

# YENİ BİR KÖK KANAL DOLGU PATININ PERİAPİKAL DOKULARDAKİ ETKİLERİNİN BİYOKİMYASAL YÖNDEN İNCELENMESİ <sup>†</sup>

## BIOCHEMICAL EVALUATION OF PERIAPICAL EFFECTS OF A NEW ROOT CANAL SEALER

**Hüma ÖMÜRLÜ <sup>‡</sup>,**  
**Mukadder CAN <sup>¶</sup>**

**Tayfun ALAÇAM <sup>‡</sup>,**  
**Tayfun İDE <sup>¶</sup>**

**Hülya ERTEN CAN <sup>§</sup>,**  
**Güliz GÖRGÜL <sup>‡</sup>**

### ÖZET

Bu çalışmanın amacı, deneysel olarak periapikal lezyon oluşumu sağlanan ratların kök kanallarının doldurulmasında kullanılmak için tarafımızdan geliştirilen çinkooksit öjenol (ZOE) esaslı yeni deney patı ile Roth kök kanal patininin bu lezyonlardaki TNF- $\alpha$  seviyeleri üzerine etkilerinin tespit edilerek birbirleri ile ve negatif kontrol grubu ile karşılaştırılmasıdır. 60 adet ratın 1. molar dişlerinin kök kanalları ağız ortamına açılarak 15 gün süre ile periapikal lezyon oluşumu için beklendi. Bu sürenin sonunda 1. gruptaki ratlar öldürüldükten sonra periapikal lezyonları çıkarıldı ve -80°C'de saklandı. 2. ve 3. gruptaki ratların kök kanallarına birer hafta ara ile iki defa pansuman yapıldı. 2. grup deney patı ile 3. grup Roth kök kanal patı ile dolduruldu. 1 ay sonra öldürülen ratların periapikal dokuları çıkarılarak -80°C'de saklandı. Çalışma öncesi tüm örneklerin üzerine 1cc PBS eklendi. Örnekler santrifüj edildikten sonra Lowry metodu ile protein miktarları belirlendi. Örneklerin TNF- $\alpha$  seviyeleri ELISA yöntemi ile TNF- $\alpha$  kiti kullanılarak tespit edildi. Elde edilen sonuçların istatistiksel değerlendirmesi sonucunda deney patı kullanılan grubun TNF- $\alpha$  seviyeleri Roth kök kanal dolgu patı ( $p < 0.005$ ) ve negatif kontrol grubu ( $p < 0.001$ ) ile karşılaştırıldığında aralarındaki farklılığın anlamlı olduğu ve deney patı grubunun TNF- $\alpha$  seviyelerinin daha düşük olduğu belirlendi. Sonuç olarak, tarafımızdan geliştirilen yeni deney patininin periapikal bölgedeki kemik rezorpsiyonundan sorumlu olan TNF- $\alpha$  seviyesi üzerinde aktive edici rol oynamadığı kanısına varıldı.

**Anahtar Kelimeler:** ZOE esaslı kök kanal dolgu patı, periapikal lezyon, TNF- $\alpha$

### SUMMARY

The aim of this study was to determine the effect of our recently improved ZOE based root canal sealer and Roth root canal sealer on experimentally induced periapical lesions of rats with regards to TNF- $\alpha$  levels, and compare each one with the other and the negative control group. First molar teeth of 60 rats were exposed to oral environment and waited for 15 days for periapical lesion formation. At the end of this period, the first group of rats were sacrificed and periapical lesions were taken out and kept in -80°C. Root canals of the second and the third group were irrigated 2 times in weekly intervals. Root canals of the second group was filled with the experimental root canal sealer. The third group was with the Roth root canal sealer. The second and the third group of rats sacrificed in 30 days period and periapical samples were kept in -80°C. Before the treatment, all of the samples were homogenized by adding 1cc PBS. After the samples were centrifuged, their protein amounts were determined by Lowry method. TNF- $\alpha$  levels of the samples were determined by ELISA method using TNF- $\alpha$  kit. TNF- $\alpha$  levels of experimental sealer group were lower than Roth root canal sealer and control groups and these level were statistically significant ( $p < 0.005$  and  $p < 0.001$ ). We concluded that; the new experimental sealer, has had no stimulating effect on the TNF- $\alpha$  level that is responsible for the resorption of periapical bone.

**Key words:** ZOE based root canal sealer, periapical lesion, TNF- $\alpha$

\* Gazi Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir.

<sup>†</sup> Türk Endodonti Derneği 6. Uluslararası Endodonti Kongresinde tebliğ edilmiştir.

<sup>‡</sup> Gazi Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi Diş Hastalıkları ve Tedavi Anabilim Dalı Prof. Dr.

<sup>§</sup> Gazi Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi Diş Hastalıkları ve Tedavi Anabilim Dalı Doç. Dr.

<sup>¶</sup> Mevki Asker Hastanesi Biyokimya Böl. Uz. Dr.

<sup>§</sup> GATA Vet. Dr.

## GİRİŞ

Pulpada tedavi edilmeyen bakteriyel enfeksiyonlar, konakçı periapikal dokularında periapikal lezyonların gelişimi ile sonuçlanmaktadır. Periapikal bölgede kemik rezorpsiyonu ile sonuçlanan iltihabi olaylarda, endojen kaynaklı birçok mediyatörün sorumlu olduğu belirlenmiştir. Kemik rezorpsiyonunda önemli rol oynayan bu mediyatörlerin, konakçı savunma hücreleri ile enfeksiyonların neden olduğu iritasyonlar arasındaki etkileşimler sonucu ortaya çıktığı ileri sürülmektedir<sup>4,5,6,8,9</sup>.

Günümüzde bu mediyatörlerden, konakçının immün hücrelerinden kaynak alan ve sitokinler grubundan olan Tümör Nekrozis Faktör, interlökinler, Koloni Stimüle edici Faktörler ve interferonlar üzerinde yapılan çalışmalar oldukça yoğunlaşmıştır<sup>10</sup>.

Bu grupta yer alan Tümör Nekrozis Faktör'ün monosit/ makrofaj hücre derivesi olan TNF- $\alpha$  (Cachectin) ve lenfosit hücre derivesi olan TNF- $\beta$  (Lenfotoksin) olarak iki tipi bulunmaktadır<sup>3</sup>.

İlk defa 1975 yılında, Aggarwall' adlı araştırmacı tarafından önceden Mycobacterium bovis ile enfekte edilmiş deney hayvanlarına endotoksin verilmesi sonucunda bu hayvanların serumlarında tespit edilen ve tümörlerinde hemorajik nekroza neden olan bu aktiviteye, TNF adı verilmiştir.

Daha sonraki yıllarda Bertolini ve arkadaşları<sup>4</sup> yaptıkları çalışmada saf hale getirilmiş TNF- $\alpha$  ve TNF- $\beta$ 'yi fetal rat kemik kültürleri ile enkübe ettiklerinde, çok çekirdekli osteoklast hücrelerinin sayılarında artış ve mineralize kemik matriksinde azalma olduğunu, ayrıca kollojen sentezinin inhibe edildiğini ve kemik formasyonunda önemli rolü olan ALP (Alkalenfosfataz) enzimlerinin azaldığını tespit etmişlerdir.

TNF- $\alpha$ , yeni osteoklastların yapımını sağladığı gibi mevcut olan osteoklastları da aktive ederek, kemik rezorpsiyonunda artışa neden olmaktadır.

Kök kanal tedavilerinden beklenen, kemik rezorpsiyonu ile elele giden lezyonun iyileşmesidir.

Bu nedenle, gerek kök kanal tedavisi esnasında mikroorganizmalar ve endotoksin oluşturan türlerle savaşım ve gerekse kök kanallarının doldurulmasında kullanılan kanal dolgu patlarının iltihabi olaylara bağlı olarak, bölgede zaten mevcut olan TNF- $\alpha$  gibi mediyatörler üzerinde aktive edici rol oynamama-

ları ve iyileşmeye yardımcı olmaları önem kazanmaktadır.

Bu çalışma deneysel olarak periapikal lezyon oluşumu sağlanan ratların kök kanallarının doldurulmasında kullanmak için tarafımızdan geliştirilen yeni ZOE esaslı deney patının rat periapikal lezyonlarındaki TNF- $\alpha$  seviyeleri üzerindeki etkilerinin incelenmesidir.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada 8 haftalık 250 – 300g ağırlığında Sprague-Dawley ratlar kullanıldı. Tüm ratlara 0.1cc Rompun + 1cc Ketolar intramuskuler olarak enjekte edilerek yeterli anestezi sağlandı. Daha sonra ratların alt ve üst çenelerindeki 1. molar dişlerin pulpa odaları rond frezler ile ve yüksek devirli turlar yardımı ile ağız ortamına açıldı. 15 gün süre ile periapikalde lezyon oluşumu için beklendi. Bu sürenin sonunda 1. gruptaki ratlar 50mg Pentotal IM olarak enjekte edilerek öldürüldü. Çene kemikleri çıkarıldıktan sonra oluşan lezyonlar bir küret yardımı ile alınarak – 80°C'de derin dondurucuda saklandı.

2. ve 3. gruptaki periapikal lezyon oluşturulmuş ratlara da aynı anestezi maddeler verildikten sonra dişlerin kök kanal sistemleri temizlendi. Kök kanallarının mekanik preperasyonu, %2.6'lık sodyumhipoklorit irrigasyonu ile birlikte yapıldı. Kavite, akselele çinkooksitöjenol ile geçici olarak kapatıldı. Birer hafta ara ile klorfenol kullanılarak iki defa pansuman yapıldı. Daha sonra 2. gruptaki ratların kök kanalları Deney patı (Tablo I) ile, 3. gruptaki ratların kök kanalları Roth kök kanal patı ile dolduruldu. 30 gün sonra 50mg Pentotal verilerek öldürülen ratların periapikal dokuları, küret yardımı ile çıkarılarak – 80°C'de derin dondurucuda saklandı.

Biyokimyasal çalışma öncesi tüm örneklerin üzerine 1cc fosfat salin tampon (PBS) ilave edildi. Dokular buz içinde 1dakika süreyle homojenizatör# kullanılarak homojenize edildi. Tüm örnekler, 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Elde edilen doku süpernatantlarının protein miktarları Lowry metodu ile tespit edildi. Örneklerin TNF- $\alpha$  seviyelerinin saptanması için rat TNF- $\alpha$  kiti\*\* kullanılarak ELISA yöntemi ile çalışıldı. Elde edilen TNF- $\alpha$  değerleri protein başına hesaplanarak sonuçlar, pg/mg/ml protein olarak belirlendi.

# Janke-Kunkel GMBH & Co. KG Almanya

\*\* Biosource Int. Cytoscreen rat TNF- $\alpha$ , A.B.D.

Elde edilen sonuçların istatistiksel değerlendirilmesinde Tek yönlü varyans analizi ve t testi kullanıldı.

## BULGULAR

Tüm gruplara ait istatistik sonuçlar Tablo II'de verilmiştir. Deneysel patı kullanılan grubun TNF- $\alpha$  seviyeleri ile Roth patı kullanılan grubun TNF- $\alpha$  seviyeleri karşılaştırıldığında aralarındaki farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi (  $p < 0.005$  ).

Deneysel patı kullanılan grubun TNF- $\alpha$  seviyeleri ile Negatif kontrol grubunun TNF- $\alpha$  seviyeleri karşılaştırıldığında aralarındaki farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi (  $p < 0.001$  ).

Roth patı kullanılan grubun TNF- $\alpha$  seviyeleri ile Negatif kontrol grubunun TNF- $\alpha$  seviyeleri karşılaştırıldığında, aralarındaki farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi (  $p > 0.01$  ).

## TARTIŞMA

Kök kanal tedavisinin en önemli amacı periapikal dokularda iyileşmeye yardımcı olmaktır. Bu nedenle, periapikal dokularla direkt temasta olan kök kanal dolgu materyallerinin, canlı dokularla biyolojik uyum içerisinde olmaları istenmektedir.

Özellikle periapikal lezyon nedeni ile kök kanal tedavisi uygulanacak olan dişlerde, zaten varolan iltihabi olayları daha da karmaşık bir hale getirmemek için kullanılacak olan kanal dolgu materyallerinin toksik etkilerinin olmamaları gerekmektedir.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, gram(-) anaerobik mikroorganizmaların endotoksin adı verilen lipopolisakaritleri ile diğer hücre duvarı komponentlerinin periapikal bölgedeki iltihabi hücreleri etkileyerek bu hücrelerden çeşitli mediyatörlerin açığa çıkmasına neden oldukları ortaya çıkmıştır<sup>10,12,13</sup>.

Gram(-) mikroorganizmaların pulpayı geçerek apikal bölgeye ulaşabilmeleri için 14 gün gerekirken, bu mikroorganizmaların endotoksinlerinin 7 gün içerisinde apikale ulaşarak buradaki iltihabi hücreleri uyurabildiği ve bu hücrelerden mediyatörlerin açığa çıkmasına neden olabildiği tespit edilmiştir<sup>11</sup>.

Periapikal lezyon bulunan dişlerde kemik re-

zorbsiyonunun durdurulabilmesi ve tamir olaylarının başlayabilmesi için osteoklast hücrelerini aktive eden TNF- $\alpha$ 'nın iltihabi hücrelerden (monosit/makrofaq) açığa çıkmasının engellenmesi gerekmektedir.

TNF- $\alpha$ 'nın mikroorganizmaların endotoksinlerinin stimülasyonu ile açığa çıktığı düşünülürse, kullanılan kök kanal dolgu patının periapikal bölgeye yeni mikroorganizmaların geçişini engelleyebilecek kadar iyi bir tıkama sağlayabilmesi ve periapikal bölgede halen yaşamını sürdürebilen mikroorganizmaların da çoğalmalarını önleyebilecek özelliklere sahip olması istenmektedir. Ayrıca, bu kök kanal patlarının sitotoksik olmaması yani iltihabi hücreler üzerinde uyarıcı etki göstermemeleri gerekmektedir.

Kök kanal tedavisinde kullanılan değişik içerikli bir çok materyal bulunmakla birlikte yeni geliştirdiğimiz deneysel patının ana bileşenini ZOE oluşturmaktadır.

Bilindiği gibi, ZOE içeren kök kanal dolgu patları periapikal dokular ile temas ettiğinde patın yapısından öjenol ayrılmaktadır. Ayrılan bu öjenolün, periapikal dokularda (kemik ve sement ) irritasyona neden olduğu bilinmektedir. Öjenolün tüm bu dezavantajları gözönüne alınarak deneysel patının içerisindeki miktarı en az seviyeye indirilmiştir. Ayrıca, diğer ZOE içeren kök kanal dolgu patları içerisinde bulunan ve toksik olduğu düşünülen diğer bileşenlerin oranlarında bazı değişiklikler yapılmıştır.

Yaptığımız çalışmada, deneysel patı kullanılan grubun periapikal TNF- $\alpha$  seviyelerinin Roth kök kanal patı kullanılan gruptan daha düşük bulunmasının bir nedeninin de içeriğindeki bu değişikliklere bağlı olabileceğini düşünmekteyiz.

Deneysel patının TNF- $\alpha$  seviyesi üzerinde aktive edici etkisinin Roth kök kanal dolgu patından daha az olmasının diğer bir nedeninin de, iki patın donma sürelerindeki farklılığa bağlı olduğu kanısındayız. Deneysel patının donma süresi 3 saat iken Roth patının 1 haftadan daha fazla olması nedeni ile Deneysel patının periapikal bölgedeki iltihabi hücreler üzerinde daha az uyarıcı rol oynadığı gözönüne alınırsa her iki patın TNF- $\alpha$  seviyelerine olan etkilerinin farklı olması da doğaldır.

Görgül ve arkadaşları<sup>7</sup> deney patı ve Roth kök kanal patı kullanarak Vero daimi hücre kültürlerinde yaptıkları sitotoksitesite çalışmalarının sonucunda, deney patının toksisitesinin daha az olduğunu tespit etmişlerdir.

Bala ve arkadaşlarının<sup>2</sup> değişik gruplardan kök kanal dolgu patlarını kullanarak yaptıkları çalışmada ise, deney patının Sealapex ve AH26'ya oranla daha az toksik olduğunu saptanmıştır.

Yaptığımız çalışma, deney patının biyoyumluğunu biyokimyasal yünden inceleyen bir çalışmadır. Bu tür TNF- $\alpha$  ve diğer sitokinler ile yapılan dişhekimliğini ilgilendiren çalışmaların sayısı oldukça azdır. Bu çalışmalar genellikle TNF- $\alpha$ 'nın pulpa ve periapikal dokulardaki varlığını göstermeye yöneliktir.

Bartel ve arkadaşlarının<sup>3</sup> yaptığı benzer çalışmada kullanılan materyal Ca(OH)<sub>2</sub> olup, bölgedeki TNF- $\alpha$  seviyesindeki değişimler incelenmiştir. Bu çalışmada, ortamda endotoksinlerin bulunmasının TNF- $\alpha$  seviyesinde artışa neden olduğu ancak Ca(OH)<sub>2</sub>'nin endotoksinleri detoksifiye ederek iyileştirici etkilerinin bulunduğu saptanmıştır.

Bizim yaptığımız çalışmada da ZOE içerikli deney patının TNF- $\alpha$  seviyesi üzerindeki etkisinin Ca(OH)<sub>2</sub> ile benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir.

Tüm bu bilgilere dayanarak tarafımızdan geliştirilen yeni deney patının canlı dokular ile biyoyumlu olduğu, içeriğinde yapılan bazı değişimler ile ZOE içerikli diğer patlara göre toksisitesinin daha az olduğu sonucuna varılmıştır.

Ancak tüm yeni materyallerde olduğu gibi bu deney patının da araştırılması gereken daha bir çok özelliklerinin olduğuna ve bu konu üzerinde çalışmaların devam etmesinin yararına inanmaktayız.

#### KAYNAKLAR

- 1- Aggarwal B, Kohr W, Hass P, Moffat B, Spencer S, Henzel W, Bringman T, Nedwin G, Goeddel D, Harkins R. Human Tumor Necrosis Factor. J Biol Chem 260 (4): 2345-2354, 1985.
- 2- Bala O, Gürhan I, Görgül G. Çeşitli kanal dolgu materyallerinin sitotoksitesiteslerinin değerlendirilmesi. A Ü Diş Hek Fak Derg 23: 147-152,1996.
- 3- Barthel C, Levin L, Reisner H, Trope M. TNF-a release in monocytes after exposure to calciumhydroxide treated E. Coli LPS. Int End J 30: 155-159, 1997.
- 4- Bertolini D, Nedwin G, Bringman T, Smith D, Mundy G. Stimulation of bone resorption and inhibition of formation in vitro by human tumour necrosis factors. Nature 319 (6): 516-518, 1986.
- 5- Beutler B, Cerami A. Cachectin and tumour necrosis factor as two sides of the same biological coin. Nature 320 (17): 584-588, 1986.
- 6- Beutler B, Krochin N, Milsark I, Luedke C, Cerami A. Control of cachectin synthesis: Mechanisms of endotoxin resistance. Science 232: 977- 980, 1986.
- 7- Görgül G, Alaçam T, Ömürlü H, Karaoğlu T, Burgu i. Yeni bir çinkooksitöjenol kanal dolgu patının sitotoksitesitesinin değerlendirilmesi. GÜ Diş Hek Fak Derg 13(1):1-6, 1996.
- 8- Panagakos F, O'Boskey J, Rodriguez E. Regulation of pulp cell matrix metalloproteinase production by cytokines and lipopolysaccharides. J End 22 (7): 358-361, 1996.
- 9- Safavi K, Rossomando E. Tumor necrosis factor identified in periapical tissue exudated of teeth with apical periodontitis. J End 17 (1): 12-14, 1991.
- 10- Torabinejad M. Mediators of acute and chronic periradicular lesions. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 78: 511-521, 1994.
- 11- Yamasaki M, Kumazawa M, Kohsaka T, Nakamura H, Kameyama Y. Pulpal and periapical tissue reactions after experimental pulpal exposure in rats. J End 20(1): 13-17, 1994.
- 12- Wang C, Stashenko P. Kinetics of bone-resorbing activity in developing periapical lesions. J Dent Res 70(10): 1362-1366, 1991.
- 13- Wang C, Stashenko P. Characterization of bone-resorbing activity in human periapical lesions. J End 19 (3): 107-111, 1993

**Tablo I.** Deney patının içeriği

Toz:	Çinkooksit inhibitörler Plastikleştirici ajan Film oluşturan rezin Akışkanlığı kontrol eden ajanlar
Likit:	Öjenol Ökaliptol

**Tablo II.** Deney patı, Roth Patı ve Negatif kontrol gruplarının TNF- $\alpha$  değerlerine ait istatistik sonuçları (a ve b istatistiksel olarak aralarında farklılık olan gruplar).

(pg/mg/ml protein)	X	$\pm$	SD
Deney patı (a,b) (n:15)	80.067	$\pm$	4.992
Roth patı (b) (n:16)	104.125	$\pm$	3.998
Negatif kontrol (a) (n:19)	104.316	$\pm$	2.709

**Yazışma Adresi**

Hülya ERTEN CAN  
G.Ü. Diş Hek. Fak. Diş Hast. Ted. A.B.D.  
Emek/ANKARA  
Tel: 2126220 / 216