dayanır. Kök kanalındaki hasarlı doku otolize uğrar ve ortaya çıkan parçalanma ürünleri çevre dokulara yayılır. Bakteriyel kontaminasyon yokken dahi foramen apikale ve aksesuar kanallar aracılığıyla periapikal bölgede hasara neden olurlar. Bu nedenle hem nekrotik dokunun hem de mikroorganizma ve toksik yan ürünlerin periapikal dokuya geçişini önlemek için kök kanal sistemini üç boyutlu olarak doldurulması gerekir (1).

Kök kanalının doldurulmasında katı olarak guta perka ve yarı katı, akışkan olarak pat kullanılır. Günümüzde ideal materyallerin hepsine sahip bir patın olmayışı nedeniyle piyasaya birçok yeni materyal sürülmektedir. Kalsiyum hidroksit esaslı patlar yüksek alkali yapıda olma özelliği ile bakterisidal etki oluşturmaları ve apikal foramen bölgesinde mineralize doku formasyonunu uyarması nedeniyle tercih edilmektedir. Ancak patın zamanla çözünmesi en büyük dezavantajıdır (2, 3, 4, 5). Rezin esaslı patlar sertleşirken boyutsal olarak stabildirler ve kolay uygulanırlar (6, 7). Biyoseramikler toksik olmayan, biyouyumlu, büzülme ve biyolojik ortamda stabil kalabilen yapıya sahiptir (8). Kemik ile temas ettiğinde, kemik ara yüzeyinde mineral hidroksiapatit yapımına yol açan, osteokondüktif bir etkiye sahip olması biyoseramiklerin en önemli avantajıdır (9).

Kök kanal tedavisinde kullanılan patlar akışkan formundan dolayı foramen apikaleden çıkarak periapikal dokularla temas edebilirler. Bu nedenle kök kanal dolgu patlarında bulunması gereken özelliklerden biri de biyouyumluluktur. Diş hekimliğinde biyouyumluluk çalışmaları hücre kültürü, hayvan deneyleri ve klinik çalışmalar ile yapılmaktadır. Hücre kültürü bu alanda sıklıkla tercih edilen bir yöntemdir. Yapılan çalışmalarda çoğunlukla periapikal bölgenin iki önemli hücre grubu olan periodontal ligament (PDL) hücreleri ve osteoblast hücreleri tercih edilmiştir. Bu çalışmada hücre grubu olarak insan periodontal ligament fibroblast (HPDLF) hücreleri kullanılmıştır.

Bu tez çalışmasının amacı kalsiyum hidroksit esaslı Sealapex ve Apexit Plus, epoksi rezin esaslı AH Plus, mineral trioksit agregat (MTA) içerikli biyoseramik esaslı

MTA-Fillapex ve kalsiyum silikat içerikli biyoseramik esaslı TotalFill BC Sealer kök kanal dolgu patlarının hücre kültürü ortamında 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromid (MTT) ve terminal deoksinukleotidil transferaz (tdt)-aracılı dUTP-biotin işaretleme (TUNEL) testleri ile sitotoksisite oranlarını karşılaştırmalı olarak değerlendirmektedir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanal Tedavisi

Kök kanal tedavisinin amacı, dişin ağız içinde fonksiyon görebilmesi için mevcut periapikal doku iyileşmesine imkân sağlayan bir ortam hazırlamaktır. Endodontik tedavi ile pulpanın lezyonel tedavisinin yanında periodonsiyumun da koruyucu tedavisi gerçekleştirilmiş olur ve bu sayede diş dokusu doğal bir implant olarak fonksiyon görmeye devam eder (10, 11).

Başarılı bir endodontik tedavideki hedefler; kök kanallarının uygun bir şekilde genişletilmesi, dezenfekte edilmesi, hastalıklı dokuların uzaklaştırılması, kök kanallarındaki ve dentin tübüllerindeki mikroorganizma mevcudiyetinin yok edilmesi, ardından inert, boyutsal olarak stabil ve biyolojik olarak uyumlu bir kanal dolgu materyali ile apikal foramene kadar hermetik bir şekilde üç boyutlu olarak doldurmasını içerir (12, 13, 14, 15).

2.1.1. Kök Kanallarının Doldurulması

Kök kanallarının doldurulması kanal tedavisinin en önemli aşamalarından biridir. Keskin C. ve ark. kök kanal dolgularının kalitesi ile tedavi sonrası apikal periodontitis ilişkisini retrospektif olarak konik ışınli bilgisayarlı tomografi (CBCT) ile inceledikleri bir çalışmada kök kanal tedavisi sızdırmazlığı yeterli olarak değerlendirilen dişlerin periodontal sağlıklarını kök kanal tedavisi sızdırmazlığı yetersiz olarak değerlendirilen dişlere göre anlamlı derecede daha olumlu bulmuşlardır (16).

Kök kanallarının sızdırmaz bir şekilde doldurulma nedenleri;

1. Mikroorganizmaların oral kaviteden periradiküler dokulara geçişini engelleyecek bir bariyer oluşturmak,

2. Kanalları temizleme ve şekillendirme işlemlerini takiben hala kanalda mevcut olabilecek mikroorganizmaları izole etmek, kök kanalı içine hapsetmek ve periapikal irritasyonu önlemek,

3. Mikrobiyal çoğalmaya yardımcı olabilecek besinlerin kök kanal sistemine sızıntısını engellemek,

4. Kök kanal sistemine gingival sulkustan veya periodontal cepten oluşabilecek sızıntıyı ve bakteri geçiş riskini azaltmaktır (17).

Kök kanal tedavisinde kullanılan çoğu teknikte bir kor materyali ve pat birlikte kullanır. Her teknik için sıvı geçişinin engellenmesi ve sızdırmaz bir dolgu için kor materyali ile birlikte kök kanal dolgu patı da gereklidir (18).

Bir kanal dolgu patının ana görevi, boşluk kalmayacak şekilde kor materyali olan guta perka ile kanal duvarları arasındaki boşluğu ve guta perkaların birbirleri arasında kalan alanları homojen bir şekilde doldurmaktır. Dolgu patının, kanaldaki düzensizlikleri ve küçük farklılıkları, aksesuar ve lateral kanalları doldurması beklenmektedir. Dolgu patlarının kanallar şekillendirilip temizlendikten sonra kanalda kalan bakteriler üzerinde antibakteriyel etki göstermesi istenmektedir (12, 13, 14, 15).

Dolgu patlarının içeriği, materyali kök kanal boşluğu içinde sınırlandırmak için yoğunlaştırılmış olsa da kondensasyon prosedürleri sırasında apikal boşluktan istenmeyen taşmalar meydana gelebilmektedir. Kanal dolgu patları kanal boşluğundan taşıp yumuşak ve sert dokularla temasa geçtiğinde, periradiküler dokuların kalıcı iltihaplanmasına ve etkilenen bölgenin ağrı, hassasiyet ve şişmesi ile birlikte ortaya çıkan gecikmiş yara iyileşmesine neden olabilmektedir. Bu nedenle, farklı vakalar için doğru kanal dolgu patının seçilmesinde, dolgu maddelerinin biyouyumluluğu önemlidir (19).

Amerikan Endodonti Birliği Klinisyen Endodontist Rehberi'nde çağdaş endodontik tedaviyi şu şekilde özetlemiştir: Daimi dişlerin ameliyatsız kök kanalı tedavisi; kök kanal sisteminin periradiküler dokuların iyileşmesini ve onarılmasını sağlamak için biyolojik olarak kabul edilebilir kimyasal ve mekanik işlemlerini içerir. Rehber bu alanda literatürlerde paraformaldehit içeren patların veya obtürasyon materyalinin biyolojik dokular için güvensiz olduğu gösterildiği için paraformaldehit içeren materyaller ile yapılan kök kanalı tedavisinin, endodontik tedavi için standartın altında olduğunu belirtmiştir (20).

2.1.2. Kök Kanal Dolgu Patları

Kök kanal dolgu patları, dentin duvarı ile kor materyali arasındaki boşluğun doldurulması için gereklidir. Patlar ayrıca kök kanalındaki boşlukları ve düzensizlikleri, lateral ve aksesuar kanalları ve lateral kompaksiyon sırasında kullanılan guta perka arasındaki boşlukları doldurur. Kök kanal dolgu patları, dolgu işlemi sırasında lubrikant olarak da hizmet eder (18).

Grossman'a göre ideal bir kanal dolgu maddesinin göstermesi gereken özellikler şunlardır:

1. Karıştırıldığında yapışkan özellikte olmalı ve böylece sertleştiği zaman kanal duvarları ile arasında iyi bir adezyon sağlamalıdır.
2. Kök kanalında hermetik bir tıkama gerçekleştirmelidir.
3. Radyografide izlenebilmesi için radyopak olmalıdır.
4. Toz kısmı çok ince partiküllü olmalı ve böylece likit kısmıyla kolayca karıştırılabilmelidir.
5. Sertleşme sırasında büzülme göstermemelidir.
6. Diş dokularında renkleşmeye neden olmamalıdır.
7. Bakteriyostatik olmalı veya en azından bakteri çoğalmasını engellemelidir.
8. Yavaş sertleşmelidir.
9. Doku sıvılarında çözünmemelidir.
10. Doku dostu olmalı, periapikal dokularda irritasyon oluşturmamalıdır.
11. Gerektiğinde kök kanalından çıkarılabilmesi için, bilinen çözücü materyallerde çözünebilme özelliğinde olmalıdır (21).

Ingle ek olarak iki madde daha eklemiştir (22).

12. Periradiküler dokularda immün bir cevap tetiklememelidir.
13. Mutajenik ya da karsinojenik olmamalıdır.

Kanal dolgu patları şu şekilde sınıflandırılmaktadır (23):

1. Çinko Oksit esaslı patlar
 - a. Çinko Oksit Ojenol
 - b. İlaçlı olanlar
 - i. Paraformaldehit içerenler
 - ii. Paraformaldehit içermeyenler
 - c. Ojenolsüz çinko oksit
2. Kalsiyum Hidroksit esaslı patlar

3. Polimerler

- a. Epoksi-amin rezin esaslı patlar
- b. Metakrilat rezin esaslı patlar
- c. Polivinil (poliketon) rezin esaslı patlar
- d. Silikon polimerler

4. Cam iyonomer esaslı patlar

5. Biyoseramik esaslı patlar

- a. MTA içerenler
- b. Kalsiyum-silikat-fosfat içerenler

2.1.2.1. Çinko Oksit Esaslı Patlar

Çinko oksit esaslı patlar uzun yıllar klinisyenler tarafından tercih edilen patlardan olmuşturlar. İçeriğindeki toz kısmı; çinko oksit, hidrojenize edilmiş rezin, bizmut subkarbonat, baryum sülfat, sodyum borattan oluşurken, likit olarak öjenol kullanılır. (24). Patın tozundaki çinko oksit partikülleri patın akıcılığını arttırmak amacıyla inceltirilmiştir. Aynı zamanda antimikrobiyal ajan olarak da görev yaparlar. Patın sertleşmesi çinko öjenolat oluşumu sayesinde. Sertleşme reaksiyonu tek yönlüdür, çinko öjenolat nem varlığında öjenol ve çinko hidroksite parçalanır. Bu nedenle doku sıvılarından çok etkilenmektedir. Ortamda nem bulunması patın çalışma zamanını kısaltmaktadır (25, 26, 27).

Çinko oksit öjenol içeren patların avantajları, antimikrobiyal özellik taşıması, kolay şekil verilebilir olması, nemsiz ortamlarda yavaş sertleşmesi ve sertleşme sırasında düşük oranda boyutsal değişiklik göstermesidir (28, 29, 30, 31).

En önemli dezavantajı ise, sürekli öjenol salınımı ile birlikte suyla temas ettiğinde dekompoze olmasıdır (32, 33). Çinko oksit içeren kök kanal dolgu patlarının belirtilen bir diğer önemli dezavantajı özellikle periapikal dokudan taşması durumunda maksiller sinüs aspergillozuna neden olabilmesidir (34). Ayrıca sertleşme sonucunda açığa çıkan serbest öjenol taze dentinde sertlik meydana getirir ve dokular için yüksek sitotoksosite göstermektedir. Doku kültürü ve implantasyon çalışmaları bu materyalin oldukça toksik olduğunu göstermektedir. İn vitro testler ve lokal toksisite sonuçlarına karşın, klinik uygulamalarda materyalle oldukça başarılı sonuçlar elde edilebilmektedir (25).

Bu gruba ait örnek kök kanal dolgu patları şunlardır: Grossman's Sealer, Pulp Canal Sealer, TubliSeal, U/P Root Canal Cement, Wach's Sealer, Ricket's sealer, Roth-801, Pulpdent Root Canal Sealer, Proco-Sol Nonstaining, Sealite Ultra, Cortisomol, Endomet Plain, Endobtur, Argoseal, N- Rickert, Endofill, Intrafill, Fill Canal, Pulp Fill, Polifill, Endoflas (1, 25).

Çinko oksit esaslı patların içerisine bazı maddeler eklenerek materyalin kimyasal özelliklerinin geliştirilmesi amaçlanmaktadır. Örneğin antimikrobiyal ve fiksasyon etkisi için sıklıkla paraformaldehit, antiseptik etki için germisitler, dentin adezyonunu sağlamak için Kanada balsamı veya bitkisel reçine (rezin), inflamatuvar reaksiyonun baskılanması için kortikosteroidler ilave edilmektedir (33).

2.1.2.2. Kalsiyum Hidroksitli Patlar

Kalsiyum hidroksit kök kanal dolgu maddeleri endodontide hem intrakanal medikaman olarak hem de kor materyali ile birlikte kök kanal dolgu patı olarak kullanılmaktadır. Kalsiyum hidroksit steril salin, kafurlu klorfenol, kafurlu paraklorfenol, metil selüloz, ringer solüsyonu, kollajen, kalsiyum fosfat jeli, trikalsiyum fosfat, iodoform ve gliserin ile karıştırılarak ya da tek başına kalsiyum hidroksit tozu olarak kullanılabilir. Kök kanal dolgu malzemesi olarak kalsiyum hidroksit patının tercih edilme nedeni apikal foramende sert doku oluşumuna yol açtığı varsayıldığı nedeniyledir. Ayrıca hazırlanma kolaylığı, kök kanal dolgusunun kanal sisteminden çıktığı durumlarda kolay rezorbe olması, rezorptif defektlerde iyileşmeyi uyarması, alkalik pH'a sahip olması gibi avantajları bulunmaktadır. Varsayımına göre kalsiyum hidroksitin alkaliliği mineralize doku oluşumunu uyarır (1, 2, 3, 4, 5). Kalsiyum hidroksit patının kanal sistemi dışına çıktığı durumlarda rezorbe olabilmesi avantaj olsa da kanal içinde çabuk rezorbe olduğu durumlar dezavantaj yaratmaktadır. Bu yüzden daimi kanal dolgusu olarak kullanılacağı durumlarda rezorbe olmasını engelleyecek taşıyıcılarla birlikte kullanılması önerilmektedir. Kanal dolgusunun rezorbe olması kanalda boşluğa neden olacak sıvı değişimine uygun bir ortam yaratmaktadır. Bu da bölgenin granülasyon dokusuyla dolmasına yol açabilmektedir ve mikroorganizmalar için uygun bir ortam oluşturmaktadır. Bu avantaj ve dezavantajlar doğrultusunda kalsiyum hidroksitin diğer prepatlarla birlikte kullanılması düşünülmüştür. Ancak bu şekilde hazırlanan preparatlar kalsiyum hidroksitin yararlı etkilerinin nötralize olmasına neden olmaktadır (1, 25).

Garg kalsiyum hidroksit patlarının özelliklerini şu şekilde sıralamıştır (1):

- Mineralizasyonu uyarır.
- Sementogenezis yoluyla apikal kapanmayı indükler.
- Travma sonrası kök rezorbsiyonunu inhibe eder.
- Alkali pH'ı sayesinde osteoklast aktivitesini inhibe eder.
- Çinko oksit öjenol esaslı patlardan daha iyi sızdırmazlık özelliğine sahiptir.
- Çinko oksit öjenol esaslı patlardan daha az toksiktir.

Kalsiyum hidroksit içerikli patların en çok bilinenleri Sealapex, Kalsibiyotik Kök Kanal dolgu patı (CRCS), Apexit Plus'tur.

Shrinidhi ve ark. 6 farklı kök kanal dolgu maddesinin mikrosızıntısını stereomikroskop ile karşılaştırdıkları bir çalışmada kalsiyum hidroksit esaslı Sealapex'in sızdırmazlığını AH Plus, MTA Plus, çinko oksit öjenol içeren patlardan daha az, Endosequence BC Sealer'dan daha fazla bulmuşlardır. Nem varlığında sertleşmeye devam ederek volümetrik ekspansiyonun devam etmesi nedeniyle sızdırmazlığın azabileceğini düşünmüşlerdir (35).

Çobankara FK ve ark. (36) bilgisayarlı akışkan filtrasyon yöntemini kullanarak dört sızdırmazlık maddesinin apikal sızdırmazlığı üzerinde çalışmışlar ve Sealapex'in AH Plus, polimer esaslı ve çinko oksit öjenol esaslı patlara göre önemli ölçüde daha az sızıntı gösterdiğini belirtmişlerdir.

Poggio ve ark. (37) agar difüzyon testi kullanarak patların E. Faecalis üzerindeki antibakteriyel etkinliklerini karşılaştırdıkları çalışmada Sealapex'in antibakteriyel etkinliğini yetersiz bulmuşlardır.

Tanomaru ve ark. (38) patların radyoopasitesini karşılaştırdıkları bir çalışmada bütün patların Uluslararası Standardizasyon Birliği (ISO) standartlarını sağladığını en yüksek radyoopasitenin MTA-Fillapex'te olduğunu ancak Sealapex ve Endo CPM kök kanal patlarının radyoopasitelerini diğerlerinden daha düşük olduğunu bildirmişlerdir.

2.1.2.3. Polimerler

Polimerler küçük yapıdaki monomer denilen moleküllerin birleşimi ile oluşan, yaklaşık 10.000 atom ihtiva eden (50) büyük yapıdaki makro moleküllerdir.

Polimer esaslı kök kanal dolgu patlarının hazırlanmaları kolaydır, sertleşirken boyutsal olarak stabildirler, radyoopaktırlar ve yeteri kadar çalışma zamanı sunarlar. Dentine yüksek oranda adaptasyon gösterirlerken kanaldan uzaklaştırılmaları da kolaydır. Esas olarak 4 grup altında incelenirler: epoksi rezin esaslı patlar, metakrilat esaslı patlar, poliketon esaslı patlar, silikon esaslı patlar (6, 7).

Epoksi rezin esaslı patlar

AH26 1954 yılında Schroeder tarafından; piyasaya sürülen ilk rezin içerikli pattır. Tozunda titanyum oksit, gümüş, heksametilen tetramin, likidinde ise bisfenol diglisidil eter bulunur. Ürün yeterince radyoopaktır (0,66mm Al kalınlığına eşdeğer). Sertleşme esnasında formaldehit açığa çıkarması ve dişte renklenmeye neden olması nedeniyle ürün geliştirilerek yerine AH Plus piyasaya sürülmüştür. Aynı zamanda AH26'nın geç sertleşme süresi ve kök kanallarından gerektiğinde sökölme zorluğu göstermesi gibi dezavantajları ortadan kaldırılmaya çalışılmıştır (39, 40).

Miletic ve arkadaşlarının AH26 ve AH Plus sitotoksitesini ve mutajenitesini karşılaştırdıkları bir çalışmada AH Plus, AH26'dan hem başlangıçta hem de sonrasında daha şiddetli sitotoksik etki göstermiştir. AH26'nın sitotoksitesinden sorumlu olan formaldehit ve diğer maddelerin esas olarak ilk 24 saat boyunca salınması nedeniyle AH Plus'tan daha az sitotoksik etki göstermiş olabileceğini düşünmüşlerdir (41).

Masoud ve arkadaşlarının insan gingival fibroblast hücrelerinde AH26, AH Plus ve Duraflur sitotoksitesini karşılaştırdıkları bir çalışmada AH Plus tüm dilüsyonlarda AH26'ya kıyasla belirgin ölçüde daha fazla hücre canlılığı göstermiştir (42).

Miletic ve arkadaşlarının (43) AH26, AH Plus, Diaket ve Apexit'in sitotoksitesini karşılaştırdıkları bir çalışmada rezin içeren AH26'nın, diğer patlara kıyasla çok yüksek bir sitotoksik potansiyel gösterdiğini canlı hücrelerin tamamen kaybına neden olduğunu belirtmişlerdir. AH26'nın toksisitesinin, sertleşmenin erken evresinde açığa çıkan kimyasal bir yan ürün olan formaldehitin varlığından dolayı olabileceğini düşünmüşlerdir. AH26 ve AH Plus, epoksi rezin bileşeni içerir ve bu, her iki malzeme için de sitotoksitenin başka bir nedeni olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca, polimerleşmeyi hızlandıran materyallerin bileşimindeki aminler, AH26 ve AH Plus'ın toksisitesi ile ilişkili olabilir.

Bu gruba ait kök kanal dolgu patları şunlardır: AH Plus, Sealer 26, 2Seal, ThermaSeal Plus, TopSeal, ADSEAL, EZ-Fill, Smartpaste (23).

Metakrilat rezin esaslı patlar

Primer ve asitlendirme yapılarak dentine bağlanma özelliği kazandırılan rezin teknolojilerinin restoratif diş hekimliğinde kullanılmaya başlanmasının ardından, düşük viskoziteli metakrilat rezin esaslı kök kanal dolgu patları endodontide kullanılmaya başlanmıştır (44).

Günümüze kadar 4 farklı nesil metakrilat rezin içerikli pat üretilmiştir.

İlk nesil hidrofilik metakrilat reçine esaslı malzeme 1970’li yılların ortalarında tasarlanmış olup, Hydron’dur. Hydron’un ana bileşeni, kök kanalına enjekte edilen ve kanal boşluğu içinde in situ polimerize olabilen poli[2-hidroksietil metakrilat] (poli [HEMA])’dır. Bu patla yapılan klinik çalışmalarda ciddi enflamatuvar reaksiyon gözlenmiş olup 1980’lerde kullanımı terk edilmiştir (45).

İkinci nesil metakrilat rezinlere örnek olan EndoRez (Ultradent Products Inc., Güney Ürdün, Utah) asidik olmayan diüretan dimetakrilat (UDMA) içeren dual-cure hem ışıkla hem de kimyasal olarak sertleşen, radyoopak bir kanal patıdır. Asitlendirme ve ek adeziv uygulaması gerektirmez. Trietilenglikol ilavesi ile pata hidrofilik özellik kazandırılmıştır. Bu özelliği sayesinde kök kanalı nemli iken kullanılabilir. Smear tabakasının kaldırılmasından sonra, dentin tübüllerine ve yan kanallara akarak rezin uzantılarının oluşturulması ve retansiyon sağlanması amacıyla geliştirilmiştir. Patın, rezinle kaplanmış EndoRez guta perka veya konvansiyonel guta perka ile birlikte kullanımı önerilmektedir (46, 47).

Üçüncü nesil, self-etch bir primer ile birlikte hem ışık hem de kimyasal olarak sertleşen kompozit rezin içeren bir pat tipidir. Bu sistemde smear tabakası korunur. Dentin yüzeyine uygulanan asidik primer, smear tabakasından geçerek dentinin üst tabakasını demineralize eder (48, 49, 50). Epiphany kanal dolgu patı ve Resilon rezin esaslı bir kanal dolgu birleşimidir. Bu nesildeki en bilinen kök kanal dolgu patı Epiphany’dır. Epiphany’nin içeriğinde bisphenol A-glycidyl methacrylate (BisGMA), etoksilat BisGMA, üretan dimetakrilat, hidrofilik difonksiyonel metakrakrilatın yanı sıra doldurucu olarak kalsiyum hidroksit, baryum sülfat, baryum camı, bizmut oksiklorit ve silika içerir. İçeriğinin %70’ini doldurucular oluşturmaktadır. Resilon termoplastik

sentetik polimer esaslı kanal dolgu materyalidir. Resilon içeriğindeki polikaprolakton sayesinde termoplastik özellik kazanmaktadır. Epiphany/Resilon kök kanal dolgu sistemi ayrıca sulfonik asit yapısında olan fonksiyonel monomer, hidroksietilmetakrilat, su ve polimerizasyon başlatıcı içeren kendiliğinden pürüzlendirme özelliğinde olan Epiphany primer içerir. %17 lik etilen diamin tetra asidik asit (EDTA) solüsyonunun kullanımının ardından kanala uygulanan Epiphany primer ve ardından uygulanan Epiphany/Resilon sistemi boşlukları doldurarak hermetik bir kapama sağlar. Bu şekilde zayıf yapıdaki dişlerin oluşturulan monoblok sayesinde güçlendirilmesi amaçlanmaktadır (25).

Dördüncü nesilde asit, primer ve rezin içeren pat tek bir formülde birleştirilmiştir. Böylece işlem süresi kısaltılmak istenmektedir ve işlemlerin arasında meydana gelebilecek hataların önlenmesi amaçlanmaktadır. MetaSEAL, Hybrid Bond SEAL, Real Seal bu gruba örnektir (18).

Poliketon (Polivinil) Rezin İçerikli Patlar

Bu patların en bilineni Diaket'tir. 1952 yılında piyasaya sürülen pat ince yapıdaki toz ve koyu kıvamlı likitten oluşmaktadır. Diaket keton yapıda kanal dolgu patı olup, yapısındaki tuz ve metal oksitlerin nötral organik yapılarla tepkimesi sonucunda poliketonlar oluşmaktadır. Toz, likit ve eritici olmak üzere 3 bölümden oluşur. Eritici bölüm kuvvetli antiseptik özellik gösterir ve hem kanal irrigasyonunda hem de gerektiğinde kanalda diaketin boşaltılmasında kullanılmaktadır. Karıştırıldıktan sonra oldukça yapışkan olan bu rezin pat dişe oldukça güçlü adezyon sağlar. Cam üzerinde karıştırıldığında 7 dakikada donar, kök kanalında ise daha kısa sürede sertleşir. Bu klinik kullanımda önemli bir dezavantajdır (25).

Silikon Esaslı Rezin patlar

Lee EndoFill, RoekoSeal, Gutaflow ve Gutaflow 2 bu gruba örnektir.

Lee EndoFill enjekte edilebilen silikon rezin esaslı bir pattır. Guta perka ile veya tek başına uygulanabilir. Formülünde hidroksil sonlanan polisiloksan, bizmut sülfat, silikon yağı, tetraetil ertosilikat, debutil kalay dilaürat, FD-C boyası bulunmaktadır. Düşük sitotoksiste göstermektedir (25).

RoekoSeal'in formülünde polimetilsiloksan, silikon yağı, zirkonyum dioksit, parafin bazlı yağ ve platin katalizör bulunmaktadır (25).

GuttaFlow ve GuttaFlow2 toz haline getirilmiş soğuk akışkan bir dolgu sistemidir. RoekoSeal'a eklenen partikül formundaki guta perkadan oluşmaktadır. Teknik malzemenin kanal içine enjeksiyonunu ve ardından tek bir ana konun yerleştirilmesini içerir. Sızdırmazlığı ile ilgili yapılan çalışmalar diğer tekniklerle karşılaştırılabilir ve daha düşük olduğunu söylemişlerdir (25).

2.1.2.4. Cam İyonomer Esaslı Patlar

Cam iyonomer esaslı patlar dentine kimyasal bağlanma özellikleri nedeniyle kanal dolgusunda kullanılmak üzere geliştirilmişlerdir. Cam iyonomerlerin diş dokularına olan adezyonu birincil olarak kimyasal bağlanma, ikincil olarak mikromekanik bağlanmadır (51, 52). Biyouyumlu olmaları, flor salınımı yapmaları ve antibakteriyel etkinliklerinin olması diğer avantajları arasında yer almaktadır (53). Ancak retreatment işlemi esnasında sökülme zorluğu ve rutin kullanılan çözücülerde çözülmemesi en önemli dezavantajıdır. Ayrıca neme karşı hassas olması nedeniyle sızıntı meydana getirmesi patın kullanımını azaltmıştır (54, 55).

Başlıca cam iyonomer içerikli kök kanal patları Ketac-Endo, Chembond, Vitrabond, ASPA, Fuji iyonmer, Activ GP ve Endion'dur.

2.1.2.5. Biyoseramik Esaslı Patlar

Biyoseramikler, özellikle tıp ve diş hekimliği alanında kullanım için tasarlanmış seramik malzemelerdir. Alümina, zirkonya, biyoaktif cam, cam seramikleri, hidroksiapatit ve kalsiyum fosfatları içerirler. Biyoseramikler, çeşitli kimyasal işlemlerle hem in situ hem de in vivo olarak elde edilen biyolojik olarak uyumlu seramik bileşiklerdir. Biyoseramikler biyolojik hidroksiapatitle benzerliklerinden dolayı mükemmel biyouyumluluk özellikleri gösterirler. Biyoseramikler, hidrasyon işlemi sırasında, insan vücudunda rejeneratif yanıtı uyaran hidroksiapatit gibi farklı bileşikler üretirler. Kemik ile temas ettiğinde, kemik ara yüzeyinde mineral hidroksiapatit yapımına yol açan, osteokondüktif bir etkiye sahiptir. Bölgede kemik iyileşme süreci varsa, osteoindüktif maddeleri absorbe etme yeteneğiyle, intrinsek osteoindüktif etkisi vardır (9).

Biyoseramikler, biyouyumludurlar ve antibakteriyel özelliğe sahiptirler. Antibakteriyel özelliği materyalin sertleşmesinde sonra çökmesiyle meydana gelir ve bu

da bakteri sekestrasyonuna yol açar. Biyoseramikler, bakteri yapışmasını önleyen 1–3 nm çaplı nanokristallerden oluşurlar (56).

Biyoseramik esaslı patlar hidrofilik yapısıyla, dentin tübüllerinde bulunan suyu çekerek sertleşmektedir. Sertleşirken kan, dentin sıvısı, tükürük gibi oral sıvılardan etkilenmezler. Çalışma süreleri klinisyen için idealdir ve yeterli akıcılığa sahiptirler (57).

Kök dentinine bağlanan biyoseramik esaslı patların tam mekanizması bilinmemekle birlikte kalsiyum silikat esaslı sızdırmazlar için aşağıdaki mekanizmaların olabileceğini düşünölmüştür (58):

1-Partiköllerin mekanik kilitlenme mekanizmasıyla dentin tüböllerine (tüböler difüzyon) difüzyonu gerçekleştir.

2-Yüksek alkalen içerikli pat ile kollajen liflerin denatüre olmasından sonra bir mineral infiltrasyon tabakası oluşur. Bu tabaka patın mineral içeriğinin intertüböler dentine infiltrasyonu sonucu oluşmaktadır.

3- Nemli dentin tabakasında gözlenen kalsiyum silikat hidrojel ve kalsiyum hidroksitin fosfat ile parsiyel reaksiyona girmesinden dolayı mineral infiltrasyon tabakasında hidroksiapatit oluşumu gözlenir.

Biyoseramik esaslı patlar içeriklerine göre iki grupta incelenmektedir:

Kalsiyum-silikat-fosfat içerenler

Bu patlar zirkonyum oksit, kalsiyum silikat, kalsiyum fosfat, kalsiyum hidroksit, hidroksiapatit doldurucu ve sertleştirici maddeler içermektedirler. Büzüşme göstermeyen, biyolojik ortamlarda kimyasal olarak stabil olan, canlı doku temasında iltihabi ileri tepki uyandırmayan, toksisitesi az olan materyallerdir. Materyaller hidroksiapatit oluşturmakta ve dentin ile dolgu maddeleri arasında bağlanmayı artırabilmektedir. Kanal dolgusu sonrası sertlikleri artmakta, donma sırasında yüksek pH göstermekte ve böylece antibakteriyel etki sağlamaktadır ve örtücölük nitelikleri iyidir (25).

iRoot SP,Bioseal, EndoSequence BC Sealer, Capseal, Smartpaste Bio, Sankin Appetite, GenereX A ve TotalFill BC Sealer bu grupta yer almaktadır.

MTA içerenler

MTA tozunda; trikalsiyum silikat, dikalsiyum silikat, trikalsiyum alüminat, bizmut oksit, kalsiyum sülfat hidrattır. Likidinde ise suda çözöünebilen bir polimer

bulunmaktadır. MTA; yüksek pH'a sahiptir, biyoyumludur, düşük çözünürlüğü vardır ve sızdırmazlık özelliği iyidir. Trikalsiyum silikat içeren MTA'nın çeşitli cerrahi uygulamalarda ve vital pulpa tedavilerindeki başarısı endodontide kök kanal dolgu patı olarak da kullanılmasını cazip kılmıştır. MTA bazlı kök kanal dolgu patları yakın zamanda kullanıma sunulmuştur (59).

ProRoot EndoSealer, MTA Obtura, Endo CPM Sealer, DiaRoot Bioaggrete ve MTA-Fillapex bu grupta yer almaktadır.

2.2. Dental Materyallerin Biyoyumluluk Özellikleri

2.2.1. Biyoyumluluk ve Sitotoksosite

Biyoyumluluk; bir materyalin canlı dokular ile temas halinde iken lokal veya sistemik toksisite, alerji, mutajenik ve karsijenik etki oluşturmeyen inert özelliklere sahip olması ve uygulandığı bölgede uygun biyolojik cevap oluşturabilmesi durumudur (60, 61). Biyoyumlu olmayan materyallere karşı oluşan olumsuz doku reaksiyonları 'toksisite' olarak değerlendirilmektedir.

Kök kanal tedavisi sırasında periradiküler dokular, apikal foramen aracılığıyla ekstrüze olan endodontik kanal dolgu maddeleriyle temas edebilir (62). Endodontide kullanılan dolgu materyalleri canlı dokularla ilişkili olup bu materyallere karşı gelişecek doku cevabı oldukça önemlidir (63). Kök kanal dolgu patları periapikal dokularla uzun süreler boyunca direkt veya yakın temasta bulunduklarında, toksik ürünleri, periradiküler hücre popülasyonunun proliferasyon kapasitesini inhibe ederek periapikal iyileşme sürecini engelleyebilirler (64, 65, 66). Bu nedenle iyi fiziksel ve kimyasal özellikler dışında endodontik materyaller biyolojik olarak da uyumlu olmalıdır (67, 68, 69). Birçok parametre genotoksosite, mutajenite, karsinojenisite, histoyumluluk ve immunolojik etkiler gibi endodontik materyallerin biyoyumluluğunu karakterize eder. Birçok çalışma endodontik materyallerin sitotoksitesine odaklanmıştır.

Toksik reaksiyona ve doku nekrozuna neden olabilecek kanal dolgu patları doku iyileşmesine engel olduğu gibi endodontik tedavinin başarısını da etkileyecektir (63, 70). Endodontik tedavide kullanılan materyallerin periapikal dokular tarafından iyi tolere edilebilen, biyolojik dokular üzerinde toksik etkisi bulunmayan ve iyileşmeyi uyarabilecek özelliklere sahip biyoyumlu materyaller olması istenmektedir (25, 65).

2.2.2. Dental Materyallerinin Biyouyumluluk Değerlendirmeleri

Dental materyallerinin biyouyumluluklarının insan üzerinde kullanıma uygun olup olmadığının tespiti için çeşitli testler yapılmaktadır. Materyaller klinik uygulamaya geçmeden önce, materyalin oral dokular üzerine olası zararlı etkileri, ilk başta hücre kültürü gibi in vitro testler ile incelenmekte, değerlendirmelere hayvan testleri ile devam edilmektedir. Bu testlerden istenilen sonuçlar elde edildiğinde klinik kullanım test çalışmaları yapılmaktadır (71).

ISO testlerin belirli standartlarda yapılması amacıyla diş hekimliğinde kullanılan tıbbi materyallerin biyouyumluluğunun değerlendirilmesi için ISO 7405 dökümanını sunmuştur. Bu dökümanda geçen testlere ek olarak ISO 10993-5 standartları da in vitro sitotoksite testleri için önerilen genel bir test protokolüdür (72).

ISO standartlarına göre (73) biyouyumluluk testleri üç aşamada yapılmalıdır. Bunlar;

İn vitro deneyler (birincil veya eleme testleri)

İn vivo hayvan deneyleri (ikincil testler)

Klinik çalışmalar olmak üzere üç basamakta yürütülmektedir.

Uygulanan testlerin avantaj ve dezavantajları tabloda gösterilmiştir (74).

Tablo 2-1: Biyouyumluluk testlerinin avantaj ve dezavantajları

Test	Avantaj	Dezavantaj
İn vitro	Hızlı uygulama Ucuz Standardize edilebilir Deney ortamının kontrolü kolaydır Geniş bir skalada değerlendirme yapılır	İn vivo ortamla ilişkisi tartışmalıdır
Hayvan Testleri	Karmaşık sistemik etkileşimler tespit edilebilir	Kullanılan materyalle ilişkisi tartışmalıdır Pahalı

	İn vitro testlere göre daha geniş kapsamlı ve daha gerçekçidir	Etik açıdan tartışmalıdır Kontrolü zor Sonuçların değerlendirilmesi zor
Kullanım Testleri	Kullanılan materyalin dokularla ilişkisi belirlenir	Çok pahalıdır Daha fazla zaman Etik açıdan daha fazla tartışmalıdır Kontrolü zor olabilir Sonuçların değerlendirilmesi zordur

2.2.2.1. İn vitro Testler

Yeni bir materyalin biyouyumlu olup olmadığını değerlendirmek amacıyla ilk geliştirilen test yöntemi in vitro deneylerdir. Biyouyumluluğun değerlendirilmesindeki in vitro testler test tüpü içinde, hücre kültür kabında veya canlı mikroorganizmada uygulanır. Dental materyallerin in vitro olarak sitotoksitesini belirlemede en yaygın kullanılan biyolojik sistemler hücre kültürleridir. Bu testler test edilecek materyalin hücre, enzim ya da diğer biyolojik sistemlerle temasıyla gerçekleştirilir. Test edilecek malzemenin, hücre kültür ortamında hücre sayısı, büyüme oranı, morfolojik özellikleri, metabolik fonksiyonları kontrol grupları ile karşılaştırılarak değerlendirilir. Deneyler arada herhangi bir bariyer olmaksızın materyalin hücre ile direkt temasıyla ya da materyal ile hücre arasında küçük bir bariyer yerleştirilmesiyle indirekt şekilde uygulanabilir (74, 75).

İn vitro testlerin avantajları şu şekilde sıralanabilir (75, 76, 77):

- Uygulaması hızlıdır.
- Testler çabuk sonlanır, kısa sürede sonuç verir.
- Genellikle hayvan veya klinik kullanım testlerine göre maliyetleri düşüktür.
- Deneyin kontrolü kolaylıkla yapılabilir.
- Geniş kapsamlı araştırma yapılabilir.

-Ayrıca bu testler hayvanların ve insanların test için kullanımını sınırlayan etik ve yasal sorunlardan uzaktır.

Bütün bu avantajlarının yanında in vitro testler organizma dışında gerçekleştirildiğinden materyale karşı gelişen biyolojik cevap hakkında net veriler elde edilememektedir (74, 78).

2.2.2.2. İn vivo Testler

Bu testlerde genellikle memeli hayvanlar kullanılır. Test edilecek materyal fare, rat, koyun, kedi, köpek, maymun gibi deney hayvanlarına implant edilmektedir ve materyalle biyolojik ortam arasında oluşabilecek ilişkilerin gözlemlenmesi amaçlanır. Elde edilen veriler in vitro testlere göre daha kapsamlı ve uygundur. Ancak in vivo testlerde değişkenlerin kontrolü daha zordur ve biyolojik cevabın karmaşık yollarla oluşması, elde edilen sonuçların kantitatif olarak değerlendirilmesini zorlaştırmaktadır. Etik tartışmaları ve hayvan hakları gibi meselelerin önem kazanması bu testlerin kullanılmasını giderek azaltmaktadır. Bu testlerin bir diğer dezavantajı zaman alıcı ve pahalı olmalarıdır. Ayrıca hayvanlardaki cevabın insandaki cevaba benzerliği konusunda şüpheler bulunmaktadır. Bu testler kemik implantasyon testi, ağız mukozası membran testi, sensitizasyon testi, subkütanöz implantasyon testlerini içermektedir (74, 78, 79).

Klinik Kullanım Testleri

Köpek, maymun gibi büyük hayvanlar ve gönüllü insanlar üzerinde yapılan kullanım testlerinde; materyalin klinik kullanımı, her açıdan taklit edilerek değerlendirme yapılmaktadır. Dental materyallerin insanlar üzerindeki alerjik potansiyellerinin belirlenmesinde patch testi, prick testi ve radioallergosorbent testi gibi testler uygulanmaktadır. İnsanlar üzerinde kullanım testlerinin yapılması test materyalinin biyouyumluluk değerlendirmesinde klinik deney aşamasıdır (74, 76, 80).

2.2.3. Hücre Kültürü

Hücre kültürünün temel ilkesi, canlı dokulardan mekanik, enzimatik veya spontan migrasyon ile alınan parçaların in vitro koşullarda yaşatılması ve üremelerinin devam ettirilmesidir. Falcon, flask, petri gibi laboratuvar gereçlerinde kültür vasatı veya medyumu denilen, içerisinde; tuzlar, tampon maddeleri, amino asitler, vitaminler, dana veya at serumu barındıran besleyici uygun sıvıların içinde üretilirler. Bu amaçla çeşitli canlıların (insan, fare, tavşan, maymun gibi) çeşitli dokuları (böbrek, akciğer, tümör, diş

pulpası, amniyon zarları) önce parçalanarak tek tek hücrelere ayrılırlar ve kültür vasatıyla birlikte steril kaplara konurlar. Bu hücre süspansiyonu %5 karbondioksit (CO₂) içeren 37°C ortamda bekletildiğinde hücreler kabın çeperine yapışarak üremeye başlarlar. Bu üreme sonucunda oluşan yapıya hücre kültürü denilmektedir (81).

Hücre kültürlerinin kullanılmasının avantajları (79, 82):

- Tekrarlanabilir olması,
- Kısa süreli etkileşimlerin değerlendirilmesinde kullanışlı olması,
- Sitotoksik tepkimeleri belirleyen kimyasal ajanların az miktarda kullanılması ve hücre üzerinde etkilerinin direkt olarak gözlenerek standart ölçümler yapılabilmesi,
- Medyum içerisindeki bileşiklerin, nem, pH, ısı, oksijen osmotik basınç ve karbondioksit miktarının kontrol altında tutulabilmesidir.

Avantajlarının yanı sıra;

- Bakteriyel ve kimyasal kontaminasyonların etkileyemeyeceği steril bir ortam oluşturma zorluğu,
- Deneyin tek tip hücre türü ile yapılması nedeniyle tek bir deney ile materyal ve organizmada farklı hücre türleri arasındaki etkileşim hakkında bilgi edinmedeki zorluklar da göz önünde bulundurulmalıdır (79, 82).

Hücre kültürü çalışmalarında primer hücre ve sürekli/devamlı hücre hatları olmak üzere iki tip hücre kullanılır. Primer hücre kültürleri doku ve organlardan ayrılan hücrelerin 24 saatten daha uzun süre kültür edilmesiyle elde edilir. Primer hücre kültürlerinde çoğalan hücreler buradan alınıp başka kültürlerle ekilebilir ve çoğaltılabilir. Bu şekilde elde edilen ilk alt kültürlerle sekonder hücre kültürleri denir ve bir seri kültür işlemlerinden sonra hücre hatları elde edilir (74, 83, 84).

Primer hücre hatlarının en önemli avantajı verici dokunun fizyolojik durumunu yansıtması, genotip ve fenotipinin verici dokuyla aynı özellikler göstermesidir. Ancak farklı bireylerden alındığı için fonksiyonel durumları yansıtması farklıdır ve üretilmesinin pahalı olması, kültüre etmenin uzun sürmesi, yaşam sürelerinin kısa olması primer hücrelerin dezavantajlarındandır. Ayrıca primer hücre hatlarının çoğalma süreleri kısıtlıdır ve çoğalma süresi hücrelerin elde edildiği kaynağın tipine ve yaşına ve diğer bilinmeyen etkenlere bağlı olarak değişkenlik göstermektedir (85). Biyouyumluluk

değerlendirme çalışmalarında primer hücre hatları alındığı doku ile benzer özellikler göstermesi bakımından sürekli hücre hatlarına göre daha ideal gözükmektedir (77).

Devamlı hücre hatlarının süresiz çoğalabilme özelliği bulunmaktadır ve kolaylıkla çoğaltılabilir. Primer hücre hatlarına kıyasla daha stabil bir fenotipe sahiplerdir. Ancak transformasyona uğradıkları için in vivo özelliklerinin tümünü koruyamamaktadır. Çalışmalarda sıklıkla kullanılan devamlı hücre hatlarından bazıları şunlardır: fare fibroblastları (L-929, 3T3) veya insan epitelyal hücreleri, insan ve hayvan pulpa hücreleri, osteoblast benzeri hücre, insan THP-1 monositleri ile immortalize fare odontoblast hücre hatlarıdır (74, 81, 85).

2.2.3.1. Periradiküler Dokular için Hücre Kültürü Çeşitleri

Pulpa ve periapikal dokular birbirlerinin devamı halindedir (91). Diş kökünü çevreleyen periodontal dokular sement, periodontal ligament ve alveolar kemikten oluşmaktadır. Pulpa yoluyla meydana gelen bir iltihap, enfeksiyon periradiküler dokularla direkt olarak ilişkilidir (1).

İnsan Periodontal Ligament Fibroblast Hücreleri (HPDLF): Periodontal ligament alveolar kemik ve sement arasında bağlantı oluşturan periradiküler dokuda bulunan yapıdır. Diş eti bağ dokusu ile devamlılık gösterir ve kemikteki vasküler kanallardan kemik iliği boşlukları ile iletişim kurar. Periodontal ligament, lif, kan damarları ve sinirler gibi diğer yapısal elemanları barındırır. Periodontal ligamentte fibroblast, makrofaj, mast hücreleri, nötrofiller, lenfositler, plazma hücreleri, malessez epitel hücreleri gibi hücresel elemanlar yer almaktadır. Fibroblastlar periodontal ligament dokusunda en çok bulunan hücrelerdir. Fibroblastın ana görevi kollajen lif sentezi ve hücrelerarası ana maddenin sentezidir (1). İnsan periodontal ligament fibroblast hücreleri kültür ortamında bipolar, birbirine paralel iğ şeklinde görülmektedir (87).

Araştırmacılar periodontal ligament kök hücresinde bulunan mezenkimal kök hücre markırlarını araştırmışlar farklı markırların bu hücreler üzerinde pozitif ve negatif ekspresyonlarını bildirmişlerdir.

Seo ve ark. ilk olarak, kemik iliği stromal hücreleri ve dental pulpa kök hücreleri üzerinde bulunan iki erken mezenkimal kök hücre markırı olan STRO-1 ve CD146/MUC18 hücre yüzey moleküllerinin PDL kök hücrelerinde de pozitif ekspresyon gösterdiğini bildirmişlerdir. Ek olarak stromal hücrelerle ilişkili olan markırlardan CD44,

stromal hücreler ve endotelyal hücrelerle ilişkili markılardan CD90, CD105 ve CD166'nında pozitif ekspresyon gösterdiğini bildirmişlerdir (88).

Trubiani ve ark. CD10, CD26, CD29, CD73 ve CD349/FZD9 gibi mezenkimal kök hücre markırlarının PDL kök hücrelerinde yüksek ekspresyonunu göstermişlerdir (89).

PDL kök hücrelerinde hematopoetik belirteçler olan; CD34 (ilkel hematopoetik progenitör markır), CD14 (monosit/makrofaj marker) ve CD19 (B hücre marker) negatif ekspresyon göstermiştir (90).

Hematopoetik belirteçlerin yokluğunun, mezenkimal hücrelerin tanımlanması için gerekli olduğu bilinmektedir. Bununla birlikte, PDL mezenkimal kök hücrelerin tanımlanması için spesifik belirteçler henüz keşfedilmemiştir ve bu sebeple PDL kök hücrelerinin kesin izolasyon ve karakterizasyonlarını sınırlandırmaktadır.

Pulpa ve periapikal dokular birbirinin devamı halindedir. Periapikal alanda oluşan iltihabı olay çevre dokulara kolayca yayılmaktadır (91). Dental materyallerin biyouyumluluklarının değerlendirildiği çalışmalarda hedefe yönelik hücre hatları kullanılması gerekliliği söz konusudur. HPDLF kök kanal pulpa dokusu ile devamlılık göstermesi nedeniyle kök kanal dolgu maddelerinin sitotoksitelerinin değerlendirildiği hücre kültürü çalışmalarında tercih edilen hücre gruplarındandır.

2.2.4. İn vitro Sitotoksite Testleri

Sitotoksite; Herhangi bir materyal ya da ajana karşı hücresel düzeyde meydana gelen hasardır. Bu hasar hücrenin yapı ve fonksiyonlarını bozmak suretiyle moleküler olayların makromoleküler sentezi engellemesi olarak ifade edilmektedir. Sitotoksite, incelenen maddenin dozuna ve maruziyet süresine bağlı olarak hücrelere değişik derecelerde zarar veren bir olaydır.

Hücreler sitotoksik etkiye maruz kaldığı takdirde nekroz, apoptoz veya otofaji gibi olaylar sonucu ölebilirler, sitostazis nedeniyle proliferasyon özelliklerini kaybedebilirler veya hücrede proenflamatuar medyatörlerin salınması gibi değişiklikler gözlemlenebilir (92).

Sitotoksite testlerinde sıklıkla hücre kültürleri kullanılarak olası toksikolojik reaksiyonlar in vitro olarak değerlendirilmektedir. Sitotoksite testleri;

- Hücre canlılığı ve ölümü
- Hücre membranı
- Hücre organelleri
- Protein veya deoksiribo nükleik asit (DNA) sentezi
- Hücre bölünmesi ile ilgili detaylı bilgiler verir.

İn vitro sitotoksosite testlerinin hedefi; uygulanan materyalin hücre veya dokuda meydana getirdiği reaksiyonları laboratuvar ortamında gözlemlemektir. İn vitro sitotoksosite deneylerinde test edilecek ajanın fiziksel özelliği ve materyalin hücreler ile temas yöntemi önem taşımaktadır. Hücre kültürü çalışmalarında hücre ile materyalin teması direkt, indirekt ya da ekstrakt yolu ile gerçekleştirilmektedir (93).

Testlerin bazı standartlarda gerçekleştirilmesi için ISO bazı kriterler belirtmiştir. İn vitro sitotoksosite değerlendirmelerinde ISO 10993-5 standartlarında bulunan test metotları ile birlikte önerilen test metotları şunlardır: Direkt hücre kültürü, agar difüzyon testi, filtre difüzyon testi, dentin bariyer testi ve bariyer test metodudur (72, 74, 92).

2.2.4.1. Direkt hücre kültürü

Direkt temas testi materyal veya bileşenlerinin direkt kültürdeki hücrelerin üzerine kısa sürelerde (> 24 saat) uygulanmasıdır. Direkt temas testinde materyal hücreler ile veya kültür vasatı ile fiziksel temas halindedir. Suda çözünabilen materyaller kültür vasatı içerisinde de iyi çözünecekleri için materyal ve hücreler arasında çok iyi temas sağlanmış olur. (94, 95 Moharamzadeh ve ark. 2009, Polyzois 1994). Şayet materyalin yapısı hidrofobik ise ve kültür vasatında çözünemiyorsa materyal hücrelere mümkün olduğunca yakın temasta olacak şekilde yerleştirilmelidir veya hücrelerin tam üzerine uygulanmalıdır. Hidrofobik yapıdaki materyaller için materyalin kültür kabına yerleştirilip hücre süspansiyonun materyal üzerine uygulanması veya hücrelerin materyal üzerinde kültür edilmesi de bir seçenektir (72).

2.2.4.2. Ekstrakt yolu ile temas testi

Ekstrakt yolu ile temas testi yönteminde materyal sıvı bir çözücü içerisinde bekletildikten sonra, materyalden çözünen bileşenler hücreler ile temas ettirilir ve sitotoksitesi incelenir. Materyalden çözünen bileşenlerin sıvı ile oluşturduğu bu süspansiyon “ekstraksiyon sıvısı” olarak adlandırılmaktadır. Çözücü olarak serum

içermeyen vasat, serum içeren vasat, fizyolojik tuz solüsyonu veya diğer uygun çözücüler kullanılabilir (72, 92).

Materyalin toksik özelliklerinin doğru bir şekilde belirlenebilmesi için; ekstraksiyon sıvısı klinik kullanım ortamını taklit etmeli ve materyalin kimyasal yapısında önemli değişiklik meydana getirmemelidir. Ekstrakt içindeki materyalin konsantrasyonu ve hücrelere temas edecek materyalden salınan bileşenlerin oranı; ekstraktı alınan materyalin kimyasal çözülebilirliğine, difüzyon oranına, pH'sına, yüzey alanına, osmolaritesine, ısıya, zamana, ekstraksiyon sıvısının hacmine ve diğer faktörlere bağlıdır (74, 92, 96).

2.2.4.3. Agar Difüzyon Testi

Agar difüzyon yöntemi, toksisite değerlendirmelerinde en uzun süredir kullanılan test yöntemidir. Bu yöntemde hücrelerin üzeri agar ile örtülür ve test materyali de agarın üzerine yerleştirilir. 24 saat inkübasyon süresinin sonunda nötral kırmızı boyanın, hücre membranının geçirgenliğine bağlı olarak, lizozomlarda birikme miktarına bakılarak hücre aktivitesi değerlendirilir. Hücrelerdeki liziz ve dekolorizasyon değerlendirilerek materyalin hücrede geliştirdiği yanıt incelenir (92, 97).

2.2.4.4. Filtre Difüzyon Testi

Filtre difüzyon metodunda filtre olarak selüloz asetat kullanılır. Selüloz asetat filtresinin bir tarafına primer hücreler diğer tarafına ise test materyali yerleştirilir. Hücre üzerinde meydana gelen materyalin sitotoksik etkisinin görülebilmesi için bileşenlerin 0.45 µm filtreden difüze olabilmesi gerekir. Hücrede meydana gelen hasarın dekolorizasyon alanının ölçülmesi ile ya da boyanma yoğunluğunun incelenmesi ile tespit edilmesi esasına dayanır (74, 77, 92, 98).

2.2.4.5. Dentin Bariyer Testi

Bu yöntemde sitotoksitenin değerlendirilmesi amacıyla bariyer olarak dentin diskleri kullanılmaktadır. Outhwaite ve ark. bölümlü oda (split chamber) mekanizmasını geliştirmişler ve dentinin geçirgenlik özelliğini incelemişlerdir (99). Materyalin biyolojik uyumluluğun değerlendirilmesinde dentinin geçirgenlik özelliğinden faydalanılması fikrini ortaya atmışlardır. Deneylerde insan dentini kullanılması her ne kadar in vivo dokuyu taklit etmesi açısından avantajlı gözükse de geçirgenlik özelliklerinin farklı olması ve elde edilmesinin zor olması dezavantajdır (100). Elde edilmesinin kısmen daha

kolay olması ve insan dentinine göre geçirgenlik bakımından daha az farklılık göstermesi gibi standardizasyonu kolaylaştırıcı özellikler bu yöntemde sığır dentini kullanımını avantajlı kılmaktadır (101).

2.2.4.6. Bariyer test metodu

Klinikte kullanılan bazı materyaller dişte açılan kaviteye yerleştirildiği zaman pulpa ile direkt temasları yoktur fakat dentin kanallarının geçirgenliği aracılığı ile etki mekanizmalarını gösterirler. Bu amaçla son yıllarda dentinin geçirgenliği taklit eden ve bileşenlerin difüzyonuna izin veren insert bariyer sistemleri geliştirilmiştir. Bu yöntemde materyal, bariyer görevi gören insert içine yerleştirilir ve asılı şekilde kültür vasatı içinde tutulur. Materyalden salınan bileşenler insertin alt kısmındaki pöröz membrandan geçip kültür vasatının dibinde çökmüş bulunan hücrelere temas eder (92, 102).

2.2.5. Çalışmada Yer Alan Sitotoksisite Değerlendirme Yöntemleri

2.2.5.1. MTT Testi

Hücre canlılığın belirlenmesi amacıyla uygulanan kolorimetrik bir sitotoksisite testi olup asıl amacı kalan canlı hücrelerin sayısının belirlenmesidir. Hücre sayımının belirlenmesinde tripan mavisi ile boyama sonrası toma lamında mikroskop ile ya da elektronik sayaçla sayım yapılması çok kullanılan metotlardan biridir. Ancak bu metotlarda çok sayıda örneğin bulunduğu mikropateler için sayılma zorluğu bulunmaktadır. Bu nedenle MTT testi gibi sayımın dijital ortamda gerçekleştirildiği yöntem çok fazla tercih edilir olmuştur (103).

MTT pozitif yüklü bir tetrazolyum tuzudur. MTT ökaryotik hücre membranını geçerek mitokondride süksinat dehidrogenaz enzimi ile formazan bileşiğine indirgenir. MTT bileşiği sarı renklidir, oluşan formazan ise mor renkli olup suda çözünmemektedir ve absorbansın ölçülmesi için uygun bir çözücüde çözündürülmesi gerekmektedir. Bazı araştırmacılar tarafından MTT testinde oluşan formazanı çözdürmek için dimetil sülfoksit (DMSO) kullanımının uygun olduğu ortaya konulmuştur. MTT testindeki mekanizmada yalnızca canlı hücrelerin aktif mitokondrisi tetrazolyum halkasını kırarak formazan bileşiğine dönüştürmektedir. Ve böylece meydana gelen renk değişikliği yalnızca canlı hücreler tarafından meydana gelir. Ölü hücreler tetrazolyum bileşiklerini indirgeme yeteneğine sahip olmadıkları için renk değişimine neden olmamaktadır (104, 105, 106, 107).

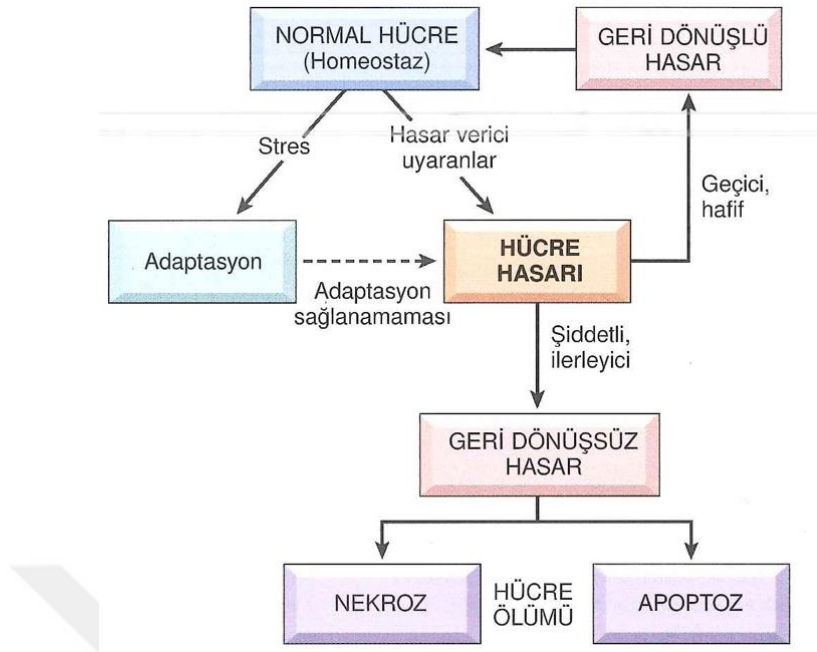
MTT testi üç aşamada gerçekleşmektedir: İlk aşamada hücreler toksisitesi test edilecek maddeye maruz bırakılırlar. İkinci aşamada toksik madde uzaklaştırılır ve vasata MTT bileşiği eklenir ve indirgenme reaksiyonlarının gerçekleşmesi için 1-4 saat inkübe edilir. Ardından meydana gelen değişiklikler spektrofotometre (Şekil3-14) yardımıyla ölçülerek canlı/ölü hücrelerin sayısı belirlenir (107).

2.2.5.2. TUNEL Testi

TUNEL apoptotik hücre çekirdeklerinin boyanması esasına dayanan bir immunohistokimyasal yöntemdir. TUNEL yönteminde görülen tepkime oldukça nettir ve yalnızca apoptozise uğramış hücre çekirdekleri boyanır. Apoptoz esnasında meydana gelen DNA kırıklarının in situ olarak tespit edilmesini sağlar (108).

2.3. Hücre Hasarı

Hücreler, yapı ve fonksiyonlarını değişen ihtiyaçlara ve hücre dışı streslere göre sürekli ayarlayarak, çevrelerine aktif şekilde katkıda bulunur. Normalde hücreler, içlerindeki ortamın, oldukça dar fizyolojik sınırlar içerisinde tutulduğu, homeostaz adı verilen, kararlı bir denge durumunu devam ettirir. Fizyolojik streslerle veya patolojik uyaranlarla karşılaştıklarında bunlara uyum (adaptasyon) sağlayarak, canlılıklarını ve fonksiyonlarını korudukları yeni bir kararlı denge durumuna ulaşırlar. Uyum sağlama kapasitesi aşılar ya da dış stres hücreye doğrudan zarar verirse, hücre hasarı gelişir. Bu hasar belirli sınırlar içerisinde kalırsa, geri dönüşlü (reversibl) bir hasardır ve hücreler başlangıçtaki istikrarlı durumlarına tekrar döner. Ancak, stres şiddetliyse, uzun süre devam ederse veya hızlı başlamışsa, etkilediği hücreler geri dönüşsüz (irreversibl) şekilde hasar görür ve olay hücre ölümü ile sonuçlanır. Özel veya belli bir stres tipinin adaptasyonu mu başlatacağı, yoksa geri dönüşlü veya geri dönüşsüz hasara mı yol açacağı yalnızca stresin niteliğine değil, aynı zamanda hücre metabolizması, kanlanma ve beslenmesi gibi birçok değişkene bağlıdır. Adaptasyon hücre sayılarında artma, hücre sayısı ve fonksiyonlarında azalma veya hücre boyutunda artma şeklinde olabilir. Bu sayede hücreler canlılık ve fonksiyonlarını sürdürmektedirler (109, 110).



Şekil 2-1: Hücre Ölümü

Hücre hasarı; hücreler uyum sağlayamayacakları derecede ağır bir stresle karşılaştıklarında, intrensek hasar oluşturan etkenlere maruz kaldıklarında ya da kendi iç yapılarındaki anormallikler nedeniyle gerçekleşir. Hasar geri dönüşsüz döneme geçtiğinde hücre ölümü ile sonlanabilir (109, 110).

Geri dönüşlü hücre hasarı: Hasara yol açan uyarı, hasarın erken dönemlerinde ya da hafif formlarında ortadan kaldırılırsa, meydana gelen fonksiyonel ve morfolojik değişiklikler geri dönüşlüdür. Bu tür hücre hasarında hücre içinde oksijen seviyesi azalır, adenozin trifosfat (ATP) sentezi baskılanır ve iyon dengesinin bozulmasına bağlı olarak hücre içine su girer ve hücrenin şişmesine neden olur. Geri dönüşlü hücre zedelenmesinin başlıca iki morfolojik özelliği, hücre şişmesi ve yağlı değişikliklerdir. Bu dönemde önemli yapısal ve fonksiyonel anormallikler bulunsa bile ağır membran hasarı ve çekirdek dağılması gerçekleşmemiştir (109, 110).

Hücre Ölümü: Hasarın sürmesi ile zedelenme geri dönüşsüz duruma gelir; artık iyileşmesi mümkün olmayan hücre ölür. Mekanizmaları, morfolojileri, hastalıklardaki ve fizyolojik durumlardaki rolleri farklı olan iki tip hücre ölümü vardır: nekroz ve apoptoz (109).

Geri dönüşlü hasarın ne zaman geri dönüşsüz olacağını ve hücre ölümü yönünde ilerleyeceğini öngördüren olaylar henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Bunun klinik önemi

çok açıktır: Hücre ölümünü doğru biçimde öngörebileceğimiz moleküler ve biyokimyasal değişiklikleri saptayabilirsek, geri dönüşlü hücre hasarının geri dönüşsüz hücre hasarına dönmesini önleyecek stratejiler geliştirebiliriz (109).

Nekroz; hücre ölümünün, membran bütünlüğünün bozulması ve hücre içeriğinin dışarı sızması sonucu hücrelerin parçalanması ile ilişkili tipi olup; büyük ölçüde enzimlerin ölümcül derecede hasar görmüş hücre üzerindeki yıkıcı etkileri sonucu gerçekleşir. Dışarıya sızan hücre içeriği çoğu zaman, inflamasyon adı verilen, lokal konak reaksiyonuna yol açar. Bu reaksiyonun amacı, ölü hücreleri ortadan kaldırmak ve sonraki onarım sürecini başlatmaktır. Hücre sindirilmesinden sorumlu enzimler, ölmekte olan hücrenin bizzat kendisine ait lizozomlardan ve ölü hücrelere karşı gelişen inflamatuvar reaksiyonunun bir parçası olarak bölgede toplanan lökositlerin lizozomlarından kaynaklanabilir (109).

Nekroza uğrayan hücrelerde eozinofil artışı, hücre çekirdeğinin büzülmesi, parçalanması ve erimesi gerçekleşir. Plazma membranı ve organel membranları parçalanır. Hücre içeriği dışarı sızar ve enzimler tarafından sindirilir. Nekroz daima patolojik olaylar sonucu gerçekleşir (109).

Apoptoz; hücrenin kendi nükleer DNA'sının, nükleer ve sitoplazmik proteinlerinin yıkımına neden olacak enzimleri aktive etmesiyle gerçekleşen bir hücre ölüm çeşididir. İstenmeyen ve onarılması olanaksız şekilde hasar görmüş hücrelerin, mümkün olan en az doku reaksiyonu ile ortadan kaldırılmasını sağlayan ve belirli bir düzen altında gerçekleşen bir hücre ölüm mekanizmasıdır. Apoptotik hücre parçaları koparak, bu olaya verilen isimden (apoptoz, dağılma) sorumlu olan görüntüyü oluştururlar. Apoptotik hücrelerin plazma membranı sağlam kalır ama hücrelerin ve parçaların, fagositler için çekici bir hedef haline gelmesine yol açacak değişikliklere uğrar. Ölen hücre ve parçaları, hücre içeriğinin dışarı sızmasına zaman kalmadan, hızla ortadan kaldırıldığından apoptotik hücre ölümü konakta inflamatuvar yanıtı neden olmaz. Apoptotik hücre ölümüne hem fizyolojik hem de patolojik etkenler yol açabilir. Apoptoz ve nekroz bazen birlikte bulunabilir ve bazı patolojik uyarılar nedeniyle başlayan apoptoz, nekroz yönünde ilerleyebilir (109).

Apoptoz fizyolojik ve patolojik olmak üzere iki şekilde gerçekleşmektedir. Fizyolojik apoptoz yoluyla hücre ölümünde, artık gereksinim duyulmayan hücrelerin uzaklaştırılması ve dokuda çeşitli hücrelerin sabit sayıda kalmasını sağlamaya hizmet

eden, normal bir olay söz konusudur. Embriyogenez sırasında hücrelerin programlı bir şekilde yok edilmesi, hormona bağımlı dokuların hormon eksikliği durumunda involüsyonları gibi durumlar fizyolojik apoptoza örnek olarak gösterilir. Patolojik durumdaki apoptozda genetik olarak değişikliğe uğramış veya onarılamayacak derecede toksik etkiye maruz kalan hücrelerin ortadan kaldırılması söz konusudur. Patolojik apoptoz; Dna hasarı, hatalı katlanmış proteinlerin birikimi, belirli enfeksiyonlardaki hücre hasarı gibi birçok nedenle gerçekleşebilmektedir (109).

Apoptoz çok sayıda ve çeşitte mediatör tarafından düzenlenir. Bunlar arasında, bazı iyonlar (kalsiyum), moleküller (seramid), genler (c-myc), proteinler (p53) ve hatta organeller (mitokondri) bulunmaktadır (110).

Apoptoz kaspaz adı verilen enzimlerin aktivasyonu ile gerçekleşir. Kaspaz aktivasyonu, proapoptotik ve antiapoptotik proteinlerin üretim ve yıkımları arasındaki hassas bir dengeye bağlıdır. Kaspaz aktivasyonu ile sonuçlanan iki farklı yolak mevcuttur: mitokondriyal yolak ve ölüm reseptör yolağı. Birbirleriyle kesişebilmelerine rağmen bu iki yol genellikle farklı koşullar altında harekete geçen, farklı moleküllerin işe karıştığı ve fizyolojide ve hastalık durumunda farklı roller oynayan yolaklardır.

İntrensek yolak (mitokondri yolağı):

Bcl-2 mitokondri dış membranında bulunan üyelerinin bir kısmının apoptozu indüklediği bir kısmının ise inhibe ettiği geniş bir ailedir. Hücreler birçok nedenden dolayı patolojik durumla karşılaştığında Bcl-2 ailesinin proapoptotik üyelerini aktif duruma geçirebilirler. Bax ve Bak adı verilen proapoptotik üyeleri aktifleştğinde mitokondri membranına girer ve sitozole geçişe izin veren kanalcıklar açarlar. Mitokondriden sitozole açılan bu kanalcıklardan sitokrom c ve mitokondri proteinlerinin geçişi gerçekleşecektir. Bax ve Bak adı verilen bu iki pro-apoptotik üye aynı zamanda anti-apoptotik üyeleri inhibe ederek bu geçişi kolaylaştırırlar. Sitokrom c diğer bazı kofaktörlerle Kaspaz 9'u aktifleştirir. Aktif kaspaz-9 ise efektör kaspazlardan kaspaz 3'ü aktifleştirir. Aktifleşen efektör kaspaz olan kaspaz 3 ilgili proteinleri parçalayarak apoptotik hücre morfolojisinin meydana gelmesine sebep olurlar.

Ekstresek yolak:

Ölüm reseptörü yolağı kendi kendilerine karşı reaktif lenfositlerin ortadan kaldırılmasında ve hedef hücrelerin, sitotoksik T lenfositleri tarafından öldürülmesinde

rol oynamaktadır. Birçok hücrenin yüzeyinde, ölüm reseptörleri adı verilen ve apoptozu tetikleyen moleküller bulunmaktadır. Bunların büyük bölümü, tümör nekroz faktörü (TNF) reseptör ailesinin üyesidir. Tıp1 TNF reseptörü ve CD95 (Fas) ölüm reseptörlerinin prototipidir. T lenfositleri Fas taşıyan hedefleri tanıyınca Fas molekülleri ve FasL ile çapraz bağ yapar ve adaptör proteinlere bağlanırlar. Bu bağlanma bölgede kaspaz8 ve kaspaz 10 aktivasyonuna yol açar. Aktifleşmiş kaspaz-8 ve kaspaz-10 kaspaz3 ve diğer efektör kaspazları aktive ederek apoptotik hücre ölümünün gerçekleşmesine neden olur.

Apoptoz giden hücrelerde gelen morfolojik değişiklikler şunlardır (111):

- Yüzey organellerinin kaybı
- Hücre büzülmesi
- Kromatin yoğunlaşması
- Sitoplazmik baloncuklar ve apoptotik hücrelerin oluşması
- Apoptotik hücre ve cisimlerin fagositozu

Apoptoz ve hücre siklusu birbirleriyle kompleks ve yakın bir ilişki içinde çalışırlar. Hücre siklusu, çoğalmak (prolifere olmak) üzere uyarılmış bir hücrede gerçekleşen ve bir dizi geçici biyokimyasal aktivitelerin ve morfolojik değişikliklerin görüldüğü bir süreçtir. Bir siklusa giren hücre, morfolojik ve genetik olarak birbirine tıpa tıpa benzeyen iki hücre oluşumuyla döngüyü tamamlar. Hücre proliferasyonu hücre siklusu içinde yer alan bazı kontrol noktaları tarafından düzenli olarak kontrol edilir. Hücre siklusu proliferasyon, farklılaşma (diferansiyasyon) ve apoptoz gibi temel hücre fonksiyonları düzenlediğinden büyüme ve doku “turnover”ıyla yakın ilişki içinde bulunur. Apoptozda rol alan bir protein olan p53 aynı zamanda hücre siklusunu durduran ve hücreye DNA’sındaki hasarları onarması için zaman kazandıran bir işlev görür. Apoptoz organizmada proliferasyonla bir diğer anlamda hücre siklusuyla bir denge halinde birçok dokuda doğal olarak oluşur. Bu düzenleme özelliğinin olması organizmadaki hemen hemen her tür fizyolojik (örneğin doku homeostazisi) ve patolojik durumlarda hücre siklusunun ne denli kritik bir öneme sahip olduğunu göstermektedir (112).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmada kalsiyum hidroksit esaslı Sealapex ve Apexit Plus, epoksi rezin esaslı AH Plus, kalsiyum silikat esaslı biyoseramik esaslı TotalFill BC Sealer ve MTA içerikli biyoseramik esaslı MTA-Fillapex'in HPDLF hücrelerine sitotoksik ve apoptotik etkileri incelendi. Değerlendirmede; toplam hücre sayısı tayini MTT testi ile, apoptotik hücre oranı TUNEL boyaması ile incelendi. Çalışma; in vitro koşullarda gerçekleştirilen deneysel bir çalışma olup, deneyler Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda hücre ve doku kültürü laboratuvar imkanları kullanılarak gerçekleştirildi.

Bu çalışmada Yakın Doğu Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Pedodonti Anabilim Dalı'nda Aylin İslam tarafından Etik Kurul onayı alınmış çekim endikasyonu konmuş dişlerden elde edilen Manisa Celal Bayar Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda Prof. Dr. Seda Vatansever gözetiminde hazır -80°C dondurulmuş daha önce 2 kez pasajlanması yapılmış insan periodontal ligament fibroblast hücresi kullanıldı.

Bu çalışma için; İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Etik Kurulu'ndan onay alındı. (Dosya No:202)

3.1. Çalışmada Kullanılan Materyaller ve İçerikleri

3.1.1. Çalışmada Kullanılan Materyaller

Çalışmada kullanılan kök kanal dolgu materyalleri (Şekil 3-1)'de ve uygulama prosedürleri (Tablo 3.1)'de gösterilmektedir.

Tablo 3-1: Kök kanal dolgu maddeleri ve uygulama prosedürleri

Materyal	Uygulama Prosedürleri
Sealapex	Baz ve katalizör macun eşit oranda 15-20 saniye ya da tamamen karışana kadar karıştırılır.
Apexit Plus	Materyal şırıngadan sıkıldığında doğru oranda karışmış olarak kullanıma hazırdır.
AH Plus	Baz ve katalizör macun eşit oranda homojen olarak tamamen karışana kadar karıştırılır.
TotalFill BC Sealer	Materyal sıkıldığında kullanıma hazırdır.
MTA-Fillapex	Baz ve katalizör macun eşit oranda 15-20 saniye ya da tamamen karışana kadar karıştırılır.



Şekil 3-1: Kök kanal dolgu maddeleri; Sealapex (A), Apexit Plus (B), AH Plus (C), TotalFill BC Sealer (D), MTA-Fillapex (E)

3.1.2. Çalışmada Kullanılan Materyallerin İçerikleri

Çalışmada kullanılan kök kanal dolgu maddelerinin içeriği, üretim numarası ve üretici firmanın adı (Tablo 3-2)'de verilmiştir.

Tablo 3-2: Kök kanal dolgu maddelerinin içerikleri

Materyal	İçeriği	Üretim No	Üretici Firma
Sealapex	Kalsiyum oksit, trimetilol provan, Neopentil Glikol, salisilat ve izobütil salisilat	18432	SybronEndo
Apexit Plus	Kalsiyum tuzları (hidroksit, oksit, fosfat), Hidrojenize kolofoni, disalisiklat, bizmut tuzları, (oksit, karbonat), yüksek yayımlı silikon dioksit(silanize), fosforik asidin alkali esteri	595377	Ivoclar Vivadent
AH Plus	PASTE A Bisfenol-A epoksi resin, Bisfenol-F epoksi resin, Kalsiyum tungstate, Zirkonyum oksit, Silika, Demir Oksit pigmenti PASTE B Dibenzildiamin, Aminoadamantan, Trisiklodekan-diamin, Kalsiyum Tungstat, Zirkonyum oksit, Silika, Silikon yağı	60620110	Dentsply DeTrey, Konstanz, Almanya
TotalFill BC Sealer	Zirkonyum oksit, kalsiyum silikat, monobazik kalsiyum fosfat, kalsiyum hidroksit	5023102EU	Brasseler U.S.A Dental
MTA-Fillapex BC Sealer	PASTE A Salisilat resin, Bizmut Trioksit, Fumed silika PASTE B Fumed silika, Titanyum Dioksit, Mineral Trioksit Agregat (%40), Rezin baz	8288	Angelus, Londrina, Brezilya

3.2. Çalışmada Kullanılan Cihazlar, Aletler, Kimyasal ve Sarf Malzemeler

3.2.1. Cihaz ve Aletler

Buzdolabı (+4°C,-20°C (Bosch)

Su Banyosu (Nüve ST 402) (Şekil3-2)

Laminar Air Flow Hava Akış Kabini (ESCO AC2-4E8) (Şekil3-6)

İnkübatör (Esco CCL-170B-8, Nuair, Nu 5510E) (Şekil3-5)

Santrifüj Cihazı (Thermo Scientific 11210900) (Şekil3-3)

Derin dondurucu (-80°C)

Mikropipet Seti ve Pipet Tabancası (Şekil3-4)

İnvertet Mikroskobu (OlympusIX71)

Toma Lamı (Şekil 3-10)

Işık Mikroskobu (Olympus BX43)

Spektrofotometre Cihazı (Biotek ELX800UV) (Şekil 3-14)



Şekil 3-2: Su Banyosu (Nüve ST 402)



Şekil 3-3: Santrifüj Cihazı (Thermo Scientific 11210900)



Şekil 3-4: Mikropipet Seti



Şekil 3-5: İnkübatör (Esco CCL-170B-8, Nuair, Nu 5510E)



Şekil 3-6: Laminar Air Flow Hava Akış Kabini (ESCO AC2-4E8)

3.2.2. Kimyasal Malzemeler

Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM) (Capricorn Scientific, DMEM-HPXA Ebsdorfergrund, Almanya) (Şekil 3-9A)

Fötal bovin serumu (FBS) (Capricorn Scientific, FBS-12B, Ebsdorfergrund, Almanya) (Şekil3-9B)

L-Glutamin (Biochrom GmbH, K0283, Berlin, Almanya) (Şekil 3-9F)

Penicilin-Streptomisin (Biosera, XC-A4122, Nuaille, Fransa) (Şekil3-9D)

Gentamisin (Gibco, 15710-064, Grand Island, USA) (Şekil3-9G)

Amfoterisin B (Capricorn Scientific, AMP-B, Ebsdorfergrund, Almanya) (Şekil3-9)

Trypsin/EDTA (Sigma, T4049, USA) (Şekil3-9E)

Tripan Mavisi (Biological Industries, 03-102-1B, Kibbutz Beit-Haemek, İsrail) (Şekil 3-11)

Fosfat Tamponlu Salin (PBS) tablet (Bioshop, PBS404.100, Burlington, Ontario, Kanada) (Şekil 3-13D)

Formaldehit tozu (Merck, TP704404, Darmstadt, Almanya)

Triton X-100 (Applichem, A49750100, Darmstadt, Almanya)

%3 Hidrojen Peroksit (Merck, K31355100 303, Darmstadt, Almanya)

Bloklama Solüsyonu (Life technologies, 859043, Frederick, USA) (Şekil 3-13A)

Biotin-Sekonder antikör (Life technologies, 859043, Frederick, USA) (Şekil 3-13B)

HRP-Streptavidin (Life technologies, 859043, Frederick, USA) (Şekil 3-13C)

3,3'-Diaminobenzidine (DAB) kromojeni (Scytek, ACK125, West Logan, USA) (Şekil 3-13E)

Mayer's hematoksileni (Bio-Optica, 05-06002/L Milano, İtalya) (Şekil 3-13F)

Kapatma Vasatı (Spring Bioscience, DMM-125, Cambridge, USA)

Anti-CD34 primer antikörü (Santa Cruz Biotechnology, sc-74499, Teksas, USA) (Şekil 3-12A)

Anti-CD45 primer antikörü (Abcam, ab 10558, Cambridge, UK) (Şekil 3-12C)

Anti-CD90(Thy-1) primer antikörü (Santa Cruz Biotechnology, sc-53456, Teksas, USA) (Şekil 3-12D)

Anti-Kollajen1 primer antikörü (Millipore, 08-115, Darmstadt, Almanya) (Şekil 3-12B)

MTT kiti (Sigma, M5655, Darmstadt, Almanya)

Dimetil sülfoksit (DMSO) (Applichem, A3672, 0250, Darmstadt, Almanya)

TUNEL Kiti (Millipore, CA 92590, Darmstadt, Almanya)

3.2.3. Sarf Malzemeler

1. Serolojik pipet 10ml
2. Serolojik pipet 5ml
3. Serolojik pipet 2ml
4. Pipet ucu
5. Steril Petri Kabı
6. 6 gözlü kültür kabı
7. 8 gözlü kültür kabı
8. 24 gözlü kültür kabı
9. 96 gözlü kültür kabı
10. Falkon tüp
11. Flask
12. 0,2 mikron çaplı enjektör filtresi

3.3. Kök Kanal Dolgu Maddesi Ekstraktlarının Hazırlanması

Çalışmaya dahil edilen kök kanal dolgu patları ve içerikleri şekilde gösterilmektedir. Çalışmada kullanılacak pat ekstraktları daha önce Candeiro ve arkadaşlarının (113) kullandıkları yöntemle benzer şekilde hazırlandı. Kök kanal dolgu patları laminar akışlı kabin içinde aseptik koşullarda ve üretici firmanın talimatlarına uygun olarak hazırlandı (Şekil3-7). Çalışmaya dahil edilen patlardan Apexit Plus ve TotalFill BC Sealer direkt olarak uygulanırken Sealapex, AH Plus ve MTA-Fillapex steril petri kabı içinde karıştırılarak hazırlandı ve plaklara rahat yerleştirilmesi için 1ml'lik enjektörlerin içine dolduruldu.



Şekil 3-7: Deneylerde kullanılan kök kanal patlarının hazırlanışı

Kültür vasatı hazırlama ve pasajlama işlemlerinin tamamı laminar akım kültür kabininde (Şekil3-6) aseptik koşullarda gerçekleştirildi.



Şekil 3-9: Hücre kültüründe kullanılan malzemeler; DMEM (A), FBS (B), Amfoterisin B (C), Penisilin-Streptomisin (D), Tripsin/EDTA (E), L-Glutamin(F), Gentamisin (G)

3.5. HPDLF için Kültür Vasatı Hazırlama Uygulaması

DMEM

%10 FBS

%1 Penisilin/streptomisin

%1 L-glutamin

%1 Gentamisin

%0,4 Amfoterisin B

HPDLF hücre vasatı %10 FBS, %1 L-glutamine, %1 penisilin/streptomisin, %1 gentamisin, %0,4 amfoterisin-B ve DMEM bazal vasatı 50ml'lik falkon tüplere serolojik pipetler (Şekil3-4) yardımıyla elde edildi.

3.6. HPDLF Hücresinin Deney İçin Hazırlanması

HPDLF hücresi -80°C dondurucudan çıkarıldıktan sonra 37°C sıcaklığa ulaşması için su banyosunda bekletildi. Bu işlem hızlıca gerçekleştirildi. Hücre için daha önceden hazırlanan taze kültür vasatından 3 ml ayrı bir falkon tüpe alındı ve ardından 1/3 oranında olacak şekilde 1 ml HPDLF hücresi falkon tüpe eklendi. Serolojik pipet yardımıyla homojenize edildi. Hücrenin dondurulması sırasında kullanılan DMSO'nun hücreden uzaklaştırılması için 5dk 1000 rpm'de santrifüj işlemi gerçekleştirildi. Santrifüj sonucu pellet haline gelen ve dibe çöken hücre haricindeki supernatant serolojik pipet yardımıyla atıldı. Pellet bulunan falkon tüpe kullanılacak kültür kabının aldığı ideal vasat miktarı ilave edildi. Homojenize edildikten sonra serolojik pipet yardımıyla kültür kaplarına aktarıldı. İnkübasyonun tamamlanması için 37°C'de %5 CO₂ içeren inkübatör cihazına alındı.

3.7. HPDLF Hücresi İçin Kültür Vasatı Değiştirme ve Pasajlama Uygulaması

İnkübatör cihazında bekletilen hücreler 2 gün arayla mikroskopla incelenerek hücrelerin konfluentlik derecelerine göre vasat değiştirme veya pasajlama işlemi gerçekleştirildi.

3.7.1. HPDLF Hücresi İçin Kültür Vasatı Değiştirme Uygulaması

Kültür vasatı değiştirme işlemi 2 gün aralıklarla düzenli olarak tekrarlandı. İnkübatörde bekletilen hücre grubu mikroskop ile incelendiğinde hücrelerin semiadherent olduğu gözlemlenmediğinde kültür kabında bulunan vasatın tamamı falkon tüpe aktarıldı ve 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj işlemi gerçekleştirildi. Santrifüj olan hücreler pellet halini alınca serolojik pipet yardımıyla supernatant atıldı. Falkon tüpte bulunan pelletin üzerine kültür vasatı eklendi ve homojenize edildi. Ardından adherent olan hücrelerin bulunduğu kültür kabına ilave edildi.

Hücreler mikroskopla incelendiğinde adherent olarak gözlemlendiğinde ise kültür kabında bulunan supernatant atıldı, kültür vasatı kültür kabına eklendi.

3.7.2. HPDLF Hücresi İçin Pasajlama Uygulaması

Kültür kabındaki hücrelerin %80 konfluent olduğu gözlemlendiğinde pasajlama işlemi yapıldı. Kültür kabında bulunan vasat uzaklaştırıldı. Hücre duvarındaki magnezyumun polistrenden ayrılmasını sağlamak ve hücrelerin birbirlerine yapışmasına neden olan kalsiyumu uzaklaştırmak amacıyla kültür kabının aldığı ideal vasat miktarının yarısı kadar Tripsin/EDTA (Şekil 3-9E) eklendi. 37°C’de %5 CO₂ içeren inkübatörde 5 dakika bekletildi ve mikroskopta hücrelerin kültür kabından kalktığı gözlemlendi. Tripsin/EDTA’nın inaktivasyonu sağlamak için Tripsin/EDTA’nın iki katı kadar, FBS içeren kültür vasatı ilave edildi ve falkon tüpe aktarılarak santrifüj işlemi gerçekleştirildi. Serolojik pipet yardımıyla süpernatant atıldıktan sonra kültür kabının ideal miktarı kadar kültür vasatı pellet üzerine eklendi. Homojenizasyon sonrası kültür kabına aktarıldı. Pasajlama işlemi hücrenin yeterli derecede konfluent olduğu gözlemlendiğinde tekrarlandı.

3.8. HPDLF Hücresi İçin Dondurma Vasatı Hazırlama ve Dondurma Uygulaması

3.8.1. HPDLF Hücresi İçin Dondurma Vasatı Hazırlama Uygulaması

FBS (%90)

DMSO (%10)

Buzdolabında -20°C’de bekletilen FBS ve sitoplazmik sıvının kristalleşip hücre membranına zarar vermesini engellemek amacıyla kullanılan DMSO solüsyonu, sıcaklarının 37°C’ye ulaşması için 15 dakika su banyosunda bekletildi. Dondurma vasatı hazırlama işlemi laminar akım kültür kabinde aseptik koşullarda gerçekleştirildi. 25 ml falkon tüpte serolojik pipetler yardımıyla 0,9ml FBS ve 0,1ml DMSO (Appllichem, A3672, 0250) solüsyonu ile dondurma vasatı elde edildi.

3.8.2. HPDLF Hücresi İçin Dondurma Uygulaması

HPDLF hücresinin yapılacak olan diğer deneylerde de kullanılabilmesi amacıyla bu işlem yapıldı. Kültür kabında bulunan hücrelerin %80 konfluent olduğu gözlemlendiğinde bu işlem yapıldı. Bir vial hücre hattı için 1 ml dondurma vasatı hazırlandı.

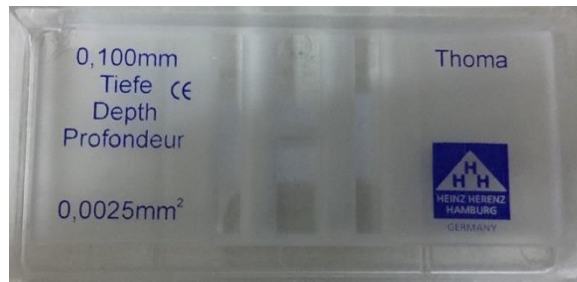
Kültür kabında bulunan hücrenin kültür vasatı tamamen atıldıktan sonra kültür kabının ideal vasat miktarının yarısı kadar tripsin/EDTA solüsyonu ilave edildi. 37°C’de 5 dakika bekletildikten sonra kültür vasatı ilave edildi. Kültür kabındaki solüsyon falkon tüpe aktarıldıktan sonra 5 dakika 1000 rpm’de santrifüj edildi. Supernatant uzaklaştırıldıktan sonra pelletin üzerine pasajlama işleminde kullanılacak kadar ve dondurma işleminde kullanılacak kadar kültür vasatı eklendi. Serolojik pipet yardımıyla homojenize edildikten sonra öncelikle pasajlama prosedürleri uygulandı. Falkonda bulunan kültür vasatı hücre süspansiyonu dondurma işlemi için tekrar santrifüj edildi.

Santrifüj olan pellet üzerindeki supernatant atıldı. Pelletin üzerine hazırlanmış olan 1ml dondurma vasatı ilave edildi. Homojenize edildikten sonra viala aktarıldı. Hazırlanan PDL fibroblast hücresi viali hızlıca -80°C dondurucuya kaldırıldı.

3.9. Hemositometri Yöntemi ile Hücre Sayımı

Santrifüj edilen hücre pelleti 1ml kültür vasatı ile homojenize edildikten sonra 20µl ependorfa aktarıldı. Ependorfa 20µl tripan mavisi de ilave edildikten sonra homojenize edildi. Toma laminin (Şekil 3-10) alt ve üst bölmelerine 10µl tripan mavisi (Şekil 3-11) hücre karışımı aktarıldı. Mikroskop yardımıyla aşağıdaki formül kullanılarak sayımı gerçekleştirildi.

Boyanmamış Hücre Sayısı x Hücre solüsyonu hacmi x Trypan Blue Dilüsyon Oranı x 10^4 = Dilüsyondaki Toplam Hücre Sayısı



Şekil 3-10: Toma Lami



Şekil 3-11: Tripan Mavisi

3.10. HPDLF Hücresinin İmmünohistokimyasal Deneyler ile Moleküler Karakterizasyon Analizleri

HPDLF hücresinin moleküler karakterizasyonunu sağlamak için hem test materyalleri hem de kontrol grupları için 3'er örnek hazırlanmıştır.

HPDLF hücresinin moleküler karakterizasyonunu sağlamak için 24 gözlü kültür kabına yuvarlak cam lameller yerleştirildi. Cam lamellere ekilecek hücrelerin yapışma sağlaması için, her bir göze 500 µl FBS eklenerek yarım saat bekletildi ve solüsyonlar atıldı. Ardından hücre ekimleri gerçekleştirildi. Karakterizasyon için yeterli hücre konfluentliği sağlanıncaya dek 2 gün arayla kültür vasatı değiştirildi.

100 ml distile su içerisine 1 tablet PBS (Şekil 3-13D) eklendi. Hücrelerin fiksasyonu için hazırlanan 25 ml PBS solüsyonu ve 1 gr paraformaldehit tozu (Merck, TP704404) beherde 60°'de manyetik karıştırıcıda hazırlandı.

Yeterli derecede konfluent olduğu gözlenen hücrelerin kültür vasatları uzaklaştırıldı ve 3'er defa PBS ile yıkandı. Her göze 500 µl hazırlanan paraformaldehit solüsyonu eklenerek yarım saat fiksasyon için bekletildi. Fiksatif uzaklaştırıldıktan sonra 3 defa 5'er dakika olmak üzere PBS ile yıkandı.

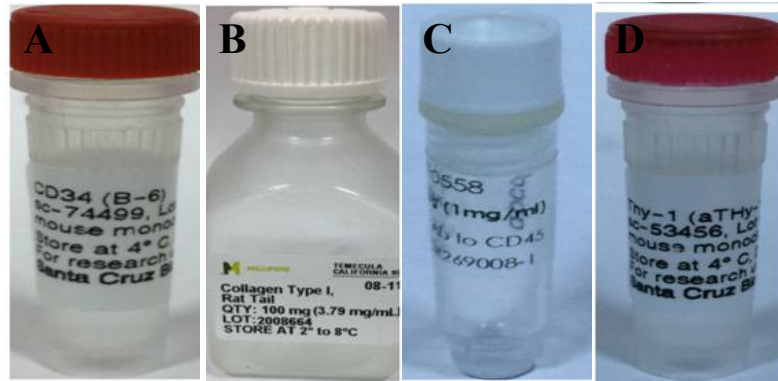
Hücre membranında permabilizasyonu sağlamak amacıyla PBS ile dilüe edilen %0,1'lik triton-X 100 (Applichem, A49750100) ilave edildi ve 15 dakika buz üstünde bekletildi. Triton X-100 uzaklaştırıldıktan sonra 3 defa 5'er dakika PBS solüsyonu ile yıkandı.

Hücre içi peroksidaz aktivitesinin inhibisyonu için %3'lük hidrojen peroksit (Merck, K31355100 303) eklendi ve 10 dakika bekletildi. Hidrojen peroksit uzaklaştırıldıktan sonra 3 defa 5'er dakika olmak üzere PBS ile yıkandı.

Bütün antijen yüzeylerini kaplamak ve sadece kullanılacak olan primer antikorun ekspresyonunu izlemek amacıyla hücreler oda sıcaklığında 1 saat bloklama solüsyonu (Şekil 3-13A) ile muamele edildi.

Blocking uzaklaştırıldıktan sonra yıkama yapılmadan primer antikorlar eklendi ve oda sıcaklığında 2 saat bekletildi. Kontrol grubuna ise PBS ilavesi yapıldı. HPDLF hücresi için primer antikor olarak anti-CD34 (Şekil 3-12A), anti-CD45 (Şekil 3-12C), anti-CD90 (Şekil 3-12D), anti-kollajen1 (Şekil 3-12B) ilave edildi. Örnekler 3 defa 5'er dakika PBS ile yıkandı.

Örnekler üretici firmanın kullanım şartlarına uygun biotinlenmiş geniş spektrumlu sekonder antikor (Şekil 3-13B) ilavesi yapılarak yarım saat bekletildi ve sekonder antikor uzaklaştırıldı. Sekonder antikor uygulamasının ardından HRP-Streptavidin enzimi (Şekil 3-13C) eklenerek yarım saat bekletildi ve 3 defa 5'er dakika PBS ile yıkandı.



Şekil 3-12: Karakterizasyonda Kullanılan Primer Antikorlar; AntiCD34(A), Antikollajen1 (B), AntiCD45 (C), AntiCD90 (D)

Oluşturulan antijen-antikor kompleksinin görünürlüğünü arttırmak ve hücrelerin meydana getirdiği immünoreaktivitelerin yoğunluklarını belirleyebilmek amacıyla, hücrelerin DAB kromojeni (Şekil 3-13E) ve Mayer' s Hematoksilen ile (Şekil 3-13F)

boyamaları yapıldı. Örnekler immunohistokimya kapatma vasatı (Spring bioscience, DMM-125) ile kapatılarak ışık mikroskobu (Olympus BX43) altında incelendi.



Şekil 3-13: İmmunohistokimya Uygulmasında Kullanılan Malzemeler; Bloklama Solüsyonu (A), Biotinlenmiş Sekonder Antikor (B), HRP-Streptavidin (C), PBS Tablet (D), DAB kromojeni (E), Mayer's Hematoksileni (F)

3.11. MTT Testinin Uygulama Prosedürü

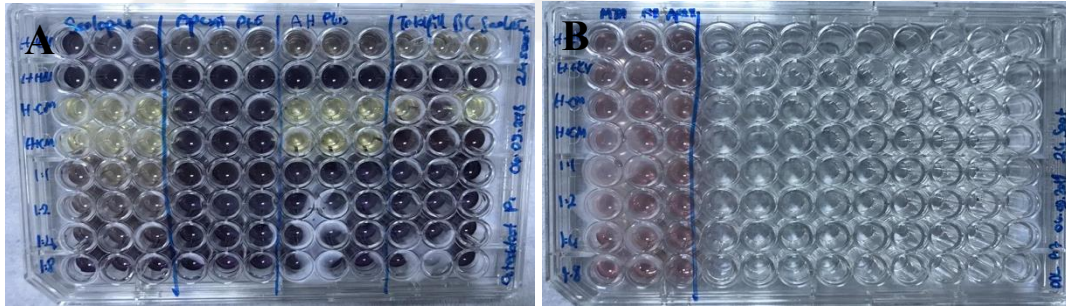
24 ve 72 saat sonundaki sitotoksik etkilerin değerlendirilmesi için hem test materyalleri hem de kontrol grupları için 6'şar örnek hazırlanmıştır.

MTT testinde kullanılacak olan HPDLF hücresi 96 gözlü plaklara her göze 10^3 hücre olacak şekilde ekildi ve 37°C 'de 48 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası kültür vasatı uzaklaştırıldı ve hücreler 24 ve 72 saat olmak üzere $100\ \mu\text{l}$ 'lik kök kanal dolgu patı ekstraktına maruz bırakıldı. ($n=6$) Bu sürelerin sonunda farklı dilüsyonlarda hazırlanan kök kanal dolgu patı ekstraktlarının hücre canlılığına sitotoksik etkisini belirlemek amacıyla MTT testi yapıldı. MTT testi için MTT kiti (Sigma, M5655) üretici firma talimatlarına uygun olarak testlerden hemen önce hazırlandı ve test protokolü talimatlara uygun olarak karanlık ortamda yürütüldü. İnkübasyon sonrası her göze $10\ \mu\text{l}$ DMSO

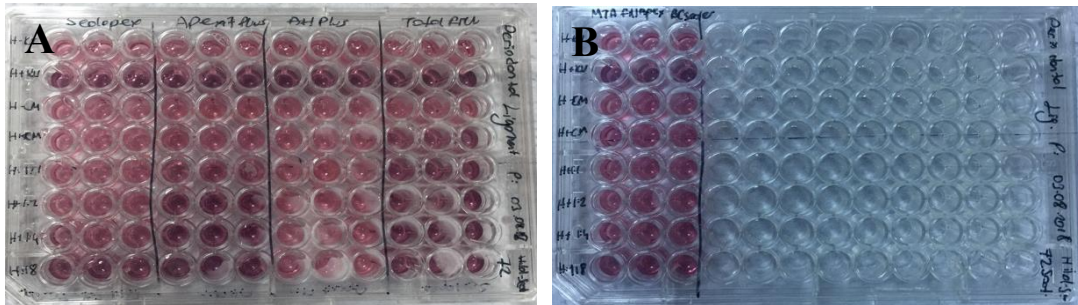
solüsyonu ilave edildikten sonra plaklar 450-690 nm dalga boyunda çalışan spektrofotometreye (Şekil3-14) aktarılarak canlılık ölçümleri yapıldı.



Şekil 3-14: Spektrofotometre Cihazı (Biotek ELX800UV)



Şekil 3-15: 24 Saat Maruziyet sonrası MTT Uygualaması Yapılan HPDLF Hücresi (A, B) Görüntüleri



Şekil 3-16: 72 Saat Maruziyet sonrası MTT Uygualaması Yapılan HPDLF Hücresi (A, B) Görüntüleri

3.12. Farklı Kök Kanal Dolgu Patı Uygulması Yapılmış HPDLF Hücresinin TUNEL Analizi ile Apoptoz Oranlarının Değerlendirilmesi

Apoptoz testinde kullanılmak üzere öncelikle her bir kök kanal dolgu patının optimal konsantrasyonu belirlendi (67, 114). Bunun için her bir kök kanal dolgu patının MTT test sonucunda elde edilen ve hücrelerin %50'sine etki eden konsantrasyonlar belirlendi. Bu konsantrasyonlar; Sealapex için 1:2, Apexit Plus için 1:2, AH Plus için 1:8, Totalfill BC Sealer için 1:0, MTA-Fillapex için 1:4 konsantrasyonlardı. 24 ve 72 saat sonundaki apoptotik etkilerin değerlendirilmesi için hem test materyalleri hem de kontrol grupları için 6'şar örnek hazırlanmıştır. (n=6)

Apoptoz tespiti için TUNEL testinde kullanılmak üzere HPDLF hücresi 8 gözlü kültür kaplarına her göze 10^3 hücre olacak şekilde ekildi ve 37°C 'de 48 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası kültür vasatı uzaklaştırıldı ve hücreler 24 ve 72 saat olmak üzere 250 μl 'lık kök kanal dolgu patı ekstraktlarına maruz bırakıldı. Kontrol grubu olarak kültür vasatı kullanıldı.

3.13. TUNEL Testinin Uygulama Prosedürü

100 ml distile su içerisine 1 tablet PBS eklendi. Hücrelerin fiksasyonu için hazırlanan PBS ile %4 oranında paraformaldehit solüsyonu beherde 60° manyetik karıştırıcıda hazırlandı.

8 gözlü kültür kaplarında 48 saat inkübe olan HPDLF hücresi kültür vasatları uzaklaştırıldı ve 3'er defa PBS ile yıkandı. Her göze 100 μl hazırlanan paraformaldehit solüsyonu eklenerek yarım saat fiksasyon için bekletildi. Fiksatif uzaklaştırıldıktan sonra 3 defa 5'er dakika olmak üzere PBS ile yıkandı.

Hücre membranında permabilizasyonu sağlamak için, PBS ile dilüe edilen % 0,1lik triton-X 100 ilave edildi ve 5 dakika buz üstünde bekletildi. Triton-x uzaklaştırıldıktan sonra 3 defa 5'er dakika PBS solüsyonu ile yıkandı. Ardından %3'lük hidrojen peroksit ilave edildi ve 5 dakika bekletildi. Hidrojen peroksit uzaklaştırıldıktan sonra 3 defa 5'er dakika PBS solüsyonu ile yıkandı.

Üretici firma talimatlarına uygun olarak TDT (Millipore, CA 92590) %77 reaksiyon tamponu ve %33 TDT (Millipore, CA 92590) enzimi ile hazırlandı.

Örneklere önce equilibration buffer (Millipore, CA 92590) ilave edildi ve 2 dakika bekletildi. Ardından hazırlanan TDT karışımı örneklere 1-2 damla olacak şekilde ilave

edildi, cover slip (Millipore, CA 92590) ile üstleri kapatıldı ve 37°C’de 1 saat bekletildi. Kontrol grubuna TDT ilavesi yapılmadı. Ardından örnekler stop wash buffer (durdurucu yıkama tamponu) (Millipore, CA 92590) ile 10 dakika bekletildi. Stop wash buffer uzaklaştırıldıktan sonra 3 defa 5’er dakika olmak üzere PBS ile yıkandı.

Örneklere antidiğoksigenin peroksidaz (Millipore, CA 92590) ilavesi yapılarak 1 saat bekletildi. Antidiğoksigenin peroksidaz uzaklaştırıldıktan sonra 3 defa 5’er dakika PBS solüsyonu ile yıkandı.

DAB dilüsyon tamponu ve DAB substratı üretici firmanın talimatlarına uygun olarak karıştırılarak DAB kromojeni hazırlandı. Hazırlanan DAB kromojeni örneklere ilave edildi ve 5 dakika bekletildi. DAB kromojeni uzaklaştırıldıktan sonra örnekler 3 defa 5’er dakika distile su ile yıkandı. Ardından örnekler Mayer’s hematoksileni ilave edildi. Mayer’s hematoksilen uzaklaştırıldıktan sonra 2 defa 5’er dakika distile su ile yıkandı. Örnekler immunohistokimya kapatma vasatı ile kapatılarak ışık mikroskobu altında incelendi (Şekil3-17).

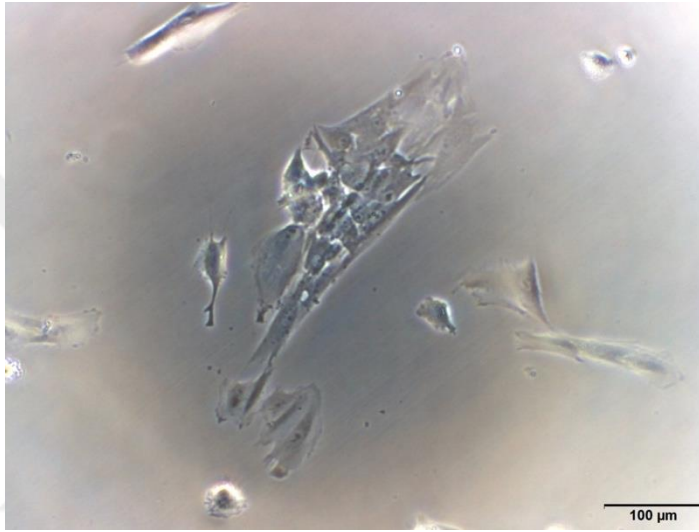


Şekil 3-17: TUNEL Uygulaması Sonrası Preperat Örnekleri

4. BULGULAR

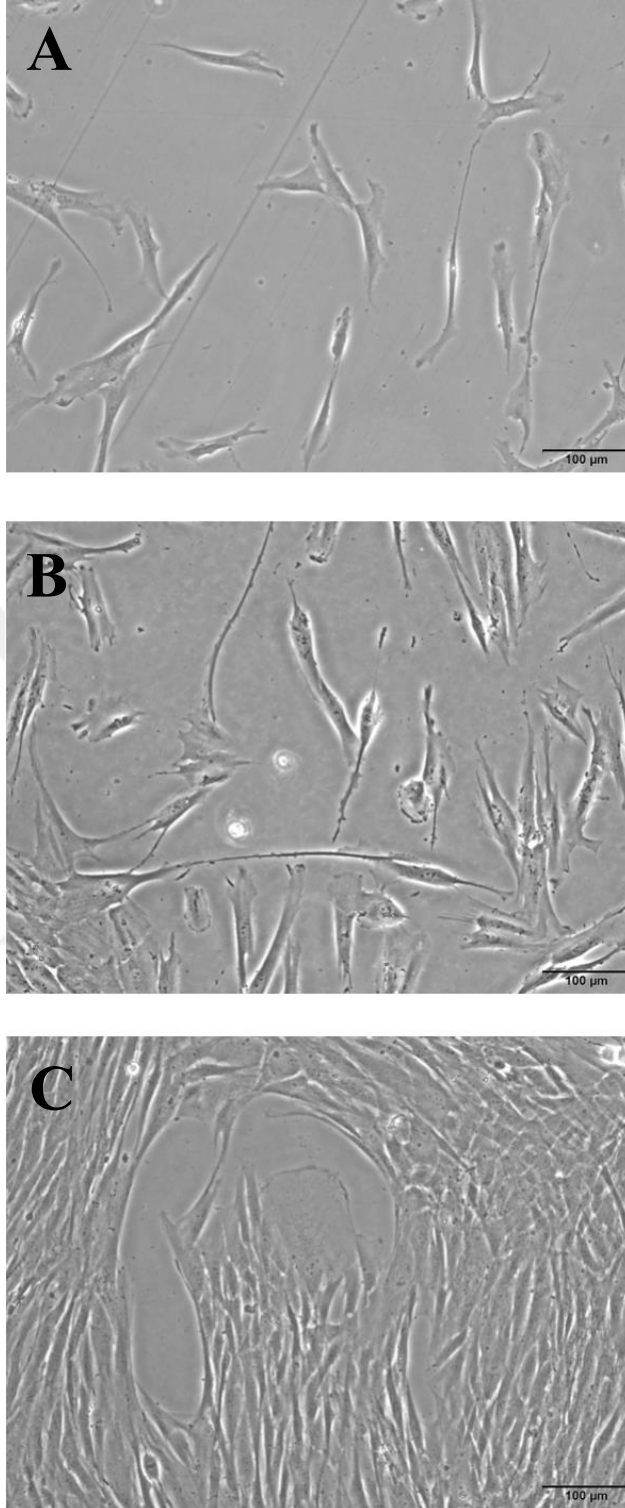
4.1. HPDLF Hücresinin Kültivasyonu

2. Pasajda dondurulmuş olan HPDLF hücreleri çalışmada kullanılmak üzere kültür kabına aktarıldı. Hücrelerin kültür kabında fibroblast yapısında, yassı, uzamış, fusiform şekilli sitoplazmik uzantılara (Şekil 4-1) sahip oldukları gözlemlendi.



Şekil 4-1: HPDLF Hücresinin Görüntüsü. Ölçek:100nm

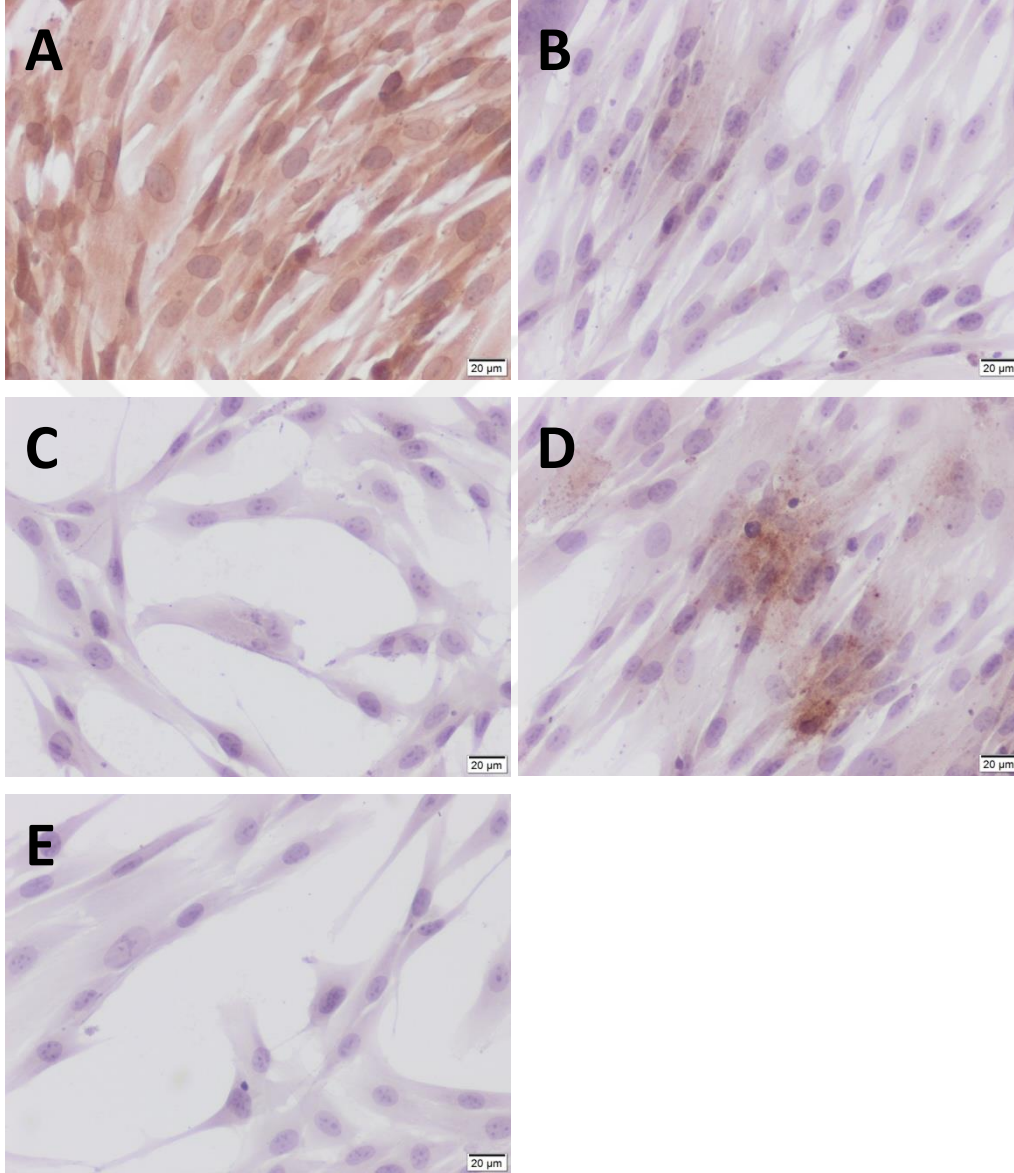
Hücrelerin 2. gününden itibaren kültür kabına yapıştığı gözlemlendi (Şekil 4-2 A). Hücrelerin 5. gününde %80 konfluent oldukları gözlemlendiğinde pasajlama işlemi gerçekleştirildi (Şekil 4-2 B). Hücrelerin dördüncü (P4), beşinci (P5), altıncı (P6), yedinci (P7) pasajlama işlemleri de yapılarak; deneylerde P7’de (Şekil 4-2 C) yer alan hücreler kullanıldı.



Şekil 4-2: HPDLF Hücresi Gruplarında Yer Alan Hücrelerin 3. Pasaj 2. Gün (A), 3.Pasaj 5.gün (B) ve 7. Pasaj (C) Görüntüleri / Ölçek: 100nm

P7' de yer alan HPDLFH karakterizasyonu; CD34, CD45, CD90 ve Kollajen1 immünohistokimyasal reaktivite doğrulamaları ile yapıldı. İmmünohistokimyasal analiz

sonuçlarına göre; izolasyonları gerçekleştirilen HPDLF hücre örneklerinde, CD45 (+), CD90(+) ve Kollajen1 (+) belirteci pozitif ekspresyon gösterirken (Şekil 4-3 A, B, D), CD34 (-) (hematopoetik belirteç) ise negatif ekspresyon (Şekil 4-3 C) gözlemlendi. Yapılan kontrol immün boyamasında da sonuçlar negatif (Şekil 4-3 E) olarak saptandı.



Şekil 4-3: HPDLF hücrelerinde CD 45 (A), CD 90 (B), CD 34 (C), Kollajen1 (D) immunoreaktivitesi, Kontrol immunohistokimya boyaması (E). Ölçek 20 µm.

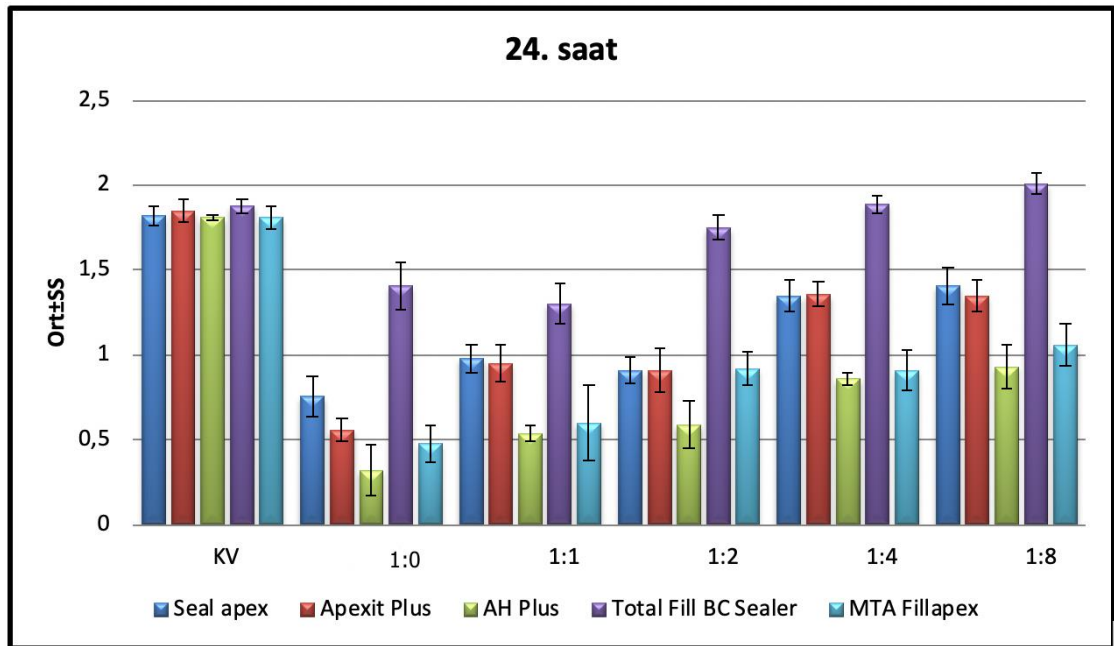
4.2. MTT Bulguları

Tablo 4-1: Farklı dilüsyonlardaki kanal patlarının ve kontrol vasatının (KV) HPDLF hücrelerinde 24. saat MTT düzeylerinin değerlendirilmesi

	KV	1:0	1:1	1:2	1:4	1:8	
	Ort±SS (medyan)	Ort±SS (medyan)	Ort±SS (medyan)	Ort±SS (medyan)	Ort±SS (medyan)	Ort±SS (medyan)	p
Sealapex	1,82±0,06 (1,82)	0,76±0,12 (0,79)	0,98±0,08 (0,95)	0,91±0,08 (0,93)	1,35±0,09 (1,37)	1,41±0,11 (1,39)	0,000 *
Apexit	1,85±0,07 (1,86)	0,56±0,07 (0,56)	0,95±0,11 (0,95)	0,91±0,13 (0,94)	1,36±0,07 (1,39)	1,35±0,09 (1,33)	0,000 *
Plus	1,81±0,02 (1,82)	0,32±0,15 (0,37)	0,54±0,05 (0,51)	0,59±0,14 (0,60)	0,86±0,04 (0,86)	0,93±0,13 (0,93)	0,000 *
AH Plus	1,81±0,02 (1,82)	0,32±0,15 (0,37)	0,54±0,05 (0,51)	0,59±0,14 (0,60)	0,86±0,04 (0,86)	0,93±0,13 (0,93)	0,000 *
TotalFill	1,88±0,04 (1,86)	1,41±0,14 (1,38)	1,30±0,12 (1,27)	1,75±0,07 (1,72)	1,89±0,05 (1,88)	2,01±0,06 (2,02)	0,000 *
BC							
Sealer							
MTA-	1,81±0,07 (1,83)	0,48±0,11 (0,45)	0,60±0,22 (0,59)	0,90±0,10 (0,95)	0,91±0,12 (0,86)	1,06±0,12 (1,06)	0,000 *
Fillapex							
P	0,058	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	

Kruskal Wallis Test

* $p < 0.05$



Tablo 4-2: Kanal patlarının farklı dilüsyonlarının ve kontrol vasatının (KV) HPDLF hücrelerinde 24. saat MTT düzeylerinin Post hoc değerlendirilme sonuçları

		KV	1:0	1:1	1:2	1:4	1:8
		P	P	P	P	P	P
Sealapex	Apexit Plus	0,200	0,010*	0,522	0,873	0,423	0,337
	AH Plus	0,873	0,004*	0,004*	0,006*	0,004*	0,004*
	TotalFill BC Sealer	0,109	0,004*	0,004*	0,004*	0,004*	0,004*
	MTA-Fillapex	0,749	0,010*	0,025*	0,631	0,004*	0,004*
Apexit Plus	AH Plus	0,055	0,006*	0,004*	0,010*	0,004*	0,004*
	TotalFill BC Sealer	0,631	0,004*	0,004*	0,004*	0,004*	0,004*
	MTA-Fillapex	0,150	0,109	0,016*	0,873	0,004*	0,006*
AH Plus	TotalFill BC Sealer	0,060	0,004*	0,004*	0,004*	0,004*	0,004*
	MTA-Fillapex	0,522	0,109	0,337	0,006*	1,000	0,045*
TotalFill BC Sealer	MTA-Fillapex	0,055	0,004*	0,004*	0,004*	0,004*	0,004*
Mann Whitney U Test		*p<0.05					

KV grubunda; kanal patı grupları arasında HPDLF hücrelerinin 24. saat MTT düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır (p:0.058; p>0.05) (Tablo 4-1).

1:0 grubunda; kanal patı grupları arasında HPDLF hücrelerinin 24. saat MTT düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır (p:0.000; p<0.05) (Tablo 4-1). Anlamlılığın hangi gruplardan kaynaklandığının tespiti için yapılan ikili karşılaştırmalar sonrasında; TotalFill BC Sealer grubunun 24. saat MTT düzeyi Sealapex, Apexit Plus, AH Plus ve MTA-Fillapex gruplarından anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur (p<0.05). Sealapex grubunun 24. saat MTT düzeyi Apexit Plus, AH Plus ve MTA-Fillapex gruplarından anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur (p<0.05). Apexit Plus grubunun 24. saat MTT düzeyi AH Plus grubundan anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur (p<0.05). Diğer gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır (p>0.05) (Tablo 4-2).

1:1 grubunda; kanal patı grupları arasında HPDLF hücrelerinin 24. saat MTT düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır (p:0.000; p<0.05) (Tablo 4-1). Anlamlılığın hangi gruplardan kaynaklandığının tespiti için yapılan ikili karşılaştırmalar sonrasında; TotalFill BC Sealer grubunun 24. saat MTT düzeyi Sealapex,

Apexit Plus, AH Plus ve MTA-Fillapex gruplarından anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). Sealapex grubunun 24. saat MTT düzeyi AH Plus ve MTA-Fillapex gruplarından anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). Apexit Plus grubunun 24. saat MTT düzeyi AH Plus ve MTA-Fillapex gruplarından anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). Diğer gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$) (Tablo 4-2).

1:2 grubunda; kanal patı grupları arasında HPDLF hücrelerinin 24. saat MTT düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p:0.000$; $p<0.05$) (Tablo 4-1). Anlamlılığın hangi gruplardan kaynaklandığının tespiti için yapılan ikili karşılaştırmalar sonrasında; TotalFill BC Sealer grubunun 24. saat MTT düzeyi Sealapex, Apexit Plus, AH Plus ve MTA-Fillapex gruplarından anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). AH Plus grubunun 24. saat MTT düzeyi Sealapex, Apexit Plus ve MTA-Fillapex gruplarından anlamlı şekilde düşük bulunmuştur ($p<0.05$). Diğer gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$) (Tablo 4-2).

1:4 grubunda; kanal patı grupları arasında HPDLF hücrelerinin 24. saat MTT düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p:0.000$; $p<0.05$) (Tablo 4-1). Anlamlılığın hangi gruplardan kaynaklandığının tespiti için yapılan ikili karşılaştırmalar sonrasında; TotalFill BC Sealer grubunun 24. saat MTT düzeyi Sealapex, Apexit Plus, AH Plus ve MTA-Fillapex gruplarından anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). Sealapex grubunun 24. saat MTT düzeyi AH Plus ve MTA-Fillapex gruplarından anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). Apexit Plus grubunun 24. saat MTT düzeyi AH Plus ve MTA-Fillapex gruplarından anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). Diğer gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$) (Tablo 4-2).

1:8 grubunda; kanal patı grupları arasında HPDLF hücrelerinin 24. saat MTT düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p:0.000$; $p<0.05$) (Tablo 4-1). Anlamlılığın hangi gruplardan kaynaklandığının tespiti için yapılan ikili karşılaştırmalar sonrasında; TotalFill BC Sealer grubunun 24. saat MTT düzeyi Sealapex, Apexit Plus, AH Plus ve MTA-Fillapex gruplarından anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). Sealapex grubunun 24. saat MTT düzeyi AH Plus ve MTA-Fillapex gruplarından anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). Apexit Plus grubunun 24. saat MTT düzeyi AH Plus ve MTA-Fillapex gruplarından anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). MTA-Fillapex grubunun 24. saat MTT düzeyi AH Plus grubundan

anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). Sealapex ve Apexit Plus grupları arasında anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$) (Tablo 4-2).

Tablo 4-3: Farklı dilüsyonlardaki kanal patlarının ve kontrol vasatının HPDLF hücrelerinde 24. saat MTT düzeylerinin Post hoc değerlendirilme sonuçları

		Sealapex	Apexit Plus	AH Plus	TotalFill BC Sealer	MTA-Fillapex
		P	P	P	P	P
KV	1:0	0,004*	0,004*	0,004*	0,004*	0,004*
	1:1	0,004*	0,004*	0,004*	0,004*	0,004*
	1:2	0,004*	0,004*	0,004*	0,025*	0,004*
	1:4	0,004*	0,004*	0,004*	0,423	0,004*
	1:8	0,004*	0,004*	0,004*	0,006*	0,004*
1:0	1:1	0,004*	0,004*	0,004*	0,109	0,200
	1:2	0,016*	0,004*	0,010*	0,004*	0,004*
	1:4	0,004*	0,004*	0,004*	0,004*	0,004*
	1:8	0,004*	0,004*	0,004*	0,004*	0,004*
1:1	1:2	0,262	0,631	0,522	0,004*	0,016*
	1:4	0,004*	0,004*	0,004*	0,004*	0,025*
	1:8	0,004*	0,004*	0,004*	0,004*	0,006*
1:2	1:4	0,004*	0,004*	0,004*	0,006*	0,873
	1:8	0,004*	0,004*	0,006*	0,004*	0,045*
1:4	1:8	0,522	0,631	0,873	0,010*	0,040*

Mann Whitney U Test

* $p<0.05$

Sealapex grubunda; dilüsyon grupları arasında HPDLF hücrelerinin 24. saat MTT düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p:0.000$; $p<0.05$) (Tablo 4-1). Anlamlılığın hangi gruplardan kaynaklandığının tespiti için yapılan ikili karşılaştırmalar sonrasında; KV grubunun 24. saat MTT düzeyi diğer tüm gruplardan anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). 1:8 grubunun 24. saat MTT düzeyi 1:0, 1:1 ve 1:2 gruplarından anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). 1:4 grubunun 24. saat

MTT düzeyi 1:0, 1:1 ve 1:2 gruplarından anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). 1:1 ve 1:2 gruplarının 24. saat MTT düzeyleri 1:0 grubundan anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). Diğer gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$) (Tablo 4-3).

Apexit Plus grubunda; dilüsyon grupları arasında HPDLF hücrelerinin 24. saat MTT düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p:0.000$; $p<0.05$) (Tablo 4-1). Anlamlılığın hangi gruplardan kaynaklandığının tespiti için yapılan ikili karşılaştırmalar sonrasında; KV grubunun 24. saat MTT düzeyi diğer tüm gruplardan anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). 1:8 grubunun 24. saat MTT düzeyi 1:0, 1:1 ve 1:2 gruplarından anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). 1:4 grubunun 24. saat MTT düzeyi 1:0, 1:1 ve 1:2 gruplarından anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). 1:1 ve 1:2 gruplarının 24. saat MTT düzeyleri 1:0 grubundan anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). Diğer gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$) (Tablo 4-3).

AH Plus grubunda; dilüsyon grupları arasında HPDLF hücrelerinin 24. saat MTT düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p:0.000$; $p<0.05$) (Tablo 4-1). Anlamlılığın hangi gruplardan kaynaklandığının tespiti için yapılan ikili karşılaştırmalar sonrasında; KV grubunun 24. saat MTT düzeyi diğer tüm gruplardan anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). 1:8 grubunun 24. saat MTT düzeyi 1:0, 1:1 ve 1:2 gruplarından anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). 1:4 grubunun 24. saat MTT düzeyi 1:0, 1:1 ve 1:2 gruplarından anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). 1:1 ve 1:2 gruplarının 24. saat MTT düzeyleri 1:0 grubundan anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). Diğer gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$) (Tablo 4-3).

TotalFill BC Sealer grubunda; dilüsyon grupları arasında HPDLF hücrelerinin 24. saat MTT düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p:0.000$; $p<0.05$) (Tablo 4-1). Anlamlılığın hangi gruplardan kaynaklandığının tespiti için yapılan ikili karşılaştırmalar sonrasında; 1:8 grubunun 24. saat MTT düzeyi KV, 1:0, 1:1, 1:2 ve 1:4 gruplarından anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). KV grubunun 24. saat MTT düzeyi 1:0, 1:1 ve 1:2 gruplarından anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). 1:4 grubunun 24. saat MTT düzeyi 1:0, 1:1 ve 1:2 gruplarından anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). 1:2 grubunun 24. saat MTT düzeyi 1:0 ve 1:1 grubundan

anlamli şekilde yu'ksek bulunmuştur ($p<0.05$). Diğer gruplar arasında anlamli bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$) (Tablo 4-3).

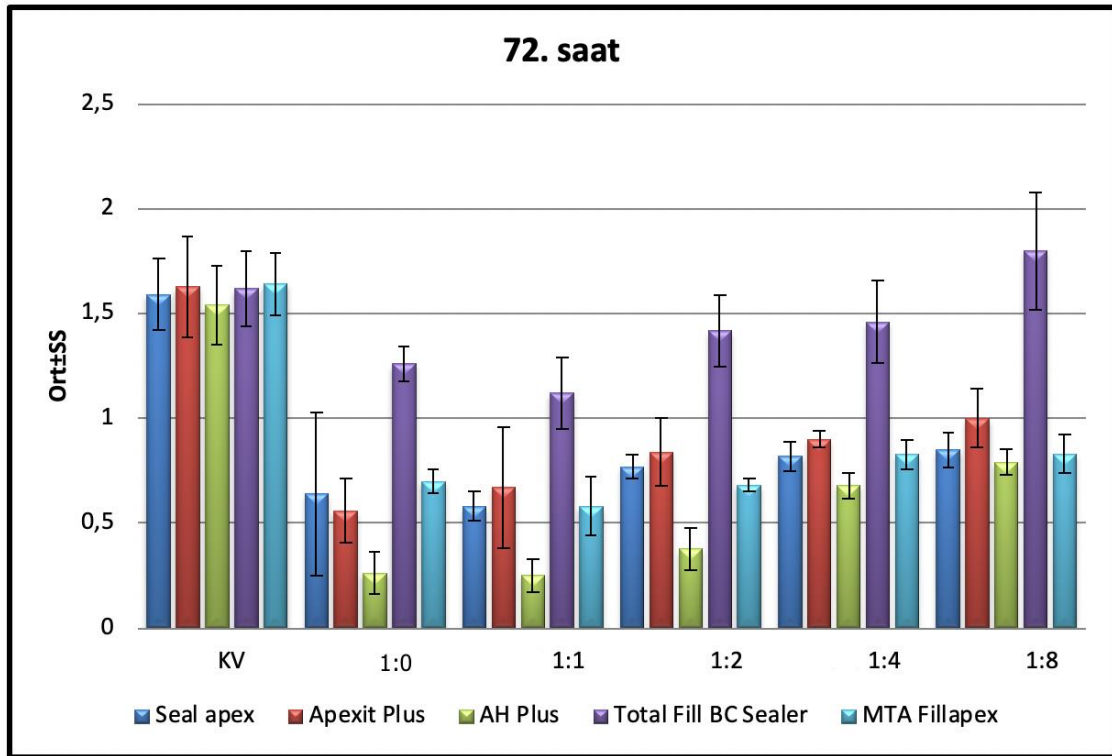
MTA-Fillapex grubunda; dilüsyon grupları arasında HPDLF hücrelerinin 24. saat MTT düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamli farklılık bulunmaktadır ($p=0.000$; $p<0.05$) (Tablo 4-1). Anlamlılığın hangi gruplardan kaynaklandığının tespiti için yapılan ikili karşılaştırmalar sonrasında; KV grubunun 24.saat MTT düzeyi diğer tüm gruplardan anlamli şekilde yu'ksek bulunmuştur ($p<0.05$). 1:8 grubunun 24. saat MTT düzeyi 1:0, 1:1, 1:2 ve 1:4 gruplarından anlamli şekilde yu'ksek bulunmuştur ($p<0.05$). 1:2 grubunun 24. saat MTT düzeyi 1:0 ve 1:1 gruplarından anlamli şekilde yu'ksek bulunmuştur ($p<0.05$). 1:4 grubunun 24. saat MTT düzeyi 1:0 ve 1:1 gruplarından anlamli şekilde yu'ksek bulunmuştur ($p<0.05$). Diğer gruplar arasında anlamli bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$) (Tablo 4-3).

Tablo 4-4: Farklı dilüsyonlardaki kanal patlarının ve kontrol vasatının (KV) HPDLF hücrelerinde 72. saat MTT düzeylerinin değerlendirilmesi

	KV	1:0	1:1	1:2	1:4	1:8	P
	Ort±SS (medyan)	Ort±SS (medyan)	Ort±SS (medyan)	Ort±SS (medyan)	Ort±SS (medyan)	Ort±SS (medyan)	
Sealapex	1,59±0,17 (1,5)	0,64±0,39 (0,47)	0,58±0,07 (0,59)	0,77±0,06 (0,78)	0,82±0,07 (0,81)	0,85±0,08 (0,88)	0,000 *
Apexit Plus	1,63±0,24 (1,62)	0,56±0,15 (0,62)	0,67±0,29 (0,76)	0,84±0,16 (0,86)	0,9±0,04 (0,89)	1,0±0,14 (0,98)	0,000 *
AH Plus	1,54±0,19 (1,51)	0,26±0,1 (0,27)	0,25±0,08 (0,27)	0,38±0,1 (0,36)	0,68±0,06 (0,67)	0,79±0,06 (0,78)	0,000 *
TotalFill	1,62±0,18 (1,63)	1,26±0,08 (1,25)	1,12±0,17 (1,06)	1,42±0,17 (1,38)	1,46±0,2 (1,47)	1,8±0,28 (1,77)	0,000 *
BC Sealer	1,64±0,15 (1,66)	0,7±0,06 (0,68)	0,58±0,14 (0,57)	0,68±0,03 (0,67)	0,83±0,07 (0,85)	0,83±0,09 (0,83)	0,000 *
MTA- Fillapex							
P	0,716	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,001*	

Kruskal Wallis Test

* $p < 0.0$



Tablo 4-5: Farklı dilüsyonlardaki kanal patlarının ve kontrol vasatının (KV) HPDLF hücrelerinde 72. saat MTT düzeylerinin Post hoc değerlendirilme sonuçları

		KV	1:0	1:1	1:2	1:4	1:8
		P	P	P	P	P	P
Sealapex	Apexit Plus	0,810	0,337	0,262	0,522	0,055	0,037
	AH Plus	0,378	0,005*	0,004*	0,004*	0,010*	0,200
	TotalFill BC Sealer	0,873	0,045*	0,004*	0,004*	0,004*	0,004*
	MTA-Fillapex	0,631	0,055	1,000	0,078	0,748	0,749
Apexit Plus	AH Plus	0,200	0,025*	0,037*	0,004*	0,004*	0,016*
	TotalFill BC Sealer	0,873	0,004*	0,013*	0,004*	0,004*	0,004*
	MTA-Fillapex	1,000	0,037*	0,200	0,010*	0,055	0,037*
AH Plus	TotalFill BC Sealer	0,262	0,004*	0,004*	0,004*	0,004*	0,004*
	MTA-Fillapex	0,262	0,004*	0,004*	0,004*	0,010*	0,423
TotalFill BC Sealer	MTA-Fillapex	0,873	0,004*	0,004*	0,004*	0,004*	0,004*
Mann Whitney U Test		*p<0.05					

KV grubunda; kanal patı grupları arasında HPDLF hücrelerinin 72. saat MTT düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır (p:0.716; p>0.05) (Tablo 4-4).

1:0 grubunda; kanal patı grupları arasında HPDLF hücrelerinin 72. saat MTT düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır (p:0.000; p<0.05) (Tablo 4-4). Anlamlılığın hangi gruplardan kaynaklandığının tespiti için yapılan ikili karşılaştırmalar sonrasında; TotalFill BC Sealer grubunun 72. saat MTT düzeyi Sealapex, Apexit Plus, AH Plus ve MTA-Fillapex gruplarından anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur (p<0.05). AH Plus grubunun 72. saat MTT düzeyi Sealapex, Apexit Plus ve MTA-Fillapex gruplarından anlamlı şekilde düşük bulunmuştur (p<0.05). MTA-Fillapex grubunun 72. saat MTT düzeyi Apexit Plus grubundan şekilde yüksek bulunmuştur (p<0.05). Diğer gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır (p>0.05) (Tablo 4-5).

1:1 grubunda; kanal patı grupları arasında HPDLF hücrelerinin 72. saat MTT düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır (p:0.000; p<0.05) (Tablo 4-4). Anlamlılığın hangi gruplardan kaynaklandığının tespiti için yapılan ikili

karşılaştırmalar sonrasında; TotalFill BC Sealer grubunun 72. saat MTT düzeyi Sealapex, Apexit Plus, AH Plus ve MTA-Fillapex gruplarından anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). AH Plus grubunun 72. saat MTT düzeyi Sealapex, Apexit Plus ve MTA-Fillapex gruplarından anlamlı şekilde düşük bulunmuştur ($p<0.05$). Diğer gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$) (Tablo 4-5).

1:2 grubunda; kanal patı grupları arasında HPDLF hücrelerinin 72. saat MTT düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p:0.000$; $p<0.05$) (Tablo 4-4). Anlamlılığın hangi gruplardan kaynaklandığının tespiti için yapılan ikili karşılaştırmalar sonrasında; TotalFill BC Sealer grubunun 72. saat MTT düzeyi Sealapex, Apexit Plus, AH Plus ve MTA-Fillapex gruplarından anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). AH Plus grubunun 72. saat MTT düzeyi Sealapex, Apexit Plus ve MTA-Fillapex gruplarından anlamlı şekilde düşük bulunmuştur ($p<0.05$). MTA-Fillapex grubunun 72. saat MTT düzeyi Apexit Plus grubundan şekilde düşük bulunmuştur ($p<0.05$). Diğer gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$) (Tablo 4-5).

1:4 grubunda; kanal patı grupları arasında HPDLF hücrelerinin 72. saat MTT düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p:0.000$; $p<0.05$) (Tablo 4-4). Anlamlılığın hangi gruplardan kaynaklandığının tespiti için yapılan ikili karşılaştırmalar sonrasında; TotalFill BC Sealer grubunun 72. saat MTT düzeyi Sealapex, Apexit Plus, AH Plus ve MTA-Fillapex gruplarından anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). AH Plus grubunun 72. saat MTT düzeyi Sealapex, Apexit Plus ve MTA-Fillapex gruplarından anlamlı şekilde düşük bulunmuştur ($p<0.05$). Diğer gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$) (Tablo 4-5).

1:8 grubunda; kanal patı grupları arasında HPDLF hücrelerinin 72. saat MTT düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p:0.000$; $p<0.05$) (Tablo 4-4). Anlamlılığın hangi gruplardan kaynaklandığının tespiti için yapılan ikili karşılaştırmalar sonrasında; TotalFill BC Sealer grubunun 72. saat MTT düzeyi Sealapex, Apexit Plus, AH Plus ve MTA-Fillapex gruplarından anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). Apexit Plus grubunun 72. saat MTT düzeyi AH Plus ve MTA-Fillapex gruplarından anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). Diğer gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$) (Tablo 4-5).

Tablo 4-6: Kanal patlarının farklı dilüsyonlarının ve kontrol vasatının HPDLF hücrelerinde 72. saat MTT düzeylerinin Post hoc değerlendirilme sonuçları

		Sealapex	Apexit Plus	AH Plus	TotalFill BC Sealer	MTA- Fillapex
		P	P	P	P	P
KV	1:0	0,004*	0,004*	0,004*	0,004*	0,004*
	1:1	0,004*	0,004*	0,004*	0,004*	0,004*
	1:2	0,004*	0,004*	0,004*	0,054	0,004*
	1:4	0,004*	0,004*	0,004*	0,200	0,004*
	1:8	0,004*	0,004*	0,004*	0,337	0,004*
1:0	1:1	0,150	0,262	0,688	0,109	0,200
	1:2	0,055	0,010*	0,078	0,054	0,631
	1:4	0,055	0,004*	0,004*	0,078	0,010*
	1:8	0,055	0,004*	0,004*	0,004*	0,010*
1:1	1:2	0,004*	0,423	0,055	0,016*	0,337
	1:4	0,004*	0,055	0,004*	0,010*	0,006*
	1:8	0,004*	0,055	0,004*	0,004*	0,006*
1:2	1:4	0,378	0,873	0,004*	0,748	0,006*
	1:8	0,150	0,109	0,004*	0,037*	0,006*
1:4	1:8	0,423	0,078	0,016*	0,025*	0,748

Mann Whitney U Test

* $p < 0.05$

Sealapex grubunda; dilüsyon grupları arasında HPDLF hücrelerinin 72. saat MTT düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p:0.000$; $p < 0.05$) (Tablo 4-4). Anlamlılığın hangi gruplardan kaynaklandığının tespiti için yapılan ikili karşılaştırmalar sonrasında; KV grubunun 72. saat MTT düzeyi diğer tüm gruplardan anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p < 0.05$). 1:1 grubunun 72. saat MTT düzeyi 1:2, 1:4 ve 1:8 gruplarından anlamlı şekilde düşük bulunmuştur ($p < 0.05$). Diğer gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p > 0.05$) (Tablo 4-6).

Apexit Plus grubunda; dilüsyon grupları arasında HPDLF hücrelerinin 72. saat MTT düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p:0.000$; $p < 0.05$) (Tablo 4-4). Anlamlılığın hangi gruplardan kaynaklandığının tespiti için yapılan ikili karşılaştırmalar sonrasında; KV grubunun 72. saat MTT düzeyi diğer tüm gruplardan anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p < 0.05$). 1:0 grubunun 72. saat MTT düzeyi 1:2, 1:4

ve 1:8 gruplarından anlamlı şekilde düşük bulunmuştur ($p<0.05$). Diğer gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$) (Tablo 4-6).

AH Plus grubunda; dilüsyon grupları arasında HPDLF hücrelerinin 72. saat MTT düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p:0.000$; $p<0.05$) (Tablo 4-4). Anlamlılığın hangi gruplardan kaynaklandığının tespiti için yapılan ikili karşılaştırmalar sonrasında; KV grubunun 72. saat MTT düzeyi diğer tüm gruplardan anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). 1:8 grubunun 72. saat MTT düzeyi 1:0, 1:1, 1:2 ve 1:4 gruplarından anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). 1:4 grubunun 72. saat MTT düzeyi 1:0, 1:1 ve 1:2 gruplarından anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). Diğer gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$) (Tablo 4-6).

TotalFill BC Sealer grubunda; dilüsyon grupları arasında HPDLF hücrelerinin 72. saat MTT düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p:0.000$; $p<0.05$) (Tablo 4-4). Anlamlılığın hangi gruplardan kaynaklandığının tespiti için yapılan ikili karşılaştırmalar sonrasında; 1:8 grubunun 72. saat MTT düzeyi 1:0, 1:1, 1:2 ve 1:4 gruplarından anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). KV grubunun 72. saat MTT düzeyi 1:0 ve 1:1 gruplarından anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). 1:2 ve 1:4 gruplarının 72. saat MTT düzeyi 1:1 grubundan anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). Diğer gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$) (Tablo 4-6).

MTA-Fillapex grubunda; dilüsyon grupları arasında HPDLF hücrelerinin 72. saat MTT düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p:0.000$; $p<0.05$) (Tablo 4-4). Anlamlılığın hangi gruplardan kaynaklandığının tespiti için yapılan ikili karşılaştırmalar sonrasında; KV grubunun 72. saat MTT düzeyi diğer tüm gruplardan anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). 1:8 grubunun 72. saat MTT düzeyi 1:0, 1:1 ve 1:2 gruplarından anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). 1:4 grubunun 72. saat MTT düzeyi 1:0, 1:1 ve 1:2 gruplarından anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). Diğer gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$) (Tablo 4-6).

Tablo 4-7: HPDLF Hücrelerinin 24. saat ve 72. saat MTT düzeylerinin değerlendirilmesi

		KV	1:0	1:1	1:2	1:4	1:8
HPDLF		Ort±SS (medyan)	Ort±SS (medyan)	Ort±SS (medyan)	Ort±SS (medyan)	Ort±SS (medyan)	Ort±SS (medyan)
Sealapex	24.	1,82±0,06	0,76±0,12	0,98±0,08	0,91±0,08	1,35±0,09	1,41±0,11
	sa.	(1,82)	(0,79)	(0,95)	(0,93)	(1,37)	(1,39)
	72.	1,59±0,17	0,64±0,39	0,58±0,07	0,77±0,06	0,82±0,07	0,85±0,08
	sa.	(1,5)	(0,47)	(0,59)	(0,78)	(0,81)	(0,88)
	p	0,037*	0,055	0,004*	0,016*	0,004*	0,004*
Apexit Plus	24.	1,85±0,07	0,56±0,07	0,95±0,11	0,91±0,13	1,36±0,07	1,35±0,09
	sa.	(1,86)	(0,56)	(0,95)	(0,94)	(1,39)	(1,33)
	72.	1,63±0,24	0,56±0,15	0,67±0,29	0,84±0,16	0,9±0,04	1,0±0,14
	sa.	(1,62)	(0,62)	(0,76)	(0,86)	(0,89)	(0,98)
	p	0,037*	0,423	0,078	0,522	0,004*	0,004*
AH Plus	24.	1,81±0,02	0,32±0,15	0,54±0,05	0,59±0,14	0,86±0,04	0,93±0,13
	sa.	(1,82)	(0,37)	(0,51)	(0,60)	(0,86)	(0,93)
	72.	1,54±0,19	0,26±0,1	0,25±0,08	0,38±0,1	0,68±0,06	0,79±0,06
	sa.	(1,51)	(0,27)	(0,27)	(0,36)	(0,67)	(0,78)
	p	0,006*	0,423	0,004*	0,016*	0,004*	0,109
TotalFill BC Sealer	24.	1,88±0,04	1,41±0,14	1,30±0,12	1,75±0,07	1,89±0,05	2,01±0,06
	sa.	(1,86)	(1,38)	(1,27)	(1,72)	(1,88)	(2,02)
	72.	1,62±0,18	1,26±0,08	1,12±0,17	1,42±0,17	1,46±0,2	1,8±0,28
	sa.	(1,63)	(1,25)	(1,06)	(1,38)	(1,47)	(1,77)
	p	0,004*	0,078	0,109	0,004*	0,004*	0,200
MTA- Fillapex	24.	1,81±0,07	0,48±0,11	0,60±0,22	0,92±0,10	0,91±0,12	1,06±0,12
	sa.	(1,83)	(0,45)	(0,59)	(0,95)	(0,86)	(1,06)
	72.	1,64±0,15	0,7±0,06	0,58±0,14	0,68±0,03	0,83±0,07	0,83±0,09
	sa.	(1,66)	(0,68)	(0,57)	(0,67)	(0,85)	(0,83)
	p	0,030*	0,016*	0,936	0,004*	0,423	0,010*

Mann Whitney U Test

* $p < 0.05$

Sealapex Kanal Patı Kullanıldığında;

KV grubunun 24. saat MTT düzeyi 72. saatten istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p:0.037$; $p<0.05$).

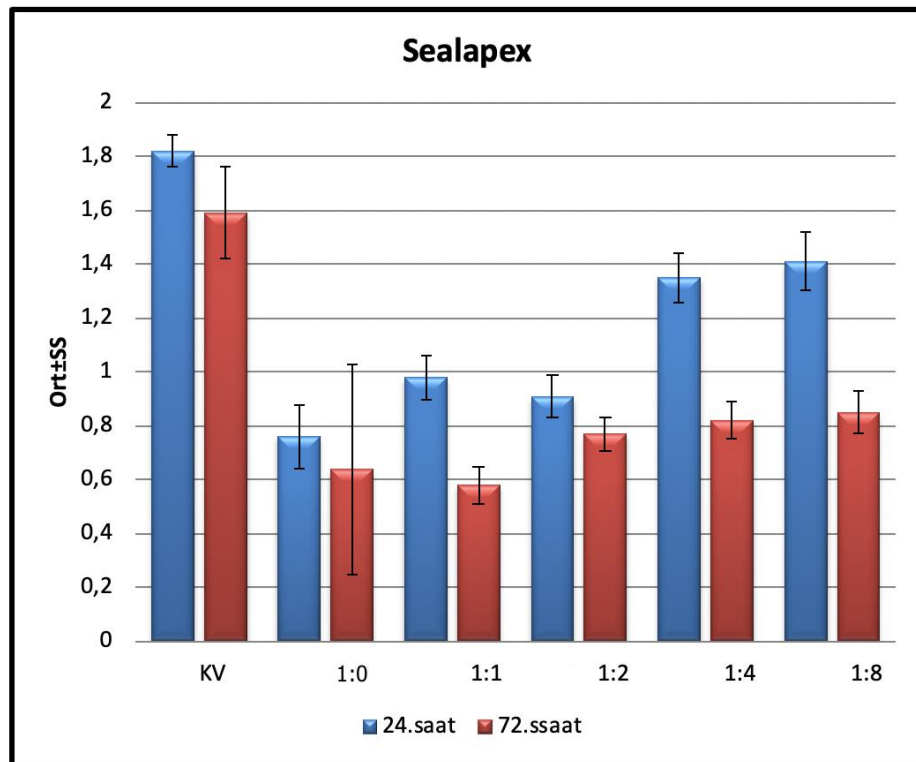
1:0 grubunun 24. saat ve 72. saat MTT düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p:0.055$; $p>0.05$).

1:1 grubunun 24. saat MTT düzeyi 72. saatten istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p:0.004$; $p<0.05$).

1:2 grubunun 24. saat MTT düzeyi 72. saatten istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p:0.016$; $p<0.05$).

1:4 grubunun 24. saat MTT düzeyi 72. saatten istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p:0.004$; $p<0.05$).

1:8 grubunun 24. saat MTT düzeyi 72. saatten istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p:0.004$; $p<0.05$).



Apexit Plus Kanal Patı Kullanıldığında;

KV grubunun 24. saat MTT düzeyi 72. saatten istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p=0.037$; $p<0.05$).

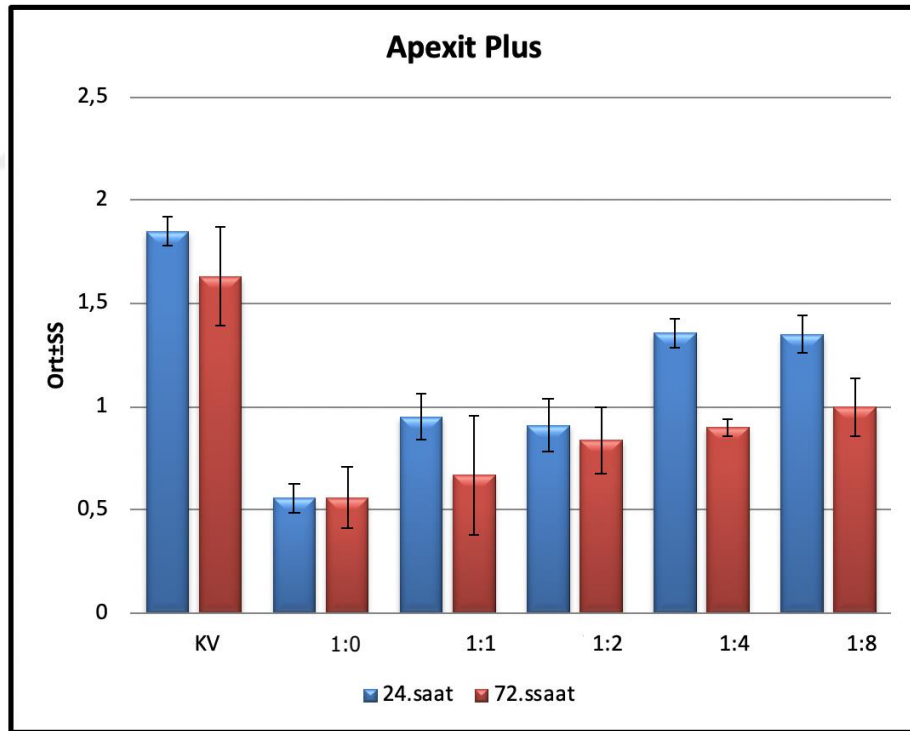
1:0 grubunun 24. saat ve 72. saat MTT düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p=0.423$; $p>0.05$).

1:1 grubunun 24. saat ve 72. saat MTT düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p=0.078$; $p>0.05$).

1:2 grubunun 24. saat ve 72. saat MTT düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p=0.522$; $p>0.05$).

1:4 grubunun 24. saat MTT düzeyi 72. saatten istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p=0.004$; $p<0.05$).

1:8 grubunun 24. saat MTT düzeyi 72. saatten istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p=0.004$; $p<0.05$).



AH Plus Kanal Patı Kullanıldığında;

KV grubunun 24. saat MTT düzeyi 72. saatten istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p:0.006$; $p<0.05$).

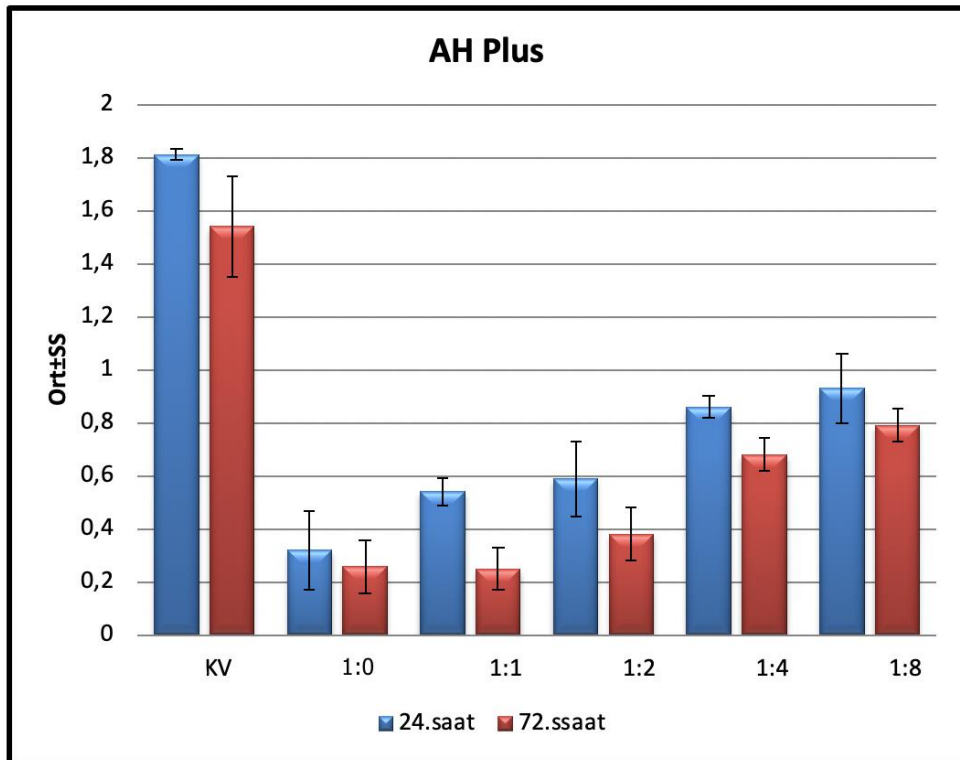
1:0 grubunun 24. saat ve 72. saat MTT düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p:0.423$; $p>0.05$).

1:1 grubunun 24. saat MTT düzeyi 72. saatten istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p:0.004$; $p<0.05$).

1:2 grubunun 24. saat MTT düzeyi 72. saatten istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p:0.016$; $p<0.05$).

1:4 grubunun 24. saat MTT düzeyi 72. saatten istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p:0.004$; $p<0.05$).

1:8 grubunun 24. saat ve 72. saat MTT düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p:0.109$; $p>0.05$).



TotalFill BC Sealer Kanal Patı Kullanıldığında;

KV grubunun 24. saat MTT düzeyi 72. saatten istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p:0.004$; $p<0.05$).

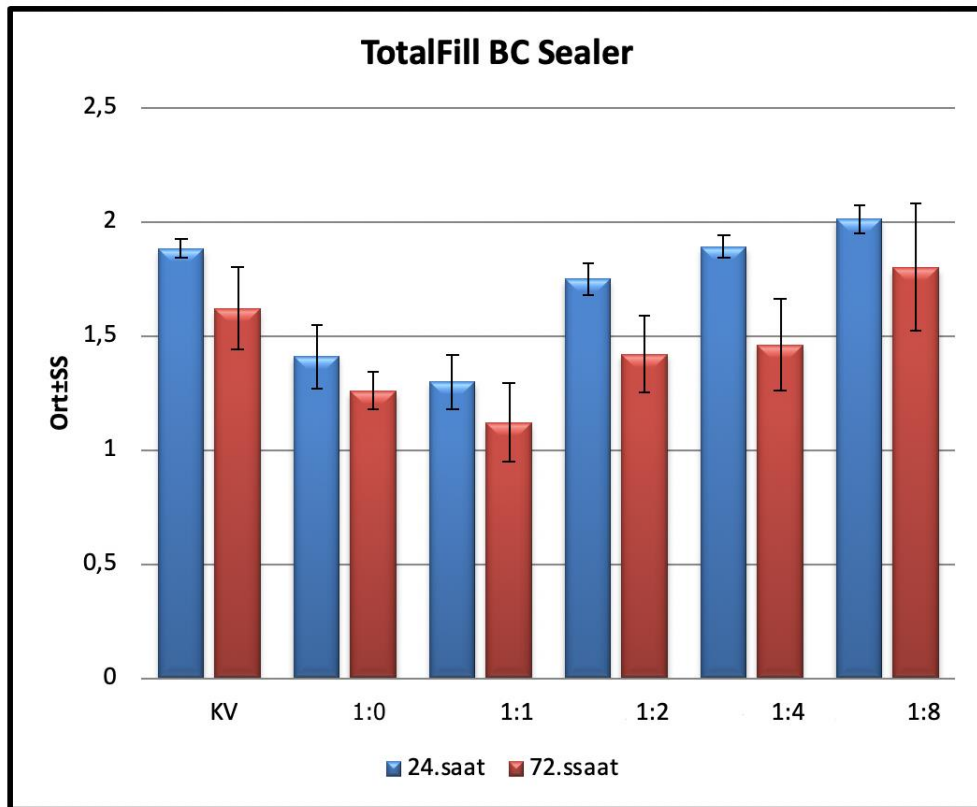
1:0 grubunun 24. saat ve 72. saat MTT düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p:0.078$; $p>0.05$).

1:1 grubunun 24. saat ve 72. saat MTT düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p:0.109$; $p>0.05$).

1:2 grubunun 24. saat MTT düzeyi 72. saatten istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p:0.004$; $p<0.05$).

1:4 grubunun 24. saat MTT düzeyi 72. saatten istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p:0.004$; $p<0.05$).

1:8 grubunun 24. saat ve 72. saat MTT düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p:0.200$; $p>0.05$).



MTA-Fillapex Kanal Patı Kullanıldığında;

KV grubunun 24. saat MTT düzeyi 72. saatten istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p:0.030$; $p<0.05$).

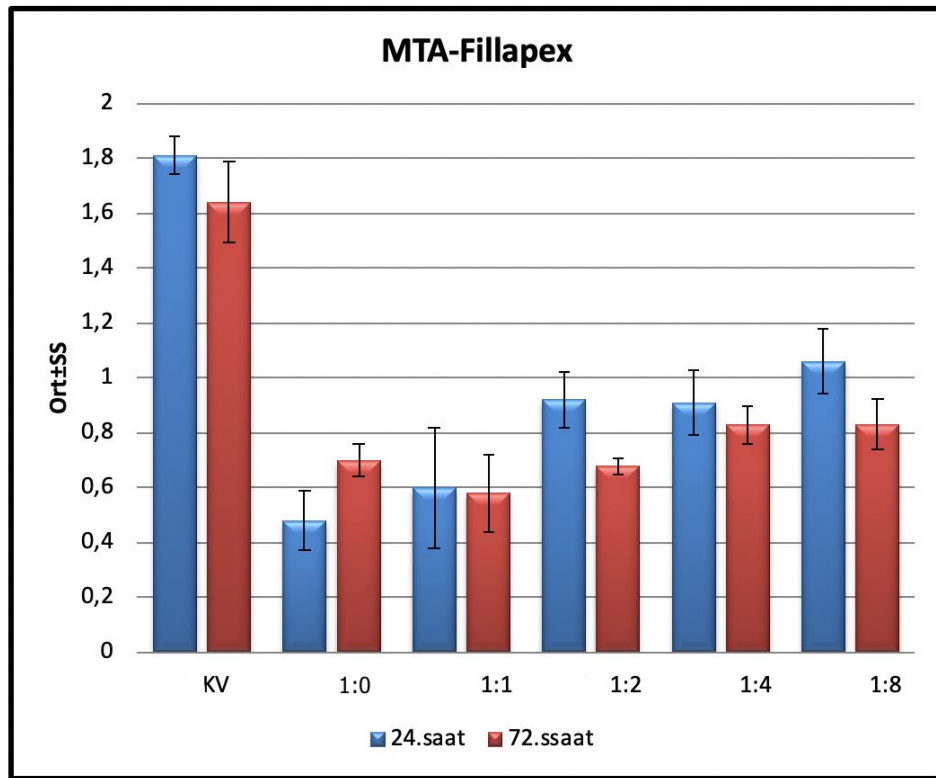
1:0 grubunun 24. saat MTT düzeyi 72. saatten istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük bulunmuştur ($p:0.016$; $p<0.05$).

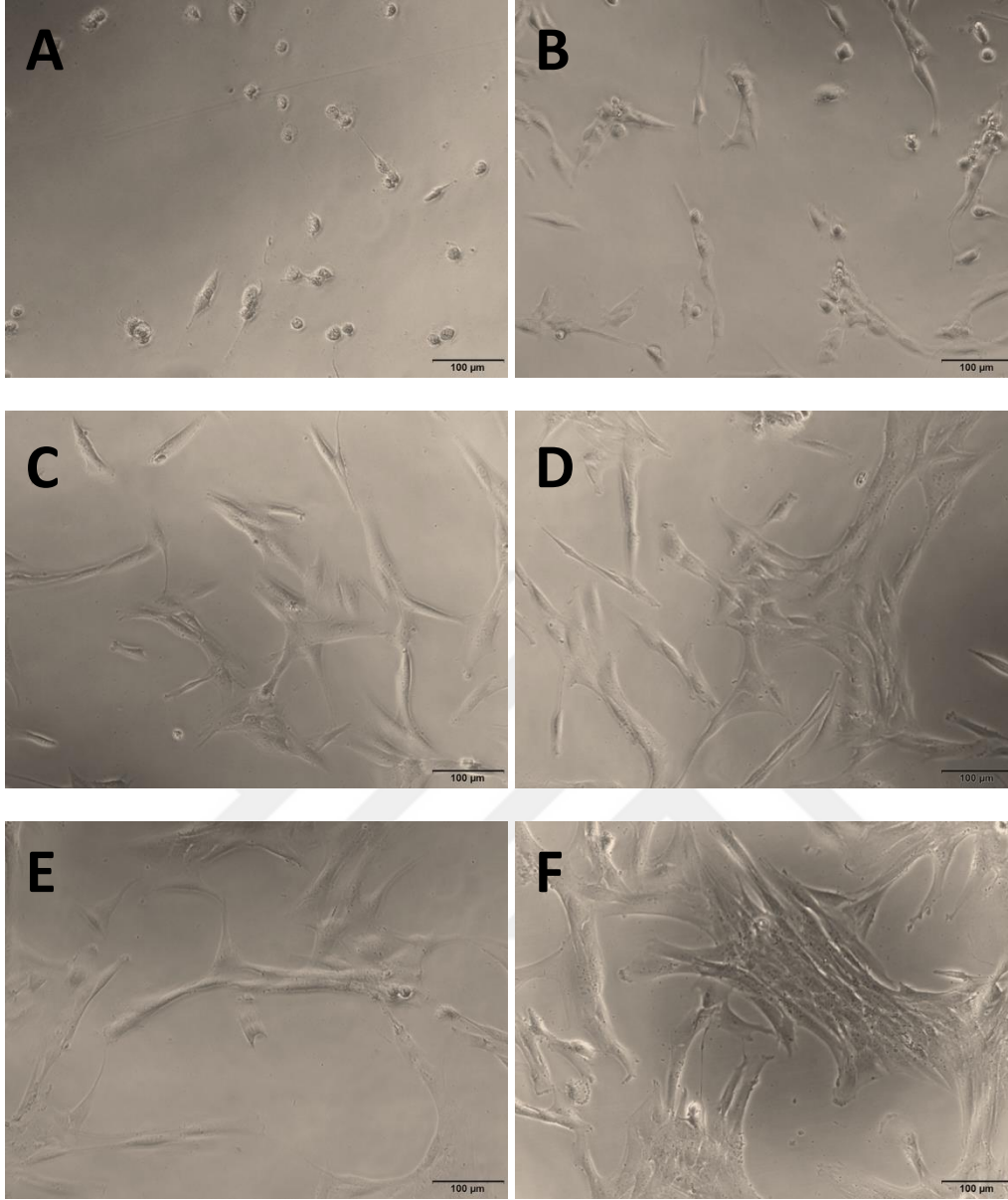
1:1 grubunun 24. saat ve 72. saat MTT düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p:0.936$; $p>0.05$).

1:2 grubunun 24. saat MTT düzeyi 72. saatten istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p:0.004$; $p<0.05$).

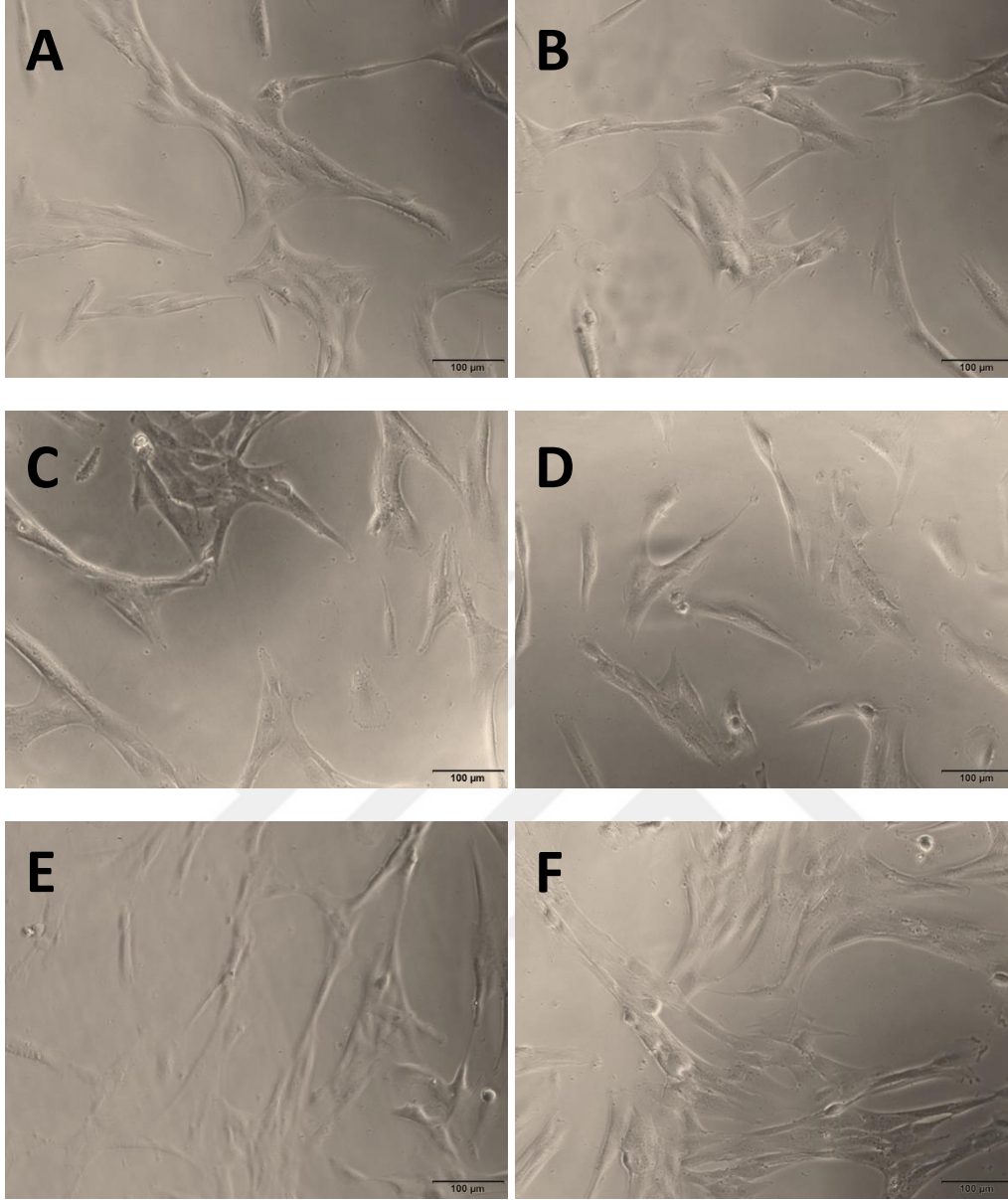
1:4 grubunun 24. saat ve 72. saat MTT düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p:0.423$; $p>0.05$).

1:8 grubunun 24. saat MTT düzeyi 72. saatten istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p:0.010$; $p<0.05$).

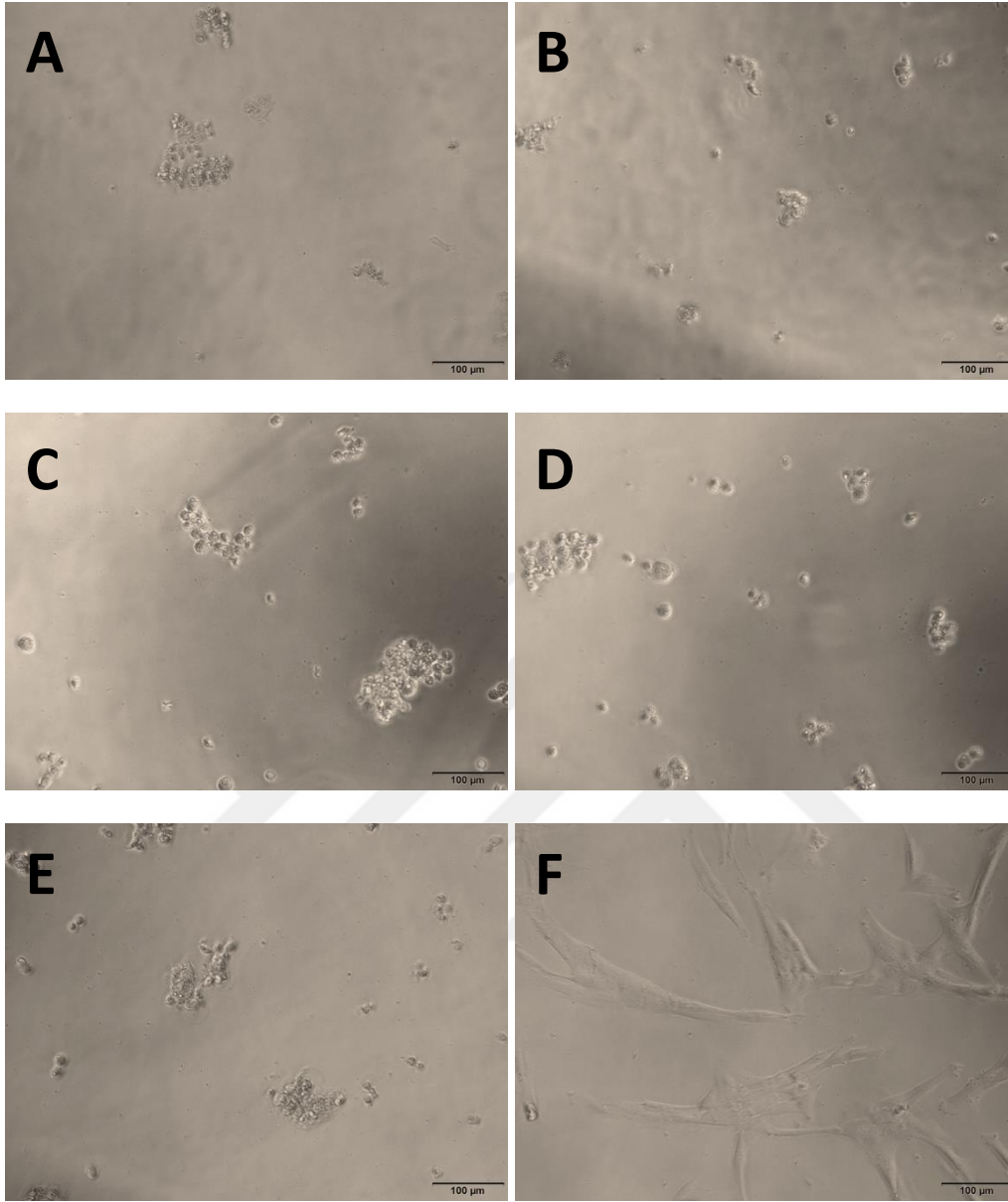




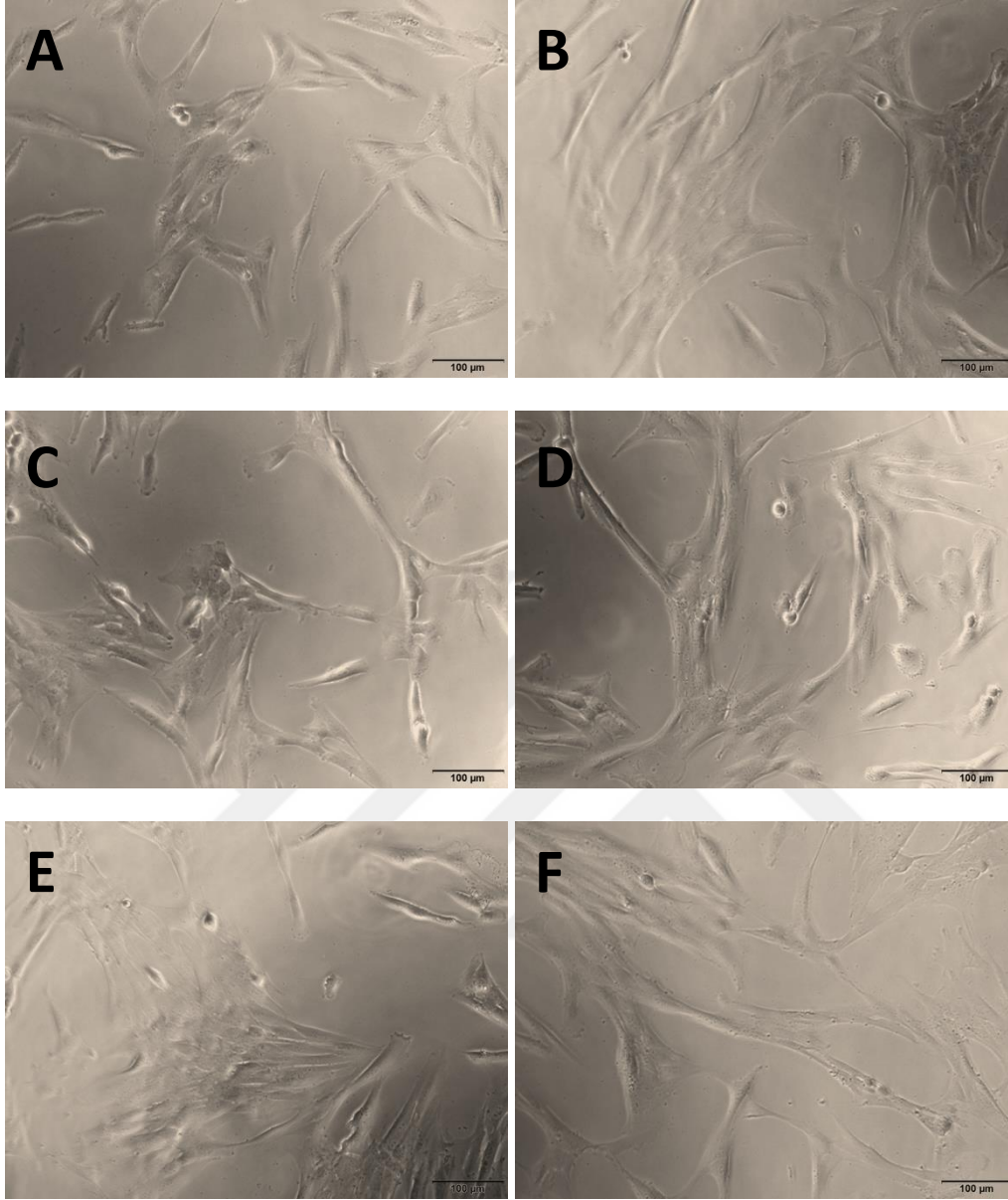
Şekil 4-4: HPDLF hücrelerinin 24 saat 1:0 (A), 1:1 (B), 1:2 (C), 1:4 (D), 1:8 (E) dilüsyonlarında Sealapex ve kontrol vasatı (F) uygulaması yapıldıktan sonra MTT görüntüleri. Ölçek: 100 µm.



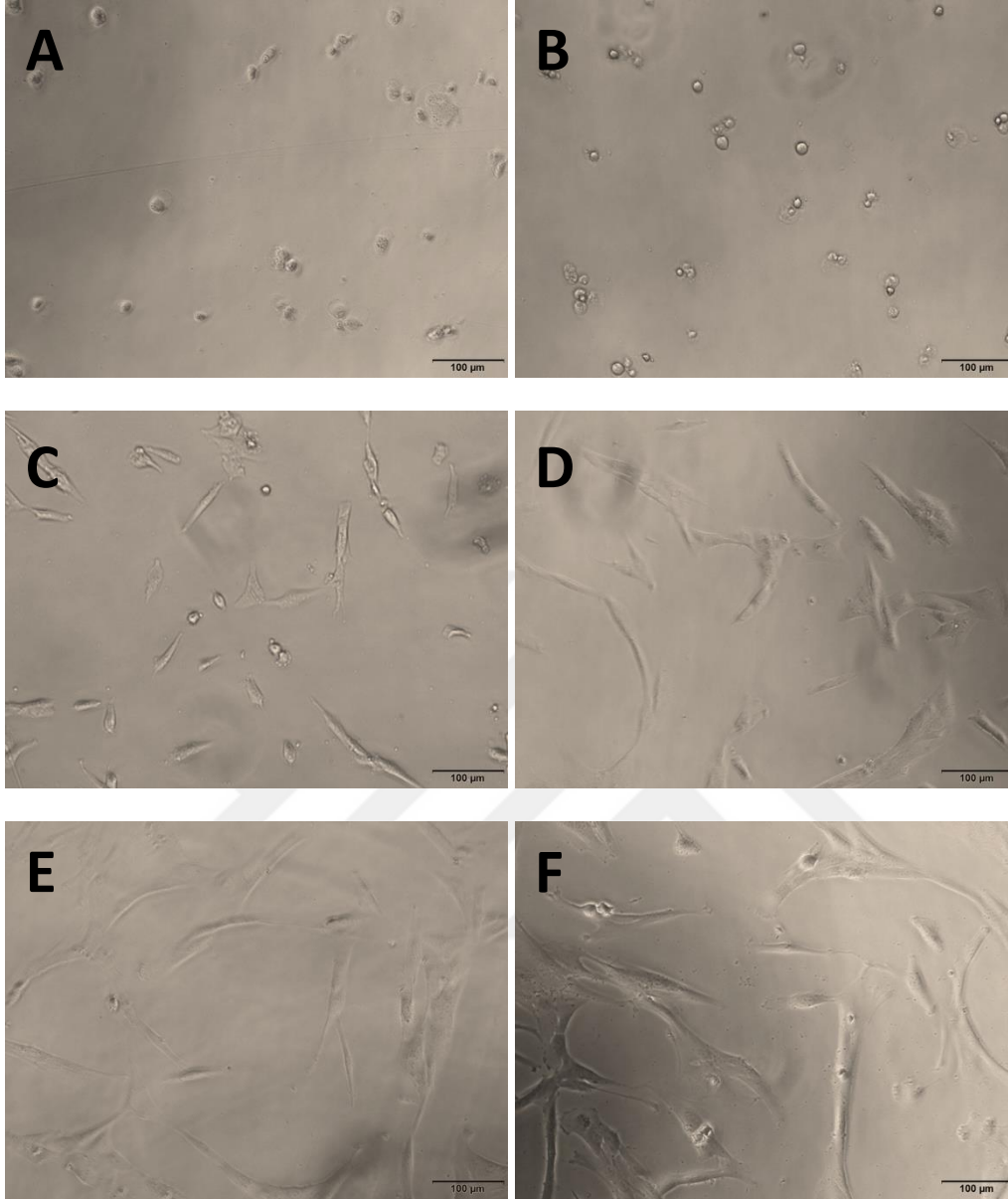
Şekil 4-5: HPDLF hücrelerinin 24 saat 1:0 (A), 1:1 (B), 1:2 (C), 1:4 (D), 1:8 (E) dilüsyonlarında Apexit Plus ve kontrol vasatı (F) uygulaması yapıldıktan sonra MTT görüntüleri. Ölçek: 100 µm.



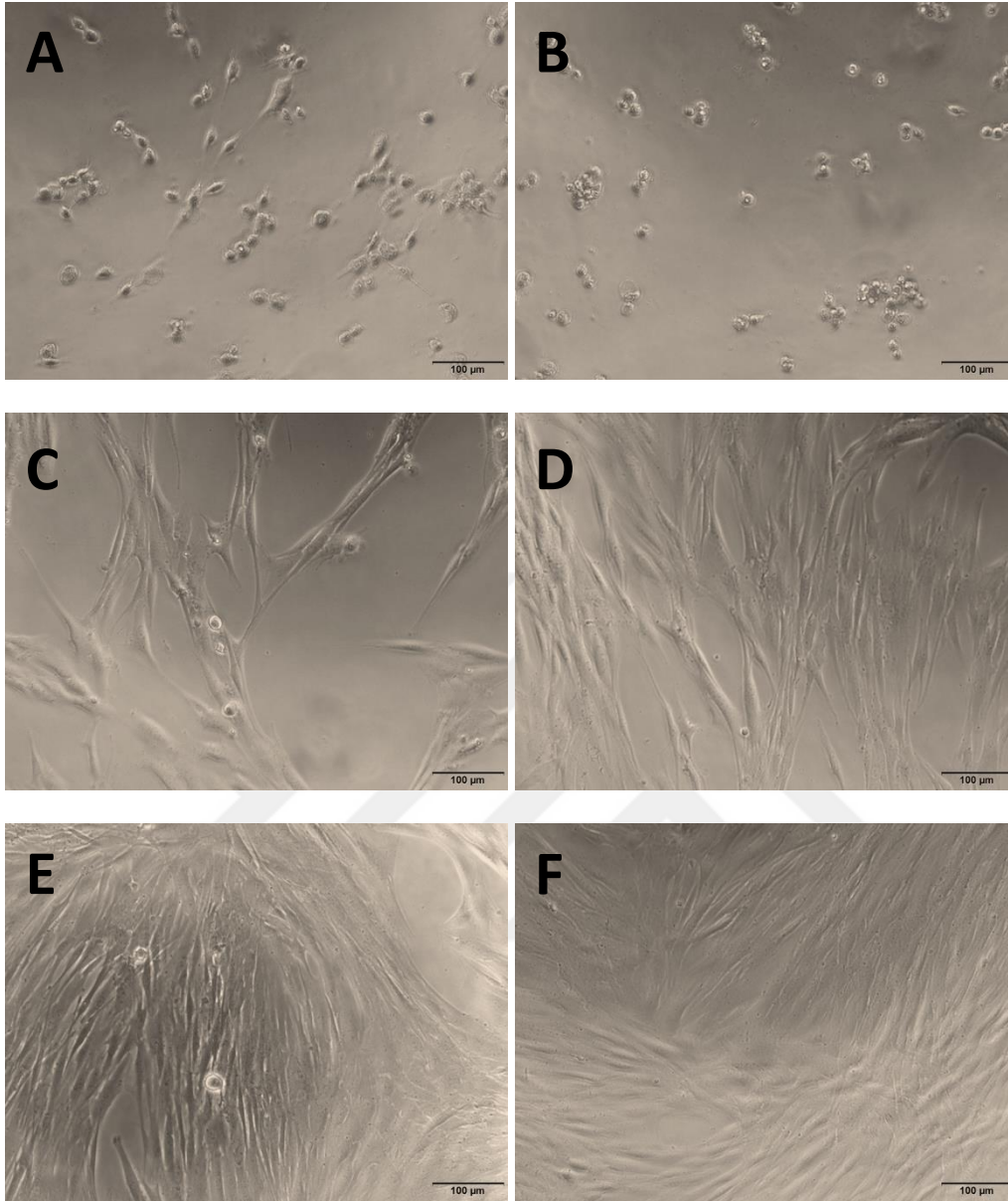
Şekil 4-6: HPDLF hücrelerinin 24 saat 1:0 (A), 1:1 (B), 1:2 (C), 1:4 (D), 1:8 (E) dilüsyonlarında AH Plus ve kontrol vasatı (F) uygulaması yapıldıktan sonra MTT görüntüleri. Ölçek: 100 µm.



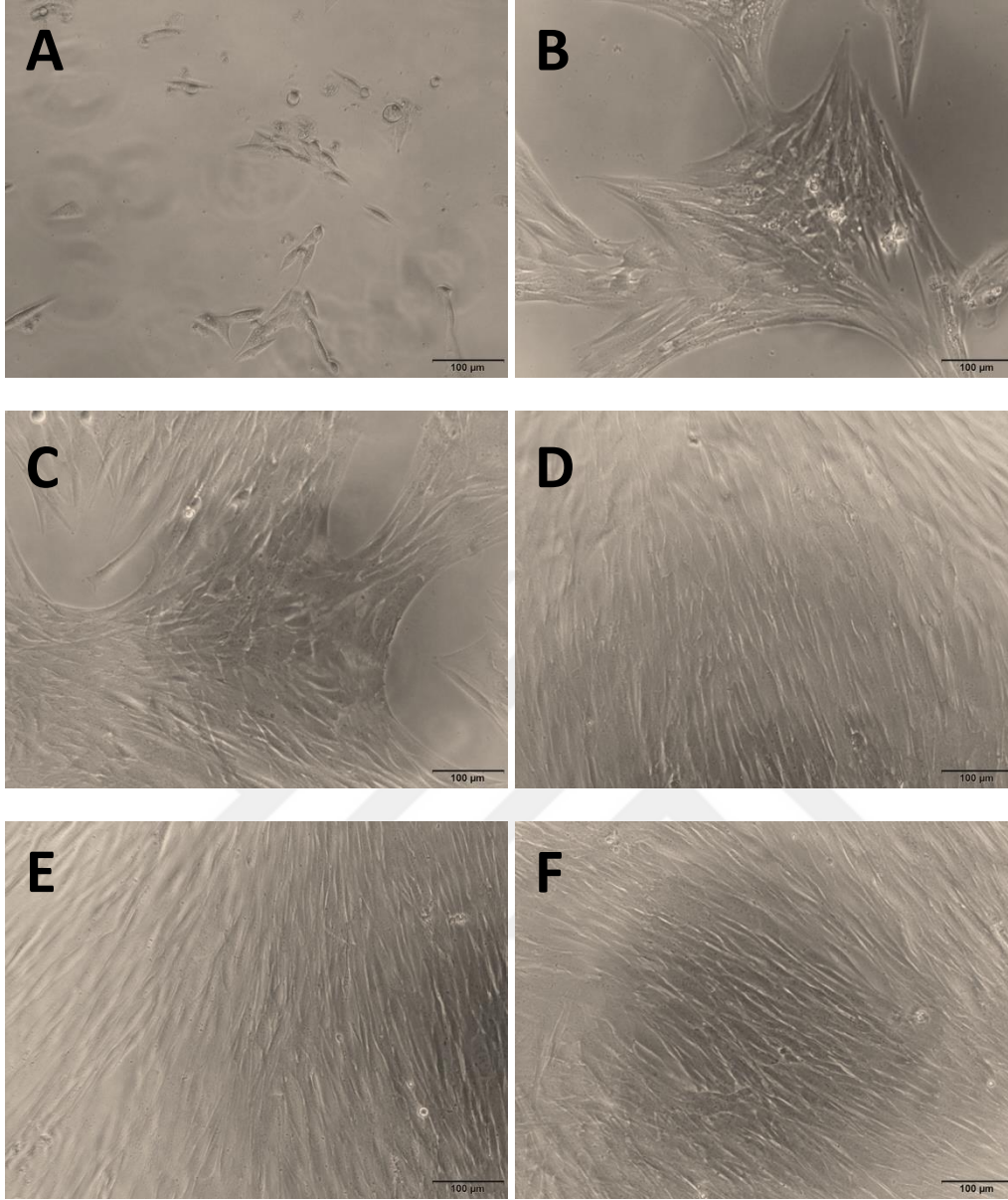
Şekil 4-7: HPDLF hücrelerinin 24 saat 1:0 (A), 1:1 (B), 1:2 (C), 1:4 (D), 1:8 (E) dilüsyonlarında TotalFill BC Sealer ve kontrol vasatı (F) uygulaması yapıldıktan sonra MTT görüntüleri. Ölçek: 100 µm.



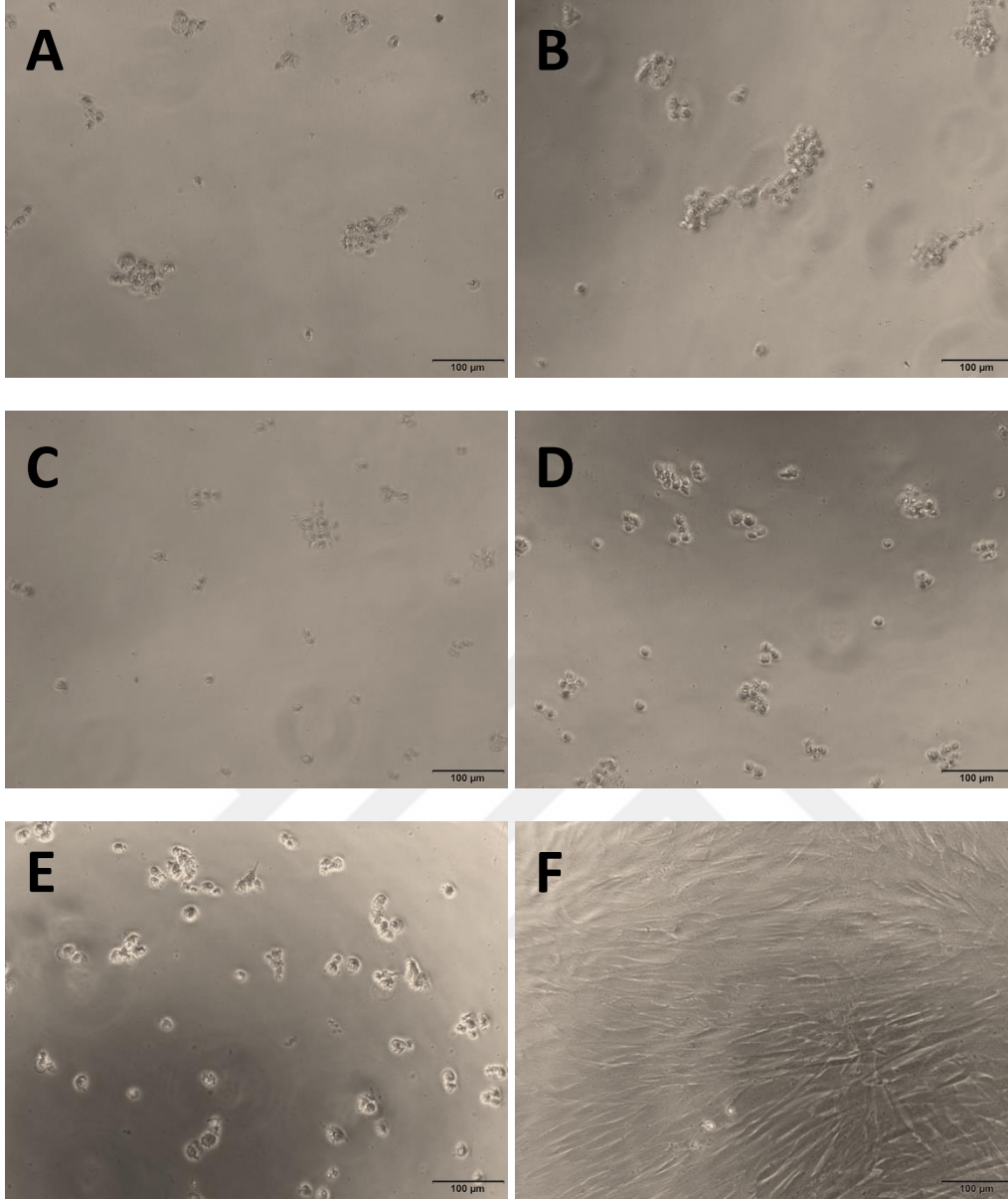
Şekil 4-8: HPDLF hücrelerinin 24 saat 1:0 (A), 1:1 (B), 1:2 (C), 1:4 (D), 1:8 (E) dilüsyonlarında MTA-Fillapex ve kontrol vasatı (F) uygulaması yapıldıktan sonra MTT görüntüleri. Ölçek: 100 µm.



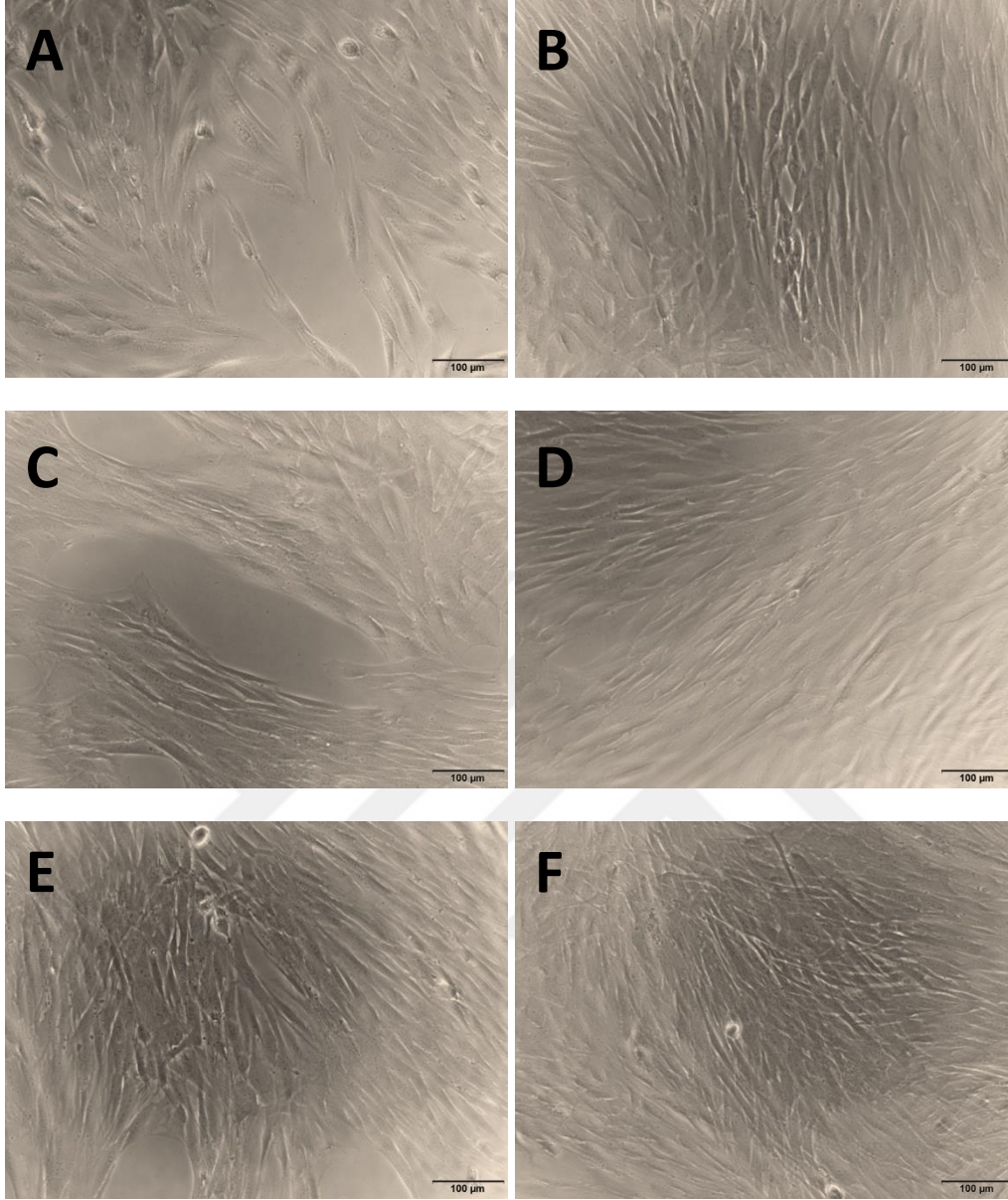
Şekil 4-9: HPDLF hücrelerinin 72 saat 1:0 (A), 1:1 (B), 1:2 (C), 1:4 (D), 1:8 (E) dilüsyonlarında Sealapex ve kontrol vasatı (F) uygulaması yapıldıktan sonra MTT görüntüleri. Ölçek: 100 µm.



Şekil 4-10: HPDLF hücrelerinin 72 saat 1:0 (A), 1:1 (B), 1:2 (C), 1:4 (D), 1:8 (E) dilüsyonlarında Apexit Plus ve kontrol vasatı (F) uygulaması yapıldıktan sonra MTT görüntüleri. Ölçek: 100 µm.



Şekil 4-11: HPDLF hücrelerinin 72 saat 1:0 (A), 1:1 (B), 1:2 (C), 1:4 (D), 1:8 (E) dilüsyonlarında AH Plus ve kontrol vasatı (F) uygulaması yapıldıktan sonra MTT görüntüleri. Ölçek: 100 µm.



Şekil 4-12: HPDLF hücrelerinin 72 saat 1:0 (A), 1:1 (B), 1:2 (C), 1:4 (D), 1:8 (E) dilüsyonlarında TotalFill BC Sealer ve kontrol vasatı (F) uygulaması yapıldıktan sonra MTT görüntüleri. Ölçek: 100 µm.

4.3. TUNEL Bulguları

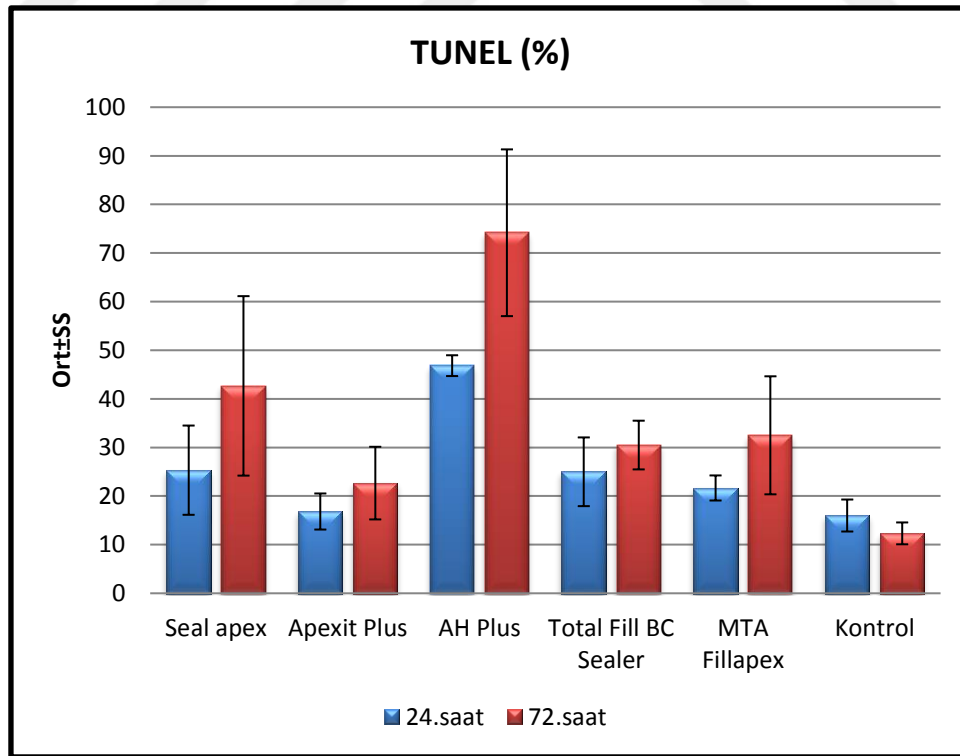
Tablo 4-8: HPDLF hücrelerinde 24.saat ve 72.saatlerde TUNEL % düzeylerinin değerlendirilmesi

HPDLF	TUNEL %		² p
	24.saat	72.saat	
	Ort±SS (medyan)	Ort±SS (medyan)	
Sealapex	25,33±9,18 (25,5)	42,67±18,46 (37,5)	0,040*
Apexit Plus	16,83±3,71 (17,5)	22,67±7,47 (24,5)	0,092
AH Plus	46,83±2,14 (46,5)	74,17±17,15 (72,5)	0,005*
TotalFill BC Sealer	25±7,07 (25)	30,5±5,01 (32)	0,222
MTA-Fillapex	21,67±2,58 (20)	32,5±12,14 (32,5)	0,071
Kontrol	16±3,29 (15)	12,33±2,25 (12)	0,070
¹ p	0,000*	0,000*	

¹Kruskal Wallis Test

²Mann Whitney U Test

* $p < 0.05$



Tablo 4-9: HPDLF hücrelerinde 24. saat ve 72. saatlerde TUNEL % düzeylerinin Post hoc değerlendirilme sonuçları

		TUNEL %	
		24.saat	72.saat
		p	p
Sealapex	Apexit Plus	0,199	0,024*
	AH Plus	0,004*	0,020*
	TotalFill BC Sealer	0,807	0,170
	MTA-Fillapex	0,411	0,376
	Kontrol	0,045*	0,004*
Apexit Plus	AH Plus	0,004*	0,004*
	TotalFill BC Sealer	0,053	0,077
	MTA-Fillapex	0,076	0,128
	Kontrol	0,514	0,035*
AH Plus	TotalFill BC Sealer	0,004*	0,004*
	MTA-Fillapex	0,003*	0,005*
	Kontrol	0,004*	0,004*
TotalFill BC Sealer	MTA-Fillapex	0,310	0,627
	Kontrol	0,023*	0,004*
MTA-Fillapex	Kontrol	0,016*	0,006*
Mann Whitney U Test		*p<0.05	

Gruplar arasında HPDLF hücrelerinin 24. saat TUNEL % düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p=0.000$; $p<0.05$) (Tablo 4-8). Anlamlılığın hangi gruplardan kaynaklandığının tespiti için yapılan ikili karşılaştırmalar sonrasında; AH Plus grubunun 24. saat TUNEL % düzeyleri Sealapex, Apexit Plus, TotalFill BC Sealer, MTA-Fillapex ve Kontrol gruplardan anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). Kontrol grubunun 24. saat TUNEL % düzeyleri Sealapex, TotalFill BC Sealer, MTA-Fillapex gruplarından anlamlı şekilde düşük bulunmuştur ($p<0.05$). Diğer gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$) (Tablo 4-9).

Gruplar arasında HPDLF hücrelerinin 72. saat TUNEL % düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p:0.000$; $p<0.05$) (Tablo 4-8). Anlamlılığın hangi gruplardan kaynaklandığının tespiti için yapılan ikili karşılaştırmalar sonrasında; AH Plus grubunun 72. saat TUNEL % düzeyleri Sealapex, Apexit Plus, TotalFill BC Sealer, MTA-Fillapex ve Kontrol gruplardan anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). Kontrol grubunun 72. saat TUNEL % düzeyleri Sealapex, Apexit Plus, TotalFill BC Sealer ve MTA-Fillapex gruplarından anlamlı şekilde düşük bulunmuştur ($p<0.05$). Apexit Plus grubunun 72. saat TUNEL % düzeyleri, Sealapex grubundan anlamlı şekilde düşük bulunmuştur ($p<0.05$). Diğer gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$) (Tablo 4-9).

Sealapex grubunda; HPDLF hücrelerinin 24. saat TUNEL % düzeyleri 72. saatten istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur ($p:0.040$; $p<0.05$).

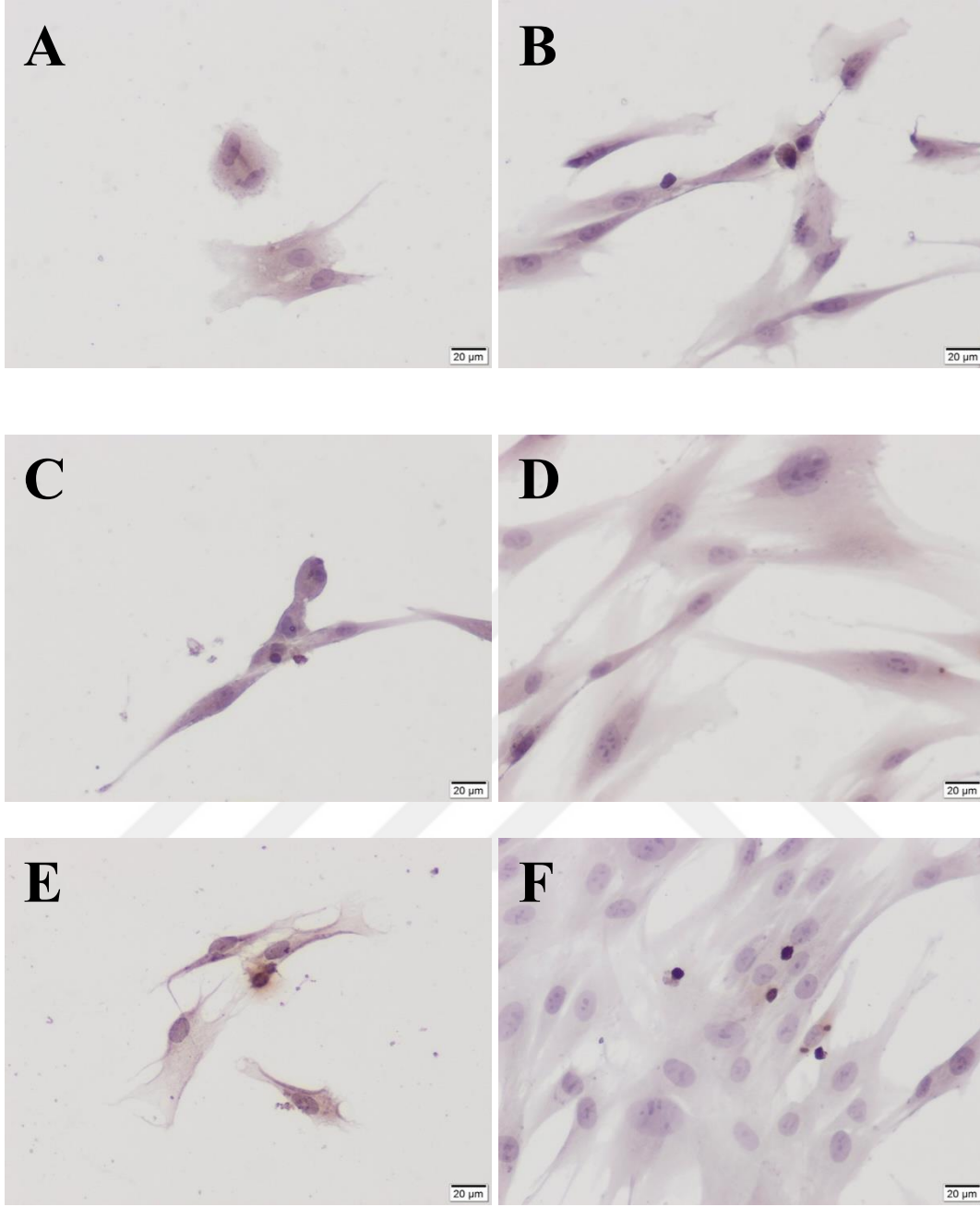
Apexit Plus grubunda; HPDLF hücrelerinin 24. saat ve 72. saat TUNEL % düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$).

AH Plus grubunda; HPDLF hücrelerinin 24. saat TUNEL % düzeyleri 72. saatten istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur ($p:0.005$; $p<0.05$).

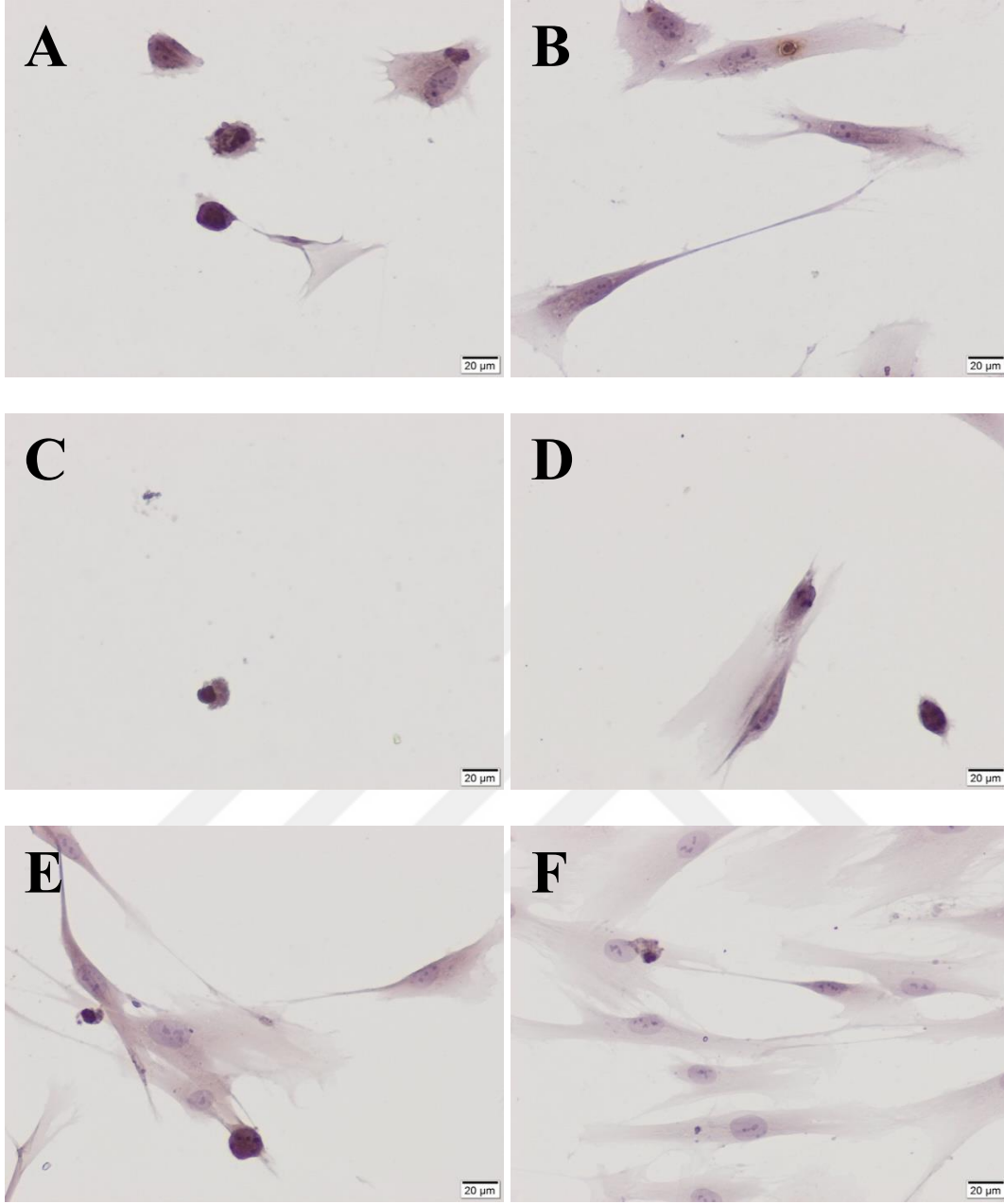
TotalFill BC Sealer grubunda; HPDLF hücrelerinin 24. saat ve 72. saat TUNEL % düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$).

MTA-Fillapex grubunda; HPDLF hücrelerinin 24. saat ve 72. saat TUNEL % düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$).

Kontrol grubunda; HPDLF hücrelerinin 24. saat ve 72. saat TUNEL % düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$).



Şekil 4-13: HPDLF hücrelerinin optimal konsantrasyonda Sealapex (A), Apexit Plus (B), AH Plus (C), TotalFill BC Sealer (D), MTA-Fillapex (E) pat uygulaması 24 saat yapıldıktan sonra TUNEL immunoreaktivitesi ve Kontrol (F) TUNEL immunohistokimya boyaması. Ölçek: 20 µm.



Şekil 4-14: HPDLF hücrelerinin optimal konsantrasyonda Sealapex (A), Apexit Plus (B), AH Plus (C), TotalFill BC Sealer (D), MTA-Fillapex (E) pat uygulaması 72 saat yapıldıktan sonra TUNEL immunoreaktivitesi ve Kontrol (F) TUNEL immunohistokimya boyaması. Ölçek: 20 µm.

5. TARTIŞMA

Kök kanal tedavisinde amaç; çeşitli nedenlerle vitalitesini kaybeden ve pulpası geri dönüşsüz olarak zarar gören dişlerin, periapikal dokularında ve kök kanalında ideal şartların sağlanarak dişin uzun dönem ağız içinde fonksiyon görmesidir. Kök kanal tedavisinde yapılan işlem dişte kök kanal aletleri ve irrigasyon solüsyonları ile kemomekanik temizlik sağlandıktan sonra ideal iyileşme koşulları ve periapikal bütünlüğü sağlayarak kök kanalının apikalde tıkanmasını sağlayacak özellikte olan kök kanal dolgu maddeleri ile doldurulmasıdır (113). Bu amaçla kök kanal dolgu patı ve guta perka konlar birlikte kullanılmaktadır (115). Bu materyallerin periapikal dokularla minimum temasta olması istenmektedir. Bununla birlikte tedavi esnasında kullanılan malzemeler direkt temasla veya doku sıvıları aracılığıyla periapikal dokulara taşabilmektedir ve her zaman periradiküler doku reaksiyonuyla uzaklaştırılamayabilir, tamir süresini değiştirebilir ve farklı doku reaksiyonlarına neden olabilmektedir (116).

Bu sebeple klinikte kullanılmadan önce endodontik materyallerin in vitro sitotoksik çalışmaları, güvenliklerinin değerlendirilmesine yönelik ilk adımdır (117).

Diş hekimliğinde kullanılan materyallerin biyoyumluluğu çeşitli test yöntemleri kullanılarak değerlendirilmektedir. Hücre kültürü testleri ve hayvan deneyleri en çok kullanılan iki yöntemdir. Diş hekimliğinde kullanılan malzemelerin biyoyumluluklarının değerlendirilmesinde hayvan deneyi çalışmaları etik konusunda hala tartışma yaratması, maliyetinin fazla olması ve uzun zaman alması gibi nedenlerle daha az tercih edilmektedir. Hücre kültürü deneylerinin standardizasyonunun daha kolay olması, görece olarak daha düşük maliyeti ve az zaman alması, kolay tekrar edilebilmesi ve etik açıdan kabul edilebilirliği biyoyumluluk çalışmalarında tercih edilme sebeplerindendir (118). Bu avantajlar göz önünde bulundurularak çeşitli malzemenin biyoyumluluğunu değerlendirmek için hücre kültürü test yöntemleri kullanılmıştır.

Hücre kültürü çalışmalarında ilaç ve materyallerin toksisitesi değerlendirileceği zaman, hücre tipi seçiminde materyalin temasta olacağı veya etki göstereceği hücre tipinin seçilmesi daha doğru bir yaklaşım olacaktır. Bu amaçla primer hücreler ve devamlı hücre hatları olmak üzere iki çeşit hücre dizini bulunmaktadır. Primer hücre hatları daha hassas hücrelerdir ve elde edilmesi daha zordur. Ancak fizyolojik durumu en iyi şekilde taklit etmesi açısından pek çok çalışmada tercih edilmektedir. Devamlı hücre hatları kolay elde edilebilmeleri, sınırsız çoğalma süreleri gibi avantajlarına rağmen in vivo

özellikleri daha az yansıtması, transformasyona uğramaları sebebiyle genotipik ve fizyolojik özelliklerini tam olarak bulundurmaması gibi dezavantajları barındırmaktadır. Çalışmamızda in vivo ortamla benzer deneysel koşullara sahip olması nedeniyle primer hücre hattı olan insan periodontal ligament fibroblast hücresi tercih edilmiştir. Yapılan çalışmalarda HPDLF kök hücre karakterizasyonunun tespitinde CD10, CD13, CD26, CD29, CD44, CD59, CD45, CD73, CD90, CD105, CD146, CD166 pozitif ekspresyon gösterirken, CD 31, CD34, CD14, CD19 negatif ekspresyon sergilemektedir (88, 89, 90, 119).

Bu çalışmada kullanılan hücrelerin mezenkimal kaynaklı periodontal kök hücreler olduğunu göstermek amacıyla; CD34, CD90, CD45 ve kollajen1 yüzey antijenlerini kullanıldı. İmmünohistokimyasal analizler ile uygulanan CD45, CD90 ve kollajen1 yüzey antijenleri için pozitif (+), CD34 hematopoetik yüzey antijeni ise negatif ekspresyon (-) göstermiştir. Bu bulgular ışığında çalışmada kullandığımız hücrelerin mezenkimal kaynaklı periodontal ligament fibroblast hücreleri olduğunu düşünmekteyiz.

Dental materyallerin sitotoksitesinin incelenmesinde test materyali ile hedef hücre arasında kontakt olmalıdır. Bu temas direkt, indirekt veya materyallerden salınan bileşenlerin salınım sıvılarının yani ekstraktlarının teması şeklinde olabilir. Temasın ekstrakt ile sağlandığı hücre kültürü sitotoksite çalışmalarında farklı ekstraksiyon süreleri ve farklı ekstraksiyon konsantrasyonları materyallerin sitotoksitesinin incelenmesi bakımından önemlidir (94, 95). Çünkü yapılan çalışmalarda hangi dilüsyonun klinikle daha yakın sonuçlar verdiği bilinmemektedir ve farklı ekstraksiyon dilüsyonlarını değerlendirmek karşılaştırma yapılan çalışmalarda doğru sonuç hakkında fikir vermesi açısından önemlidir. Bizim çalışmamızda her bir kök kanal dolgu patının inkübatörde 24 saat sertleşme süreleri tamamlandıktan sonra üzerlerine diğer literatürlerden örnek alınarak (113, 120) 1ml kültür vasatı başına 0,2 gr pat olacak şekilde kültür vasatı ilave edilmiş ve 37°C'de 24 saat süre ile bekletilerek salınım sıvıları elde edilmiştir. Elde edilen salınım sıvılarının 1:0, 1:1, 1:2, 1:4, 1:8 dilüsyonları çalışmada kullanılmıştır. Materyallerden elde edilen bu dilüsyonların sitotoksik etkisi literatürlerdeki farklı süreler de göz önüne alınarak, sadece bir inkübasyon süresine bağlı kalmayacak şekilde 1. ve 3. günlerin sonunda değerlendirilmiştir (121, 122, 123).

Kök kanal tedavisinde kullanılmak üzere geliştirilen çeşitli içerik ve özelliklere sahip birçok yeni kanal dolgu patı piyasaya sürülmektedir. Mevcut çalışmada kullanımı

sıklıkla tercih edilen patlar olan kalsiyum hidroksit esaslı Sealapex ve Apexit Plus, epoksi rezin esaslı AHPlus, MTA içerikli biyoseramik esaslı MTA-Fillapex ve kalsiyum silikat içerikli biyoseramik esaslı TotalFill BC Sealer kök kanal dolgu patlarının sitotoksik ve apoptotik etkileri MTT ve TUNEL testleriyle incelenmiştir.

Çalışmamızda kök kanal dolgu materyallerinin biyouyumluluklarının değerlendirilmesinde; ISO 10993-5 Standartları Sitotoksitesite Testleri-İn vitro Yöntemleri bölümü rehber alınmıştır (72,73). Sitotoksitesite değerlendirilen kök kanal dolgu patlarının hücre sayımı kolorimetrik MTT yöntemi, apoptotik hücre oranları TUNEL yöntemi yapılarak belirlenmiştir.

MTT kolorimetrik testi, yani Mosmann'ın Tetrazolium Toksisite analizi hücre canlılığını değerlendirmek için kullanılan kolorimetrik bir testtir. Sarı bir tetrazol olan MTT, canlı hücrelerin mitokondrisinde bulunan süksinat dehidrojenaz ile mor formazan bileşiğine indirgenir. Çözünür olmayan mor formazanın çözünmesi için ürününün içine asit çözeltisi ilave edilir. Bu renkli çözeltinin absorbansı (optik yoğunluk), belirli dalga boylarında spektrofotometre ve ELİSA gibi cihazlarla ölçülmektedir (124).

MTT yöntemi biyouyumluluk testleri içinde çok hassas olmasının yanı sıra hızlı sonuç elde edilmesi, çok düşük düzeydeki toksisite değerlendirilmelerine imkân tanınması, tekrarlanabilir olması ve farklı çalışmalar arasında karşılaştırma yapılmasına imkan sağlaması gibi avantajları ile günümüzde hala kök kanal dolgu materyallerinin sitotoksitesite değerlendirmesinde hücre sayısının belirlenmesinde en çok tercih edilen yöntemdir. (125, 126, 127, 128) Bizde çalışmamızda farklı kanal dolgu patlarının hücresel sitotoksitesitesini değerlendirmek amacıyla MTT yöntemi tercih edildi.

TUNEL apoptozun göstergesi olan DNA parçalarını işaretleyen bir in situ histolojik tekniktir. Çalışmamızda apoptoz, TUNEL analizi kullanılarak DNA iplikçik kırılmasının enzimatik olarak işaretlenmesi ile değerlendirilmiştir (129, 130). Dış hekimliği alanında yapılan sitotoksitesite çalışmalarında kolorimetrik metotlarla hücre sayımı daha sıklıkla değerlendirilirken hücre ölümünün nekroz veya apoptoz yoluyla olup olmadığı daha az sıklıkla incelenmiştir (129, 131, 132).

Bir materyalin sitotoksik etkileri incelenirken nekroz ve apoptoz gibi hücre ölüm tipi ayırımının yapılması ölüm tiplerinde gözlenen farklı biyolojik cevaplar açısından önem taşımaktadır. Nekrozda enzimlerin lizozomlardan dışarı sızması, sitoplazmaya geçmesi ve hücre sindirilmesi gerçekleşmektedir. Hücresel içerik zedelenmiş olan plazma

membranından hücre dışı aralığa geçer, inflamatuvar yanıt başlar ve hücre hasarı görülür. Apoptozda ise hücre, büyüme faktörlerinden yoksun kaldığında, DNA ve proteinler onarılamayacak düzeyde zedelendiğinde, membran bütünlüğü bozulmayacak şekilde çekirdeğin dağılması ile apoptotik parçalar oluşturur ve hücre kendini öldürür. Apoptoz ile meydana gelen ölümden inflamatuvar yanıt gerçekleşmez ve apoptotik hücreler makrofajlar tarafından fagosit edilirler (109). Bu sebeple apoptoz ile meydana hücre ölümünde immün yanıt oluşmamaktadır. Bu farka bağlı olarak materyal ile temasta olan hücrelerin daha çok apoptozu indüklediği durumlarda dokularda inflamasyon oluşturmadığı ve dokularda meydana gelen modifikasyonlara daha hızlı adapte olacağı düşünülmektedir (133). Ayrıca bir materyalin hangi yolla toksik etkiye neden olduğunun tespiti ile daha ileri çalışmalarda toksisitenin nekroz veya apoptozda hangi basamakta meydana geldiğini araştırmak için önemli bir adım olacaktır. Meydana gelen toksik etkinin hangi hücre ve mediatörde meydana geldiğinin bilinmesi günümüzde kanser hastalıklarının önlenmesi için kullanılan ilaçlarda çalışmaların temelini oluşturmaktadır (134, 135). Diş hekimliğinde de kullanılan malzemeye bağlı gelişen reaksiyonların hangi aşamada meydana geldiği yeni üretilcek materyallerde ideal malzemenin diş hekimlerine sunulması için öncü olacaktır.

Çalışmamızda iki farklı kalsiyum hidroksit kök kanal dolgu patı olan Sealapex ve Apexit Plus'ın sitotoksiteleri MTT testi ile değerlendirildiğinde her iki patta tüm dilüsyon ve temas sürelerinde kontrol grubundan daha az canlılık göstermiştir. Sealapex patının dilüsyonları anlamlılık açısından değerlendirildiğinde 24 saatlik temasta hücre canlılığın $1:8=1:4>1:2=1:1>1:0$, 72 saatlik temasta $1:8=1:4=1:2=1:0>1:1$ şeklinde olduğu görülmüştür. Sealapex patının zamana bağlı hücre canlılığı anlamlılık açısından değerlendirildiğinde $1:1$, $1:2$, $1:4$, $1:8$ dilüsyonlarda 24. Saat hücre canlılığın 72. Saat hücre canlılığından fazla olduğu gözlenmiştir. Apexit Plus patının dilüsyonları anlamlılık açısından değerlendirildiğinde 24. saatlik temasta hücre canlılığın $1:8=1:4>1:2=1:1>1:0$, 72 saatlik temasta $1:8=1:4=1:2=1:1\geq 1:0$ şeklinde olduğu görülmüştür. Apexit Plus patının zamana bağlı hücre canlılığı anlamlılık açısından değerlendirildiğinde $1:4$, $1:8$ dilüsyonlarda 24. Saat hücre canlılığın 72. Saat hücre canlılığından fazla olduğu gözlenmiştir. Kalsiyum hidroksit patları olan Sealapex ve Apexit Plus patlarını sitotoksik açıdan karşılaştırdığımızda aralarında 24. Saat $1:0$ dilüsyon grubu haricinde anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. Çalışmamızın bulguları değerlendirildiğinde Sealapex ve

Apexit Plus kök kanal dolgu patları sitotoksik açıdan birbirine yakın benzer sonuçlar vermiştir.

Kalsiyum hidroksitin yüksek alkali pH'si, hücresel bölünme ve büyüme gibi temel enzim aktivitelerini engeller. Yüksek pH, sitoplazmik zarın bütünlüğünü, organik bileşenleri (proteinler ve fosfolipitler) ve besin aktarım mekanizmasını değiştirir ve bozar (136, 137, 138). Kalsiyum hidroksit pulpa ve çevre dokusunda yüksek pH'sı ile hücrelerin ölümüne neden olur ve çevresinde nekrotik bölge meydana gelir. Kalsiyum hidroksitin bilinen sert doku oluşturma özelliğinin bu bölgeye komşu olan hücreler ile sağlandığı bilinir (137, 138, 139). Kalsiyum hidroksit esaslı kök kanal dolgu materyallerin yüksek alkali pH'sına sahip olması ve sertleşme sonrasında rezorbe olarak çözünmesi gibi nedenlerde ilk dönemde orta dereceden şiddetli sitotoksik etkisinin mevcut olduğu düşünülmektedir. Ayrıca Sealapex'in içeriğinde bulunan izobütil salisilat, polimetilen metil salisilat ve Apexit Plus'ın içinde bulunan silikon ve disalisiklatın da bu toksisiteden sorumlu olabileceği düşünülebilir. (140, 141, 142)

Chang ve ark. (143) 5 farklı kök kanal dolgu patının toksik etkinliklerini PDL hücreleri üzerinde direkt temas yöntemiyle 3. ve 18. saatlerde MTT analizi ile karşılaştırmışlardır. Sealapex'in toksisitesi kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Sealapex'in 18. saatte gözlenen sitotoksitesi 3. Saatten anlamlı derecede yüksektir. Elde edilen bulgular doğrultusunda Sealapex içeriğinde bulunan polimetilen metil salisilat reçinesi ve izobütil salisilat katkı maddelerinin bu toksisiteye neden olabileceği sonucuna varmışlardır (140, 141). Bu çalışmada Sealapex patında gözlenen maruziyet süresinin artmasıyla birlikte artan oranda sitotoksite gözlenmesi bizim çalışmamızla benzerlik göstermektedir.

Key ve ark. (144) Sealapex ve çeşitli kök kanal dolgu patlarının sitotoksitelerini direkt temas yöntemi yöntemi ile hemasitometre sayımı ile değerlendirmişlerdir. 1. ve 24. saatte yapılan sitotoksite değerlendirmelerinde Sealapex'in 24. Saatte kontrol grubundan anlamlı derecede fazla hücre ölümüne neden olduğu bildirilmiştir. İlk karıştırıldığı anda sitotoksik etkisi bulunmazken daha sonra gözlenen sitotoksik etkinin nedenini kalsiyum hidroksitin sertleşme sonrasında çözünmesiyle açığa çıkan çökeltinin kronik inflamatuvar reaksiyon yaratması ile açıklamışlardır. 24. saatte gözlenen toksisite bulguları bizim çalışmamızla benzerlik göstermektedir.

Kim ve ark. (145) Endoseal, AHPlus ve Sealapex'in MGF3 ve insan gingival fibroblast hücreleri üzerinde sitotoksitesilerini 24 saat sertleşme sonrası ekstrakt yöntemi ile değerlendirdikleri çalışmalarında iki hücre grubunda da Sealapex'in sitotoksitesini 1., 3. Ve 7. Günde kontrol grubundan anlamlı derecede fazla bulmuşlardır. Sealapex'in sitotoksik etkisinin bu derece yüksek olmasının sebebinin 24 saat sertleşmenin yeterli olmadığı ve bu nedenle katkı maddelerinin ekstrakt sıvısına fazla geçiş göstermesi nedeniyle olabileceği sonucuna varmışlardır. AH Plus'ın toksik etkinliği MGF3 hücrelerinde 1. ve 3. günde oldukça fazla gözlenirken 7. Günde nontoksik olduğu bildirilmiş, insan gingival fibroblast hücrelerinde ise 1,3,7 günlerde toksisitesi oldukça yüksek bulunmuş ve azalma göstermemiştir. Kim ve ark. yaptığı çalışmada AHPlus sonuçlarının 7. Günde farklı olması hücre çeşitlerinin farklılığı nedeniyle yorumlanmıştır. Periodontal ligament hücrelerine daha yakın karakteristik özelliğe sahip hücre grubu olan insan gingival fibroblast hücreleri için elde edilen bulgular bizim çalışmamızla elde edilen bulgular ile benzerlik göstermektedir.

Scelza ve ark. (146) çeşitli kanal dolgu patlarını karıştırıp sertleşmelerini bekledikten sonra her gün düzenli olarak üzerine ekledikleri kültür vasatını değiştirmişlerdir. Ve belirli günlerde topladıkları ekstrakt sıvısının toksisitesini PDL hücreleri üzerinde değerlendirmişlerdir. Sealapex ve AH Plus 1. gün ekstrakt sıvısında yüksek toksik etki göstermiş, AH Plus'un toksisitesi 7. günde azalırken Sealapex'te toksik etkinin azalması 14.günden sonra gerçekleşmiştir. 24 saat sonuçları bizim çalışmamızla benzerlik gösterse de yapılan çalışmada zamanla toksik etkinin azalmasındaki farklılığın bizim çalışmamızdaki yöntem farklılığı nedeni ile ilgili olduğunu düşünmekteyiz. Yapılan çalışmada zamanla ekstrakt sıvısı hücre maruziyeti azalırken, bizim çalışmamızda zamanla ekstrakt sıvısı hücre maruziyeti artmaktadır.

Teixeira ve ark. (147) yeni bir yöntem deneyerek insan gingival fibroblastların ekimini gerçekleştirdikten sonra farklı kök kanal dolgu patları ile doldurulan tek kanallı dişlerin etilen dioksitle sterilizasyonunu sağlayıp dişleri herbiri aynı uzaklıkta olacak şekilde hücre kültür ortamına almışlardır. 24. ve 48. saatlerde elde ettikleri ekstrakt sıvılarının sitotoksitesilerini MTT analizi ile değerlendirmişlerdir. Kontrol grubu olarak guta perka ile dolumu yapılan dişleri seçmişler ve AH Plus, Sealapex, MTA-Fillapex ile doldurulan dişlerle aralarında 24. saat toksisite bulguları açısından anlamlı bir farklılık gözlemlememişlerdir. 48. saat toksisite bulgularında MTA-Fillapex grubunun

toksisitesini gutaperka ile dolumu yapılan kontrol grubu, Sealapex ve AH Plus'tan anlamlı derecede yüksek bulmuşlardır. Çalışmamızda Sealapex, AH Plus ve MTA-Fillapex grubu 24 ve 72 saatte kontrol grubuna göre bütün dilüsyonlarda anlamlı derece yüksek toksisite derecesine sahiptir. Bizim çalışmamızda elde ettiğimiz bulgularla Teixeira ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada elde edilen bulgular karşılaştırıldığında gözlenen farklılığın, çalışmalarda kullanılan kontrol grubunun farklılığı nedeni ile olabileceğini düşünmekteyiz.

Bu çalışmada kalsiyum hidroksit esaslı Sealapex, Apexit Plus patlarının ve sıvı ile temasta kalsiyum hidroksit oluşmasına neden olan MTA-Fillapex, TotalFill BC Sealer patlarının oluşturduğu apoptotik TUNEL düzeyleri kontrol grubundan anlamlı derece yüksek bulunmasına karşın %50 oranını geçmemiştir. Kalsiyum hidroksit ve kalsiyum iyonlarının proapoptotik olduğu bilinmektedir (148). Kalsiyum hidroksit yüksek pH'sı nedeniyle erken dönemde çevre dokuda hücrelerin ölümüne neden olur ve nekrotik bölge meydana getirir (137, 138, 139). Nekrotik hücre ölümünün hücre içi kalsiyum iyonlarının aşırı yüklenmesi ile ilişkili olduğu ve apoptotik süreçteki çoklu fonksiyonların kalsiyum sinyalinden kaynaklandığı bildirilmiştir (149, 150, 151). Çalışmamızda kalsiyum serbestleyen patların oluşturduğu orta şiddetli apoptotik etkinin nedeninin kalsiyum hidroksitin hem proapoptotik olması hem de nekrotik alan oluşturma özelliğinin olmasıyla ilgili olabileceğini düşünmekteyiz.

Szczurko ve ark. (152) farklı kök kanal dolgu patlarının sitotoksisitesini HPDLF hücresinde materyal ve hücreler arasında bariyer olacak şekilde indirekt yöntemle, materyaller karıştırıldıktan hemen sonra ve sertleşme sonrası 24. saatte MTT analizi ile, apaptoz ve nekroz değerleri AnnexinV ve propidium iyodid ile değerlendirilmişlerdir. AH Plus'ın hem karıştırıldıktan hemen sonra hem de sertleşme sonrası 24. saatte MTA-Fillapex ve Apexit Plus'tan daha toksik olduğu bildirilmiştir. MTA Fillapex'in sertleşme sonrası 24. saat toksisitesi Apexit Plus'tan yüksek bulunmuştur. AH Plus ve MTA-Fillapex'in toksik etkinliği zamanla artarken, tam tersine Apexit Plus'ın toksik etkinliği zamanla azalmıştır. Çalışmamızda benzer olarak sertleşme sonrası 24. Saat bulguları değerlendirildiğinde AH Plus en toksik bunu sırasıyla MTA-Fillapex ve Apexit Plus izlemiştir. Szczurko ve arkadaşlarının yaptıkları çalışma incelendiğinde üç patta da kontrol grubuna kıyasla apoptotik hücre ölümü daha fazla görülmektedir. AH Plus ve Apexit Plus apoptik hücrelerin yüzdesinde önemli bir artışa neden olurken, MTA-

Fillapex daha çok nekrotik hücrelerin oranını arttırmıştır. MTA-Fillapex'in yüksek toksisitesinin içeriğindeki silika ve salisilat reçineden kaynaklandığı düşünülmektedir. Apexit Plus'ın apoptozu uyarmasının nedeni olarak içeriğinde kalsiyum hidroksit ve kalsiyum iyonlarının proapoptotik özelliği düşünülmüştür (148). Elde ettiğimiz bulgularla Szczurko ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada elde edilen bulgular karşılaştırıldığında patların sitotoksikite sıralaması benzer sonuçlar vermiştir. Genel olarak hücre canlılık oranları Szczurko ve ark. yaptığı çalışmada daha yüksek bulunmuştur. Bu farklılığın nedeninin Szczurko ve ark. hücre kültürü yöntemi olarak materyal indirekt temas testi yöntemini kullanırken bizim çalışmamızda ekstrakt yolu temas yöntemi kullanılmasından kaynaklı olabileceği düşünülmektedir.

Martinho ve ark. (153) farklı kök kanal dolgu patlarının sitotoksik etkinliğini çeşitli dilüsyonlarda (1:2, 1:4, 1:8, 1:16) MTT analizi ile incelemişlerdir. Tüm materyaller 1:2, 1:4, 1:8 dilüsyonda kontrol grubundan anlamlı derecede düşük hücre canlılığına sahipken, 1:16 dilüsyonda kontrol grubu ile aralarında farklılık gözlenmemiştir. AH Plus Jet ve Apexit Plus arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı bildirilmiştir. Yapmış olduğumuz çalışmada AH Plus patı Apexit Plus grubundan daha toksik bulunmuştur. Bulgular incelendiğinde bizim çalışmamızda Apexit Plus'ın AH Plus patından daha az toksik olduğu bulunurken, Martinho ve ark. yaptığı çalışmada bu iki pat arasında farklılık olmadığı bildirilmiştir. AH Plus jet şırıngalı sisteme sahipken, AH Plus patı iki ayrı tüpte klinisyenin karıştırarak hazırladığı bir sistemdir. Bu iki çalışma arasındaki farklılık bundan kaynaklanmış olabilir.

Çalışmamızda sitotoksik özellikleri değerlendirilen AH Plus, epoksi rezin esaslı bir kök kanal dolgu patıdır ve AH 26'da bulunan olumsuz özellikleri ortadan kaldırmak için piyasaya sürülmüştür. AH Plus, öncü ürün AH 26'nın yüksek radyoopasite, düşük çözünürlük ve minimum büzülme gibi avantajlı özelliklerini muhafaza etmektedir. AH 26'nın dezavantajlarından olan renk değişimi ve toksisitesinden içeriğinde bulunan az miktarda formaldehit sorumlu tutulmuş ve yeni ürün AHPlus'ta formaldehit içeriğinin kaldırıldığı söylenmiştir. Bununla birlikte, yapılan bir çalışmada bir dakikada gerçekleşen formaldehit salınım miktarı (3.9 ppm) gözlenmiştir (19, 154). AH Plus'ın orta ila şiddetli sitotoksitesi çalışmalarda erken dönemde genellikle gözlenmektedir. Yeni formülasyon olan AH Plus'ta epoksi polimerizasyonunu sağlamak için amin grubuna eklenen minimum formaldehitin bu etkiye neden olabileceği düşünülmektedir (67, 145, 146, 155).

Bununla birlikte bazı araştırmacılar ciddi sitotoksik etkinin sertleşme sırasında epoksi rezin bileşiminden Bisfenol-A (113) salınımı sonucu olabileceğini düşünmüşlerdir. Bizim çalışmamızda görülen AH Plus'un yüksek sitotoksik etkisi bu bulgularla açıklanabilir.

Çalışmamızda AH Plus sonuçları değerlendirildiğinde materyalin maruziyet süresinin artması ve dilüe edilmesiyle birlikte toksik etkisinin azaldığı gözlenmektedir. AH Plus'un sertleşme sonrası çözünürlüğü zamanla azalmaktadır (156). Dilüsyon oranının düşürülmesi ile ortamda çözünen katkı maddeleri de böylece azalmaktadır. AH Plus sitotoksitesinin dilüe edildikçe azalması, materyaldeki çözünme ile ortama geçen katkı maddesinin azalması ile ilgili olabilir.

Yapmış olduğumuz çalışmada MTT testi sonuçlarına göre AHPlus kök kanal dolgu patı; Sealapex, Apexit Plus, MTA-Fillapex ve TotalFill BC Sealer grubundan anlamlı derecede yüksek toksik etkiye sahip olarak bulunmuştur. Çalışmamızda kök kanal dolgu maddelerinin sertleşme sonrası erken dönem kabul edilen 24 ve 72 saat sonra sitotoksik etkilerini gözlemlenmiştir. AH Plus 24 ve 72 saat bulguları değerlendirildiğinde tüm dilüsyonlarda 24 saat hücre sağkalım oranı 72 saate göre anlamlı derece fazla bulunmuştur. 72 saat sonunda hücre ortamının daha fazla oranda materyalden çözünen bileşiğe maruz kalması, toksik etkinlikteki artışın sebebi olarak açıklanabilir. Ayrıca, bu çalışmada 24 ve 72 saat gibi nispeten kısa dönemli sitotoksik etkiler incelendiğinden, uzun dönem sitotoksikite çalışmalarıyla karşılaştırma yapmak mümkün olmamaktadır.

Silva ve ark. (157) yaptıkları çalışmada AH Plus materyalinin yeni karıştırıldığında ciddi sitotoksik etki gösterdiği fakat bu etkinin 1. Haftada azaldığını ve 2. Hafta sonrası nontoksik hale geldiğini belirtmiştir.

Candeiro ve ark. (113) AH Plus ve BC sealer patının sadece 1:10 dilüsyonda toksik etkinliklerini HGF hücreleri üzerinde karşılaştırdıkları çalışmalarında AH Plus ve BC sealer patının toksik etkinliğinin 1., 3., 5. ve 7. günlerde zamanla azaldığını, AH Plus patının kontrol grubu ve BC Sealer patından istatistiksel olarak düşük hücre canlılığı gösterdiğini bildirmişlerdir. Çalışmamızda da AH plus patı içerik olarak Endosequence BC Sealer ile benzer olan TotalFill BC sealer patından ve kontrol grubundan daha düşük hücre canlılığı göstermiştir. Yapılan çalışmada fibroblast hücresinin in vivo ortamının taklidi amacıyla deney gruplarında uygulanan ekstrakt sıvısının yarısı her gün taze kültür vasatı ile değiştirilmiştir. Çalışmamızda hücre ile dilüsyon teması gün geçtikçe artarken

Candeiro ve ark. çalışmasında hücrelerin ekstrakt sıvısı ile teması gün geçtikçe azaltılmıştır. Çalışmalar arasındaki 1 ve 3. Günlerde gözlenen farkın bu nedenle olduğunu düşünmekteyiz.

Jung ve ark. (158) AH Plus, MTA-Fillapex, BioRoot ve Pulp Canal Sealer kanal dolgu patlarının ekstrakt sıvılarının toksik etkinliklerini 1:1, 1:2 ve 1:10 dilüsyonlarda 1., 7., 14., 21. günlerde MTT analizi ve LDH testi analizi ile değerlendirmişlerdir. 1:0 dilüsyonda tüm gruplarda ekstrakt süresine bakılmaksızın tüm hücrelerin öldüğünü bildirmişlerdir. 1:10 dilüsyonda ise AH Plus haricinde tüm grupların kontrol grubuna benzer hücre sağkalımına neden olduğunu bildirmişlerdir. Bu nedenle 1:0 ve 1:10 dilüsyonlarını değerlendirmeye almamışlardır. 1:2 dilüsyonda AH Plus ve MTA-Fillapex patının toksik etkinliği zamanla istatistiksel olarak artış göstermiştir ve yüksek toksik etkiye sahiptir. Çalışmamızda 1:2 dilüsyonlarda AH Plus ve MTA-Fillapex grupları 24. saatte istatistiksel olarak 72 saate göre daha az toksik etki göstermektedir. Mevcut çalışma bizim çalışmamız benzer bulgulara sahiptir.

Collado-Gonzalez ve ark. (159) Bioseal, GuttaFlow2, MTA-Fillapex ve AH Plus materyallerinin ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarının sitotoksitelerini PDL hücreleri üzerinde 24., 48., 72., 168. saat etkilerini MTT testi ile inceledikleri çalışmalarında AH Plus ve MTA-Fillapex'in dilüe edilmemiş ekstratlarının bütün zamanlarda kontrol grubuna kıyasla yüksek sitotoksite gösterdiklerini gözlemlemişlerdir. Gonzalez ve arkadaşlarının yaptığı çalışma bizim çalışmamızla benzer bulgular göstermektedir.

AH Plus materyalinin erken dönem sitotoksitesinin nedeni olarak epoksi polimerizasyonunu hızlandırmak için eklenen aminden formaldehit salınımı ve Bisfenol-A'nın sorumlu olabileceği düşünülmektedir.

Erken dönem etkilerin incelendiği çalışmamızda TUNEL testi ile en fazla apoptotik oran AH Plus patında elde edilmiştir. Apoptozla meydana gelen hücre ölümünde immün yanıt oluşmadığı ve mevcut dokunun meydana gelen modifikasyonlara daha hızlı adapte olabileceği düşünülmektedir. Hem kısa hem uzun dönem etkilerin incelendiği sitotoksite çalışmalarında AH Plus'ın erken dönemde sitototoksik etkisinin yüksek olduğu, bu etkinin uzun dönemde zamanla azaldığı gözlenmiştir. (67, 146, 155) Yapılan çalışmalar göz önünde bulundurulduğunda, AH Plus'ın uzun dönemde azalan toksik etkisinin, çalışmamızdaki hücre ölüm mekanizmasının apoptoz ile

gerçekleşmesiyle ilişki olabileceğini düşünmekteyiz. Bu konuda daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Victoria-Escandell ve arkadaşları flow stometri yöntemini kullanarak insan dental pulpa kök hücrelerinde yapmış oldukları çalışmalarında AH Plus'ı ve MTA Fillapex'i yüksek oranda apoptotik bulmuşlardır. Çalışmanın bulguları bizim çalışmamızla paralellik göstermektedir (160).

Saygılı ve ark. TUNEL yöntemini kullanarak L929 fare fibroblastları üzerinde yapmış oldukları çalışmalarında AH Plus'ı ve MTA Fillapex'i yüksek oranda apoptotik bulmuşlardır. Çalışmanın bulguları bizim çalışmamızla paralellik göstermektedir. (161)

MTA içeriğinde temel olarak kalsiyum oksit, silikon dioksit, trikalsiyum silikat, dikalsiyum silikat bulunan Mahmud Torabinejad tarafından retrograd dolgu materyali olarak geliştirilen bir malzemedir. Kök ucu dolgu materyali olarak geliştirilse de vital pulpa tedavilerinde, perforasyon tedavilerinde, apeksifikasyonda, rezorbsiyon tedavilerinde başarılı bir malzeme olarak kullanılmaktadır. MTA insan diş dokularıyla direkt temasa girdikten sonra kalsiyum hidroksit oluşturur, hücre tutunması ve çoğalması için kalsiyum iyonu salar, ayrıca alkali yapısıyla antibakteriyel ortam yaratır (162, 163). MTA sitokin salımını uyarır ve sert doku oluşturan hücrelerin farklılaşmasını ve göçünü destekler (162, 164, 165). MTA yüzeyinde hidroksiapatit oluşturarak biyolojik sızdırmazlık sağlar (8).

Biyoseramik içerikli kök kanal dolgu patları yakın zamanda piyasaya sürülmüştür. Seramik içerikli patların kalsiyum silikat gibi MTA ile benzer içerikleri sayesinde osteoinduktif etkileri olduğu belirtilmektedir. Kalsiyum silikat esaslı homojen nanopartikül yapıda olan patların hidrofiliği ve çözünürlüğü sayesinde ideal kök kanal dolgusu kriterlerini karşıladığı düşünülür. Kalsiyum silikat esaslı maddelerin uzun sertleşme süresine ve yüksek çözünürlüğe sahip olduğu bilinmektedir. Bu sertleşme süresi materyalin dezavantajı olarak değerlendirilse de zamanla Ca^{+} iyonlarının çözünmesiyle birlikte hidroksiapatit tabakası oluşturması materyalin biyouyumluluğu ile ilişkilendirilir (9, 58, 166).

Çalışmamızda kalsiyum silikat içerikli biyoseramik patlardan MTA-Fillapex ve TotalFill BC Sealer'in sitotoksik özellikleri değerlendirilmiştir. MTA-Fillapex patı tüm dilüsyon ve temas sürelerinde kontrol grubundan daha az canlılık gösterirken, TotalFill BC Sealer patı 24. saatte 1:4, 1:8 ve 72. saatte 1:2, 1:4, 1:8 dilüsyonlarda kontrol grubu

ile benzer hatta fazla canlılık göstermiştir. MTA-Fillapex patının dilüsyonları anlamlılık açısından değerlendirildiğinde 24. saatlik temasta hücre canlılığın $1:8=1:4>1:2>1:1=1:0$, 72 saatlik temasta $1:8=1:4>1:2=1:1=1:0$ şeklinde olduğu görülmüştür. MTA-Fillapex patının zamana bağlı hücre canlılığı anlamlılık açısından değerlendirildiğinde 1:0 dilüsyonda 24. saat hücre canlılığı 72. saatten düşük bulunmuş, 1:2, 1:8 dilüsyonlarda 24. saat 72. saatten daha fazla hücre canlılığına sahip bulunmuştur. TotalFill BC Sealer patının dilüsyonları anlamlılık açısından değerlendirildiğinde 24. saatlik temasta hücre canlılığının $1:8=1:4>1:2=1:1>1:0$, 72 saatlik temasta $1:8>1:4=1:2>1:1=1:0$ şeklinde olduğu görülmüştür. TotalFill BC Sealer patının zamana bağlı hücre canlılığı anlamlılık açısından değerlendirildiğinde 1:2, 1:4 dilüsyonlarda 24. saat hücre canlılığın 72. saat hücre canlılığından fazla olduğu gözlenmiştir. Tüm bu bulgular doğrultusunda kalsiyum silikat esaslı biyoseramik esaslı MTA-Fillapex ve TotalFill BC Sealer patlarını sitotoksik açıdan karşılaştırdığımızda tüm dilüsyon ve gruplarda TotalFill BC Sealer patının MTA-Fillapex patından daha fazla hücre canlılığına sahip olduğunu gözlemlemekteyiz.

Vouzara ve arkadaşlarının (167) kalsiyum fosfat ve kalsiyum oksit içeren epoksi rezin esaslı Simpliseal, mineral trioksit agregat esaslı salisilat rezin patı olan MTA-Fillapex ve biyoseramik esaslı Bioroot RCS materyallerinin 24 saat ve 1 haftalık ekstraktlarının 1:1 ve 1:2 dilüsyonlarının, NIH/3T3 hücrelerinde 24. saat ve 72. saatte hücre ölüm oranı ve proliferasyon etkilerini değerlendirdikleri bir sitotoksikite çalışmasında; MTA-Fillapex'in biyoseramik esaslı Bioroot RCS'den istatistiksel olarak anlamlı derecede daha fazla hücre ölümüne neden olduğu gözlemlenmiş ancak Simpliseal ile arasında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. Yapılan çalışmada uygulanan materyallerin hepsi temas süresi arttıkça ve ekstrakt süresinin uzamasıyla birlikte daha fazla sitotoksik etki göstermiştir. Klinikte toksik maddelerin periapikal dokuların lokal mekanizmaları tarafından uzaklaştırılması nedeniyle sitotoksitenin zamanla azalacağı düşünülmüş ve bu durum klinik koşullarla uyumlu bulunmamıştır. Bu çalışmayla uyumlu olarak bizim çalışmamızda MTA-Fillapex 24. saat ve 72. saatte yüksek oranda sitotoksikite göstermiş ve dilüsyonun azalmasıyla toksisitenin azaldığı gözlenmiştir. Biyoseramik esaslı TotalFill BC Sealer ile kıyaslandığında çalışmamızda MTA-Fillapex'in istatistiksel anlamda yüksek sitotoksikite gösterdiği gözlenmiştir.

Bin ve ark. (67) beyaz MTA, MTA-Fillapex ve AH Plus maddelerinin farklı dilüsyonlarının 24, 48 ve 72 saatlik hücre sağkalım oranlarını MTT analizi ile

karşılaştırdıkları bir sitotoksosite çalışmasında; beyaz MTA %50'nin üzerinde hücre canlılığına sahip bulunmuş ve diğer iki materyalden daha biyoyumlu olduğu bildirilmiştir. Bin ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada hem MTA-Fillapex hem de AH Plus düşük hücre canlılığı sergilemiştir. Yapmış olduğumuz çalışmada benzer dilüsyon ve saatler değerlendirildiğinde AH Plus ve MTA-Fillapex'in kontrol grubuna oranla sitotoksik olduğu görülmektedir. MTA ve MTA-Fillapex arasında gözlenen istatistiksel anlamlı fark MTA-Fillapex'in kök kanal patı özelliği kazanması için içeriğine eklenen katkı maddeleri nedeniyle olabilir.

Güven ve ark.'nın (168) patların sitotoksitesini 1. ,3. ,7., 14. günlerde MTT analizi ile değerlendirdikleri bir çalışmada, MTA-Fillapex grubunun hücre canlılığı zamanla azalmaktadır. Yaptığımız çalışmada MTA-Fillapex patı 1:1 dilüsyonda 24. saatte 72. saate kıyasla anlamlı olarak fazla hücre canlılığına sahiptir. Diğer dilüsyonlarda da istatistiksel olarak anlamlı bulunmamakla birlikte zamanla canlı hücre sayısında azalma gözlenmiştir. Kalsiyum silikat içerikli maddelerin fiziksel özellikleri değerlendirildiğinde uzun sertleşme süresine sahip olduğu bilinmektedir. Bu hücre canlılığının zamanla azalması sertleşme ile birlikte çözünen madde miktarındaki artışla ilgili olabilir. Güven ve arkadaşlarının yaptığı çalışmanın bulguları ile bizim çalışmamızdan elde edilen bulgular paralellik göstermektedir.

MTA-Fillapex içeriğinde bulunan mineral trioksit agregat maddesinin zengin biyolojik özelliklerinden yararlanmak amacıyla geliştirilen biyoagregat ve biyoseramik özellikli olarak piyasaya sürülmüş salisilat rezin içeren kök kanal dolgu patıdır (169, 170). MTA esaslı kök kanal dolgu patlarının mineralizasyonu teşvik etmesi ve biyoyumlu olması beklenmektedir (171). Çimento formunda olan MTA'nın kök kanal dolgu maddesi olarak yeterli akışkanlığa sahip bir pat olabilmesi için içerisine jel ve suda çözünebilir rezin gibi kimyasal maddeler ilave edilmiştir. Yaptığımız çalışmada MTA içerikli MTA-Fillapex kök kanal dolgu patının farklı dilüsyonlarda 24. ve 72. saat toksisitesi kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı ölçüde yüksek bulunmuştur. Torabinejad ve ark. (172) MTA'nın toksik özelliklerini agar difüzyon testi ile değerlendirmiş, hem sertleşmiş hem de sertleşmemiş MTA'nın çevresinde hücresel parçalanma olduğunu bildirmişlerdir. Mevcut çalışmada MTA-Fillapex'in bir diğer kalsiyum silikat esaslı pat olan TotalFill BC Sealer patından daha fazla sitotoksik özellik göstermesinin nedeni materyalin içerisindeki salisilat rezin ile ilişkili olabilir (67, 173, 174).

Bu çalışmada MTA-Fillapex'in kalsiyum serbestleyen diğer patlara göre MTT düzeyi daha yüksek bulunmuştur. Ayrıca TUNEL testi ile incelenen apoptotik oranları da kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede daha fazla bulunmuştur. Rezin salisilatın insan fibrosarkom hücre hattı (HT-1080) üzerindeki etkisini AnnexinV analizi ile değerlendiren bir çalışmada, 24 saat temas sonrası hücresel apoptoz bulguları gözlemlendiği bildirilmiştir. Ayrıca histolojik muayenede hücrelerin hücre yuvarlanması ve büzülme, sitoplazmada vakuol ve genetik materyal fragmanları gibi apoptoz bulguları gözlemlendiği bildirilmiştir (175). Bizim çalışmamızda rezin salisilat içerikli MTA-Fillapex kontrol grubundan anlamlı derecede daha fazla apoptoz oranına sahip bulunmuştur. MTA-Fillapex'in apoptoza neden olması ile rezin salisilat içeriğine sahip olması arasında bir ilişki olabileceğini düşünmekteyiz.

TotaFill BC Sealer üretici firma tarafından kalsiyum silikat içeren bioseramik esaslı kök kanal dolgu maddesi olarak tanımlanmaktadır. TotalFill BC Sealer'ın içinde bulunan kalsiyum fosfat bileşenlerinin dişte fiziko-kimyasal özellikleri belirgin şekilde değiştirerek kemiğe benzeyen mineral yapıların oluşması için hücresel yanıt geliştirdiği ve hidroksiapatit oluşturma yeteneğini arttırdığı gösterilmektedir (176, 177, 178, 179) Bizim çalışmada yeni geliştirilen bu patın çalışmada kullanılan diğer patlardan daha biyouyumlu olduğu gözlenmektedir.

Kalsiyum hidroksit esaslı Apexit Plus'ın kalsiyum silikat esaslı iRoot patı ile periapikal inflamasyonun ve sert doku oluşumunun karşılaştırıldığı in vivo bir hayvan deneyi çalışmasında her iki materyalinde 1., 2., 3. aylık dönemlerin sonunda sert doku bariyeri oluşturduğu gözlenmiştir. Bu iki materyalin sert doku oluşturma özelliği kalsiyum ve hidroksil iyonlarını serbest bırakma yeteneklerinden kaynaklanabilir. Yapılan çalışmada Apexit Plus erken dönemde hafif ve orta dereceli inflamatuvar yanıtı neden olmuştur. Bu durum Apexit Plus'ın hidroksil içeriğinin ortama erken salınması ve alkaliliği arttırması sonucunda dejeneratif ve inflamatuvar etkiye neden olması ile ilişkilendirilebilir. Çalışma sonucunda kalsiyum hidroksitli kök kanal dolgu patına kıyasla kalsiyum silikat esaslı maddede gözlenen tam iyileşme, maddenin homojen ve nanopartikül yapıda olması, hidrofilikliği ve çözünürlüğü ile ilgili olabilir (180).

Rodriguez-Lozano ve ark. (181) AH Plus, MTA-Fillapex ve TotalFill BC Sealer'ın 1:1 1:2 ve 1:4 dilüsyonlarının 24., 48. ve 72. saat toksisitesini indirekt temas testi yöntemi ile MTT analizi ile değerlendirdikleri çalışmalarında, TotalFill BC Sealer

patını tüm dilüsyonlarda ve zamanlarda kontrol grubuna en yakın bulmuşlardır. Yaptıkları çalışmada TotalFill BC Sealer patı 48. ve 72. saatte AH Plus patına göre düşük toksisite ve yüksek proliferasyon özelliği göstermiştir. Ayrıca MTA-Fillapex ve AHPlus, TotalFill BC Sealer ve kontrol grubundan anlamlı derece düşük hücre canlılığına sahiptir. Rodriguez ve ark. yaptıkları çalışma bizim çalışmamızla karşılaştırıldığında benzer bulgular göstermiştir.

Colombo ve ark. (182) EasySeal, Sealapex, MTA-Fillapex, AH Plus, BioRoot™ RCS ve TotalFill BC Sealer patlarının 1., 2. ve 3. Gündeki toksik etkinliklerini sertleşme sonrası ekstrakt sıvısı ile değerlendirmişlerdir. Yapılan çalışmada Bioroot ve TotalFill BC Sealer 1. Günde toksik etki göstermezken 2. ve 3. günlerde hafif toksik etkinlik sergilemişlerdir, AH Plus 1. gün düşük toksik etkinlik gösterirken 2. ve 3. gün şiddetli sitotoksik etki göstermiştir. Sealapex 3 gün boyunca orta dereceli toksik etkili bulunmuştur ve MTA-Fillapex ve Endoseal 3 gün boyunca şiddetli toksik etki göstermiştir. Yapılan çalışmada patların etkinlikleri karşılaştırılacak olursa MTA-Fillapex, AH Plus ve Endoseal en fazla toksik etkinliğe sahip olan 3 kanal dolgu patı olup, Sealapex orta şiddette toksik etki göstermiş, TotalFill BC Sealer ve BioRoot™ RCS ise kontrol grubuna en yakın yani en düşük toksik etkili bulunmuştur. Çalışmamızda da toksik etkinlik sıralaması en düşükten en yükseğe TotalFill BC Sealer-Sealapex-Apexit Plus-MTA-Fillapex-AH Plus şeklindedir. Colombo ve ark. çalışmasındaki veriler çalışmamızın bulguları ile uyumludur.

Zhou ve ark. (173) kalsiyum silikat içerikli Endosequence BC Sealer, MTA-Fillapex ve epoksi rezin içerikli AH Plus'ın ekstraksiyon sıvılarının 1:2, 1:8, 1:32 ve 1:128 dilüsyonlarının toksik etkinliğini 0., 7., 14., 21. ve 28. günlerde fibroblast hücrelerinde flow sitometri analizi ile değerlendirmişlerdir. Sertleşmesi tamamlanan patların üzerine kültür vasatı ilave edilerek 0. saat ekstrakt sıvıları elde edilmiştir. Ekstrakt sıvıları toplandıktan sonra, aynı hacme sahip taze kültür ortamı, aynı kuyucuklara eklenmiştir. Daha sonra değerlendirme yapılacak diğer günlerde de ekstrakt sıvıları toplanarak taze kültür vasatıyla değiştirilmiştir. 0. saatte AH Plus ve MTA-Fillapex yeni karıştırıldığında yüksek konsantrasyonlarda şiddetli toksik etki göstermiş, konsantrasyon düştükçe nontoksik bulunmuştur. Endosequence BC Sealer ise yüksek konsantrasyonda bile hafif toksik etki göstermiştir. AH Plus tüm dilüsyonlarda 2. Hafta ve sonrası kontrol grubuna yakın canlılık gösterirken Endosequence BC Sealer tüm dilüsyonlarda

zamanlarda kontrol grubuna yakın ve fazla hücre canlılığına sahip olmuştur. MTA-Fillapex'in ise 1:2 ve 1:8 dilüsyonda 1 haftadan sonra ciddi sitotoksik etki gösterdiği bulunmuş, daha yüksek konsantrasyonlarda toksik etki göstermediği bildirilmiştir. Bizim yaptığımız çalışmamızda AH Plus ve MTA-Fillapex patı 1:2 ve 1:8 dilüsyonda 1. Ve. 3 günlerde yüksek toksik etkinliğe sahiptir. Kalsiyum silikat içerikli olan TotalFill BC Sealer patı 1:2 dilüsyonda 1:8 dilüsyona göre istatistiksel olarak anlamlı olarak daha az canlılık gösterdiği bulunmuştur. TotalFill BC Sealer 24. ve 72. saat değerlendirmesinde 1:8 dilüsyon yüksek oranda canlılık göstermiştir.

Mevcut çalışmada kullanılan MTA-Fillapex ve TotalFill BC Sealer kök kanal dolgu patları yeni geliştirmiş patlardır ve henüz sınırlı sayıda çalışma mevcuttur. Daha önce Totalfill BC Sealer patı ile ilgili yapılmış apoptoz oranı değerlendirme çalışması yapılmamıştır. Dolayısıyla bu patlarla ilgili elde edilen bulguların daha kesin bir sonuca ulaşabilmesi için daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Hücre kültürü ile yapılan biyouyumluluk çalışmaları tıp ve diş hekimliği alanında kullanılan ve yeni geliştirilen ürünlerin değerlendirilmesinde ilk basamaktır. Ancak yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlar her zaman in vivo çalışmalarla ve klinik kullanımdan elde edilen sonuçlarla paralellik göstermeyebilir. Bunun birçok nedeni olabilir. Örneğin hidrofilik bir materyalin in vivo koşullarda sertleşme süresi in vitro koşuldaki sertleşme süresinden farklı olabilmektedir. Bunun yanı sıra hücre kültürüne uygulanan çeşitli ilaç/materyal konsantrasyonun in vivo şartlarda canlı dokuda hangi konsantrasyona denk geldiği bilinmemektedir. Ayrıca in vivo çalışmalarda çevre dokuda meydana gelen hücresel yanıt in vitro çalışmalarda mevcut değildir. İn vitro hücre kültürü çalışmaları dental materyallerin biyolojik etkileri hakkında ön bilgi sağlamaktadır. Kesin sonuca varabilmek için in vitro ve in vivo çalışmaların bir arada yapılması gerekmektedir. Ayrıca kök kanal dolgu patı olarak kullanılacak olan malzemenin seçiminde biyolojik özelliklerinin bilinmesinin yanında fiziksel, kimyasal özelliklerinin bilinmesi de büyük önem taşır.

Sonuçlar

Endodontik tedavide kullanılan kök kanal dolgu patlarının hücre kültürü yöntemiyle insan peridontal ligament fibroblast hücreleri üzerinde sitotoksik etkilerinin MTT ve TUNEL testi kullanılarak kıyaslandığı in vitro çalışmamızda şu sonuçlar elde edilmiştir:

1. Tüm materyaller 72. saat temasta 24. Saate göre daha yüksek oranda sitotoksosite göstermiştir.
2. Kalsiyum hidroksit içerikli kök kanal dolgu patları olan Sealapex ve Apexit Plus materyali hücre sayısında benzer oranda düşüş göstermiştir.
3. Çalışmamızda AH Plus materyalinin 24 ve 72 saatlik süreç sonunda tüm dolgu patlarından daha sitotoksik ve apoptotik olduğu tespit edilmiştir.
4. MTA-Fillapex patı MTA içerikli üretilen bir dolgu patı olmasına karşın yüksek oranda toksisite göstermiştir. Çalışmamızda rezin içeriğine sahip olan MTA-Fillapex ve AH Plus patları diğer patlardan daha sitotoksik bulunmuştur.
5. Çalışmamızda kalsiyum hidroksit içerikli Sealapex ve Apexit Plus patlarının ve etki mekanizmasında kalsiyum hidroksit olan MTA-Fillapex ve TotalFill BC Sealer patlarının TUNEL düzeyleri kontrol grubundan anlamlı derece yüksek bulunmasına karşın %50'yi geçmemiştir.
6. Çalışmamızda; TotalFill BC Sealer 24 ve 72 saatlik süreç sonunda diğer tüm dolgu patlarından daha az hücre ölümüne ve apoptoza neden olmuştur ve kontrol grubuna yakın sonuçlar vermiştir. Çalışmamızda kullandığımız diğer materyallere göre, biyouyumluluk açısından en iyi sonucu vermiştir.
7. Çalışmamızda genel olarak patlar erken dönem toksisite açısından karşılaştırıldığında en biyouyumludan en toksik olana doğru sıralama şu şekildedir: TotalFill BC Sealer>Sealapex-Apexit Plus>MTA-Fillapex>AH Plus

KAYNAKLAR

1. Garg, N., ve Kapoor R. Obturation of root canal system. İçinde Garg N., ve Garg A, editor. *Textbook of Endodontics Second Edition*. New-Delhi: Jaypee Brothers Medical Publishers; 2010. pp 265-301.
2. Cvek M. Treatment of non-vital permanent incisors with calcium hydroxide. *Odontol Revy* 1974; **25**: 239.
3. Bystrom A., Claesson R., Sundqvist G. The antimicrobial effect of camphorated para- monochlorophenol, camphorated phenol and calcium hydroxide in treatment of infected root canals. *Endod Dent Traumatol* 1985; **1**: 170–5.
4. Manhart M. The calcium hydroxide method of endodontic sealing. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1982; **54**: 219–24.
5. Stock C. Calcium hydroxide: root resorption and perio-endo lesions. *Br Dent J* 1985; **158**: 325–34.
6. Hauman, CH. ve 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.
7. Barthel CR., Losche GM., Zimmer S., Roulet JF. Dye penetration in root canals filled with AH26 in different consistencies. *Journal of Endodontics* 1994; **20**: 436-439.
8. Camilleri J. ve Pitt Ford TR. Mineral trioxide aggregate: a review of the constituents and biological properties of the material. *Int Endod J* 2006; **39**(10): 747-54.
9. Cheng L., Ye F., Yang R., Lu X., Shi Y., Li L. ve ark. Osteoinduction of hydroxyapatite/beta-tricalcium phosphate bioceramics in mice with a fractured fibula. *Acta Biomater* 2010; **6**(4): 1569–1574.
10. Hansen EK., Asmussen E. ve Christansen NC. In vivo fractures of endodontically treated posterior teeth restored with amalgam. *Endod Dent Traumatol* 1990; **6**: 49-55.
11. Johnson WT. *Color Atlas of Endodontics*. Philadelphia, Pennsylvania: Saunders Company; 2002.

12. Çalışkan MK. *Endodontide Tanı ve Tedaviler*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2006.
13. Schilder H. Filling root canals in three dimensions. *Dent Clin North Am* 1967; 723-744.
14. Sjögren, U., Hägglund, B., Sundqvist, G., Wing, K. Factors affecting the long-term results of endodontic treatment. *Journal of Endodontics* 1990; **10**: 498-504.
15. Torabinejad M., Handysides R., Khademi AA., Bakland LK. Clinical implications of the smear layer in endodontics: a review. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2002; **6**: 658-666.
16. Keskin C., Uzun İ., Kalyoncuoğlu E., Güler B., ve Özyürek T. Koronal restorasyon ve kök dolgularının kalitesi ile tedavi sonrası apikal periodontitis ilişkisinin retrospektif incelenmesi. *Ondokuz Mayıs Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi* 2012; **3**: 15-21.
17. Özen D. *İki farklı kök kanal dolgu tekniği ile farklı kök kanal patlarının bağlanma dayanımının değerlendirilmesi*. Ankara: Doktora Tezi; 2014.
18. Jonhson W., Kulild JC., Tay F. Obturation of the cleaned and shaped root canal system. İçinde *Cohen's Pathway of the Pulp 11th*. St. Louis, Missouri: Elsevier Inc; 2016. pp 289-290.
19. Kaur A., Shah N., Logani A., ve Mishra N. Biotoxicity of commonly used root canal sealers: A meta-analysis. *J Conserv Dent* 2015; **2**: 83-88.
20. American Association of Endodontists. *Guide to clinical endodontics* 5th ed. Chicago: The Association; 2013.
21. Grossman L. *Endodontics* 11th ed. Philadelphia, USA: Lea & Febiger; 1988.
22. Johnson JD. Root canal filling materials. İçinde Ingle, JI., Bakland LK. ve Baumgartner JC., editor. *Ingle's endodontics*. PMPH, USA: BC Decker; 2008. pp 1019-1052.
23. Tarhan SÇ., Uzunoğlu E. Kök Kanal Dolgu Maddeleri Derleme. *Türkiye Klinikleri Journal of Dental Sciences Special Topics* 2010; **1**: 1-15.
24. Grossman L. *Endodontics Practice*. Philadelphia, USA: Lea & Febiger; 1978.

25. Alaçam T. *Endodonti*. Adana: Nobel Kitabevi; 2012.
26. Huang FM., Tai KW., Chou MY., Chang YC. Cytotoxicity of resin, zinc-oxideeugenol, and calcium hydroxide-based root canal sealers on human periodontal ligament cells and permanent V79 cells. *Int Endod J* 2002; **35**: 153-158.
27. Huwe WR. In vitro studies on the local pharmacodynamics, pharmacology and toxicology of eugenol and zinc oxide-eugenol. *Int Endod J* 1988; **21**: 130-134.
28. al-Khatib ZZ., Baum RH., Morse DR., Yeşilsoy C., Bhambhani S. ve Furst ML. The antimicrobial effect of various endodontic sealers. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1990; **70**: 784.
29. Barkhordar RA. Evaluation of antimicrobial activity in vitro of ten root canal sealers on *Streptococcus sanguis* and *Streptococcus mutans*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1989; **68**: 770.
30. Heling I. ve Chandler NP. The antimicrobial effect within dentinal tubules of four root canal sealers. *J Endod* 1996; **22**: 257-259.
31. Mickel AK., Nguyen TH. ve Chogle S. Antimicrobial activity of endodontic sealers on *Enterococcus faecalis*. *J Endod* 2003; **29**: 257.
32. Ingle JI. ve West JD. Obturation of the radicular space. İçinde Ingle F, Taintor JF, editör. *Endodontics 5th Edition*. Phila: Lee&Febiger; 2002. pp 747-768.
33. Himel VT., Mcspadden JT. ve Goodis HE. Instruments, materials, and devices. İçinde Cohen S, Hargreaves KM, editor. *Pathways of the Pulp 9th Edition*. St. Louis: Mosby; 2006. pp 233-290.
34. Hülsmann M ve Hermann HW. Kök kanallarının doldurulmasında karşılaşılan problemler. İçinde Hülsmann M., Clemens B. ve Barthell C. editor. *Endodontide Problemler Etyoloji, Tanı ve Tedavi*. İstanbul: Quintessence; 2014. pp 310.
35. Ballullay, SV., Vinay V., Thumu J., Devalla S., Bollu IP., ve Balla S. Stereomicroscopic dye leakage measurement of six different root canal sealers. *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR* 2017; **11**: 65-68.

36. Cobankara FK., Orucoglu H., Sengun A., ve Belli S. The quantitative evaluation of apical sealing of four endodontic sealers. *Journal of endodontics* 2006; **32**(1): 66-68.
37. Poggio C., Trovati F., Ceci M., Colombo M., ve Pietrocola G. Antibacterial activity of different root canal sealers against *Enterococcus faecalis*. *Journal of clinical and experimental dentistry* 2017; **9**(6): 743.
38. Tanomaru-Filho M., Bosso R., Viapiana R. ve Guerreiro-Tanomaru JM. Radiopacity and flow of different endodontic sealers. *Acta Odontol Latinoam* 2013; **26**(2): 121-5.
39. Ørstavik D., Nordahl I. ve Tibballs JE. Dimensional change following setting of root canal sealer materials. *Dent. Materials* 2001; **17**: 512-519.
40. Spangberg LSW., Barbosa SV., Lavigne AS. AH 26 releases formaldehyde. *J Endod* 1993; **19**: 596-598.
41. Miletić I., Jukić S., Anić I., Željezić D. ve Garaj- Vrhovac Osmak VM. Examination of cytotoxicity and mutagenicity of AH26 and AH Plus sealers. *International endodontic journal* 2003; **36**(5): 330-335.
42. Parirokh M., Forghani FR., Paseban H., Asgary S., Askarifard S. ve Mahani SE. Cytotoxicity of two resin-based sealers and a fluoride varnish on human gingival fibroblasts. *Iranian endodontic journal* 2015; **10**(2): 89.
43. Miletić I., Anić I., Karlović Z., Maršan T, Pezelj-Ribaric S, Osmak M. Cytotoxic effects of the four root filling materials. *Endod Dent Traumatol* 2000; **16**: 287–290.
44. Kim YK., Grandini S., Ames JM., Gu LS., Kim SK., Pashley DH. ve ark. Critical review on methacrylate resin-based root canal sealers. *J Endod* 2010; **36**: 383-399.
45. Langeland K, Olsson B, Pascon EA. Biological evaluation of Hydron, *J Endod* 1981; **7**: 196.
46. Bergmans L., Moisiadis P., De Munck J., Van Meerbeek B., & Lambrechts P. Effect of polymerization shrinkage on the sealing capacity of resin fillers for endodontic use, *J Adhes Dent* 2005; **7**: 321

47. Tay FR., Loushine RJ., Monticelli F., Weller RN., Breschi L., Ferrari, M. ve Pashley DH. Effectiveness of resin-coated gutta-percha cones and a dual-cured, hydrophilic methacrylate resin-based sealer in obturating root canals. *J Endod* 2005; **31**: 659.
48. Kurtzman GM., Norby CE., Von Fraunhofer JA. The Leakage Resistance Of Endodontic Fiber Obturators. *Academy Of General Dentistry* 2007; **55**: 36-38.
49. Shipper G. ve Trope M. In vitro microbial leakage of endodontically treated teeth using new and standard obturation techniques. *J Endod* 2004; **30**: 154-158.
50. Gogos C., Economides N., Stavrianos C., Kolokouris I., Kokorikos I. Adhesion of a new methacrylate resin-based sealer to human Dentin. *J Endod* 2004; **30**: 238-240.
51. Wilson AD., Prosser HJ., Powis DM. Mechanism of adhesion of polyelectrolyte cements to hydroxyapatite. *J Dent Res* 1983; **62**: 590-592.
52. Akinmade AQ., Nicholson JW. Review; glass-ionomer cements as adhesives. Part I. Fundamentals aspects and their clinical relevance. *J Mater Scien*; **4**: 95-101.
53. Saunders WP., Saunders EM. Coronal leakage as a cause of failure in root-canal therapy: A review. *Endod. Dent. Traumatol* 1994; **10**: 105-108.
54. De Bruyne MA., De Moor RJ. The use of glass ionomer cements in both conventional and surgical endodontics. *Int Endod J* 2004; **37**: 91-104.
55. Dalat DM., Onal B. Apical leakage of a new glass ionomer root canal sealer. *J Endod* 1998; **24**: 161-163.
56. Hermansson L. *Nanostructural Bioceramics: Advances in Chemically Bonded Ceramics*. USA: Jenny Stanford Publishing; 2014.
57. Chard T., Harwell GR., Hirschberg C., Patel R. An evaluation of setting time of mineral trioxide aggregate and EndoSequence root repair material in the presence of human blood and minimal essential media. *J Endod* 2013; **39**: 1071-2.
58. Al-Haddad A., Ab Aziz C., ve Zeti A. Bioceramic-based root canal sealers: a review. *International journal of biomaterials* 2016.

59. Alzraikat H., Taha NA. ve Hassouneh L. Dissolution of a mineral trioxide aggregate sealer in endodontic solvents compared to conventional sealers. *Brazilian oral research* 2016; **30**.
60. Hanks CT., Wataha JC., Sun Z. In vitro models of biocompatibility: A review. *Dent Mater* 1996; **12**: 186-193.
61. Schmalz G. Concepts in biocompatibility testing of dental restorative materials. *Clin Oral Invest* 1997; **1**: 154–162.
62. Silva EJ., Rosa TP., Herrera DR. Jacinto RC., Gomes BP. ve Zaia AA. Evaluation of cytotoxicity and physicochemical properties of calcium silicate-based endodontic sealer MTA Fillapex. *Journal of Endodontics* 2017; **50**: 407–414.
63. Er K., Vural M., Bulut E., Akpınar KE. Kanal dolgu patları tarafından oluşturulan doku reaksiyonlarının incelenmesi. *Cumhuriyet Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi* 2003; **6**: 86-91.
64. Granchi D., Stea S., Ciapetti G. Endodontic sealers induce alterations in the cell cycle of in vitro cultured osteoblasts. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics* 1995; **79**: 359–366.
65. Huang TH., Yang JJ., Li HH. The biocompatibility evaluation of epoxy resin-based root canal sealers in vitro. *Biomaterials* 2002; **23**: 77–83.
66. Pinna L., Brackett MG., Lockwood PE. In vitro cytotoxicity evaluation of a self adhesive, methacrylate resin-based root canal sealer. *Journal of Endodontics* 2008; **34**: 1085–1088.
67. Bin CV., Valera MC., Camargo S. Cytotoxicity and genotoxicity of root canal sealers based on mineral trioxide aggregate. *Journal of Endodontics* 2011; **38**: 495–500.
68. Camargo CH., Oliveira TR., Silva GO. Setting time affects in vitro biological properties of root canal sealers. *Journal of Endodontics* 2014; **40**: 530–533.
69. Cotti E., Petreucic V., Re D. Cytotoxicity evaluation of a new resin-based hybrid root canal sealer: an in vitro study. *Journal of Endodontics* 2014; **40**: 124–128.

70. Molloy D., Goldman M., White RR., Kabanı S. ve Mass B. Comparative tissue tolerance of a new endodontic sealer. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1992; **73**: 490-493.
71. Schmalz G. ve Dorthe Arenholt Bindslev. *Biocompatibility of Dental Materials 1st ed.* Verlag Berlin Heidelberg: Springer; 2009 pp 13-40.
72. ISO 10993-5. *Biological evaluation of medical devices. Part 5. Tests for in vitro cytotoxicity.* 1999.
73. ISO 7405. *Dentistry- Precilinal evulation of biocompatibility of medical devices used in dentistry-Test methods for dental materials.* 2009.
74. Tuncer S., Demirci M. Dental materyallerde biyouyumluluk değerlendirmeleri. *Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi* 2011; **2**: 141-149.
75. Wataha JC. Biocompatibility of dental metarials. İçinde Craig RG, Powers JM editor. *Craig's Restorative Dental Materials 11th Ed.* Mosby: St Louis; 2002. pp 125-59.
76. Kurtulmuş S., Aydın A. Dental Döküm Alaşımlarının Genotoksisite, Mutajenisite ve Karsinojenisitesi. *Selçuk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi* 2007; **16**: 73-8.
77. Powerrrs JM. ve Sakaguchi RL. *Craig's restorative dental materials 12th ed.* St. Louis, MO: Mosby Elsevier; 2006. pp 97-125.
78. Wataha JC. Principles of biocompatibility for dental practitioners. *J Prosthet Dent* 2001; **86**(2): 203-9.
79. Freshney R. *Culture of animal cells, a manual basic technique.* New York: Wiley-Liss; 1994.
80. Uzun İ., Bayındır F. Dental materyallerin biyouyumluluk test yöntemleri. *GÜ Diş Hek Fak Derg* 2011; **28**(2): 115-22.
81. Freshney RI. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique, Fifth Edition.* Haboken: John Wiley & Sons; 2005. pp 1-216.
82. Pizzoferrato, A., Ciapetti, G., Stea, S., Cenni, E., Arciola, C., Granchi, D. Cell culture methods for testing biocompability. *Clin Mater* 1994; **15**(3): 173-90.

83. Helgason CD., Miller CL. Methods in molecular biology Third edition. Tatowa: Humana Press; 2005. pp 1-12.
84. MacDonald C. Primary culture and establishment of cell lines. İçinde Davis JM editor. *Basic cell culture: a practical approach*. Oxford, New York: IRL Press; 1994.
85. Demirok H. *Farklı kök kanal dolgu patlarının sitotoksik ve genotoksik özelliklerinin in-vitro incelenmesi*. Konya: Doktora tezi; 2016.
86. Ogilvie AL., Ingle JL. *An Atlas of Pulpal and Periapical Biology*. Philadelphia: Lea &Febiger; 1965. pp 121.
87. Baloş K., Özcan G., Baran C., Yalım M., Gürhan İ. Dişeti ve periodontal ligament fibroblastlarının değişik özelliklerinin incelenmesi. *Otorinolaregoloji ve stomatoloji dergisi*; **1**(3) 151-155.
88. Seo BM., Miura M., Gronthos S., Bartold PM., Batouli S., Brahimi J. ve ark. Investigations of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *The Lancet* 2004; **364**: 149-155
89. Trubiani ODPR., Di Primio R., Traini T., Pizzicannella J., Scarano A., Piattelli A. ve Caputi S. Morphological and cytofluorimetric analysis of adult mesenchymal stem cells expanded ex vivo from periodontal ligament. *International journal of immunopathology and pharmacology* 2005; **18**(2): 213-221.
90. Vasandan AB., Shankar SR., Prasad P., Sowmya Jahnavi V., Bhonde RR. ve Jyothi Prasanna S. Functional differences in mesenchymal stromal cells from human dental pulp and periodontal ligament. *Journal of cellular and molecular medicine* 2014; **18**(2): 344-354.
91. Aşçı SK. *Endodonti*. İstanbul: Quintessence; 2014.
92. Murray PE., Garcia Godoy C., Garcia Godoy F. How is the biocompatibility of dental biometarials evaluated? *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2007; **13**(3): 258-66.
93. Nicholson JW. *The chemistry of medical and dental materials*. Cambridge: The Royal Society of Chemistry; 2002. pp 186-195.

94. Moharamzadeh K., Brook I., Noort R. Biocompatibility of resin-based dental materials. *Materials* 2009; **2**(2): 514-48.
95. Polyzois GL. In vitro evaluation of dental materials. *Clin Mater* 1994; **16**: 21-60.
96. Standart I. *Biological evaluation of medical devices-Part 5: test for in vitro cytotoxicity*. Geneve, Switzerland: International Organization for Standardization; 2009.
97. Schmalz G. The agar overlay method. *Int. Endod J* 1988; **21**: 59-66.
98. Wennberg A., Hasselgren G., Tronstad L. A method for toxicity screening of biomaterials using cells cultured on Millipore filters. *J Biomed Mater Res* 1979; **13**: 109-20.
99. Outhwaite WC., McKenzie DM., Pashley DH. A versatile split-chamber device for studying dentin permeability. *J Dent Res* 1974; **53**(6): 1503.
100. Schmalz G., Hiller K., Nunez L., Stoll J., Weis K. Permeability Characteristics of Bovine and Human Dentin under Different Pretreatment Conditions. *J Endod* 2001; **27**: 23–30.
101. Schmalz G., Garhammer P., Schweiki H. A commercially available cell culture device modified for dentin barrier tests. *J Endod* 1996; **22**: 249–252.
102. Tang AT., Li J., Ekstrand J., Liu Y. Cytotoxicity tests of in situ polymerized resins: methodological comparisons and introduction of a tissue culture insert as a testing device. *J Biomed Mater Res* 1999; **45**(3): 214-22.
103. Connolly DT., Knight MB., Harakas NK., Wittwer AJ., Feder J. Determination of the number of endothelial cells in culture using an acid phosphatase assay. *Anal Biochem* 1986; **152**: 136-140.
104. Mossman T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; **65**: 55-63.
105. Riss TL. ve Moravec RA. Cell proliferation assays: improved homogeneous methods used to measure the number of cells in culture. İçinde Celis JE, editor. *Cell Biology*. Burlington: Elsevier Academic Press; 2006.

106. Denizot F., Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods* 1986; **89**: 271-277.
107. Tokur O. ve Aksoy A. In Vitro Sitotoksosite Testleri. *Harran Üniv Vet Fak Derg* 2017; **6**(1): 112-118.
108. Dinçel GÇ. Patolojik apoptozis ve tanı yöntemleri. *Gümüşhane Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi* 2016; **5**(1): 86-108.
109. Kumar V., Abbas AK. ve Aster JC. *Robbins temel patoloji*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2013.
110. Ulukaya E. Bölüm III. İçinde Engin K. Ve Ozyardımcı N, editor. *Akciğer Kanseri-Tanı ve tedavide temel ilkeler ve uygulamalar*. İstanbul: Avrupa Tıp; 2001.
111. Kandiloğlu G. Hücre ölüm mekanizmaları. İçinde Sözmen EY ve Girgin FK editor. *Apoptoz mekanizmaları- tanı yöntemleri klinik önemi*. İzmir: Güven; 1999. pp 3-9.
112. Kumar V., Abbas AK. ve Fausto N. *Pathologic basis of disease 7th edition. Chapter1: Cellular adaptations, cell injury, and cell death*. New Delhi, India: Elsevier; 2005. pp 4-18.
113. Candeiro GTDM. Moura- Netto CD. D'Almeida- Couto RS., Azambuja- Júnior N., Marques MM., Cai S., ve Gavini G. Cytotoxicity, genotoxicity and antibacterial effectiveness of a bioceramic endodontic sealer. *International Endodontic Journal* 2016; **49**(9): 858-864.
114. Maherali N. ve Hochedlinger K. Guidelines and techniques for the generation of induced pluripotent stem cells. *Cell stem cell* 2008, **3**(6): 595-605.
115. Collins J., Walker MP., Kulild J. ve Lee C. A comparison of three gutta-percha obturation techniques to replicate canal irregularities. *Journal of endodontics* 2006; **32**(8): 762-765.
116. Collado-González M., Tomás-Catalá CJ., Oñate-Sánchez RE., Moraleda JM. ve Rodríguez-Lozano FJ. Cytotoxicity of GuttaFlow Bioseal, GuttaFlow2,

- MTA Fillapex, and AH Plus on human periodontal ligament stem cells. *Journal of endodontics* 2017; **43**(5): 816-822.
117. Peters OA. Research that matters: biocompatibility and cytotoxicity screening. *Int Endod J* 2013; **46**: 195–7.
 118. Schmalz G., Schuster U., Thonemann B., Barth M., Esterbauer S. Dentin barrier test with transfected bovine pulp-derived cells. *J Endod* 2001; 27(2): 96-102.
 119. Can A. *Kök Hücre Biyolojisi ve Klinik Uygulamalar*. Ankara: TÜBA; 2009.
 120. Cavalcanti BN., Rode SM., Marques MM. Cytotoxicity of substances leached or dissolved from pulp capping materials. *International Endodontic Journal* 2005; **38**: 505–9.
 121. Gerosa R., Menegazzi G., Borin M., ve Cavalleri G. Cytotoxicity evaluation of six root canal sealers. *Journal of endodontics* 1995; **21**(9): 446-448.
 122. Poggio C., Riva P., Chiesa M., Colombo M. ve Pietrocola G. Comparative cytotoxicity evaluation of eight root canal sealers. *Journal of clinical and experimental dentistry* 2017; **9**(4): 574.
 123. Karapınar- Kazandağ M., Bayrak ÖF., Yalvaç ME., Ersev H., Tanalp J., Şahin F., ve Bayırlı G. Cytotoxicity of 5 endodontic sealers on L929 cell line and human dental pulp cells. *International endodontic journal* 2011; **44**(7): 626-634.
 124. Zakerzadeh A., Esnaashari E. ve Dadfar S. In vitro comparison of cytotoxicity and genotoxicity of three vital pulp capping materials. *Iranian endodontic journal* 2017; **12**(4): 419.
 125. Gerlier D. ve Thomasset N. Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. *Journal of immunological methods* 1986; **94**(1): 57-63.
 126. Cuppini M., Zatta KC., Mestieri LB., Grecca FS., Leitune VCB., Guterres SS. ve Collares FM. Antimicrobial and anti-inflammatory drug-delivery systems at endodontic reparative material: synthesis and characterization. *Dental Materials* 2019; **35**(3): 457-467.

127. Ciapetti G., Cenni E., Pratelli L. ve Pizzoferrato A. In vitro evaluation of cell/biomaterial interaction by MTT assay. *Biomaterials* 1993; **14**(5): 359-364.
128. Marques EF., da Silva Benigno MB., Macedo CP. ve Bitencourt L. Cytotoxicity and Genotoxicity Analysis of two Endodontic cements in Human Fibroblast Culture in Vitro. *International Journal of Advanced Engineering Research and Science* 2020; **7**(1).
129. Shigetani Y., Sasa N., Suzuki H., Okiji T. ve Ohshima H. GaAlAs laser irradiation induces active tertiary dentin formation after pulpal apoptosis and cell proliferation in rat molars. *Journal of endodontics* 2011; **37**(8): 1086-1091.
130. Saygili G., Saygili S., Tuglu I., Davut Capar I. In Vitro Cytotoxicity of GuttaFlow Bioseal, GuttaFlow 2, AH-Plus and MTA Fillapex. *Iranian endodontic journal* 2017; **12**(3): 354.
131. Kok SH., Hou KL., Hong CY., Chao LH., Lai EHH., Wang HW. ve ark. Sirtuin 6 modulates hypoxia-induced apoptosis in osteoblasts via inhibition of glycolysis: implication for pathogenesis of periapical lesions. *Journal of endodontics* 2015; **41**(10): 1631-1637.
132. Saito K., Nakatomi M., Kenmotsu S., Ohshima H. Allogenic tooth transplantation inhibits the maintenance of dental pulp stem/progenitor cells in mice. *Cell Tissue Res.* 2014; **356**(2): 357-67.
133. Cimpan MR., Cressey LI., Skaug N., Halstensen A., Lie SA., Gjertsen BT., Martre R. Patterns of cell death induced by eluates from denture base acrylic resins in U-937 human monoblastoid cells. *Eur J Oral Sci* 2000; **108**(1): 59-69.
134. Yang Q., Guo X., & Yang L. Metformin enhances the effect of regorafenib and inhibits recurrence and metastasis of hepatic carcinoma after liver resection via regulating expression of Hypoxia Inducible Factors 2 α (HIF-2 α) and 30 kDa HIV Tat-Interacting Protein (TIP30). *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research* 2018; **24**: 2225.
135. Jiao Y., Wu Y., Du D. Polydatin inhibits cell proliferation, invasion and migration, and induces cell apoptosis in hepatocellular carcinoma. *Braz J Med Biol Res* 2018; **51**(4).

136. Estrela C., Estrela CR., Barbin EL., Spanó JCE., Marchesan MA. ve Pécora JD. Mechanism of action of sodium hypochlorite. *Brazilian dental journal* 2002; **13**(2): 113-117.
137. Huang XQ., Camba J., Gu LS., Bergeron BE., Ricucci D., Pashley DH. ve ark. Mechanism of bioactive molecular extraction from mineralized dentin by calcium hydroxide and tricalcium silicate cement. *Dental Materials* 2018; **34**(2): 317-330.
138. Fridland M., Rosado R. Mta solubility: a long term study. *Journal of endodontics* 2005; **31**(5): 376-379.
139. Farhad A. ve Mohammadi Z. Calcium hydroxide: a review. *International dental journal* 2005; **55**(5): 293-301.
140. Chan TY. Potential dangers from topical preparations containing methyl salicylate. *Human Experimental Toxicology* 1996; **15**: 747-50.
141. Lapczynski A., Jones L., McGinty D., Letizia CS., Api AM. Fragrance material review on isobutyl salicylate. *Food & Chemical Toxicology* 2007; **45**(1): 424-452.
142. Yang, C. S., Chen, K. H., Hsu, W. M., & Li, Y. S. (2008). Cytotoxicity of silicone oil on cultivated human corneal endothelium. *Eye*, **22**(2), 282-288.
143. Chang MC., Lin LD., Chen YJ., Tsai YL., Cheng YA., Kuo CS. ve Jeng JH. Comparative cytotoxicity of five root canal sealers on cultured human periodontal ligament fibroblasts. *International endodontic journal* 2010; **43**(3): 251-257.
144. Key JE., Rahemtulla FG. ve Eleazer PD. Cytotoxicity of a new root canal filling material on human gingival fibroblasts. *Journal of endodontics* 2006; **32**(8): 756-758.
145. Kim RJY. ve Shin JH. Cytotoxicity of a novel mineral trioxide aggregated based root canal sealer. *Dental materials journal* 2014; 2013-171.
146. Scelza MZ., Coil J. ve Alves GG. Effect of time of extraction on the biocompatibility of endodontic sealers with primary human fibroblasts. *Brazilian oral research* 2012; **26**(5): 424-430.

147. Teixeira L., Basso FG., Hebling J., Costa CADS., Mori GG., Silva-Sousa YTC. ve Oliveira CFD. Cytotoxicity evaluation of root canal sealers using an in vitro experimental model with roots. *Brazilian dental journal* 2017; **28**(2): 165-171.
148. Onishi Y., Tanimoto Y. ve Kizaki H. Inflammation and apoptosis. *The Bulletin of Tokyo Dental College* 1997; **38**(2): 65-76.
149. Zhivotovsky B. ve Orrenius S. Calcium and cell death mechanisms: a perspective from the cell death community. *Cell calcium* 2011; **50**(3): 211-221.
150. Orrenius S., Gogvadze V. ve Zhivotovsky B. Calcium and mitochondria in the regulation of cell death. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2015; **460**: 72–81.
151. Souza GL., Rosatto CMP., Silva MJB., Silva MV., Rocha Rodrigues DB., ve Moura CCG. Evaluation of apoptosis/necrosis and cytokine release provoked by three root canal sealers in human polymorphonuclears and monocytes. *International endodontic journal* 2019; **52**(5): 629-638.
152. Szczurko G., Pawińska M., Łuczaj-Cepowicz E., Kierklo A., Marczuk-Kolada G., ve Hołownia A. Effect of root canal sealers on human periodontal ligament fibroblast viability: ex vivo study. *Odontology* 2018; **106**(3): 245-256.
153. Martinho FC., Camargo SEA., Fernandes AMM., Campos MS., Prado RF., Camargo CHR. ve Valera MC. Comparison of cytotoxicity, genotoxicity and immunological inflammatory biomarker activity of several endodontic sealers against immortalized human pulp cells. *International endodontic journal* 2018; **51**(1). 41-57.
154. Cohen B., Pagnillo MK., Musikant B., Deutsch SA. An in vitro study of the cytotoxicity of two root canal sealers. *J Endod* 2000; **26**: 228-229.
155. Zoufan K., Jiang J., Komabayashi T., Wang YH., Safavi KE. Cytotoxicity evaluation of Gutta Flow and EndoSequence BC sealers. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontics* 2011; **112**: 657–66.
156. Barros J., Costa-Rodrigues J., Lopes MA., Pina-Vaz I., Fernandes MH. Response of human osteoblastic and osteoclastic cells to AH plus and pulp canal

- sealer containing quaternary ammonium polyethylenimine nanoparticles. *J Endod* 2014; **40**: 1149-1155.
157. Silva, EJNLD., Santos CC. ve Zaia AA. Long-term cytotoxic effects of contemporary root canal sealers. *Journal of Applied Oral Science* 2013; **21**(1): 43-47.
 158. Jung S., Sielker S., Hanisch MR., Libricht V., Schäfer E., ve Dammaschke T. Cytotoxic effects of four different root canal sealers on human osteoblasts. *PloS one* 2018; **13**(3).
 159. Collado-González M., Tomás-Catalá CJ., Oñate-Sánchez RE., Moraleda JM. ve Rodríguez-Lozano FJ. Cytotoxicity of GuttaFlow Bioseal, GuttaFlow2, MTA Fillapex, and AH Plus on human periodontal ligament stem cells. *Journal of endodontics* 2017; **43**(5): 816-822.
 160. Victoria-Escandell A., Ibañez-Cabellos JS., de Cutanda SBS., Berenguer-Pascual E., Beltrán-García J., García-López E. ve Monterde M. Cellular responses in human dental pulp stem cells treated with three endodontic materials. *Stem cells international*, 2017.
 161. Saygili G., Saygili S., Tuglu I. ve Capar ID. In vitro cytotoxicity of guttaflow bioseal, guttaflow 2, AH-plus and MTA fillapex. *Iranian endodontic journal* 2017; **12**(3) 354.
 162. Darvell BW. ve Wu R.C. "MTA"-an Hydraulic Silicate Cement: review update and setting reaction. *Dent Mater* 2011; **27**(5): 407-22.
 163. Akyüz S., Kaya DMS. ve Demirel DS. Çocuk Diş Hekimliğinde MTA: Bir Literatür Güncellemesi. *Turkiye Klinikleri Journal of Dental Sciences Special Topics* 2012; **3**(1): 6-12.
 164. Sarkar NK., Caicedo R., Ritwik P., Moiseyeva R., ve Kawashima I. Physicochemical basis of the biologic properties of mineral trioxide aggregate. *Journal of endodontics* 2005; **31**(2): 97-100.
 165. Téclés O., Laurent P. ve Aubut I. Human tooth culture: a study model for reparative dentinogenesis and direct pulp capping materials biocompatibility. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2008; **85**(1):180-7.

166. Jitaru S., Hodisan I., Timis L., Lucian A. ve Bud M. The use of bioceramics in endodontics-literature review. *Clujul Medical* 2016; **89**(4): 470.
167. Vouzara T., Dimosiari G., Koulaouzidou EA., & Economides N. Cytotoxicity of a new calcium silicate endodontic sealer. *Journal of endodontics* 2018; **44**(5): 849-852.
168. Güven EP., Yalvac ME., Kayahan MB., Sunay H., Sahin F. ve Bayirli G. Human tooth germ stem cell response to calcium-silicate based endodontic cements. *Journal of Applied Oral Science* 2013; **21**(4): 351-357.
169. Formosa LM., Mallia B., ve Camilleri J. A quantitative method for determining the antiwashout characteristics of cement- based dental materials including mineral trioxide aggregate. *International endodontic journal* 2013; **46**(2): 179-186.
170. Formosa LM., Mallia B. ve Camilleri J. Mineral trioxide aggregate with anti-washout gel–Properties and microstructure. *Dental materials* 2013; **29**(3): 294-306.
171. Gomes-Filho JE., Watanabe S., Bernabé PFE. ve de-Moraes Costa MT. A mineral trioxide aggregate sealer stimulated mineralization. *Journal of Endodontics* 2009; **35**(2): 256-260.
172. Torabinejad M., Hong CU., Ford TP. ve Kettering JD. Cytotoxicity of four root end filling materials. *Journal of Endodontics* 1995; **21**(10): 489-492.
173. Zhou HM., Du TF., Shen Y., Wang ZJ., Zheng YF. ve Haapasalo M. In vitro cytotoxicity of calcium silicate–containing endodontic sealers. *Journal of Endodontics* 2015; **41**(1): 56-61.
174. Borges RP., Sousa- Neto MD., Versiani MA., Rached- Júnior FA., De-Deus G., Miranda CES., ve Pécora JD. Changes in the surface of four calcium silicate- containing endodontic materials and an epoxy resin- based sealer after a solubility test. *International endodontic journal* 2012; **45**(5): 419-428.
175. Mahdi JG., Alkarrawi MA., Mahdi AJ., Bowen ID. ve Humam D. Calcium salicylate- mediated apoptosis in human HT- 1080 fibrosarcoma cells. *Cell Proliferation* 2006; **39**(4): 249-260.

176. Gandolfi MG., Taddei P., Tinti A., Dorigo EDS., ve Prati C. Alpha-TCP improves the apatite-formation ability of calcium-silicate hydraulic cement soaked in phosphate solutions. *Materials Science and Engineering* 2011; **31**(7): 1412-1422.
177. Gandolfi MG., Shah SN., Feng R., Prati C. ve Akintoye SO. Biomimetic calcium-silicate cements support differentiation of human orofacial mesenchymal stem cells. *Journal of endodontics* 2011; **37**(8): 1102-1108.
178. Barrère F., van Blitterswijk CA. ve de Groot, K. Bone regeneration: molecular and cellular interactions with calcium phosphate ceramics. *International journal of nanomedicine* 2006; **1**(3): 317.
179. Koutroulis A., Kuehne SA., Cooper PR. ve Camilleri J. The role of calcium ion release on biocompatibility and antimicrobial properties of hydraulic cements. *Scientific Reports* 2019; **9**(1): 1-10.
180. Zaki DY., Zaazou MH., Khallaf ME. ve Hamdy TM. In vivo comparative evaluation of periapical healing in response to a calcium silicate and calcium hydroxide based endodontic sealers. *Open access Macedonian journal of medical sciences* 2018; **6**(8): 1475.
181. Rodríguez- Lozano FJ., García- Bernal D., Oñate- Sánchez RE., Ortolani- Seltenerich PS., Forner L. ve Moraleda JM. Evaluation of cytocompatibility of calcium silicate- based endodontic sealers and their effects on the biological responses of mesenchymal dental stem cells. *International endodontic journal* 2017; **50**(1): 67-76.
182. Colombo M., Poggio C., Dagna A., Meravini MV., Riva P., Trovati F. ve Pietrocola G. Biological and physico-chemical properties of new root canal sealers. *Journal of Clinical and Experimental Dentistry* 2018; **10**(2): 120.

ETİK KURUL KARARI



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU



Sayı : 202

17.08.2017

Konu : Prof. Dr. Raif Erişen

Sayın Prof. Dr. Raif ERİŞEN
Endodonti Anabilim Dalı

İlgili : Endodonti Anabilim Dalının 24/04/2017 gün ve 154848 sayılı yazısı.

Sorumlu araştırmacılığını üstlendiğiniz 2017/47 dosya nolu "Farklı Kanal Dolgu Maddelerinin Sitotoksitelerinin Hücre Kültürü Yöntemi ile Karşılaştırmalı Olarak İncelenmesi" başlıklı çalışma kurulumuzun 17/08/2017 tarih ve 57 sayılı toplantısında görüşülerek etik yönden uygun bulunmuş olup, tutanaklar ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi rica ederim.

Prof. Dr. Faruk Haznedaroğlu
İ.Ü. Diş Hekimliği Fakültesi Klinik
Araştırmalar Etik Kurulu Başkanı

Eki: İ.Ü. Diş Hekimliği Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Karar Formu

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	İkbal Sena	Soyadı	Çelebi Keskin
Doğ.Yeri	KONAK	Doğ.Tar.	04.11.1992
Email	İkbalsena_celebi@hotmail.com	Uyruğu	TC

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora		
Yük.Lis.		
Lisans	Ondokuz Mayıs Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi	2015
Lise	Dündar Çiloğlu Anadolu Lisesi	2010

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Diş Hekimi	İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi	2016-2020
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	İyi	Orta	Orta		

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı			
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Orta	İyi

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

-SODYUM HİPOKLORİTE BAĞLI DOKU NEKROZU VE TEDAVİSİ: BİR OLGU SUNUMU, ÇELEBİ KESKİN İ. S. , Erişen R., Akış D., Özgen M. Türk Endodonti Derneği 8. Bilimsel Sempozyumu, Adana, Türkiye, 10 - 13 May 2018, ss.313-314

-ODONTOJENİK KÜTANÖZ SİNÜS YOLU OLUŞUMU VE TEDAVİSİ: OLGU RAPORU, ÇELEBİ KESKİN İ. S. , Erişen R., Yalçın T. Y. Türk Endodonti Derneği 8. Bilimsel Sempozyumu, Adana, Türkiye, 10 - 13 May 2018, ss.245-246

-MUKOZAL FENESTRASYON VE TEDAVİLER, ÇELEBİ KESKİN İ. S. , Erişen R., Akış D. Türk Endodonti Derneği 8. Bilimsel Sempozyumu, Adana, Türkiye, 10 - 13 May 2018, ss.155-156

-C Kanallı Alt İkinci Büyükazı Dişinde Kök Kanal Tedavisi: Olgu Raporu, ÇELEBİ KESKİN İ. S. , Erişen R. ,24. İzdo Uluslararası Bilimsel Kongre Ve Sergisi, İzmir, Türkiye, 10 - 12 November 2017, ss.33, Treatment of a fusion of a maxillary central incisor tooth: a case report.

Treatment of a fusion of a maxillary central incisor tooth: a case report. ÇELEBİ KESKİN İ. S. , Erişen R., Yalçın T. Y. , Dinçol M. E.18th Biennal ESE Congress-Brussels, Belgium, Brüksel, Belçika, 14 - 16 September 2017, pp.FRIDAY C-33-FRIDAY C33-FRIDAY C-33

Özel İlgi Alanları (Hobileri):