

## FARKLI RETROGRAD DOLGU MADDELERİNİN SIZINTI DEĞERLENDİRMESİ: ENDOTOKSİN SIZINTI ÇALIŞMASI

### LEAKAGE EVALUATION OF DIFFERENT ROOT-END FILLING MATERIALS: AN ENDOTOXIN LEAKAGE STUDY

*Burak İLHAN\**,

*Kürşat ER<sup>§</sup>*

*Timur ESENER<sup>†</sup>*

*Timurhan CEYHAN<sup>II</sup>*

*Kerem Engin AKPINAR<sup>‡</sup>*

#### ÖZET

**Amaç:** Bu çalışmada, beş farklı retrograd dolgu maddesinin zamana bağlı endotoksin sızdırmazlığının *Limulus Amebocyte Lysate* (LAL) testi kullanılarak karşılaştırılması amaçlandı.

**Gereç ve Yöntem:** Çalışmada 30 adet çekilmiş tek köklü insan mandibular premolar dişleri kullanıldı. Köklerin apikal 3 mm'si ve dişlerin kronları uzaklaştırıldı. Step back tekniği kullanılarak kök kanalları prepare edildi ve retrograd kaviteler açıldı. Dişler 5 farklı gruba ayrıldı ve seçilen retrograd dolgu maddeleri ile açılan kaviteler dolduruldu. Grup 1 amalgam dolgu ile; grup 2 mineral trioksit agregat (MTA) ile; grup 3 bir cam iyonomer simanla (Fuji II LC); grup 4 bir silikonla güçlendirilmiş çinko oksit simanla (Super EBA) ve grup 5 bir kompozit ve dentin bonding sistemle (P60 ve Single Bond) dolduruldu. Dolgu işlemlerinden sonraki 1. ve 14. günlerde dolgulardaki endotoksin sızıntısı belirlendi.

**Sonuç:** Elde edilen sonuçlara göre, tüm retrograd dolgu maddelerinde sızıntı gözlemlendi ve sızıntı oranı açısından gruplar arasında istatistiksel olarak bir fark bulunmadı.

**Anahtar kelimeler:** Retrograd dolgu, sızıntı, endotoksin.

#### SUMMARY

**Objective:** The purpose of this study was to compare the ability of five different root-end fillings to prevent endotoxin leakage over time using the *Limulus Amebocyte Lysate* (LAL) test.

**Material and Method:** Thirty newly extracted single-rooted human mandibular premolars were used. The apical 3 mm of roots and the crowns of the teeth were separated. Root canals were prepared using the step-back technique and simulated root-end cavities performed. The teeth were divided into five groups and then root-end cavities were filled with selected root-end fillings. Group 1 were filled with amalgam; group 2 were filled with mineral trioxide aggregate (MTA); group 3 were filled with a glass-ionomer cement (Fuji II LC); group 4 were filled with a reinforced zinc oxide-eugenol cement (Super EBA); and group 5 were filled with a composite resin & dentin bonding system (P60 & Single Bond). At 1-day and 14-day after filling, the endotoxin leakage along these fillings was determined.

**Conclusion:** According to the results, Overall the root-end fillings were had evidence of leakage but no statistically significant differences in rate of leakage among the groups.

**Keywords:** Root-end filling, leakage, endotoxin.

**Makale Gönderiliş Tarihi : 24.04.2006**

**Yayına Kabul Tarihi: 12.06.2006**

\* *Başkent Üniversitesi Hastanesi, Ankara, Dr.*

† *Erciyes Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi, Diş Hastalıkları ve Tedavisi Anabilim Dalı, Prof. Dr.*

‡ *Cumhuriyet Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi, Endodonti Bilim Dalı, Yrd. Doç. Dr.*

§ *Karadeniz Teknik Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi, Endodonti Anabilim Dalı, Yrd. Doç. Dr.*

*II Ordu İlaç Fabrikası, Ar-Ge ve Kalite Kontrol Bölümü, Ankara, Ecz. Dr.*

## GİRİŞ

Endodontik tedavide; kök kanal sistemi genellikle konservatif endodontik işlemlerle tamamen doldurulabilmektedir. Tedavinin başarısızlığı durumunda ise konservatif tekrarlayan tedavi ilk adımdır. Endodontik tekrarlayan tedavilerinde başarısız olduğu inatçı kök ucu iltihabının bulunduğu durumlarda, geniş kök perforasyonlarında, çıkarılamayan kırık alet varlığında ve post-core restorasyonları gibi kontrendike olduğu durumlarda endodontik cerrahi işlemler uygulanır. Endodontik cerrahi; apikal bölgenin küretajı, kök ucu rezeksiyonu ve takiben kök ucuna retrograd dolgu yerleştirilmesini içerir. Retrograd dolgu yerleştirilmesinin amacı; uygun kavite açımını takiben kök ucunun etkili şekilde tıkanmasını sağlamaktır. Retrograd dolgu maddeleri, canlı dokularla temasta olduğundan biyoygunluk özellikleri önem kazanmaktadır. Bugüne kadar amalgam, gümüş konlar, altın yaprak, çinko oksit ojenol siman, guta perka, polikarboksilat siman, cam iyonomer siman, teflon, kompozit, kalsiyum fosfat içerikli biomateriyaller ve MTA gibi çeşitli retrograd dolgu maddeleri kullanılmıştır<sup>8,14</sup>.

Yapılan çalışmalarda ideal sızdırmazlık özelliklerine sahip retrograd dolgu maddelerini saptayabilmek için çeşitli sızdırmazlık inceleme teknikleri geliştirmişlerdir. Bunlardan, boya sızıntı, bakteriyel mikro sızıntı, insan serumu sızıntı tekniği, sıkıştırılmış hava tekniği, gaz kromatografi tekniği, otoradyografi tekniği, elektro-kimyasal teknik, akışkan iletim tekniği, üç boyutlu yeniden düzenleme ve endotoksin sızıntı teknikleri en fazla kullanılan tekniklerdir<sup>4,7,9,10,12,21,26</sup>. Bu tekniklerden endotoksin sızıntı tekniği en hassas tekniklerden birisidir. Bu teknik, periapikal dokulardaki yıkımla doğrudan ilişkilendirilen bir bakteriyel metabolit olan endotoksinlerin, kurulan düzenekteki apikal rezervuarda LAL tekniği ile tespiti esasına dayanmaktadır. Çok gelişmiş olan bu teknikte endotoksin tespitinden başka, örneklerdeki endotoksin miktarı büyük bir hassasiyetle tespit edilebilmektedir<sup>2,21,24</sup>.

Sızdırmazlık testlerinde birçok faktör sonuca etki edebilir; dişin ve kök kanal sisteminin anatomisi, morfolojisi, kök kanal sisteminin hazırlanış şekli ve aşamaları, kullanılan maddelerin çeşit ve hazırlanma şekilleri, uygulanan test teknikleri bu faktörler olarak sayılabilir<sup>11</sup>.

Bu çalışmanın amacı; amalgama alternatif olarak geliştirilen değişik içerikli retrograd dolgu maddelerinin endotoksin sızdırmazlık etkinliklerini *in vitro* olarak karşılaştırmaktır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

### Kullanılan Retrograd Dolgu Maddeleri

Çalışmada retrograd dolgu maddesi olarak; amalgam (Cavex, Haarlem, Holland), MTA (Mineral trioksit agregat, Pro Root MTA, Dentsply, Tulsa, OK, USA), Fuji II LC (ışınla sertleşen cam iyonomer siman, GC Co., Tokyo, Japan), Super EBA (silikonla güçlendirilmiş çinko oksit ojenol siman, Harry J Bosworth Co, Sokokie, IL, USA), ve P60 (kompozit dolgu, 3M Espe, St. Paul, MN, USA) bir dentin bonding ajanı olan Single Bond (3M Espe, St. Paul, MN, USA) ile birlikte kullanıldı.

### Dişlerin Seçimi ve Hazırlanması

Çalışmada 30 adet periodontal veya ortodontik nedenlerle çekilen tek kök ve kanallı mandibular premolar insan dişleri kullanıldı. Kök yüzeyinde çürük, abrazyon kavitesi, çatlak ve kırık bulunan dişler çalışmaya dahil edilmedi. Çekim sonrası dişler %5.25'lik sodyum hipoklorit (NaOCl) solüsyonunda 60 dak. kadar bekletilerek kök yüzeyindeki organik artıklar uzaklaştırıldı. Bu işleme rağmen kök yüzeyinde kalan artık dokular bir periodontal küret yardımı ile uzaklaştırıldı. Hazırlanan örnekler kullanılabildiği kadar +4°C'de serum fizyolojik solüsyonunda saklandı.

Dişler rasgele her grupta 6 adet olmak üzere 5 gruba ayrıldı. Köklerin boyları standart uzunlukta (16 mm) olacak şekilde, dişlerin apikal 3 mm ve koronal kısımları separe yardımıyla kesildi. Her bir kök kanalının preparasyonu, 50 nolu kanal aleti ebadına kadar K-tipi kanal aletleri (Mani Inc, Machi Tochigi, Japan) ile step back tekniği kullanılarak yapıldı. Kök ucu şekillendirmesi ise, peeso frezler (Mani Inc, Machi Tochigi, Japan) kullanılarak, 3 mm derinliğinde ve 1 mm çapında kaviteler oluşacak şekilde prepare edildi. Ardından koronal açılardırma uygulanarak preparasyon işlemi tamamlandı. Bu işlem esnasında kök kanalları %5.25'lik NaOCl ile yıkandı. İşlemler tamamlandıktan sonra kökler, olabilecek endotoksin ve diğer bakteriyel metabolitlerden arındırmak için, %5.25'lik NaOCl içinde 24 saat bekletildi. Bu sürenin sonunda dişler steril serum fizyolojik içinde 24 saat bekletilerek nörtralize edildi.

Daha sonra kanallar kloroform kullanılarak yumuşatılan guta perka ile apikal 3 mm mesafeye kadar dolduruldu. Ardından üreticilerin talimatları doğrultusunda hazırlanan retrograd dolgu maddeleri köklerin prepare edilmiş olan apikal 3 mm bölümüne uygun büyüklükteki düz uçlu fulvarlarla yerleştirilerek kondanse edildi. Dolgu maddelerinin sertleşmesini takiben koronal bölümden taşırılmış guta perkalar köklerin içinden uzaklaştırıldı. Her bir grup-

tan bir kök negatif kontrol amacıyla tamamıyla mumla dolduruldu.

Kapaklı ependorf tüplerinin uç kısmı kesilerek dişlerin apikal bölümünün geçebileceği bir açıklık sağlandı. Kökler apikal 3-4 mm'lik bölümü tüpün ucundan dışarı taşıyacak şekilde yerleştirilip, arada kalan boşluk yapışkan mumla dolduruldu. Dişlerin dışarıda kalan kısmına iki kat tırnak cilası ile kaplandı.

Çalışmamızda plastik vidalı kapakları olan 2 ml'lik cam şişeler kullanıldı. Kapaklar tam ortalarından 2 cm çapında olacak şekilde delindi. Kapaklar ve şişeler ayrı ayrı yıkanıp 24 saat %5.25'lik NaOCl içinde bekletildi daha sonra yıkama işleminden geçirilip durulandı. Tüm bu işlemlerin ardından delinen kapaklara, içlerinde kökler olan ependorf tüpleri sıkıca yerleştirildi. Bu modellere (diş-tüp-kapak ünitesi) 24 saat etilen oksit sterilizasyonu (Anprolene AN 74C Gas Sterilizer, Andersen Products Inc., Haw River, NC, USA) uygulandı.

#### **Limulus Amebocyte Lysate (LAL) Testinin Uygulanması**

Cam şişeler tek tek alüminyum folyo ile kaplandıktan sonra 2 saat süre ile 180°C'de steril edildi. Deneyin bu aşaması LAL Kinetic Reagent Test Kiti (Charles River Labs., Charleston, UK) kullanılarak sürdürüldü. Tüm okumalar Ati-Log Kinetic Tube Reader (Labs Kinetics Ltd., London, UK), değerlendirmeler ise Ati-Log V 4.6 (Labs Kinetics Ltd., London, UK) programı kullanılarak yapıldı. Yapılan ön çalışmada sterilizasyon sonrası kurulan sistemin taşıdığı baz endotoksin değerlerinin çalışmayı etkilemeyecek şekilde, kabul edilen normların altında olduğu tespit edildi.

Tüm çalışmalar steril kabin kullanılarak steril koşullarda yapıldı. İlk önce steril şişelere mikropipet ve dispenser yardımı ile 3.5 ml apirojen su (LAL Reagent Water, LRW Lot P02436, Charles River Lab, Charleston, UK) eklendi. 10 ng'lık standart *Escherichia coli* 055:B5 liyofilize endotoksin (Lot EX23232, Charles River Lab., Charleston, UK) şişesine üreticinin talimatları doğrultusunda yine mikropipet vasıtasıyla 2.4 ml apirojen su eklenip 5 dak. boyunca vortex karıştırıcıda karıştırılıp 50 EU/ml'lik bir çözelti elde edildi.

Daha önceden hazırlanan diş-tüp-kapak üniteleri, içinde apirojen su bulunan şişelere vidalandı. Ependorf tüplerinin tek tek kapakları açılarak köklerin koronal kısımlarından mikropipet yardımıyla hazırlanan solüsyondan 0.05 ml (50 µl) enjekte edildi. Böylelikle enjekte edilen sıvı içinde 2.5 EU endotoksin dişin içine taşınmış oldu. Bu miktarın hepsi şişenin içine geçerek suya karışsa bile toplam miktar 3.55 ml, beklenen maksimum konsan-

rasyon ise (2.5 EU/3.55 ml) 0.70 EU/ml olarak hesaplandı. Bu şekilde hazırlanan modeller ilk 24 saat değerlendirilmesini beklemek üzere 37°C'de saklandı.

Standart solüsyonların hazırlanması için öncelikle, 10 ng'lık standart *Escherichia coli* 055:B5 liyofilize endotoksin 3 ml apirojen su ile sulandırılıp 5 dak. vortex karıştırıcıda karıştırılarak 50 EU/ml'lik solüsyon elde edildi.

13x100 mm 10 ml'lik, borosilikat, apirojen 3 adet tüpün (Charles River Lab., Charleston, UK) birincisine 4.9 ml, ikincisine 4.5 ml, üçüncüsüne 4.5 ml apirojen su eklendi. Daha önce hazırlanmış olduğumuz 50 EU/ml'lik solüsyondan mikropipet vasıtasıyla 0.1 ml (5 EU endotoksin içeren) çekilip 4.9 ml apirojen su içeren ilk tüpe eklendi. Böylelikle 1 EU/ml'lik bir solüsyon elde edilmiş oldu. Ardından 1 EU/ml'lik bu tüpten 0.5 ml'lik (0.5 EU endotoksin içeren) solüsyon çekip 4.5 ml'lik ikinci tüpe eklendi. Bu şekilde de 0.1 EU/ml'lik solüsyon elde edildi. Bu 0.1 EU/ml'lik solüsyondan da 0.5 ml (0.05 EU endotoksin içeren) çekilip 4.5 ml'lik üçüncü tüpe eklenerek 0.01 EU/ml'lik solüsyon elde edildi. Böylelikle sırasıyla 1 EU/ml, 0.1 EU/ml, 0.01 EU/ml'lik üç farklı standart solüsyon elde edilmiş oldu.

24 saatin sonunda modeller etüvden çıkarılarak steril kabinin içine yerleştirildiler. Elde edilen örnekler aktarılabilecek tüpleri karıştırmamak için her tüpün kendine ait yuva veya yerleşeceği beyaz izolasyon köpüğünden hazırlanan şablonu da steril kabinin içine koyarak 8x75 mm'lik borosilikat apirojen tüpler (Charles River Lab., Charleston, UK) yuvalarına yerleştirildi.

Kinetic Tube Reader cihazının çalışma ve değerlendirme prensipleri gereği her örnekten iki bağımsız ölçüm yapıldı. Her bir çalışma grubu için Tablo 1'deki sıra oluşturuldu.

Tablo 1'deki 9-12. satırlar arasında görülen "numune" ve "numune + spike" aşamaları tek bir dolgu maddesini temsil etmektedir. Sonuç tablosunda bir grubu oluşturan her 5 üye için ayrı ayrı uygulandı.

**Tablo 1.** Deney çalışma şeması

1.	Negatif Kontrol
2.	Negatif Kontrol
3.	Pozitif Kontrol 1.00
4.	Pozitif Kontrol 1.00
5.	Pozitif Kontrol 0.1
6.	Pozitif Kontrol 0.1
7.	Pozitif Kontrol 0.01
8.	Pozitif Kontrol 0.01
9.	Numune
10.	Numune
11.	Numune + Spike
12.	Numune + Spike

Her bir dolgu maddesi için yapılan ölçümde 28 örnekli bir deney grubu oluşturulduğu için Kinetic Tube Reader cihazının kapasitesi göz önüne alınarak her seferinde 5, çalışma boyunca toplam 10 farklı deney yapıldı.

Öncelikle negatif kontrollerin şişeleri steril kabin içinde açılarak 0.1 ml sıvı çekilip şablonda belirlenen yerde duran iki ayrı tüpe enjekte edildi. Deneyin tüm aşamalarında ajirojen suyun taksimi hariç her işlemde sonra mikropipet ucu değiştirildi. Ardından sırasıyla hazırlanan 1 EU/ml, 0.1 EU/ml, 0.01 EU/ml'lik standart solüsyonlardan 0.1 ml çekilip kendilerine ayrılan tüplere aktarıldı. Böylelikle ilk sekiz tüp çalışmaya hazırlandı. Bu işlemlerin ardından ilk numunenin şişesinden 0.4 ml çekilip 9, 10, 11, 12 nolu tüplere eşit olarak 0.1 ml aktarıldı. Ardından 11 ve 12 nolu tüplere 1 EU/ml'lik 0.01 ml standart endotoksin çözeltisinden eklendi. Böylelikle elde ettiğimiz numunenin üzerine tarafımızdan standardize bir endotoksin çözeltisi ekleyerek elde edilen bu örneğe "spike" adı verilmektedir. Spike ikinci bir pozitif kontrol aşaması olup amacı, numune ortamında endotoksinin bozulmasını sağlayacak bir etkenin olup olmadığını kontrol etmek dolayısıyla sağlamasını yapmaktır. Deney esnasında her bir numuneden iki bağımsız, iki tane de spike'lı ölçüm yapıldı. Bu prosedür her 5 dolgu maddesine ait 25 numune için aynı şekilde tekrarlanarak, tüpler şablonda kendilerine ait yerlere yerleştirildi.

LAL Endochrome-K (Charles River Lab., Charleston, UK) şişesi açılarak mikropipet vasıtasıyla 3.2 ml ajirojen su ile üretici firmanın talimatları doğrultusunda sulandırılarak köpürmemesine dikkat edilerek elde hafifçe çalkalandı. Bu solüsyon şablonda bekleyen tüplerin her birine 0.1 ml olmak üzere mikropipetlerle aktarıldı.

Kinetic Tube Reader cihazı daha önceden açılarak bağlı olduğu bilgisayar ünitesi vasıtasıyla çalışma ve numunelere ait ön beklenen konsantrasyon, numune sayıları ve yerleşimleri gibi ön veriler girildi. Cihazın ideal çalışma sıcaklığı olan 37°C ye kadar ısınması beklendi. Daha sonra tüpler şablondaki düzenleri esas alınarak cihaz üzerindeki yuvalara yerleştirildi.

Bütün bu laboratuvar işlemlerinden sonra 1 saat sürecek olan okuma ve değerlendirme sürecini yürütecek olan program başlatıldı. Bu sürenin sonunda tüpler cihazdan çıkarılıp numunelerde bulunan endotoksin ve LAL reaksiyonu sonucu sarı renge doğru bir dönüşme ve jelleşme olup olmadığı kontrol edildi. Tüm bu işlemlerin ardından numuneler alındıktan sonra tekrar etüve yerleştirilen örnekler bir 14 günlük bekleme periyodunun ardından sırasıyla aynı işlem dizininin geçirilmek üzere tekrar çıkarıldılar ve LAL testi ile ilgili prosedür bir kez daha uygulandı.

## Test Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Deney sürecinin sonunda Ati – Log V 4.6 programı ile veriler incelendi. Bu aşamada 4 ana kriterin sağlanmış olmasına dikkat edildi. Bunlar:

1. Konsantrasyon zaman eğrisi ait olan Correl Coefficient katsayısı 0.98'den az olmamalıdır.

2. Numunelere deney aşamasında eklediğimiz 1EU/ml lik 0.01 ml standart endotoksini temsil eden Spike Recovery değeri 50–200 arasında olmalıdır.

3. Negatif kontrollerin oluşum zamanı en uzun olmalıdır.

4. Spike Recovery değeri en yüksek olan numunenin oluşum zamanı konsantrasyonu en yüksek olan pozitif kontrolün (1.00 EU/ml) oluşum zamanı ile en düşük pozitif kontrolün (0.01 EU/ml) oluşum zamanı arasında olmalıdır.

Bu bilgiler göz önüne alınarak öncelikle bütün tüpler beklenen jelleşme ve renk değişimi açısından tek tek gözden geçirildi. Bu işlemin sonucunda bütün tüplerde beklenen reaksiyonun gerçekleştiği gözlemlendi. Ardından programdan ayrıntılı rapor alındı. Bu raporda temel kriterler oluşum zamanı (dak.) ve konsantrasyon (EU/ml) olarak alındı. Yukarıda geçen kriterler ışığında bu veriler incelendi ve uygunlukları saptandı. 14. güne ait veriler de bu sürenin sonunda aynı yöntemle elde edilip değerlendirildi.

## İstatistiksel Analiz

Elde edilen tüm veriler SPSS (Version 10.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) programına yüklendikten sonra, Kruskal Wallis ve Mann-Whitney-U testleri ile değerlendirildi.

## BULGULAR

Grupların 1. ve 14. gün sonundaki karma oluşum zamanları değerlendirildiğinde, tüm gruplarda oluşum zamanı sürelerinde bir azalma göze çarpmakla beraber sadece MTA grubunda bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Aynı şekilde oluşum zamanı değerleri 1. ve 14. gün bazında birbirleriyle karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunamamıştır ( $p>0.05$ ) (Tablo 2).

**Tablo 2.** Grupların 1. ve 14. gün oluşum zamanı değerleri

Gruplar	Oluşum Zamanı (dak.)		P
	1.Gün ortalama $\pm$ Sh	14.Gün ortalama $\pm$ Sh	
MTA	15.77 $\pm$ 2.42	15.05 $\pm$ 2.24	P=0.019, P<0.05
Super EBA	19.64 $\pm$ 2.96	19.49 $\pm$ 2.38	P=0.198, P>0.05
P60	19.19 $\pm$ 3.03	19.14 $\pm$ 2.33	P=0.124, P>0.05
Amalgam	16.09 $\pm$ 2.57	16.02 $\pm$ 3.17	P=0.131, P>0.05
Fuji II	19.68 $\pm$ 3.16	19.08 $\pm$ 2.34	P=0.131, P>0.05
	P=0.117, P>0.05	P=0.059, P>0.05	

Sh: Standart hata

Grupların 1. ve 14. gün sonundaki toplam konsantrasyon değerleri birbirleriyle karşılaştırıldığında, bu değerler açısından 1. ve 14. gün sonunda gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farka rastlanmamıştır ( $p>0.05$ ). Grupların kendi içlerinde 1. gün ve 14. gün konsantrasyon değerleri karşılaştırıldığında ise tüm gruplarda istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmiştir ( $p<0.05$ ) (Tablo 3).

**Tablo 3.** Grupların 1. ve 14. gün konsantrasyon değerleri

Gruplar	Konsantrasyon (EU/ML) 1.Gün ortalama ± Sh	Konsantrasyon (EU/ML) 14.gün ortalama ± Sh	
MTA	0.4107±0.0848	0.4461±0.2585	P=0.026, P<0.05
Super EBA	0.1952±0.0404	0.2046±0.0497	P=0.003, P<0.05
P60	0.2179±0.0529	0.2307±0.0760	P=0.041, P<0.05
Amalgam	0.3865±0.1482	0.5032±0.1434	P=0.004, P<0.05
Fuji II	0.2281±0.0681	0.2351±0.0760	P=0.033, P<0.05
	P=0.209, P>0.05	P=0.098, P>0.05	

Sh: Standart hata

Her bir grubu oluşturan numune, pozitif kontrol ve spike değerlerine ait 1. ve 14 gün oluşum zamanı sonuçları değerlendirildiğinde MTA, Fuji II ve amalgama ait numune oluşum zamanı değerlerinde 14. gün sonunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlenirken, Super EBA ve P60' a ait değerlerde anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir ( $p>0.05$ ) (Tablo 4).

**Tablo 4.** Grupların pozitif kontrol, numune, spike 1. ve 14.gün oluşum zaman değerleri

Gruplar		Oluşum Zamanı (dak.) 1. Gün ortalama±Sh	Oluşum Zamanı (dak.) 14. Gün ortalama±Sh	
MTA	Pozitif kontrol	24.42±7.09	23.18±6.59	P=0.144, P>0.05
	Numune	13.69±0.96	12.60±0.64	P=0.043, P<0.05
	Spike'lı değer	10.99±0.59	10.94±0.85	P=0.500, P>0.05
Super EBA	Pozitif kontrol	27.33±9.84	25.50±7.68	P=1.000, P>0.05
	Numune	18.35±1.72	17.77±1.59	P=0.225, P>0.05
	Spike'lı değer	15.81±1.56	15.35±1.40	P=0.225, P>0.05
P60	Pozitif kontrol	27.45±9.96	25.28±7.49	P=1.000, P>0.05
	Numune	17.75±1.59	16.98±1.56	P=0.080, P>0.05
	Spike'lı değer	15.63±1.53	14.79±1.38	P=0.345, P>0.05
Amalgam	Pozitif kontrol	27.44±9.24	24.58±7.64	P=0.273, P>0.05
	Numune	13.59±1.64	12.28±1.39	P=0.043, P<0.05
	Spike'lı değer	11.80±1.48	10.64±1.13	P=0.043, P<0.05
Fuji II	Pozitif kontrol	27.48±1.26	23.79±6.95	P=0.317, P>0.05
	Numune	18.41±2.81	17.83±2.51	P=0.043, P<0.05
	Spike'lı değer	15.98±2.45	15.28±1.99	P=0.225, P>0.05

Sh: Standart hata

Tablo 5'de grupların kendi içlerinde pozitif kontrol, numune ve spike olmak üzere 1. ve 14. gün konsantrasyon değerleri incelendi. Buna göre; P60 dışında tüm grupların numune konsantrasyon değerlerinde 14. gün sonunda 1. güne göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlemlendi. Ayrıca, tüm gruplardaki spike konsantrasyon değerlerinde eklenen standart endotoksin oranında hata payları içinde bir artış ve oluşum zamanlarında ise buna bağlı bir düşüş

gözlenmiştir.

**Tablo 5.** Grupların pozitif kontrol, numune, spike 1. ve 14. gün konsantrasyon değerleri

Gruplar		Konsantrasyon (EU/ML) 1.gün ortalama±Sh	Konsantrasyon (EU/ML) 14.gün ortalama±Sh	
MTA	Pozitif Kontrol	0.2733±0.2358	0.2848±0.2498	P=0.465, P>0.05
	Numune	0.4059±0.1031	0.4606±0.1135	P=0.043, P<0.05
	Spike'lı Değer	0.5122±0.1074	0.5699±0.1116	P=0.080, P>0.05
Super EBA	Pozitif Kontrol	0.2887±0.2540	0.2876±0.2557	P=1.000, P>0.05
	Numune	0.1045±0.0444	0.1182±0.0461	P=0.043, P<0.05
	Spike'lı Değer	0.2120±0.0473	0.2238±0.0458	P=0.042, P<0.05
P60	Pozitif Kontrol	0.2887±0.2540	0.2876±0.2557	P=1.000, P>0.05
	Numune	0.1335±0.0698	0.1572±0.0740	P=0.043, P<0.05
	Spike'lı Değer	0.2465±0.0810	0.2577±0.0748	P=0.345, P>0.05
Amalgam	Pozitif Kontrol	0.2633±0.2217	0.3250±0.2943	P=0.715, P>0.05
	Numune	0.3839±0.1940	0.5231±0.2514	P=0.043, P<0.05
	Spike'lı Değer	0.4877±0.1949	0.6259±0.2488	P=0.043, P<0.05
Fuji II	Pozitif Kontrol	0.2842±0.2500	0.2848±0.2498	P=0.317, P>0.05
	Numune	0.1540±0.0710	0.1625±0.0719	P=0.043, P<0.05
	Spike'lı Değer	0.2570±0.0725	0.2683±0.0677	P=0.345, P>0.05

Sh: Standart hata

Bütün gruplardaki numunelere ait 1. ve 14. gün oluşum zamanı sonuçları birbirleriyle karşılaştırılarak değerlendirildiğinde, gruplara ait numuneler arasında oluşum zamanı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadığı görüldü ( $p>0.05$ ) (Tablo 6).

**Tablo 6.** Numunelere ait 1.ve 14. gün oluşum zamanı değerlerinin karşılaştırılması

Gruplar	Oluşum Zamanı (dak.) 1. Gün ortalama±Sh	Oluşum Zamanı (dak.) 14. Gün ortalama±Sh
MTA	13.69±0.96	12.40±0.64
Super EBA	18.35±1.72	17.77±1.59
P60	17.75±1.59	16.48±1.56
Amalgam	13.59±1.64	12.28±1.39
Fuji II	18.41±2.81	17.83±2.51
	P=0.204, P>0.05	P=0.065, P>0.05

Sh: Standart hata

Gruplardaki numunelerin 1. ve 14. gün oluşum zamanı ve konsantrasyon değerleri birbirleriyle karşılaştırıldığında, numuneler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir ( $p>0.05$ ). Böylelikle kullanılan retrograd dolgu maddeleri arasında endotoksin sızdırmazlığı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ( $p>0.05$ ) (Tablo 7).

**Tablo 7.** Numunelere ait 1. ve 14. gün konsantrasyon değerlerinin karşılaştırılması

Gruplar	Konsantrasyon (EU/ML) 1.Gün Ortalama ± Sh	Konsantrasyon (EU/ML) 14.Gün Ortalama ± Sh
MTA	0.4006±0.1135	0.4099±0.1031
Super EBA	0.1045±0.0444	0.1182±0.0461
P60	0.1335±0.1559	0.1572±0.0740
Amalgam	0.3839±0.1910	0.5231±0.2514
Fuji II	0.1540±0.0710	0.1625±0.0719
	P=0.065, P>0.05	P=0.056, P>0.05

Sh: Standart hata

Tüm gruplardaki spike değerlerinde eklenen endotoksin miktarlarıyla paralel olarak hata payları içinde bir artış gözlenmiş, tüm gruplarda en yüksek konsantrasyon ve en düşük oluşum zamanı değerlerine pozitif kontrollerde rastlanmıştır. Bu durum çalışmanın kontrol mekanizmasının sağlıklı işlediğini göstermektedir.

## TARTIŞMA

Periapikal lezyonlar genellikle kök kanal yolu ile bakterilerin ve bakteriyel metabolitlerin kök ucuna gelmeleriyle oluşur. Kemik yıkım reaksiyonundan sorumlu mediatörler, lipopolisakkaritler (LPS), diğer hücre duvarı komponentleri ve konak tarafından üretilen maddelerdir (sitokinler, TNF, prostoglandinler ve bradikinin). Endotoksinler, bu bakterilerin hücre duvarlarının majör komponentleri olan lipopolisakkarit yapılarıdır. Endotoksinler periapikal lezyonların patogeneğinde önemli rol oynarlar. Hagemann faktörünü aktive ederek kan pıhtılaşmasını başlatırlar ve bir ağrı mediatörü olan bradikinin prodüksiyonunu sağlarlar. Ayrıca, osteoklastların gelişimine, kemik rezorpsiyonlarına, trombosit hasarına, histaminin açığa çıkarılıp mast hücrelerinin degranülasyonuna, ateş, lökopeni, hipoglisemi ve hipotansiyona, hatta önemli organların perfüzyonu ve şoka neden olabilirler<sup>13,17,18,22</sup>. Pulpal ve periapikal hastalıkların çoğu oral bakterilerin direkt veya indirekt etkileriyle oluşur. Her ne kadar irritan faktörler fiziksel, kimyasal ve termal olabilirlerse de, bunların etiolojisinde esas yatan öğenin mikrobiyal ajanlar olduğu kabul edilmiştir<sup>22</sup>. Endotoksinler ölü bir gram (-) bakteriden bile kaynaklanabilecekleri için ölü bakterilerin zararı yaşayanlardan daha fazla olabilir. Gram (-) bakteriler genellikle nekrotik dişlerin kök kanallarında bulunurlar. LPS yapıları anlık konsantrasyonlarda bile büyük bir biyolojik etki gösterecek kapasitededirler<sup>13,18,20</sup>.

Yapılan çalışmalarda periapikal bölge ve granülomlarda önemli oranlarda endotoksin varlığı tespit edilmiştir<sup>5,6,18,22</sup>. Horiba ve arkadaşları<sup>6</sup> apikal periodontitisli dişlerde endotoksin varlığına dair yaptıkları çalışmada semptomatik, eksudatif ve apikal radyolüseni gösteren dişlerde, bu bulguları göstermeyen dişlere göre daha yoğun oranda endotoksin tespit etmişlerdir. Pitts ve arkadaşları<sup>18</sup> köpek dişleri üzerinde yaptıkları çalışmada, dişlerin kök kanallarına *S. Minnesota*'ya ait endotoksin enjekte etmiş ve oluşan periapikal lezyonlarda PMN lökositlerin baskın hücre olduğunu ve bu bölgelerde kemik rezorpsiyonları izlendiğini belirtmişlerdir. Benzer şekilde, Filho ve arkadaşları<sup>7</sup> köpek dişlerinde yaptıkları başka bir çalışmada, pulpalarına endotoksin uygulanan dişlerde radyolojik olarak izlenebilen lezyonlar oluşurken, kontrol gruplarında ve kalsiyum hidroksitle kombine olarak endotoksin uygu-

lanan dişlerde lezyon gelişmemiştir. Taşman<sup>22</sup> periapikal lezyonlardan aldığı örneklerde endotoksin varlığını araştırdığı çalışmasında, periapikal lezyonlu dişlerde endotoksin varlığına rastlanma oranının kontrol grubunu teşkil eden dişlere göre anlamlı derecede fazla olduğunu tespit etmiştir.

Araştırmacılar pulpal ve periapikal lezyonların bakteri istilasıyla değil çoğunlukla bakteriyel ürünlerin sızmasıyla oluştuğunu belirtmişlerdir<sup>2,15,24,25</sup>. Warfvinge ve arkadaşları<sup>25</sup> maymun dişlerinde açtıkları kavitelere pulpa odasıyla kalan 1 mm dentin üzerine oral mikroorganizmalardan elde ettikleri endotoksinleri uygulamışlardır. Bunun sonucunda yüksek moleküler ağırlığa sahip metabolitlerin dentin üzerinden nüfuz ederek pulpada enflamatuvar reaksiyonlara yol açtıklarını tespit etmişlerdir. Nissan ve arkadaşları<sup>15</sup> bakteriyel ürünlerin dentinde 24 saatlik bir sürede 0.5 mm ilerleyebilme kapasitesine sahip olduklarını yaptıkları *in vitro* çalışmalarında göstermişlerdir. Trope ve arkadaşları<sup>24</sup> guta perka ile tıkanmış kök kanallarında endotoksinlerin penetrasyon yeteneklerini ölçtükleri çalışmalarında 21 günlük bir süre sonunda örneklerin %31.5'inde sızıntı tespit etmişlerdir. Araştırmacılar enfekte pulpal dişlerde endotoksinlerin kök kanalı boyunca ilerleyerek periapikal dokularda enflamasyon meydana getirebileceklerini belirtmişlerdir. Carratu ve arkadaşları<sup>2</sup> kök kanal tedavili dişlerde endotoksin ve bakteriyel sızdırmazlığı incelemişler. Bu çalışmanın sonucunda endotoksin gruplarında 31. güne kadar bir sızıntı görülmezken, bakteri gruplarında 13-37. günler arasında tüm örneklerde sızıntı tespit edilmiştir. Araştırmacılar bu sonucu, bakterilerin enzimatik aktiviteleriyle dişteki yapıları ve guta perkeyi etkileyerek kendilerine geçiş için boşluklar yarattıkları şeklinde yorumlamışlardır ve bu enzimatik aktiviteden yoksun endotoksinlerin daha az sızıntı göstermelerini aynı nedene bağlamışlardır. Bu ve benzeri çalışmalar periapikal enfeksiyonların, endotoksin ve diğer bakteriyel metabolitlerin kök kanalları boyunca ilerleyerek bu bölgeyi etkilemesi sonucu meydana geldiğini ortaya koymaktadır. Dentin yapısı ve bazı kök kanal dolguları bu geçişe engel olamamaktadırlar. Kök kanal sisteminin üç boyutlu olarak sızdırmaz bir şekilde doldurulması ve gerektiğinde retrograd dolguyla desteklenmesi endotoksin geçişini engellemek açısından önemlidir.

LAL testi yeterli miktarda endotoksinin lizati koagüle ettiği savı üzerine kurulmuştur ve bugün geniş bir oranda kullanım alanı bulmaktadır. Kromojenik substrat kullanılarak endotoksin varlığına olan hassasiyetleri geliştirilmiştir<sup>16</sup>. Bu test endotoksinlerin fonksiyon göstermek için Lipid A komponentine bağımlı olmalarından yola çıkarak endotoksin varlığını ortaya koymaktadır. LAL testi bugün

oldukça güvenilir kabul edilmekte ve özellikle ilaç üretiminde alternatifsiz olarak kullanılan bir yöntemdir ve endotoksinlerle yapılan çalışmalarda LAL testi ağırlıklı bir yere sahiptir.

Retrograd dolgu maddelerinin apikal sızdırmazlık yetenekleri çeşitli yöntemler kullanılarak birbirleriyle karşılaştırılmalı olarak değerlendirilmiştir<sup>11</sup>. *In vivo* çalışmalar doku madde etkileşimi ve materyalin uygulandığı bölgelerdeki dinamikleri yansıtması açısından ön plana çıkarırken, *in vitro* çalışmalar deney şartlarının kontrol altında tutulabilmesi ve sızıntının kolaylıkla izlenebilmesi açısından avantaj teşkil etmektedir. Mikrosızıntı, retrograd dolgu ve kök perforasyonu gibi tedavilerde başarıyı etkileyen en önemli faktördür. Kök kanal sistemi ile dişin dış yüzeyleri arasındaki iletim yollarının kapatılması burada büyük önem taşır. Çünkü bir çok endodontik başarısızlığın nedeni bir çok bakteri ve metabolitlerinin periradiküler dokulara sızmasına bağlanmaktadır. Bu çalışmada periapikal lezyonların oluşmasında en büyük role sahip olan endotoksinler kullanılmıştır. Böylelikle dolgu maddelerinin direkt olarak bu moleküller üzerindeki sızdırmazlık etkilerini inceleme ve birbirleriyle karşılaştırma olanağı bulunmuş olduk.

Tang ve arkadaşları<sup>21</sup> yaptıkları *in vitro* çalışmada bu çalışmaya benzer şekilde farklı retrograd dolgu maddelerinin endotoksin sızdırmazlıklarını incelemiş ve sonuçları LAL testi uygulayarak değerlendirmişlerdir. Bu çalışmanın sonuçlarına göre, MTA tüm ölçüm aralıklarında amalgam ve IRM'den daha az bir sızdırmazlık gösterirken, Super EBA karşısında tüm ölçüm aralıkları içinde sadece 2. ve 12. hafta sonuçları itibarıyla istatistiksel olarak anlamlı derece de az bir sızıntı gösterebilmiştir. Çalışmamızda kullanılan LAL testi Tang ve arkadaşlarının kullandığından farklı ve endotoksin varlığına daha duyarlı bir sistem olması nedeniyle çalışmamız 14 gün olarak planlanmıştır. Çalışmamızda tüm numunelerde negatif kontrol gruplarına göre sızıntı tespit edilip bu sızıntı miktarları arasında 24 saat ve 14 gün ölçüm aralıklarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır. Tang ve arkadaşlarının ulaştığı sonuçlarda MTA'nın en az sızdırmazlığa sahip materyal olarak tespiti, çalışmalar arasında sonuç itibarıyla bir farklılık doğmasına neden olmuştur. Bu durum LAL testinde kullanılan metotların ve deney sürelerinin farklı olmasına bağlı olduğunu düşünmekteyiz.

Torabinejad ve arkadaşları<sup>23</sup> S. *Epidermis* kullanarak yaptıkları çalışmada MTA, Super EBA ve IRM'ye göre çok daha az düzeyde sızıntı göstermiştir. Scheerer ve arkadaşları<sup>19</sup> ise, P. *Nigrescens* kullandıkları çalışmada MTA, Super EBA ve Geristore arasında bakteriyel sızıntı bakı-

mından anlamlı bir fark bulamamışlardır. Dharananidhikul ve arkadaşları<sup>3</sup> çalışmalarında dentin bağlayıcıyla kullanılan kompozit rezin materyalin Super EBA ve amalgamdan bakteriyel sızdırmazlık açısından daha üstün olduğunu gözlemlemişlerdir. Adamo ve arkadaşları<sup>1</sup> ise MTA, amalgam, Super EBA ve kompozit rezinler arasında bakteriyel sızdırmazlık açısından anlamlı bir fark bulamamışlardır.

Çalışmamız sonucunda MTA, Super EBA, amalgam, Fuji II ve P60 adlı materyallerin *in vitro* koşullarda endotoksin sızdırmazlık etkinlikleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Materyallerin apikal sızıntı etkinliklerinin daha iyi anlaşılabilmesi için özellikle endotoksinler kullanılarak daha çok çalışma yapılması gerektiğine inanıyoruz. Ayrıca retrograd dolgu maddelerinin biyolojik dokular ile uyumlarının, doku içi dinamikler karşısındaki davranışlarının ve apikal iyileşmeye katkılarının daha yakından izlenebilmesine olanak verecek *in vivo* çalışmaların *in vitro* çalışmalarla kombine olarak yürütülmesinde fayda olacaktır.

#### KAYNAKLAR

1. Adamo HL, Buruiana R, Schertzer L, Boylan RJ. A comparison of MTA, Super-EBA, composite and amalgam as root-end filling materials using a bacterial leakage model. *Int Endod J* 32:197-203, 1999.
2. Carratu P, Amato M, Riccitiello F, Rengo S. Evaluation of leakage of bacteria and endotoxins in teeth treated endodontically by two different techniques. *J Endod* 28:272-275, 2002.
3. Dharananidhikul A, Noghrenian R, Rosenberg PA, Boylan RJ. Comparative bacterial assay of microleakage of three retrofilling materials. *J Endod* (abstrct) 21:225, 1995.
4. Erkut S, Tanyel RC, Keklikoğlu N, Yıldırım S, Katiboğlu AB. A comparative micro leakage study of retrograd filling materials. *Turk J Med Sci* 36:113-120, 2006.
5. Filho PN, Leonardo MR, Silva LA, Assed S. Radiographic evaluation of the effect of endotoxin (LPS) plus calcium hydroxide on apical and periapical tissues of dogs. *J Endod* 28:694-696, 2002.
6. Horiba N, Maekawa Y, Matsumoto T, Nakamura H. A study of the distribution of endotoxin in the dentinal wall of infected root canals. *J Endod* 16:331-334, 1990.
7. Inoue S, Yoshimura M, Tinkle JS, Marshall FJ. A 24-week study of the microlakage of four retrofilling materials using a fluid filtration method. *J Endod* 17:369-375, 1991.
8. Johnson BR. Considerations in the selection of a root-end filling material. *Oral Surg Oral Med, Oral Pathol Oral Radiol Endod* 87:398-404, 1999.
9. Kersten HW, Moorer WR. Particles and molecules in endodontic leakage. *Int Endod J* 22:118-324, 1989.
10. King KT, Anderson RW, Pashley DH, Pantera EA. Longitudinal evaluation of the seal of endodontic retrofillings. *J Endod* 16:307-

- 310, 1990.
11. Küçükay IK. Endodontide apikal sızıntı inceleme yöntemleri 1. bölüm. DÜ Dişhek Fak Derg 2:65-79, 1991.
  12. Lyroudia K, Pantelidou O, Mikrogeorgis G, Nikopoluos N, Pitas I. Three dimensional reconstruction: a new method for the evaluation of apical microleakage. J Endod 26:36-38, 2000.
  13. Nair RPN. Pathobiology of the periapex: Cohen S., Burns RC. Pathways of the Pulp. Eight Ed, Mosby Co., St. Louis, 457-468, 2002.
  14. Niederman R, Theodosopoulou JN. A systematic review of *in vivo* retrograde obturation materials. Int Endod J 36:577-585, 2003.
  15. Nissan R, Segal H, Pashley D, Stevens R, Trowbridge H. Ability of bacterial endotoxin to diffuse through human dentin. J Endod 21:62, 1995.
  16. Obayashi T, Tamura H, Tanaka S, Ohki M, Takahashi S, Arai M, Masuda M, Kawai T. A new chromogenic endotoxin-specific assay using recombinant limulus coagulation enzymes and its clinical applications. Clin Chim Acta 149:55-65, 1985.
  17. Pisano JV, Weine FS. Microbiology of endodontics: Endodontic Therapy. Fifth Ed, Mosby Co., Philadelphia, 693-701, 1996.
  18. Pitts DL, Williams BL, Morton TH. Investigation of the role of endotoxin in periapical inflammation. J Endod 8:10-18, 1982.
  19. Scheerer SQ, Steiman HR, Cohen J. A comparative evaluation of three root-end filling materials : an *in vitro* leakage study using *Prevotella nigrescens*. J Endod 27:40-42, 2001.
  20. Takahashi K. Microbiological, pathological, inflammatory, immunological and molecular biological aspects of periradicular disease. Int Endod J 31:311-325, 1998.
  21. Tang HM, Torabinejad M, Kettering JD. Leakage evaluation of root-end filling materials using endotoxin. J Endod 28:5-7, 2002.
  22. Taşman F. Periapikal lezyonlarda endotoksinlerin rolü. Doktora tezi. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Endodonti (Diş) Programı, 1995.
  23. Torabinejad M, Rastegar FA, Kettering JD, Pitt Ford TR. Bacterial leakage of mineral trioxide aggregate as a root end filling material. J Endod 21:109-112, 1995.
  24. Trope M, Chow E, Nissan R. *In vitro* endotoxin penetration of coronally unsealed endodontically treated teeth. Endod Dent Traumatol 11:90-94, 1995.
  25. Warfvinge J, Dahlen G, Bergenholtz G. Dental pulp response to bacterial cell wall material. J Dent Res 64:1046-1050, 1985.
  26. Yatsushiro JD, Baumgartner JC, Tinkle JS. Longitudinal study of the microleakage of two root end filling materials using a fluid conductive system. J Endod 24:716-719, 1998.

#### Yazışma adresi

Yrd. Doç. Dr. Kürşat Er  
Karadeniz Teknik Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi  
Endodonti Anabilim Dalı, 61080 Trabzon  
Tel. : 0-462-3774735  
Faks : 0-462-3253017  
E-posta: kursater@ktu.edu.tr