



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**FARKLI KÖK KANAL PATLARININ SİTOTOKSİSİTE VE
ANTİMİKROBİYAL ETKİNLİK YÖNÜNDEN
KARŞILAŞTIRILMASI**

Meşkule ŞAHİN

**ENDODONTİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Berna ASLAN**

2012-ANKARA

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**FARKLI KÖK KANAL PATLARININ SİTOTOKSİSİTE VE
ANTİMİKROBİYAL ETKİNLİK YÖNÜNDEN
KARŞILAŞTIRILMASI**

Meşkule ŞAHİN

**ENDODONTİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Berna ASLAN**

2012-ANKARA

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Endodonti Doktora Programı

çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından
Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 18 / 10 / 2012



Prof. Dr. Berna ASLAN
Ankara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi
Jüri Başkanı



Prof. Dr. Aylin KALAYCI
Ankara Üniversitesi
Diş Hekimliği Fakültesi



Prof. Dr. Oya BALA
Gazi Üniversitesi
Diş Hekimliği Fakültesi



Prof. Dr. Devran GERÇEKER
Ankara Üniversitesi
Tıp Fakültesi



Prof. Dr. Hülya ERTEN CAN
Gazi Üniversitesi
Diş Hekimliği Fakültesi

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay Sayfası	ii
İçindekiler	iii
Önsöz	v
Simgeler ve Kısaltmalar	vi
Şekiller	viii
Çizelgeler	ix
1. GİRİŞ	1
1.1. Kök Kanal Dolgu Materyalleri	3
1.1.1. Katı Kök Kanal Dolgu Materyalleri	3
1.1.2. Kök Kanal Dolgu Patları	4
1.1.2.1. Kök Kanal Dolgu Patlarının Sınıflandırılması	5
1.1.2.1.1. Çinko Oksit Öjenol İçerikli Kök Kanal Dolgu Patları	6
1.1.2.1.2. Paraformaldehit İçerikli Kök Kanal Dolgu Patları	7
1.1.2.1.3. Kloroperka	8
1.1.2.1.4. Cam İyonomer İçerikli Kök Kanal Dolgu Patları	8
1.1.2.1.5. Kalsiyum Hidroksit İçerikli Kök Kanal Dolgu Patları	9
1.1.2.1.6. Silikon İçerikli Kök Kanal Dolgu Patları	10
1.1.2.1.7. Polimerler	11
1.1.2.1.8. MTA (Mineral Trioxide Aggregate) İçerikli Kök Kanal Dolgu Patı	12
1.2. Çalışmamızda Kullandığımız Kök Kanal Dolgu Patları	14
1.2.1. AH Plus	14
1.2.2. Tubli Seal EWT	15
1.2.3. EndoREZ Kök Kanal Dolgu Patı	16
1.2.4. MTA Fillapex	18
1.2.5. Epiphany Kök Kanal Dolgu Sistemi	19
1.2.5.1. Real Seal Kök Kanal Dolgu Patı	20
1.3. Biyouyumluluk	21
1.3.1. Biyouyumluluk Testleri	23
1.3.2. Hücre Kültürü	27
1.3.2.1. Hücre Kültürü Çalışmalarında Kullanılan Hücre Tipleri	28
1.3.2.2. Hücre Kültürü Test Yöntemleri	31
1.3.2.3. Sitotoksisite Değerlendirme Yöntemleri	36
1.4. Antimikrobiyal Etkinlik	40
1.4.1. Antimikrobiyal Etkinlik Değerlendirme Test Yöntemleri	40
1.5. Çalışmamızda Kullandığımız Bakteri Türü: <i>Enterococcus faecalis</i>	42
1.6. Amaç	45
2. GEREÇ ve YÖNTEM	47
2.1. Sitotoksisite Değerlendirmesi	48
2.1.1. Materyal Örneklerinin Hazırlanması	48
2.1.2. Ekstraksiyon Sıvısı Elde Edilmesi	48

2.1.3. Hücre Kültürü Hazırlanması	49
2.1.4. MTT (Mitokondriyal Toksikite Testi) Yöntemi İle Hücre Canlılık Tayini	50
2.1.5. İstatistiksel Analiz	51
2.2. Antimikrobiyal Etkinlik Değerlendirmesi	52
2.2.1. Bakteri Süspansiyonunun Hazırlanması	52
2.2.2. Direkt temas testi Yöntemi	53
2.2.3. İstatistiksel Analiz	55
3. BULGULAR	56
3.1. Sitotoksikite Çalışmasına Ait Bulguları	56
3.2. Antimikrobiyal Etkinlik Çalışmasına Ait Bulgular	62
4. TARTIŞMA	68
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	89
ÖZET	92
SUMMARY	93
KAYNAKLAR	94
ÖZGEÇMİŞ	109

ÖNSÖZ

Kök kanal dolgu patları endodontide önemli bir yer tutmaktadır. Endodontik tedavilerde kemomekanik işlemler sonunda kök kanalı, katı kök kanal dolgu materyalleri ve kök kanal dolgu patları ile hermetik bir şekilde doldurularak iyileşme sağlanmaya çalışılmaktadır. Ben de doktora tez çalışmamda periapikal dokularla ilişkide olan kök kanal dolgu patlarının sitotoksik ve antimikrobiyal etkilerini değerlendirerek, klinik kullanımlarına katkı sağlamayı amaçladım. Eğitimim ve tez çalışmalarım süresince bana yardımcı olan pek çok kişiye teşekkür etmem gerektiğine inanıyorum.

Doktora eğitimimde olduğu gibi tez çalışmamın gerçekleşmesinde de fikirleri ile yol gösteren, bilgisi ve hoşgörüsüyle her zaman bana destek olan değerli hocam, tez danışmanım, Sayın Prof. Dr. Berna ASLAN'a,

Tez çalışmalarım süresince bilgileriyle yol gösteren, laboratuvarlarında çalışma ortamı sağlayan ve yakın ilgi ve desteğini esirgemeyen Ankara Üniversitesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Devran GERÇEKER'e,

Her konuda benden yardımlarını ve bilgilerini esirgemeyen değerli Endodonti Anabilim Dalı öğretim üyelerine,

Her zaman yanımda olan ve bana destek veren canım dostlarım Dr. Dt. E. Asuman Çavdar TETİK, Dr. Dt. Fatma BÖKE, Dr. Dt. Arzu BAYALAN ALDEMİR, Dt. Burcu KOCATÜFEK ÖZYILMAZ'a ve çalışma arkadaşlarıma,

Diş Hekimliği ve doktora eğitimim sırasında her zaman yanımda olan, anlayışını ve yardımlarını esirgemeyen eşim İdris Aytek ŞAHİN'e, ailemize katılarak bana umut veren oğlum Deniz Umut ŞAHİN'e ve ŞAHİN ailesine,

Yaşamım boyunca olduğu gibi doktora eğitimim süresince de maddi ve manevi destekleri ve sevgileriyle her zaman yanımda olan ve bugünlere gelmemi sağlayan sevgili aileme,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

SİMGELER VE KISALTMALAR

ADT	Agar Difüzyon Testi
ANSI/ADA	American National Standard/ American Dental Association
ark	arkadaşları
ATCC	American Type Culture Collection
Bis GMA	Bisfenol-A Glisidil Metakrilat
BHI	Brain Heart İnfüzyon
°C	Santigrat Derece
Ca ⁺⁺	Kalsiyum
Ca(OH) ₂	Kalsiyum Hidroksit
cm	Santimetre
CO ₂	Karbondioksit
Cr-51	Krom 51
DCT	Direkt Temas Testi
dk	Dakika
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetil Sülfoksit
EBPADMA	Etoksilat Bisfenol A Dimetakrilat
EDTA	Etilendiamintetraasetik Asit
Endo CPM Sealer	Portland Cement Modified Sealer
FBS	Fetal Sığır Serumu
FDI	The Federation Dentaire Internationale
HEMA	2-Hidroksietil Metakrilat
ISO	International Standards Organization
LDH	Laktat Dehidrogenaz
µm	Mikrometre
µl	Mikrolitre
mg	Miligram
ml	Mililitre

mm	Milimetre
MTA	Mineral Trioxide Aggregate
MTAS	Mineral Trioxide Aggregate Sealer
MTT	Mitokondrial Dehidrogenaz Aktivitesi
NaCl	Sodyum Klorür
Na ₂ CrO ₄	Sodyum Kromat
nm	Nanometre
OH ⁻	Hidroksil İyonu
PBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
PEGDMA	Polietilen Glikol Dimetakrilat
ppm	Parts Per Million
RCF	Rölatif Santrifüj Kuvveti
RSA	Roekoseal
THP-1	Human Acute Monocytic Leukemia Cell Line
UDMA	Üretan Dimetakrilat Matriksi
UV	Ultraviyole
%	Yüzde

ŞEKİLLER

Şekil 2.1.	AH Plus	47
Şekil 2.2.	Tubli Seal EWT	47
Şekil 2.3.	EndoREZ	47
Şekil 2.4.	MTA Fillapex	47
Şekil 2.5.	Real Seal	47
Şekil 2.6.	Steril kabin (Class II Holten LominerHow, Danimarka)	48
Şekil 2.7.	DMEM besi ortamı	49
Şekil 2.8.	İnkübatör	49
Şekil 2.9.	FBS-fetal sığır serumu	49
Şekil 2.10.	McFarland standart cihazı	53
Şekil 2.11.	Bakteri süspansiyonu	53
Şekil 2.12.	Direkt temas testiyöntemi	53
Şekil 2.13.	Kök kanal dolgu patları yerleştirilmiş 96 kuyucuklu plak	54
Şekil 2.14.	Spektrofotometre (Sanofi Diagnostic Pasteur PR 1100 Reader)	55
Şekil 3.1.	24. 48. ve 72. saatteki kontrol grubuna göre değişik patlardaki hücre canlılık oranlarının grafiksel ifadesi	57
Şekil 3.2.	Grup; A 1-6 saat arası optik densitometre değerleri	64
Şekil 3.3.	Grup A; 13-18 saat arası optik densitometre değerleri	65
Şekil 3.4.	Grup B; 1-6 saat arası optik densitometre değerleri	66
Şekil 3.5.	Grup B; 13-18 saat arası optik densitometre değerleri	67

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1.	AH Plus kök kanal dolgu patının içeriği	14
Çizelge 1.2.	Tubli Seal kanal patının içeriği	15
Çizelge 1.3.	Tubli Seal EWT kök kanal dolgu patının içeriği	16
Çizelge 1.4.	EndoREZ kök kanal dolgu patının içeriği	17
Çizelge 1.5.	MTA Fillapex kanal dolgu patının içeriği	18
Çizelge 1.6.	Resilon sisteminin piyasadaki üretici firmaları ve markaları	19
Çizelge 1.7.	Real Seal kök kanal dolgu patının içeriği	21
Çizelge 3.1.	AH Plus, Tubli Seal EWT, EndoREZ, MTA Fillapex, Real Seal kök kanal dolgu patlarının 24., 48. ve 72. saatteki hücre canlılık oranlarının (%) ortalama değerleri (minimum-maksimum)	56
Çizelge 3.2.	Mosmann (1983)'in skalasına göre AH Plus, Tubli Seal EWT, EndoREZ, MTA Fillapex, Real Seal kök kanal dolgu patlarının sitotoksosite değerleri	58
Çizelge 3.3.	24. saatteki kontrol grubuna göre kök kanal dolgu patlarının canlı hücre oranları karşılaştırması	59
Çizelge 3.4.	48. saatteki kontrol grubuna göre değişik patlardaki canlı hücre oranları karşılaştırması	59
Çizelge 3.5.	72. saatteki kontrol grubuna göre değişik patlardaki canlı hücre oranları karşılaştırması	60
Çizelge 3.6.	AH Plus grubuna ait 24, 48, ve 72 saatlik değerlendirmede kontrol grubuna göre canlı hücre oranları karşılaştırması (Friedman Testi)	61
Çizelge 3.7.	Tubli Seal EWT grubuna ait 24, 48, ve 72 saatlik değerlendirmede kontrol grubuna göre canlı hücre oranları karşılaştırması (Friedman Testi)	61
Çizelge 3.8.	EndoREZ grubuna ait 24, 48 ve 72 saatlik değerlendirmede kontrol grubuna göre canlı hücre oranları karşılaştırması (Friedman Testi)	61
Çizelge 3.9.	MTA Fillapex grubuna ait 24, 48 ve 72 saatlik değerlendirmede kontrol grubuna göre canlı hücre oranları karşılaştırması (Friedman Testi)	62
Çizelge 3.10.	Real Seal grubuna ait 24, 48 ve 72 saatlik değerlendirmede kontrol grubuna göre canlı hücre oranları karşılaştırması (Friedman Testi)	62

Çizelge 3.11. Grup A; 1-6 saat arası OD ortalama değerleri (\pm SD) (ANOVA)	63
Çizelge 3.12. Grup A; 13-18 saat arası OD ortalama değerleri (\pm SD) (ANOVA)	64
Çizelge 3.13. Grup B; 1-6 saat arası OD değerleri ortalaması (\pm SD) (ANOVA)	65
Çizelge 3.14. Grup B; 13-18 saat arası OD değerleri ortalaması (\pm SD) (ANOVA)	66

1. GİRİŞ

Başarılı bir endodontik tedavide amaç, kök kanallarının uygun bir şekilde genişletilip dezenfekte edildikten sonra inert, boyutsal olarak stabil ve biyolojik olarak uyumlu bir kanal dolgu materyali ile apikal foramene kadar hermetik bir şekilde üç boyutlu olarak doldurulmasıdır.

Sıklıkla kök kanal dolgu materyali olarak güta perka ve kök kanal dolgu patı birlikte kullanılmaktadır. Güta perka tek başına kullanıldığında kök kanal sistemini tam anlamıyla doldurmada yetersiz kalır (Himel ve ark., 2006, s.:265). Bu nedenle kök kanal dolgu patları güta perkayı dentine bağlamada; çoklu foraminaları, anastomozları ve yan kanallar gibi düzensizlikleri doldurmada gerekli bir bağlayıcı ajandır (Schafer, 2000; Johnson ve Gutmann, 2006, s.:368).

Endodontide kullanılan kök kanal dolgu maddeleri doğrudan canlı dokularla temas halinde olabildikleri gibi çözündüklerinde de içeriklerinde bulunan bazı maddelerin salınımı ile dokuları etkileyebilir. Bu maddelere karşı oluşan doku yanıtı, endodontik tedavinin sonuçlarını doğrudan etkileyeceği için, oldukça önemlidir. İdeal bir kök kanal dolgu maddesinde bulunması gereken özelliklerden biri, periapikal dokuları irrite etmemesi ve temas ettiği canlı dokularla uyum gösterebilmesidir (Johnson ve Gutmann, 2006, s.:369). Kök kanallarının kemomekanik preparasyonunu takiben, kök kanal dolgusunun apikal sonlanması ve kullanılan maddenin yapısı, mineralize doku birikimi ile foramenin kapanması gibi ideal bir biyolojik yanıtın oluşmasında çok önemli bir yer tutar (Holland ve de Souza, 1985). Endodontik tedavi sonunda periapikal dokularda onarım süreci başlar. Onarım süreci hücre proliferasyonu ve organik matriks formasyonundan oluşur. Bu olayların sonucunda kök apeksinde örtücülük sağlanmış olur. Onarımın başlangıç evresinde patların iritan potansiyeli onarımı yavaşlatabilir veya durdurabilir. Çünkü patolojik olaylara bağlı iritasyon ile beraber şekillendirme esnasında oluşabilecek hatalar çevre dokularda hasara sebep olabilir. Bu nedenle kök ucu ve çevre dokulara zarar vermeyecek bir madde kullanılmalıdır (Lin ve Rosenberg, 2011).

Enfekte kök kanallarında, yeniden enfeksiyonu önlemek için kök kanalı dolgusundan önce kanal duvarlarının şekillendirilmesi, irrigasyon ve pansuman materyallerinin uygulanması endodontik tedavinin önemli basamaklarıdır. Ancak, kök kanalının kompleks bir yapıya sahip olması, apikal deltanın yapısı, yan ve aksesuar kanalların varlığı; bu basamakların gerçekleştirilmesine rağmen dentin tübüllerinde mikroorganizmaların kalmasına neden olmakta ve kök kanalının tamamen steril hale gelmesi çoğu zaman mümkün olamamaktadır (Byström ve Sundqvist, 1983; Byström ve Sundqvist, 1985; Peters ve ark., 1995). Bu yüzden endodontik tedavinin son basamağı olan kök kanal dolgusu işlemi esnasında kullanılacak materyallerin bakteri gelişimini önlemek için antibakteriyel özelliğe sahip olması istenir (Torabinejad ve ark., 1995a). Bu anlamda en ideal kök kanal dolgu patı, kök kanalının duvarlarını tamamiyle örtmeli, periapikal dokular tarafından tolere edilebilir olmalı, rezorbe olmamalı ve hacimsel stabiliteye sahip olmalıdır. Ayrıca kök kanal tedavisinden sonra periapikal doku iyileşmesinin gerçekleşebilmesi için gerekli temel basamaklardan birisi de mikroorganizma ve toksinlerinin kanal içerisinden uzaklaştırılmasıdır. Bundan dolayı kök kanal dolgu materyalinin bakterisit veya en azından bakteriyostatik etkisinin olması istenir (Abou-Rass ve Oglesby, 1981; Canalda ve Pumarola, 1989; Torabinejad ve ark., 1995a; Barbosa ve ark., 1997).

Bu nedenlerden ötürü, endodontide pulpanın canlılığını devam ettirmede ve kanal tedavisinde kök kanallarının dezenfeksiyonu ve doldurulmasında kullanılmakta olan farklı içerikli birçok madde, araştırmacılar tarafından fiziksel özellikleri, kullanım özellikleri, antimikrobiyal etkileri ve biyolojik özellikleri açısından incelenmekte ve en ideal madde bulunmaya çalışılmaktadır. Günümüzde halen ideal özelliklere sahip olduğu öne sürülen yeni kök kanal dolgu maddeleri geliştirilmektedir. Her yeni geliştirilmiş maddenin diğer özelliklerinin yanında, kısa ve uzun dönemde biyolojik uyumunun ve antimikrobiyal etkisinin ne olduğu, yani temasta olduğu dokuların gösterdiği tepki, bu tepkinin derecesi ve dokuların buna karşı gösterdikleri yanıt ve antimikrobiyal etkisinin ne olduğu belirlenmelidir.

1.1. Kök Kanal Dolgu Materyalleri

Periapikal doku hastalıklarının etiyolojisinde ve patogenezinde primer etkenin bakteriler olduğunun belirlenmesinden sonra, temizlenip şekillendirilen kök kanalının uzun süreli sızdırmaz bir şekilde doldurulması ve böylece bakteri ve antijenlerinin kök kanal sisteminden periapikal bölgeye yayılımlarının önlenmesi zorunluluk olmuştur. Bu nedenle; kök kanal dolgu materyali, inflamasyon nedeni olan enfeksiyon ve reenfeksiyonu önlemelidir. (Schmalz ve Arenholt-Bindslev, 2010, s.: 202-213).

Walton ve Johnson (2002) endodontide kullanılan kök kanal dolgu materyallerini, katı ve yarı-katı olmak üzere 2 ana grup altında toplamışlardır.

Himel ve ark. (2006) ise güta perka konları, Resilon, güta perka kaplanmış kor materyalleri ve gümüş konları katı materyaller olarak, kök kanal dolgu materyallerini ise yarı-katı materyaller olarak sınıflandırmışlardır.

1.1.1. Katı Kök Kanal Dolgu Materyalleri

Katı materyaller, kanal içine rahat yerleştirilebilecek şekilde tasarlanmış olsalar da, kök kanal sistemindeki düzensizliklere uyum göstermeleri zordur. Katı materyaller kanal içine yerleştirildiğinde genellikle kök kanal duvarları ile dolgu materyali arasında bir boşluk oluşturmaktadır. Bu nedenle katı materyallerin, yarı-katı materyaller ile birlikte kullanılması önerilmektedir. Katı kök kanal dolgu materyalleri, kök kanal dolgusunun boyutunun ayarlanabilmesine olanak vermesinden dolayı yarı-katı materyallere oranla üstünlük sağlamaktadır (Walton ve Johnson, 2002, s.: 239-267; Regan, 2004, s.: 181-196).

1.1.2. Kök Kanal Dolgu Patları

Kök kanal patları, ana kon dolgu materyalinin yüzeyleri ile dentin duvarları arasındaki boşluğu doldurmak için gereklidir. Patlar aynı zamanda lateral kondensasyon yöntemi kullanılarak kanal içindeki düzensizlikleri, lateral ve aksesuar kanalları ve de gütü perka konlar arasındaki boşlukları doldurur. Ayrıca doldurma işlemi sırasında kayganlaştırıcı etki de gösterirler (Johnson ve Gutmann, 2006, s.:368).

Kök kanal dolgu patları kök kanal sisteminin doldurulmasında az miktarda kullanılmasına rağmen kök kanal tedavisinin sonucunu etkilediği gösterilmiştir (Qrstavik ve ark., 1987; Saunders ve Saunders, 1994; Saleh ve ark., 2004; Qrstavik, 2005).

Grossman'a göre iyi bir kök kanal dolgu patında aranılan nitelikler şunlardır: (Grossman, 1982, s.:297)

1. Karıştırıldığında yapışkan özellikte olmalı ve böylece sertleştiği zaman kendisi ile kanal duvarı arasında iyi bir adezyon sağlamalıdır.
2. Kök kanalında hermetik bir tıkkama gerçekleştirmelidir.
3. Radyografide izlenebilmesi için radyopak olmalıdır.
4. Toz kısmı çok ince partiküllü olmalı ve böylece sıvı kısmıyla kolayca karıştırılabilmelidir.
5. Sertleşme sırasında büzülme göstermemelidir.
6. Diş dokularında renkleşmeye neden olmamalıdır.
7. Bakteriyostatik olmalı veya en azından bakteri gelişimini engellemelidir.
8. Yavaş sertleşme özelliğinde olmalıdır.
9. Doku sıvılarında çözünmemelidir.
10. Doku dostu olmalıdır; yani, periapikal dokulara zararlı etkisi bulunmamalıdır.
11. Gerektiğinde kök kanalından çıkarılabilmesi için, bilinen çözücü materyallerde çözünbilme özelliğinde olmalıdır.

Grossman'ın bildirdiği bu özelliklere sonradan bazı özellikler daha eklenmiştir. Bunlar: (Ingle ve ark., 2002, s.:579-668)

12. Periapikal dokularda immun cevaba neden olmamalıdır.
13. Karsinojenik ve mutajenik etkisi olmamalıdır.

1.1.2.1. Kök Kanal Dolgu Patlarının Sınıflandırılması

Kanal patları içerdikleri maddeler, sertleşme, fiziksel özellikleri, rezorbe olabilmelerine ve kullanım sıklıklarına göre sınıflandırılmışlardır (Schmalz ve Arenholt-Bindslev, 2010, s.:202-213).

Himel ve ark.'nın patları içeriklerine göre sınıflandırması (Himel ve ark., 2006, s.:265-271)

1. Çinko oksit öjenol içerikli patlar
2. Formaldehit içerikli patlar
3. Kloroperka
4. Cam iyonomer içerikli patlar
5. Kalsiyum hidroksit içerikli patlar
6. Silikon içerikli patlar
7. Polimerler

Schmalz ve Arenholt-Bindslev (2010)'in kök kanal dolgu patlarını kullanım sıklıklarına göre sınıflandırması:

1. Çinko oksit öjenol içerikli patlar
2. Kalsiyum hidroksit içerikli patlar
3. Epoksi rezin esaslı patlar
4. Metakrilat içerikli patlar
5. Mineral trioksit aggregate (MTA)

6. Silikon içerikli patlar

1.1.2.1.1. Çinko Oksit Öjenol İçerikli Kök Kanal Dolgu Patları

Çinko oksit öjenol içerikli kök kanal dolgu patları, genelde toz ve likit olmak üzere iki kısımdan oluşmaktadır. Toz, çinko oksit ağırlıklı olup içine radyoopak maddeler ve rezin eklenmiştir. Likidin esasını öjenol oluşturmaktadır. Bazı çinko oksit öjenol içerikli patların likidine, pata yapışma özelliği kazandıran Kanada balsamı eklenmiştir. Günümüzde endodontide kök kanal dolgu materyali olarak kullanılan patların büyük çoğunluğunun içerisinde ana bileşen olarak çinko oksit öjenol bulunmaktadır. Çinko oksit öjenol, çinko oksit öjenolat kristalleri matriksi arasına gömülmüş ve sertleşmiş çinko oksit kristalleri oluşturarak donan bir bileşiktir (Himel ve ark., 2006, s.:265).

Adeziv özellikleri dikkate alındığında, birçok çinko oksit öjenol içerikli kanal patının içerisinde yüksek konsantrasyonda kolofoni (colophony) olduğu görülür. Kolofoni yaklaşık %90'ı rezinöz asitten oluşan bitkisel rezindir (Sousa-Neto ve ark., 1999).

Bu simanlara kimyasal özelliklerini geliştirecek materyaller eklenmiştir. Örneğin antimikrobiyal ve fiksasyon etkisi için sıklıkla paraformaldehit, antiseptik etki için germisitler, dentin adezyonunu sağlamak için Kanada balsamı ya da bitkisel reçine (rezin), enflamatuvar reaksiyonun baskılanması içinde kortikosteroidler ilave edilmektedir (Himel ve ark., 2006, s.:265).

Çinko oksit öjenol içeren patların avantajı, kolay şekil verilebilir olması, nemsiz ortamlarda yavaş sertleşmesi ve sertleşme sırasında düşük oranda boyutsal değişiklik göstermesidir. En önemli dezavantajı ise, sürekli öjenol salınımı ile birlikte suyla temas ettiğinde dekompoze olmasıdır (Ingle ve ark., 2002, s.:747-768; Himel ve ark., 2006, s.:265).

Bu gruba ait örnek kök kanal dolgu patları şunlardır: Rickert's patı, Tubli Seal patı, Procosol, Grossman patı ve Wach patı.

1.1.2.1.2. Paraformaldehit İçerikli Kök Kanal Dolgu Patları

Antibakteriyel ve terapötik özelliklerinden dolayı çinko oksit öjenol esaslı kök kanal dolgu patları geliştirilmiştir. Bu patların toz kısmına çinko okside ilaveten %4,78-6,5 oranında paraformaldehit, timol, iyodür, deksametazon ve hidrokortizon asetat ilave edilmiştir ve bu nedenle paraformaldehit içerikli patlar olarak da anılmaktadır (Ingle ve ark., 2002, s.:579-668; Hauman ve Love, 2003).

Paraformaldehit içeren kök kanal dolgu patları, devamlı formaldehit gazı saldıklarından sürekli fiksatif ve antiseptik etki elde edilmesi amaçlanarak kullanılmaktadır (Lewis ve Chestner, 1981).

Bu patların toksik etkileri olduğu, dokularla temasta nekroza neden olabilecekleri, apikalden taşmaları durumunda ise kalıcı paresteziye neden olabilecekleri ileri sürülmüştür (Ingle ve ark., 2002, s.:579-668; Hauman ve Love, 2003).

Paraformaldehit içeren kök kanal dolgu patları sinir dokusu ile direk temasa geçtiğinde, sinir iletimini tamamen, irreversible olarak inhibe ederek dokuda kalıcı hasar oluşturduğu bildirilmiştir (Brodin, 1988).

Kök kanal tedavisini takiben bazı olgularda aşırı duyarlılık gelişebilmekte ve bunun formaldehit salınımı sonucu olduğuna inanılmaktadır. Formaldehitin sitotoksik özelliğinin yanı sıra, hem mutajenik hem de karsinojenik olduğu bilinmektedir. Ancak, endodontik kanal patından salınan formaldehitin bu etkileri oluşturmadığı da ileri sürülmüştür (Koch, 1999).

Yukarıda ifade edilen olumsuz etkileri nedeniyle ve ayrıca Avrupa Endodonti Derneği'nin de tavsiyesiyle bu tip kanal dolgu patlarının kullanılmaması gerektiği bildirilmiştir (European Society of Endodontology, 1994).

Bu gruba ait örnek kök kanal dolgu patları şunlardır: Endomethasone, Kri patı, Riebler's patı, N2 Universal, N2 Normal, Spad ve Oxpara.

1.1.2.1.3. Kloroperka

Uzun yıllardır kullanılan bir kanal patı olan kloroperka beyaz güta perkanın kloroformla birleşmesinden oluşur. Diğer bir ticari preparat olan kloroperka N-Q'ya kloroperkanın adeziv özelliğini artırmak için rezin ve Kanada balsamı eklenmiştir. Kloroperka ürünlerinin çoğunluğundaki genel problem kloroformun buharlaşması anındaki büzülmedir. Bu pata radyoopasiteyi artırmak ve büzülmeyi azaltmak amacıyla çinko oksit tozu ilave edilmiştir (Himel ve ark., 2006, s.:266-267).

Kloroformun genel kullanımı, toksisitesi hakkındaki endişeler nedeniyle son yıllarda önemli ölçüde azalmıştır. Ancak endodontide kullanılan miktarının önemsiz olduğu ve sağlığa zararlı olmadığı belirtilmekle birlikte kloroform yüksek oranda uçucu olduğu için klinisyenler dikkatli davranmalıdırlar (Wennberg, 1980).

1.1.2.1.4. Cam İyonomer İçerikli Kök Kanal Dolgu Patları

Cam iyonomer simanlar 1970'lerin başında geliştirilmiştir (Wilson ve Kent, 1972). Cam iyonomerlerin mine ve dentinin hidroksiapatitine kimyasal olarak bağlanmaları, biyoyumlulukları, flor salınımları ve antibakteriyel özellikleri nedeniyle kök kanal dolgu patı olarak kullanımları gündeme gelmiştir (Saunders ve Saunders, 1994).

Cam iyonomer simanlar 25 yıldan daha uzun bir süredir diş hekimliğinin birçok alanında kullanılmasına rağmen literatürde sistemik, toksik veya allerjen özelliklerine dair çok az bilgi bulunmaktadır.

Zmener ve Dominquez (1983)'in yaptığı çalışmada çok az doku irritasyonuna neden olduğu, Pissiotis ve ark. (1991)'nin yaptığı in vitro çalışmaya göre ise hafif toksisite gösterdiği öne sürülmüştür. Cam iyonomerlerin endodontik pat olarak biyolojik özelliklerine ait çok az sayıda veri vardır, bu nedenle bu kök kanal patlarının güvenilirliği ve etkinliği henüz tam olarak bilinmemektedir.

Cam iyonomer içerikli kök kanal dolgu patlarıyla ilgili en önemli sorun endodontik tedavinin yenilenmesi işlemidir. Patın sökülmesini kolaylaştıran herhangi bir çözücü yoktur. Donmuş patın kanaldan sökülmesi ise oldukça zordur (Dalat ve Onal, 1998; Spangberg, 1998, s.:228).

Bu gruba ait örnek kök kanal dolgu patları şunlardır: Ketac-Endo, Endion, Vitrabond, Fuji Ionomer ve Chembond.

1.1.2.1.5. Kalsiyum Hidroksit İçerikli Kök Kanal Dolgu Patları

Kalsiyum hidroksit, kök kanal dolgu materyali olarak ilk defa 1940 yılında Rhoner tarafından kullanılmıştır (Leonardo ve ark., 1980; Fava ve Saunders, 1999).

Bu patların hazırlanması ve uygulanması kolaydır, radyoopasiteleri yeterlidir ve kök kanalından döner aletlerle uzaklaştırılabilirler fakat dentine yapışmaları zayıftır (Wennberg ve Qrstavik, 1990). Uzun dönemde yapılan bazı araştırmalarda, bu patların yüksek oranda hacimsel genişlemeye, dağılma ve yüksek çözünürlüğe sahip olduğu tespit edilmiştir (Wu ve ark., 1995).

Kalsiyum hidroksit esaslı kök kanal dolgu maddelerinin ortama hidroksil iyonları salınımına bağlı olarak ortam pH'ında yükselme meydana gelir ve alkalizasyon

sağlanır. Bu durum mikroorganizmaların sahip olduğu membran enzimlerini geri dönüşümsüz olarak hasara uğratar ve mikroorganizmaların ölmesini sağlar (Imlay ve Linn, 1988; Foreman ve Barnes,1990; Türkün ve Cengiz, 1997). Fakat hidroksil iyonlarının etkinliği; tamponlama sistemleri, asitler, proteinler ve karbondioksit tarafından sınırlandırılır bu da kalsiyum hidroksitin antibakteriyel etkinliğinin azalmasına neden olur (Siqueira ve Uzeda, 1998).

Bu patların kalsiyum hidroksit içeriğinden dolayı terapötik etkili olduğu ileri sürülmektedir. Terapötik etki göstermesi için kalsiyum hidroksitin Ca^{++} ile OH^- iyonlarına ayrılması gerekmektedir. Bu nedenle kalsiyum hidroksit içerikli bir kök kanal dolgu patının, kalsiyum hidroksit salması için çözünmesi gereklidir (Tagger ve ark., 1988). Kalsiyum hidroksit çözündüğünde kanal dolgusunda boşluklar bırakır ve bu durum patın fonksiyonunu bozmaktadır.

Bu gruba ait örnek kök kanal dolgu patları şunlardır: Sealapex, Biocalex, Acroseal, CRCS (Calcibiotic Root Canal Sealer), Apexit ve Apexit Plus.

1.1.2.1.6. Silikon İçerikli Kök Kanal Dolgu Patları

Kök kanal patı olarak 1984 yılında piyasaya sunulmuştur. Materyaller ilk olarak C-silikonundan (çapraz bağlı silikon kondensasyonu), yeni materyaller ise A-silikonlarından (eklemeli çapraz bağlanma) oluşmaktadır. Son zamanlarda silikon matriksi içine parçacık boyutu $30\mu m$ 'den küçük güta perka tozu ve koruyucu madde olarak gümüş parçacıkları eklenmiştir. Çalışma zamanı 15 dk ve sertleşme zamanı 25-30 dk'dır (Bouillaguet ve ark., 2006; Schmalz ve Arenholt-Bindslev, 2010, s.:213).

Silikon içerikli patlar kapsüller içerisinde bulunur. Güta perkanın yerleştirilmesinden sonra, karıştırılan silikon içerikli pat kanal içine kolaylıkla enjekte edilebilir. Silikon esaslı patlar diğer kanal patları gibi istendiğinde uzaklaştırılabilir (Schmalz ve Arenholt-Bindslev, 2010, s.:213).

Bu materyaller polimerizasyon büzülmesi göstermezler, göreceli olarak iyi mekanik ve tıkama özelliklerine sahiptirler. Bu patların sistemik toksisite veya alerjiye neden olduğuna dair bir veri bulunmamaktadır. Silikon materyalinin içeriğine dayanarak ters, olumsuz bir reaksiyon beklenmemektedir. C-silikon içerikli eski preparatların aksine A-silikon içerikli preparatların, farklı hücre kültürü ve implantasyon testlerinde çok az toksik olduğu veya hiç toksisite göstermediği bildirilmiştir (Görduysus ve ark., 1998; Bouillaguet ve ark., 2006).

Bu patların antibakteriyel özellikleri yoktur. Silikon içerikli patlarla ilgili sınırlı sayıda klinik çalışma vardır (Saleh ve ark., 2004; Willershausen ve ark., 2011). Bu gruba ait örnek kök kanal dolgu patları şunlardır: Lee Endo-Fill, RoekoSeal, GuttaFlow.

1.1.2.1.7. Polimerler

Polimer yapıdaki kök kanal dolgu patları, toz / likit veya çift pat sistemi şeklindedir. Son yıllarda piyasaya sürülen kök kanal dolgu patlarının çoğu polimerlerdir.

Radyoopasite, adezyon, apikal örtücülük yeteneği, akıcılık gibi fizikokimyasal özellikleri yüksek olan patlardır (Barthel ve ark., 1994).

Endodontide farklı tip polimerlerden oluşan kanal patları geliştirilmiştir. Poliketon kaynaklı Diaket-A, epoksi rezin esaslı AH26 ve AH Plus, metakrilat esaslı EpiPhany, Real Seal, Real Seal SE, SimpliFill, metakrilat bazlı ve polihidroksi-etil metakrilatlı Hydron, üretan dimetakrilat esaslı EndoREZ bu grup patlara örnek olarak verilebilir (Himmel ve ark., 2006, s.:233-290).

1.1.2.1.8. MTA (Mineral Trioxide Aggregate) İçerikli Kök Kanal Dolgu Pati

İlk olarak 1993 yılında Torabinejad tarafından geliştirilen MTA, başlangıçta periapikal cerrahi uygulamalarında kök ucu dolgu maddesi olarak geliştirilmiştir (Schwartz ve ark., 1999).

MTA, ağırlıkça %75 Portland imentosu, %20 bizmut oksit ve %5 kalsiyum sülfat dihidrattan oluşmaktadır (Dentsply, Tulsa Dental, 2002).

MTA'nın temelini oluşturan Portland imentosunun içeriğindeki temel bileşikler; trikalsiyum silikat, dikalsiyum silikat, trikalsiyum aluminat, tetrakalsiyum aluminoferrit, kalsiyum sülfat, alkali asitler ve diğer bileşiklerdir (Camilleri ve ark., 2005).

MTA'nın Portland imentosu dışında kalan küçük bir kısmını, kimyasal ve fiziksel özelliklerini modifiye eden diğer mineral oksitler oluştururken, bizmut oksit tozu yapıya radyoopasiteyi sağlamak için eklenmiştir. İçerikteki alçı taşı ise sertleşme zamanının kontrolünü sağlamaktadır (Torabinejad ve ark., 1995b).

MTA; kimyasal içeriği, fiziksel ve mekanik özellikleri, ulaştığı yüksek pH değer, biyoyumluluğu, yüksek örtücülüğü ve sızdırmazlığı, antimikrobiyal olmasının yanında sert doku oluşumunu indükleme gibi özellikleri sayesinde; cerrahi ve cerrahi olmayan yaklaşımlarla kök ucu dolgusunda (Torabinejad ve ark., 1993; Chong ve ark., 2003), apeksifikasyonda (Hachmeister ve ark., 2002; Villa ve Fernandez, 2005), pulpa kuafajında (Pitt Ford ve ark., 1996; Aeinehci ve ark., 2002), kök ve furkasyon perforasyonlarının tamirinde (Lee ve ark., 1993; Arens ve Torabinejad,1996; Sluyk ve ark., 1998), rezorptif defektlerin tamirinde (White ve Braynt, 2002; Hsien ve ark., 2003), endodontik tedavili dişlerin kanal içi beyazlatma işlemlerinde bariyer (Cummings ve Torabinejad, 1995) olarak kullanılmaktadır.

Portland çimentosunun yüzeyindeki kısmın, karbondioksit ile temasa geçmesi ile oluşan reaksiyon sonucu kalsiyum hidroksit oluşur. Karbondioksit, karbonatlaşma ve sertleşme için önemlidir (Abdullah ve ark., 2002).

MTA düşük çözünürlük özelliğine sahiptir (Torabinejad ve ark., 1995b). MTA su ile karıştırıldığında ilk pH değeri 10,2 olarak görülürken, sertleşme tamamlandıktan sonra pH'nın 12,5'e yükseldiği ve bu değerde kaldığı bildirilmektedir. Bu değerler $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ile karşılaştırılabilir bir pH derecesidir (Torabinejad ve ark., 1995b). MTA ve $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 'in her ikisinin de sert doku oluşumunu indüklemeye özelliğinin, materyallerin benzer alkali pH derecelerine sahip olmalarına bağlı olduğu düşünülmektedir (Torabinejad ve ark., 1995b). MTA'nın klinikte kullanımının bazı dezavantajları vardır.

Materyalin maliyet, karıştırma güçlüğü, uzun sertleşme süresi, uygulama alanında dağılması gibi dezavantajlarının, klinik kullanımını sınırladığı bildirilmektedir (Schwartz ve ark., 1999).

Ayrıca, materyalin gri renkte olan ilk çeşidinin pulpotomi ve pulpa kuafajı tedavilerinde kullanımı sonrası renklenmeye neden olabildiği bildirilmiştir (Kratchman, 2004).

Kullanımındaki bu güçlüklerin dışında, materyalin yüksek alkalinitesinin kök dentininin sertliğini etkilemesi de bir başka dezavantajdır (White ve ark., 2002).

İdeal biyouyumluluğa sahip olduğu öne sürülen MTA'nın, fiziksel özelliklerine ait bu dezavantajlarının giderilerek kök kanal dolgu patı olarak geliştirilmesi konusunda araştırmalar yapılmaktadır. Bu araştırmalar sonucunda Endo CPM Sealer, MTA Fillapex, MTAS, MTA Obtura adlı MTA içerikli kök kanal patları kullanıma sunulmuştur.

1.2. Çalışmamızda Kullandığımız Kök Kanal Dolgu Patları

1.2.1. AH Plus

İlk defa Schröder tarafından 1957’de piyasaya sunulan AH26 kök kanal dolgu patı epoksi rezin içerikli bir pattır. Tozunda %10 gümüş, %60 bizmut oksit, %25 heksametilentetramin ve %5 titanyum oksit; likitinde ise bisfenoldiglisidil eter bulunmaktadır (Schröder, 1957).

Likidinde bulunan bisfenoldiglisidil eter’in, bir katalizör olan ve patın tozunda bulunan heksametilentetraminle birleşerek polimerize olması sırasında formaldehit açığa çıkar ve açığa çıkan formaldehit antiseptik etki gösterir. Günümüzde, AH26’nın epoksi - amin kimyası korunarak, renkleşme eğilimi ve formaldehitin açığa çıkışı elimine edilerek AH Plus geliştirilmiştir. Yeni formülde titanyum dioksit bulunmamaktadır ve heksametilentetramin %25’den %20’ye düşürülmüştür (Spangberg ve ark., 1993). AH Plus kanal dolgu patının içeriği Çizelge 1.1’de gösterilmiştir.

Çizelge 2.1. AH Plus kök kanal dolgu patının içeriği.

PAT A (epoksi patı)	PAT B (amin patı)
Diglisidil – bisfenol – A – eter	1- Adamantan amin
Kalsiyum tungstat	NN-dibenzil-5-oksanonandiamin-1,9
Zirkonyum oksit	TCD-diamin
Aerosol	Kalsiyum tungstat
Demir oksit	Zirkonyum oksit
Pigment	Silikon yağı

Üretici firma AH Plus’ın formaldehit açığa çıkarmadığını belirtmektedir. Buna rağmen, Cohen ve ark. (2000) yaptıkları çalışmada, AH Plus’ın minimal miktarda (3,9 ppm) formaldehit saldığını bildirmişler ve bu sonucu epoksi rezinlerle aminlerin sertleşmeyi başlatmak için girdikleri reaksiyona bağlamışlardır. Leonardo ve ark. (1999), yaptıkları çalışmada AH Plus’tan çok az miktarda formaldehit salındığını ve

bu miktarın AH26'ya göre göz ardı edilebilecek düzeyde düşük olduğunu bildirmişlerdir.

AH Plus kök kanal dolgu patınının, AH26'ya oranla artmış radyoopasitesi, kısaltılmış donma süresi, düşük çözünürlüğü ve daha iyi bir akıcılığı vardır (Himel ve ark., 2006, s.:269).

Üretici firma AH Plus kök kanal dolgu patınının çabuk ve kolay karıştırılmasını sağlamak amacıyla, AH26'daki toz / likit sistem yerine, A ve B patları eşit hacimde karıştırılan çift patlı sistem halinde kullanıma sunmuştur. Çalışma süresi 23°C'de minimum 4 saattir. Sertleşme süresi 37°C'de 8 saattir (Dentsply DeTrey GmbH, Konstanz, Germany).

1.2.2. Tubli Seal EWT

Rickert patınının dış yapılarındaki renk değişimine neden olma dezavantajının giderilmesi için bazı küçük değişiklikler yapılarak Tubli Seal geliştirilmiştir. Tubli Seal kanal dolgu patınının içeriği Çizelge 1.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 1.2. Tubli Seal kanal patınının içeriği.

BAZ	KATALİZÖR
Çinko oksit	Öjenol
Oleorezin	Polimerize rezin
Bizmut	Annidalin
Triasit timol iyodür	
Yağ ve mum	

Karıştırılması kolaydır, boyama özelliği yoktur ve lubrikasyon niteliği fazladır. Nielsen ve ark. (2006) değişik kanal dolgu maddelerinin aerobik ve anaerobik ortamlardaki sertleşme süresini inceledikleri çalışmada Tubli Seal kanal dolgu patınının aerobik ortamda diğer kanal dolgu patlarına göre daha hızlı sertleştiğini bildirmişlerdir.

Tubli Seal kök kanal dolgu patı, periapikal dokularda duyarlılık ve irritasyona neden olabilmektedir (Chang ve ark., 2010).

Tubli Seal'in çalışma süresi 30 dk'dan azdır ve nemli ortamda bu süre daha da kısalmaktadır. Bu nedenle dolgu öncesi kanalın iyice kurulanması gerekmektedir (Nielsen ve ark., 2006). Tubli Seal'in bu dezavantajından dolayı firma çalışma süresi arttırılan Tubli Seal EWT'yi piyasaya sunmuştur. Baz ve katalizör olmak üzere 2 tüpten oluşur. Tubli Seal EWT kök kanal dolgu patının içeriği Çizelge 1.3'de gösterilmiştir.

Çizelge 1.3. Tubli Seal EWT kök kanal dolgu patının içeriği.

BAZ	KATALİZÖR
Çinko oksit	4-Allyl-2-Methoxyphenol (öjenol)
Mineral yağ	Dimerik asit rezin
Baryum sülfat	Mineral yağ
Lesitin	
Mısır unu	

Tubli Seal EWT kök kanal patının çözünürlüğü azdır, film kalınlığı incedir, yeterli akıcılığa sahiptir ve 2 saat çalışma süresine sahiptir (McMichen ve ark., 2003).

1.2.3. EndoREZ Kök Kanal Dolgu Patı

Günümüzde EndoREZ metakrilat bazlı yeni bir endodontik pat olarak kök kanallarının doldurulmasında kullanılmak üzere piyasaya sürülmüştür. EndoREZ hidrofildir, iki bileşenden oluşur ve kimyasal olarak sertleşir. Üretan dimetakrilat matriksi (UDMA) içinde çinko oksit, baryum sülfat ve pigmentlerin bulunduğu bir reçinedir (Ultradent, South Jordan, UT, ABD) (Çizelge 1.4). UDMA kompozit reçinelerin organik matriksini de oluşturan bir monomerdur. EndoREZ üretici firmanın iddiasına göre biyouyumlu, iyi örtücülüğe sahip, hidrofilik karakterde, kolay uygulanabilen bir kök kanal dolgu patıdır. EndoREZ'in radyoopasitesi güta-perkanınkine benzerdir (Zmener ve Pameijer, 2004).

Çizelge 1.4. EndoREZ kök kanal dolgu patının içeriği.

EndoREZ kök kanal dolgu patının içeriği
%30 Üretan dimetakrilat
Çinko oksit
Baryum sülfat
Pigmentler

EndoREZ, TwoSpense2 adı verilen özel bir şırınga sistemi içinde piyasaya sürülmüştür. Ultra-Mixer adı verilen tek kullanımlık uçlar bu şırınganın başına takılarak, kullanılmak istenen miktarda pat, şırınganın pistonu itilerek karıştırma kağıdına koyulur. Maddenin bu tür bir şırınga sistemi ile kullanılması, katalizör ve bazın karışma oranının, firmanın belirlediği ölçüde olmasına olanak sağlamaktadır (Zmener ve Pameijer, 2004; Qrstavik, 2005).

Yapılan bir çalışmada aralarında EndoREZ'in de bulunduğu farklı içerikli kök kanal dolgu patlarının antibakteriyel etkileri farklı mikroorganizmalar üzerinde incelenmiştir. EndoREZ'in sadece *Peptostreptococcus anaerobius*'e karşı etkin olabildiği bildirilmiştir (Zareba, 2003).

Becce ve Pameijer (2006) tarafından yapılan, EndoREZ'in biyouyumluluğu, antimikrobiyal etkinliği ve sitotoksitesinin değerlendirildiği çok yönlü bir çalışmada, toksisitenin değerlendirilmesi için L-929 hücre kültürü kullanılmıştır. 72 saat sonunda canlı kalan hücrelerin oranı %60 bulunmuştur. Araştırmacı EndoREZ'in hafif derecede toksik olduğunu bildirmiştir. EndoREZ'in antimikrobiyal özelliğini agar difüzyon testinde *Enterococcus faecalis* kullanarak değerlendirmişler ve bakterisid etkisini çinko oksit öjenole yakın bulmuşlardır.

Yapılan *in vivo* biyolojik uyumluluk testlerinin hemen hemen hepsinde ise bu maddenin ciltaltı bağ dokusu ve kemik tarafından tolere edildiği ve periapikal dokularla uyumlu olduğu (Louw ve ark., 2001; Zmener, 2004; Zmener ve ark., 2005) saptanmış ve maddenin biyouyumlu olduğu sonucuna varılmıştır. Sadece Sousa ve ark.'nın (2006) yaptıkları kemik içi implantasyon çalışması sonuçlarında EndoREZ'in biyouyumlu olmadığı bildirilmiştir.

Zmener ve ark. (2005) EndoREZ'in, kök kanal dolgusu için kullanılabilecek bir materyal olduğunu, ancak EndoREZ gibi yeni bir kök kanal dolgu maddesinin biyolojik özelliklerinin değerlendirilebilmesi için daha çok sayıda *in vivo* biyoyumluluk testlerine gerek duyulduğunu bildirmişlerdir.

1.2.4. MTA Fillapex

MTA Fillapex (Angelus Industria de produtos Odontologicos S/A, 2011, Brezilya), piyasaya yeni sunulan bir kök kanal dolgu patıdır. MTA Fillapex kök kanal dolgu patının içeriği Çizelge 1.5'te gösterilmiştir.

Çizelge 1.5. MTA Fillapex kök kanal dolgu patının içeriği.

MTA Fillapex kök kanal dolgu patının içeriği
Salisilat Rezin
Seyreltilmiş Rezin
Natürel Rezin
Bizmut trioksit
Nano tanecikli silis
MTA
Pigmentler

Patın fiziksel özelliklerine ilişkin üretici firmanın tanımlaması şu şekildedir: akıcılığı ISO standartlarına uygundur, çalışma zamanı yaklaşık 35 dk, sertleşme süresi ise 135 dk'dır ve yüksek radyoopasiteye sahiptir. Sertleşme süresince genleşmesi düşüktür. Doku sıvıları ile temas halinde düşük çözünürlük gösterir. Öjenol içermez ve rezin simanların sertleşmesini etkilemez.

MTA Fillapex pat / pat şeklinde, 4mg'lık çift enjektörlü sistem olarak piyasaya sunulmuştur. Çift enjektör sisteminin ucuna karıştırma ucu yerleştirilmiştir. Bu, patın doğru oranda, kolayca ve homojen olarak karıştırılmasını sağlar ve patın gereksiz kullanımını önlemektedir. Böylece tek kullanımlık olan karıştırma uçları ile sağlıklı olarak patın rahatlıkla kanal içerisine uygulanabilmesi sağlanmıştır (Angelus Science and Technology, 2011).

Üretici firmanın önerileri doğrultusunda kullanım talimatları: (Angelus Science and Technology 2011)

- 1. Kök kanal hazırlığı:** MTA Fillapex'in doldurulmasından önce, seçilen preparasyon tekniğine göre kök kanalı prepare edilip, temizlenir ve kurutulur.
- 2. Karıştırma:** Enjektöre takılan karıştırma uçları sayesinde patın eşit miktarda karıştırılması sağlanır. Enjektör sıkıldıktan sonra karıştırma ucundan çıkan pat kullanıma hazırdır.
- 3. Doldurma:** Seçilen kanal dolgu tekniğine göre, güta perka ya da gümüş konlar ince bir tabaka MTA Fillapex kanal patına bulanır ve kök kanalı doldurulur. MTA Fillapex, lentülo ya da karıştırma uçlarına eklenen özel uygulama uçlarıyla direkt olarak kanalın içine uygulanabilir.
- 4. Kök kanal dolgusunun sökülmesi:** Güta perka dolgularının sökülmesi için kullanılan geleneksel teknikler ile kök kanalından uzaklaştırılabilir.

1.2.5. Epiphany Kök Kanal Dolgu Sistemi

Epiphany sistemi; Resilon primer, Epiphany patı ve Resilon kor materyalini içerir.

Temelde üç bileşenden oluşan bu sistem, içerik olarak tamamen aynı olmalarına rağmen farklı üretici firmalar sebebiyle değişik isimlerle anılır (Çizelge 1.6).

Çizelge 1.6. Resilon sisteminin piyasadaki üretici firmaları ve markaları.

Firma Adı	Piyasa Adı
Sybron Endo	Real Seal
Pentron Clinical Technologies	Epiphany
Light Speed	Simpli Fill
Heraeus Kulzer	Inno Endo
Obtura Spartan	Resinate

Bütün firmalar, bu materyalleri kitler halinde piyasaya sunmuşlardır. Kitler, çeşitli boylarda Resilon konları, Obtura II tekniğinde kullanılmak üzere Resilon peletleri, 4 ml'lik şişede rezin patı (Epiphany), 6 ml'lik şişede primer, 3 ml rezin inceltici, primer'ı kanala uygulamak için gerekli fırçalar, karıştırma pedi, bazı kitlerde patı kanala göndermek için şırınga uçlarından oluşur (Pentron, 2007).

1.2.5.1. Real Seal Kök Kanal Dolgu Patı

Epiphany veya Real Seal, dual sertleşen rezin esaslı kompozit bir paktır ve asidik ortamda uygun otopolimerizasyon imkanı tanıyan yeni bir redoks katalizörü içerir. Resin matriks, bisfenol-A glisidil metakrilat (Bis GMA), etoksillenmiş Bis GMA, ürethan dimetakrilat ve hidrofilik difonksiyonel metakrilatların karışımıdır. Doldurucu olarak silanlanmış baryum borosilikat camlar, baryum sülfat, silika, Ca(OH)₂ ayrıca aminli bizmut oksiklorit, peroksit, foto inisiyator, stabilize ediciler ve pigment içerir. Pattaki toplam doldurucu içeriği ağırlıkça %70'dir (Kaya ve Keçeci, 2008).

Yeni geliştirilen bir materyal olan Resilon, dentine adezyon sağladığı gözlenen alternatif bir kanal dolgu materyalidir. Bu dolgu sisteminin ilk jenerasyonu, sentetik polimer esaslı kök dolgu materyali (Resilon), dual-cure rezin içerikli kompozit (Epiphany), self-etch primer ve akışkanlığı sağlamakta kullanılacak inceltici rezinden oluşur (Shipper ve ark., 2005; Merdad ve ark., 2007). İkinci jenerasyonda Epiphany SE self-etch patında orjinal pat ile primer birleştirilmiştir. Priming aşaması olmaksızın; self-etch, dual-cure, hidrofilik rezin patı hem Resilona hem de kanal içindeki dentine bağlanmaktadır (Pentron, 2007). Biraz hidrofilik özelliklere sahip, fazla esnek alifatik monomer içerikli ürethan dimetakrilat monomeri (UDMA)'nin yerine primerin içeriğindeki daha hidrofilik monomer olan 2-hidroksietil metakrilat (HEMA)'ın ve asidik metakrilat resinlerin pata ilave edilmesiyle kullanım kolaylığı sağlayan Epiphany SE patı, Epiphany patından farklılık gösterir (Resende ve ark. 2009). Real Seal patının içeriği Çizelge 1.7'de gösterilmiştir

Çizelge 1.7. Real Seal kök kanal dolgu patının içeriği.

Real Seal kök kanal dolgu patının içeriği	
Üretan dimetakrilat monomeri (UDMA)	Silika
Poly(ethylene glycol) dimethacrylate (PEGDMA)	Kalsiyum hidroksit
Etoksillenmiş bisfenol A dimetakrilat (EBPADMA)	Aminler ile bizmutoksikloroit
Bisfenol-a-glisidil dimetakrilat (BisGMA)	Peroksit
Silanlanmış baryum borosilikat camlar	Photo initatör
Baryum sülfat	Pigmentler

Real Seal SE, Epiphany SE self-etch patı ile benzer yapıya sahip dördüncü nesil metakrilat rezin esaslı kök kanal dolgu patıdır. Pat çift taraflı bir şırıngadan ve karıştırıcı bir uçtan uygulanır. Bu sayede hem doğru bir karıştırma elde edilir, hem de kullanımı çok kolaylaşmıştır (Barnett ve Trope, 2004). Versiani ve ark. (2006) Real Seal ile aynı içeriğe sahip Epiphany patının önerilen American National Standard/American Dental Association (ANSI/ADA) standartlarına uygunluğunu değerlendirmişlerdir. ANSI/ADA'nın 57 numaralı teknik şartnamesine göre bir kök kanal patı üretici firmanın belirlediği sürenin %10'u içinde sertleşmelidir. Epiphany için bu süre üretici firma tarafından 25 dk olarak bildirilmiştir. Versiani ve ark. (2006) yaptıkları çalışmada kısmen sertleşmenin görüldüğü süre ortalama 24,75 dk olarak bulunmuştur. Versiani ve ark. (2006) da Epiphanyi ışıksız bir ortamda karıştırıp sertleşmesini beklemişlerdir. Sertleşme için önerilen süre tamamlandığında, tam olarak sertleşmediği izlenmiştir. Bunun üzerine ışık kaynağı uygulanmış ve tekrar önerilen süre beklenmiştir. Yüzeyde hala sertleşmesi tam olarak tamamlanmamış ince bir tabaka olduğu bildirilmiştir. Araştırmacılar, polimerizasyonun bu şekilde etkilenmesini, ortamda bulunan oksijenin polimerizasyonu engellemesine bağlamışlardır. Real Seal kök kanal dolgu patının da aerobik ortamda tam olarak sertleşmediği, anaerobik ortamda ise 30 dk'da sertleştiği bildirilmiştir (Nielsen ve ark., 2006).

1.3. Biyouyumluluk

Biyouyumluluk, canlı dokularla temasta olan herhangi bir maddenin, sistemik ve lokal toksisite, allerjik, mutajenik ve karsinojenik etki yapmayan inert özelliklere

sahip olması ve vücudun yumuşak ya da sert dokularda doku reaksiyonu oluşturmamasını ifade eder (Schmalz ve Arenholt-Bindslev, 2010, s.:1-2; Wataha, 2000). Biyouyumluluğun bir başka tanımı ise bir materyalin kendine özgü uygulamaları sonrası, uygun konakçı doku cevabı oluşturabilme yeteneğidir (Schmalz, 1994). Biyolojik uyum için; malzemenin kimyasal yapısı, restorasyonun tasarımı, elde edilme yöntemleri, mekanik özellikleri, doku ile temasının şekli, yeri ve dokunun özellikleri gibi pek çok faktörün bir arada uyum içerisinde olması gereklidir. Biyolojik uyum özelliği olmayan materyaller doku reaksiyonuna yol açmaktadırlar.

Biouyumlulukta konakçı, materyal ve materyalin fonksiyonu arasında bir kesişme olduğu görülür. Bir materyalin biyouyumlu olarak düşünülebilmesi için bu üç faktörün uyum içinde olması gerekmektedir. Biyouyumluluk dinamik bir olaydır, çünkü bu üç faktörden herhangi birinde değişiklik meydana gelirse biyouyum bozulur (Schmalz, 1994; Wataha, 2001).

Kök kanal tedavisinde kök kanalının doldurulmasıyla beraber ağız içerisine yabancı bir madde yerleştirilmiş olur. Bu durum dolgu materyalinin canlı periapikal dokularla direkt ilişkide olduğu sonucunu da beraberinde getirir. Potansiyel olarak irrite edici özelliğe sahip materyallerin periapikal dokular ile temasına müsaade edilmesi halinde enflamasyon, nekroz ve beraberinde ağrı oluşabilir. İlgili bölgenin rejenerasyonunun ve fonksiyonunun sağlanamaması durumunda ise başarı şansı düşer (Gulati ve ark., 1991). Bu nedenle kök kanal dolgu materyallerinin biyolojik özellikleri ve klinik uygulamalar açısından uygunluğunun değerlendirilmesi büyük bir önem taşımaktadır.

Endodontik uygulamalarda herhangi bir materyal değerlendirilirken farklı kriterler göz önünde bulundurulmalıdır. Pulpa ve yumuşak dokulara zararlı olmaması, dolaşım sistemine geçerek sistemik toksisiteye ve alerjik reaksiyonlara neden olabilecek herhangi bir madde içermemesi bu kriterlerden sadece bir kaçıdır (Phillipps, 1991, s.: 61-67).

Eğer bir madde yumuşak dokulara zarar veriyorsa, o maddenin sağlam veya deformasyona karşı dayanıklı olmasının hiçbir önemi yoktur. Bir kanal dolgu maddesinin biyolojik uyumluluğu kabul edilebilir ise apikal sızıntı, manüplasyon ve diğer faktörler için test edilebilecek ve o maddenin endodontik dolgu materyali için uygun olup olmadığı belirlenebilecektir (Phillipps, 1991, s.: 61-67).

1.3.1. Biyouyumluluk Testleri

In vitro koşullarda kullanılması düşünülen materyallerin vücut dokuları üzerindeki toksik etkilerinin değerlendirilmesi ve oluşturabilecekleri biyolojik reaksiyonların taklit ve tahmin edilebilmesi amacı ile *in vitro biyouyumluluk testleri* geliştirilmiştir (Kawahara ve ark., 1955; Langeland ve ark., 1966; Klötzer ve Langeland, 1973). *In vitro* araştırmalar, hücre ve dokuda oluşan yaralanmaların dönüşebilir (dejeneratif) ve dönüşümsüz (nekrotik) aşamalarında ortaya çıkan spesifik olayları incelemektedir. *In vitro* biyouyumluluk testlerinde; vücut dokularının üzerine veya içerisine yerleştirilen malzemelere karşı gelişecek olan biyolojik reaksiyonların test ortamında oluşturulması amaçlanmaktadır (Hanks ve ark., 1996). Bir materyalin biyouyumluluğunun belirlenmesinde en önemli aşama, materyale uygun özellikteki en ideal test yönteminin seçilmesidir (Browne, 1985). Çünkü biyolojik uyumun belirlenmesinde kullanılacak olan testler hem materyalin uygulandığı bölgeye hem de beklenen zararlı etkilere göre farklılık göstermektedir (Hensten-Pettersen, 1988).

In vitro biyouyumluluk testlerinin uygulanmasında bazı problemlerle karşılaşılmaktadır. Biyolojik reaksiyonların *in vitro* testlerle şekillendiği koşullarda, elde edilen sonuçlar *in vivo* sistem içerisinde yer alan koruyucu mekanizmalardan etkilenmediklerinden, sadece test edilen parametreyle ilgili olarak şekillenmektedirler (Kawahara ve ark., 1968). Bununla birlikte, uygulanan test yöntemlerinin tekrarlanabilir özellikte olabilmeleri için standart test yöntemlerinin geliştirilmesi gerekmektedir (Helgeland, 1982, s.:201-215). Günümüze dek hücresel ve moleküler biyolojideki hızlı gelişmelere paralel olarak materyallerin biyouyumluluğunu belirlemek amacıyla çok sayıda test yöntemi geliştirilmiş olmakla

birlikte, bu yöntemlerin standardize edilmemesi nedeni ile testler, geliştirilen malzemelerdeki teknik ilerlemelerin gerisinde kalmıştır. Ancak 1982 yılında FDI (Uluslararası Diş Hekimliği Birliği), ISO (Uluslararası Standardizasyon Organizasyonu) ve ADA (Amerikan Diş Hekimliği Akademisi) tarafından ortak bir görüşe varılarak diş hekimliğinde kullanılacak malzemelerin biyolojik uyumunun araştırılmasına yönelik testler oluşturulmuştur (Hanks ve ark., 1996).

Materyallerin biyoyumluluğunun değerlendirilmesinde kullanılacak olan testler *öncül testler*, *ikincil testler* ve *kullanım testleri* olmak üzere üç aşamada gerçekleştirilmektedir. Diş hekimliği malzemelerinin biyolojik uyumluluğu, genellikle, öncül testler grubunda yer alan sitotoksosite testleri ile değerlendirilmektedir.

I. Öncül Testler

1. *LD50 ağız içi testi*
2. *LD10 karın içi test*
3. *Soluma testi*
4. *Hemolizis testi*
5. *Ames testi*
6. *Styles testi*
7. *Dominant letal test*
8. *Sitotoksosite testi (ISO-7405 1997)*

Sitotoksosite Testi

Sitotoksosite moleküler olaylar sonucu çeşitli makromolekülerin sentezlenmesinin engellenmesi ve buna bağlı olarak hücrenin fonksiyonlarında ve yapısında belirgin hasarlar meydana gelmesi olarak tanımlanır (Aldridge, 1993; Murray ve ark., 2007).

Sitotoksisite testi, test malzemesinin uygun hücre kültürlerindeki hücre büyüme oranı ve morfolojik özellikleri üzerindeki etkisinin negatif ve pozitif kontrol grupları kullanılarak değerlendirildiği test yöntemidir (ISO-7405 1997).

Sitotoksisite testlerinde hücre kültürleri kullanılarak olası toksikolojik reaksiyonlar *in vitro* olarak değerlendirilmektedir.

Sitotoksite testleri

- Hücre canlılığı ve ölümü
- Hücre membranı
- Hücre organelleri
- Protein veya DNA sentezi
- Hücre bölünmesi ile ilgili detaylı bilgiler verir (Nicholson, 2002, s.: 258-266).

Test edilecek materyalin fiziksel özelliği ve hücreler ile temas yöntemi önemlidir. Hücre ile materyalin teması direkt, indirekt veya ekstrakt yolu ile gerçekleşebilir.

Sitotoksisite testleri sırasında hücrelerde oluşan morfolojik değişiklikleri inceleyen çalışma sayısı oldukça azdır. En sık karşılaşılan hücresel bozulma, hücrelerin yapıştıkları yüzeyden ayrılmaları ve iğ şeklindeki fibroblast hücrelerinin sitoplazmik büzülme nedeniyle yuvarlaklaşması, mikrovilluslerin kaybolması ve vakuol oluşumu şeklindedir (Sen ve ark., 1998). Diş hekimliği malzemelerinin sitotoksisitesinin değerlendirildiği testlerde, uygulanan materyalin; hücre sayısı ve büyümesi, hücrelerin membran bütünlüğü, biyosentez veya enzim aktivitesi ile hücrenin genetik yapısı üzerindeki etkileri ölçülmektedir (Helgeland, 1982, s.: 201-215; Hensten-Pettersen, 1988; Hanks ve ark., 1996).

Testlerin belirli standartlara uygun olarak yapılabilmesi için ISO, bazı kriterler belirlemiştir. ISO 7405, diş hekimliğinde kullanılan medikal materyallerin klinik

öncesi biyoyumluluk değerlendirmesi için önerilen test protokollerinden bir tanesidir.

ISO 10993 (1999), medikal ürünlerin biyolojik olarak değerlendirilmesi için farklı metotların önerildiği diğer bir test protokolüdür. Bu standardın asıl amacı belirttiği yöntemlerle insanların korunmasıdır. ISO 10993-5 *in vitro* sitotoksite testleri için önerilen genel bir test protokolüdür.

Sitotoksitenin değerlendirilmesinde kullanılan in vitro testlerin avantajları

1. Test edilecek malzemenin, diğer metabolik olaylardan bağımsız olarak, hücre metabolizmasındaki spesifik bir fonksiyon üzerindeki etkisi değerlendirilmektedir.
2. Aynı anda çok sayıda örnek, kısa zamanda test edilebilmektedir ve diğer testlere oranla daha ekonomiktir.
3. Deneyle sonuçunda kantitatif sonuçlara ulaşılmaktadır.
4. Materyallerin toksisitesi kullanım testlerine oranla daha hassas şekilde değerlendirilmektedir.
5. Deneyle sırasında test koşulları standardize edilebilmektedir (Browne, 1988; Schmalz, 1994).

Sitotoksitenin değerlendirilmesinde kullanılan in vitro testlerin dezavantajları

1. Her test için bir tür hücre kullanılması gerekmektedir.
2. Kültür hücreleri konak hücrelerinden farklılık göstermektedir.
3. Kültür ortamında, *in vivo* koşullarda mevcut olan enflamatuar reaksiyonların ve diğer doku koruyucu mekanizmaların bulunmaması önemli bir eksikliklerdir. (Schmalz, 1994; Schmalz, 1997; Browne, 1988).

II. İkincil Testler

1. *Kemik implantasyon testi* (Kallus, 1984a)
2. *Ağız mukozası membran testi* (ISO-7405, 1997)
3. *Sensitizasyon testi* (Kallus, 1984b; ISO-7405, 1997).
4. *Subkutanöz implantasyon testi* (Bessing ve Kallus, 1987; ISO-7405, 1997)

III. Kullanım Testleri

1. *Restoratif malzemeler için pulpa ve dentin testi* (ISO-7405, 1997)
2. *Kuafaj ve pulpotomi malzemeleri testi* (ISO-7405, 1997)
3. *Endodonti malzemeleri testi* (Hensten-Pettersen, 1988; ISO-7405, 1997)
4. *Kemik içi implant malzemeleri testi* (Hensten-Pettersen, 1988; Edgerton ve Levine, 1993)

1.3.2. Hücre Kültürü

Hücre kültürü yönteminin temel ilkesi, canlı dokulardan alınan parçaların *in vitro* koşullarda yaşama ve üremelerini sağlamaktır. Hücre kültürleri; tüp, şişe gibi laboratuvar gereçlerinde uygun besleyici sıvıların içinde üretilerek kullanılan canlı dokulardır. Bu amaçla çeşitli canlıların (insan, maymun, fare, tavşan gibi) çeşitli dokuları (böbrek, akciğer, tümör, amniyon zarları) parçalanarak tek tek hücrelere ayrılır. Bu hücreler çeşitli tuzlar, tampon maddeleri, aminoasitler, vitaminler, dana veya at serumu içeren besleyici sıvılarda süspansiyon edilerek steril tüp veya şişelere koyulur. Bu hücre süspansiyonu 36 °C'de bekletildiğinde hücreler kabın çeperine yapışarak ürerler. Üreme sonucunda oluşan yapıya hücre kültürü denir (Freshney, 2005, s.:1-216).

Hücre ve doku kültürlerinin kullanılması ile son yıllarda moleküler biyoloji ve tıp alanlarında büyük aşamalar sağlanmış, hastalıkların epidemiyolojisi, patogenezi,

teşhis ve tedavisinde önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. Hücre kültürü çalışmaları, hücre metabolizmasının organizmanın ölümünden sonra bir süre daha devam ettiğinin gözlenmesi ile ortaya çıkmıştır (Davis, 1996, s.: 135-223). Hücre ve doku kültürü üretmek için kullanılan vasatlarda, hücre metabolizma faaliyetlerinin devamı ve hücrelerin çoğalması belirli maddelerin varlığı ile sağlanabilmektedir. Hücre bu maddeleri diğer moleküllerden kendi sentezleyememekte ve bu gerekli maddeler ortama ilave edilen vasatlardan sağlanmaktadır. Vasatlar, doğal ve sentetik materyallerin çeşitli kombinasyonlarını kapsamaktadır. Hücre üretme vasatları, hücrenin organlardan ayrılmasından sonra doku tabakası oluşana kadar hücrelerin üretilmesi için kullanılmakta, genel olarak serumla birlikte hücrelerin çabuk üremelerini sağlayan diğer maddeleri içermektedir. Hücrelerin *in vitro* olarak çoğaltılabilmeleri için en uygun ortam, *in vivo* ortamlarına en yakın olan ortamdır (Davis, 1996, s.:135-186; Sharp, 1977, s.: 1-57; Freshney, 2005, s.: 97-125).

Hücre kültürleri; bireysel faktörlerden etkilenmemeleri, materyaller arasında parametrik karşılaştırmalara olanak tanınmaları, tekrarlanabilme özellikleri, çalışma koşullarının standardize edilebilmesi, deneylerde kullanılacak hayvanların öldürülmemesi gibi etik nedenlerden dolayı da tercih edilmektedir (Browne, 1988; Schmalz, 1994; Schmalz, 1997). Buna karşın, hücre kültürü testleri ile sadece materyallerin ilk toksisite reaksiyonları konusunda bilgi edinilebilmekte, materyalin uzun süreli doku temasında oluşturacağı sitotoksikite düzeyi konusunda ise veri elde edilememektedir (Schmalz, 1994).

1.3.2.1. Hücre Kültürü Çalışmalarında Kullanılan Hücre Tipleri

1. Primer Hücre Kültürleri

Primer hücre kültürleri doku ve organlardan ayrılan hücrelerin 24 saatten daha uzun süre kültür edilmesiyle elde edilir. Diş eti ve pulpa fibroblastları, primer kültür hücrelerine örnektir. 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. Fakat primer kültürlerin insandan izole edilmesi ve kültürünün yapılması oldukça zordur. Primer kültürler farklı bireylerden alındığı için fonksiyonel durumları yansıtması farklıdır (Freshney, 2005, s.: 1-216; Helgason ve Miller, 2005, s.: 1-12; Powers ve Sakaguchi, 2006, s.: 97-125; Schmalz ve Arenholt Bindslev, 2009, s.: 13-40).

Primer hücre kültürleri, üretim aşamalarının zor olmasına, hassas hücreler olmalarına, çalışma esnasında ortaya çıkabilecek sorunlara ve kontrollerinin son derece güç olmasına rağmen orijinal fizyolojik durumu ifade etmeleri nedeniyle değerlidirler (Mjör ve Hensten-Pettersen, 1983; Browne, 1988).

2. Devamlı Hücre Kültürleri

Devamlı hücre hatları süresiz çoğalabilme özelliğine sahip transformasyona uğramış primer hücrelerdir ve daha stabil bir fenotipe sahiptir. Devamlı hücreler meydana gelen transformasyondan dolayı *in vivo* özelliklerinin tümünü koruyamazlar. Devamlı hücre hatları kolaylıkla çoğaltılabilir.

Çalışmalarda sıklıkla kullanılan devamlı hücre hatları fare fibroblastları (L-929, 3T3) veya insan epitelial hücreleridir (HeLa). Ayrıca çalışmalarda insan ve hayvan pulpa hücreleri, insan THP-1 monositleri ile immortalize fare odontoblast hücre hatları da kullanılmaktadır (Freshney, 2005, s.: 1-216; Helgason ve Miller, 2005, s.: 1-12; Powers ve Sakaguchi, 2006, s.: 97-125; Schmalz ve Arenholt-Bindslev, 2009, s.: 13-40).

Hücre Kültürlerinin Avantajları

1. Hücre kültürü ortamında fizikokimyasal çevre ve buna bağlı olarak fizyolojik koşullar daha iyi kontrol edilebilmektedir. Sıcaklık, pH, osmotik basınç, oksijen

ve karbondioksit kısmi basınçları gibi fizikokimyasal koşullar hücre kültüründe daha kolay sağlanırken, canlı vücudunda sabit bir çevre oluşturarak birtakım testleri yapmak daha zordur.

2. Örnek homojenitesinin kontrolü sağlanabilmektedir. Doku örnekleri çoğunlukla heterojendir. Ancak birkaç pasaj sonra kültüre edilmiş hücreler homojen hale gelmektedirler. Hücrelerin homojenitesi, elde edilen ürünlerin homojenitesi açısından son derece önemlidir. Bunun sağlanmasının bir diğer yolu da çalışan kişilerin homojenitesi ve çalışmaların aynı koşullarda yapılmasıdır.
3. Hücre kültürleri ekonomiktir. *In vivo* sistemlerde test için canlı organizmaya verilen maddelerin bir kısmı çeşitli yollarla dışarıya atılacak, bir kısmı da organizmanın bağışıklık sistemi tarafından ortadan kaldırılacaktır. Bu koşullarda canlı bir organizmada verilen maddenin ancak %10'una cevap alınabilirken, hücre kültürlerinde bu oran %90'lara çıkabilmektedir.
4. Hücre kültürleri ürün elde edilmesinde endüstriyel amaçlı olarak kullanılabilir. Son yıllarda geliştirilen teknikler ile bu daha kolay hale gelmiştir (Freshney, 2005, s.:1-216).

Hücre Kültürlerinin Dezavantajları

1. Primer kültür ile başladığında, birbirini izleyen pasajlarda hücreler farklılaşmakta ve her zaman bir miktar ölüm gerçekleşmektedir. Yani hücre kültürlerinde zamana bağlı bir kararsızlık söz konusudur.
2. Hücre kültürlerinde hijyen çok önemli olduğundan primer kültürlerin elde edildiği doku ve bunların bulunduğu koşullar hücre kültürlerini etkilemektedir.
3. Deneyim çok önemli bir faktördür. *In vitro* çalışmalarda sterilizasyon, kültürlerin hazırlanması ve mikroskopik inceleme uzmanlık gerektirmektedir.
4. Hücre kültürleri, *in vivo* yöntemlere oranla daha ekonomik olmasına karşın kullanılan hücre üretme vasatları ve diğer malzemeler son derece pahalıdır. Buna rağmen elde edilen ürünün saf olması önemli bir avantajdır. Ancak son yıllarda bu teknolojinin gelişmesi, kullanılan malzemelerin geliştirilmesine ve giderek daha da ucuzlamasına olanak tanımaktadır (Kang ve ark., 1993; Davis, 1996, s.: 135-223; Freshney, 2005, s.: 1-216).

1.3.2.2. Hücre Kültürü Test Yöntemleri

Diş hekimliği materyallerinin sitotoksitesinin değerlendirilmesinde kullanılan hücre kültürleri, toksikolojide yeni geliştirilen ilaçların sitotoksitesinin değerlendirilmesi amacıyla kullanılan tekniklerden uyarlanan metotlardır. Ancak toksikolojide sitotoksitesi değerlendirilen ilaçların çoğu sıvılarda kolayca çözünebilmekte fakat diş hekimliğinde kullanılan materyaller genellikle düşük çözünebilirlik değerleriyle üretilmektedirler. Bunun yanı sıra, ilaçlarla dental materyallerin şekil, yapı ve etkileşim süreleri arasında önemli farklılıklar bulunmaktadır. Bu nedenle diş hekimliğinde yapılan hücre kültürü çalışmaları, hem kurulan metotlarda hem de değerlendirme ölçütlerinde köklü teknik düzenlemelerin yapılmasını zorunlu kılmaktadır (Hanks ve ark., 1996). Diş hekimliği malzemelerinin sitotoksite testlerinde en sık ve standart olarak kullanılan fibroblast hücre kültürleri L-929 ve Balb/c3T3 devamlı hücre kültür hatlarıdır (ISO Standard 10993-5, 1999; Taira ve ark., 2000).

Kültür ortamında hücrelerin yaşaması, beslenmesi ve çoğalması için bazı şartların yerine getirilmesi gerekmektedir. *In vitro* hücre kültürü deneylerinde, hücrelerin yaşatılması için açık ya da kapalı sistem inkübatörleri kullanılmaktadır. Açık sistemde; kültür ortamı ile inkübatör içerisindeki hava ilişkidir. Bu tür inkübatörlerde ortama, sisteme bağlı olan bir tüpten CO₂ gelmekte, hücre ve dokuların yaşatılması için, genellikle, 37 °C'de, %5 CO₂'li ve %95 nemli ortam sağlanmaktadır. Uzun süreli kültürlerde, mutlaka açık sistem kullanılmalı ve birkaç gün ara ile kültür vasatı yenilenmelidir. Bu işlem metabolizma artıklarının uzaklaştırılıp yeni, geliştirici ve besleyici faktörlerin sağlanması için yapılmaktadır (Davis, 1996, s.: 135-223). Diş hekimliği materyallerinin sitotoksitesi *in vitro* koşullarda değerlendirilirken; hücre büyümesi, mitotik aktivite, oksijen alımındaki, glikoz metabolizmasındaki ve membran geçirgenliğindeki değişiklikler ile mitokondrial enzim fonksiyonlarının saptanması olmak üzere beş ayrı ölçüt kullanılmaktadır (Yeşilsoy ve Feigal, 1985; Hensten-Pettersen, 1988). Değerlendirme aşağıdaki yöntemlerle yapılmaktadır:

1. Agar Overlay Test Yöntemi

Agar difüzyon testi, toksisite deneylerinde en uzun süredir kullanılan bariyer test yöntemidir. Bu yöntem ile fare fibroblast (L-929) hücrelerinin üzerini örten %1,5'lük agar besiyerinden difüze olan test materyalleri bileşenlerinin toksisitesi incelenir. 24 saatlik inkübasyon süresi sonucu nötral kırmızı boyanın, hücre membranındaki geçirgenliğine bağlı olarak, lizozomlarda birikme miktarına göre hücre aktivitesini değerlendiren bir test metodudur. Hücrelerdeki dekolorizasyon ve liziz değerlendirilerek materyallere karşı gelişen yanıtlar incelenir.

Difüze olan toksik madde konsantrasyonun yüksek olduğu bölgelerde hücre erimesi (lizis), renk değiştiren bölgedeki difüzyon sahasının genişliğine bağlı olarak, *zone indeksi* ve *hücre erime indeksi* olmak üzere iki şekilde değerlendirilmektedir.

Basit ve ucuz bir yöntem olmasına rağmen agarda çözünemeyen veya difüze olamayan test materyali veya bileşenleri hücreler üzerinde her hangi bir etki gösteremezler (Schmalz, 1988; Murray ve ark., 2007).

2. Agarose Test Yöntemi

1973 yılında Wilsnack ve arkadaşları agar overlay test yöntemine benzer olan agarose test yöntemini tanıtmışlardır. Araştırmacılar materyallerin agarosedaki difüzyon yeteneğinin daha yüksek olduğunu bildirerek, agar overlay yönteminin daha hassas şekilde uygulanabilmesi için, agar yerine agarose kullanılması gerektiğini öne sürmüşlerdir (Wilsnack ve ark., 1973).

3. Milipore Filtre Test Yöntemi

In vivo ortamda hücreler ve test edilecek malzeme arasında, genellikle direkt temas bulunmamaktadır. Keratinize epitel, dentin veya ekstraselüler matriks direkt teması

engellemektedir. Bu durumda *in vivo* koşulları tam anlamıyla oluşturabilmek için bazı *in vitro* bariyer testleri geliştirilmiştir. Böylece materyallerden açığa çıkan herhangi bir maddenin hücreler üzerinde toksik etki oluşturabilmesi için 0,45 ml' lik filtre porlarının içine difüze olması gerekmektedir (Wennberg ve ark., 1979). Selüloz esterlerinden yapılmış filtre üzerine hücrelerin tek tabaka halinde yapışması sağlandıktan sonra hücre kültür ortamı %1 agar içeren ortam ile değiştirilmekte ve bu ortamın hücreler üzerinde jel haline gelmesi beklenmektedir. Ardından filtre-hücre tabakası-agardan oluşan üçlü yapı ters çevrilerek filtrenin üstte kalması sağlanmaktadır. Katı veya çözülebilen test örneği filtre üzerine yerleştirilerek belirlenen test süresi boyunca beklenmektedir. Bu test yönteminde değerlendirme; hücre ve materyalin temas bölgesinde ve boyanan alanın koyuluk değeri, çapı ve genişliği göz önüne alınarak yapılmaktadır.

Milipore filtre test yöntemi, özellikle katı ve pat yapısındaki materyallerin test edilmesinde kullanılmakta, likitler de bu yöntemle değerlendirilebilmektedir. Sıvı materyallerin test edilmesi için materyalin 0,1 ml'si selüloz bir diske emdirilerek milipore filtre üzerine yerleştirilmektedir (Hensten-Pettersen, 1988; Wennberg, 1988; ISO-7405, 1997).

4. Krom Salınım Yöntemi

Bu yöntemle likit ve katı yapıdaki materyallerin sitotoksitesi değerlendirilmektedir. Bu amaçla hücreler Na_2CrO_4 ile işaretlenmektedirler.

Na_2CrO_4 içerisindeki heksavalent Cr-51, hücrelerin içine girdikten sonra hücre proteinleri ile hücresel yapılara tutunmakta ve trivalent forma dönüşmektedir. Hücrelerin işaretlenmesinden sonra, hücre ve materyaller direkt temas halinde 4-24 saat süreyle inkübe edilmektedir. Hücrelerin ölümü, hücre zarı geçirgenliğini değiştirdiğinden trivalent formdaki Cr-51 hücre dışına çıkmaktadır. Hücre dışına çıkan Cr-51'in radyoaktivitesinin ölçülmesiyle hücre ölümü konusunda net ve kesin bir sayı ve bilgi edinilmektedir. Fakat bu yöntemle hücre ölümünü takiben gelişen

subletal değişiklikler ölçülememektedir. Aynı test yöntemi, hücreler 3H(trityum)-Thymidine ile işaretlenerek de gerçekleştirilmektedir (Sanderson, 1964; Wigzell, 1965; Spanberg, 1973; Spanberg ve Al-Nazhan, 1988).

5. Model Kavite Test Yöntemi

Bu yöntemde, polimetil metakrilattan hazırlanmış kavite modelinde, kavite tabanına bir filtre ya da dentin tabakası yerleştirilmekte ve hücre kültürleri bu tabakanın altında üretilmektedir. Materyalin toksisitesi, sırasıyla lizozomal ve mitokondrial enzim işaretleyicileri olan asit fosfataz ve süksinat dehidrojenaz analizi ile yapılmaktadır (Tyas, 1977).

6. Diş Kavite Test Yöntemi

Restoratif materyallerin kimyasal toksisitesini saptamak amacıyla kullanılmaktadır. İlk basamakta, dentine uygulanan materyallerden toksik maddelerin difüzyonu belirlenmektedir. Genellikle 3. molar dişlerin çekimini takiben dişler fosfat tamponlu salinde 3-4 saat bekletilmektedir. Normal kavite ya da kron preparasyonundan sonra sistem dentin duvarına penetre olabilen solüsyonlarla uygulanmaktadır. Bu yöntemin *in vivo* verilerle uyumlu sonuçlar verdiği belirtilmektedir (Hume, 1985).

7. Dentin Bariyer Testi

Restoratif materyallerin pulpa üzerine etkilerini belirlemede, model kavite ve diş kavite metotlarından sonra varılan nokta dentin bariyer testleridir. Dentin bariyer testlerinin geliştirilmesinin temelinde, toksik hadiselere karşı dentinin koruyucu etkilerinin gösterilmesi yatmaktadır.

Outhwaite ve ark. 1974 yılında geliştirdikleri bölümlü oda (split chamber) aleti ile dentinin geçirgenlik özelliğini incelemişler ve materyallerin biyolojik uyumluluklarının değerlendirilmesinde dentinin geçirgenlik özelliğinden yararlanılması fikrini ortaya atmışlardır.

Araştırmacılar geliştirdikleri dentin bariyer test cihazları ile materyallerin biyolojik özelliklerini incelemişlerdir (Tyas, 1977; Hume, 1985). Test cihazlarının farklı materyallerden yapılması ve farklı boyutlarda olması ayrıca ticari olarak satılmamaları bu cihazların standart test uygulamalarında kullanılmasını engelleyen faktörlerdir. Bu nedenle dental materyallerin sitotoksiste değerlendirmelerinde kullanmak için Schmalz ve arkadaşları (1996) hücre kültür testlerinde kullanılan perfüzyon cihazında bazı değişiklikler yapmışlardır. Orjinal perfüzyon odasındaki membran yerine dentin diski kullanmışlardır. Kullanılan dentin diski insan veya sığır dişlerinden kesilerek hazırlanmış farklı kalınlıklardaki dentin disklerinden oluşabilir (Schmalz ve ark., 2001a; Schmalz ve ark., 2001b). Bu dentin diskinin pulpaya bakan tarafı asitle dağlanmış. Dentin diski bölümlü odaya biyolojik olarak uyumlu paslanmaz çelik bir tutucu ile yerleştirilir. Böylece bu oda dentin diski ile iki bölüme ayrılır. Hücreler dentin diskinin asitle dağlanmış tarafında üretilir ve hücrelerin ürettirdiği bu kısım pulpa tarafı (alt oda) olarak tanımlanır. Uygulanacak test materyali silikon bir tüp içinde dentin diskinin üst kısmına uygulanır. Materyalin uygulandığı bu kısım kavite bölümü olarak tanımlanır. Cihazın pulpa bölümü bir taraftan medyum şişesine bağlı diğer tarafı ise peristaltik pompa ve atık medyumun toplandığı şişeye bağlıdır (Schmalz ve ark., 1996).

Dentin bariyer testlerinde sitotoksiste değerlendirmeleri; belirlenen inkübasyon süreleri sonrasında, canlı hücre sayımı (Schmalz, 1997) veya MTT ile enzim aktivitesindeki değişikliklere göre yapılabilmektedir (Schmalz ve ark., 2002).

8. Hemolizis Testi

Bu yöntemin amacı kemikle veya yumuşak dokuyla uzun süre temasta olacak materyallerin akut hemolitik aktivitesini incelemektir. Hemolizis testinde tavşan kanı kullanılarak, materyalin hemolitik aktivitesi belirlenmektedir. Materyalin hem yüzeyi hem de materyalden çözünen maddeler akut hemolitik aktiviteyi oluşturur (Haugen ve Hensten-Pettersen, 1979; Wennberg ve Hensten-Pettersen, 1981).

9. Ekstraksiyon Testi

Ekstraksiyon testinde, test edilecek örnekler üzerine hücre vasatı ilave edilerek 37°C'lik, %5 CO₂ içeren etüvde deney süresi boyunca bırakılır. Süre sonlandığında tüplerin içindeki vasat, daha önceden hazırlanarak kültüre edilen hücrelerdeki vasat ile değiştirilip en az 24 saat süre ile 37°C'lik %5 CO₂ içeren etüvde bekletilir. Sonra, nitel ya da nicel değerlendirme hücrelerdeki değişikliklere ya da hücre erimesine göre yapılır (Huang ve Chang, 2002; Schwarze ve ark., 2002a).

Ekstraksiyon testinde ekstratların filtrasyonla steril edilebilmeleri, direkt temas testlerine göre avantaj sağlamaktadır; çünkü direkt temas testinde test materyallerinin sterilizasyonu materyalin özelliklerinde değişikliklere neden olabilmektedir (Keiser ve ark., 2000).

1.3.2.3. Sitotoksosite Değerlendirme Yöntemleri

Sitotoksosite değerlendirme yöntemleri dört başlık altında incelenebilir. Bunlar (Freshney, 2005, s.: 359-373):

1. Canlılık (viability) değerlendiren testler: kısa dönemde oluşan toksik reaksiyonların etkileri incelenir.

2. Yaşam (survival) değerlendiren testler: uzun dönemde oluşan toksik reaksiyonların etkileri incelenir.
3. Hücre proliferasyonunu değerlendiren testler
4. Metabolik sitotoksosite değerlendirme testleri

1. Canlılık Değerlendirme Testleri

Canlılık testleri toksik etki sonucu kültürde canlı kalan hücre oranının belirlenmesinde kullanılır. Canlılık testleri membran bütünlüğü bozulmuş hücre içerisine alınan tripan mavisi, eritrosin ya da naftalin siyahı gibi boyalar ile veya membran bütünlüğü bozulmamış canlı sağlam hücrelerin içerisine alınan diasetil florasan ya da nötral kırmızı gibi boyaların kullanılması ile yapılır. (Freshney, 2005, s.: 359-373). Nötral kırmızı testi, Tripan mavisi testi, Floresan metodu canlılık değerlendirme testlerindedir (Jenkins, 1999, s.: 239-252; Powers ve Sakaguchi, 2006, s.: 97-125).

2. Yaşam Değerlendirme Testleri

Kısa dönem testleri hızlı ve kolay uygulanabilir olmasına rağmen sadece değerlendirme esnasındaki ölü hücreleri göstermektedir. Bununla birlikte toksik etkilere maruz kalan hücrelerde etkiler birkaç saat, gün veya daha geç görülmektedir. Bu nedenle canlılık oranının belirlenmesinde, kısa dönemde ortaya çıkan toksite reaksiyonlarda geri dönüşüm olabildiğinden uzun dönem testleri kullanılmaktadır. Hücre yaşamı (survival) seyreltilmiş tek tip hücre süspansiyonundan hücrelerin ayrı ayrı koloni oluşturabilme kabiliyeti olarak tanımlanır. Düşük hücre yoğunluğunda koloni oluşturma düzeyi (plating efficiency) hücre yaşamının belirlenmesinde kullanılan yöntemdir (Freshney, 2005, s.: 359-373).

3. Proliferasyon Değerlendirme Testleri

Kültür içerisindeki hücrelerin bir kaç gün sonraki sayımı materyalin çeşitli bileşenlerinin hücre proliferasyonuna etkisinin belirlenmesinde de kullanılır. Ancak test süresi içinde belirli bir anda yapılan hücre sayımı belirgin bir sonuç vermediğinden dolayı en azından testin erken aşamalarında bir büyüme eğrisinin elde edilmesi gereklidir. Hücre sayımında büyüme eğrisi analizleri az sayıda örnek varsa kullanılabilir ancak sayı artarsa bu analizler çok kullanışlı değildir. Birçok örneğin incelendiği durumlarda belirli bir anda hücre sayımı (3 günden 5 güne kadar etkiye maruz kalan hücrelerin sayısı) yapılarak bu analiz uygulanır. Büyüme eğrisinde kontrol hücrelerinin log fazı (üreme fazı) tercihinde orta-üreme fazı içinde yer aldığı an seçilmelidir. Herhangi anlamlı bir etki sonucu elde edilen gelişme eğrisinin ikinci bir gelişme eğrisi ile desteklenmesi gerekir ya da diğer değerlendirme yöntemleri kullanılmalıdır (Freshney, 2005, s.: 359-373). 3H-timidin testi, Bromodeoksiuridin immunohistokimyasal teknik testi proliferasyon değerlendirme testlerindedir (Babich ve ark., 2000; Moharamzadeh ve ark., 2009).

4. Metabolizma Değerlendirme Testleri

Örneklem sayısı fazla olduğu durumlarda yaşam belirleme testlerinin hazırlık aşamaları ve testlerin analizleri zaman alıcı ve zahmetlidir. Ayrıca bazı düşük yoğunlukta hücre hatlarının özellikle yeni izole edilmiş hücrelerin koloni oluşturabilme yetenekleri zayıftır. Bu nedenle yüksek yoğunluğa sahip hücrelerin değerlendirilmesi için bazı alternatif test metotları geliştirilmiştir. Bu testler ile doğrudan hücre yaşam (survival) değerlendirilmesi yapılamaz. Ancak yapılan bu testlerde hücre sayısındaki net artış, total protein miktarı veya DNA artışı belirlenir. Aynı zamanda bu test ile tetrazolyum tuzunun formazon kristaline indirgenmesi ya da DNA veya protein sentezi saptanarak devam eden metabolik aktivite belirlenir (Freshney, 2005, s.: 359-373). Metabolizma testleri ve protein içerik testleri kısa dönem toksisiteden ziyade uzun dönemde oluşacak zararı anlamak için hücrelerin metabolik veya proliferatif kapasitelerini ölçerler (Jenkins, 1999, s.: 239-252).

Metabolizma testlerinde hücrelerin canlılıkları mikroplak okuyuculu spektrofotometre yardımı ile tespit edilir. Ucuz ve hızlı bir yöntemdir. Bu gruba giren testler şunlardır: MTT testi, Alamar mavisi testi, LDH testi (Freshney, 2005, s.: 359-373; Moharamzadeh ve ark., 2009).

Çalışmamızda kullandığımız MTT Test Yöntemi (Mitokondrial Dehidrogenaz Aktivitesi)

Sitotoksitenin değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılan enzimatik test yöntemlerinden biri, MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium-bromide] testidir. Bu test MTT'yi mavi, çözünmeyen formazan bileşiğine dönüştürebilen dehidrogenaz enzim aktivitesini ölçmektedir. Reaksiyon mitokondrial süksinil dehidrogenaz tarafından katalize edilmektedir. Hücrelerde uygulanan maddenin sitotoksik etkisi nedeniyle dehidrogenaz aktivitesinin etkilendiği koşullarda mavi renkli formazan oluşmamakta, formazan oluşumu, yalnızca aktif mitokondrinin bulunduğu canlı hücrelerde görülmektedir. Formazan oluşumu, optik yoğunluğun ölçülmesi veya test örneğinin çevresindeki formazan ışığın elektron mikroskopuyla belirlenmesi yöntemleriyle değerlendirilmektedir (Jenkins, 1999, s.:239-252; Li ve ark., 2003; Freshney, 2005, s.:359-373). Materyallerin toksik etkileri sonucunda, genellikle, hücrelerin metabolizması etkilenmektedir. Özellikle hücrelerdeki mitokondrileri etkileyen bazı kimyasal maddeler, MTT testi ile değerlendirilmektedir (Schmalz, 1994; Jenkins, 1999, s.:239-252). Hücre kültürlerinde metabolik olarak aktif hücrelerin sayısı ile bağlantılı olarak boyanın konsantrasyonu ve abzorbans değerleri değişmektedir. MTT yöntemi, büyük sayılardaki hücre kültürlerinde canlı hücre oranının belirlenmesinde hızlı, güvenilir ve kolay bir yöntemdir. MTT değerlendirmeleri, büyüme döngüsünün herhangi bir aşamasındaki canlı hücre yoğunluğu hakkında fikir vermektedir (Lewis ve ark., 1999; Li ve ark., 2003).

1.4. Antimikrobiyal Etkinlik

Pulpal ve periapikal patolojide mikroorganizmalar ve mikroorganizma ürünleri temel etiyolojik faktörlerdir. Bu nedenle, tedavi işlemleri sırasında bakterilerin uzaklaştırılması, ortamda kalan bakterilerin tekrar büyümelerinin ve kolonizasyonunun önlenmesi, başarılı diş tedavilerinde temel faktörlerdir (Kakehashi ve ark., 1965; Debelian ve ark., 1992; Weiss ve ark., 1996). Diş hekimliği pratiğinde kullanılan pek çok dental materyal uzun süreler örtücülük özelliğini koruyamamaktadır. Bu durum, materyal-diş yüzeyinde boşluk oluşumuna ve buna bağlı olarak gelişen mikrobiyal sızıntıya yol açmaktadır. Bu nedenle, dental materyallerin biyouyumlu olmalarının yanı sıra, belirli ölçüde antimikrobiyal özelliklerinin de olması istenmektedir. Ancak, dental materyaller antimikrobiyal etkinliğe sahip olsalar da, *in vivo* koşullarda yapısal bozulma gösteriyorlarsa, zamanla bu özelliklerinde bir azalma meydana gelebileceği gerçeği unutulmamalıdır (Tobias, 1988).

Dental materyallerin biyolojik özellik değerlendirmelerinin bir parçası olarak kabul edilen antimikrobiyal etkinlik değerlendirmelerinde (Mjör, 1977), çeşitli test yöntemlerinden yararlanılmaktadır.

1.4.1. Antimikrobiyal Etkinlik Değerlendirme Test Yöntemleri

1. Agar Difüzyon Testi

Antimikrobiyal etkinlik değerlendirmelerinde, en yaygın kullanılan test yöntemi agar difüzyon testidir (Tobias, 1988). Test, sıvı agarla sulandırılan bakterilerin petri kutularına yayılması ile yapılabileceği gibi, daha önceden agar konulan petrilere, bakterilerin ekilebilmesi ile de yapılabilmektedir. Deney materyallerinin test bakterileri ile inkübasyonunda, deney kalıpları kullanılabileceği gibi, materyallerin ayrı bir taşıyıcıya gerek kalmaksızın, agar içine açılan yuvalara da yerleştirilebileceği

bildirilmiştir (Qrstavik Niom, 1988). Agar difüzyon testinde, materyalin test edilen bakterilere karşı toksisitesine bağlı olarak, materyal çevresinde bir inhibisyon alanı oluşur. Böylece, toksisite ile birlikte, farklı materyallerin farklı difüzyon oranları da sonuçları etkileyebilmektedir (Fraga ve ark., 1996; Siqueira ve Uzeda, 1997; Bağış ve ark., 2001). Agar difüzyon testinin en önemli avantajı, materyaller aynı agar ortamına yerleştirildiği sürece, farklı inokülasyon büyüklüğü ve manüplasyon değişkenlerini elimine etmesidir. Böylece, materyaller arasında etkili bir karşılaştırmaya izin verir (Fraga ve ark., 1996). Ancak materyalin bakterisit mi, bakteriyostatik mi olduğunun değerlendirilememesi, yöntemin dezavantajı olarak görülmektedir (Tobias, 1988).

2. Dilüsyon Testi

Bu testte, antimikrobiyal özellikleri değerlendirilecek materyallerin bakteriler için özel hazırlanmış sıvılar içeren deney tüplerinde sulandırılmaları yapılır. Daha sonra tüplere eşit miktarlarda bakteriyel süspansiyonlar ilave edilerek, 2-20 dakika arasında inkübasyonları sağlanır. Çeşitli konsantrasyonlarda deney materyali içeren tüplerdeki bakteri canlılığı, inkübasyon süresi bitiminde steril tüplere ekim yapılarak kontrol edilir. Ekimler sonucunda, bakteri büyümesi gözlenmemesi, test materyallerinin antimikrobiyal etkinliğine işaret eder (Qrstavik Niom, 1988). Ancak, dilüsyon testi ile sadece bakteri besi ortamında çözünebilen materyallerin etkinliğinin değerlendirilebilmesi, yöntemin en önemli dezavantajıdır (Spanberg, 1973; Estrela ve ark., 2001).

3. Yaşam Süresi Testi

Bu testte, etkinliği değerlendirilecek materyalin ekstrat veya solüsyonları, belirli sayıdaki bakteri ile karıştırılarak, inkübe edilir. Belirlenen sürelerde bu karışımlardan örnekler alınarak bakteri büyümesi tespit edilir. Testte, katı besi ortamında hayatta kalabilen bakteri sayısı hesaplanarak, dental materyallerin bakterisidal etkinlikleri

değerlendirilir. Ancak, agar difüzyon ve dilüsyon testinde olduğu gibi, besi ortamında çözünebilen materyallerin etkinliğinin değerlendirilebilmesi yöntemin en önemli dezavantajıdır (Gilbert ve ark., 1978; Qrstavik, 1981).

4. Direkt Temas Testi

Direkt temas testinde, deney materyalleri ile inkübe edilen bakterilerin büyümeleri, 96 gözlü mikrotitrasyon plaklarındaki turbidometrik değerlendirmelerle yapılmaktadır. Her bir gözdeki bakteriyel büyüme değişimleri ısı kontrollü spektrometrede 600 nm dalga boyunda 30 dakikalık aralarla kaydedilmektedir. Agar difüzyon testinin dezavantajlarını içermeyen ve sayısal değerlendirme yapılabilmesine izin veren bu test yönteminin en önemli dezavantajı, deneysel işlemler sırasındaki kontaminasyona bağlı olarak hatalı sonuçlar verebilmesidir (Weiss ve ark., 1996).

Mevcut testlerin eksikliklerini gidermek ve deneysel koşulları klinik koşullara daha da yaklaştırmak amacı ile, bu testlerin dışında bakteriyel süspansiyonların deney materyalleri üzerine yerleştirilmesi ve belirlenen inkübasyon süreleri sonrasında bakteri miktarının sayısal olarak değerlendirilmesi esasına dayanan deneysel test yöntemlerinin de geliştirildiği görülmektedir (Boeckh ve ark., 2002).

1.5. Çalışmamızda Kullandığımız Bakteri Türü: *Enterococcus faecalis*

Kök kanal tedavisinde başarıyı etkileyen en önemli etkenlerden bir tanesi mikroorganizma ve toksinlerinin kök kanalından uzaklaştırılması işlemidir. Bu amaçla; kök kanal tedavisinde mekanik preparasyon, irrigasyon ve kanal içi ilaçların kullanılması ile mikroorganizmalar mümkün olduğunca yok edilmeye çalışılmaktadır. Ancak gerek kök kanalının göstereceği anatomik farklılıklar, gerekse kök kanalında bulunan bazı mikroorganizmaların dentin tübüllerinde ilerleme kabiliyetinde olmaları gibi faktörler nedeni ile kanal içinde ulaşılamayan bölgelerde

mikroorganizmalar kalabilmektedir (Dahlen ve ark., 2000). *Enterococcus faecalis*, bu mikroorganizma türlerinden biridir (Molander ve ark., 1998).

Enterococcus faecalis, fakültatif anaerop, Gram (+) bir koktur. Genellikle tek başlarına, çiftler halinde (diplokok) veya kısa zincirler halinde gözlenirler. Nonhemolitik ve hareketsiz bakterilerdir (Rocas ve ark., 2004a).

Enterococcus faecalis diğer enterokok türlerinde olduğu gibi, elverişsiz koşullara kolaylıkla adapte olabilir. Sodyum dodesil sülfat, safra tuzları, hiperosmolarite, ısı, etanol, hidrojen peroksit, asidite ve alkalitenin normal öldürücü düzeylerine diğer mikroorganizma türlerinden daha dirençlidir (Flahaut ve ark., 1996a; Flahaut ve ark., 1996b; Flahaut ve ark., 1996c; Flahaut ve ark., 1997).

Enterococcus faecalis, tedavi edilmemiş nekrotik pulpal dişlerin mikrobiyal florasının küçük bir kısmını oluştururken, kronik apikal periodontitis bulgusu veren başarısız endodontik tedavili dişlerin %30-70'inde pozitif kültürünün elde edildiği ve sıklıkla da saf kültür halinde bulunduğu gösterilmiştir (Kayaoğlu ve Qrstavik, 2004).

Enterococcus faecalis'in primer endodontik enfeksiyonlarda görülme sıklığı %4-40 olarak bildirilirken, inatçı periradiküler lezyonlarda bulunma sıklığının çok daha fazla olduğu belirtilmiştir (Rocas ve ark., 2004a). Ayrıca *Enterococcus faecalis*'in başarısız kök kanal tedavili dişlerde bulunma sıklığının primer endodontik enfeksiyonlardan 9 kat daha fazla olduğu da bildirilmiştir (Rocas ve ark., 2004a). Moleküler teknikler, başarısız endodontik tedavili dişlerde yüksek düzeyde *Enterococcus faecalis* olduğunu onaylamış ve bu başarısız vakaların %60-90'ında türe ait gen parçaları saptanmıştır (Rocas ve ark., 2004a; Rocas ve ark., 2004b; Siqueira ve Rocas, 2004; Sedgley ve ark., 2006).

Enterococcus faecalis; litik enzimler, sitolizin, feromonlar ve lipoteikoik asit gibi belirli virulans faktörlere sahiptir (Rocas ve ark., 2004a). *Enterococcus faecalis*'in konak hücrelere bağlanabildiği ve konak cevabını değiştirebildiği belirtilmiştir

(Love, 2001; Rocas ve ark., 2004a). *Enterococcus faecalis*, lenfositlerin etkilerini bastırmak suretiyle de endodontik başarısızlığa neden olabilmektedir (Lee ve ark., 2004). Bu mikroorganizmanın çok çeşitli genetik polimorfizimler sergilediği görülmekte (Sedgley ve ark., 2004) ve serin proteaz, jelatinaz ve dentine bağlanmayı kolaylaştıran kollojen bağlayan protein (Ace) gibi enzimlere sahip olduğu bilinmektedir (Hubble ve ark., 2003). Dentine bağlanabilme özelliği de gösteren *Enterococcus faecalis*, dentin tübüllerine 400-1000 µm ilerleyebilecek kadar küçük boyutlu olup dentin tübülleri içerisinde yaşayabilmektedir (Haapasalo ve Qrstavik, 1987; Love, 2001).

Enterokoklar zor çevresel şartlara iyi dayanıklılık gösterirler. 10-45°C arasında, %6,5 NaCl besiyerinde çoğalabilmekte, pH 9,6'nın üzerindeyken ve 60°C'de 30 dakika yaşayabilmektedirler (Sherman, 1937; Teixeira ve Facklam, 2003). Kök kanal sistemi mikroorganizmaların çoğalmaları için besinden zengin bir ortam olmamakla birlikte, *Enterococcus faecalis*'in apikal foramenden sızan serumu kullanarak çoğalabileceği, diğer taraftan virülans faktörlerinden hyaluronidaz aracılığıyla dentinde bulunan hyaluronattan veya organik kısımca zengin olduğu bilinen smear tabakasından çoğalmak için gerekli enerjiyi elde edebileceği düşünülmektedir. *Enterococcus faecalis* uzun süre açlığa dayanabilme kapasitesine ve uygun besin ortamı oluşunca normal hallerine dönebilme kabiliyetine de sahiptir (Figdor ve ark., 2003). Yapılan bir araştırmada *Enterococcus faecalis*'in kök kanalında ek besin olmadan 12 ay boyunca canlılığını sürdürebildiği de gösterilmiştir (Sedgley ve ark., 2005).

Enterococcus faecalis'in biyofilm oluşturarak 1000 kat daha dirençli hale geldiği belirtilmiştir (Distel ve ark., 2002). *In vitro* çalışmalarda *Enterococcus faecalis*'in dentin tübüllerini 24 saat gibi çok kısa sayılabilecek bir sürede istila ettiği de gösterilmiştir (Haapasalo ve Qrstavik, 1987; Qrstavik ve Haapasalo, 1990; Peters ve ark., 2000; Love, 2001; Weiger ve ark., 2002). *Enterococcus faecalis* monoenfeksiyon oluşturma yeteneğine de sahiptir. Sobrinho ve ark. (1998) tarafından rat dişleri üzerinde yapılan bir çalışmada, kök kanallarına çeşitli bakteriler ayrı ayrı ve birlikte ekilmiş ve *Enterococcus faecalis*'in diğer bakterilerden farklı

olarak, pek çok vakada kök kanalında diğer bakterilerin desteği olmadan tek başına kolonize olabildiği bulunmuştur.

Enterococcus faecalis'in kanal içi antiseptik materyal olarak sıklıkla kullanılan ve güçlü bir alkalın dezenfektan olan kalsiyum hidroksitin antimikrobiyal etkisine karşı dirençli olduğu da pek çok çalışmada gösterilmiştir (Stevens ve Grossman, 1983; Haapasalo ve Qrstavik,1987; Qrstavik ve Haapasalo, 1990; Siqueira ve Uzeda, 1996; Distel ve ark., 2002; Siren ve ark., 2004).

Enterococcus faecalis yukarıda belirtilen özellikleri dolayısıyla endodontide, inatçı bir patojen olarak kabul edilmektedir. Endodontik tedavide başarıyı artırma yolundaki çalışmalarda *Enterococcus faecalis*'in tam eliminasyonunun sağlanması önemli bir aşama olarak görülmektedir.

1.6. Amaç

Kök kanal tedavisinde amaç, kanalların mekanik olarak temizlenmesini takiben, iritan özellik taşımayan bakterisid ilaçlarla yıkanması ve yine toksik olmayan dolgu ve kanal patlarıyla tıkanmasıdır.

Endodontik dolgu materyalleri doğrudan canlı dokularla ilişkide olduğundan, bu materyallere karşı oluşabilecek doku cevabı önemlidir. Toksik reaksiyona ve doku nekrozuna neden olabilecek kanal dolgu patları doku iyileşmesine engel olduğu gibi endodontik tedavinin başarısını da etkileyecektir. Bu yüzden, iyi bir kanal dolgu patı biyolojik olarak uyumlu olmalıdır ve periradiküler dokular tarafından iyi tolere edilmelidir.

Kök kanal tedavisinin aşamalarından olan kemomekanik temizliğin amacı kök kanalındaki mikroorganizmaları uzaklaştırmaktır. Fakat kök kanal preparasyon işlemi, yıkama solüsyonları ve kanaliçi medikamanlar tüm mikroorganizmaları elimine etmekte yetersiz kalmaktadırlar. Bunun için, kanalların doldurulmasında

kullanılan kök kanal dolgu patlarının antimikrobiyal etkisinin de bulunması önem taşımaktadır.

Yukarıda ifade edilen nedenlerden dolayı çalışmamızda klinikte yaygın olarak yerini almış kök kanal dolgu patı olan AH Plus ve son yıllarda yaygın olarak kullanılmaya başlanmış nispeten daha yeni kök kanal dolgu patları olan Tubli Seal EWT, EndoREZ, MTA Fillapex ve Real Seal'ı sitotoksosite ve antimikrobiyal etkinlik yönünden *in vitro* olarak incelemeyi amaçladık.

2. GEREÇ ve YÖNTEM

Çeşitli kök kanal dolgu patlarının sitotoksik ve antimikrobiyal özelliklerini değerlendirmeyi amaçladığımız bu çalışmada 5 farklı kök kanal dolgu patı kullanılmıştır. Bu kök kanal dolgu patları şunlardır:

1. AH Plus (Dentsply DeTrey, Konstanz, Almanya) (Şekil 2.1)
2. Tubli Seal EWT (Kerr, Michagen, ABD) (Şekil 2.2)
3. EndoREZ (Ultradent Corp, Utah, ABD) (Şekil 2.3)
4. MTA Fillapex (Angelus, Londrina, Brezilya) (Şekil 2.4)
5. Real Seal (Sybron Endo, California, ABD) (Şekil 2.5)



Şekil 2.1. AH Plus.



Şekil 2.2. Tubli Seal EWT.



Şekil 2.3. EndoREZ.



Şekil 2.4. MTA Fillapex.



Şekil 2.5. Real Seal.

2.1. Sitotoksisite Değerlendirmesi

Çalışmamızın sitotoksisite değerlendirmeleri, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarları'nda yürütüldü. Çalışmada kök kanal dolgu patlarının sitotoksik etkilerinin araştırılması amacıyla hücre kültürü deneyleri yapılmış ve beş farklı kök kanal patının etkileri araştırılmıştır.

2.1.1. Materyal Örneklerinin Hazırlanması

Deneyde kullanılacak kök kanal dolgu patları üretici firmanın talimatları doğrultusunda steril kabin (Class II Holten LominerHow, Danimarka) (Şekil 2.6) içerisinde aseptik şartlarda hazırlanmıştır. 6 kuyucuklu plağın her bir kuyucuğuna her kuyucuğa farklı kök kanal dolgu patı 1 cm çapında alanı kaplayacak şekilde yerleştirilmiştir.



Şekil 2.6. Steril kabin (Class II Holten LominerHow, Danimarka).

2.1.2. Ekstraksiyon Sıvısı Elde Edilmesi

Kök kanal patları 6 kuyucuklu plaklara yerleştirildikten sonra bakteriyel kontaminasyonu önlemek amacı ile materyaller 24 saat süreyle ultraviyole ışığında bekletilmiş daha sonra 6 ml kültür ortamı Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM/F12) (Biochrom Ag, Berlin, Almanya) (Şekil 2.7) ilave edilerek, 37°C,

% 100 nemli ortamda, %5 CO₂ içeren atmosfere sahip inkübatörde (Heracell, Hessen, Almanya) (Şekil 2.8) ekstraksiyon için 48 saat süreyle bekletilmiştir. 48 saat sonra aspire edilen kültür ortamı steril santrifüj tüplerine aktarılmış ve deney materyali olarak kullanılmıştır. Elde edilen ekstraksiyon sıvıları hücre canlılık testinde kullanılmaya kadar -20°C’de saklanmıştır.



Şekil 2.7. DMEM besi ortamı.



Şekil 2.8. İnkübatör.

2.1.3. Hücre Kültürü Hazırlanması

Deneylede L-929 fare derisi fibroblastları (L-929 HÜKÜK 95030802, Şap Enstitüsü, Ankara, Türkiye), kültür ortamı olarak ise antibiyotik içermeyen, %10 fetal sığır serumu (Biochrom Ag, Berlin, Almanya) (Şekil 2.9) ile desteklenmiş DMEM kullanılmıştır.



Şekil 2.9. FBS-fetal sığır serumu.

Ankara Şap Enstitüsü hücre kültürü koleksiyonundan (HÜKÜK) temin edilen, dondurulmuş haldeki L-929 fare fibroblast hücreleri (L-929 HÜKÜK 95030802, Şap Enstitüsü, Ankara, Türkiye) ampül içinde 37°C su banyosunda 1-2 dakika bekletildikten sonra bir pipet ile hemen önceden 37°C'ye ısıtılmış besiyeri içeren steril santrifüj tüpüne aktarılmıştır. Hücrelerin yapıştığı gözlemlendikten sonra besiyeri vakumla çekilmiş, 1-2 ml PBS (Dulbecco's phosphate buffered saline, Stem Cell Technologies, Vancouver, Kanada) ile bir kez yıkandıktan sonra %0,05 / %0,02 Tripsin-EDTA (PAA, Pasching, Avusturya) solüsyonu ilave edilerek yaklaşık 1 dakika %5 CO₂ içeren inkübatörde bekletilmiştir. Hücrelerin yüzeyden kalktığı ters mikroskopta gözlemlendikten sonra vakit kaybetmeden yeterli miktarda besiyeri içerisine alınarak 900 RCF 4 dakika santrifüj edilmiş, üst faz vakumla çekildikten sonra altta kalan hücreler besiyerinde homojenize edilerek 3 ayrı T-25 hücre kültürü kabına (Orange Scientific, Braine-l'Alleud, Belçika) alınarak %5 CO₂ içeren atmosferde 37°C'de kültüre edilmiştir. Bu işlemler hücrelerin büyüme-yapışma durumları kontrol edilerek ve uygun zamanda pasajlanarak hücreler 2. pasajda elde edilmiştir.

2.1.4. MTT (Mitokondriyal Toksikite Testi) Yöntemi İle Hücre Canlılık Tayini

MTT stok solüsyon: MTT 5mg/ml olacak şekilde PBS içerisinde çözüldü ve 0,2 mm filtreden geçirildi.

MTT çalışma solüsyonu: MTT stok solüsyonunun DMEM ile 1:10 dilüsyonu hazırlandı.

Kök kanal patlarına DMEM ilave edildiği esnada eş zamanlı olarak L-929 hücre süspansiyonu 3.10⁴ hücre/ml olacak şekilde hazırlanmış ve 96 kuyucuklu hücre kültürü plaklarına her bir kuyucuğa 100µl olacak şekilde eklenerek hücre çoğalması için %5 CO₂ içeren 37°C'lik inkübatörde 48 saat bekletilmiştir. Tüm deney işlemleri 4 kez tekrarlanmıştır.

48 saat sonunda kuyucuklardaki deney ortamı uzaklaştırılarak yerine her bir kuyucuğa 100µl olacak şekilde deney materyali eklenmiştir.

Kontrol grubuna ise 100 µl DMEM/F12 ilave edilmiştir.

Farklı saatlerdeki sitotoksiteyi ölçebilmek amacı ile 3 adet 96 kuyucuklu plak (24, 48 ve 72. saatler için) ayrı ayrı hazırlanmıştır.

24 saat sonunda 24. saat olarak etiketlenen 96 kuyucuklu plak inkübatörden çıkarılarak besiyeri ortamdan uzaklaştırılmış, önceden su banyosunda 37°C'ye ısıtılmış PBS ile yıkandıktan sonra her bir kuyucuğa 100µl DMEM ve 25 µl MTT çalışma solüsyonu (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) ilave edilerek karanlık ortamda 37°C'de 4 saat süre ile bekletilmiştir.

Süre bitiminde hücre kültürü plaklarındaki tüm sıvılar aspire edilmiş ve her bir göze 100 µl DMSO (dimetil sülfoksit, Riedel de Haën, Almanya) ve 12,5 µl glisin tamponu (0,1 M Glisin, 0,1 M NaCl, pH: 10.5) eklenmiştir. Hemen ardından spektrofotometrede (Spectramax M2, Molecular Devices, California, ABD) 570 nanometrede absorbansları ölçülmüştür. Bu işlemler 48. ve 72. saatler için de aynı şekilde uygulanmıştır. Tüm deney işlemleri ve MTT testi dört kez tekrarlanmıştır.

2.1.5. İstatistiksel Analiz

Her pat ve kontrol grubu için 4 tekrarlı olarak çalışılan 24., 48. ve 72. saatlere ait absorbans değerleri Excel programı kullanılarak önce her 4 tekrarın ortalamaları alınmış, daha sonra patların absorbans ölçümlerinden elde edilen her bir değer kontrolden elde edilen değere bölünerek hücre canlılık oranı hesaplanmıştır.

Deney sonucunda elde edilen verilerin analizinde IBM SPSS Statistics 19 paket programı (IBM, New York, ABD) kullanılmıştır. Farklı zamanlar için patlar arasında farklılık olup olmadığını test etmek amacıyla parametrik olmayan Kruskal-Wallis

Testi kullanılmış, analiz sonucunda fark çıkan gruplarda farkın kaynağını bulmak için LSD (Least Significant Difference) testi uygulanmıştır. Ayrıca farklı zamanlar için her bir pat ile kontrol grubu arasında farklılık olup olmadığını test etmek amacıyla Mann-Whitney U Testi kullanılmıştır. Farklı patların zamana göre değişiminin anlamlı olup olmadığını test etmek amacıyla ise parametrik olmayan Friedman Testi kullanılmış, analiz sonucunda fark çıkan gruplarda farkın kaynağını bulmak için LSD testi uygulanmıştır.

2.2. Antimikrobiyal Etkinlik Değerlendirmesi

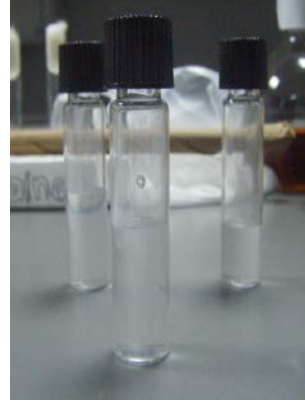
Çalışmamızın ikinci bölümü, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi İbni Sina Hastanesi Başhekimliği Merkez laboratuvarında yürütüldü. AH Plus, Tubli Seal EWT, EndoREZ, MTA Fillapex ve Real Seal kök kanal dolgu patlarının antimikrobiyal etkileri *Enterococcus faecalis* üzerinde, direkt temas test yöntemi kullanılarak incelenmiştir.

2.2.1. Bakteri Süspansiyonunun Hazırlanması

Çalışmamızda kullanılan test mikroorganizması olan *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 suş'u Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi İbni Sina Hastanesi Başhekimliği Merkez laboratuvarından temin edilmiştir. Çalışma sırasında, *Enterococcus faecalis*'in Triptik Soy Agar (TSA, Oxoid, ABD) besiyerine ekilerek 18 saatlik inkübasyon sonucu elde edilen taze kültürleri kullanılmıştır. Bu kültürlerden McFarland standart cihazı (Phonenix Spec Nephelometer, ABD) (Şekil 2.10) kullanılarak McFarland 0,5 ($1,5 \times 10^8$) olacak şekilde, serum fizyolojik içeren tüplere alınarak hazırlanan bakteri süspansiyonu (Şekil 2.11) kullanılmıştır.



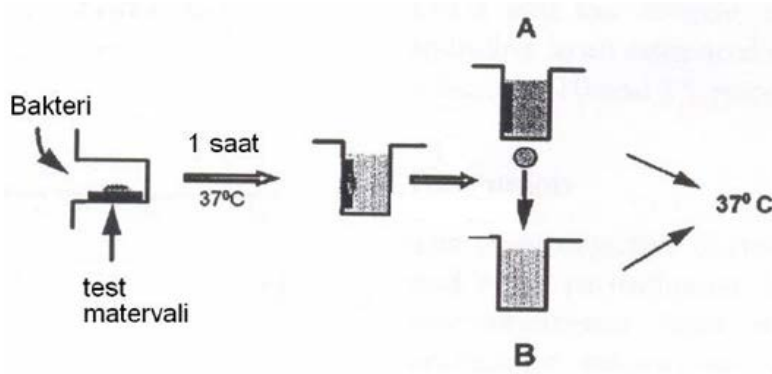
Şekil 2.10. McFarland standart cihazı.



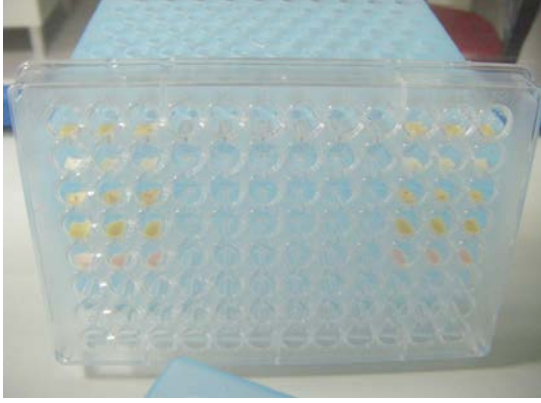
Şekil 2.11. Bakteri süspansiyonu.

2.2.2. Direkt Temas Test Yöntemi

Direkt temas testi (Şekil 2.12) Weiss ve ark. (1996)'nın yaptığı çalışmaya göre yapılmıştır. 96 kuyucuklu steril ELİSA plaklar kullanılarak bakteriyel büyüme tespit edilmiştir. 96 kuyucuklu plaklar dikey olarak tutulmuş ve kuyucuklar kök kanal dolgu patları ile kaplanmıştır (Şekil 2.13).



Şekil 2.12. Direkt temas test yöntemi (Weiss ve ark., 1996).



Şekil 2.13. Kök kanal dolgu patları yerleştirilmiş 96 kuyucuklu plak.

Yaklaşık 20 dakika beklendikten sonra test materyalleri üzerine mikropipet yardımı ile 10 µl McFarland standart 0,5 bakteriyel süspansiyonları eklenmiştir. Bakteriyel süspansiyon likitinin buharlaşması için 37°C’de 1 saat beklenmiştir. Daha sonra 96 kuyucuklu plaklar yatay pozisyona getirilmiştir. Grup A’da bakteri ile direkt teması sağlanan test materyallerinin bulunduğu kuyucuklara mikropipet yardımı ile 245 µl Brain Heart İnfuzyon (BHI, Oxoid, ABD) besiyeri eklenmiş ve 2 dakika karıştırılmıştır. Grup B’de ise içinde test materyali olmayan 5 kuyucuğa da mikropipet kullanımı ile 215 µl BHI besiyeri eklenmiştir. Grup A’dan çekilen 15 µl BHI besiyeri alınarak Grup B’ye konulmuştur. Böylece her iki grupta da eşit miktarda BHI besiyeri olması sağlanmıştır. Ayrıca hem madde varlığında hem de madde olmadan antimikrobiyal etkinliğin değerlendirilmesi sağlanmıştır.

Test materyali ile kaplanmamış kuyucuklara aynı işlemler yapılarak pozitif kontrol grubu, test materyali ile kaplı kuyucuklarda bakteri ekimi yapılmadan aynı işlemler yapılarak da negatif kontrol grubu oluşturulmuştur.

Daha sonra toplam 18 saat olmak üzere ilk 6 saat ve son 6 saat her saatte bir olmak üzere spektrofotometrede (Sanofi Diagnostic Pasteur PR 1100 Reader, ABD) (Şekil 2.14) 620 nm dalga boyu kullanılarak ölçüm yapılmıştır.

Deney ölçümleri tamamlandıktan sonra bakteri eklenmeyen kuyucuklarda kontaminasyon olmadığını kontrol etmek amacıyla her bir kuyucuktan örnek alınarak agar plaklarına ekim yapılmış ve bakteri üremesi olup olmadığı kontrol edilmiştir.



Şekil 2.14. Spektrofotometre (Sanofi Diagnostic Pasteur PR 1100 Reader).

2.2.3. İstatistiksel Analiz

Deney sonucunda elde edilen verilerin analizinde IBM SPSS Statistics 19 paket programı kullanılmıştır. AH Plus, Tubli Seal EWT, EndoREZ, MTA Fillapex, Real Seal kök kanal dolgu patları ve kontrol grubu arasında 18 saatlik süre diliminde ilk 6 saat ve son 6 saat farklılık olup olmadığını test etmek amacıyla tek yönlü varyans analizi (ANOVA), tek yönlü varyans analizi sonucunda gruplar arasındaki fark önemli bulunduğunda çoklu karşılaştırma testlerinden LSD ile karşılaştırmalar yapılmıştır.

3. BULGULAR

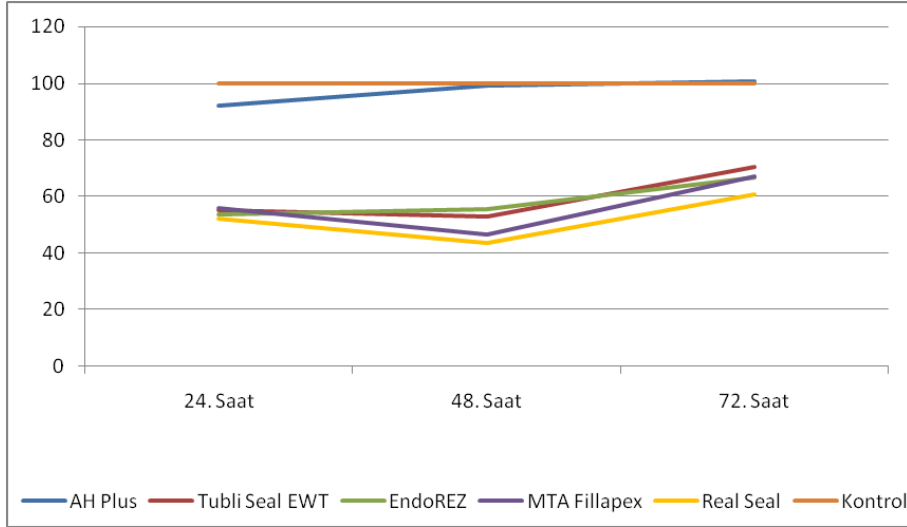
3.1. Sitotoksisite Çalışmasına Ait Bulguları

Çalışmamızın birinci bölümünde AH Plus, Tubli Seal EWT, EndoREZ, MTA Fillapex ve Real Seal kök kanal dolgu patlarının sitotoksik etkilerinin 24., 48. ve 72. saatlerdeki incelenmesi sonucunda elde edilen hücre canlılık oranları, kök kanal dolgu patlarına ait ekstraksiyon sıvılarının hücre kültürleri üzerine uygulanmasından sonra MTT testi ile elde edilen optik densitometre değerlerinin, kontrol grubu optik densitometre değerlerine oranı (%) hücre canlılığı olarak ifade edilmiş ve her grubun kendi kontrol grubunun hücre canlılık oranlarının %100 olduğu kabul edilerek hesaplamalar yapılmıştır.

Çalışmamızdaki gruplara ait 24., 48. ve 72. saatteki hücre canlılık oranlarının ortalama değerleri (minimum-maksimum) Çizelge 3.1’de verilmiş ve grafiksel ifadesi ise Şekil 3.1’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. AH Plus, Tubli Seal EWT, EndoREZ, MTA Fillapex, Real Seal kök kanal dolgu patlarının 24., 48. ve 72. saatteki hücre canlılık oranlarının (%) ortalama değerleri (minimum-maksimum).

Gruplar	24. Saat	48. Saat	72. Saat
AH Plus	91,93 (81,86-100,08)	99,22 (93,66-103,94)	100,63 (94,12-109,58)
Tubli Seal EWT	55,28 (51,46-58,16)	53 (37,85-62,91)	70,39 (66,74-72,98)
EndoREZ	53,83 (51,45-57,07)	55,82 (51,58-63,1)	66,62 (62,79-71,93)
MTA Fillapex	55,9 (54,42-56,92)	46,77 (38,53-57,49)	66,98 (59,62-78,44)
Real Seal	52,12 (46,7-57,16)	43,63 (35,45-53,72)	60,92 (56,35-65,11)
Kontrol	100 (98,18-101,94)	100 (93,95-104,75)	100 (88,3-105,95)



Şekil 3.1. 24. 48. ve 72. saatteki kontrol grubuna göre değişik patlardaki hücre canlılık oranlarının grafiksel ifadesi.

Mosmann (1983) deney materyali uygulandıktan sonraki hücre canlılığı oranına göre sitotoksik etkiyi aşağıdaki skala ile derecelendirmiştir:

- %90 ve üzeri hücre canlılığı varlığı → sitotoksik değil
- %60-90 arası hücre canlılığı varlığı → hafif derecede sitotoksik
- %30-59 arası hücre canlılığı varlığı → orta derecede sitotoksik
- %30 ve altı hücre canlılığı varlığı → şiddetli derecede sitotoksik

Çalışmamızda bu sınıflama esas alınarak elde edilen hücre canlılık oranlarına göre kök kanal dolgu patlarının sitotoksikite dereceleri Çizelge 3.2’de gösterilmiştir.

Buna göre; 24 ve 48 saatlik değerlendirmede AH Plus’ın sitotoksik olmadığı, Tubli Seal EWT, EndoREZ, MTA Fillapex ve Real Seal kök kanal dolgu patlarının orta derecede sitotoksik olduğu görülmektedir (Çizelge 3.2).

72 saatlik değerlendirmede ise AH Plus’ın sitotoksik olmadığı, Tubli Seal EWT, EndoREZ, MTA Fillapex ve Real Seal kök kanal dolgu patlarının hafif derecede sitotoksik olduğu gözlenmiştir (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2. Mosmann (1983)'in skalasına göre AH Plus, Tubli Seal EWT, EndoREZ, MTA Fillapex, Real Seal kök kanal dolgu patlarının sitotoksikite değerleri.

	24. Saat	48. Saat	72. Saat
AH Plus	Sitotoksik Değil	Sitotoksik Değil	Sitotoksik Değil
Tubli Seal EWT	Orta	Orta	Hafif
EndoREZ	Orta	Orta	Hafif
MTA Fillapex	Orta	Orta	Hafif
Real Seal	Orta	Orta	Hafif

Çalışmamızdaki deney gruplarına ait hücre canlılık oranlarından elde edilen ortalama değerler ile kontrol grubu arasındaki fark Mann-Whitney U testi, kök kanal dolgu patlarının kendi aralarındaki fark ise Kruskal-Wallis testi ile istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

Buna göre; uygulanan Mann-Withney U testi sonucunda 24 saatlik değerlendirme periyodunda kontrol grubu ile AH Plus grubu arasında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p>0,05$). Ancak kontrol grubu ile Tubli Seal EWT, EndoREZ, MTA Fillapex ve Real Seal grupları arasında anlamlı bir farklılık olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$) (Çizelge 3.3).

Uygulanan Kruskal-Wallis testi sonucunda ise 24 saatlik değerlendirmede bu çalışmada kullanılan kök kanal dolgu patları arasında canlı hücre oranları bakımından anlamlı bir farklılık bulunmaktadır ($p<0,05$). Buna göre; AH Plus grubundaki canlı hücre oranı diğer tüm kök kanal dolgu patları gruplarından anlamlı derecede daha yüksek bulunmuştur (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.3. 24. saatteki kontrol grubuna göre kök kanal dolgu patlarının canlı hücre oranları karşılaştırması.

Pat	AH Plus	Tubli Seal EWT	EndoREZ	MTA Fillapex	Real Seal	P
AH Plus	-	*	*	*	*	0,029*
Tubli Seal EWT	*	-				
EndoREZ	*		-			
MTA Fillapex	*			-		
Real Seal	*				-	
Kontrol	0,083	0,021**	0,021**	0,021**	0,021**	

*: p<0,05; **:p<0,05

48. saat sonuçları için, uygulanan Mann-Withney U testi sonucunda kontrol grubu ile AH Plus grubu arasında anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0,05$). Ancak kontrol grubu ile Tubli Seal EWT, EndoREZ, MTA Fillapex ve Real Seal grupları arasında anlamlı bir farklılık bulunmaktadır ($p<0,05$) (Çizelge 3.4).

Uygulanan Kruskal-Wallis testi sonucunda 48 saatlik değerlendirmede bu çalışmada kullanılan kök kanal dolgu patları arasında canlı hücre oranları bakımından anlamlı bir farklılık bulunmaktadır ($p<0,05$). Buna göre; AH Plus grubundaki canlı hücre oranı diğer tüm kök kanal dolgu patları gruplarından anlamlı derecede daha yüksektir (Çizelge 3.4).

Çizelge 3.4. 48. saatteki kontrol grubuna göre değişik patlardaki canlı hücre oranları karşılaştırması.

Pat	AH Plus	Tubli Seal EWT	EndoREZ	MTA Fillapex	Real Seal	p
AH Plus	-	*	*	*	*	0,017*
Tubli Seal EWT	*	-				
EndoREZ	*		-			
MTA Fillapex	*			-		
Real Seal	*				-	
Kontrol	0,773	0,021**	0,021**	0,021**	0,021**	

*: p<0,05; **:p<0,05

72 saatlik değerlendirme sonuçları için, uygulan Mann-Withney U testi sonucunda kontrol grubu ile AH Plus grubu arasında anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0,05$). Ancak kontrol grubu ile Tubli Seal EWT, EndoREZ, MTA Fillapex ve

Real Seal grupları arasında anlamlı bir farklılık bulunmaktadır ($p<0,05$) (Çizelge 3.5).

Uygulanan Kruskal-Wallis testi sonucunda 72 saatlik değerlendirmede çalışmada kullanılan kök kanal dolgu patları arasında canlı hücre oranları bakımından anlamlı bir farklılık bulunmaktadır ($p<0,05$). Buna göre; AH Plus grubundaki canlı hücre oranı diğer tüm kök kanal dolgu patları gruplarından anlamlı derecede daha yüksektir. Ayrıca Tubli Seal EWT grubundaki canlı hücre oranı Real Seal grubundan anlamlı derecede daha yüksektir (Çizelge 3.5).

Çizelge 3.5. 72. saatteki kontrol grubuna göre değişik patlardaki canlı hücre oranları karşılaştırması.

Pat	AH Plus	Tubli Seal EWT	EndoREZ	MTA Fillapex	Real Seal	p
AH Plus	-	*	*	*	*	0,010*
Tubli Seal EWT	*	-			*	
EndoREZ	*		-			
MTA Fillapex	*			-		
Real Seal	*	*			-	
Kontrol	1,000	0,021**	0,021**	0,021**	0,021**	

*: $p<0,05$; **: $p<0,05$

Çalışmamızda kullanılan her bir kök kanal dolgu patının farklı zaman periyotlarındaki sitotoksik etkisinin istatistiksel değerlendirilmesinde Friedman testi kullanılmıştır.

AH Plus kök kanal dolgu patı sonuçları için; uygulanan Friedman testi sonucunda 24., 48. ve 72. saatlerdeki ölçümler arasında kontrol grubuna göre canlı hücre oranları bakımından anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0,05$) (Çizelge 3.6).

Çizelge 3.6. AH Plus grubuna ait 24, 48, ve 72 saatlik değerlendirmede kontrol grubuna göre canlı hücre oranları karşılaştırması (Friedman Testi).

Zaman	24. Saat	48. Saat	72. Saat	p
24. Saat	-			0,472*
48. Saat		-		
72. Saat			-	

*p>0,05

Tubli Seal EWT kök kanal dolgu patı sonuçları için; uygulanan Friedman testi sonucunda 24., 48. ve 72. saatlerdeki ölçümler arasında kontrol grubuna göre canlı hücre oranları bakımından anlamlı bir farklılık bulunmaktadır ($p<0,05$). Buna göre; 72. saatteki kontrol grubuna göre canlı hücre oranı 24. ve 48. saatteki kontrol grubuna göre canlı hücre oranından anlamlı derecede daha yüksektir (Çizelge 3.7).

Çizelge 3.7. Tubli Seal EWT grubuna ait 24, 48, ve 72 saatlik değerlendirmede kontrol grubuna göre canlı hücre oranları karşılaştırması (Friedman Testi).

Zaman	24. Saat	48. Saat	72. Saat	P
24. Saat	-		*	0,039*
48. Saat		-	*	
72. Saat	*	*	-	

*: p<0,05

EndoREZ kök kanal dolgu patı sonuçları için; uygulanan Friedman testi sonucunda 3 farklı zaman periyodundaki ölçümler arasında kontrol grubuna göre canlı hücre oranları bakımından anlamlı bir farklılık olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$). Buna göre; 72. saatteki kontrol grubuna göre canlı hücre oranı 24. ve 48. saatteki kontrol grubuna göre canlı hücre oranından anlamlı derecede daha yüksektir (Çizelge 3.8).

Çizelge 3.8. EndoREZ grubuna ait 24, 48 ve 72 saatlik değerlendirmede kontrol grubuna göre canlı hücre oranları karşılaştırması (Friedman Testi).

Zaman	24. Saat	48. Saat	72. Saat	P
24. Saat	-		*	0,039*
48. Saat		-	*	
72. Saat	*	*	-	

*: p<0,05

MTA Fillapex kök kanal dolgu patı sonuçları için; uygulanan Friedman testi sonucunda 24., 48. ve 72. saatlerdeki ölçümler arasında kontrol grubuna göre canlı hücre oranları bakımından anlamlı bir farklılık bulunmaktadır ($p<0,05$). Buna göre; 72. saatteki kontrol grubuna göre canlı hücre oranı 24. ve 48. saatteki kontrol grubuna göre canlı hücre oranından anlamlı derecede daha yüksektir (Çizelge 3.9).

Çizelge 3.9. MTA Fillapex grubuna ait 24, 48 ve 72 saatlik değerlendirmede kontrol grubuna göre canlı hücre oranları karşılaştırması (Friedman Testi).

Zaman	24. Saat	48. Saat	72. Saat	P
24. Saat	-		*	0,039*
48. Saat		-	*	
72. Saat	*	*	-	

*: $p<0,05$

Real Seal kök kanal dolgu patı sonuçları için; uygulanan Friedman testi sonucunda 24., 48., ve 72. saatlerdeki ölçümler arasında kontrol grubuna göre canlı hücre oranları bakımından anlamlı bir farklılık bulunmaktadır ($p<0,05$). Buna göre; 72. saatteki kontrol grubuna göre canlı hücre oranı 24. ve 48. saatteki kontrol grubuna göre canlı hücre oranından anlamlı derecede daha yüksek ayrıca 48. saatteki kontrol grubuna göre canlı hücre oranı 24. ve 72. saatteki kontrol grubuna göre canlı hücre oranından anlamlı derecede daha düşüktür (Çizelge 3.10).

Çizelge 3.10. Real Seal grubuna ait 24, 48 ve 72 saatlik değerlendirmede kontrol grubuna göre canlı hücre oranları karşılaştırması (Friedman Testi).

Zaman	24. Saat	48. Saat	72. Saat	P
24. Saat	-	*	*	0,018*
48. Saat	*	-	*	
72. Saat	*	*	-	

*: $p<0,05$

3.2. Antimikrobiyal Etkinlik Çalışmasına Ait Bulgular

AH Plus, Tubli Seal EWT, EndoREZ, MTA Fillapex ve Real Seal kök kanal dolgu patlarının *Enterococcus faecalis* üzerindeki antimikrobiyal etkilerini, direkt temas

testiyöntemi kullanarak incelediğimiz çalışmamızın ikinci bölümünde *Enterococcus faecalis* ile direkt teması sağlanan kök kanal dolgu maddelerinin bakteriyel büyüme üzerine etkisi spektrofotometre cihazı ile toplam 18 saatlik periyodun 1-6 ve 13-18 saatlik periyotlarında her bir periyotta 6 ölçüm olmak üzere, her bir pat için hazırlanmış 3 kuyucuktan elde edilen toplam 36 ölçüm ile değerlendirilmiştir. Kök kanal dolgu patlarının spektrofotometre ile elde edilen optik densitometre değerleri (Grup A pat varlığında, Grup B pat olmadan) kontrol grubu ile istatistiksel olarak tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanılarak karşılaştırılmıştır.

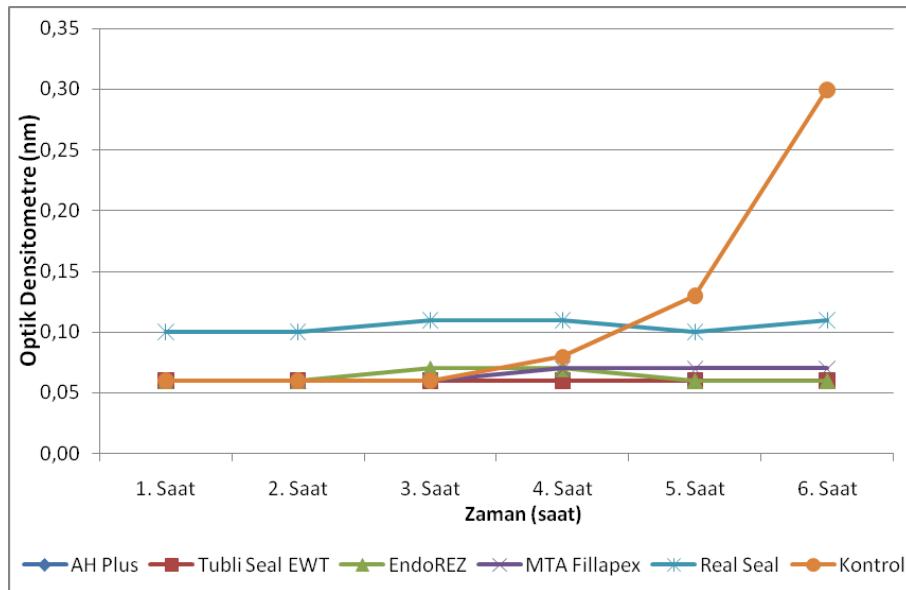
1-6 saatler arasında Grup A'ya ait optik densitometre değerleri ortalamaları Çizelge 3.11'de, grafik olarak ifadesi ise Şekil 3.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.11. Grup A; 1-6 saat arası OD ortalama değerleri (\pm SD) (ANOVA).

Patlar	OD Ortalamaları (SD)
AH Plus	0,06 \pm 0,002 (a)**
Tubli Seal EWT	0,06 \pm 0,002 (a)
EndoREZ	0,06 \pm 0,011 (a)
MTA Fillapex	0,06 \pm 0,016 (a)
Real Seal	0,10 \pm 0,020 (b)
Kontrol	0,12 \pm 0,096 (b)
P	0,000*

*p<0,05; **aynı sütunda farklı harfler taşıyan gruplar arasındaki fark anlamlıdır.

1-6 saatler arasında Grup A için; kök kanal dolgu patları ve kontrol grubu arasında anlamlı farklılık görülmektedir (p<0,05). Kontrol grubu optik densitometre değerleri ortalaması AH Plus, Tubli Seal EWT, EndoREZ, MTA Fillapex' ten anlamlı derecede daha yüksektir. Ayrıca Real Seal kök kanal dolgu patına ait optik densitometre değerleri ortalaması diğer 4 kök kanal dolgu patlarının optik densitometre değerleri ortalamasından anlamlı derecede daha yüksektir (Çizelge 3.11). Real Seal kök kanal dolgu patı hariç, bu çalışmada kullanılan kök kanal dolgu patları ilk 6 saatlik süre sonunda antimikrobiyal etkinliklerini sürdürmüşlerdir.



Şekil 3.2. Grup; A 1-6 saat arası optik densitometre değerleri.

13-18 saatler arasında Grup A'ya ait optik densitometre ortalamaları Çizelge 3.12'de, grafik olarak ifadesi ise Şekil 3.3'te gösterilmiştir.

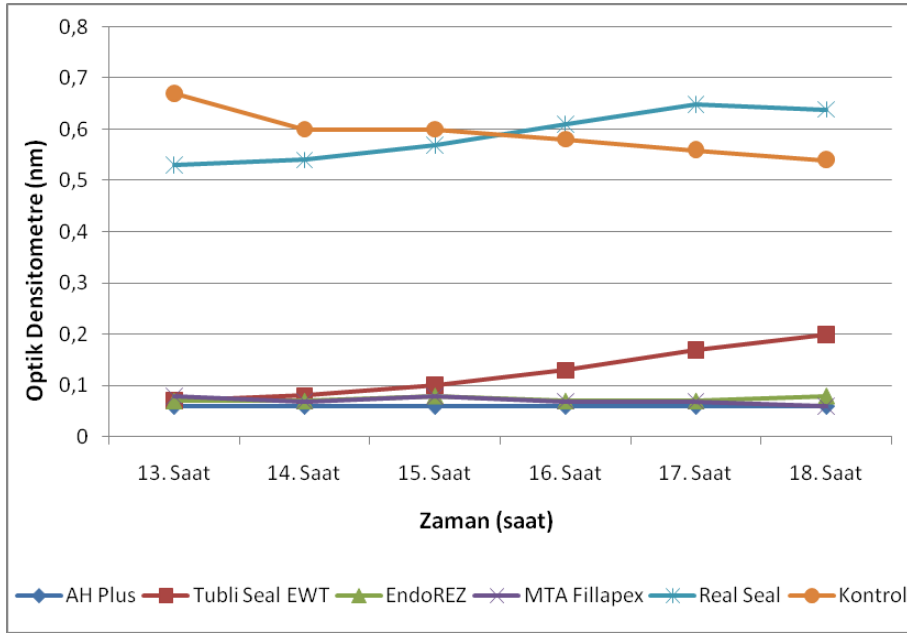
Çizelge 3.12. Grup A; 13-18 saat arası OD ortalama değerleri (\pm SD) (ANOVA).

Patlar	OD ortalamaları (SD)
AH Plus	0,06 \pm 0,002 (a)**
Tubli Seal EWT	0,13 \pm 0,153 (b)
EndoREZ	0,07 \pm 0,018 (a)
MTA Fillapex	0,07 \pm 0,021 (a)
Real Seal	0,59 \pm 0,148 (c)
Kontrol	0,59 \pm 0,042 (c)
P	0,000*

*p<0,05; **aynı sütunda farklı harfler taşıyan gruplar arasındaki fark anlamlıdır.

13-18 saatler arasında Grup A için; kök kanal dolgu patları ve kontrol grubu arasında anlamlı farklılık görülmektedir ($p<0,05$). Kontrol grubuna ait optik densitometre değerleri ortalaması AH Plus, Tubli Seal EWT, EndoREZ ve MTA Fillapex'in optik densitometre değerleri ortalamasından anlamlı derecede daha yüksektir. Real Seal kök kanal dolgu patına ait optik densitometre değerleri ortalaması diğer 4 kök kanal dolgu patlarının optik densitometre değerleri ortalamasından anlamlı derecede daha yüksektir. Tubli Seal EWT kök kanal dolgu patının optik densitometre değerleri

ortalaması AH Plus, EndoREZ ve MTA Fillapex'in optik densitometre değerleri ortalamasından anlamlı derecede daha yüksektir. AH Plus, EndoREZ, MTA Fillapex 18. saatin sonunda antimikrobiyal etkinliğini devam ettirirken, Tubli Seal EWT 14. saatin sonunda antimikrobiyal etkisini kaybetmeye başlamıştır. Real Seal kök kanal dolgu patı ise bu zaman diliminde herhangi bir antimikrobiyal etki göstermemiştir (Çizelge 3.12).



Şekil 3.3. Grup A; 13-18 saat arası optik densitometre değerleri.

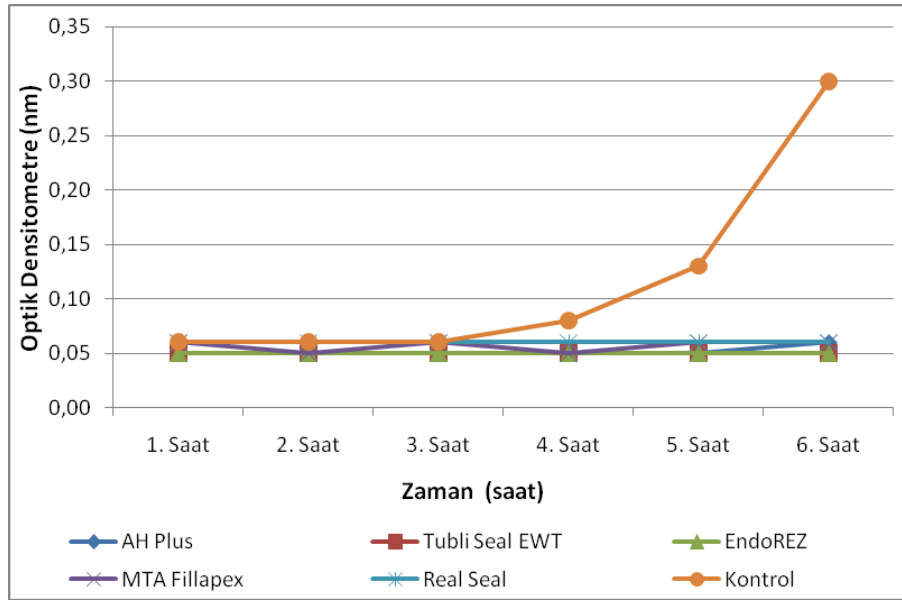
1-6 saatler arasında Grup B' ye ait optik densitometre ortalamaları Çizelge 3.13'te grafik olarak ifadesi ise Şekil 3.4'te gösterilmiştir.

Çizelge 3.13. Grup B; 1-6 saat arası OD değerleri ortalaması (\pm SD) (ANOVA).

Patlar	OD Ortalamaları (SD)
AH Plus	0,05 \pm 0,004 (a)**
Tubli Seal EWT	0,05 \pm 0,002 (a)
EndoREZ	0,05 \pm 0,001 (a)
MTA Fillapex	0,06 \pm 0,002 (a)
Real Seal	0,06 \pm 0,004 (a)
Kontrol	0,12 \pm 0,096 (b)
P	0,000*

*p<0,05; **aynı sütunda farklı harfler taşıyan gruplar arasındaki fark anlamlıdır.

1-6 saatler arası Grup B için; kök kanal dolgu patları ve kontrol grubu optik densitometre değerleri ortalamaları arasında anlamlı farklılık görülmektedir ($p<0,05$). Kontrol grubu optik densitometre değerleri ortalaması AH Plus, Tubli Seal EWT, EndoREZ, MTA Fillapex ve Real Seal'ın optik densitometre değerleri ortalamasından anlamlı derecede daha yüksektir. İlk 6 saat için çalışmamızda kullandığımız kök kanal dolgu patları antimikrobiyal etkinlik göstermişlerdir (Çizelge 3.13).



Şekil 3.4. Grup B; 1-6 saat arası optik densitometre değerleri.

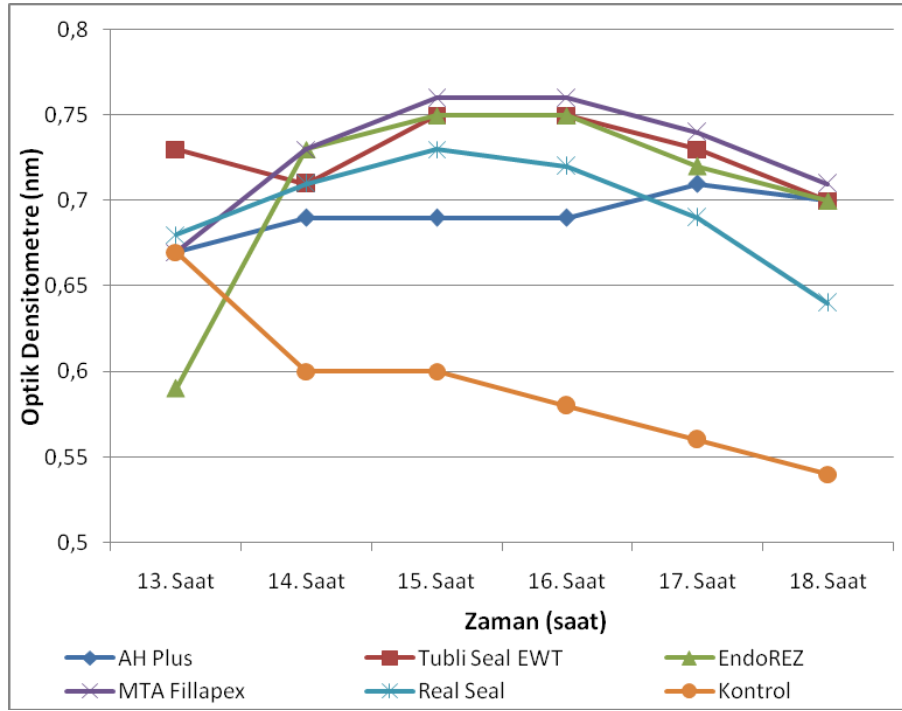
13-18 saatler arası Grup B optik densitometre değerleri ortalaması Çizelge 3.14'te, grafik olarak ifadesi ise Şekil 3.5'te gösterilmiştir.

Çizelge 3.14. Grup B; 13-18 saat arası OD değerleri ortalaması (\pm SD) (ANOVA).

Patlar	OD Ortalamaları (SD)
AH Plus	0,69 \pm 0,046 (a)**
Tubli Seal EWT	0,73 \pm 0,030 (a)
EndoREZ	0,71 \pm 0,074 (a)
MTA Fillapex	0,73 \pm 0,050 (a)
Real Seal	0,70 \pm 0,047 (a)
Kontrol	0,59 \pm 0,042 (b)
P	0,000*

* $p<0,05$; **aynı sütunda farklı harfler taşıyan gruplar arasındaki fark anlamlıdır.

13-18 saatler arası Grup B için; kök kanal dolgu patları ve kontrol grubu optik densitometre değerleri arasında anlamlı farklılık görülmektedir ($p<0,05$). Kontrol grubuna ait optik densitometre değerleri ortalaması diğer tüm kök kanal dolgu patlarının optik densitometre değerleri ortalamasından anlamlı derecede daha düşüktür. Son 6 saatlik zaman periyodunda bu çalışmada kullanılan kök kanal dolgu patları antimikrobiyal etkinliklerini kaybetmişlerdir (Çizelge 3.14).



Şekil 3.5. Grup B; 13-18 saat arası optik densitometre değerleri.

4. TARTIŞMA

Kök kanal tedavisinin amacı, çürük veya travma gibi etiyolojik nedenlerle canlılığını kaybetmiş veya irreversible pulpitis gelişen dişlerde, periapikal dokularda ideal çevre şartları yaratılarak dişin uzun yıllar boyunca ağızda fonksiyon görmesini sağlamaktır. Bu tedavilerde kök kanal aletleri ve yıkama solüsyonları kullanılarak yapılan kemomekanik preparasyon ile bakterilerin eliminasyonu, pulpa doku artıkları ve debrislerin uzaklaştırılması sağlanır. Kök kanallarının doldurulması aşamasında ise, ideal iyileşme koşulları oluşturularak, periapikal dokuların bütünlüğünü ve apikal bölgenin biyolojik olarak tıkanmasını sağlayacak özellikte kök kanal dolgu maddelerinin kullanılması amaçlanır (Grossman, 1982, s.:297).

Kök kanallarının doldurulması safhasında kullanılan kök kanal dolgu patlarının özellikleri tedavinin başarısını etkileyen önemli faktörlerden birisidir. Bu nedenle kök kanal dolgu patlarının fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellikleri çok sayıda araştırmanın konusu olmuştur.

Endodontik dolgu materyalleri doğrudan canlı dokularla ilişkide olduğundan, bu materyallere karşı oluşabilecek doku cevabı önemlidir. Toksik reaksiyona ve doku nekrozuna neden olabilecek kanal dolgu patları doku iyileşmesine engel olduğu gibi endodontik tedavinin başarısını da etkileyecektir (Mollay ve ark., 1992; Economides ve ark., 1995).

İyi bir kanal dolgu patı biyolojik olarak uyumlu olmalıdır ve periradiküler dokular tarafından iyi tolere edilmelidir (Economides ve ark., 1995).

Kök kanallarının kompleks bir anatomik yapıya sahip olması nedeni ile, kanal içerisinde bulunan mikroorganizmaların ve toksinlerinin biyomekanik preparasyonla uzaklaştırılmaları her zaman tamamen mümkün olmayabilir (Peters ve ark., 1995). Ayrıca bazı mikroorganizmaların dentin tübüllerinde ilerleme kabiliyetinde olmaları nedeniyle kanal içerisinde ulaşılamayan bölgelerde zorunlu anaerob

mikroorganizmalar canlılıklarını koruyarak patojenitelerini devam ettirmektedirler (Portenier ve ark., 2003). Bu nedenlerden dolayı, kök kanal tedavisinde kullanılan kök kanal dolgu maddelerinin antibakteriyel etkiye sahip olmaları genel olarak istenilen bir özelliktir.

Yapılan çalışmalar doğrultusunda, endodontik tedavilerde kullanılan materyallerin periapikal dokular üzerinde sitotoksik, genotoksik, karsinojenik ve mutajenik etkilerinin bulunabildiği bildirilmiştir (Huang ve ark., 2002a, Huang ve ark., 2002b; Hauman ve Love, 2003; Lin ve ark., 2004).

Bu nedenle çalışmamızda AH Plus ile nispeten daha yeni kök kanal dolgu patları olan Tubli Seal EWT, EndoREZ, MTA Fillapex ve Real Seal'in sitotoksik etkilerini ve ağız florasında sıkça rastladığımız mikroorganizma olan *Enterococcus faecalis* üzerindeki antimikrobiyal etkinlikleri değerlendirilmiştir.

Bir materyalin biyolojik karakterini belirleyen birçok parametre vardır. Bunlara örnek olarak materyalin bileşimi, çözünen bileşenleri, donma özellikleri, donmuş patın stabilitesi ve kanal dolgu patı ile komşu yumuşak ve sert dokular arasındaki yüzey temas alanı verilebilir (Barbosa ve ark., 1993; Schwarze ve ark., 2002a). Ayrıca yapılan bir çalışma antimikrobiyal bir ajanın etkinliğini ve biyoyumluluğunu belirleyen en önemli faktörlerin konsantrasyonu ve konak dokuları ile temas süresi olduğunu belirtmiştir (Komissarova ve ark., 2005). Araştırmacılar endodontik tedaviler sırasında kullanılan kanal dolgu patlarının canlı periapikal dokular ile temasta olacağını ve bu materyallerin dokulara biyoyumlu olmaması halinde periapikal bölgelerdeki hücreler üzerinde stres oluşturarak, hücrelerin yapısında, proliferasyonunda, adezyonunda, enzim sistemlerinde dejenerasyonların meydana gelmesine neden olacağını vurgulamışlardır (Schwarze ve ark., 2002a; Lin ve ark., 2004; Kumar ve ark., 2005, s.: 4-18). Schwarze ve ark.'ları (2002a, 2002b) periapikal bölgeye taşan, yeni donmaya başlamış kanal dolgu patlarından salınan bileşiklerin varolan periapikal lezyonun iyileşmesine olumsuz etkide bulunabileceklerini veya yeni bir periapikal enflamasyon oluşumunu indükleyebileceklerini belirtmişlerdir.

Biyouyumlu bir kanal dolgu patı yaralanmış dokuların tamirini stimüle etmeli ve doku tamirini engellememelidir (Granchi ve ark., 1995; Guigand ve ark., 1999; Huang ve ark., 2002a). Özellikle son yıllarda endodontik tedavilerde kullanılan kanal dolgu patlarının biyouyumluluğunu değerlendiren çalışmaların sayısı artmıştır (Guigand ve ark., 1999; Melegari ve ark., 2006; Willershausen ve ark., 2011; Bin ve ark., 2012). Çalışmalarda kanal dolgu patlarının biyouyumlulukları; hücre kültürü, hayvan çalışmaları ve klinik araştırmalarla değerlendirilmiştir.

ISO 10993 standartlarına (1998) göre bir materyalin sitotoksik ve genotoksik etkilerinin hücre kültürü düzeyinde araştırılması gerekmektedir. Ancak hücre kültürü çalışmalarında, *in vivo* şartlarda olduğu gibi diğer tip hücrelerle ilişki ve etkileşim söz konusu değildir. Bu nedenle konak cevabını tam olarak yansıtmayabilirler (MacDonald, 1998, s.: 149-180; Wigley, 1998, s.:1-26; Guigand ve ark., 1999).

Hücre kültürü çalışmaları, endodontik tedavilerde kullanılan materyallerin hücresel yanıtlarını belirleyebilmek ve biyouyumluluklarını değerlendirebilmek amacıyla kullanılan *in vitro* test yöntemleridir (Rappaport ve ark., 1964, Keresztesi ve Kellner, 1966). Birçok araştırmacı, çeşitli amaçlarla kullanılan biyomateriyallerin sitotoksik ve genotoksik etkilerini hücre kültürü çalışmaları ile değerlendirmenin hayvan çalışmalarına veya klinik çalışmalara göre bazı üstünlükleri olduğunu belirtmektedir (Geurtsen ve Leyhausen, 1997; Cartwright ve Shah, 1998, s.:57-91). Cartwright ve Shah (1998), hücre kültürü çalışmalarında sitotoksik ve genotoksik etkilerin, pek çok fiziko-kimyasal ve fizyolojik değişkenlerden uzak olarak incelenebildiğini bildirmişlerdir. Bu testler sırasında, ısı, pH, osmotik basınç, oksijen ve karbondioksit tansiyonu gibi çevre şartları da kontrol altındadır. Freshney (1990) de, hücre kültürü çalışmalarının, hayvan çalışmalarına göre daha ucuz ve tekrarlanabilir olduğunu, ayrıca hücrelerin davranışlarının kompleks organizma etkileşimleri olmadan, kontrol altındaki koşullarda inceleme fırsatı sunduğunu belirtmiştir.

Yukarıda ifade edilen nedenlerle çeşitli kök kanal dolgu patlarının sitotoksik etkilerini incelediğimiz çalışmamızda da hücre kültürü yöntemi tercih edilmiştir.

Kanal dolgu patlarının sitotoksik etkilerini hücre kültürü düzeyinde araştıran çalışmalarda farklı primer/diploid ve devamlı hücre hatları kullanılmıştır. Çalışmalarda sıklıkla kullanılan devamlı hücre hatları; L-929 fare derisi fibroblastı (Ersev ve ark., 1999; Telli ve ark., 1999; Cohen ve ark., 2000; Miletic ve ark., 2000), 3T3 fare fibroblastı (Leyhausen ve ark., 1999; Schwarze ve ark., 2002a; Schwarze ve ark., 2002b), V79 çin hamster hücreleri (Scweickl ve Schmalz, 2000; Huang ve ark., 2002a; Miletic ve ark., 2003), Vero hücreleri ve Hela servikal kanser hücreleri (Miletic ve ark., 2000)'dir.

Hücre kültürü çalışmasında kullanılmak üzere seçilen hücre tipi, toksisitesinin belirlenmesi amaçlanan materyalin kullanım sahası ile ilişkili olarak seçilmelidir (Hensten-Pettersen ve Helgeland, 1977). Schedle ve ark. (1995) ve Taira ve ark. (2000) dental materyallerin sitotoksitesilerinin belirlenmesinde hücre tipleri içerisinde en duyarlı ve güvenilir şekilde kullanılacak hücre kültürü ortamının L-929 fare fibroblastları olduğunu belirtmişlerdir. ISO 10993-5 (1999) sitotoksitesite testleri, *in vitro* yöntemler standartlarına göre; *in vitro* çalışmalarda dental materyallerin sitotoksik etkilerinin araştırılmasında standart olarak L-929 ya da Balb/3T3, WI38 gibi hücre tipi kültürlerinin kullanılmasını önermektedir.

Selden ve arkadaşları (1997) pulpadan elde edilen hücrelerin, diş hekimliğinde kullanılan materyallerin sitotoksitesite değerlendirmelerinde, fare fibroblastlarından farklı hassasiyet gösterdiğini bildirmişlerdir. Pulpadan elde edilen hücreler, kısıtlı miktarda elde edilebilmeleri, standartize edilememeleri, uzun süre işleme tabi tutulduklarında protein ekspresyon modellerinde değişiklikler göstermeleri gibi olumsuz bazı özelliklere sahiptirler (Schmalz ve ark., 2001b). Pulpadan elde edilen hücrelerin, kabul edilebilir olması için, kolay işlenmeleri, materyallere karşı gösterdikleri etkilerin, tekrar testlerde de görülebilmesi gerektiği bildirilmiştir (van Wyk ve ark., 2001). Farklı bireylere ait dişlerden elde edilen hücreler aynı tip olsa bile kültür işlemi esnasında farklı reaksiyonlar verebilirler. Moule ve Bartold (1995) pulpa fibroblast hücreleri ile yaptıkları bir çalışmada, pulpadan alınan hücrelerin alındığı kişilerin yaşı, kaynağı ve pasaj sayısı aynı olsa bile farklı reaksiyonlar verebileceklerini belirtmişlerdir.

Bu nedenle çalışmamızda L-929 fare fibroblastları tercih edilmiştir. Bu hücreler, üreme yeteneklerinin daha gelişmiş olması ve deney koşullarına daha dayanıklı olmaları nedeni ile *in vitro* sitotoksosite çalışmalarında sıkça kullanılmaktadır (Torabinejad ve ark., 1995b; Osorio ve ark., 1998; Sletten ve Dahl, 1999; Haglund ve ark., 2003; Cao ve ark., 2005).

Sitotoksosite çalışmalarında günümüze kadar pek çok *in vitro* test yöntemi kullanılmıştır. Bizim çalışmamızda hücre canlılığının ölçülmesi için bu testlerden biri olan MTT testi kullanılmıştır. MTT testi 1983 yılında Mosmann tarafından geliştirilmiştir. Bu test yöntemi, memeli hücrelerinin canlılığının ve proliferasyonunun ölçülmesi için kullanılan kolorimetrik bir test yöntemidir ve bunu canlı hücrelerin metabolik aktivitelerindeki değişimleri belirleyerek tayin eder. Aynı zamanda bu yöntem sitotoksitenin değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılan enzimatik test yöntemlerinden birisidir (Ferrari ve ark., 1990; Wataha ve ark., 1992). MTT ([3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] testi, canlı hücrelerin mitokondrilerinden salınan dehidrogenaz enziminin sarı renkteki suda çözünebilen tetrazolyum tuzunun (MTT) mor formazan (1-[4,5-dimetiltiazol-2-difenil formazan) boyasına redüksiyonuna dayanmaktadır. Oluşan formazan kristallerinin miktarı direkt olarak hücrelerdeki mitokondrial enzim aktivitesini göstermektedir. Bu yöntem, biyoyumluluk testleri içerisinde, hızlı sonuç alınması ve hassas olmasının yanı sıra materyallerin düşük düzeydeki toksisitelerinin dahi değerlendirilmesine olanak sağlaması nedeniyle en güvenilir testlerden biri olarak kabul edilmektedir (Ferrari ve ark., 1990; Wataha ve ark., 1992). MTT testi pek çok araştırmacı tarafından tercih edildiğinden elde edilen bulguların karşılaştırılabilmesi gibi bir avantaj da sağlar.

Hücre kültürü çalışmalarında farklı ekstraksiyon süreleri, materyallerin sitotoksisiteelerinin incelenmesi bakımından önemlidir (Huang ve Chang, 2002). Kök kanal dolgu patlarının dokulara direkt teması kadar bu materyallerden salınan komponentlerin de periodonsiyuma hasar verebileceği bilindiğinden bu materyallerin ekstraksiyon sıvılarının da test edilmesi gereklidir (Takahara ve ark., 1990; Geurtsen ve Leyhausen, 1997; Geurtsen ve ark., 1998). Bu nedenle çalışmamızda AH Plus,

Tubli Seal EWT, EndoREZ, MTA Fillapex, Real Seal kök kanal dolgu patlarının L-929 hücre kültüründe sitotoksitelerinin değerlendirilmesinde materyallerin 24, 48 ve 72 saatlik ekstraksiyon sıvıları incelenmiştir.

Çalışmamızdaki deney gruplarına ait ekstraksiyon sıvılarının hücre kültürleri üzerine tatbikinden sonraki MTT testi ile elde edilen optik densitometre değerlerinin, kontrol grubu optik densitometre değerlerine oranı (%) hücre canlılığı olarak ifade edilmiş ve her grubun kendi kontrol grubunun hücre canlılık oranlarının %100 olduğu kabul edilerek hesaplamalar yapılmıştır.

Mosmann (1983)'ın sınıflamasına göre, çalışmamız sonucunda elde edilen veriler değerlendirildiğinde 24, 48 ve 72 saatlik zaman dilimlerinde AH Plus kök kanal dolgu patının sitotoksik etki göstermediği gözlenmiştir. Çalışmamızda kullandığımız diğer kök kanal dolgu patları olan Tubli Seal EWT, EndoREZ, MTA Fillapex ve Real Seal ise 24 ve 48 saatlik zaman dilimlerinde orta derecede sitotoksite gösterirken, 72 saatlik zaman diliminde hafif derecede sitotoksite göstermişlerdir.

Bu çalışmadaki MTT testi sonuçları istatistiksel olarak değerlendirildiğinde; 24, 48 ve 72 saatlik sürelerde hücre canlılık oranları açısından Tubli Seal EWT, EndoREZ, MTA Fillapex, Real Seal grupları arasında anlamlı bir fark gözlenmezken AH Plus grubunun diğer deney gruplarından daha iyi sonuç verdiği tespit edilmiştir.

Çalışmamızdaki her bir kök kanal dolgu patı için 24. saatten 72. saate kadar olan zamana bağlı hücre canlılık oranındaki değişim değerlendirildiğinde; AH Plus her 3 zaman periyodunda da sitotoksik etki göstermemiştir. Tubli Seal EWT, EndoREZ, MTA Fillapex kök kanal dolgu patlarının sitotoksik etkileri ise 72. saatte önemli ölçüde azalırken, Real Seal 48. saatte en yüksek sitotoksik etkiye sahip olmuştur.

Yapılan literatür araştırmasında, AH Plus, Tubli Seal EWT, EndoREZ, MTA Fillapex ve Real Seal kök kanal dolgu patları ile ilgili sitotoksite çalışmalarında, farklı toksisite değerleri bildirilmiştir.

Leyhausen ve arkadaşları (1999), AH Plus kök kanal dolgu patının sitotoksik ve genotoksik etkilerini iki farklı hücre dizini (primer insan periodontal lışgament fibroblastı, devamlı 3T3 hücreleri) ve dört farklı yöntemle (prokaryotik umu testi, ökaryotik DNA sentezi inhibisyon testi, alkalın filtre elüsyon testi, Ames testi) değerlendirmişlerdir. AH Plus kök kanal dolgu patının genotoksik ve sitotoksik etkisi olmadığı sonucuna varmışlardır. AH Plus'ın sitotoksik etkisi değerlendirildiğinde bu çalışmada bizim kullandığımız hücre tipi ve analiz yöntemi kullanılmamasına rağmen sonuçlar çalışmamızla paralellik göstermektedir. Leyhausen ve arkadaşları AH Plus'ın sitotoksik etkiye sahip olmamasını yapısında bulunan ve sıvılarda çözünebilen sitotoksik komponentlerinin az miktarda salınmasına bağlamışlardır. Bizim çalışmamızda da patların ekstraksiyon sıvılarının kullanıldığı göz önüne alındığında AH Plus'ın sitotoksik etkisinin olmaması bu durumla açıklanabilir.

Dartar-Öztan ve arkadaşları (2003), AH Plus va Roekoseal kanal patlarının sitotoksitelerini L-929 hücreleri üzerinde 24, 48 ve 72 saat süre ile karşılaştırdıkları çalışmalarında, her iki pat arasında istatistiksel olarak fark olmadığını belirtmişlerdir. AH Plus ve RoekoSeal kök kanal dolgu patları her 3 zaman periyodunda da istatistiksel olarak anlamlı bir toksisite değeri göstermemişlerdir. Bu çalışma AH Plus'ın sitotoksisite göstermemesi yönünden bizim çalışmamızın sonuçlarını desteklemektedir.

Cohen ve arkadaşlarının (2000) agar difüzyon test yöntemini kullanarak yaptıkları çalışmada, AH Plus kök kanal dolgu patı şiddetli sitotoksik bulunmuştur. Sonuçlar arasındaki bu farklılığın deney metotlarının farklılığından kaynaklandığını düşünmekteyiz. Agar difüzyon testinde materyal agarın üzerine yerleştirilerek beklenip değerlendirme yapılırken, bizim çalışmamızda önce materyal ekstraktı elde edilmiş ve bu ekstrakt kullanılmıştır.

Camps ve About (2003)'un AH Plus, Cortisomol ve Sealapex kök kanal dolgu patlarının sitotoksitelerini L-929 fare derisi fibroblastı kullanarak, MTT analiz yöntemi ile değerlendirdikleri çalışmada AH Plus'ın sitotoksik etkisi olmadığını bildirerek çalışmamız bulgularına benzer sonuçlar elde etmişlerdir.

Azar ve arkadaşları (2000) yaptıkları çalışmada AH Plus, AH 26 ve çinko oksit öjenol içerikli bir kök kanal dolgu patını sitotoksisite yönünden insan gingival fibroblastı kullanarak değerlendirmişlerdir. Çalışma sonucunda AH 26 ve çinko oksit öjenol içerikli kök kanal dolgu patı sitotoksik bulunurken, AH Plus sadece karıştırıldıktan sonraki 4 saat sitotoksik etki göstermiş, ilerleyen zamanda bu etkisini kaybetmiştir. Bu çalışma bizim bulgularımızı desteklemektedir.

Yapılan literatür araştırmasında Tubli Seal EWT kök kanal dolgu patına ait sitotoksisite çalışmasına rastlanmamıştır. Bizim çalışmamız sonucunda Tubli Seal EWT orta ve hafif derecede sitotoksik bulunmuştur. Bu sitotoksisite kök kanal dolgu patının içeriğinde bulunan öjenolden kaynaklanmış olabilir. Çinko oksit ve öjenol karıştırıldığında şelasyon reaksiyonu meydana gelmekte ve sonuçta içerisinde çinko oksit kristalleri bulunan, çinko öjenolat matriksi oluşmaktadır (Molnar, 1967; Meryon ve ark., 1988). Yapılan hücre kültürü ve doku implant çalışmalarında, bu matriks içinde reaksiyona girmemiş veya hidroliz ile sertleşebilen öjenolün toksik etkilere yol açabileceği bildirilmiştir (Matsumoto ve ark., 1989; Araki ve ark., 1993; Economides ve ark., 1995; Mittal ve ark., 1995).

Eldeniz ve arkadaşları (2007) yaptıkları bir çalışmada insan gingival fibroblastları ve L-929 fare fibroblast hücrelerini kullanarak beş yeni kök kanal patını (RC Sealer, Epiphany, EndoREZ, GuttaFlow ve Acroseal) rutin olarak kliniklerde kullanılan üç pat ile (AH Plus, Roekoseal, Apexit) karşılaştırarak *ex vivo* olarak sitotoksik etkilerini değerlendirmişlerdir. Çalışmanın sonucunda rezin-bazlı (Epiphany, EndoREZ) kök kanal dolgu patları ve kalsiyum hidroksit-bazlı (Apexit, Acroseal) kök kanal dolgu patları diğer patlardan anlamlı olarak daha sitotoksik bulunmuştur. Bu çalışma Real Seal kök kanal dolgu patı ile aynı içeriğe sahip Epiphany ve bir diğer rezin içerikli kök kanal dolgu patı olan EndoREZ' in AH Plus kök kanal dolgu patından daha fazla sitotoksik etki göstermesi yönüyle bizim çalışmamızla paralellik göstermektedir.

Al-Hiyasat ve arkadaşlarının (2010) çeşitli kök kanal dolgu patlarının sitotoksisitelerini değerlendirdikleri çalışmada materyallerden elde ettikleri

elüsyonları Balb C 3T3 fibroblastları üzerinde 48 saat bekletip MTT analiz yöntemi ile değerlendirmişlerdir. AH Plus'ı en biyouyumlu materyal olarak, EndoREZ'i ise orta derecede sitotoksik olarak bildirmişlerdir. Bu çalışmanın sonuçları bizim çalışmamızı desteklemektedir.

Ames ve arkadaşlarının (2009) çeşitli kök kanal dolgu materyallerinin sitotoksitelerini MTT analiz yöntemi ile rat osteosarkom hücreleri üzerinde, 5 hafta boyunca değerlendirdikleri çalışmada bizim çalışmamızda orta derecede sitotoksik bulunan EndoREZ ve Real Seal kök kanal dolgu patları, yerleştirildikten hemen sonra şiddetli sitotoksik bulunmuştur. Bu farklılığın sitotoksikite değerlendirme yöntemindeki ve kullanılan hücre tipinin farklılığından kaynaklandığını düşünmekteyiz. Biz kök kanal dolgu patlarının ekstraksiyon sıvısını kullanırken Ames ve arkadaşları (2009) patların hücrelerle direkt temasını sağlayarak hücre canlılığını değerlendirmişlerdir.

Lodiene ve arkadaşları (2008) AH Plus, EndoREZ, RoekoSeal ve Epiphany patlarının toksisitelerini Milipor Filtre Difüzyon testi ve MTT analiz testini kullanarak karşılaştırmışlardır. Filtre difüzyon testi sonuçlarına göre AH Plus ilk karıştırıldığında sitotoksik bulunmuş fakat 24 saat sonra çalışmamızda da olduğu gibi toksik olmadığı gözlenmiştir. EndoREZ, ışınlamadan hemen sonra ve 24 saat sonra test edildiğinde her iki durumda da sitotoksikite göstermemiştir. RoekoSeal da ilk karıştırıldığında ve 24 saat sonra toksik bulunmamıştır. Epiphany ilk karıştırıldığında şiddetli sitotoksik, ışılandıktan hemen sonra ve 24 saat sonra orta derecede sitotoksik bulunmuştur. MTT testinde 24 saat sonra AH Plus ve RoekoSeal hafif sitotoksik olarak değerlendirilmiştir. EndoREZ sitotoksik olarak değerlendirilmezken Epiphany şiddetli sitotoksik bulunmuştur. Bu çalışma AH Plus kök kanal dolgu patının sitotoksik cevabı yönünden bizim çalışmamızı desteklemektedir. EndoREZ kök kanal dolgu patının sonuçları değerlendirildiğinde bu çalışma ile bizim çalışmamızın bulguları arasındaki bu farklılığın EndoREZ kök kanal dolgu patının hazırlanması aşamasından kaynaklandığını düşünmekteyiz. Bizim çalışmamızda kök kanal dolgu patını sertleştirmek için ışık kullanılmamıştır. Bundan dolayı çözünen bileşiklerin toksisiteye neden olabileceğini düşünmekteyiz. Real Seal kök kanal

dolgu patı ile aynı içeriğe sahip Epiphany kök kanal dolgu patının sitotoksosite sonuçları da bizim çalışmamız bulguları ile paraleldir.

Karapınar-Kazandağ ve arkadaşlarının (2011) yaptıkları çalışmada AH Plus, RoekoSeal, EndoREZ, Epiphany ve Activ GP kök kanal dolgu patlarının sitotoksitesi, L-929 fare derisi fibroblastı ve insan dental pulpa hücreleri üzerinde MTS analiz yöntemi kullanılarak 24 ve 72 saatlik dilimde değerlendirilmiştir. AH Plus sitotoksik bulunmaması yönüyle bizim çalışmamızı desteklemektedir. EndoREZ kök kanal dolgu patı ise bizim çalışmamızdan farklı olarak sitotoksik etki göstermemiştir. Bu farklılığın deney koşulları, materyallerin hücrelerle temas şekli, ekstraksiyon sıvılarının elde ediliş yönteminin farklılığından kaynaklandığını düşünmekteyiz. Real Seal ile aynı içeriğe sahip Epiphany sitotoksik bulunması yönüyle bizim çalışmamızı desteklemektedir.

Bouillaguet ve arkadaşları (2004) farklı kök kanal dolgu patlarının sitotoksiteleri ve örtücülük özelliklerini inceledikleri çalışmada, sitotoksite çalışması için 24, 48 saat ve 1 haftalık zaman periyotlarında MTT testi ile değerlendirme yapmışlardır. Çalışma sonucunda EndoREZ kök kanal dolgu patının Balb/c 3T3 fare fibroblastı üzerinde sitotoksik etkisi olduğu belirtilmiştir. Kullanılan hücre tipinin farklı olmasına rağmen bulgular bizim bulgularımızla paraleldir.

Scarparo ve arkadaşları (2009) kanal dolgu patlarını ratların derialtı bağ dokusu içine yerleştirerek 7, 30 ve 60 günlük zamanlarda patların sitotoksik etkilerini incelemişlerdir. EndoREZ ve Endofill'in AH Plus'tan daha güçlü enflamatuar cevap oluşturduğunu ve AH Plus'ın oluşturduğu enflamatuar cevap zamanla azalırken EndoREZ ve Endofill'in sitotoksik etkilerini devam ettirdiklerini bildirmişlerdir. Bu çalışmada kök kanal patlarının sitotoksik etkilerinin değerlendirme yöntemi ve sürelerinin farklı olmasına rağmen bulgular bizim çalışmamızla benzerdir.

Gençoğlu ve arkadaşlarının (2010) albino Wistar ratlar üzerinde yaptığı *in vivo* çalışmada Guttaflow, EndoREZ ve Pulp Canal Sealer kök kanal dolgu patlarının sitotoksik etkilerini 24 saat, 7 ve 10 gün sonra değerlendirmişlerdir. Çalışma

sonucunda bizim çalışmamız bulgularından farklı olarak EndoREZ ve Guttaflow'un biyouyumlu olduğu bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda 24 saat sonunda orta derecede sitotoksik bulunan EndoREZ'in bu çalışmada biyouyumlu bulunmasının sebebinin bizim çalışmamızda *in vitro* değerlendirme yapılırken, Gençoğlu ve arkadaşlarının çalışmalarını konakçının savunma mekanizmalarının devrede olduğu *in vivo* şartlarda gerçekleştirmelerinden kaynaklandığını düşünmekteyiz.

EndoREZ kök kanal dolgu patının yapısında bulunan üretan dimetakrilat (UDMA), bu patın sitotoksik etkisinden sorumlu tutulabilir. UDMA'nın toksik bir ajan olduğu daha önceki çalışmalarda da öne sürülmüştür (Mohsen ve ark., 1998; Hikage ve ark., 1999; Chang ve ark., 2010). UDMA'nın düşük konsantrasyonda ve çok kısa zaman periyotlarında bile sitotoksik tahribatların başlamasından önce görülen bir reaksiyon olan intraselüler glutasyon seviyesinde azalmaya neden olarak hücrede hasara yol açabileceği öne sürülmüştür (Volk ve ark., 2006).

Scelza ve arkadaşları (2012) yaptıkları çalışmada Sealapex, Root Canal Sealer EWT, Real Seal ve MTA Fillapex kök kanal dolgu patlarının sitotoksik etkilerini insan osteoblastları üzerinde XTT analizi, nötral kırmızı ve kristal viyole boya testlerini kullanarak değerlendirmişlerdir. 24 saat sonunda bütün patların şiddetli sitotoksik etkileri olduğu belirtilmiştir. Bizim çalışmamızda ise 24 saat sonunda Real Seal ve MTA Fillapex kök kanal dolgu patları orta derecede sitotoksik etki göstermiştir. Bu farklılığın sitotoksisiteyi değerlendirme yöntemlerinin ve kullanılan hücre tipinin farklılığından kaynaklandığını düşünmekteyiz.

Gomes-Filho ve arkadaşları (2011) MTA Fillapex kök kanal dolgu patının sitotoksik etkilerini, Wistar ratlarda subkutan doku reaksiyonları olarak 7, 15, 30, 60 ve 90 günlük periyotlarda *in vivo* olarak incelemişlerdir. Çalışma sonucunda bizim çalışmamızda farklı zamanlarda değişik derecelerde sitotoksik etki gösteren MTA Fillapex'in biyouyumlu olduğunu ve mineralizasyonu stimüle ettiğini bildirmişlerdir. Bu farklılığın çalışmalardaki yöntem ve zaman farklılığından kaynaklandığını düşünmekteyiz.

MTA Fillapex, MTA'nın biyolojik özelliklerinden yararlanmak için, zayıf fiziksel özelliklerinin geliştirilerek (Ber ve ark., 2007, Parirokh ve Torabinejad, 2010) kök kanal dolgu patı olarak kullanılması amacıyla piyasaya sürülmüştür. İçeriğinde MTA, salisilat rezin, nötral rezin, bizmut ve silika vardır. MTA Fillapex'in fizikokimyasal ve biyolojik özellikleri hakkında çok az literatür bilgisi vardır. Bizim yaptığımız çalışmada MTA Fillapex ortadan hafife doğru değişen derecelerde sitotoksik bulunmuştur. Bu sitotoksik etkinin sebebinin içeriğinde bulunan rezin komponentlerden kaynaklandığını düşünmekteyiz.

Xu ve arkadaşları (2010) AH Plus ve Real Seal kök kanal dolgu patlarının, insan osteoblast benzeri MG63 hücreleri üzerindeki sitotoksitesilerini 72 saatlik zaman periyodunda, MTT analizi ile inceledikleri çalışmada Real Seal kök kanal dolgu patını AH Plus'tan daha sitotoksik bulmuşlardır. Bu sonuçlar bizim çalışmamızla paralellik göstermektedir.

Susini ve arkadaşları (2006) yaptıkları bir çalışmada kök modeli ile Epiphany ve Resilon'un sitotoksitesisini değerlendirmişlerdir. MTT testi kullanılarak L-929 fare fibroblast hücreleri üzerinde yapılan deneyde Resilon ve Epiphany, Sealite ve gutta-perka, RoekoSeal ve gutta-perka kombinasyonlarının sitotoksitesileri değerlendirilmiştir. 1. ve 2. günlerde Epiphany-Resilon en sitotoksik materyaller olarak bulunmuştur. Epiphany'den ayrı olarak Resilon ISO 10993-5 standartları doğrultusunda test edildiğinde sitotoksik bulunmamıştır. Bu çalışmanın sonuçları Real Seal kök kanal dolgu patı ile aynı içeriğe sahip Epiphany kök kanal dolgu patınının 1. ve 2. günlerde sitotoksitesite göstermesi yönünden bizim çalışmamızı desteklemektedir.

Real Seal kök kanal dolgu patı UDMA, PEGDMA, Bis-GMA ve benzeri rezin içermektedir. Real Seal'ın %60'ı rezin komponentlerden oluşmaktadır (Xu ve ark., 2010). Real Seal kök kanal dolgu patınının sitotoksitesitesi yüksek rezin içeriğine ve patın tamamen polimerize olmamasına bağlanabilir (Bouillaguet ve ark., 2006). Real Seal genellikle anaerobik ortamda 30 dakikada sertleşirken, ortamda hava varlığında kök kanal dolgu patınının yüzeyi bir hafta sonra sertleşmektedir (Nielsen ve ark.,

2006). Çünkü oksijen rezinlerin polimerizasyonunu inhibe etmektedir (Rueggeberg ve Margeson, 1990). Bizim çalışmamızda, kök kanal patı işlem görmeden önce 24 saat 37°C’de saklanmış fakat hava ile tamamen teması kesilmemiştir. Bu yüzden kök kanal dolgu patının yüzeyi tamamen sertleşmeyip, polimerize olmamış toksisiteye neden olabilecek asidik monomerler açığa çıkmış olabilir.

Polimerizasyon reaksiyonu sonucu sertleşen kök kanal dolgu patları, kök kanalı içine taze karıştırılmış olarak yerleştirilmektedir ve bu patların birçoğu doku hasarına neden olmaktadır. Polimerizasyon işlemi ilerledikçe, toksik serbest radikaller, reaksiyona uğramamış metakrilatlar ve askıda kalan metakrilatlar azalmaktadır (Santerre ve ark., 2001). Bu durum materyallerin sitotoksik etkisinin zamanla azalmasının sebebi olabilir (Brackett ve ark., 2008; Brackett ve ark., 2010; Brackett ve ark., 2012). Çalışmamızda kullandığımız kök kanal dolgu patlarının 72. saatte sitotoksik etkilerinin azalmış olması da bu duruma bağlanabilir.

Çalışmamızın ikinci bölümünde ise AH Plus, Tubli Seal EWT, EndoREZ, MTA Fillapex ve Real Seal kök kanal dolgu patlarının antimikrobiyal etkinlikleri karşılaştırılmıştır.

Diş hekimliğinde kullanılan materyallerin antibakteriyel etkinliklerinin değerlendirilmesinde ADT (agar düfüzyon testi), DCT (direkt temas testi) ve *in vitro* enfekte dentin yöntemi gibi çeşitli yöntemler kullanılmaktadır (Helting ve Chandler, 1996; Weiss ve ark., 1996; Fuss ve ark., 1997; Fuss ve ark., 2000; Sukuwat ve Srisuwan, 2002; Çobankara ve ark., 2004).

Kök kanal dolgu patlarının antibakteriyel özelliklerini değerlendirmede en yaygın olarak kullanılan yöntem ADT yöntemidir. Ancak bu yöntemin bazı dezavantajları vardır. En büyük dezavantajı bakteriyostatik etki ile bakterisidal etkiyi ayırt edememesidir. Yarı nicel olup, çözünebilir komponentlerin aktivitesinin değerlendirilebilmesi için uygundur, fakat sınırlıdır. ADT agar viskozitesinde, ortam içeriğinde, test edilecek materyallerin yoğunluğunda, agar plağı başına düşen örneklerin sayısı ve hacminde, plaktaki örneklerin yerleştirilmesinde ve

düzenlenmesinde, örnekler ile agar arasındaki uygun kontakt sağlanmasında, inkübasyon zamanı ve ısıda dikkatli bir standardizasyon gerektirmektedir (Tobias, 1988; Tobias ve ark., 1988). ADT'nin bu dezavantajlarından dolayı Weiss ve arkadaşları (1996) DCT yöntemini tanımlamışlardır. DCT'de test mikroorganizması ile test materyalinin direkt ve tam teması sağlanarak mikroorganizmanın yaşamını sürdürüp sürdürmediği tespit edilir. Çalışmamızda da direkt temas testi yöntemi tercih edilmiştir.

Çalışmamızda test mikroorganizması olarak Gram (+) fakültatif anaerob *Enterococcus faecalis*'i kullanmayı tercih ettik. Aerobik ve fakültatif mikroorganizmalar genellikle primer enfeksiyonlara nazaran uzun süreli tedaviler, flare-up ve başarısız tedavilerin olduğu vakalarda daha sık izole edilirler (Matusow, 1995; Siren ve ark., 1997). Normalde oral floranın bir parçasını oluşturan *Enterococcus faecalis* yapılan çalışmalara göre kök kanal tedavilerinde başarısızlığa en çok neden olan bakteri türü olarak saptanmıştır (Sundqvist ve ark., 1998; Love, 2001; Siqueira, 2001; Figdor ve ark., 2003). Tek bir mikroorganizma olarak da hayatını devam ettirebilmektedir ve dirençli periapikal patolojilere sebep olabilmektedir (Sundqvist ve ark., 1998; Siqueira, 2001). Bu bakterilerin düşük beslenme şartlarına sahip ortamlarda canlılıklarını koruyabildikleri ve kök kanal tedavisi esnasında standart kemomekanik işlemler sonrasında dahi çoğalabildikleri bildirilmiştir (Siqueira ve ark., 2002). Evans ve arkadaşları (2002) da *Enterococcus faecalis*'in Ca(OH)₂'e karşı kritik pH değeri olan 11,1 ile 11,5'e kadar dirençli olduğunu bildirmişlerdir. *Enterococcus faecalis* dentin tubüllerinde ilerleyebilme yeteneğine sahiptir (Portenier ve ark., 2003). Tüm bunlara ek olarak kolay kültür ve çalışma şartlarına da sahip olmasından dolayı antimikrobiyal etkinlik çalışmalarında sıkça tercih edilen bir bakteridir (Chong ve ark., 1994; Estrela ve ark., 2000; Siqueira ve ark., 2002; Stowe ve ark., 2004).

Fuss ve arkadaşları (2000) yaptıkları bir çalışmada karıştırma oranlarına göre endodontik patların antibakteriyel ve fiziksel özelliklerinin değiştiğini ileri sürmüşlerdir. Bu sebeple çalışmamızda kullanılan kök kanal dolgu patlarının hazırlanması üretici firma önerilerine uygun olarak yapılmıştır.

Çalışmamızda pat varlığında (Grup A) ilk 6 saatlik sürede; AH Plus, Tubli Seal EWT, EndoREZ, MTA Fillapex antimikrobiyal etkinlik gösterirken, Real Seal kök kanal dolgu patı herhangi bir antimikrobiyal etkinlik göstermemiştir. Son 6 saatlik sürede ise AH Plus, EndoREZ ve MTA Fillapex antimikrobiyal etkinliklerini sürdürürken, Tubli Seal EWT 14. saatten itibaren antimikrobiyal etkinliğini kaybetmeye başlamıştır. Real Seal kök kanal dolgu patı bu sürede de herhangi bir antimikrobiyal etki göstermemiştir. Pat olmadığında (Grup B); ilk 6 saatlik sürede tüm kök kanal dolgu patları antimikrobiyal etki gösterirken, 13-18 saatlik dilimde antimikrobiyal etkinliklerini kaybetmişlerdir.

Saleh ve arkadaşları (2004) AH Plus ve Grossman patı ile yapılan kanal dolgusunun *in vitro* şartlarda yaklaşık 300 µm'lik alanda *Enterococcus faecalis* ile enfekte edilen dentin tübülleri içindeki bakterileri elimine ettiğini göstermişlerdir. Bu çalışma AH Plus'ın *Enterococcus faecalis* üzerinde antimikrobiyal etkisinin olması yönüyle bizim çalışmamızı desteklemektedir.

Slutzky-Goldberg ve arkadaşları (2008) çalışmalarında direkt temas testini kullanarak AH Plus, Apexit Plus, Epiphany ve Roekoseal'in *Enterococcus faecalis* üzerine antimikrobiyal etkinliklerini taze karıştırılmış ve 1, 2, 7 ve 14 günlük zaman periyotlarında değerlendirmişlerdir. Epiphany'de 7 gün bakteri artışı gözlenmiştir. AH Plus ve RoekoSeal'in antimikrobiyal etkisi olmadığı sonucuna varılmıştır. Bu çalışmanın sonuçları AH Plus kök kanal dolgu patı göz önüne alındığında bizim çalışmamız bulguları ile örtüşmemektedir. Bu farklılığın kök kanal dolgu patlarının donması için beklenen sürenin farklı olmasından kaynaklanabileceğini düşünmekteyiz. Fakat Real Seal ile aynı içeriğe sahip Epiphany açısından değerlendirildiğinde sonuçlar bizim çalışmamızla paralellik göstermektedir.

Nawal ve arkadaşları (2011) Guttaflow, Epiphany ve AH Plus kök kanal dolgu patlarının antimikrobiyal etkinliklerini ve akıcılık özelliklerini araştırdıkları çalışmalarında antimikrobiyal etkinlik değerlendirmesi için agar difüzyon testi ile direkt temas testi ve mikroorganizma olarak ise *Enterococcus faecalis*'i kullanmışlardır. Araştırmacılar 1 ve 24 saatlik zaman aralıklarında antimikrobiyal

etkinliği değerlendirmişlerdir. Çalışma sunucunda her iki test metodunda ve her iki zaman diliminde de Epiphany ve AH Plus'ın antimikrobiyal etki gösterdiği sonucuna varmışlardır. Bu alışma sonucunda elde edilen AH Plus kök kanal patına ait bulgular bizim çalışmamızla paralellik gösterirken Real Seal kök kanal dolgu patı ile aynı içeriğe sahip Epiphany göz önüne alındığında bizim çalışmamızla örtüşmemektedir. Bu farklılığın bizim çalışmamızda 1 saat süre ile sağlanan mikroorganizma ve kök kanal dolgu patı direkt temasının, bu çalışmada 24 saat boyunca sağlanmasından kaynaklandığını düşünmekteyiz.

Siqueira ve arkadaşlarının (2000) eşitli kök kanal dolgu patlarının agar difüzyon testini kullanarak 5 günlük zaman periyodunda antimikrobiyal etkilerini ve bu kök kanal dolgu patlarının akıcılık oranlarını değerlendirdikleri çalışmalarında AH Plus'ın *Enterococcus faecalis* üzerinde etkili olduğu sonucuna varmışlardır. Bu çalışmanın bulguları yöntem ve zaman farklılığına rağmen bizim sonuçlarımızla paraleldir.

Gomes ve arkadaşları (2004) eşitli kök kanal dolgu patlarının antimikrobiyal etkinliklerini 24 saat, 48 saat ve 7 günlük sürelerde, farklı mikroorganizmalar kullanarak agar difüzyon ve direkt temas testiile incelemişlerdir. Çalışma sonucunda tüm zaman periyotlarında AH Plus'ın *Enterococcus faecalis* üzerinde antimikrobiyal etkisi olduğunu belirterek bizim çalışmamız bulgularına benzer sonuçlar bildirmişlerdir.

zcan ve arkadaşları (2011) yaptıkları *ex vivo* bir çalışmada *Enterococcus faecalis* ile enfekte edilmiş dentin bloklarını kullanarak, Guttaflow ve AH Plus kök kanal dolgu patlarının farklı kök kanal dolgu teknikleri kullanılarak, bakteri öldürme potansiyellerini değerlendirmişlerdir. Çalışma sonucunda AH Plus'ın, Guttaflow kök kanal dolgu patından daha etkili bir şekilde *Enterococcus faecalis*'in ölümüne neden olduğu, dolgu tekniklerinin ise kök kanal dolgu patlarının antimikrobiyal etkinliğinde çok az rolü olduğunu bildirmişlerdir.

Eldeniz ve arkadaşlarının (2006) çeşitli kök kanal dolgu patlarının antimikrobiyal etkisini 3 farklı mikroorganizma üzerinde agar difüzyon (24, 48 saat ve 7, 10 gün) ve direkt temas testi (16 saat) kullanarak değerlendirdikleri çalışmalarında, EndoREZ'in agar difüzyon testi sonucunda herhangi bir antimikrobiyal etki göstermediği belirtilmişlerdir. Direkt temas testiyle değerlendirdiklerinde taze karıştırılmış ve 24 saat beklemiş örnekler *P. aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* ve *S. aureus* üzerinde antimikrobiyal etki göstermiştir. Bu çalışma taze karıştırılmış EndoREZ kök kanal dolgu patınının *Enterococcus faecalis*'in çoğalmasını inhibe etmesi yönüyle bizim çalışmamızı desteklemektedir.

Kont Çobankara ve arkadaşları (2004) ADT (24 saat, 7 gün) ve DCT (19 saat) yöntemini kullanarak *Enterococcus faecalis* üzerindeki farklı kök kanal dolgu patlarının antimikrobiyal etkinliğini incelemişlerdir. ADT sonuçlarına göre RoekoSeal kök kanal dolgu patınının antimikrobiyal etkinliği olmadığını, AH Plus, Sealapex ve Sultan kök kanal dolgu patlarının aynı antimikrobiyal etkiyi gösterdikleri, Ketac-Endo'nun ise en zayıf antimikrobiyal etkiyi gösterdiği sonucuna varmışlardır. DCT sonuçlarına göre ise Ketac-Endo, Sultan ve AH Plus'ın Sealapex ve RoekoSeal'dan daha fazla ancak birbirleriyle benzer antimikrobiyal etkiye sahip olduklarını ileri sürmüşlerdir. Bu çalışma AH Plus kök kanal dolgu patınının her iki antimikrobiyal etkinlik değerlendirme yönteminde de *Enterococcus faecalis* üzerinde antimikrobiyal etki göstermesi yönüyle bizim sonuçlarımızla paralellik göstermektedir.

Kayaoğlu ve arkadaşları (2005) filtre kağıdı kullanarak yaptıkları diskleri *Enterococcus faecalis* süspansiyonu içine daldırılmış ve taze karıştırılmış farklı kök kanal dolgu patlarının üzerine arada filtre membran olduğunda ve filtre membran olmadan yerleştirmişlerdir. Mikroorganizmaların çoğalması için 24 saat bekledikten sonra bakteri ölçümü yapmışlardır. AH Plus membran varlığında da, yokluğunda da *Enterococcus faecalis* üzerinde antimikrobiyal etki göstermiştir. Bu çalışma AH Plus'ın *Enterococcus faecalis* üzerinde antimikrobiyal etkinliğinin olduğunu göstermesi yönüyle bizim çalışmamızla paralellik göstermektedir.

Pizzo ve arkadaşları (2006) direkt temas testi yöntemi 7 saatlik zaman periyodunda kullanarak yaptıkları çalışmada AH Plus, Endomethasone, Pulp Canal Sealer, Vcanalare kök kanal dolgu patlarının antimikrobiyal etkinliğini *Enterococcus faecalis* üzerinde değerlendirmişlerdir. Çalışma sonunda taze karıştırılmış tüm kök kanal dolgu patlarının bakteriyel büyümeyi inhibe ettiği sonucuna varmışlardır. AH Plus kök kanal dolgu patına ait bulgular, çalışmamız bulguları ile örtüşmektedir.

Mickel ve arkadaşları (2003) agar difüzyon test yöntemi kullandıkları çalışmalarında AH Plus'ın *Enterococcus faecalis* üzerinde antimikrobiyal etkinliği olmadığını bildirerek bizim çalışmamız bulgularından farklı sonuçlar rapor etmişlerdir. Daha önce yapılan çalışmalar aynı materyal, mikroorganizma ve süre kullanılsa bile ADT ve DCT'inden elde edilen verilerin arasında farklılık olabileceğini göstermiştir (Shalhav ve ark., 1997; Kont Çobankara ve ark., 2004). Sonuçlarımız arasındaki bu farklılığa kullanılan yöntemler arasındaki farklılığın neden olduğunu düşünmekteyiz.

Epoksi rezin bazlı kök kanal dolgu patı olan AH Plus'ın antimikrobiyal etkinliği, daha önceden mutajenik bir komponent olduğu ileri sürülen (Heil ve ark., 1996) bisfenol-A diglisidil etere veya polimerizasyonu esnasında salınan düşük miktardaki formaldehite bağlanabilir (Leonardo ve ark., 1999). Ayrıca, polimerize olmamış içeriğinde bulunan epoksi rezinin toksik olduğu ileri sürülmüştür (Schweickl ve ark., 1995; Schweickl ve Schmalz, 2000). Bir başka çalışmada hem Pat A (epoksi rezin içerikli), hem Pat B (amin içerikli) ve hem de karıştırılmış hallerinin hücre canlılığını azalttığı bildirilmiştir (Schweickl ve Schmalz, 2000). Bu durumun antimikrobiyal etkinliğini arttırdığı düşünülebilir.

Literatür araştırmasında Tubli Seal EWT kök kanal dolgu patı ile ilgili antimikrobiyal etkinliğine bakıldığı herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu kök kanal dolgu patının antimikrobiyal etkisinin içeriğinde bulunan öjenolden kaynaklandığını düşünmekteyiz. Tubli Seal EWT gibi çinko oksit öjenol-bazlı patların benzer çalışmalar sonucunda 7 günü aşan güçlü antimikrobiyal etkileri olduğu bildirilmiştir (Gomes ve ark., 2004; Bodrumlu ve Semiz, 2006; Aal-Saraj ve ark., 2012). Savioli ve arkadaşları (2006) daimi dişler için kullanılan çinko oksit

öjenol-bazlı bir kök kanal dolgu patının (Grossman'ın patı) ve komponentlerinin antimikrobiyal etkisini değişik mikroorganizmalar üzerinde araştırmışlar ve öjenol bileşeninin *K. rhizophila*, *E. faecalis*, *S. mutans*, *E. coli* ve *S. aureus* üzerinde antimikrobiyal etkisi olduğunu bulmuşlardır.

Sipert ve arkadaşları (2005) yaptıkları çalışmada çeşitli kök kanal dolgu patları ve retrograd dolgu materyallerinin Müller-Hinton agar test yöntemini kullanarak, içlerinde *Enterococcus faecalis*'in de bulunduğu farklı mikroorganizmalar üzerindeki antimikrobiyal etkisini 24 saat sonra değerlendirmişlerdir. Çalışma sonucunda EndoREZ kök kanal dolgu patının herhangi bir mikroorganizma üzerine antimikrobiyal etkisi bulunmamıştır. Bu sonuç bizim bulgularımızla çelişmektedir. Buna neden olarak, çalışmalarda kullanılan yöntem farklılığını söyleyebiliriz. ADT sonucunda EndoREZ'in antimikrobiyal etkisinin gözlenmemesi, EndoREZ'in çözünemeyen ve agar ortamına diffüz olma yeteneği olmayan bileşenlerinden kaynaklanabilir (Eldeniz ve ark., 2006).

Zhang ve arkadaşlarının (2009) yaptığı bir çalışmada farklı 7 kök kanal dolgu materyalinin antimikrobiyal etkinlikleri karşılaştırılmıştır. Karşılaştırma yapılırken modifiye direkt temas testive mikroorganizma olarak *Enterococcus faecalis* kullanılmıştır. Değerlendirmeyi taze karıştırılmış kanal dolgu patları için 2, 5, 20, 60 dakika, donmuş kanal patları için 1, 3 ve 7 gün sonra yapmışlardır. Çalışmaları sonucunda antimikrobiyal etkinliği olan kök kanal dolgu patlarının bakteri ölümüne neden olabilmeleri için minimum 20 dakikaya ihtiyaçları olduğu ve taze karıştırılmış AH Plus ve EndoREZ'in *Enterococcus faecalis* üzerinde antimikrobiyal etkinliği olduğu, Epiphany'nin ise antimikrobiyal etkinliği olmadığı sonucuna varmışlardır. Bu sonuçlar bizim çalışmamızı desteklemektedir.

EndoREZ karıştırıldıktan 7 gün sonra bile nemli ve yapışkan bir yüzeye sahiptir. Bu durum kök kanal dolgu patının hala tam olarak donmadığını göstermektedir. Yavaş donması, reaksiyona girmemiş monomerlerin ayrılması ve düşük pH'sının EndoREZ'in gösterdiği antimikrobiyal etkinliğinde önemli rol oynadığı düşünülmektedir(Zhang ve ark., 2009).

Morgantel ve arkadaşlarının (2011) MTA-bazlı kök kanal patlarının antimikrobiyal etkisini inceledikleri çalışmalarında agar difüzyon testi (48 saat sonunda) ve direkt temas testi (1, 6, 15 ve 60. dakikalarda ölçüm alınarak) kullanılmıştır. Mikroorganizma olarak ise *Enterococcus faecalis* seçilmiştir. Taze karıştırılmış patları değerlendirdikleri agar difüzyon testi sonucunda MTA Fillapex kök kanal dolgu patının *Enterococcus faecalis* üzerinde antimikrobiyal etkinliği olduğunu bildirmişlerdir. Donmuş patların değerlendirildiği direkt temas testi yönteminde ise aralarında MTA Fillapex'in de bulunduğu patların herhangi birinin antimikrobiyal etki göstermediğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar kullanılan yöntemlerin farklı olmasına rağmen bizim çalışmamız bulguları ile benzer bulgular elde etmişlerdir. Direkt temas testi sonucu ise bizim çalışmamız bulguları ile çelişmektedir. Bu farklılığın sebebi ise, bizim çalışmamızda taze karıştırılmış kök kanal dolgu patlarını değerlendirirken, Morgantel ve arkadaşlarının örneklerini 7 gün bekleterek değerlendirmesi nedeniyle olabilir.

Farklı yöntemlerle yapılan birçok çalışma MTA'nın *Enterococcus faecalis* üzerinde farklı zaman periyotlarında antimikrobiyal etkisi olduğunu belirtmektedir (Sipert ve ark., 2005; Ribeiro ve ark., 2006; Tanomaru-Filho ve ark., 2007; Dennis ve ark., 2007; Zhang ve ark., 2009a). MTA Fillapex kök kanal dolgu patının ana bileşeni de MTA'dır. Patın sahip olduğu antimikrobiyal etkisinin içeriğinde bulunan MTA'dan kaynaklandığını düşünmekteyiz.

Pinheiro ve arkadaşları (2009) farklı kök kanal dolgu patlarının antimikrobiyal etkinliğini *Enterococcus faecalis* üzerinde agar difüzyon testi ile değerlendirmişlerdir. Değerlendirme sonucunda Real Seal kök kanal dolgu patı ile aynı içeriğe sahip Epiphany kök kanal dolgu patı herhangi bir antimikrobiyal etki göstermemiştir. Bizim çalışmamızda kullanılan yöntem ile bu çalışmada kullanılan yöntem farklılığına rağmen bulgular paraleldir.

Real Seal genellikle anaerobik ortamda 30 dakikada sertleşirken, hava varlığında kök kanal dolgu patının yüzeyi bir hafta sonra sertleşmektedir (Nielsen ve ark., 2006). Bizim çalışmamızda kullandığımız direkt temas testi turbidometrik değerlendirme

yapılan bir yöntemdir (Weiss ve ark., 1996). Yani test edilen örneklerin bakteriyel büyümeye izin vermesi sonucu artan bulanıklık belirlenmektedir. Grup A için, Real Seal kök kanal patı tamamen sertleşmediği için çözünerek bulanıklığı arttırmış ve yanlış yorumlamaya neden olmuş olabilir. Grup B’de pat olmadığından bulanıklık oluşmamış ve bu nedenle optik densitometresi daha düşük ölçülmüş olabilir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Kök kanal tedavilerinde kullanılan kanal dolgu patlarından AH Plus, Tubli Seal EWT, EndoREZ, MTA Fillapex ve Real Seal'ın L-929 hücre kültüründe MTT yöntemi ile sitotoksitelerini ve *Enterococcus faecalis* üzerinde direkt temas testi ile antimikrobiyal etkilerini incelemiş olduğumuz çalışmamızda aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir:

1. Çalışmamızın birinci bölümünde Mosmann'ın sınıflamasına göre elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde; AH Plus kök kanal dolgu patı 24, 48 ve 72 saatlik zaman dilimlerinde herhangi bir sitotoksik etki göstermezken, Tubli Seal EWT, EndoREZ, MTA Fillapex ve Real Seal'ın 24. ve 48. saatlerde orta, 72. saatte ise hafif derecede sitotoksite gösterdiği bulunmuştur.
2. Çalışmamızdaki deney ve kontrol gruplarına ait MTT testi ile elde edilen ortalama optik densitometre değerlerinin istatistiksel olarak analiz edilmesi sonucunda AH Plus grubuna ait canlı hücre oranı 24. ve 48. saatlerde diğer kök kanal dolgu patlarından önemli ölçüde yüksek bulunmuştur ($p<0,05$). Diğer kök kanal dolgu patları arasında fark olmadığı tespit edilmiştir ($p>0,05$). 72 saatlik değerlendirmede ise AH Plus grubuna ait canlı hücre oranı yine diğer kök kanal dolgu patlarından anlamlı derecede daha yüksek bulunurken ($p<0,05$), Tubli Seal EWT grubuna ait canlı hücre oranının Real Seal grubundan önemli ölçüde daha yüksek olduğu gözlenmiştir ($p<0,05$). Diğer gruplar arasında ise herhangi bir fark olmadığı saptanmıştır ($p>0,05$).
3. Her kök kanal dolgu patı grubuna ait 24, 48 ve 72 saatlik değerlendirme sonucu elde edilen canlı hücre oranları istatistiksel olarak analiz edildiğinde AH Plus grubunda her 3 zaman dilimi arasında istatistiksel olarak fark gözlenmemiştir ($p>0,05$). Tubli Seal EWT, EndoREZ, MTA

Fillapex ve Real Seal grubunda 72. saatte elde edilen canlı hücre oranları 24. ve 48. saate göre anlamlı derecede daha yüksektir. Ayrıca Real Seal grubunda 48. saatte elde edilen canlı hücre oranı diğer saatlere göre anlamlı derecede daha düşüktür.

4. Çalışmamızın ikinci bölümünün sonuçları değerlendirildiğinde; pat varlığında (Grup A) 1-6 saatler arasında AH Plus, Tubli Seal EWT, EndoREZ, MTA Fillapex kök kanal dolgu patları antimikrobiyal etki gösterirken, Real Seal kök kanal dolgu patı bu sürede antimikrobiyal etkinlik göstermemiştir. 13-18 saatler arasında ise AH Plus, EndoREZ ve MTA Fillapex antimikrobiyal etkinliklerini sürdürürken, Tubli Seal EWT'nin antimikrobiyal etkisi zamanla azalmıştır. Real Seal kök kanal dolgu patı antimikrobiyal etkinlik göstermemiştir.
5. Pat olmadığında (Grup B) 1-6 saatler arası tüm kök kanal dolgu patları antimikrobiyal etkinlik gösterirken, 13-18 saatler arasında antimikrobiyal etkinliklerini kaybetmişlerdir.

Kök kanal dolgu patları, kök kanallarını hermetik bir şekilde doldurmada yetersiz kalan katı kök kanal dolgu maddelerini desteklemek amacıyla kullanılmaktadır. Bu materyallerin kök kanalını üç boyutlu olarak doldurma becerilerinin yanında olumlu biyolojik özelliklere de sahip olmaları istenir. Bu materyaller çevre dokularla direkt temas edebildiğinden dolayı tam bir iyileşme sağlanması için biyoyumlu olmalı, ayrıca preparasyon ve irrigasyon işlemleri ile kök kanalındaki mikroorganizmaların tam eliminasyonu mümkün olmadığından dolayı enfeksiyonların tekrarlaması açısından antimikrobiyal etkiye de sahip olmalıdır. Ancak genellikle materyallerin sitotoksik etkisi arttıkça antimikrobiyal etkisi de artmaktadır.

Yaptığımız bu çalışmada, sitotoksik ve antimikrobiyal etkilerini incelediğimiz 5 farklı kök kanal dolgu patından sadece AH Plus kök kanal dolgu patının bu deney şartlarında sitotoksik etki göstermeksizin antimikrobiyal etkiye sahip olduğu gözlenmiştir. Tubli Seal EWT, EndoREZ ve MTA Fillapex kök kanal dolgu patları

ortadan hafife değişen oranlarda sitotoksik etki gösterirken, antimikrobiyal etkinlikleri deney periyodu boyunca devam etmiştir. Sadece Real Seal kök kanal dolgu patının antimikrobiyal etkinliği yetersiz bulunmuştur.

Ancak, bu çalışmadaki gerek sitotoksisite gerekse antimikrobiyal etkinlik değerlendirme yöntemleri *in vitro* şartlarda sınırlı olarak gerçekleştirilmiştir. Materyallerin sitotoksisite ve antimikrobiyal etkinliklerinin değerlendirilebilmesi için, daha uzun süreli *in vivo* ve klinik koşullarda da incelenmesi ve daha fazla sayıda araştırmalarla desteklenmesi gerekmektedir.

ÖZET

Farklı Kök Kanal Dolgu Patlarının Sitotoksiste ve Antimikrobiyal Etkinlik Yönünden Karşılaştırılması

Bu çalışmanın amacı, kök kanal tedavilerinde kullanılan AH Plus, Tubli Seal EWT, EndoREZ, MTA Fillapex, Real Seal kök kanal dolgu patlarının L-929 hücre kültüründe MTT testi ile sitotoksik etkilerinin ve ayrıca *Enterococcus faecalis* üzerinde direkt temas testi ile antimikrobiyal etkilerinin incelenmesidir.

Çalışmanın birinci bölümünde, 6 kuyucuklu plağın her bir kuyucuğuna farklı kök kanal dolgu patı 1 cm alanı kaplayacak şekilde yerleştirilmiştir. Örnekler üzerine DMEM ilave edilerek, 24, 48 ve 72 saat bekletilmiştir. Elde edilen ekstraksiyon sıvıları, L-929 hücre süspansiyonu içeren 96 kuyucuklu plakların her bir gözüne 100 µl yerleştirilmiştir. 48 saatlik inkübasyondan sonra plaklardan ekstraksiyon sıvıları uzaklaştırılmış ve her bir göze 25 µl MTT solüsyonu ilave edilerek 4 saat süre ile bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda spektrofotometrede 570 nm’de absorbansları ölçülmüştür.

Çalışmanın ikinci bölümünde, kök kanal dolgu patları karıştırılarak 96 kuyucuklu plakların yan duvarına yerleştirilmiş ve 10 µl bakteriyel süspansiyon eklenerek, bakteri ve patın direkt temasını sağlamak için 1 saat beklenmiştir. Patın bulunduğu kuyucuklara taze besiyeri eklenmiş ve bu kuyucuklardan 15 µl besiyeri alınarak sadece besiyeri bulunan kuyucuklara ilave edilmiştir. Bakteriyel büyüme, 18 saatlik zaman periyodunda ilk 6 saat ve son 6 saat her saatte bir spektrofotometre kullanılarak 620 nm’de ölçülmüştür.

Mosmann’ın sınıflamasına göre AH Plus her 3 zaman diliminde de sitotoksiste göstermezken, Tubli Seal EWT, EndoREZ, MTA Fillapex ve Real Seal 24. ve 48. saatlerde orta, 72. saatte ise hafif derecede sitotoksiste göstermişlerdir. MTT testi sonuçlarına göre ise, 24, 48 ve 72 saatlik değerlendirmede hücre canlılık oranları bakımından AH Plus ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmezken ($p>0,05$), diğer kök kanal dolgu patları ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$). Kontrol grubuna ait hücre canlılık oranları Tubli Seal EWT, EndoREZ, MTA Fillapex ve Real Seal kök kanal dolgu patlarının hücre canlılık oranlarından anlamlı derecede daha yüksektir.

Direkt temas testi sonuçlarına göre, Grup A (pat var)’da ilk 6 saatlik sürede Real Seal hariç diğer tüm kök kanal dolgu patları antimikrobiyal etki gösterirken, son 6 saatlik sürede EndoREZ, MTA Fillapex ve Real Seal antimikrobiyal etkilerini devam ettirmişlerdir. Tubli Seal EWT 14. saatte antimikrobiyal etkisini kaybetmeye başlamış, Real Seal antimikrobiyal etkinlik göstermemiştir. Grup B (pat yok)’de ilk 6 saatlik sürede bütün kök kanal dolgu patları antimikrobiyal etki gösterirken, son 6 saat tüm patlar antimikrobiyal etkilerini kaybetmişlerdir.

Anahtar Kelimeler: Antimikrobiyal etki, direkt temas testi, *Enterococcus faecalis*, kök kanal dolgu patları, MTT testi, sitotoksiste

SUMMARY

Comparison of cytotoxicity and antimicrobial effects of different root canal sealers

The aim of this study was evaluate the cytotoxicity of root canal sealers AH Plus, Tubli Seal EWT, EndoREZ, MTA Fillapex and Real Seal on L-929 cells with the MTT assay and the antimicrobial effects on *Enterococcus faecalis* using the direct contact test.

In the first part of this study, sealers were placed in six-well plate. Every sealers placed at the bottom of each well to cover an area of 1 cm diameter. Placed DMEM on samples for 24, 48 and 72 hours. 100 µl of eluate was transferred to a 96-well plate containing L-929 cell suspension. After 48 hours incubation the extracts were removed from the wells, 25 µl MTT solution was added to each well and waited for 4 hours. Subsequently, the spectrophotometric absorbance was measured at 570 nm using a spectrophotometer.

In the second part of this study, sealers were mixed and placed on the side walls of 96-well plate well and 10 µl bacterial suspensions were allowed to directly contact with the sealers for 1 hour. Fresh media were added to wells which including sealers and 15 µl were transferred from this wells to another wells containing fresh medium. Bacterial growth was then measured using spectrophotometer at 620 nm first six and last six hours at one hour periods over 18 hours.

According to Mosmann's scala AH Plus was non-cytotoxic, Tubli Seal EWT, EndoREZ, MTA Fillapex and Real Seal had moderate cytotoxicity at 24 and 48 hour evaluation and slightly cytotoxicity at 72 hour evaluation. According to the MTT assay, in the rates of cell viability there was no statistically significant difference between AH Plus and control group at 24, 48 and 72-hour evaluation ($p>0.05$), but there was statistically significant difference between the other sealers and control group ($p<0.05$). The control group had significantly high rates of cell viability than Tubli Seal EWT, EndoREZ, MTA Fillapex and Real Seal.

The results of the direct contact test showed that, in Grup A (paste present) at first six hours except Real Seal all sealers had antimicrobial effect, at last six hours AH Plus, EndoREZ and MTA Fillapex continue their antimicrobial effect, Tubli Seal EWT started to loose its antimicrobial effect at 14. hour and Real Seal had no antimicrobial effect. In Grup B (paste absense) at first six hours all sealers had antimicrobial effect, but they lost their antimicrobial effect at last six hours.

Key Words: Antimicrobial effect, cytotoxicity, direct contact test, *Enterococcus faecalis*, MTT assay, root canal sealers

KAYNAKLAR

- AAL-SARAJ, A.B., ARIFFIN, Z., MASUDI, S.M. (2012). An agar diffusion study comparing the antimicrobial activity of Nanoseal with some other endodontic sealers. *Aust. Endod. J.*, **38(2)**: 60-63.
- ABDULLAH, D., FORD, T.R., PAPAIOANNOU, S., NICHOLSON, J., MCDONALD, F. (2002). An evaluation of accelerated portland cement as a restorative material. *Biomaterials.*, **23**: 4001-4010.
- ABOU-RASS, M., OGLESBY, S.W. (1981). The effect of temperature concentration and tissue type on the solvent ability of sodium hypochlorite. *J. Endod.*, **7**: 376-377.
- AEINEHCI, M., ESLAMI, B., GHANBARIHA, M., SAFFAR, A.S. (2002). Mineral trioxide aggregate (MTA) and calcium hydroxide as pulp-capping agents in human teeth: a preliminary report. *Int. Endod. J.*, **36**: 225-231.
- ALDRIDGE, W.N. (1993). The biochemical principles of toxicology. *Exp. Toxicol.*, **5**: 56-78.
- AL-HIYASAT, A.S., TAYYAR, M., DARMANI, H. (2010). Cytotoxicity evaluation of various resin based root canal sealers. *Int. Endod. J.*, **43(2)**: 148-153.
- AMES, J.M., LOUSHINE, R.J., BABB, B.R., BRYAN, T.E., LOCKWOOD, P.E., SUI, M., ROBERTS, S., WELLER, R.N., PASHLEY, D.H., TAY, F.R. (2009). Contemporary methacrilate resin-based root canal sealers exhibit different degrees of *ex vivo* cytotoxicity when cured in their self-cured mode. *J. Endod.*, **35(2)**: 225-228.
- ANGELUS SCIENCE AND TECHNOLOGY. (2011). Produtos - MTA fillapex-angelus. Erişim: [http://www.angelus.ind.br/en/endodontics/mta_fillapex/]. Erişim tarihi: 15.04.2011.
- ARAKI, K., SUDA, H., BARBOSA, S.V., SPANGBERG, L.S. (1993). Reduced cytotoxicity of a root canal sealer through eugenol substitution. *J. Endod.*, **19(11)**: 554-557.
- ARENS, D., TORABINEJAD, M. (1996). Repair of furcal perforations with mineral trioxide aggregate. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.*, **82**: 84-88.
- AZAR, N.G., HEIDARI, M., BAHRAMI, Z.S., SHOKRI, F. (2000). *In vitro* cytotoxicity of a new epoxy resin root canal sealer. *J. Endod.*, **26(8)**: 462-465.
- BABICH, H., REISBAUM, A.G., ZUCKERBRAUN, H.L. (2000). *In Vitro* Response of Human Gingival Epithelial S-G Cells to Resveratrol. *Toxicol. Letter.*, **114**: 143-153.
- BAĞIŞ, Y.H., KÖSEM, G., YAMANEL, K. (2001). Dentin bonding ajanların *Streptococcus mutans* üzerine antibakteriyel etkilerinin *in vitro* olarak değerlendirilmesi. *A. Ü. Diş Hek. Fak. Derg.*, **28**: 279-285.
- BARBOSA, S.V., ARAKI, K., SPANGBERG, L.W. (1993). Cytotoxicity of some modified root canal sealers their leachable components. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.*, **75**: 357-361.
- BARBOSA, C.A.M., GONCALVES, R.B., SIQUEIRA, J.F., de UZEDA, M. (1997). Evaluation of the antibacterial activities of calcium hydroxide, chlorhexidine and camphorated paramonochlorophenol as intracanal medicament, A clinical and laboratory study. *J. Endod.*, **23(5)**: 297-300.
- BARNETT, F., TROPE, M. (2004). Resilon: A novel material to replace gutta-percha. *Contemp. Endod.*, **1**: 16-19.
- BARTHEL, C.R., LOSCHE, G.M., ZIMMER, S., ROULET, J.F. (1994). Dye penetration in root canals filled with AH26 in different consistencies. *J. Endod.*, **20**: 436-439.
- BECCE, C., PAMEIJER, C.H. (2006). Biocompatibility of a new endodontic sealer. *81 st General Session of the IADR*, 25-28.

- BER, B., HATTON, J., STEWART, G. (2007). Chemical modification of ProRoot MTA to improve handling characteristics and decrease setting time. *J. Endod.*, **33**: 1231–1234.
- BESSING, C., KALLUS, T. (1987). Evaluation of Tissue Response to Dental Alloys by Subcutaneous Implantation. *Acta. Odontol. Scand.*, **45**: 247-255.
- BIN, C.V., VALERA, M.C., CAMARGO, S.E., RABELO, S.B., SILVA, G.O., BALDUCCI, I., CAMARGO, C.H. (2012). Cytotoxicity and genotoxicity of root canal sealers based on mineral trioxide aggregate. *J. Endod (Epub)*, **38(4)**: 495-500.
- BODRUMLU, E., SEMİZ, M. (2006). Antibacterial activity of a new endodontic sealer against *Enterococcus faecalis*. *J. Can. Dent. Assoc.*, **72(7)**: 637.
- BOECKH, C., SCHUMACHER, E., PODBIELSKI, A., HALLER, B. (2002). Antibacterial activity of restorative dental biomaterials *in vitro*. *Caries Res.*, **36**: 101-107.
- BOUILLAGUET, S., WATAHA, J.C., LOCKWOOD, R.E., GALGANO, C., GOLAY, A., KREJCI, I. (2004). Cytotoxicity and sealing properties of four classes of endodontic sealers evaluated by succinic dehydrogenase activity and confocal laser scanning microscopy. *Eur. J. Oral Sci.* **112**:182-187.
- BOUILLAGUET, S., WATAHA, J., TAY, F., BRACKETT, M., LOCKWOOD, P. (2006). Initial *in vitro* biological response to contemporary endodontic sealers. *J. Endod.*, **32**: 989-992.
- BRACKETT, M.G., MARSHALL, A., LOCKWOOD, P.E., LEWIS J.B., MESSER, R.L.W., BOUILLAGUET, S., WATAHA, J.C. (2008). Cytotoxicity of endodontic materials over 6-weeks *ex vivo*. *Int. Endod. J.*, **41**:1072-1078.
- BRACKETT, M.G., MESSER, R.L., LOCKWOOD, P.E., BRYAN, T.E., LEWIS, J.B., BOUILLAGUET, S., WATAHA, J.C. (2010). Cytotoxic response of three cell lines exposed *in vitro* to dental endodontic sealers. *J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.*, **95**: 380–386.
- BRACKETT, M.G., LEWIS, J.B., KIOUS, A.R., MESSER, R.L.W., LOCKWOOD, P.E., BRACKETT, W.W., WATAHA, J.C. (2012). Cytotoxicity of endodontic sealers after one year of aging *in vitro*. *J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.*, Epub: **00B(00)**
- BRODIN, P. (1988) Neurotoxic and analgesic effects of root canal cements and pulp-protecting dental materials. *Endod. Dent. Traumatol.*, **4**: 1-11.
- BROWNE, R.M. (1985). *In vitro* cytotoxicity of testing dental restorative materials. *CRC Critical Reviews in Biocompatibility.*, **1**: 85-110.
- BROWNE, R.M. (1988). The *In Vitro* Assessment of the Cytotoxicity of Dental Materials-Does It Have a Role? *Int. Endod. J.*, **21**: 50-58.
- BYSTROM, A., SUNDQVIST, G. (1983). Bacteriologic evaluation of the effect of 0.5 percent sodium hypochlorite in endodontic therapy. *Oral Surg.*, **55**: 307-312.
- BYSTROM, A., SUNDQVIST, G. (1985). The antibacterial action of sodium hypochlorite and EDTA in 60 cases of endodontic therapy. *Int. Endod. J.*, **18**: 35-40.
- CAMILLERI, J., MONTESIN, F.E., BRADY, K., SWEENEY, R., CURTIS, R.V., FORD, T.R. (2005). The constitution of mineral trioxide aggregate. *Dent. Mater.*, **21**: 297-303.
- CAMPS, J., ABOUT, I. (2003). Cytotoxicity testing of endodontic sealers: a new method. *J. Endod.*, **29**: 583–586.
- CANALDA, C., PUMAROLA, J. (1989). Bacterial growth inhibition produced by root canal sealer cements with a calcium hydroxide base. *Oral Surg.*, **68**: 99-102.
- CAO, T., SAW, T.Y., HENG, B.C., LIU, H., YAP, A.U.J., NG, M.L. (2005). Comparison of different test models for the assesment of cytotoxicity of composite resins. *J. Appl. Toxicol.*, **25**: 101–108.
- CARTWRIGHT, T., SHAH, P. (1998). *Culture media In: Basic cell culture: Ed. Davis JM*, New York: Oxford Univercity Press, Pp.: 57-91.

- CHANG, M.C., LIN, L.D., CHEN, Y.J., TSAI, Y.L., CHENG, Y.A., KUO, C.S., CHANG, H.H., TAI, T.F., LIN, H.J., JENG, J.H. (2010). Comparative cytotoxicity of five root canal sealers on cultured human periodontal ligament fibroblasts. *Int. Endod. J.*, **43**: 251-257.
- CHONG, B.S., OWADALLY, I.D., PITT FORD, T.R., WILSON, R.F. (1994). Antibacterial activity of potential retrograde root filling materials. *Endod. Dent. Traumatol.*, **10**: 66-70.
- CHONG, B.S., PITT FORD, T.R., HUDSON, M.B. (2003). A prospective clinical study of Mineral Trioxide Aggregate and IRM when used as root-end filling materials in endodontic surgery. *Int. Endod. J.*, **36**: 520-526.
- COBANKARA, F.K., ALTINOZ, H.C., ERGANIS, O., KAV, K., BELLI, S. (2004). *In vitro* antibacterial activities of root canal sealers by using two different methods. *J. Endod.*, **30**: 57-60.
- COHEN, B.I., PAGNILLO, M.K., MUSIKANT, B.L., DEUTSCH, A.S. (2000). An *in vitro* study of the cytotoxicity of two root canal sealers. *J. Endod.*, **26**: 228-229.
- CUMMINGS, G.R., TORABINEJAD, M. (1995). Mineral trioxide aggregate (MTA) as an isolating barrier for internal bleaching. *J. Endod.*, **21**: 228.
- DAHLEN, G., SAMUELSSON, W., MOLANDER, A., REIT, C. (2000). Identification and antimicrobial susceptibility of *enterococci* isolated from the root canal. *Oral Microbiol. Immunol.*, **15**: 309-312.
- DALAT, D.M., ONAL, B. (1998). Apical leakage of a new glass ionomer root canal sealer. *J. Endod.*, **24**: 161-163.
- DARTAR-OZTAN, M., YILMAZ, S., KALAYCI, A., ZAIMOGLU, L. (2003). A comparison of the *in vitro* of two root canal sealers. *J. Oral. Rehabil.*, **30**: 426-429.
- DAVIS, J.M. (1996). *Basic Cell Culture. A Practical Approach*. New York: Oxford University Press INC. p: 135-223.
- DEBELIAN, G.J., OLSEN, I., TRONSTAD, L. (1992). Profiling of propioni-bacterium acnes recovered from root canal and blood during and after endodontic treatment. *Endod. Dent. Traumatol.*, **8**: 248-254.
- DENNIS, M.H., WATTS, J.D., BEESON, T.J., KIRKPATRICK, T.C., RUTLEDGE, R.E. (2007). The anti-microbial effect against *Enterococcus faecalis* and the compressive strength of two types of mineral trioxide aggregate mixed with sterile water or 2%chlorhexidine liquid. *J. Endod.*, **33**: 844-847
- DENTSPLY TULSA DENTAL. (2002). Material safety data sheet (White MTA). Prepared by: Greenburg, J.
- DISTEL, J.W., HATTON, J.F., GILLESPIE, M.J. (2002). Biofilm formation in medicated root canals. *J. Endod.*, **28**: 689-693.
- ECONOMIDES, N., VASSILIE, P.K.K., POULUPOULOS, A., KOLOKURIS, I., ROZOS, G., SHORE, R. (1995). Experimental study of the biocompatibility of four root canal sealers and their influence on the zinc and calcium content of several tissues. *J. Endod.*, **21(3)**:122-125.
- EDGERTON, M., LEVINE, M.J. (1993). Biocompatibility: Its Future in Prosthodontic Research. *J. Prosthet. Dent.*, **69**: 406-415.
- ELDENIZ, A.U., ERDEMIR, A., HADIMLI, H.H., BELLI, S., ERGANIS, O. (2006). Assessment of antibacterial activity of EndoREZ. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.*, **102(1)**: 119-126.
- ELDENIZ, A.U., MUSTAFA, K., QRSTAVIK, D., DAHL, J.E. (2007). Cytotoxicity of new resin-,calcium hydroxide-,and silicone-based root canal sealers on fibroblasts derived from human gingiva and L929 cell lines. *Int. Endod. J.*, **40**: 329-337.
- ERSEV, H., SCHMALZ, G., BAYIRLI, G., SCHWEIKI, H. (1999). Cytotoxic and mutagenic potencies of various root canal filling materials in eukaryotic and prokaryotic cells *in vitro*. *J. Endod.*, **25(5)**: 359-63.

- ESTRELA, C., BAMMANN, L.L., ESTRELA, C.R., SILVA, R.S., PECORA, J.D. (2000). Antimicrobial and chemical study of MTA, portland cement, calcium hydroxide paste, Sealapex and Dycal. *Braz. Dent. J.*, **11**: 3-9.
- ESTRELA, C., BAMMANN, L., PIMANTE, F.C., PECORA, J.D. (2001). Control of microorganisms *in vitro* by calcium hydroxide pastes. *Int. Endod. J.*, **34**: 341-345.
- EUROPEAN SOCIETY OF ENDODONTOLOGY. (1994). Consensus report of the European Society of Endodontology on quality guidelines for endodontic treatment. *Int. Endod. J.*, **27**: 115-124.
- EVANS, M., DAVIES, J.K., SUNDQVIST, G., FIGDOR, D. (2002). Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. *Int. Endod. J.*, **35**: 221-228.
- FAVA, L.R.G., SAUNDERS, W.P. (1999). Calcium hydroxide pastes: classification and clinical indications. *Int. Endod. J.*, **32**: 257-282.
- FERRARI, M., FORNASIERO, M.C., ISETTA, A.M. (1990). MTT colorimetric assay for testing macrophage cytotoxic activity *in vitro*. *J. Immunol. Methods.*, **131**: 165-172.
- FIGDOR, D., DAVIES, J.K., SUNDQVIST, G. (2003). Starvation survival, growth and recovery of *Enterococcus faecalis* in human serum. *Oral Microbiol. Immunol.*, **18**: 234-239.
- FLAHAUT, S., FRERE, J., BOUTIBONNES, P., AUFRAY, Y. (1996a). Comparison of the bile salts and sodium dodecyl sulfate stress responses in *Enterococcus faecalis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**: 2416-2420.
- FLAHAUT, S., BENACHOUR, A., GIARD, J.C., BOUTIBONNES, P., AUFRAY, Y. (1996b). Defense against lethal treatments and de novo protein synthesis induced by NaCl in *Enterococcus faecalis* ATCC 19433. *Arch. Microbiol.*, **165**: 317-324.
- FLAHAUT, S., HARTKE, A., GIARD, J.C., BENACHOUR, A., BOUTIBONNES, P., AUFRAY, Y. (1996c). Relationship between stress response toward bile salts, acid and heat treatment in *Enterococcus faecalis*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **138**: 49-54.
- FLAHAUT, S., HARTKE, A., GIARD, J.C., AUFRAY, Y. (1997). Alkaline stress response in *Enterococcus faecalis*: adaptation, cross-protection, and changes in protein synthesis. *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**: 812-814.
- FOREMAN, P.L., BARNES, I.E. (1990). A review of calcium hydroxide. *Int. Endod. J.*, **23**: 283-297.
- FRAGA, R.C., SIQUEIRA, J.F., UZEDA, M.D. (1996). *In vitro* evaluation of antibacterial effects of photo-cured glass ionomer liners and dentin bonding agents during setting. *J. Prosthet. Dent.*, **76**: 483-486.
- FRESHNEY, R.I. (1990). Measurement of cytotoxic and viability. In: Culture of animal cells-a manual of basic technique, 2nd ed. New York. Wiley-Liss p.: 245-256.
- FRESHNEY, R.I. (2005). *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*. 5th Edition., Haboken; John Wiley & Sons: p.: 1-216.
- FUSS, Z., WEISS, E.I., SHALHAV, M. (1997). Antibacterial activity of calcium hydroxide containing endodontic sealers on *Enterococcus faecalis in vitro*. *Int. Endod. J.*, **30**: 397-402.
- FUSS, Z., CHARNIAQUE, O., PILO, R., WEISS, E. (2000). Effect of various mixing ratios on antibacterial properties and hardness of endodontic sealers. *J. Endod.*, **26**: 519-522.
- GENCOGLU, N., SENER, G., OMURTAG, G.Z., TOZAN, A., USLU, B. ARBAK, S., HELVACIOGLU, D. (2010). Comparison of biocompatibility and cytotoxicity of two new root canal sealers. *Acta. histochemica.*, **112**: 567-575.
- GEURTSSEN, W., LEYHAUSEN, G. (1997). Biological aspects of root canal filling materials- Histocompatibility, cytotoxicity, and mutagenicity. *Clin. Oral Invest.*, **1**: 5-11.
- GEURTSSEN, W., LEINENBACH, F., KRAGE, T., LEYHAUSEN, G. (1998). Cytotoxicity of four root canal sealers in permanent 3T3 cells and primary human periodontal ligament fibroblast cultures. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.*, **85(5)**: 592-597.

- GILBERT, D.B., GERMALNE, G.R., JENSEN, J.R. (1978). Inactivation by saliva and serum of the antimicrobial activity of some commonly used root canal sealer cements. *J. Endod.*, **4**: 100-105.
- GOMES, B.P.F., PEDROSO, J.A., JACINTO, R.C., VIANNA, M.E., FERRAZ, C.C.R., ZAIA, A.A., SOUZA-FILHO, F.J. (2004). *In vitro* evaluation of the antimicrobial activity of five root canal sealers. *Braz. Dent. J.*, **15**(1): 30-35.
- GOMES-FILHO, J.E., WATANABE, S., LODI, S.C., CINTRA, L.T.A., NERY, M.J., FILHO, J.A.O., DEZAN JR, E., BERNABE, P.F.E. (2011). Rat tissue reaction to MTA Fillapex. *Dent. Traumatol.*, **Epub**: 1-5.
- GORDUYSUS, M.O., ETIKAN, I., GOKOZ, A. (1998). Histopathological evaluation of the tissue reactions to Endo-Fill root canal sealant and filling material in rats. *J. Endod.*, **24**: 194-196.
- GROSSMAN, L.I. (1982). *Endodontic Practice* "10th ed". Philadelphia: Lea & Febiger, p.: 297.
- GRANCHI, D., STEA, S., CIAPETTI, D., CAVEDAGNA, D., STEA, S., PIZZOFERRATO, A. (1995). Endodontic cements induce alterations in the cell cycle of *in vitro* cultured osteoblasts. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.*, **79**: 359-566.
- GUIGAND, M., MUSSI, P.P., GOFF, A.L., VULCAIN, J.M., MALLET, M.B. (1999). Evaluation of the cytocompatibility of three endodontic materials. *J. Endod.*, **25**(6): 419-423.
- GULATI, N., CHANDRA, S., AGGARWAL, P.K., JAISWAL, J.N., SINGH, M. (1991). Cytotoxicity of eugenol in sealer containing zinc-oxide. *Endod. Dent. Traumatol.*, **7**: 181-185.
- HAAPASALO, M., QRSTAVIK, D. (1987). *In vitro* infection and disinfection of dentinal tubules. *J. Dent. Res.*, **66**: 1375-1379.
- HACHMEISTER, D.R., SCHINDLER, W.G., WALKER, W.A., THOMAS, D.D. (2002). The sealing ability and retention characteristics of mineral trioxide aggregate in a model of apexification. *J. Endod.*, **28**: 386-390.
- HAGLUND, R., HE, J., JARVIS, J., SAFAVI, K.E., SPANGNERG, L.S., ZHU, Q. (2003). Effects of root-end filling materials on fibroblasts and macrophages *in vitro*. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.*, **95**(6): 739-745.
- HANKS, C.T., WATAHA, J.C., SUN, Z. (1996). *In Vitro* Models of Biocompatibility: A Review. *Dent. Mater.*, **12**: 186-193.
- HAUGEN, E., HENSTEN-PETTERSEN, A. (1979). Evaluation of periodontal dressing by hemolysis and oral LD50 tests. *J. Dent. Res.*, **58**: 1912-1913.
- HAUMAN, C.H., LOVE, R.M. (2003). Biocompatibility of dental materials used in contemporary endodontic therapy: a review. Part 2. Root-canal-filling materials. *Int. Endod. J.*, **36**: 147-160.
- HEIL, J., REIFFERSCHIED, G., WALDMANN, P., LEYHAUSEN, G., GEURTSSEN, W. (1996). Genotoxicity of dental materials. *Mutat. Res.*, **368**: 181-184.
- HELGELAND, K. (1982). *In vitro testing of dental cements. In: Biocompatibility of Dental Materials.* '2nd Ed.' Smith, D. C., Williams, D. F., CRC Press, Boca Raton. Pp: 201-215.
- HELGASON, C.D., MILLER, C.L. (2005). *Methods in molecular biology.* 3th Ed. Tatowa; Humana Press.: p.: 1-12
- HELING, I., CHANDLER, N.P. (1996). The antimicrobial effect within dentinal tubules of four root canal sealers. *J. Endod.*, **22**: 257-259.
- HENSTEN-PETTERSEN, A., HELGELAND, K. (1977). Evaluation of biologic effects of dental materials using different cell culture technique. *Scand. J. Dent. Res.*, **85**: 291-296.
- HENSTEN-PETTERSEN A. (1988). Comparison of the methods available for assessing cytotoxicity. *Int. Endod. J.*, **21**: 89-99.
- HIKAGE, S., SATO, A., SUZUKI, S., COX, C.F., SAKAGUCHI, K. (1999). Cytotoxicity of dental resin monomers in the presence of S9 mix enzymes. *Dent. Material. J.*, **18**: 76-86.

- HIMEL, V.T., MCSPADDEN, J.T., GOODIS, H.E. (2006). *Instruments, materials, and devices. In: Pathways of the Pulp*. "9nd Ed." Cohen, S., Hargreaves, K.M., St. Louis: Mosby p.: 233-290.
- HSIEN, H.C., HENG, Y.A., LEE, Y.L., LAN, W.H., LIN, C.P. (2003). Repair of perforating internal resorption with mineral trioxide aggregate: a case report. *J. Endod.*, **29**: 538-539.
- HOLLAND, R., de SOUZA, V. (1985). Ability of a new calcium hydroxide root canal filling material to induce hard tissue formation. *J. Endod.*, **11(12)**: 535- 543.
- HUANG, F.M., CHANG, Y.C. (2002). Cytotoxicity of resin-based restorative materials on human pulp cell cultures. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.*, **94**: 361-365.
- HUANG, F.M., TAI, K.W., CHOU, M.Y., CHANG, Y.C. (2002a). Cytotoxicity of resin-, zinc oxide-eugenol-, and calcium hydroxide-based root canal sealers on human periodontal ligament cells and permanent V79 cells. *Int. Endod. J.*, **35**: 153-158.
- HUANG, T.H., YANG, J.J., LI, H., KAO, C.T. (2002b) The biocompatibility evaluation of epoxy resin-based root canal sealers *in vitro*. *Biomaterials.*, **23**: 77-83.
- HUBBLE, T.S., HATTON, J.F., NALLAPAREDDY, S.R., MURRAY, B.E., GILLESPIE, M.J. (2003). Influence of *Enterococcus faecalis* proteases and the collagen-binding protein, Ace, on adhesion to dentin. *Oral Microbiol. Immunol.*, **18**: 121-126.
- HUME, W.R. (1985). A new technique for screening chemical toxicity to the pulp from dental restorative materials and procedures. *J. Dent. Res.*, **64**: 1322-1325.
- IMLAY, J.A., LINN, S. (1988). DNA damage and oxygen radical toxicity. *Science.*, **240**: 1302-1309.
- INGLE, J.I., NEWTON, C.W., WEST, J.D., GUTMANN, J.L., GLICKMAN, G.N., KORZON, B.H., MARTIN, H. (2002). *Obturation of the radicular space. In: Endodontics*, "5nd Ed." Ingle, J.I., Bakland, L. K., Hamilton, London: BC Decker Inc. P.: 579-668.
- INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. (1997). Dentistry- Preclinical Evaluation of Biocompatibility of Medical Devices Used in Dentistry Test Methods for Dental Materials. ISO-7405.
- INTERNATIONAL STANDARDS ORGANIZATION (ISO). (1998). Biological evaluation of medical devices. Part 1: Evaluation and testing. 10993-1.
- INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. (1999). Biological Evaluation of Medical Devices-Part 5: Tests for *In Vitro* Cytotoxicity. ISO-10993-5.
- JENKINS, N. (1999). *Animal Cell Biotechnology Methods and Protocols*. New Jersey: Bioprocess Research and Development Eli Lilly&Co. Humana Press. p.: 239-252.
- JOHNSON, W.T., GUTMANN, J.L. (2006). *Obturation of the cleaned and shaped root canal system. In: Pathways of the Pulp*. "9nd Ed." Cohen, S., Hargreaves, K. M. St. Louis: Mosby, p.: 368-369.
- KAKEHASHI, S., STANLEY, H.R., FITZGERALD, R.J. (1965). The effect of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surg.*, **20**: 340-349.
- KALLUS, T. (1984a). Evaluation of the Toxicity of Denture Base Polymers after Subcutaneous Implantation in Guinea Pigs. *J. Prosthet. Dent.*, **52(1)**: 126-134.
- KALLUS, T. (1984b). Enhanced Tissue Response to Denture Base Polymers in Formaldehyde-Sensitized Guinea Pigs. *J. Prosthet. Dent.*, **52(2)**: 292-299.
- KANG, U.J., FISHER, L.J., JOH, T.H., O'MALLEY, K.L., GAGE, F.H. (1993). Regulation of Dopamine Production by Genetically Modified Primary Fibroblasts. *J. Neurosci.*, **13**: 5203-5211.
- KARAPINAR-KAZANDAG, M., BAYRAK, O.F., YALVAC, M.E., ERSEV, H., TANALP, J., SAHIN, F., BAYIRLI, G. (2011). Cytotoxicity of 5 endodontic sealers on L929 cell line and human dental pulp cells. *Int. Endod. J.*, **44**: 626-634.

- KAWAHARA, H., SHIOTA, M., YAMAKAWA, Y. (1955). Studies on the effects of dental metals upon the mesenchymal cells in tissue culture. *J. Osaka Odontol. Soc.*, **18**: 348-348.
- KAWAHARA, H., YAMAGAMI, A., NAKAMURA, M. (1968). Biological Testing of Dental Materials by Means of Tissue Culture. *Int. Dent. J.*, **18**: 443-467.
- KAYA, B.Ü., KEÇECİ, A.D. (2008). Termoplastik sentetik polimer esaslı daimi kök kanal dolgu maddesi-Resilon. *E.Ü. Diş Hek. Fak. Derg.*, **29**: 21-31.
- KAYAOGLU, G., QRSTAVIK, D. (2004). Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, **15**: 308-320.
- KAYAOGLU, G., ERTEN, H., ALACAM, T., QRSTAVIK, D. (2005). Short-term antibacterial activity of root canal sealers towards *Enterococcus faecalis*. *Int. Endod. J.*, **38**: 483-488.
- KEISER, K., JOHNSON, C.C., TIPTON, D.A. (2000). Cytotoxicity of mineral trioxide aggregate using human periodontal ligament fibroblasts. *J. Endod.*, **26**: 288-191.
- KERESZTESI, K., KELLNER, G. (1966). The biological effect of root filling materials. *Int. Dent. J.*, **16**: 222-223.
- KLOTZER, W.T., LANGELAND, K. (1973). Testing of materials and methods for crown and bridge prosthesis on animals. *SSO Schweiz Monatsschr Zahnheilkd.*, **83**: 163-244.
- KOCH, M.J. (1999). Formaldehyde release from root-canal sealers: Influence of method. *Int. Endod. J.*, **32**: 10-16.
- KOMISSAROVA, E.V., SAHA, S.K., ROSSMAN, T.G. (2005). Dead or dying: the importance of time in cytotoxicity assays using arsenite as an example. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **202**: 99-107.
- KONT COBANKARA, F., ALTINOZ, H.C., ERGANIS, O., KAV, K., BELLI, S. (2004). *In vitro* antibacterial activities of root canal sealers by using two different methods. *J. Endod.*, **1**: 57-60.
- KRATCHMAN, S.I. (2004). Perforation repair and one-step apexification procedures. *Dent. Clin. North Am.*, **48**: 291-307.
- KUMAR, V., ABBAS, A.K., FAUSTO, N. (2005). *Pathologic basis of disease*. Chapter 1: Cellular adaptations, cell injury, and cell death. Elsevier Inc. 7th edition. Pp: 4-18.
- LANGELAND, L.K., GUTTUSO, J., JEROME, D.R., LANGELAND, K. (1966). Histologic and clinical comparison of addent with silicate cements and cold-curing materials. *J. Am. Dent. Assoc.*, **72**: 373-385.
- LEE, S.J., MONSEF, M., TORABINEJAD, M. (1993). Sealing ability of mineral trioxide aggregate for repair of lateral root perforation. *J. Endod.*, **19**: 541-544.
- LEE, W., LIM, S., SON, H.H., BAE, K.S. (2004). Sonicated extract of *Enterococcus faecalis* induces irreversible cell cycle arrest in phytohemagglutinin-activated human lymphocytes. *J. Endod.*, **30**: 209-212.
- LEONARDO, M., LEAL, J., FILHO, A. (1980). Pulpectomy. Immediate root canal filling with calcium hydroxide. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.*, **49**: 441-450.
- LEONARDO, M.R., BEZERRA DA SILVA, L.A., FILHO, M.T., SANTANA DA SILVA, R. (1999). Release of formaldehyde by 4 endodontic sealers. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.*, **88**: 221-225.
- LEWIS, C.W., SMITH, J.E., ANDERSON, J.G., FRESHNEY, R.I. (1999). Increased Cytotoxicity of Food-Borne Mycotoxins toward Human Cell Lines *in vitro* via Enhanced Cytochrome p450 Expression using the MTT Bioassay. *Mycopathologia.*, **148**: 97-102.
- LEWIS, B.B., CHESTNER, S.B. (1981). Formaldehyde in dentistry: a review of mutagenic and carcinogenic potential. *JADA.*, **103(3)**: 429-434.

- LEYHAUSEN, G., HEIL, J., REIFFERSCHIED, G., WALDMANN P., GEURSEN, W. (1999). Genotoxicity and cytotoxicity of the epoxy resin-based root canal sealer AH Plus. *J. Endod.*, **25(2)**: 109-113.
- LI, J.K., CHANG, W.H., LIN, C.H., RUAAN, R.C., LIU, H.C., SUN, J.S. (2003). Cytokine Release from Osteoblasts in Response to Ultrasound Stimulation. *Biomaterials.*, **24**: 2379–2385.
- LIN, P.C., CHEN, W.M.W., TAI, T.F., LEE, M.Y., LIN, B.R., JENG, J.H. (2004). Effects of root-end filling materials and eugenol on mitochondrial dehydrogenase activity and cytotoxicity to human periodontal ligament fibroblasts. *Biomed. Mater. Res. Part B: Apply Biometer.*, **71B**: 429-440.
- LIN, L.M., ROSENBERG, P.A. (2011). Repair and regeneration in endodontics: A review. *Int. Endod. J.*, **44(10)**: 889-906.
- LODIENE, G., MORISBAK, E., BRUZELL, E., QRSTAVIK, D. (2008). Toxicity evaluation of root canal sealers *in vitro*. *Int. Endod. J.*, **41**: 72-77.
- LOUW, N.P., PAMEIJER, C.H., NORVAL, G. (2001). Histopathological evaluation of root canal sealer in subhuman primates. *J. Dent. Res., IADR Abstracts.*, **80**: 654.
- LOVE, R.M. (2001). *Enterococcus faecalis*--a mechanism for its role in endodontic failure. *Int. Endod. J.*, **34**: 399-405.
- MacDONALD, C. (1998). *Primary culture and the establishment of cell lines*. In: Basic cell culture, Ed: Davis J. M. New York: Oxford University Press., p.: 149-180.
- MATSUMOTO, K., INOUE, K., MATSUMOTO, A. (1989). The effect of newly developed root canal sealers on rat dental pup cells im primary culture. *J. Endod.*, **15(2)**: 60-67.
- MATUSOW, R.J. (1995). Endodontic cellulitis “flare-up”. Case report. *Aust. Dent. J.*, **40**:36-38.
- McMICHEN, F.R., PEARSON, G., RAHBARAN, S., GULABIVALA, K. (2003). A comparative study of selected physical properties of five root-canal sealers. *Int. Endod. J.*, **36**: 629-635.
- MELEGARI, K.K., BOTERO, T.M., HOLLAND, G.R. (2006). Prostaglandin E2 production and viability of cells cultured in contact with freshly mixed endodontic materials. *Int. Endod. J.*, **39**: 629-635.
- MERDAD, K., PASCON, A.E., KULKARNI, G., SANTERRE, P., FRIEDMAN, S. (2007). Short-term cytotoxicity assessment of components of the epiphany resin-percha obturating system by indirect and direct contact millipore filter assays. *J. Endod.*, **33**: 24-27.
- MERYON, S.D., JOHNSON, S.G., SMITH, A.J. (1988). Eugenol release and the cytotoxicity of different zinc oxide-eugenol combinations. *J. Dent.*, **16**: 66-70.
- MICKEL, A.K., NGUYEN, T.H., CHOGLE, S. (2003). Antimicrobial activity of endodontic sealers on *Enterococcus faecalis*. *J. Endod.*, **29**: 257-258.
- MILETIC, I., ANIC, I., KARLOVIC, Z., MARSAN, T., PEZELJ, R.S., OMSAK, M. (2000). Cytotoxic effect of four root filing materials. *Endod. Dent. Traumatol.*, **16**: 287-290.
- MILETIC, I., JUKIC, S., ANIC, I., ZELJEVIC, D., VRHOVAC, V.G., OMSAK, M. (2003). Examination of cytotoxicity and mutagenicity of AH26 and AH Plus sealers. *Int. Endod. J.*, **36**: 330-335.
- MITTAL, M., CHANDRA, S., CHANDRA, S. (1995). Comparative tissue toxicity evaluation of four endodontic sealers. *J. Endod.*, **21(12)**: 622-624.
- MJÖR, I.A. (1977). Histologic demonstration of bacteria subjacent to dental restorations. *Scand. J. Res.*, **85**: 169-174.
- MJÖR, I.A., HENSTEN-PETTERSEN, A. (1983). The Biological Compatibility of Alternative Alloys. *Int. Dent. J.*, **33**: 35–40.
- MOHARAMZADEH, K., BROOK, I.M., NOORT, R.V. (2009). Biocompatibility of Resin-based Dental Materials. *Materials.*, **2(2)**: 514-548.

- MOHSEN, N.M., CRAIG, R.G., HANKS, C.T. (1998). Cytotoxicity of urethane dimethacrylate composites before and after aging and leaching. *J. Biomed. Mater. Res.*, **39(2)**: 252-260.
- MOLANDER, A., REIT, C., DAHLEN, G., KVIST, T. (1998). Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. *Int. Endod. J.*, **31**: 1-7.
- MOLLAY, D., GOLDMAN, M., WHITE, R.R., KABANI, S.(1992). Comparative tissue tolerance of a new endodontic sealer. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.*, **73(4)**: 490-493.
- MOLNAR, E.J. (1967). Residual eugenol from zinc oxide-eugenol compounds. *J. Dent. Res.*, **46**: 645-649.
- MORGANTEL, R.D., VIER-PELISSER, F.V., OLIVEIRA, S.D., ANTUNES, F.C., COGO, D.M., KOPPER, P.M.P. (2011). Antibacterial activity of two MTA-based root canal sealers. *Int. Endod. J.*, **44(12)**: 1128-1133.
- MOSMANN, T. (1983). Rapid calorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods.*, **65**: 55-63.
- MOULE, A.J., LI, H., BARTOLD, P.M. (1995). Donor variability in the proliferation of human dental pulp fibroblasts. *Aust. Dent. J.*, **40**: 110-114.
- MURRAY, P.E., GARCIA GODOY, C., GARCIA GODOY, F. (2007). How is the biocompatibility of dental biomaterials evaluated? *Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal.*, **12(3)**: E258-66.
- NAWAL, R.R., PARANDE, M., SEHGAL, R., NAIK, A., RAO, N.R. (2011). A comparative evaluation of antimicrobial efficacy and flow properties for Epiphany, Gutttaflow and AH-Plus sealer. *Int. Endod. J.*, **44(4)**: 307-313.
- NICHOLSON, J.W. (2002). *The Chemistry of Medical and Dental Materials. The Royal Society of Chemistry* Cambridge; p.: 186-195.
- NIELSEN, B.A., BEELER, W.J., VY, C., BAUMGARTNER, J.C. (2006). Setting times of Resilon and other sealers in aerobic and anaerobic environments. *J. Endod.*, **32**: 130-132.
- OSORIO, R.M., HEFTI, A., VERTUCCI, F.J., SHAWLEY, A.L. (1998). Cytotoxicity of endodontic materials. *J. Endod.*, **24(2)**: 91-96.
- OUTHWAITE, W.C., MCKENZIE, D.M., PASHLEY, D.H. (1974). A versatile split-chamber device for studying dentin permeability. *J. Dent. Res.*, **53(6)**: 1503.
- OZCAN, E., ELDENIZ, A.U., ARI, H. (2011). Bacterial killing by several root filling materials and methods in an ex vivo infected root canal model. *Int. Endod. J.*, **44**: 1102-1109.
- PARIROKH, M., TORABINEJAD, M. (2010). Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review—Part I: chemical, physical, and antibacterial properties. *J. Endod.*, **36(1)**: 16-27.
- PENTRON. (2007). *Epiphany Soft Resin Endodontic Obturation System*. Wallingford, CT, USA: Pentron Clinical Technologies, LLC.
- PETERS, L.B., WESSELINK, P.R., MOORER, W.R. (1995). The fate and the role of bacteria left in root dentinal tubules. *Int. Endod. J.*, **28**: 95-99.
- PETERS, L.B., WESSELINK, P.R., MOORER, W.R. (2000). Penetration of bacteria in bovine root dentine *in vitro*. *Int. Endod. J.*, **33**: 28-36.
- PHILLIPS, R.W. (1991). *Biological consideration in use of dental materials. Skinner's Science of Dental Materials* '9th Ed.' Indiana: W. B. Saunders Company. p.: 61-67.
- PINHEIRO, C.R., GUINES, A.S., PIZZOLITTO, A.C., BONETTI-FILHO, I. (2009). *In vitro* antimicrobial activity Acroseal, Polifil and Epiphany against *Enterococcus faecalis*. *Braz. Dent. J.*, **20(2)**: 107-111.
- PISSIOTIS, E., SAPOUNAS, G., SPANGBERG, L.S.W. (1991). Silver-glass ionomer cement as a retrograde filling material: a study *in vitro*. *J. Endod.*, **17**: 225.

- PITT FORD, T.R., TORABINEJAD, M., ABEDI, H.R., BAKLAND, L.K., KARIYAWASAM, S.P. (1996). Using mineral trioxide aggregate as a pulp capping material. *J. Am. Dent. Assoc.*, **127**: 1491-1494.
- PIZZO, G., GIAMMANCO, G.M., CUMBO, E., NICOLOSI, G., GALLINA, G. (2006). *In vitro* antibacterial activity of endodontic sealers. *J. Dent.*, **34**: 35-40.
- PORTENIER, I., WALTIMO, T.M.T., HAAPASALO, M. (2003). *Enterococcus faecalis*-the root canal survivor and 'star' in post-treatment disease. *Endod. Top.*, **6**: 135-159.
- POWERS, J.M., SAKAGUCHI, R.L. (2006). *Craig's restorative dental materials*. 12th ed. St. Louis: Mosby Elsevier; p.: 97-125.
- QRSTAVIK, D. (1981). Antibacterial properties of root canal sealers, cements and pastes. *Int. Endod. J.*, **14**: 125-133.
- QRSTAVIK, D., KEREEKES, K., ERIKSEN, H.M. (1987). Clinical performance of three endodontic sealers. *Endod. Dent. Traumatol.*, **3**: 178-186.
- QRSTAVIK, D., HAAPASALO, M. (1990). Disinfection by endodontic irrigants and dressings of experimentally infected dentinal tubules. *Endod. Dent. Traumatol.*, **6**: 142-149.
- QRSTAVIK, D. (2005). Materials used for root canal obturation: technical, biological and clinical testing. *Endod. Top.*, **12**(1): 25-38.
- QRSTAVIK NIOM, D. (1988). Antibacterial properties of endodontic materials. *Int. Endod. J.*, **21**: 161-169.
- RAPPAPORT, H.M., LILLIY, G.E., KAPSIMALIS, P. (1964). Toxicity of endodontic filling materials. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.*, **18**: 785-802.
- REGAN, J.D. (2004). *Root canal system obturation*. In: *Endodontics*. "3rd ed." Stock, C.J.R., Gulabivala, K., Walker, R.T, eds Phil.: Mosby, p.: 181-196.
- RESENDE, L.M., RACHED-JUNIOR, F.J., VERSIANI, M.A., SOUZA-GABRIEL, A.E., MIRANDA, C.E., SILVA-SOUSA, Y.T., SOUSA NETO, M.D. (2009). A comparative study of physicochemical properties of AH Plus, Epiphany, and Epiphany SE root canal sealers. *Int. Endod. J.*, **42**: 785-793.
- RIBEIRO, C.S., KUTEKEN, F.A., HIRATA JUNIOR, R., SCENZA, M.F.Z. (2006). Comparative evaluation of antimicrobial action of MTA, calcium hydroxide and portland cement. *J. Appl. Oral Sci.*, **14**: 330-333.
- ROCAS, I.N., SIQUEIRA, J.F., SANTOS, K.R.N. (2004a). Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. *J. Endod.*, **30**: 315-320.
- ROCAS, I.N., JUNG, I.Y., LEE, C.Y., SIQUEIRA, J.F. JR. (2004b). Polymerase chain reaction identification of microorganisms in previously root-filled teeth in a South Korean population. *J. Endod.*, **30**: 504-508.
- RUEGGERBERG, F.A., MARGESON, D.H. (1990). The effect of oxygen inhibition on an unfilled/filled composite system. *J. Dent. Res.*, **69**: 1652-1658.
- SALEH, I.M., RUYTER, I.E., HAAPASALO, M., QRSTAVIK, D. (2004). Survival of *Enterococcus faecalis* in infected dentinal tubules after root canal filling with different root canal sealers *in vitro*. *Int. Endod. J.*, **37**: 193-198.
- SANDERSON, A.R. (1964). Applications of isoimmune cytolysis using radiolabelled target cells. *Nature (London)*, **204**: 250-253.
- SANTERRE, J. P., SHAJII, L., LEUNG, B.W. (2001). Relation of dental composite formulations to their degradation and the release of hydrolyzed polymeric-resin-derived products. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, **12**: 136-151.
- SAUNDERS, W.P., SAUNDERS, E.M. (1994). Coronal leakage as a cause of failure in root-canal therapy: a review. *Endod. Dent. Traumatol.*, **10**: 105-108.

- SAVIOLI, R.N., PECORA, J.D., MIAN, H., ITO, I.Y. (2006). Evaluation of the antimicrobial activity of each component in Grossman's sealer. *Braz. Oral. Res.*, **20**: 127-131.
- SCARPARO R.K., GRECCA, F.S., FACHIN, E.V. (2009). Analysis of tissue reactions to methacrylate resin-based, epoxy resin-based, and zinc oxide-eugenol endodontic sealers. *J. Endod.*, **35**(2): 229-232.
- SCELZA, M.Z., LINHARES, A.B., SILVA, L.E., GRANJEIRO, J.M., ALVES, G.G. (2012). A multiparametric assay to compare the cytotoxicity of endodontic sealers with primary human osteoblasts. *Int. Endod. J.*, **45**(1): 12-18.
- SCHAFFER, E. (2000). Root filling materials. *Dtsch Zahnärztl.*, **55**: 15-25.
- SCHEDLE, A., SAMORAPOOMPICHIT, P., RAUSCH-FAN, X.H., FRANZ, A., FÜREDER, W., SPERR, W.R., SPERR, W., ELLINGER, A., SLAVICEK, R., BOLTZ-NITULESCU, G., VALENT, P. (1995). Response of L-929 fibroblasts, human gingival fibroblasts and human tissue mast cells to various metal cations. *J. Dent. Res.*, **74**: 1513-1520.
- SCHMALZ, G. (1988). Agar Overlay Method. *Int. Endod. J.*, **21**: 59-66.
- SCHMALZ, G. (1994). Use of Cell Cultures for Toxicity Testing of Dental Materials-Advantages and Limitations. *J. Dent.*, 22 Suppl **2**: 6-11.
- SCHMALZ, G., GARHAMMER, P., SCHWEIKI, H. (1996). A commercially available cell culture device modified for dentin barrier tests. *J. Endod.*, **22**: 249-252.
- SCHMALZ, G. (1997). Concepts in Biocompatibility Testing of Dental Restorative Materials. *Clin. Oral Investig.*, **1**: 154-162.
- SCHMALZ, G., HILLER, K., NUNEZ, L., STOLL, J., WEIS K. (2001a). Permeability Characteristics of Bovine and Human Dentin under Different Pretreatment Conditions. *J. Endod.*, **27**: 23-30.
- SCHMALZ, G., SCHUSTER, U., THONEMANN, B., BARTH, M., ESTERBAUER, S. (2001b). Dentin barrier test with transfected bovine pulp-derived cells. *J. Endod.*, **27**: 96-102.
- SCHMALZ, G., SCHUSTER, U., KOCH, A., SCHWEIKL, H. (2002). Cytotoxicity of low pH dentin bonding agents in a dentin barrier test *in vitro*. *J. Endod.*, **28**: 188-192.
- SCHMALZ G, ARENHOLT-BINDSLEV, D. (2009). *Biocompatibility of Dental Materials*. 1st ed. Verlag Berlin Heidelberg; Springer. p.: 13-40.
- SCHMALZ, G., ARENHOLT-BINDSLEV, D. (2010). *Root canal filling materials*. In: *Textbook of Endodontology* "2th ed." Ed. Bergenholtz, G., Hørsted-Bindslev, P., Reit, C., West Sussex. John Wiley & Sons. p.: 1-2, 193-218.
- SCHROEDER, A. (1957). Gewebeverträglichkeit des Wurzelfüllmittels AH26 (Histologische und klinische Prüfungen). *Zahnarzt Welt.*, **58**: 563.
- SCHWARZE, T., FIEDLER, I., LEYHAUSEN, G., GEURTSSEN, W. (2002a). The cellular compatibility of five endodontic sealers during the setting period. *J. Endod.*, **28**: 784-786.
- SCHWARZE, T., LEYHAUSEN, G., GEURSEN, W. (2002b). Long-term cytocompatibility of various endodontic sealers using a new root canal model. *J. Endod.*, **28**(11): 749-753.
- SCHWARTZ, R.S., MAUGER, M., CLEMENT, D.J., WALKER, W.A. (1999). Mineral trioxide aggregate: a new material for endodontics. *J. Am. Dent. Assoc.*, **130**: 967-975.
- SCHWEIKL, H., SCHMALZ, G., STIMMELMAYR, H., BEY, B. (1995). Mutagenicity of AH26 in an *in vitro* mammalian cell mutation assay. *J. Endod.*, **21**: 407-410.
- SCHWEIKL, H., SCHMALZ, G. (2000). The induction of micronuclei in V79 cells by the root canal filling material AH Plus. *Biomaterials.*, **21**: 939-944.
- SEDGLEY, C.M., LENNAN, S.L., CLEWELL, D.B. (2004). Prevalence, phenotype and genotype of oral *enterococci*. *Oral Microbiol. Immunol.*, **19**: 95-101.

- SEDGLEY, C.M., LENNAN, S.L., APPELBE, O.K. (2005). Survival of *Enterococcus faecalis* in root canals *ex vivo*. *Int. Endod. J.*, **38**: 735-742.
- SEDGLEY, C., NAGEL, A., DAHLEN, G., REIT, C., MOLANDER, A. (2006). Real-time quantitative polymerase chain reaction and culture analyses of *Enterococcus faecalis* in root canals. *J. Endod.*, **32**: 173-177.
- SELDEN, J.K., CAMES, D.L., MACDOUGALL, M. (1997). Evaluation of immortalized clonal Mouse odontoblasts and dental pulp cell lines for *in vitro* biocompatibility testing (abstract). *J. Dent. Res.*, **76**: 156.
- SEN, B.H., KAZEMI, R.B., SPANGBERG, L.S.W. (1998). Morphological Effects on L929 Fibroblasts of Titanium Tetrafluoride Application. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.*, **86**: 341-346.
- SHALHAV, M., FUSS, Z., WEISS, I.E. (1997). *In vitro* antibacterial activity of a glass ionomer endodontic sealer. *J. Endod.*, **23**: 616-619.
- SHARP, J.A. (1977). *An Introduction to Animal Tissue Culture*. Southampton: The Camelot Press Ltd. p.: 1-57.
- SHERMAN, J.M. (1937). The *Streptococci*. *Bacteriol. Rev.* **1**: 3-97.
- SHIPPER, G., TEIXEIRA, F.B., ARNOLD, R.R., TROPE, M. (2005). Periapical inflammation after coronal microbial inoculation of dog roots filled with gutta-percha or resilon. *J. Endod.*, **31**: 91-96.
- SIPERT, C.R., HUSSNE, R.P., NISHIYAMA, C.K., TORRES, S.A. (2005). *In vitro* antimicrobial activity of Fill Canal, Sealapex, Mineral Trioksit Aggregate, Portland Cement and EndoREZ. *Int. Endod. J.*, **38(8)**: 539-543.
- SIQUEIRA, J.F. JR., de UZEDA, M. (1996). Disinfection by calcium hydroxide pastes of dentinal tubules infected with two obligate and one facultative anaerobic bacteria. *J. Endod.*, **22**: 674-676.
- SIQUEIRA, J.F., UZEDA, M.D. (1997). Intracanal medicaments: Evaluation of the antibacterial effects of chlorhexidine, metranidazole and calcium hydroxide associated with three vehicles. *J. Endod.*, **23**: 167-169.
- SIQUEIRA, J.F., UZEDA, M.D. (1998). Influence of different vehicles on the antibacterial effects of calcium hydroxide. *J. Endod.*, **24**: 663-665.
- SIQUEIRA, J.F., FAVIERI, A., GAHYVA, S.M.M., MORAES, S.R., LIMA, K.C., LOPES, H.P. (2000). Antimicrobial activity and flow rate of newer and established root canal sealers. *J. Endod.*, **26(5)**: 274-277.
- SIQUEIRA, J.F. (2001). Aetiology of root canal treatment failure: why well-treated teeth can fail. *Int. Endod. J.*, **34**: 1-10.
- SIQUEIRA, J.F., ROCAS, I.N., SANTOS, S.R., LIMA, K.C., MAGALHAES, F.A., DE UZEDA, M. (2002). Efficacy of instrumentation techniques and irrigation regimens in reducing the bacterial population within root canals. *J. Endod.*, **28**: 181-184.
- SIQUEIRA, J.F. JR., ROCAS, I.N. (2004). Polymerase chain reaction-based analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.*, **97**: 85-94.
- SIREN, E.K., HAAPASALO, M.P., RANTA, K., SALMI, P., KEROSUO, E.N. (1997). Microbiological findings and clinical treatment procedures in endodontic cases selected for microbiological investigation. *Int. Endod. J.*, **30**: 91-95.
- SIREN, E.K., HAAPASALO, M.P., WALTIMO, T.M., QRSTAVIK, D. (2004). *In vitro* antibacterial effect of calcium hydroxide combined with chlorhexidine or iodine potassium iodide on *Enterococcus faecalis*. *Eur. J. Oral Sci.*, **112**: 326-331.
- SLETTEN, G.B., DAHL, J.E. (1999). Cytotoxic effects of extracts of compomers. *Acta. Odontol. Scand.*, **57(6)**: 316-322.

- SLUTZKY-GOLDBERG, I., SLUTZKY, H., SOLOMONOV, M., MOSHONOV, J., WEISS, E.I., MATALON, S. (2008). Antibacterial properties of four endodontic sealers. *J. Endod.*, **34(6)**: 735-738.
- SLUYK, S., MOON, P., HARTWELL, G. (1998). Evaluation of setting properties and retention characteristics of MTA when used as a furcation perforation repair material. *J. Endod.*, **24**: 768-771.
- SOBRINHO, A.P., BARROS, M.H., NICOLI, J.R., CARVALHO, M.A., FARIAS, L.M., BAMBIRRA, E.A. (1998). Experimental root canal infections in conventional and germ-free mice. *J. Endod.*, **24**: 405-408.
- SOUSA, J.A.C., MONTES, C.R.M., PASCON, E.A., LOYOLA, A.M., VERSIANI, M.A. (2006). Comparison of the intraosseous biocompatibility of AH Plus, EndoREZ, and Epiphany root canal sealers. *J. Endod.*, **32(7)**: 656-662.
- SOUSA-NETO, M.D., GUIMARAES, L.F., SAQUY, P.C., PECORA, J.D. (1999). Effect of different grades of gum rosins and hydrogenated resins on the solubility, disintegration, and dimensional alterations of Grossman cement. *J. Endod.*, **25(7)**: 477-480.
- SPANGBERG, L. (1973). Kinetic and quantitative evaluation of material cytotoxicity *in vitro*. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.*, **35**: 389-401.
- SPANGBERG, L.S., AL-NAZHAN, S.A. (1988). The Radiochromium Release Method for Evaluation of Cytotoxicity *In Vitro*. *Int. Endod. J.*, **21**: 72-78.
- SPANGBERG, L.S.W., BARBOSA, S.V., LAVIGNE, G.D. (1993). AH 26 releases formaldehyde. *J. Endod.*, **19(12)**: 596-598.
- SPANGBERG, L.S.W. (1998). *Endodontic treatment of teeth without apical periodontitis*. In: *Essential Endodontology*. Qrstavik D, Pitt Ford TR., Blackwell Pub Com, Oxford p.: 228.
- STEVENS, R.H., GROSSMAN, L.I. (1983). Evaluation of the antimicrobial potential of calcium hydroxide as an intracanal medicament. *J. Endod.*, **9**: 372-374.
- STOWE, T.J., SEDGLEY, C.M., STOWE, B., FENNO, J.C. (2004). The effects of chlorhexidine gluconate (0.12%) on the antimicrobial properties of toothcolored ProRoot MTA. *J. Endod.*, **30**: 429-431.
- SUKUWAT, C., SRISUWAN, T. (2002). A comparison of the antimicrobial efficacy of three calcium hydroxide formulations on human dentin infected with *Enterococcus faecalis*. *J. Endod.*, **28**: 102-104.
- SUNDQVIST, G., FIGDOR, D., PERSSON, S., SJOGREN, U. (1998). Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.*, **85(1)**: 86-93.
- SUSINI, G., ABOUT, I., TRAN-HUNG, L., CAMPS, J. (2006). Cytotoxicity of Epiphany and Resilon with a root model. *Int. Endod. J.*, **39**: 940-944.
- TAGGER, M., TAGGER, E., KFIR, A. (1988). Release of calcium and hydroxyl ions from set endodontic sealers containing calcium hydroxide. *J. Endod.*, **14**: 588-591.
- TAIRA, M., NAKAO, H., MATSUMOTO, T., TAKAHASHI, J. (2000). Cytotoxic Effect of Methyl Methacrylate on 4 Cultured Fibroblasts. *Int. J. Prosthodont.*, **13**: 311-315.
- TAKAHARA, K., ONODERA, A., MATSUMOTO, K. (1990). Toxicity of root canal sealers on rat bone cells in primary culture. *Endod. Dent. Traumatol.*, **6(5)**: 200-207.
- TANOMARU-FILHO, M., TANOMARU, J.M.G., BARROS, D.B., WATANABE, E., ITO, I.Y. (2007). In vitro antimicrobial activity of endodontic sealers, MTAbased cements and portland cement. *J. Oral Sci.*, **49**: 41-45.
- TEIXEIRA, L.A., FACKLAM, R.R. (2003). Enterococcus. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH (eds). *Manual of Clinical Microbiology*. Eighth edition, Washington. ASM Pres. pp: 422-433.

- TELLI, C., SERPER, A., DOGAN, A. L., GUC, D. (1999). Evaluation of the cytotoxicity of calcium phosphate root canal sealers by MTT assay. *J. Endod.*, **25**(12): 811-813.
- TOBIAS, R.S. (1988). Antibacterial properties of dental restorative materials: A review. *Int. Endod. J.*, **21**: 155-160.
- TOBIAS, R.S., RIPPIN, J.W., BROWNE, R.M., WILSON, C.A. (1988). A further study of the antibacterial properties of dental restorative materials. *Int. Endod. J.*, **21**: 381-392.
- TORABINEJAD, M., WATSON, T.F., PITT FORD, T.R. (1993). Sealing ability of a mineral trioxide aggregate used as a retrograde root filling material. *J. Endod.*, **19**: 591-595.
- TORABINEJAD, M., HONG, C.U., PITTFORD, T.R., KETTERING, J.D. (1995a). Antibacterial effects of some root end filling materials. *J. Endod.*, **21**(8): 403-406.
- TORABINEJAD, M., HONG, C.U., MCDONALD, F., PITT FORD, T.R. (1995b). Physical and chemical properties of a new root-end filling material. *J. Endod.*, **21**: 349-353.
- TURKUN, M., CENGIZ, T. (1997). The effects of sodium hypochlorite and calcium hydroxide on tissue dissolution and root canal cleanliness. *Int. Endod. J.*, **30**: 335-342.
- TYAS, M.J. (1977). A method for the in vitro toxicity testing of dental restorative materials. *J. Dent. Res.*, **56**: 1285-1290.
- van WYK, C.W., OLIVER, A., MARITZ, J.S. (2001). Cultured pulp fibroblasts: are they suitable for in vitro cytotoxicity testing?. *J. Oral Pathol. Med.*, **30**: 168-177.
- VERSIANI, M.A., CARVALHO-JUNIOR, J.R., PADILHA, M.I., LACEY, S., PASCON, E.A., SOUSA-NETO, M.D. (2006). A comparative study of physicochemical properties of AH Plus and Epiphany root canal sealants. *Int. Endod. J.*, **39**: 464-471.
- VILLA, P., FERNANDEZ, R. (2005). Apexification of a replanted tooth using mineral trioxide aggregate. *Dent. Traumatol.*, **21**: 306-308.
- VOLK, J., ENGELMANN, J., LEYHAUSEN, G., GEURTSSEN, W. (2006). Effects of three resin monomers on the cellular glutathione concentration of human gingival fibroblasts. *Dent. Material.*, **22**: 499-505.
- WALTON, R.E., JOHNSON, W.T. (2002). *Obturation. In: Principles and Practice of Endodontics.* "3rd. Ed." Walton; R.E., Torabinejad; M., eds. Philadelphia: W.B. Saunders p.: 239-267.
- WATAHA, J.C., CRAIG, R.G., HANKS, C.T. (1992). Precision of and new methods for testing *in vitro* alloy cytotoxicity. *Dent. Mater.*, **8**: 65-70.
- WATAHA, J.C. (2000). Biocompatibility of dental casting alloys: A review. *J. Prosthet. Dent.*, **83**: 223-234.
- WATAHA, J.C. (2001). Principles of biocompatibility for dental practitioners. *J. Prosthet. Dent.*, **86**: 203-209.
- WEIGER, R., DE LUCENA, J., DECKER, H. E., LOST, C. (2002). Vitality status of microorganisms in infected human root dentine. *Int. Endod. J.*, **35**: 166-171.
- WEISS, E.I., SHALHAV, M., FUSS, Z. (1996). Assessment of antibacterial activity of endodontic sealers by a direct contact test. *Endod. Dent. Traumatol.*, **12**: 179-184.
- WENNERBERG, A., HASSELGREN, G., TRONSTAD, L. (1979). A method for toxicity screening of biomaterials using cells cultured on Millipore filters. *J. Biomed. Mater. Res.*, **13**: 109-120.
- WENNERBERG, A. (1980). Biological evaluation of root canal sealers using *in vitro* and *in vivo* methods. *J. Endod.*, **6**: 784-787.
- WENNERBERG, A., HENSTEN-PETTERSEN, A. (1981). Sensitivity of erythrocytes from various species to in vitro hemolysis. *J. Biomed. Materials Res.*, **15**: 433-435.

- WENNBERG, A. (1988). *In Vitro* Assessment of the Biocompatibility of Dental Materials-the Millipore Filter Method. *Int. Endod. J.*, **21**: 67-71.
- WENNBERG, A., ORSTAVIK, D. (1990). Adhesion of root canal sealers to bovine dentine and gutta-percha. *Int. Endod. J.*, **23**: 13-19.
- WHITE, C., BRAYNT, N. (2002). Combined therapy of mineral trioxide aggregate and guided tissue regeneration in treatment of external root resorption and an associated osseous defect. *J. Periodontol.*, **73**: 1517-1521.
- WHITE, J.D., LACEFIELD, W.R., CHAVERS, L.S., ELEAZER, P.D. (2002). The effect of three commonly used endodontic materials on the strength and hardness of root dentin. *J. Endod.*, **28**: 828-830.
- WIGLEY, C.B. (1998). *The cell culture laboratory*. New York:Oxford University Press., p.: 1-26.
- WIGZELL, H. (1965). Quantative titrations of Mouse H-2 antibodies using Cr-51-labelled target cells. *Transplantation.*, **3**: 423-431.
- WILLERSHAUSEN, I., CALLAWAY, A., BRISEÑO, B. WILLERSHAUSEN, B. (2011). *In vitro* analysis of the cytotoxicity and the antimicrobial effect of four endodontic sealers. *Head&Face Med.*, **7**: 15.
- WILSNACK, R.E., MEYER, F.J., SMITH, J.G. (1973). Human cell culture toxicity testing of medical devices and correlation to animal tests. *Biomaterials, Medical Devices and Artificial Organs.*, **1**: 543-562.
- WILSON, A.D., KENT, B.E. (1972). A new translucent cement for dentistry. The glass ionomer cement. *Braz. Dent. J.*, **132**: 133-135.
- WU, M.K., WESSELINK, P.R., BOERSMA, J. (1995). A 1-year follow-up study on leakage of four root canal sealers at different thicknesses. *Int. Endod. J.*, **28**: 185-189.
- XU, P., LIANG, J., DONG, G., ZHENG, L., YE, L. (2010). Cytotoxicity of RealSeal on human osteoblast-like MG63 cells. *J. Endod.*, **36**(1): 40-44.
- YESILSOY, C., FEIGAL, R.J. (1985). Effects of Endodontic Materials on Cell Viability across Standard Pore Size Filters. *J. Endod.*, **1**: 401-407.
- ZAREBA, T. (2003). Antimicrobial Activity of Root Canal Sealers- in vitro evaluation. *J. Thromb. Haemost.*, **1**(1): ABST number 903_r1946
- ZHANG, H., SHEN, Y., RUSE, N.D., HAAPASALO, M. (2009). Antibacterial activity of endodontic sealers by modified direct contact test against *Enterococcus faecalis*. *J. Endod.*, **35**(7): 1051-1055.
- ZMENER, O., DOMINQUEZ, F.V. (1983). Tissue response to a glass ionomer used as an endodontic cement. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.*, **56**: 198.
- ZMENER, O. (2004). Tissue response to a new methacrylate-based root canal sealer: Preliminary observations in the subcutaneous connective tissue of rats. *J. Endod.*, **30**(5): 348-351.
- ZMENER, O., PAMEIJER, C.H. (2004). Clinical and radiographic evaluation of a resin based root canal sealer. *Am. J. Dent.*, **17**(1): 19-22.
- ZMENER, O., BANEGAS, G., PAMEIJER, C.H. (2005). Bone tissue response to a methacrylate-based endodontic sealer: A histological and histometric study. *J. Endod.*, **31**(6): 457-459.

ÖZGEÇMİŞ

I. Bireysel Bilgiler

Adı: Meşkule

Soyadı: ŞAHİN

Doğum yeri ve tarihi: Artvin, 01.03.1982

Uyruğu: T.C.

Medeni Durumu: Evli

İletişim adresi ve telefonu: Gökkuşuğu Cad. 31/20 Cevzlidere Balgat/ANK.,
5442873703

II. Eğitimi

2012-2006 Ankara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Endodonti Anabilim Dalı

2006-2001 Ankara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi

2000-1993 Artvin Anadolu Lisesi

1993-1988 Mehmetçik İlköğretim Okulu

Yabancı Dili: İngilizce

II. Bilimsel Etkinlikler

Yayınları:

- ‘Flare-up’ Dt. **Meşkule Şahin**, Dt. Burcu Kocatüfek Özyılmaz, Dt. Esmâ Asuman Çavdar Tetik, Roots, Yıl 5, Sayı 15, Şubat 2011

Posterler:

- ‘Furkasyon Perforasyonlu Devital Bir Dişte Flare-up Tedavisi: Bir Vaka Raporu’ Esmâ Asuman Çavdar, **Meşkule Özdemir**, Türk Endodonti Derneği 3. Bilimsel Sempozyumu, 25-27 Nisan 2008, Antalya-TÜRKİYE
- ‘İdiopatik Apikal Kök Rezorpsiyonu: Bir Vaka Raporu’ **Meşkule Özdemir**, Esmâ Asuman Çavdar, Türk Endodonti Derneği 3. Bilimsel Sempozyumu, 25-27 Nisan 2008, Antalya-TÜRKİYE

- ‘Endodontic and Surgical Treatment of a Fused Tooth: Case Report’ **Meşkule Şahin**, Fatma Böke, 14th Congress of Balkan Stomatological Society, 6-9 May 2009, Varna, BULGARIA
- ‘Multiple Idiopathic Apical Root Resorption for 3 Years Follow up: A Case Report’ Esmâ Asuman Çavdar Tetik, **Meşkule Şahin**, International Congress of Apolonia ‘DENTISTRY TODAY’ 28-30 May 2010, Struga, MACEDONIA
- ‘The Effect of Intracoronar Bleaching Agents on Microhardness of Human Dentin’ **Meşkule Şahin**, Berna Aslan, Semra Sevimay, Aylin Kalaycı, Burcu Özyılmaz, 10th International Congress of the Turkish Endodontic Society, 23-25 September 2010, Istanbul, TURKEY
- ‘Treatment of Endo-Perio Combined Lesion on a Mandibular Right Canine – A Case Report’ **Meşkule Şahin**, Fatma Böke, International Congress of Apolonia ‘DENTISTRY TODAY’ 28-30 May 2010, Struga, MACEDONIA