

T. C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KALSİYUM FOSFAT ESASLI KANAL DOLGU MADDELERİ OLAN
SANKİN APATİTE TİP I, TİP II VE TİP III'ÜN
SİTOTOKSİK, HEMOLİTİK VE ANTİBAKTERİYEL ETKİLERİNİN
BEŞ DEĞİŞİK KANAL DOLGU MADDESİ İLE
KIYASLAMALI OLARAK ARAŞTIRILMASI

ENDODONTİ (DİŞ) PROGRAMI
DOKTORA TEZİ

Dr. CÜNEYT TELLİ

ANKARA - 1991

23535

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KALSIYUM FOSFAT ESASLI KANAL DOLGU MADDELERİ OLAN
SANKIN APATİTE TİP I, TİP II VE TİP III'ÜN
SİTOTOKSİK, HEMOLİTİK VE ANTİBAKTERİYEL ETKİLERİNİN
BEŞ DEĞİŞİK KANAL DOLGU MADDESİ İLE
KIYASLAMALI OLARAK ARAŞTIRILMASI

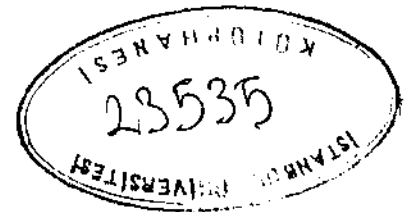
ENDODONTİ (DİŞ) PROGRAMI
DOKTORA TEZİ

Dr. CÜNEYT TELLİ

DANIŞMAN ÖĞRETİM ÜYESİ
PROF.DR. VELİ DURMAZ

ANKARA - 1991

6367-91



DOKTORA TEZ SAVUNMA JÜRİSİ

PROF. DR. İBRAHİM ETİKAN
BAŞKAN

PROF. DR. VELİ DURMAZ
(DANIŞMAN ÜYE)

PROF. DR. TAMER KINOĞLU
ÜYE

PROF. DR. ŞEMSETTİN USTAÇELEBİ
ÜYE

DOÇ. DR. TAMER ÜNVER
ÜYE

İÇİNDEKİLER

	<u>SAYFA</u>
1. GİRİŞ.....	1 - 2
2. GENEL BİLGİLER.....	3 - 16
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	17 - 22
4. BULGULAR.....	23 - 40
5. TARTIŞMA.....	41 - 51
6. SONUÇLAR.....	52 - 54
7. ÖZET.....	55
8. KAYNAKLAR.....	56 - 61

GİRİŞ

Kök kanal tedavisinin uzun dönemde başarısını etkileyen son ve en önemli aşama kök kanalının uygun dolgu maddeleriyle hermetik olarak obturasyonudur.

Grossman(1) tarafından belirtilen ve diğer otoritelerin de hemfikir olduğu ideal kanal dolgu maddesi özelliklerine sahip bir maddenin yapımı henüz gerçekleştirilememiştir.

Günümüzde kullanılan kök kanal dolgu maddeleri ve teknikleri tatminkar olmakla birlikte yeni kanal dolgu maddelerinin geliştirilmesi endodontik tedavi uygulamasına yararlar sağlayacaktır. Kalsiyum fosfat buna aday en önemli maddelerden birisidir.

Kök kanal dolgu maddeleri canlı dokularla temas halinde olabileceklerinden biyolojik özelliklerinin incelenmesi gerekmektedir. Bu özelliklerini incelemek için çeşitli in vitro ve in vivo teknikler mevcuttur. İn vitro tekniklerin avantajı deneysel koşulların kolayca kontrol edilebilmesidir. İn vivo tekniklerde ise deney koşullarını kontrol etmek en büyük problem olarak karşımıza çıkmaktadır(2).

İn vitro teknikler hemoliz testleri, hücre kültürü testleri ve karsinojenik etki testlerini içermektedir. Kök kanal dolgu maddelerinde incelenmesi gereken bir diğer özellik de antibakteriyel etkidir(2,3).

Biz de sunulan çalışmada kalsiyum fosfat temelli kanal dolgu maddeleri olan Sankin Apatite tip I, tip II ve tip III'ün hemolitik, sitotoksik ve antibakteriyel etkilerini bes diğer kanal dolgu maddesiyle kıyaslayarak araştırmayı planladık.

Çalışmamızda kanal dolgu maddeleri olarak; Sankin Apatite tip I, tip II, tip III, Dorifill, Spad, Express, Endomethasone ve CRCS kullanıldı. Bu maddelerin sitotoksik etkileri Vero devamlı epitelyal hücre kültürleri ve BHK devamlı fibroblastik hücre kültürleri üzerinde test edildi.

Yine bu maddelerin toz kısımlarının, likit kısımlarının ve likit ve toz kısımlarının firmaları tarafından önerilen oranlarda karıştırıldıktan ve tamamen sertleşmesi beklendikten sonra öğütülen tozlarının hemolitik etkileri mikroteknikte insan O grubu eritrositleri kullanılarak incelendi.

Yukarıda adı geçen kanal dolgu maddelerinin bilinen bazı Gram (+) ve Gram (-) bakteriler üzerine olan antibakteriyel etkisi agar disk diffüzyon yöntemiyle incelendi.

GENEL BİLGİLER

Kök kanal tedavisinin son ve en kritik aşaması kök kanalının doldurulmasıdır. Kök kanal dolgusunun amacı kanalda tam bir kapatma sağlamak suretiyle kök kanalı ile periodonsiyum arasındaki tüm giriş yollarını kapatmaktır(1). Ingle ve Tañtor(4a) kök kanal tedavilerindeki başarısızlığın %58 oranında kanalda obturasyonun tam olarak sağlanamamasına bağlı olduğunu belirtmişlerdir. Özetle endodontik tedavinin uzun dönemde başarısı ancak bu aşamada başarılı olmakla mümkün olabilir.

Grossman(1) ideal kanal dolgu maddesinde bulunması gereken özellikleri şu şekilde sınıflamıştır:

- 1- Madde kök kanalına kolaylıkla tatbik edilebilmelidir.
- 2- Kök kanalını lateral yönde ve apikalde iyice kapatmalıdır.
- 3- Kök kanalına tatbik edildikten sonra büzülmemelidir.
- 4- Neme karşı dayanıklı olmalıdır.
- 5- Bakterisid özelliğe sahip olmalı yada enazından bakterilerin üremelerine engel olmalıdır.
- 6- Radyopak olmalıdır.
- 7- Diş dokularını boyamamalıdır.
- 8- Periapikal dokuları irrite etmemeli ve dişin yapısını bozmamalıdır.
- 9- Steril olmalı veya tatbikten önce kolaylıkla ve çabuk olarak steril edilebilmelidir.
- 10- Gerektiğinde kolaylıkla sökülebilmelidir.

Grossman(1) ideal kök kanal simanında bulunması gereken özellikleri de şu şekilde sınıflamıştır:

- 1- Sertleştiğinde mükemmel bir sızdırmazlık sağlamalıdır.
- 2- Kanal duvarlarıyla ve dolgu maddesiyle iyi bir adhezyon sağlamalıdır.
- 3- Radyopak olmalıdır.
- 4- Diş dokularını boyamamalıdır.
- 5- Boyutsal değişiklik göstermemelidir.
- 6- Kolaylıkla karıştırılabilmeli ve kanala tatbik edilebilmelidir.
- 7- Gerektiğinde kolaylıkla sökülebilmelidir.
- 8- Doku sıvılarında çözünmemelidir.
- 9- Bakterisid özelliğe sahip olmalı yada enazından bakterilerin üremelerine engel olmalıdır.
- 10- Periapikal dokuları irrite etmemelidir.
- 11- Yavaş sertleşmeli, yeterli çalışma zamanına izin vermelidir.

Ingle ve Taintor(4b) bu özelliklere şu iki maddenin ilave edilebileceğini belirtmektedirler:

- 12- Periapikal dokularda immün bir cevap oluşturmamalıdır.
- 13- Mutajen veya karsinojen olmamalıdır.

Kök kanal dolgu maddelerinin sınıflamasında tam bir görüş birliği olmamasına karşın pek çok araştırmacı değişik şekillerde sınıflamıştır.

Nguyen isimli araştırıcının sınıflaması aşağıdaki sekildedir(5a):

1- Kök kanal dolgu patları : Bu grupta ZnO-öjenol içeren patlar, çinko oksit ve sentetik rezinler (Cavit), epoksi resinler (AH26), akrilik, polietilen, polivinil resinler (Diaket), polikarboksilat simanlar, silicone rubber ve kloroperka bulunurlar.

2- Yarı katı maddeler : Gutta percha, akrilik ve gutta percha içeren koniler bu gruba girerler.

3-Katı maddeler :Bu grup da ikiye ayrılır :

a- Yarı katı veya bükülebilir tip : Gümüş koni ve paslanmaz  elik kanal aletleri.

b- Tamamen sert olanlar : Vitalyum ve krom-kobalt implant koniler.

4- Gümüş amalgam : Endodontik cerrahide yaygın olarak kullanılmaktadır.

Bu sınıflamaya her geçen gün yeni maddelerin dahil edilmesi mümkündür.

Günümüzde en yaygın olarak kullanılan kök kanal doldurma yöntemleri gutta perchanın bir kanal dolgu patıyla birlikte kullanıldığı lateral ve vertikal kondensasyondur.

Halihazırda klinikte uygulanmakta olan kanal dolgu maddeleri ve teknikleri tatminkar olmakla birlikte biyolojik uyumluluğu daha yüksek kanal dolgu maddelerinin ve daha kolay dolgu tekniklerinin bulunması endodontik tedavinin klinik uygulanması açısından büyük yararlar sağlayacaktır.

Kalsiyum fosfatlar kemik ve dişin orijinal yapılarında yer almalarından dolayı dişhekimliğinde uzun zamandan beri geniş kapsamlı araştırmaların konusu olmuşlardır ve olmaya devam etmektedirler.

Kalsiyum fosfatların kemik grefti olarak ilk kullanılımları 1920 yılında Albee tarafından rapor edilmiştir(6).

Yaklaşık olarak bundan elli yıl kadar sonra 1969 yılında Levitt ve arkadaşları, 1971 yılında ise Monroe ve arkadaşları bir tür kalsiyum fosfat seramik yapım metodunu rapor etmişler ve apatite yapısındaki bu seramik maddenin tıp ve dişhekimliğinde implant materyali olarak kullanılabileceğini belirtmişlerdir(6).

LeGeros(6) isimli araştırmacı kalsiyum fosfat yapısındaki maddelerin dişhekimliğindeki kullanım alanlarını şu şekilde sınıflamaktadır:

- 1-Alveolar kret yüksekliğinin artırılması,
- 2-Alveolar krette çekim sonrası olası erimeyi engellemek amacıyla diş kökü formundaki implantların çekim boşluğuna tatbik edilmesi,
- 3-Periodontal defektlerin veya kemik kayıplarının kapatılması,
- 4-Metal implantlarda kemik metal adhezyonunu artırmak için implant yüzeyinin kaplanması,
- 5-Yarık damak olgularının tedavi edilmesi,
- 6-Maksillofasial defektlerin tedavi edilmesi,
- 7-Pulpa kaplama materyali olarak kullanılması,

Kalsiyum fosfat yapısındaki maddelerin endodontik tedavideki kullanım alanları çeşitli araştırmacılar tarafından incelenmiş ve bu maddelerin pulpa kaplamasında, mekanik perforasyonların kapatılmasında ve apeksifikasyonda kullanılabileceği çeşitli araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir(6-15).

Siman gibi sertleşebilen bir kalsiyum fosfat implant materyalinin yapılması cazip bir düşünce olmuştur, çünkü bu maddelerin hem kalsiyum fosfatların yüksek biyolojik uyumluluk özelliğine sahip olacağı; hem de siman gibi manupule edilebileceği düşünülmüştür(16).

LeGeros ve arkadaşları(16) ilk defa olarak apatitik bir kalsiyum fosfat siman yapımı üzerinde çalışmışlar ve sonuçları rapor etmişlerdir.

1985 yılında Brown ve Chow(17) isimli araştırmacılar tamamen kalsiyum fosfattan oluşan ve sertleşme reaksiyonu sonuç ürünü hidroxyapatite olan bir siman için patent almışlardır.

Brown ve Chow isimli araştırmacılar tarafından tek başına yada gutta percha konilerle birlikte kanal dolgu maddesi olarakta kullanılabileceği belirtilen bu madde üzerindeki çalışmalar halihazırda devam etmektedir. (18-28)

Sankin trading company'nin üretmekte olduğu Sankin apatite halihazırda ticari olarak piyasada bulunmakta olan tamamen Kalsiyum fosfat yapısındaki tek kanal dolgu maddesidir.

Kök kanal dolgu maddeleri canlı dokularla kontakt halinde olabileceklerinden dolayı biyolojik özelliklerinin araştırılması gerekmektedir. ANSI/ADA (The American National Standart Institute/American Dental Association), FDI (The Fedaration Dentaire International) ve DIN (Deutsches Institut für Normung) dökümanlarında endodontik dolgu maddelerinin biyolojik özelliklerinin incelenmesi için uygulanabilecek in vitro ve in vivo testler belirtilmektedir. İn vitro testler; sitotoksisite, hemoliz, karsinojenik etki in vivo testler ise, subkütan implant, kemik içi implant, duyarlılık ve endodontik kullanım testlerini içermektedir(5b,29,30,31).

Endodontik dolgu maddelerinin toksisitetlerini belirlemek amacıyla geliştirilen yöntemler şu şekilde sınıflandırılabilir(5b);

1- Akut sistemik reaksiyon

a-Oral yolla

b-Enjeksiyonla

2- Kontakt irritasyon

a-Müköz membran

b-Göz yüzeyine

3- İmplantasyon reaksiyonu

a-Yumuşak doku

i-Subkütanöz

ii-İntramusküler

b-Kemik

i-Tibia

ii-Çene kemiği

c-Diş

i-Pulpa

ii-Periapiks

4-Uzun süreli reaksiyon

a-Onkolojik

b-İmmünolojik

İn Vitro :

5-Hücre kültürleri

a-Hayvan hücre kültürleri (benign, malignant)

b-İnsan hücre kültürleri (benign, malignant)

Araştırmamızda kullandığımız kanal dolgu maddeleri Sankin Apatite tip I ,Sankin Apatite tip II, Sankin Apatite tip III, CRCS, Endomethasone, Dorifill, Express ve SPAD tır. Firmalar tarafından içerikleri aşağıdaki gibi açıklanmıştır;

SANKİN APATİTE TİP I (Sankin Trading,Tokyo,Japan)

Toz:

α -TCP (Trikalsiyum fosfat) ve hydroxyl apatit içermektedir
Oranları firma tarafından açıklanmamıştır.

Likit:

Firma tarafından açıklanmamıştır.

SANKİN APATİTE TİP II (Sankin Trading,Tokyo,Japan)

Toz:

%30 iodoform içermektedir
 α -TCP içermektedir
Oranları firma tarafından açıklanmamıştır.

Likit:

Firma tarafından açıklanmamıştır.

SANKİN APATİTE TİP III (Sankin Trading,Tokyo,Japan)

Toz:

%25 iodoform içermektedir
 α -TCP içermektedir
Oranları firma tarafından açıklanmamıştır.

Likit:

Firma tarafından açıklanmamıştır.

DORIFILL: (Dorident, Wien, Austria)

Tozi:

Firma tarafından tam olarak açıklanmamıştır.

Çinko-bizmut-titan-oksit yapıda olduğu belirtilmektedir.

Likit:

Öjenol

ENDOMETHASONE: (Septodont, Paris, France) (32)

Tozi:

Deksametazon	0.01 gr
Hidrokortizon asetat	1.00 gr
Paraformaldehit	2.20 gr
Minium	5.00 gr
Çinko oksit	41.79 gr
Timol iodid	25.00 gr
Baryum sülfat	15.00 gr
Magnezyum sitrat	10.00 gr

Likit:

Öjenol

TRAITEMENT-SPAD: (Spad, Quetigny, France) (32)

Tozi:

Fenilcivaborat	0.16 gr
Kalsiyum hidroksit	0.94 gr
Hidrokortizon asetat	2.00 gr
Triksimetilen	4.70 gr
Titan oksit	6.30 gr
Baryum sülfat	13.00 gr
Çinko oksit	72.90 gr

Likit: (L)

Gliserin	13.00 gr
Formaldehid solüsyonu	87.00 gr

Likit: (LD)

Hidroklorik asit	20.00 gr
Rezorsinol	25.00 gr
Gliserin	55.00 gr

CRCS (Calcibiotic Root Canal Sealer): (Hygenic, OH., U.S.A.)

Toz:

Çinko oksit
Hidrojene rosin ester
Baryum sulfat
Kalsiyum hidroksit
Bizmut subkarbonat
Oranları: firma tarafından açıklanmamıştır.

Likit:

Öjenol
Ökaliptol

Firma oranlarını: tam olarak belirtmemekle birlikte
Öjenol oranının yaklaşık %30 azaltıldığını
belirtmektedir.

EXPRESS: (Alcos corp. U.S.A)

Toz:

Çinko oksit % 40
Hidrojene rezin % 30
Bizmut bileşimi % 14
Baryum sülfat % 14
Sodyum borat % 2

Likit:

Öjenol %100

HÜCRE KÜLTÜRLERİ:

Hücre kültürleri pratikte çeşitli gayelere yönelik olarak kullanım bulmaktadır. Özellikle virusların üretilmesi için kullanılmasının yanı sıra hücre kültürleri bazı biyolojik ve kimyasal maddelerin etkinliklerinin ölçülmesi için iyi bir test sistemi oluşturmaktadır.

Dental maddelerin in vitro etkinlikleri ilk defa Kawahara ve arkadaşları tarafından tarif edilmekle beraber kanal dolgu maddelerinin doku kültürlerindeki in vitro etkinlikleri ilk defa Tomii ve arkadaşları ile Maizumi ve Sauerwein tarafından gösterilmiştir(2). Endodontik maddelerin etkinliklerini hücre kültürleri üzerinde ilk araştıranlar Kerestezi-Kellner ile Rappaport ve arkadaşlarıdır(2).

Hücre kültürleri genotipik ve fenotipik özellikleri yönünden bazı farklılıklar içermektedirler. Ancak kanal dolgu maddeleri içerdikleri kimyasal maddeler yönünden heterojendirler. Kanal dolgu maddelerinin içerisinde bulunan her maddenin hücrenin kendisi, metabolizması veya metabolizma ürünleri üzerindeki etkinliği farklı olacaktır.

Hücre kültürlerini genotipik ve fenotipik özelliklerine göre üç grupta toplayabiliriz.

- 1- Primer hücre kültürleri
- 2- Diploid hücre kültürleri
- 3- Devamlı hücre kültürleri

Primer ve diploid hücre kültürleri yaşayan konaktan ayrıldıktan sonra belirli bir yaşam sürecine sahiptirler. Orjinal konağın tüm fenotipik ve genotipik (Kromozom sayısı ve şekli) özelliklerini aynen taşırlar yani euploiddirler. Buna karşın devamlı hücre kültürleri orjinal konağın genotipik ve fenotipik özelliklerinden ayrıcalıklar gösterirler. Bu ayrıcalıklar devamlı hücre kültürlerine sonsuz pasaj edilebilme ve yaşam özelliği verir. Genotipik olarak devamlı hücre kültürleri aneuploiddirler.

İlk anda primer, diploid ve devamlı hücre kültürlerinin denenen bazı maddelerin toksik etkilerine farklı cevap verecekleri düşünülse de daha önce yapılan çalışmalarda bu farklılık gösterilememiştir(2). Euploid ve aneuploid hücre kültürleri genotipik ve fenotipik yönden farklıdırlar. Ancak bu farklılık kanal dolgu maddelerine olan duyarlılığı etkileyecek faktörler değildir.

Farklı kanal dolgu maddelerinin doku kültürlerinde toksik olma şekli kimyasal yapıları nedeniyle farklıdır. Örneğin öjenol hücre proteinlerini koagüle ederek toksik etki göstermesine karşın, iodin hücre enzim sistemi üzerinde inhibisyona neden olmaktadır(2). Ancak bütün bu etkilerin sonucunda direkt olarak hücre canlılığı kaybolmakta veya hücrenin üreme özelliği (mitoz) durmaktadır. Kanal dolgu maddelerinin hücre kültürleri üzerindeki toksik etkisinin hangi mekanizmayla olduğundan ziyade toksik olup olmadığı pratik yönden daha fazla önem taşımaktadır. Bu gayeye yönelik olarak yapılan çalışmalar göstermiştir ki; kullanılan hücre tipinden veya inhibisyonun mekanizmasından ziyade maddenin hücre canlılığı üzerindeki etkisi daha önemlidir.

Bazı çalışmalarda hücre kültürleri yerine organ kültürleri (tissue explant) kullanılmıştır. Organ kültürünün kullanılması ilk bakışta daha cazip görülmekle birlikte toksik materyalin etkinliği bu tür sistemde sadece histolojik olarak tarif edilebilir. Buna karşın hücre kültürlerinin kullanılma avantajı hücrenin canlılığı ve mitoz oranına etkisi yönünden de kinetik olarak çalışılabilmesidir(2). Bu nedenle literatürde kanal dolgu maddeleri ile yapılan çalışmalarda hücre kültürleri daha ön sırayı almaktadır.

Biyomateriyallerin hücre kültürleri üzerindeki etkinliğini göstermede yirmiden fazla yöntem olduğu belirtilmektedir(3). Bu yöntemlerin toksik maddeyi ölçme yönünden uygulanışları, duyarlılıkları, özgüllükleri farklıdır. Kanal dolgu maddelerinin toksik etkilerini araştırabilmek için kullanılan yöntemler önem taşımaktadır. Bu nedenle toksik etkiyi ölçmek için kullanılan yöntemlerden bazıları geçerli olarak kabul edilmektedir(2,3,33).

Standardizasyonun daha iyi sağlanması ve sonuçların güvenilir olmasını sağlamak amacıyla kanal dolgu maddelerinin toksik etkilerini ölçmek için birden fazla yöntemin kullanılması uygun olmaktadır.

Hücre kültürlerine olan toksik etkinliğin ölçülmesi için bugüne dek çeşitli teknikler pratige getirilmiştir. Bunlar arasında en çok kullanılan testler; agar overlay yöntemi, radiochromium release yöntemi, canlı hücre sayımı ve mitotik indeksin saptanması yöntemidir(2,3,33,34,35). Bütün bu yöntemlerde esas kanal dolgu maddelerinin içerisinde bulunan çözünebilir veya diffüze olabilir nitelikteki toksik maddelerin etkinliklerinin saptanmasıdır. Toksik maddelerin bu yöntemlerde etkinliği farklı şekillerde olabilmektedir. Örneğin bazı maddeler doğrudan hücre membranı üzerinde etki göstererek permeabiliteyi etkilemekte ve bunun sonucunda hücre erimesine ve ölmesine neden olmaktadır. Bazı maddeler ise hücre içerisine penetre olabilmekte ve hücre metabolik ürünleri üzerinde toksik etki göstermektedir(2).

Etki mekanizması ne olursa olsun yukarıda bahsedilen testler bu etkileri göstermek için geçerli olarak kabul edilebilir.

Şaher(36) çeşitli pulpa kaplama maddelerinin toksik etkilerini agar overlay yöntemi ve ayrışım solusyonu yöntemiyle hücre kültürleri üzerinde incelemiş her iki teknikte de benzer sonuçlar elde ettiğini rapor etmiştir.

Çalt(37) beş değişik kanal dolgu maddesinin sitotoksik etkilerini gerek ayrışım solusyonu yöntemi ve gerekse agar overlay yöntemi ile hücre kültürlerinde araştırmış her iki teknikte ulaştığı sonucun benzer olduğunu rapor etmiştir.

Onat(38) ise amalgam, isopast ve adaptic dolgu maddelerinin toksik etkilerini agar overlay ve ayrışım solusyonu yöntemleriyle hücre kültürlerinde araştırmış her iki yöntemdeki sonuçların benzerlik gösterdiğini belirtmiştir.

HEMOLİZ TESTİ:

Bazı araştırmacılar tarafından kullanılmamakla birlikte toksik maddelerin hücre membranına, dolayısıyla permeabilitesine olan etkinliğin gösterilmesi için kullanılabilecek diğer bir testtir. (3,29,30,31,33)

Grossman'a(1) göre ideal kanal dolgu maddesinde bulunması gereken özelliklerden birisi de, maddenin bakterisid etkiye sahip olması yada enazından bakterilerin üremesini teşvik etmemesidir. Bazı araştırmacılar kanal dolgu maddelerinin antibakteriyel etkiye sahip olması gerektiğini belirtirlerken diğer bazı araştırmacılar ise bakterilerin üremesi için uygun bir ortam yaratmamalarının yeterli olacağını ifade etmektedirler(39). Orstavik(39) yüksek antibakteriyel etkiye sahip maddelerin yüksek oranda da sitotoksik olduklarını belirtmiştir.

Örneğin Endomethasone içerisinde antibakteriyel etkiye sahip timol ioddid, paraformaldehit ve öjenol bulunmaktadır ve bunların sitotoksik maddeler olduğu bilinmektedir(5b,40).

CRCs de antibakteriyel etki yapan kalsiyum hidroksit ve öjenol mevcuttur ve bu maddelerin sitotoksik olduğu bilinmektedir(5b,40,43,44).

Pupo ve arkadaşları(41) ile Seven ve arkadaşları(42) yapılan çalışmalarda çeşitli kanal dolgu maddelerinin Gram (+) ve Gram (-) bakteriler üzerindeki antibakteriyel etkinliğini araştırmışlar ve madde içeriği yönünden tartışmışlardır.

Ayrıca bugüne kadar yapılan çalışmalar Orstavik(39) tarafından karşılaştırılmalı olarak verilmiştir.

Genellikle antimikrobiyal etkinin ölçülmesi için iki yöntem kullanılmaktadır. Bunlardan birincisi disk diffüzyon yöntemi, diğeri ise tüp dilüsyon yöntemidir(3).

Disk diffüzyon yönteminde, belirli miktarlarda ölçülecek antimikrobiyal maddenin emdirildiği kağıt diskler bakteri çiminin ekildiği agara uygulanmakta ve meydana gelen zon çapı ölçülerek değerlendirme yapılmaktadır.

Tüp dilüsyon yönteminde ise sıvı halinde bulunan test edilecek antimikrobiyal madde üzerine bakteri ilave edilmekte ve inhibisyon çeşitli yöntemlerle saptanmaktadır.

Pratikte en çok kullanılan yöntem disk diffüzyon yöntemidir. Maddenin emdirildiği disk etrafında oluşan inhibisyon çapı ölçülerek bakterinin o maddeye duyarlılığı; duyarlı, orta derecede duyarlı veya rezistan olarak ifade edilmektedir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamızda kullanılan kanal dolgu maddeleri:

- 1-Sankin Apatite tip I
- 2-Sankin Apatite tip II
- 3-Sankin Apatite tip III
- 4-Endomethasone
- 5-Dorifill
- 6-Express
- 7-Spad
- 8-CRCS'dir

Kanal Dolgu Maddelerinden Ayrışım Solusyonu Eldesi:

Yukarıda adı verilen kanal dolgu maddelerinin in vitro sitotoksik etkilerini canlı hücre sayımı ile göstermek amacıyla ayrışım solusyonları hazırlanmıştır.

Bunun için kanal dolgu maddeleri firmaları tarafından önerilen oranlarda karıştırıldıktan sonra 10cm çapında cam petri kutularının ortasına 1cm çapında daha önceden işaretlenmiş olan dairesel alanlara yayıldı. Yayılan kanal dolgu maddelerinin yüksekliği 2mm yi geçmeyecek şekilde ayarlandı.

Daha sonra kanal dolgu maddesi konulan herbir petri kutusuna 10ml %10 FCS (fötal dana serumu) içeren MEMO (minimal essential medium autoclavable) vasatı ilave edildi. 48 saat 37'C lik etüvde bekletilen petrilerden ayrışım sıvıları toplanarak "Zeitz" filtresinden süzüldü ve böylece ayrışım solusyonları elde edilmiş oldu (Şekil.1).



Şek.1 Ayırışım solusyonu hazırlanması (inkübasyondan önce)

Hücre Kültürleri:

Vero (African Green Monkey Kidney) hücreleri ; maymun böbrek devamlı hücre kültürleri olup, orijinal olarak Flow laboratuvarları, Irwine, fskoçyadan elde edilmiş olup, seri pasajlar halinde devam ettirilmektedir. Hücrelerin üretiminde %10 FCS, mililitrede 100 ünit Penisilin +100µgr Streptomisin içeren MEMO vasatı kullanıldı. Hücreler pasaj sırasında %0,25 lik tripsin ile muamele edildikten sonra santrifüj edilerek ve üretme vasatında sulandırılarak yeni ~~vi~~felere veya tüplere ekildiler.

BHK-21 (Baby Hamster Kidney) devamlı hücre kültürü orijinal olarak Glasgow üniversitesi, viroloji enstitüsünden elde edilmiş olup fibroblastik morfolojili hücrelerdir.

BHK-21 hücrelerinin üretimi için %10 FCS, %10 Triptose Phosphate Broth ve mililitrede 100 ünit Penisilin + 100µgr Streptomisin içeren MEMO vasatı kullanıldı.

BHK-21 hücreleride yukarıda Vero hücre kültürleri için yukarıda tarif edilen ~~ve~~kilde pasaj edildiler.

Kanal Dolgu Maddeleri Ayrışım Solusyonlarının Hücre Kültürlerindeki Etkilerinin Canlı Hücre Sayımı ile Saptanması:

Kanal dolgu maddelerinin ayrışım solusyonlarının sitotoksik etkilerini saptayacağımız hücreler tripsin ile muamele edildikten sonra üretme vasatı ile sulandırılıp 16*1,5cm büyüklüğündeki lastik tıpalı hücre kültürü tüplerine 5×10^3 yoğunlukta olmak üzere 2ml konuldu. Hücreler 37°C de tek tabaka hücre kültürü oluşturmaları için 48 saat inkübe edildiler. İnkübasyon sonucunda vasatlar dökülüp yerine kanal dolgu maddelerinden elde edilen ayrışım solusyonları konuldu. Her ayrışım solusyonu için 8 tüp hazırlanarak 0, 24, 48 ve 72. saatlerde çift tüp kullanılarak hücre sayımı yapıldı. 0. saatte yapılan hücre sayımı başlangıç hücre sayısını belirledi.

Hücre sayımı yapmak için hücrelerin tüplerdeki vasatları dökülerek bir kere PBS (Phosphate Buffered Saline) ile iki defa ise 1ml tripsin + 1ml versen solusyonu karışımı ile yıkanarak 37°C de hücreler ayrışana kadar bekletildiler. Tek tek ayrılan hücreler 1ml PBS içerisine konulduktan sonra %1 lik tripan mavisi solusyonundan 0.1ml ilave edilerek Thoma kamerasından mikroskop altında hücre sayımı yapıldı.

Mikroskop altında boyanmayan parlak hücreler canlı olarak kabul edilip sayıldılar. Sayım sırasında her defasında iki alan sayılarak ortalaması alındı. Bu ortalama 10^4 ile çarpıldığında her tüpteki canlı hücre sayısını ifade etmekte idi.

Ayrıca ayrışım solusyonları hem Vero hem BHK hücre tüplerine konularak oluşturdıkları sitotoksik etkinin kaydedilmesi ve resimlenmesi için kullanıldı.

Kanal Dolgu Maddelerinin İnsan O Grubu Eritrositleri Üzerindeki Hemolitik Aktivitesinin Araştırılması:

Kanal dolgu maddelerinin insan O grubu eritrositleri üzerindeki hemolitik aktivitesi üç şekilde test edildi.

1-Likit kısımlarının hemolitik aktivitesi

2-Toz kısımlarının hemolitik aktivitesi

3-Maddelerin firmaları tarafından önerilen oranlarda karıştırıldıktan ve 48 saat rutubetli ortamda sertleşmesi beklendikten sonra öğütülmesiyle elde edilen tozlarının hemolitik aktivitesi.

Hemolitik aktiviteye bakmak için mikroseroloji yönteminden yararlanıldı.

Toz kısımların hazırlanışı: Toz kısımlar 0,1 gr tartılarak serolojik tüpler içerisine konuldu üzerine 0,1ml (4 damla) serum fizyolojik konuldu ve iyice süspanse edildi.

Likit kısımlar ise doğrudan "Uplate" in ilk çukuruna 1 damla damlatılmak suretiyle kullanıldı.

Test aşağıdaki şekilde uygulandı:

1-Testin yapılacağı "Uplate" çukurlarına önce 1 damla (0,025ml) serum fizyolojik damlatıldı.

2-Daha sonra dilüsyonu yapılacak kanal dolgu maddesi kısmı 0,025ml kapasiteli loop (mikrodiluter) ile alınıp 1/2 dilüsyondan başlamak üzere seri dilüsyonlar yapıldı.

3-Bütün çukurlara bir damla daha serum fizyolojik ilave edildi.

4-Daha sonra bütün test çukurlarına 2şer damla (0,05ml) önceden 3 kere serum fizyolojik ile santrifugasyonla yıkanan %0,5 lik insan O grubu eritrositleri ilave edildi.

5-Kontrol çukurlarına ise 2 damla (0,05ml) serum fizyolojik ve 2 damla (0,05ml) %0,5 lik insan O grubu eritrositi ilave edildi.

6-Bütün testlerde plate'ler 37'C lik inkübatörde 2 saat inkübe edildiler. İnkübasyonun ilk 1 saatinin her 10 dakikasında homojen bir karışım sağlanması için plateler sallanarak karıştırıldı.

Sonuçlar hemolizin meydana gelmesi oranında aşağıdaki şekilde değerlendirildi;

0H: Hemoliz yok
1H: %25 hemoliz
2H: %50 hemoliz
3H: %75 hemoliz
4H: Tam hemoliz

Bazı kanal dolgu maddelerinin içerisinde bulunan fiksatifler nedeniyle eritrositler fiksasyona uğramıştır. Bu görünüm ise "F" olarak değerlendirildi.

Kanal Dolgu Maddelerinin Çeşitli Gram (+) ve Gram (-) Bakteriler Üzerindeki Antibakteriyel Etkinliğinin Agar Disk Diffüzyon Yöntemiyle Araştırılması:

Antibakteriyel etki için kullanılan bakteri suşları α -hemolytic Streptococcus ve β -hemolytic Streptococcus Gram (+) bakteri olarak deneye alındılar. Her iki bakteride rutin mikrobiyoloji laboratuvarında yeni izole edilen suşlardı. Diğer bir Gram (+) bakteri olan Staphylococcus aureus ATCC 25923 (American Type Culture Collection) suşu olarak mevcuttu. Gram (-) bakteri olarak ise Escherichia coli (ATCC 25922) ve Pseudomonas aureginosa (ATCC 27853) kullanıldı.

Antimikrobiyal aktivitenin ölçülmesi için bakteriler; buvyona ekilerek 1 gece 37'C de etüvde bekletilerek üretildiler. Ertesi gün homojen bulanıklıkta üremiş olan bakteri kültürlerinden eküvyon yardımı ile alınarak DST (Drug Sensitivity Testing) agar üzerine homojen şekilde ekimleri yapıldı.

Test edilecek olan kanal dolgu maddeleri firmaların önerdiği şekilde karıştırıldıktan sonra antibiyotik içermeyen kağıt disklerle 1mm yüksekliğinde homojen olarak yayıldı. Bu diskler daha sonra steril bir pens yardımı ile ekim yapılan petri kutularının ortalarına yerleştirildi ve 37'Clik inkübatöre konularak 1 gece inkübe edildiler.

Ertesi gün petriler etüvden alınarak madde etrafında oluşan zon çapı milimetrik cetvelle ölçülerek kaydedildi.

BULGULAR

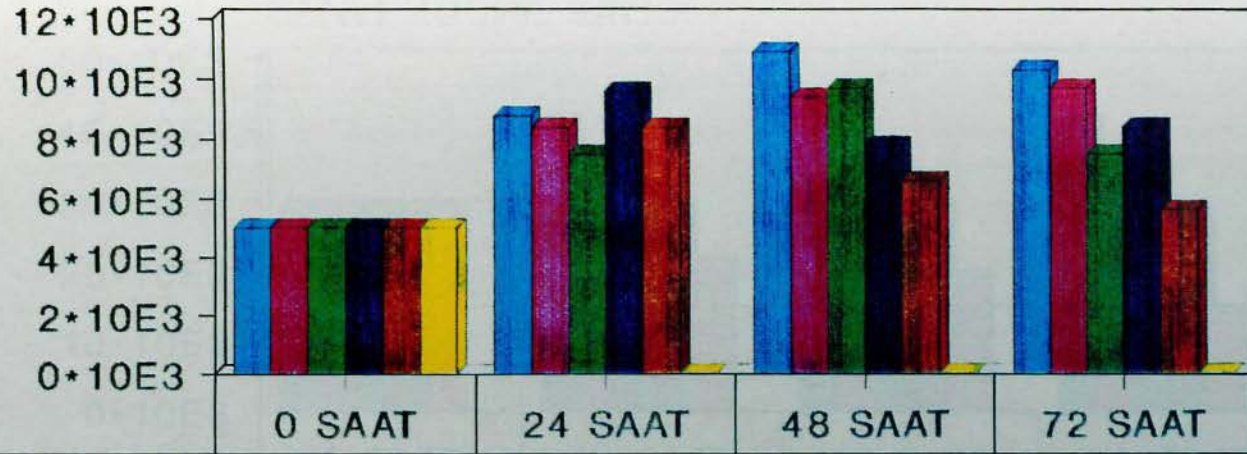
Sankin Apatite Tip I, Tip II, Tip III ve Diğer Kanal Dolgu Maddelerinin Hücre Kültürleri Üzerine Etkisinin Canlı Hücre Sayımı ile Araştırılması:

Kanal dolgu maddelerinden elde edilen ayrışım solusyonları tüpler içerisinde hazırlanmış 48 saatlik Vero ve BHK hücreleri üzerine konuldu. Ayrıca 0 zaman örneği olarak iki tüp, hücre sayılarak ortalaması alındı. Ayrışım solusyonlarının hücre kültürleri üzerine tatbikinden 24, 48, 72 saat sonra hücre sayımı yapılarak sonuçlar kaydedildi.

Tablo.1 de Vero hücrelerinde kontrol ve Sankin apatite tip I Sankin apatite tip II, Sankin apatite tip III, CRCS, Express, Dorifill, Endomethasone, Spad ayrışım solusyonları ile elde edilen canlı hücre sayımları görülmektedir.

Başlangıç hücre sayısı $5 \cdot 10^3$ iken 72. saatte kontrolde hemen hemen iki katına çıkan sayıda hücre elde edilmiştir. Kontrole en yakın hücre sayımı veren ayrışım solusyonları sırası ile Sankin apatite tip I, Sankin Apatite tip III ve Sankin apatite tip II dir. CRCS ile 24. saatte hücre sayısında artış kaydedilmesine rağmen 72. saatte başlangıç hücre sayısına oranla azalma görülmektedir. Express, Dorifill, Endomethasone ve Spad ile 24. saatte başlamak üzere hücre sayısında sayım yapılamayacak oranda bir azalma kaydedilmiştir.

CANLI HÜCRE SAYISI

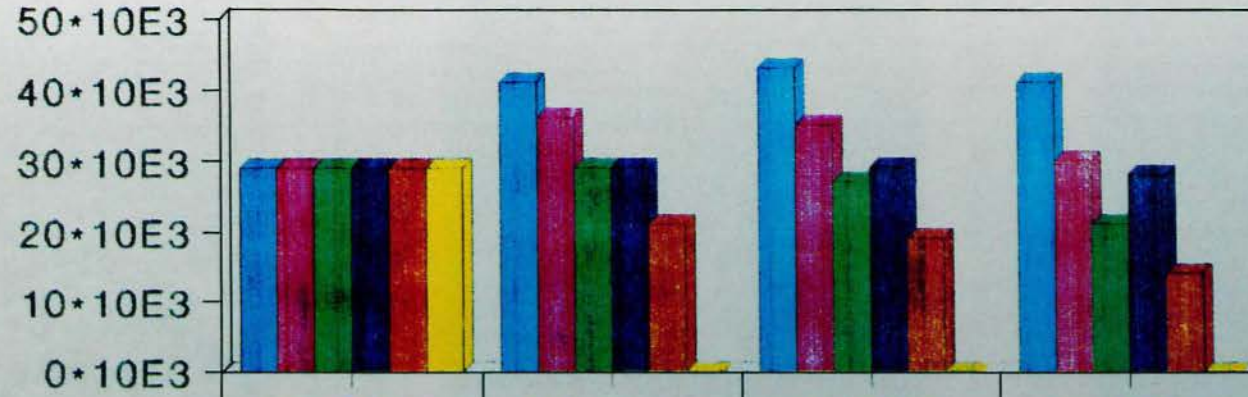


	0 SAAT	24 SAAT	48 SAAT	72 SAAT
KONTROL	5*10E3	8.8*10E3	10.9*10E3	10.3*10E3
S.A. TIP I	5*10E3	8.4*10E3	9.4*10E3	9.7*10E3
S.A. TIP II	5*10E3	7.5*10E3	9.7*10E3	7.5*10E3
S.A. TIP III	5*10E3	9.6*10E3	7.8*10E3	8.4*10E3
CRCS	5*10E3	8.4*10E3	6.6*10E3	5.6*10E3
EXP,DOR,END,SPAD	5*10E3	0*10E3	0*10E3	0*10E3

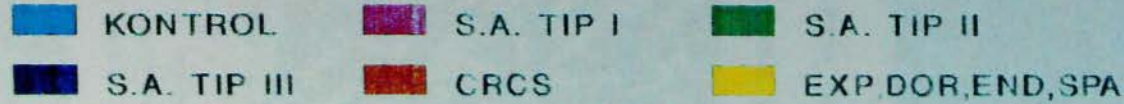
■ KONTROL ■ S.A. TIP I ■ S.A. TIP II
■ S.A. TIP III ■ CRCS ■ EXP,DOR,END,SPA

Tablo.1 Sankin Apatite tip I, tip II, tip III ve diğer kanaldolgu maddelerinin Vero hücre kültürleri üzerine etkisinin canlı hücre sayımı ile saptanması (10E3=10³)

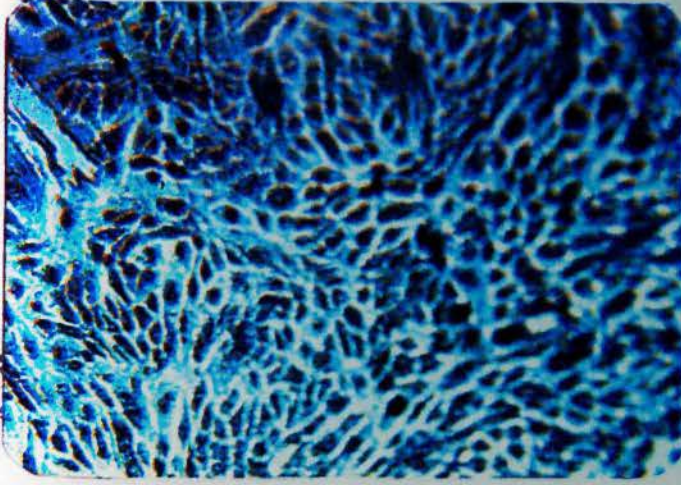
CANLI HUCRE SAYISI



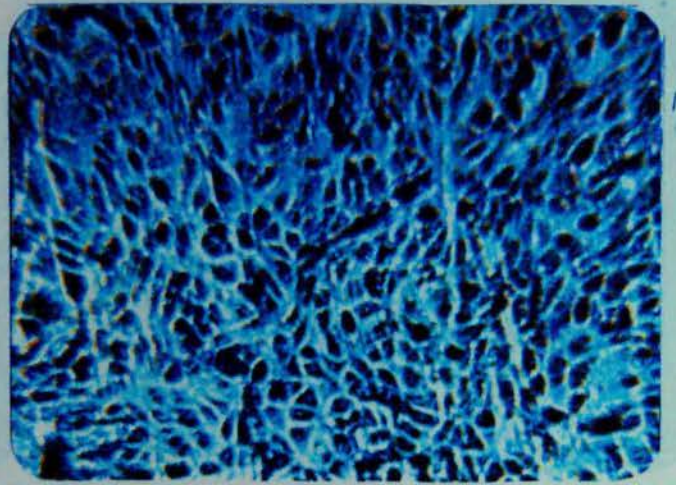
	0 SAAT	24 SAAT	48 SAAT	72 SAAT
KONTROL	29*10E3	41*10E3	43*10E3	41*10E3
S.A. TIP I	29*10E3	36*10E3	35*10E3	30*10E3
S.A. TIP II	29*10E3	29*10E3	27*10E3	21*10E3
S.A. TIP III	29*10E3	29*10E3	29*10E3	28*10E3
CRCS	29*10E3	21*10E3	19*10E3	14*10E3
EXP,DOR,END,SPAD	29*10E3	0*10E3	0*10E3	0*10E3



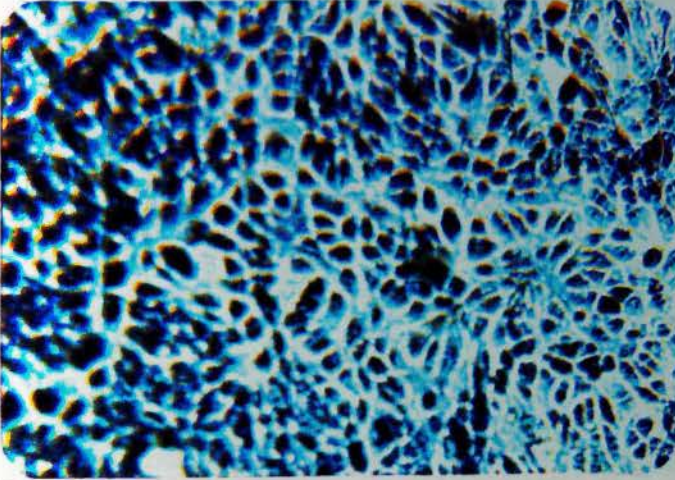
Tablo.2 Sankin Apatite tip I, tip II, tip III ve diğer kanal dolgu maddelerinin BHK hücre kültürleri üzerine etkisinin canlı hücre sayımı ile saptanması ($10E3=10^3$)



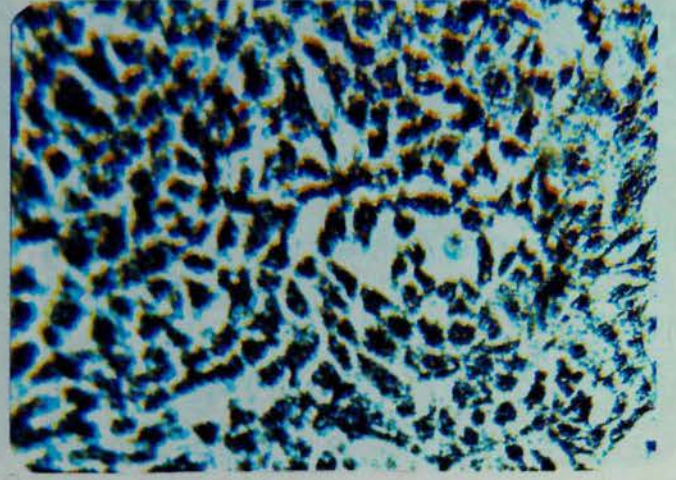
Sekil 2a Normal Vero hücre kültürü,
0 zaman
(Büyütme 50X, Giemsa boyası ile).



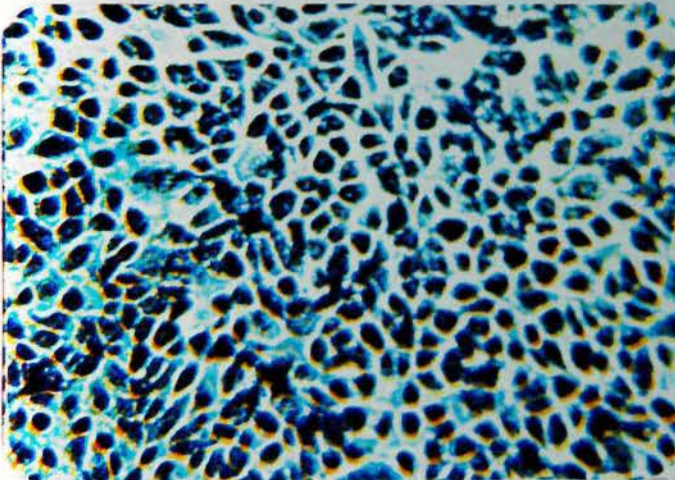
Sekil 2b Normal Vero hücre kültürü,
72 inci saat
(Büyütme 50X, Giemsa boyası ile).



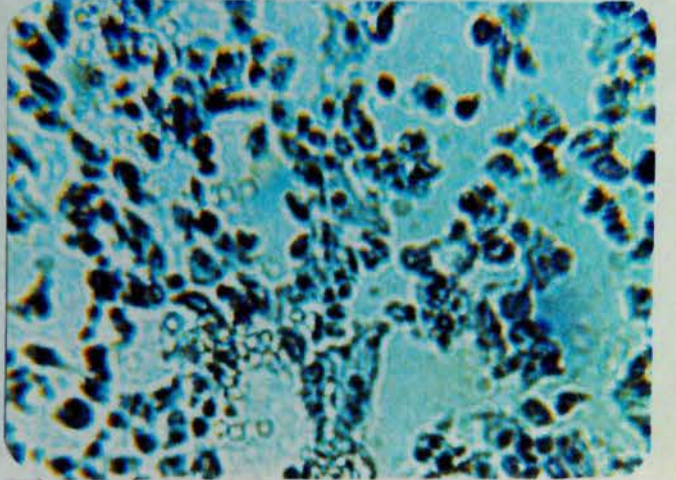
Sekil 2c SA tip I ayrışım
solüsyonunun Vero hücre kültürleri
üzerine 72 saat sonraki etkisi.
(Büyütme 50X, Giemsa boyası ile).



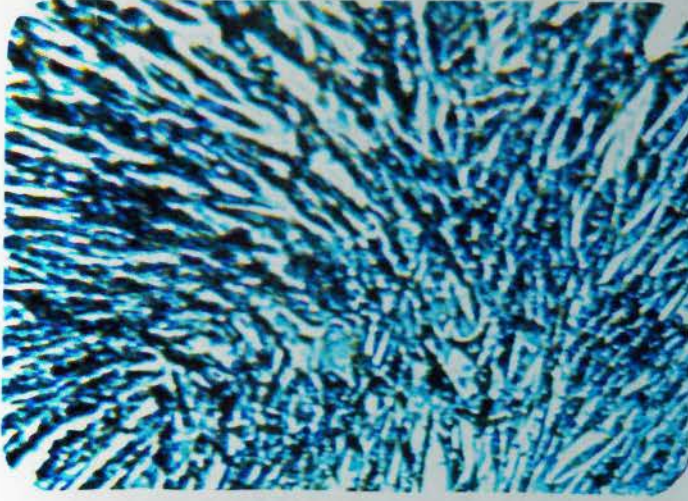
Sekil 2d SA tip II ayrışım
solüsyonunun Vero hücre kültürleri
üzerine 72 saat sonraki etkisi.
(Büyütme 50X, Giemsa boyası ile).



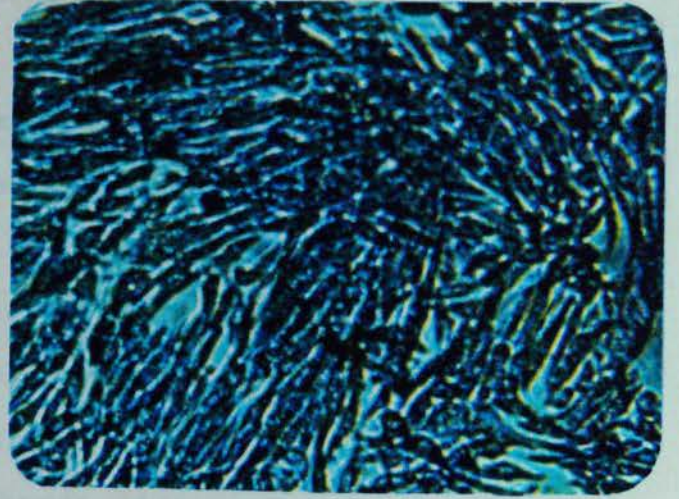
Sekil 2e SA tip III ayrışım
solüsyonunun Vero hücre kültürleri
üzerine 72 saat sonraki etkisi.
(Büyütme 50X, Giemsa boyası ile).



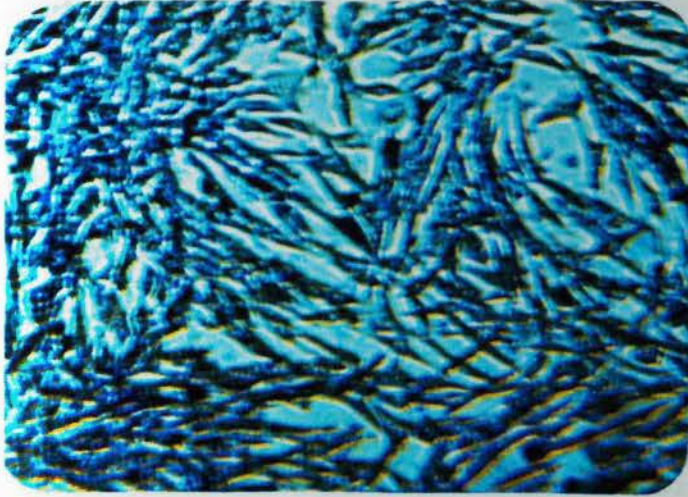
Sekil 2f CRCS ayrışım solüsyonunun
Vero hücre kültürleri üzerine 72
saat sonraki etkisi.
(Büyütme 50X, Giemsa boyası ile).



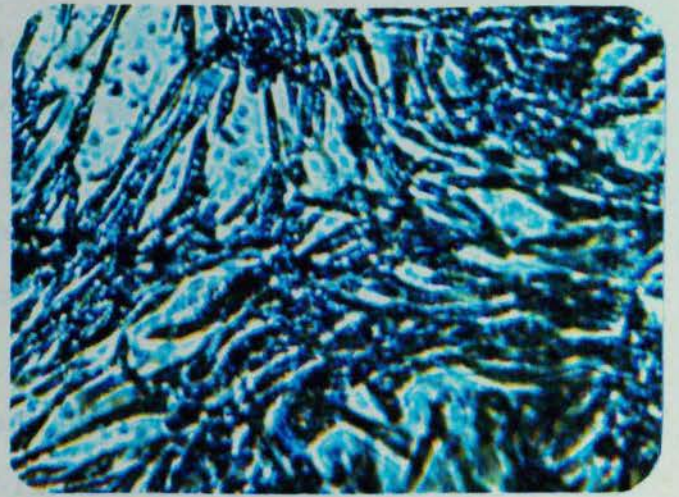
Sekil 3a Normal BHK hücre kültürü,
0 zaman
(Büyütme 50X, Giemsa boyası ile).



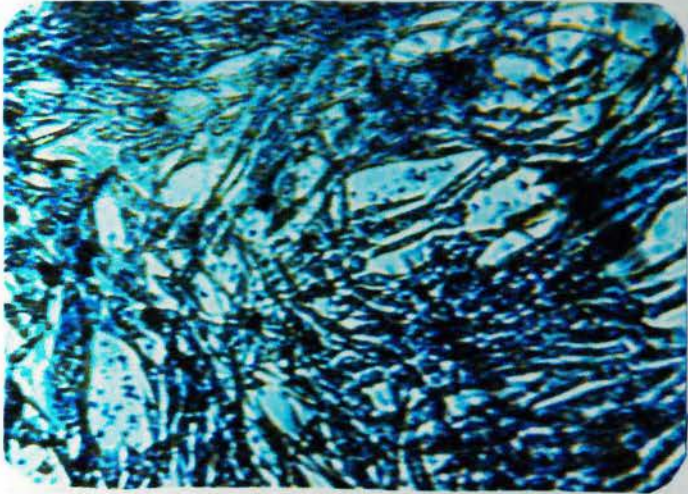
Sekil 3b Normal BHK hücre kültürü,
72 inci saat
(Büyütme 50X, Giemsa boyası ile).



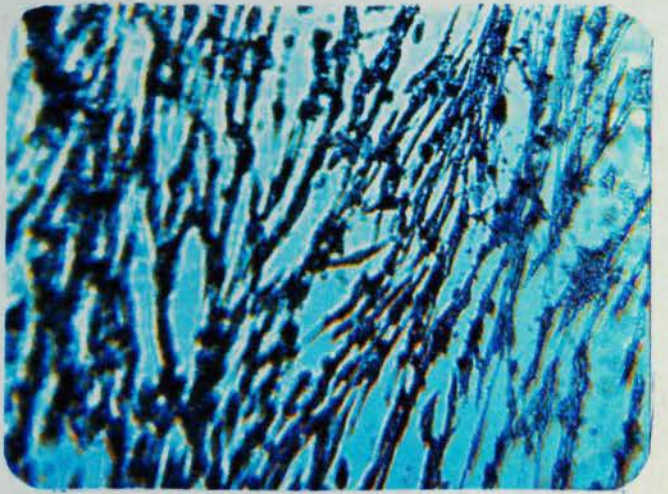
Sekil 3c SA tip I ayrışım
solüsyonunun BHK hücre kültürleri
üzerine 72 saat sonraki etkisi.
(Büyütme 50X, Giemsa boyası ile).



Sekil 3d SA tip II ayrışım
solüsyonunun BHK hücre kültürleri
üzerine 72 saat sonraki etkisi.
(Büyütme 50X, Giemsa boyası ile).



Sekil 3e SA tip III ayrışım
solüsyonunun BHK hücre kültürleri
üzerine 72 saat sonraki etkisi.
(Büyütme 50X, Giemsa boyası ile).



Sekil 3f CRCS ayrışım solüsyonunun
BHK hücre kültürleri üzerine 72
saat sonraki etkisi.
(Büyütme 50X, Giemsa boyası ile).

Fibroblastik morfoloji içeren BHK hücrelerinde ise canlı hücre sayımı yönünden alınan sonuçlar Vero hücre kültürlerinde alınan sonuçlara paralellik göstermektedir (Tablo.2). BHK hücrelerinde 0 zaman hücresi 29×10^3 iken kontrol 72 saat içerisinde 41×10^3 sayısına yükselmiştir. Kontrol kadar sayıda artma olmamakla beraber Sankin apatite tip I, Sankin apatite tip III sayılarında herhangi bir göze çarpan azalma olmamıştır. BHK hücreleri Sankin apatite tip II'den diğer Sankin apatite'lara oranla daha çok etkilenmiştir. CRCS ayrışım solusyonu ise canlı hücre sayısını 72. saatte 0 zamanın yarı sayısına indirecek oranda etkin olmuştur. BHK hücrelerinde Express, Dorifill, Endomethasone ve Spad ayrışım solusyonları Vero hücrelerinde olduğu gibi 24 saat içerisinde canlı hücre sayımı yapılamayacak derecede bir azalmaya neden olmuştur (Tablo.2).

Vero hücrelerinde elde edilen morfolojik değişiklikler Şekil.2 deki resimlerde görülmektedir. Şekilde de görüldüğü gibi Sankin apatite tip I, Sankin apatite tip III ile muamele edilmiş Vero hücrelerinin morfolojilerinde göze çarpan bir değişiklik olmamakla birlikte Sankin apatite tip II ile muamele edilen hücrelerde kısmi dejenerasyon CRCS ile muamele edilen Vero hücrelerinde ise göze çarpacak derecede dejenerasyon görülmektedir. Aynı sonuçlar Şekil.3 te verilen BHK hücre morfolojileri ile de paralellik göstermektedir.

Sankin Apatite Tip I. Tip II. Tip III ve Diğer Kanal Dolgu Maddelerinin İnsan O Grubu Eritrositleri Üzerindeki Hemolitik Aktivitelerinin Araştırılması:

Kanal Dolgu Maddelerinin Likit Kısımlarının Hemolitik Aktivite Sonuçları:

Sankin apatite tip I, tip II ve tip III'ün likit kısımlarının seri dilüsyonları yapıldıktan sonra insan O grubu eritrositleri ile muamele edildiklerinde, Sankin apatite tip I ile 1/32 dilüsyonda, tip II ile 1/64 dilüsyonda ve Sankin apatite tip III ile yine 1/32 dilüsyonda tam hemoliz alınmıştır(Şekil.4). Daha sonraki ilk dilüsyonda hemoliz azalmış ve ondan sonra kaybolmuştur.

Spad LD ile 1/32 dilüsyonda tam hemoliz alınmış, Spad L ile ise 1/1(saf) dilüsyonda tam hemoliz elde edilmiştir(Şekil.6).

Diğer kanal dolgu maddeleri olan Express, CRCS, Endomethasone ve Dorifill ile plate'in son dilüsyonu olan 1/2048 dilüsyonda dahi tam hemoliz elde edilmiştir. Bunun üzerine deney bir kere daha ileri dilüsyonlarında çalışılarak tekrarlanmıştır.

Bu ileri dilüsyonlar çalışılan deneyin sonuçları Şekil.7 de görülmektedir. Buna göre Express, Dorifill ve Endomethasone 1/8192 dilüsyonda son tam hemolizi vermiş, CRCS nin ise son tam hemolizi 1/2048 dilüsyonda kalmıştır.

Hemoliz sonuçlarına göre Sankin Apatite tip I, tip II, tip III, Spad LD ve Spad L diğer kanal dolgu maddeleri likit kısımlarına göre daha az hemolitik aktiviteye sahiptirler.

Kanal Dolgu Maddelerinin Toz Kısımlarının Hemolitik Aktivite Sonuçları:

Sankin apatite tip I, Sankin apatite tip II ve Sankin apatite tip III'ün toz kısımlarının dilüsyonları ile elde edilen sonuçlar Şekil.4 te görülmektedir.

Sankin apatite'in her üç tipinin toz kısımları son tam hemolizi 1/4 dilüsyonda oluşturmışlardır(Şekil.4).

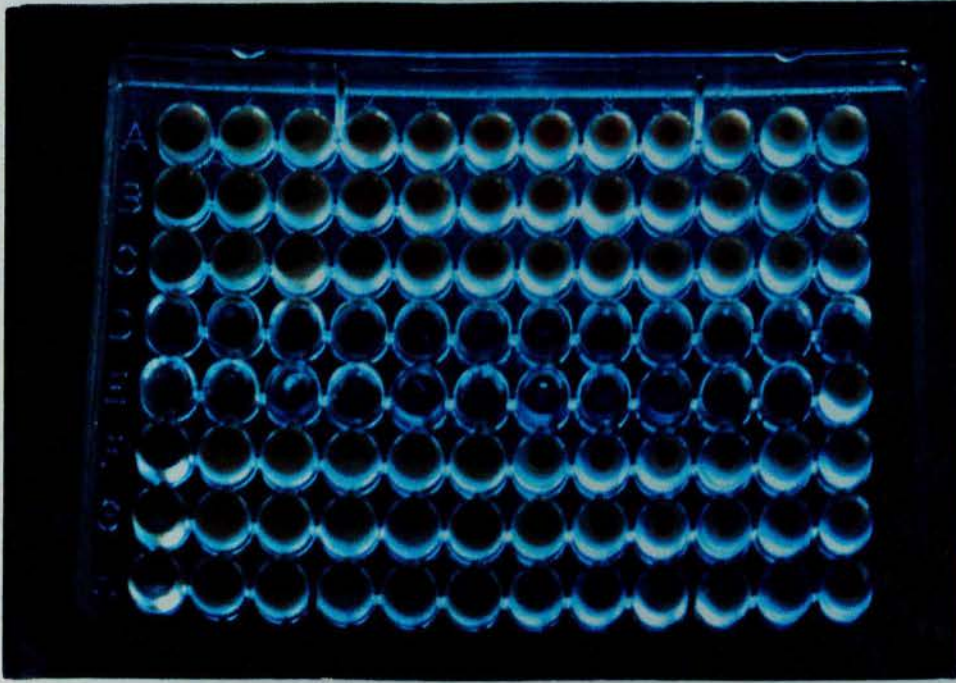
Spad, Express, CRCS, Endomethasone ve Dorifill'in toz kısımlarının hemolitik aktivite sonuçları Şekil.5 te verilmiştir.

Buna göre Spad ve Express'in toz kısımları 1/16 dilüsyonlarında, CRCS'nin toz kısmı 1/128 dilüsyonda, Endomethasone ve Dorifill'in toz kısımları 1/64 dilüsyonlarında son tam hemolizi vermiştir.

Toz kısımlar kullanılarak yapılan hemolitik aktivite sonuçlarında likit kısımlar kullanılarak yapılan hemolitik aktivite sonuçlarına benzerlik göstermektedir. Yani Sankin apatite tip I, tip II, tip III'ün toz kısımları diğer kanal dolgu maddelerinin toz kısımlarından daha az hemolitik aktiviteye sahiptirler.

Reaksiyon Tamamlandıktan Sonra Maddelerin Öğütülmesiyle Elde Edilen Tozların Hemolitik Aktivite Sonuçları:

Reaksiyon tamamlandıktan sonra öğütülen tozlar ile yapılan hemolitik aktivite deneylerinde Sankin apatite tip I, tip II, tip III ile alınan sonuçlar diğer kanal dolgu maddeleriyle alınan sonuçlarla birlikte Şekil.8 de görülmektedir.



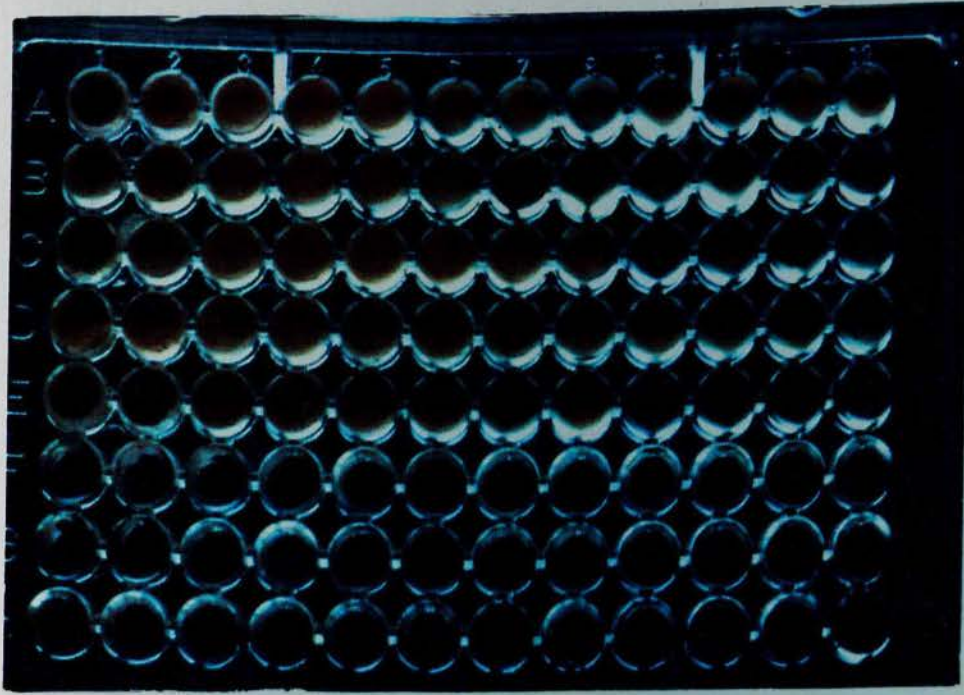
	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/2048	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	4H	4H	4H	3H	1H	0H	0H	0H	0H	0H	0H	0H	SA tip I,
B	4H	4H	4H	2H	1H	0H	0H	0H	0H	0H	0H	0H	SA tip II
C	4H	4H	4H	2H	1H	0H	0H	0H	0H	0H	0H	0H	SA tip III
D													
E												0H	KONTROL
F	4H	4H	4H	4H	4H	4H	1H	0H	0H	0H	0H	0H	SA tip I
G	4H	4H	4H	4H	4H	4H	4H	2H	0H	0H	0H	0H	SA tip II
H	4H	4H	4H	4H	4H	4H	2H	0H	0H	0H	0H	0H	SA tip III

Testin değerlendirilmesi: 0H: Hemoliz yok
1H: 25% hemoliz
2H: 50% hemoliz
3H: 75% hemoliz
4H: Tam hemoliz
F: Eritrositlerin erimeden fiske olması

TOZ

LIKİT

Şek.4 Sankin Apatite tip I, II ve III ün toz ve likit kısımlarının insan O grubu eritrositleri üzerine hemolitik aktivitesi.



	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/2048	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	4H	4H	4H	4H	4H	3H	2H	1H	0H	0H	0H	0H	SPAD
B	4H	4H	4H	4H	4H	3H	2H	0H	0H	0H	0H	0H	EXPRESS
C	4H	4H	4H	4H	4H	4H	4H	4H	1H	0H	0H	0H	CRC8
D	4H	4H	4H	4H	4H	4H	4H	3H	2H	0H	0H	0H	ENDOMET.
E	4H	4H	4H	4H	4H	4H	4H	3H	1H	0H	0H	0H	DORIFILL
F													
G													
H												0H	KONTROL

Testin değerlendirilmesi: 0H: Hemoliz yok

1H: 25% hemoliz

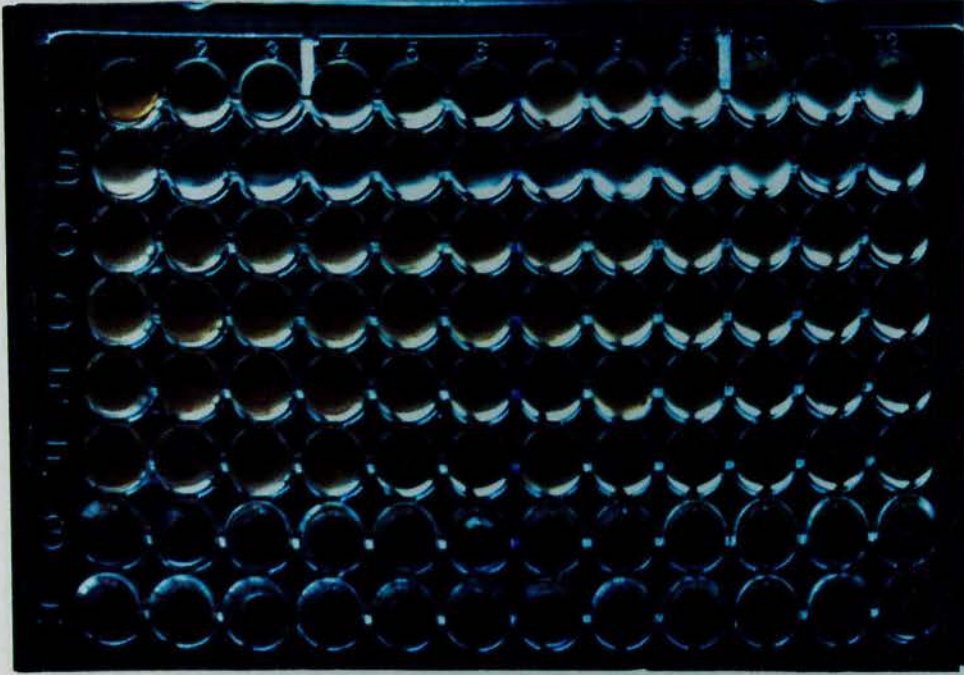
2H: 50% hemoliz

3H: 75% hemoliz

4H: Tam hemoliz

F: Eritrositlerin erimeden fiks olmaları

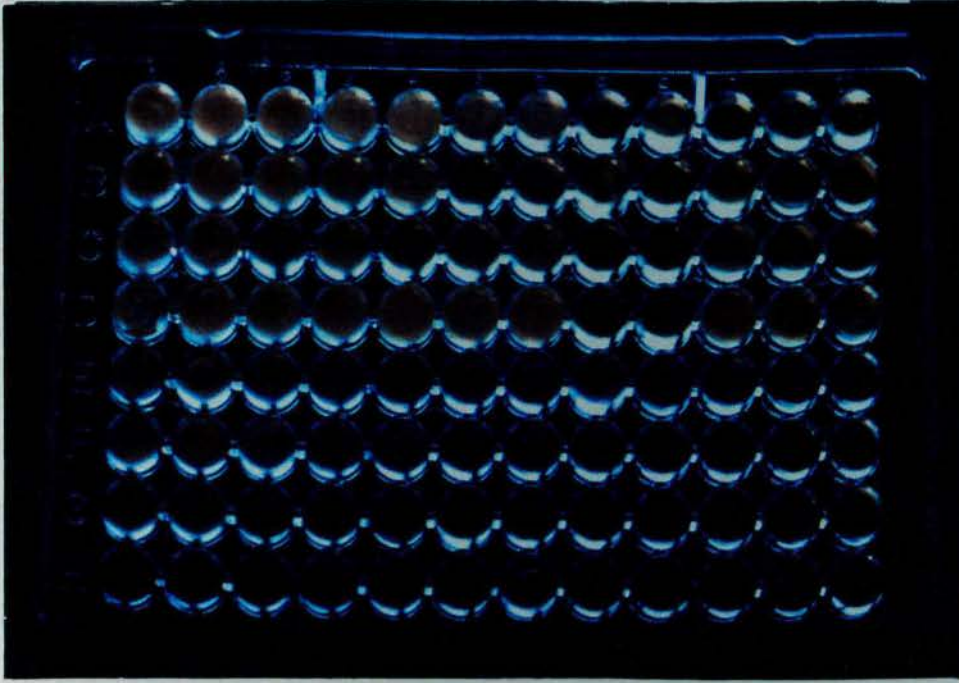
Şek.5 Çeşitli kanal dolgu maddelerinin toz kısımlarının insan O grubu eritrositleri üzerine hemolitik aktivitesi



	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/2048	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	4H	4H	4H	4H	4H	4H	3H	1H	0H	0H	0H	0H	SPAD LD
B	4H	1H	0H	0H	0H	0H	0H	0H	0H	0H	0H	0H	SPAD L
C	4H	4H	4H	4H	4H	4H	4H	4H	4H	4H	4H	4H	EXPRESS
D	4H	4H	4H	4H	4H	4H	4H	4H	4H	4H	4H	4H	CRC8
E	4H	4H	4H	4H	4H	4H	4H	4H	4H	4H	4H	4H	ENDOMET.
F	4H	4H	4H	4H	4H	4H	4H	4H	4H	4H	4H	4H	DORIFILL
G													
H													

Testin değerlendirilmesi: 0H: Hemoliz yok
 1H: 25% hemoliz
 2H: 50% hemoliz
 3H: 75% hemoliz
 4H: Tam hemoliz
 F: Eritrositlerin erimeden fiks olması

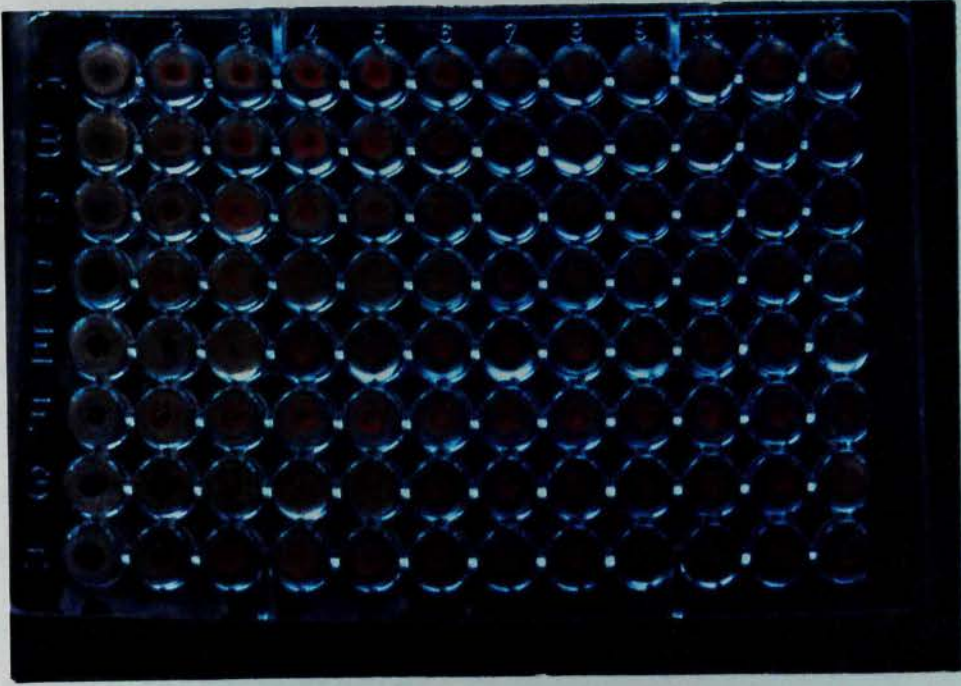
Şek.6 Çeşitli kanal dolgu maddelerinin likit kısımlarının insan O grubu eritrositleri üzerine hemolitik aktivitesi



	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/2048	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	4H	4H	4H	4H	4H	4H	4H	4H	4H	4H	4H	4H	EXPRESS
B	4H	4H	4H	4H	4H	4H	4H	4H	4H	4H	4H	4H	DORIFILL
C	4H	4H	4H	4H	4H	4H	4H	4H	4H	4H	4H	4H	ENDOMET.
D	4H	4H	4H	4H	4H	4H	4H	4H	4H	4H	4H	4H	CRC8
E	4H	4H	2H	1H	0H	0H	0H	0H	0H	0H	0H	0H	EXPRESS
F	4H	4H	0H	0H	0H	0H	0H	0H	0H	0H	0H	0H	DORIFILL
G	4H	4H	1H	0H	0H	0H	0H	0H	0H	0H	0H	0H	ENDOMET.
H	2H	1H	0H	0H	0H	0H	0H	0H	0H	0H	0H	0H	CRC8
	1/4096	1/16384											
		1/8192	1/32768										

Testin değerlendirilmesi: 0H: Hemoliz yok
 1H: 25% hemoliz
 2H: 50% hemoliz
 3H: 75% hemoliz
 4H: Tam hemoliz
 F: Eritrositlerin erimeden fiks olması

Şek.7 Çeşitli kanal dolgu maddelerinin likit kısımlarından yapılan ileri dilüsyonlarının insan O grubu eritrositleri üzerine hemolitik aktivitesi



	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/2048	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	F	F	F	F	OH	OH	OH	OH	OH	OH	OH	OH	SA tip I
B	F	F	F	F	F	OH	OH	OH	OH	OH	OH	OH	SA tip II
C	F	F	F	F	OH	OH	OH	OH	OH	OH	OH	OH	SA tip III
D	4H	4H	4H	4H	4H	2H	OH	OH	OH	OH	OH	OH	SPAD
E	4H	4H	4H	2H	OH	OH	OH	OH	OH	OH	OH	OH	CRCS
F	F	F	F	F	OH	OH	OH	OH	OH	OH	OH	OH	ENDOMET.
G	4H	4H	4H	4H	4H	2H	OH	OH	OH	OH	OH	OH	DORIFILL
H	F	F	F	F	F	F	OH	OH	OH	OH	OH	OH	EXPRESS

Testin değerlendirilmesi: OH: Hemoliz yok

1H: 25% hemoliz

2H: 50% hemoliz

3H: 75% hemoliz

4H: Tam hemoliz

F: Eritrositlerin erimeden fikse olması

Şek.8 Çeşitli kanal dolgu maddelerinin karıştırılıp reaksiyon tamamlandıktan sonra öğütülen tozlarının insan O grubu eritrositleri üzerindeki hemolitik aktivitesi

Sankin apatite tip I ve Sankin apatite tip III'ün 1/8 dilüsyona kadar eritrositlerin fiksasyonuna neden olduğu, Sankin apatite tip II'nin de 1/16 dilüsyonda aynı fiksasyona neden olduğu görülmektedir(Şekil.8).

Spad ve Dorifill 1/16 dilüsyona kadar tam hemoliz, CRCS 1/4 dilüsyona kadar tam hemolize neden olmuşlardır. Endomethasone 1/8 dilüsyona kadar, Express ise 1/32 dilüsyona kadar fiksasyona neden olmuştur.

Reaksiyon tamamlandıktan sonra öğütülen maddelerle elde edilen sonuçlar diğer kısımlarla elde edilen sonuçlarla uyumluluk göstermektedir.

Sankin Apatite Tip I, Sankin Apatite Tip II, Sankin Apatite Tip III ve Diğer Kanal Dolgu Maddelerinin Antibakteriyel Etkilerinin Agar Disk Diffüzyon Yöntemi ile Arastırılmasından Elde Edilen Sonuçları:

α -hemolytic Streptococcus, β -hemolytic Streptococcus, Staphylococcus aureus, Escherichia coli ve Pseudomonas aureginosa bakterilerinin Sankin apatite tip I, tip II, tip III ve diğer kanal dolgu maddelerine duyarlılıkları agar disk diffüzyon yöntemi ile çalışılmıştır.

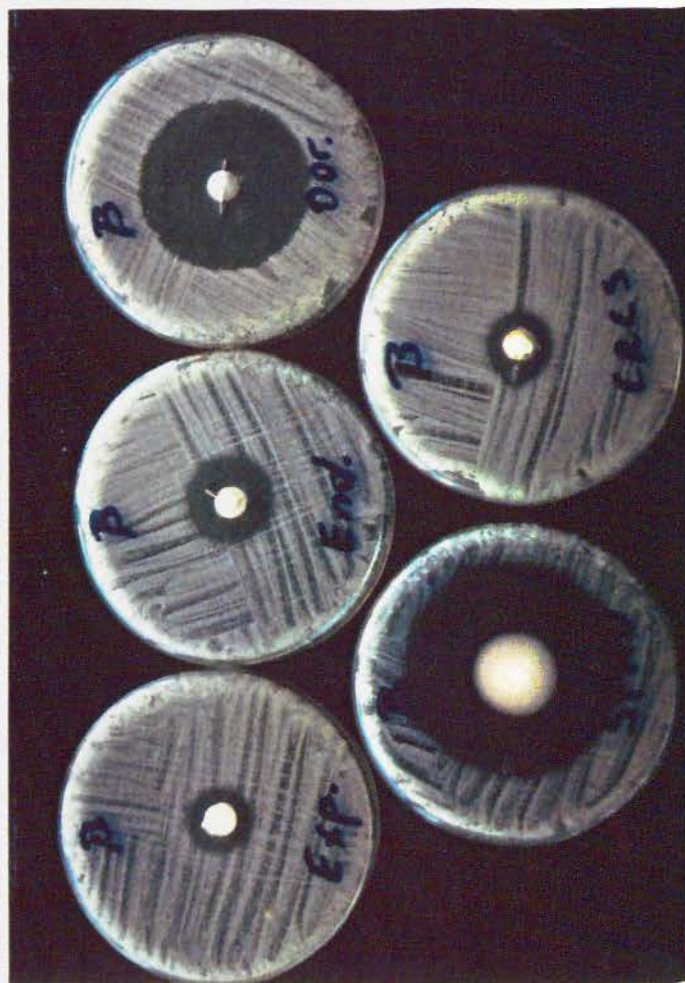
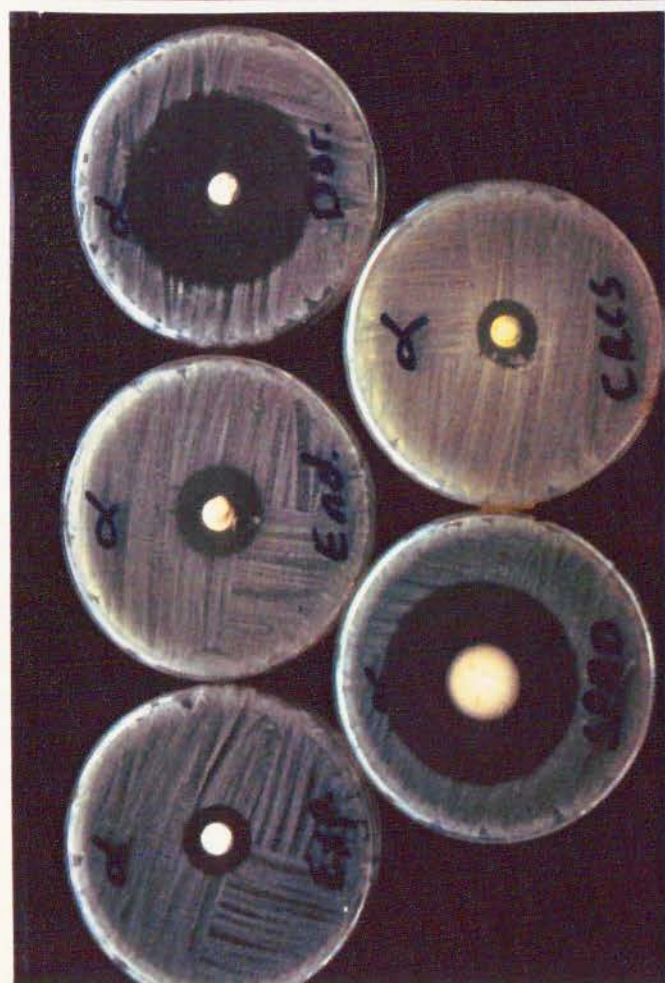
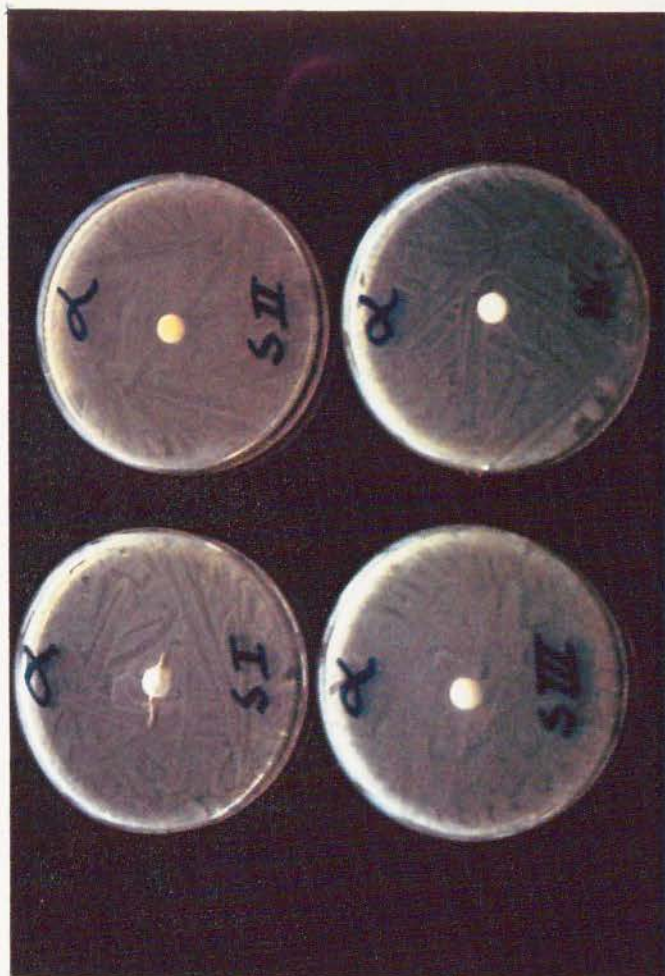
Gram (+) bakterilerden α -hemolytic Streptococcus, β -hemolytic Streptococcus ve Staphylococcus aureus üzerinde Sankin apatite tip I, Sankin apatite tip II, Sankin apatite tip III herhangi bir duyarlılık zonu oluşturmamışlardır. Aynı şekilde Gram (-) bakterilerden E.coli, Pseudomonas aureginosa üzerinde Sankin apatite tip I, Sankin apatite tip II, Sankin

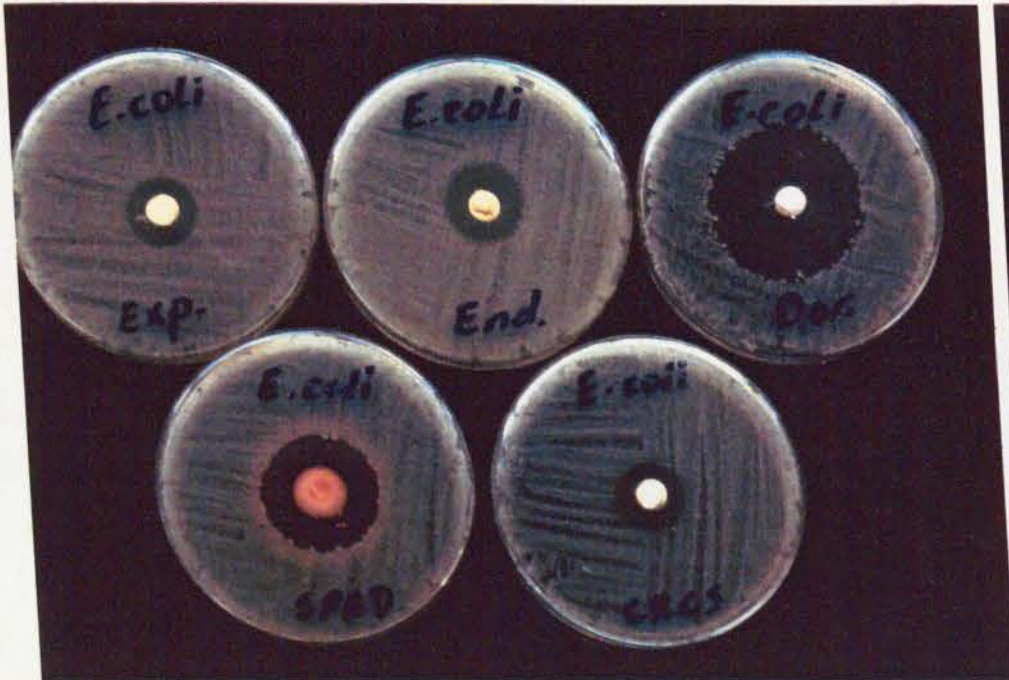
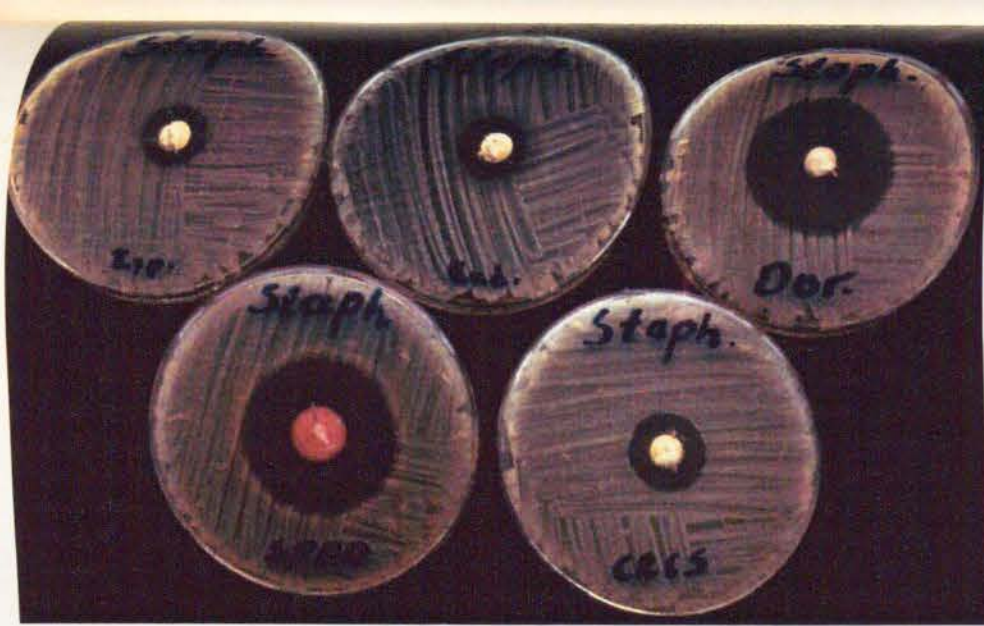
apatite tip III herhangi bir duyarlılık zonu oluşturmamışlardır.

Gram (+) bakterilerden α ve β -hemolytic Streptococcuslar üzerinde en fazla antibakteriyel etki gösteren Dorifill ve Spad'tır(Şekil.9). Bu iki kanal dolgu maddesini sırasıyla Endomethasone, Express ve CRCS izlemektedir. Staphylococcus aureus üzerinde de antibakteriyel etki gösteren en etkin kanal dolgu maddeleri Dorifill ve Spad'tır.

Dorifill ve Spad'ın Gram (-) bakteriler üzerindeki antibakteriyel etkinliği Gram (+) lere olan etkinliğine oranla az olmakla birlikte diğer kanal dolgu maddelerine oranla daha fazladır(Şekil.9). Diğer kanal dolgu maddeleri olan Endomethasone, CRCS ve Express E.coli üzerinde bir miktar antibakteriyel etki göstermesine rağmen Pseudomonas aureginosa üzerinde yalnız Endomethasone çok az etki göstermiş CRCS ve Express antibakteriyel etki göstermemiştir.

Bu sonuçlar Sankin apatite tip I, Sankin apatite tip II ve Sankin apatite tip III'ün diğer kanal dolgu maddelerine oranla Gram (+) ve Gram (-) bakteriler üzerinde antibakteriyel etki göstermediklerini açıkça göstermektedir.





TEST EDİLEN BAKTERİ	SA TIP I	SA TIP II	SA TIP III	CRCS	EXPRESS	ENDOMETHASONE	DORIFILL	SPAD	KONTROL
YENİ İZOLE EDİLMİŞ BAKTERİLER				*					
ALPHA HEMOLYTIC STREPTOCOCCUS	0	0	0	14	16	20	43	44	0
BETA HEMOLYTIC STREPTOCOCCUS	0	0	0	14	15	20	40	48	0
ATCC 25923 STAPHYLOCOCCUS AUREUS	0	0	0	17	15	10	35	33	0
ATCC 25922 ESCHERICHIA COLI	0	0	0	15	16	17	35	27	0
ATCC 27853 PSEUDOMONAS AUREGINOSA	0	0	0	0	0	10	20	23	0

* ZON CAPI (MILIMETRE)

TARTIŞMA

Günümüzde dişhekimliğinde kullanılmakta olan birçok kök kanal dolgu maddesi mevcuttur. Kök kanal dolgu maddelerinin yaygın olarak kullanılmaya başlamasından sonra kimyasal, fiziksel ve biyolojik özelliklerinin incelenmesi birçok araştırmaya konu olmuştur. Bu araştırmalar sonucunda kanal dolgu maddelerinde olması gereken özellikler de birçok araştırmacı tarafından tartışılmıştır.

in vivo olarak canlıya uygulanan kanal dolgu maddesi öncelikle biyolojik olarak uygun olmalıdır. Bu uygunluğun göstergesi aşağıdaki şekillerde özetlenebilir:

1-Periapikal dokuları irrite etmemelidir(1).

2-Periapikal dokularda immun bir cevap oluşturmamalıdır (4b,5a).

3-Mutajen veya karsinojen olmamalıdır(4b,5a).

4-Kök kanal dolgu maddeleri uygulandıktan sonra mikroorganizmaların üremesine ve bir enfeksiyon odağının oluşmasına ortam hazırlamamalıdır(1).

Yukarıdaki özelliklerde gözönüne alınarak yeni kanal dolgu maddelerinin geliştirilmesi için çeşitli çalışmalar yapılmış ve mevcut kanal dolgu maddelerinin biyolojik özelliklerinin incelenmesi için birçok test yöntemi geliştirilmiştir.

Mutlaka bütün araştırmacıların hemfikir olduğu en önemli özellik kanal dolgu maddelerinin yarattığı sitotoksik etkilerdir. Sitotoksik etki genellikle kök kanal dolgu

maddeleri içerisinde bulunan bazı iönlara veya antibakteriyel olarak kullanılan maddelere bağlı olabilir(33). Özellikle kanal dolgu maddelerinin uygulanmasından sonra diffüzyon yolu ile sızarak çevre dokulara yayılabilen maddeler incelenmelidir.

Dişhekimliğinde kullanılan bazı kanal dolgu maddelerinde toksik olabilecek kimyasal maddeler mevcuttur. Örneğın CRCS'de bulunan kalsiyum hidroksit ve öjenol antibakteriyel aktiviteye sahip olmalarına rağmen doku hücreleri üzerinde istenmeyen sitotoksik etkiyede sahiptirler(5b,40). Endomethasone'da ise CRCS'ye oranla antibakteriyel etkisinin yanında daha fazla toksik etki yapan timol iödid ve paraformaldehit mevcuttur(5b,40). Bu toksik maddelerin ne oranda soluble hale geçip toksik etki yaptığını saptamak ancak bazı deneysel yöntemlerle mümkündür(33,35,45,46).

Welker ve Neupert(33), biyomateriyallerin fizyolojik ortamda ayrıştırılmalarının test yöntemi için yüksek bir standardizasyon sağladığını belirterek bu yöntemle hücreler üzerine yüzey efektinin tam olarak elde edilebileceğini vurgulamışlardır.

İn vivo deney şartlarının kontrol edilmesindeki güçlük ve kıyas edilebilmesindeki zorluklardan dolayı in vitro deneyler daha çok kullanım alanı bulmuşlardır(2).

Son günlerde pratikte kullanılmaya başlayan yeni bir kök kanal dolgu maddesi kalsiyum fosfat yapısını esas alan Sankin apatite'dır.

Sunulan çalışmada Sankin apatite'in üç tipinin in vitro hücre üzerindeki etkinlikleri araştırılmış ve diğer kanal dolgu maddeleri ile kıyaslanmıştır. Bu gayeye yönelik olarak in vitro sitotoksosite deneyleri, hemolitik aktivite deneyleri ve antibakteriyel etki deneyleri uygulanmıştır.

Sankin apatite tip I, α -TCP ve hydroxyl apatite içermektedir. Sankin apatite tip II, α -TCP'a ilave olarak %30 iodoform içermektedir, Sankin apatite tip III ise yine α -TCP ve ilave olarak daha az oranda (%5) iodoform içermektedir. Görüldüğü gibi Sankin apatite'ların içeriği kalsiyum fosfatlardan (hydroxyl apatite, α -TCP) ve değişik oranlarda iodoform'dan oluşmaktadır.

Öncelikle bu maddelerin kök kanalına uygulandıktan sonra soluble olarak sızan ve toksik etki gösterebilecek özelliğinin saptanması hedef alınmıştır. Bu nedenle çalışmamızda elution (ayrışım solusyonu) hazırlanması yöntemi ilk aşamada uygulanmıştır. Bunun için Sankin apatite karışımları hazırlandıktan sonra hücre kültürlerinde kullanılan Eagle vasatı ilave edilerek sıvıya çözünmek suretiyle geçebilen toksik maddelerin varlığı in vitro toksisite deneyi ile ölçülmüştür. Sankin apatite'ların yanı sıra kıyaslama gayesi ile CRCS, Express, Endomethasone, Spad ve Dorifill aynı yöntemle teste tabi tutulmuştur. İn vitro sitotoksik etkinin ölçülmesinde; ayrışım solusyonlarının hücre canlılığına ve üremesine olan etkinliği ölçülmüştür.

Bugüne kadar in vitro sitotoksik deneylerde farklı orijin ve morfolojideki hücreler kullanılmıştır. Sitotoksik etki deneylerinde en çok kullanılan hücreler; L929 fare fibroblast hücreleri, BHK-21 fibroblast hücreleri, HeLa ve NCTC 2544 hücreleridir. HeLa ve NCTC 2544 epitelyal orijinli hücrelerdir(2). Vero hücreleride HeLa hücreleri gibi epitelyal orijinli aneuploid hücre kültürleridir.

Deneylerimizde biz de epitelyal morfolojili Vero (African Green Monkey Kidney) ve fibroblastik morfolojili BHK (Baby Hamster Kidney) hücrelerini kullandık. Tablo I de Sankin apatite tip I, tip II, tip III ve diğer kanal dolgu maddelerinin Vero hücre kültürleri üzerindeki etkisinin 0, 24, 48 ve 72.saatlerde yapılan canlı hücre sayımları yer almaktadır. Görüldüğü gibi kontrol hücrelerinde canlı hücre sayısı 72. saate kadar artış göstermiş 72. saatte bu artış durmuştur. Bu hücrelerin monolayer yapmasına bağlı bir özelliktir. Canlı hücre sayımındaki artış Sankin apatite tip I, tip II ve tip III'te de belirli oranlarda görülmüştür. CRCS'de ilk 24 saat içerisinde bir artış görülmesine karşın 48 ve 72. saatlerde az miktarda dereceli bir azalma ortaya çıkmıştır. Express, Dorifill, Endomethasone ve Spad uygulanan Vero hücre kültürlerinde canlı hücre sayımı yapılamayacak miktarda bir azalma saptanmıştır. Bu sonuçlar epitelyal orijinli olan Vero hücre kültürlerinde Sankin apatite tiplerinin sıvıya ayrılan maddelerinin toksik olmadığını göstermektedir. CRCS'den de alınan sonuçlar Sankin apatite'lar gibi fazla toksik maddenin ayrılmadığını göstermektedir.

Express, Dorifill, Endomethasone ve Spad'ta ise ayrışım solusyonlarında ayrışan toksik maddelerin varlığı ortaya çıkmaktadır (Tablo.1, Şekil.2).

Fibroblastik hücre kültürü olan BHK hücre kültürü ile alınan canlı hücre sayım sonuçları Tablo.2 de verilmiştir. BHK hücrelerinde kontrol ve Sankin apatite tip I, tip II, tip III canlı hücre sayımları arasında doğru orantılı bir uyum mevcuttur. CRCS Vero hücre kültürlerinde alınan sonuçlara benzer olarak BHK hücre kültürlerinde de fazla sitotoksosite göstermemiştir. Buna karşın Express, Dorifill, Endomethasone ve Spad 24 saatlik inkübasyonda canlı hücre sayısını sayılamayacak derecede toksisite göstererek etkilemiştir (Tablo.2, Şekil.3).

Hücre kültürlerinde canlı hücre sayımı ile aldığımız bu sonuçlar kanal dolgu maddelerinin toksik etkilerini saptamada epitelial veya fibroblastik hücre tipinin sonucu etkilemediğini ortaya koymuştur. Zira Vero ve BHK hücre kültürlerinde kanal dolgu maddeleri ile alınan toksik etki sonuçları uyumluluk içerisinde.

İn vitro olarak biyomateryaller çalışılırken diploid ve aneuploid hücrelerin farklı şekilde davranabileceği düşünülse de bu düşünceye varılması için herhangi bir açık kanıt yoktur(2). Epitelial orijinli hücrelerin fibroblastik orijinli hücrelerden farklı davranabileceği konusu da tartışılmış bu konuda da böyle bir cevabı ortaya çıkaracak herhangi bir bulgu elde edilememiştir(2). Bizim çalışmamızın sonuçlarında bu bilgilerle uyumluluk göstermektedir.

Kök kanal dolgu patlarındaki toksik maddelerin etkileri birçok şekilde olabilir. Bunlardan en önemlisi hücre membranı üzerine olan etkinliktir(3). Hücre membranı üzerindeki etkinlik hücre permeabilitesini bozarak ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle orijin ne olursa olsun membran yapısının universalliği toksik maddeden etkilenmeye aynı derecede cevap verecektir. Membran etkinliğinin yanı sıra hücredeki bazı makromoleküler sentez mekanizmalarının etkilenebileceği söylenmektedir(3). Etkilenme şekli ne olursa olsun sonuç hücre canlılığının kaybolması ile ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle araştırmacılar tarafından sitotoksik etki yönünden en duyarlı yöntem olarak kabul edilen hücre kültürü yöntemi kök kanal dolgu maddelerinin bu özelliklerinin kıyaslanmasına olanak vermektedir(2,5b). Endomethasone ve Spad ile alınan toksik etki sonuçları literatürde daha önce rapor edilen toksisite sonuçlarıyla uyumluluk göstermektedir(47,48,49). Dorifill ve Express ile elde ettiğimiz sonuçlar Endomethasone ve Spad ile elde ettiğimiz sonuçlara benzerlik göstermektedir. Bu maddelerin içerikleri incelendiğinde toksik bir madde olduğu bilinen öjenolun Dorifill ve Express'in likit kısımlarını oluşturduğunu görülmektedir(5b). Buna ilaveten Dorifill ve Express'te bulunan çinko bileşiği büyük oranda toksisiteden sorumlu olabilir.

Sankin apatite tip I, tip II ve tip III'te sitotoksik etkinin görülmemesi bu kanal dolgu maddelerinin diğerlerine oranla ayrışabilen toksik madde içermediklerini ortaya koymaktadır. Sankin apatite tip II ve tip III'ün içerisinde

değişik oranlarda iodoform mevcuttur. Kalsiyum fosfatların diş ve kemik yapısında da bulunan biyolojik uyumu yüksek maddeler olduğu bilinmektedir(50). İodoform ise paraformaldehit, öjenol'e oranla daha az toksik bir maddedir(5b). Buna rağmen Sankin apatite tip II içerisinde diğer Sankin apatite'lara oranla daha fazla (%30) iodoformun mevcudiyeti hücre kültürlerinde daha fazla sitotoksik etkiyle kendini göstermiştir. Sankin apatite'ların ve diğer kanal dolgu maddelerinin oluşturduğu sitotoksitenin hücre morfolojisi üzerine etkisi Şekil.2 ve 3'te görülebilmektedir. Görüldüğü gibi Sankin apatite tip I ve tip III ile alınan morfolojik görünüm 72. saatte normal hücre kültürleri ile aynıdır. Ancak Sankin Apatite tip II'de az miktarda hücre açılması ve granulasyon mevcuttur. CRCS ile elde edilen toksik etki hücre yuvarlaklaşması, piknotik hücre oluşumu ve hücre azalması ile karakterizedir. Bu görünüm Vero ve BHK hücrelerinde benzerlik göstermiştir. Express, Dorifill, Endomethasone ve Spad ile meydana gelen sitotoksik etki hücre azlığı nedeniyle resimlenememiştir. Elde ettiğimiz sitotoksik etki sonuçları ışığında Sankin apatite tip I, tip II ve tip III'ün diğer çalışılan kanal dolgu maddelerine kıyasla üstün olduğu deneysel olarak saptanmıştır.

Hemoliz testi; kemik ve yumuşak doku ile uzun süreli temasta bulunabilecek materyallerin akut hemolitik aktivitesini saptamak amacıyla uygulanan bir testtir(3). Hemolitik aktivitenin azlığının maddenin biyolojik uyumluluğu yönünden avantaj olduğu söylenebilir. Bu nedenle Sankin apatite tip I,

tip II, tip III ve diğer kanal dolgu maddelerinin insan O grubu eritrositleri üzerindeki hemolitik aktivitesi araştırılmıştır. Bunun için kanal dolgu maddelerinin likit kısımları, toz kısımları ve karıştırılan maddelerin reaksiyon tamamlandıktan sonra öğütülmesiyle elde edilen tozlarının hemolitik aktiviteleri ayrı ayrı çalışılmıştır.

Kanal dolgu maddelerinin likit kısımlarıyla yapılan testlerde Sankin apatite tip I ve tip III 1/32 dilüsyonda tip II ise 1/64 dilüsyonda son tam hemolizi oluşturmuşlardır (Şekil.4). Spad LD ile 1/32 dilüsyonda, Spad L ile saf dilüsyonda son tam hemoliz elde edilmiştir (Şekil.6). Diğer kanal dolgu maddeleri olan Express, Dorifill ve Endomethasone 1/8192, CRCS ise 1/2048 dilüsyonda son tam hemolizi vermişlerdir (Şekil.7). Likit kısımlar kıyaslandığında Sankin apatite tip I, tip II, tip III, Spad LD ve Spad L diğer kanal dolgu maddelerinin likit kısımlarına oranla daha az hemolitik aktiviteye sahiptirler.

Kanal dolgu maddelerinin toz kısımlarının oluşturduğu hemolitik aktivite sonuçlarına göre Sankin apatite tip I, tip II ve tip III son tam hemolizi 1/4 dilüsyonda oluşturmuşlardır (Şekil.4). Spad ve Express 1/16 dilüsyonlarda, CRCS 1/128 dilüsyonda Endomethasone ve Dorifill ise 1/64 dilüsyonlarda son tam hemolizi vermişlerdir.

Karıştırılan maddelerin tamamen reaksiyona girip sertleşmesi beklendikten sonra öğütülmesiyle elde edilen tozlarının test edilmesinde Sankin apatite tip I ve tip III 1/8 dilüsyona kadar eritrositleri fikse etmişler, Sankin apatite tip II ise

1/16 dilüsyonda aynı fiksasyona neden olmuştur (Şekil.8). Spad ve Dorifill 1/16 dilüsyona kadar tam hemoliz, CRCS 1/4 dilüsyona kadar tam hemoliz, Endomethasone 1/8 dilüsyona kadar fiksasyona, Express ise 1/32 dilüsyona kadar fiksasyona neden olmuştur.

Hemoliz sonuçları değerlendirildiğinde Spad'ın Ld ve L likitleri hariç Sankin apatite'in her üç tipinin toz ve likit kısımları diğer test edilen maddelere oranla daha az hemolitik aktiviteye sahiptir.

Reaksiyon tamamlandıktan sonra öğütülen maddelerin hemolitik aktivitesi farklılıklar göstermiştir. Özellikle Sankin apatite tip I, tip II ve tip III eritrositlerin hemolizinden ziyade fiksasyonuna neden olmuştur. Fiksasyon hemolizden ziyade eritrosit yüzeyinde meydana gelen değişiklik nedeniyle renk değişimi ile karakterize bir reaksiyondur. Likit ve toz kısımlarının reaksiyonlarına göre karışım elde edildikten sonraki elde edilen sonuçlar reaksiyona giren maddelerin farklı şekilde davranan ürünler oluşturduğunu ifade edebilir. Sonuçlar genel olarak değerlendirildiğinde, Sankin apatite'in her üç tipinin hemolitik aktivitelerinin azlığı nedeniyle diğer kanal dolgu maddelerine oranla bir üstünlüğe sahip olduğu sonucuna varılmaktadır.

Kanal dolgu maddelerinin antibakteriyel etkiye sahip olması arzu edilen bir özelliktir. Zira oluşabilecek bir enfeksiyon apikal periodontitise neden olarak endodontik tedavinin başarısızlığı ile sonuçlanabilir(33). Ancak antibakteriyel etki göstermesi için kanal dolgu preparatlarının içerisinde

ilave edilen maddelerin antibakteriyel etkileri ile sitotoksik etkileri paralellik göstermektedir(33). Bu nedenle kanal dolgu maddelerine ilave edilen antimikrobiyallerin avantajını yoksa dezavantajını oluşturduğu günümüzde tartışma konusudur(14). Amerikan ekolü üyeleri genellikle kanal dolgu patının iyi sızdırmazlık özelliklerine sahip olmasını ve biyolojik uyumluluğunun iyi olmasını istemektedirler(33). Avrupa ekolü ise sertleşmeyen, rezorbe olan (Gysi patı, Walkhoff patı ve Bernard'ın Biocalex'i) ve sertleşen (Endomethasone, N₂, Diaket v.s) kanal dolgu maddelerinde antibakteriyel özelliğin önemini savunmaktadırlar (33).

Aseptik şartların yeterince sağlanamadığı endodontik tedavi koşullarında antibakteriyel madde içeren kanal dolgu maddelerinin kullanılması tercih edilebilir(33).

Bazı otoriteler kanal tedavisi esnasında başarılı bir biyomekanik preparasyonun yapıldığı durumlarda antibakteriyel etkiye sahip bir pansuman maddesinin bile kullanılmasına gerek olmadığını söylemektedirler(5c,51,52).

Çalışmamızda Sankin apatite tip I, tip II ve tip III ve diğer kanal dolgu maddelerinin antibakteriyel özelliği agar disk diffüzyon yöntemi kullanılarak kıyaslamalı olarak araştırılmıştır. Test için Gram (+) bakterilerden α -hemolytic Streptococcus, β -hemolytic Streptococcus ve Staphylococcus aureus Gram (-) bakterilerden ise E.coli ve Pseudomonas aureginosa kullanılmıştır.

Test edilen bakteriler üzerinde Sankin apatite'in her üç tipide herhangi bir antibakteriyel zon oluşturmamışlardır. Buna karşın Dorifill ve Spad hem Gram (+) hem de Gram (-) bakteriler üzerinde maksimum antibakteriyel zon oluşturmışlardır. Bunları farklı derecelerde olmak üzere Endomethasone, Express ve CRCS takip etmiştir (Şekil.9). Sonuçlarımız Sankin apatite'in her üç tipinde in vitro yöntemlerle ölçülebilecek agara diffüze olabilen antibakteriyel madde içermediğini ortaya koymaktadır. Bu sonuç gerçekten antibakteriyel etkinin sitotoksik etki ile paralellik gösterdiğini diğer deney sonuçlarımızla birlikte bir defa daha vurgulamaktadır.

Çalışmamızda elde edilen sonuçlar Sankin apatite tip I, tip II ve tip III'ün yüksek biyolojik uyumluluğa sahip olduğunu ve aseptik koşulların sağlanabildiği durumlarda başarıyla kullanılabileceği fikrini uyandırmaktadır. Bu maddelerin klinikte kullanılması için in vitro ve in vivo bir çok geniş kapsamlı araştırmanın yapılması daha kesin sonuçlara varılması açısından önem taşımaktadır.

SONUÇLAR

Endodontik tedavilerde kullanılan birçok kök kanal dolgu maddesi ve kök kanal doldurma tekniği bulunmaktadır. Genel olarak kullanılmakta olan kök kanal dolgu maddeleri ve teknikleri tatminkardır. Ancak daha kolay uygulanabilen kanal dolgu tekniklerinin bulunması endodontik tedavilerin pratik uygulanımına büyük yararlar sağlayacaktır. Kanal dolgu maddeleri söz konusu olduğunda ise biyolojik uyumu yüksek olan kanal dolgu maddelerinin geliştirilmesi ve kullanıma sokulması arzulanmaktadır. Halihazırda in vitro deney yöntemleri, deney koşullarının daha kontrol edilebilir olmasından ve dolayısı ile daha yüksek bir standardizasyon sağladığı için tercih edilmektedir. In vitro teknikler arasında yeralan hücre kültürü ve hemolitik aktivite yöntemleri kök kanal dolgu maddelerinin sitotoksik etkilerinin ölçülmesinde kullanılan hassas standart teknikler olarak kabul edilmektedir. Yine kök kanal dolgu maddelerinin incelenmesi gereken özelliklerinden biri olan antibakteriyel etkinin incelenmesi için standart in vitro teknikler bulunmaktadır.

Günümüzde kalsiyum fosfatların diş ve kemiğin yapısında yeralan biyolojik uyumluluğu yüksek maddeler olmalarından dolayı kanal dolgu maddeleri olarakta kullanılabileceği düşünülmüş ve bu konuda yoğun çabalar sarfedilmiştir. Halihazırda piyasada bulunan tamamen kalsiyum fosfat yapısındaki tek kanal dolgu maddesi Şankin apatite tip I'dir.

Bu çalışma, kalsiyum fosfat esaslı kanal dolgu maddeleri olan Sankin apatite tip I, Sankin apatite tip II ve Sankin apatite tip III'ün sitotoksik ve hemolitik aktivitelerini pratikte kullanılan diğer kanal dolgu maddeleri ile kıyaslamalı olarak araştırmak gayesi ile planlanmıştır. Maddelerin antibakteriyel etkilerinin kıyaslanması da araştırmanın kapsamı içine alınmıştır. Hücre kültürü çalışmalarında devamlı hücre kültürleri olan Vero (epitelyal orijinli) ve BHK (fibroblastik orijinli) kullanılmış, yöntem olarakta ayrışım solusyonu testi (elution test) seçilmiştir. Sonuçlar canlı hücre sayımı ile saptanmıştır. Bu maddelerin hemolitik aktivitelerini tayin etmek için toz kısımlarının, likit kısımlarının ve karıştırılan maddenin tamamen sertleşmesi beklendikten sonra öğütülen tozlarının etkileri ayrı ayrı çalışılmıştır. Gerek hücre kültürü çalışmaları ve gerekse hemolitik aktivite çalışmalarından elde edilen sonuçlar genel olarak büyük uyumluluk göstermiştir. Bu sonuçlara göre en az toksik etki gösteren maddeler Sankin apatite tip I ve Sankin apatite tip III'tür. Bunları Sankin apatite tip II ve belirgin bir farkla CRCS izlemektedir. Endomethasone, Express, Dorifill ve Spad'ın yüksek derecede toksik etkiye sahip oldukları saptanmıştır. Antibakteriyel etki incelendiğinde en yüksek antibakteriyel etkiye sahip olan maddelerin Dorifill ve Spad olduğu gözlenmiştir. Bu maddeleri sırasıyla Endomethasone, Express ve CRCS izlemektedir. Sankin apatite'ların her üç tipinde de test edilen bakteriler üzerine herhangi bir antibakteriyel etki saptanamamıştır.

Sonuçlarımız diğ r araştırmacılarla uyumluluk göstererek, kanal dolgu maddelerinin içinde yeralan antibakteriyel ajanların yüksek sitotoksisite problemini de beraberlerinde getirdiklerini, dolayısı ile bu antibakteriyel ajanların gerekliliğinin sorgulanması gerektiğini bir kere daha vurgulamaktadır. Yine sonuçlarımız in vitro tekniklerin kanal dolgu maddelerinin biyolojik özelliklerinin incelenmesinde kullanılan hassas standart teknikler olduğunu göstermektedir.

ÖZET

Kalsiyum fosfat esaslı kanal dolgu maddeleri olan Sankin apatite tip I, tip II ve tip III'ün Vero (African Green Monkey Kidney) ve BHK (Baby Hamster Kidney) hücreleri üzerindeki sitotoksik, insan O grubu eritrositleri üzerindeki hemolitik ve çeşitli Gram (+) ve Gram (-) bakteriler üzerindeki antibakteriyel etkileri beş diğer kanal dolgu maddesi (Express, Dorifill, Endomethasone, Spad, CRCS) ile kıyaslamalı olarak araştırılmıştır.

Deney sonuçlarımız en az sitotoksik ve hemolitik etki gösteren kanal dolgu maddelerinin Sankin apatite tip I, Tip II ve tip III olduğunu ortaya koymuştur. Sankin apatite'ların her üç tipinin test edilen bakteriler üzerinde herhangi bir antibakteriyel etkiye sahip olmadıkları gözlenmiştir. Elde edilen bilgiler mevcut bilgilerin ışığında tartışılmıştır.

REFERANSIAR

1. Grossman LI, Oliet S, Del Rio CE. Endodontic practice 11th ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1988:242-270.

2. Spangberg LSW. Experimental endodontics 1st ed. Boca Raton, Florida: CRC press inc, 1990:173-211.

3. Mjör IA, Hensten Petersen A, Orstavik D. Biological properties. In Mjör IA (ed): Dental materials: Biological properties and clinical evaluation 1st ed. Boca Raton, Florida: CRC press inc, 1985:21-69.

4a. Ingle JJ, Beveridge EE, Glick DH, Weichman JA, Abou-Rass M. Modern endodontic therapy. In Ingle JJ & Taintor JF. (eds): Endodontics 3rd ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1985, 1-52.

4b. Ingle JJ, Luebke RG, Zidell JD, Walton RE, Taintor JF. Obturation of the radicular space. In Ingle JJ & Taintor JF. (eds): Endodontics 3rd ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1985, 223-307.

5a. Nguyen TN. Obturation of the root canal system. In Cohen S & Burns R. (eds): Pathways of the pulp 4th ed. St Louis: The C.V. Mosby company, 1987, 183-274.

5b. Heuer MA, Miserendino LJ. Instruments and materials. In Cohen S & Burns R. (eds): Pathways of the pulp 4th ed. St Louis: The C.V. Mosby company, 1987, 397-440.

5c. Gutmann JL, Dumsha TC. Cleaning and shaping the root canal system. In Cohen S & Burns R. (eds): Pathways of the pulp 4th ed. St Louis: The C.V. Mosby company, 1987, 156-82.

6. LeGeros RZ. Calcium phosphate materials in restorative dentistry: A review. *Adv Dent Res* 1988;2:164-80.

7. Boyne PJ, O'Leary TJ, Cox FC. Hydroxylapatite, beta tricalcium phosphate and autogenous and allogeneic bone for filling periodontal defects, alveolar ridge augmentation, and pulp capping. *J Am Dent Assoc* 1984;108:822-31.

8. Sinai IH, Romea DJ, Glassman G, Morse DR, Fantasia J, Furst L. An evaluation of tricalcium phosphate as a treatment for endodontic perforations. *J Endodon* 1989;15:399-403.

9. Metsger DS, Driskell TD, Paulsrud JR. Tricalcium phosphate ceramic-a resorbable bone implant: review and current status. *J Am Dent Assoc* 1982;105:1035-8.

10. Himel VT, Brady J, Weir J. Evaluation of repair of mechanical perforations of the pulp chamber floor using biodegradable tricalcium phosphate or calcium hydroxide. *J Endodon* 1985;11:161-5.

11. Boone ME, Kafrawy AH. Pulp reaction to a tricalcium phosphate ceramic capping agent. *Oral Surg* 1979;47:369-71.

12. Jean A, Kerebel B, Kerebel LM, LeGeros RZ, Hamel H. Effects of various calcium phosphate biomaterials on reparative dentin bridge formation. *J Endodon* 1988;14:83-7.

13. Driskell TD, Heller AL, Koenigs JF. Dental treatments. U.S. Patent No. 3,913,229. 1975.

14. Watanabe H, Aoki H, Murakami K, Ariizumi Y, Nakagawa K, Sakurai E, Uii H, Asai Y. Fundamental studies of calcium phosphate ceramics in endodontic therapy (part 1) tissue reactions to hydroxyapatite ceramics (Periograf) applied to osseous defect in rat mandibles. *Shikwa Gakuho* 1984;84:1175-83.

15. Furasawa M. Clinico-pathological studies of calcium phosphate ceramics as a basic material in endodontic therapy. *Shikwa Gakuho* 1987;87:701-43.
16. Chow LC. Calcium phosphate materials: reactor response. *Adv Dent Res* 1988;2:181-4.
17. Brown WE, Chow LC. Dental restorative cement pastes. U.S. Patent No. 4,518,430. 1985.
18. Brown WE, Chow LC. A new calcium phosphate, water-setting cement. *Cem Res Prog* 1986;352-79.
19. Brown WE, Chow LC. A new calcium phosphate setting cement. *J Dent Res* 1983;62:672.
20. Gruninger SE, Siew C, Chow LC, O'Young A, Ts'ao HK, Brown WE. Evaluation of the biocompatibility of a new calcium phosphate setting cement. *J Dent Res* 1984;63:270.
21. Krell KV, Wefel JS. A calcium phosphate cement root canal sealer--scanning electron microscopic analysis. *J Endodon* 1984;10:571-6.
22. Krell KV, Madison S. Comparison of apical leakage in teeth obturated with a calcium phosphate cement or Grossman's cement using lateral condensation. *J Endodon* 1985;11:336-9.
23. Chohayeb AA, Chow LC, Tsaknis PJ. Evaluation of calcium phosphate as a root canal sealer-filler material. *J Endodon* 1987;13:384-7.
24. Fukase Y, Takagi S, Eanes ED, Chow LC, Brown WE. Setting reactions and compressive strength of calcium phosphate cement. *J Dent Res* 1989;68:1733.
25. Miyazaki K, Takagi S, Chow LC, Antonucci JM. Polymeric calcium phosphate cements. *J Dent Res* 1990;69 SI:2068.

26. Sugawara A, Kusama K, Nishimura S, Hishiyama M, Ohashi M, Moro I, Chow LC, Takagi S. Biocompatibility and osteoconductivity of calcium phosphate cement. *J Dent Res* 1990;69 SI:1628.

27. Sugawara A, Chow LC, Takagi S, Chohayeb H. In vitro evaluation of the sealing ability of a calcium phosphate cement when used as a root canal sealer-filler. *J Endodon* 1990;16:162-5.

28. Brown WE, Chow LC. Combination of sparingly soluble calcium phosphates in slurries and pastes as mineralizers and cements. U.S. Patent no. 4,612,053, 1986.

29. American National Standards Institute / American Dental Association document no. 41. *J Am Dent Assoc* 1979;99:697-8.

30. Federation Dentaire Internationale, Recommended standard practices for the biological evaluation of dental materials. *Int Dent J* 1980;30:140.

31. DIN-Vornorm 13930: Biologische prüfung von dentalwerkstoffen. *Dtsch Zahnarztl Z* 1986;41:1248-52.

32. Bayırlı G. Endodontik tedavî. İstanbul Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi Yayınları, İstanbul. 1985:312-85.

33. Welker VD, Neupert G, Oehring H. Aspekte der toxitätsprüfung stomatologischer werkstoffe. *Zahn Mund Kieferheilkd* 1986;74:699-705.

34. Kawahara H, Yamagami A. Biological testing of dental materials by means of tissue culture. *Int Dent J* 1968;18:443-67.

35. Neupert V, Welker D. Bestimmung der gewebsvertraglichkeit stomatologischer werkstoffe an zellkulturen. *Zahn Mund U Kieferheilk* 1975;63:134-41.

36.Şaher E. Üç değişik pulpa kaplama maddesinin etkinliklerinin hücre kültürlerinde ve pulpaları ekspoz edilen 3. molarlarda histopatolojik olarak incelenmesi. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doktora tezi,1983.

37.Çalt S. Beş değişik kanal dolgu maddesinin etkinliklerinin hücre kültürlerinde ve ratlarda histopatolojik olarak incelenmesi Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doktora tezi.1987

38.Onat A. Gümüş amalgamı, adaptic ve isopast dolgu maddelerinin gingiva üzerindeki sitotoksik etkilerinin hücre kültürleriyle araştırılması. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doktora tezi,1984.

39.Orstavik D. Antibacterial properties of endodontic materials. Int End J 1988;21:161-9.

40.Seltzer S. Endodontology: Biologic considerations in endodontic procedures. 2nd ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1985:281-325.

41.Pupo J, Biral RR, Benatti O, Abe A, Valdrighi L. Antimicrobial effects of endodontic filling cements on microorganisms from root canal. Oral Surg 1983;55:622-7.

42.Seven N, Ayyıldız A, Kırzioğlu Z. Kanal dolgu maddelerinin antibakteriyel özelliklerinin araştırılması. Mikrobiyol Bül 1989;23:361-8.

43.Yeşilsoy C, Feigal R. Effects of endodontic materials on cell viability across standard pore size filters. J Endodon 1985;11:401-7.

44.Yeşilsoy C, Morse DR, Kobayashi C. A comparative tissue toxicity evaluation of established and newer root canal sealers. Oral Surg 1988;65:459-67.

45.Nakamura H, Sakakibara F, Matsumoto Y, Hirano S, Hayakawa H, Sakai K, Yip M. Study on the cytotoxicity of root canal filling materials. J Endodon 1986;12:156-60.

46. Spangberg L, Pascon EA. The importance of material preparation for the expression of cytotoxicity during in vitro evaluation of biomaterials. *J Endodon* 1988;14:247-50.
47. Tzinfas D, Pantelidou O. Treatment of periapical lesions on dog's teeth using periapically extruded Spad. *Int End J* 1988;21:361-6.
48. Orstavik D, Hongslo JK. Mutagenicity of endodontic sealers. *Biomater* 1985;6:129-32.
49. Meryon SD, Brook AM. In vitro comparison of the twelve endodontic materials using a new technique. *Int End J* 1990;23:203-10.
50. Gregoire M, Orly I, Menanteau J. The influence of calcium phosphate biomaterials on human bone cell activities. An in vitro approach. *J Biomed Mater Res* 1990;24:165-77.
51. Walton RE, Torabinejad M. Principles and practice of endodontics. 1st ed. Philadelphia; W.B. Saunders company, 1989:223-48.
52. Weine FS. Endodontic therapy. 4th ed. St. Louis; The C.V. Mosby comp, 1989:277-369.