

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ

**SICAK GÜTA PERKA TEKNİKLERİNİN
SEMENTOBLASTLAR VE PERİODONTAL LİGAMENT
HÜCRELERİ ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

Dt. Nazife Tuğba AZMAZ

UZMANLIK TEZİ

ENDODONTİ ANA BİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Sema BELLİ

KONYA-2019

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ

**SICAK GÜTA PERKA DOLUM TEKNİKLERİNİN
SEMENTOBLASTLAR VE PERİODONTAL LİGAMENT
HÜCRELERİ ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

Dt. Nazife Tuğba AZMAZ

UZMANLIK TEZİ

ENDODONTİ ANA BİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Sema BELLİ

Bu çalışma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 18102020 proje numarasıyla desteklenmiştir.

KONYA-2019

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ DIŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ DEKANLIĞI'NA

Nazife Tuğba AZMAZ tarafından savunulan bu çalışma jürimiz tarafından Endodonti Anabilim Dalı'nda **Uzmanlık Tezi** olarak '*Oy Birliği*' ile kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof. Dr. M. Kemal ÇALIŞKAN

EGE ÜNİVERSİTESİ

Danışman: Prof. Dr. Sema BELLİ

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

Üye: Prof. Dr. Sema S. HAKKI

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

ÖN SÖZ

Uzmanlık eğitimim ve zorlu tez sürecimde bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım, benden hiçbir yardımı esirgemeyen saygı değer danışman hocam Prof. Dr. Sema BELLİ'ye

Tez çalışmam boyunca bilgi ve tecrübesini esirgemeyip yol gösteren hocam Prof. Dr. Sema S. HAKKI'ya,

Bu tez çalışmasında çok büyük katkısı olan beraber çalıştığım için kendimi şanslı hissettiren Dr. Şerife Buket BOZKURT'a,

Uzmanlık eğitimimde bilgilerinden ve tecrübelerinden faydalandığım hocalarım Prof. Dr Hale ARI AYDINBELGE, Prof. Dr. Ayçe ÜNVERDİ ELDENİZ, Prof. Dr. Funda KONT ÇOBANKARA'ya,

Uzmanlık eğitimim boyunca her zaman bana destek olan ve kendilerinden çok şey öğrendiğim, Selçuk Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi Endodonti bölümünün bana kazandırdığı sevgili asistam arkadaşlarım Dr. Öğr. Üyesi Şeref Nur MUTLU, Uzm. Dt. Semanur KARAGÖLLÜ AKTAŞ, Uzm. Dt. Mine ÖZÇELİK YILMAZ, Dt. Didem Seda GÜLTEKİN, Dt Gamze HAYIRCI'ya,

Nerde olurlarsa olsunlar her zaman varlıklarını yanımda hissettiğim, beraber büyüyüp diş hekimi olduğum arkadaşlarım Uzm. Dt Neslihan BULAK, Dr. Öğr. Üyesi Berceste GÜLER, Dr. Dt. Duygu YAVUZER, Dr. Öğr. Üyesi Ezgi DOĞAN, Dr. Dt. Zeynep TAŞTAN EROĞLU, Uzm. Dt. Kubilay EROĞLU, Dt. Ayseli OKUMUŞ, Uzm. Dt. Kıvanç KÜLAH, Dr. Dt. Burçin ÇEVİK'e

Sadece uzmanlık eğitimimde değil hayatımın her anında her zaman yanımda olan en büyük dayanağım annem Vahide AZMAZ ve kardeşim Abdulkerim AZMAZ'a ve varlığını her daim hissettiğim babam Abdurrahman AZMAZ'a

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	iii
ÖZET	iv
SUMMARY	v
1. GİRİŞ	1
1.1. Kök Kanal Dolgu Materyalleri	2
1.1.1. Güta perka.....	3
1.2. Kanal Dolgu Patları.....	4
1.2.1. AH Plus	7
1.3. Kök Kanal Dolum Teknikleri	8
1.4. Çalışmamızda Kullanılan Dolum Teknikleri.....	10
1.4.1. Basit Tek Kon Yöntemi	11
1.4.2. Devamlı ısı ile obturasyon yöntemi	12
1.4.3. Termoplastik Güta perka Enjeksiyonu.....	14
1.5. Sıcak Dolum Tekniklerinde Uygulanan Isının Periradiküler Dokulara Etkisi	16
1.6. Periradiküler dokular	17
1.6.1. Sement.....	17
1.6.2. Periodontal ligament	18
1.6.3. Alveol kemiği	19
1.7. Hücreler	19
1.7.1. Periodontal Ligament Mezenkimal Hücreleri	20
1.7.2. Sementoblastlar	20
1.8. <i>Heat-Shock</i> Proteinleri.....	21
1.8.1. HSP-90	21
1.8.2. HSP-70	22
1.8.3. HSP-27	22
2. GEREÇ VE YÖNTEM	23
2.1. Örneklerin Hazırlanması.....	23
2.2. Kanalların Şekillendirilmesi	24
2.3. OCCM.30 Hücrelerinin Eldesi.....	25
2.4. İnsan Periodontal Ligament-Mezenkimal Kök Hücrelerinin Eldesi	25

2.5. Hücre Kültürü Koşulları	26
2.6. Pilot Çalışma	26
2.7. MTT Hücre Canlılık Deneyleri.....	28
2.8. Real Time- Polymerase Chain Reaction (RT-PCR).....	33
2.8.1. RNA İzolasyonu	33
2.9. Verilerin İstatistiksel Analizi	39
3. BULGULAR	40
3.1. MTT Deney Sonuçları.....	40
3.2. mRNA Gen Ekspresyon Deney Sonuçları.....	41
3.2.1. iPDL-MKH mRNA Ekspresyon Deneyleri.....	41
3.2.2. OCCM.30 mRNA Ekspresyon Deneyleri	45
4. TARTIŞMA.....	50
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	61
6. KAYNAKLAR.....	63
7. ÖZGEÇMİŞ	71

SİMGELER VE KISALTMALAR

ALP	: Alkalen fosfataz
BSP	: Bone sialoprotein
cDNA	: Complementary deoksiribonükleik asit
CO₂	: Karbondioksit
DMEM	: Dulbecco's Modified Minimal Essential Medium
DMSO	: Dimethyl sulfoxide
ELISA	: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay testi
FBS	: Fetal Bovine Serum
HSP	: Heat Shock Protein
HSP-25	: Heat Shock Protein-25
HSP-27	: Heat Shock Protein-27
HSP-70	: Heat Shock Protein 70
HSP-90	: Heat Shock Protein-90
iPDL-MKH	: İnsan periodontal ligament mezenkimal hücreleri
K1	: Kontrol-1 grubu
K2	: Kontrol-2 grubu
KP	: Kanal patı grubu
ml	: mililitre
mm	: milimetre
mRNA	: mesenger ribonükleik asit
MTT	:3- (4,5-Dimethylthiazol-2-yl) -2,5-Diphenyltetrazolium bromide
NaOCl	: Sodyum hipoklorit
OCCM.30	: Fare sementoblast
OCN	: Osteokalsin
PDL	: Periodontal ligament
Runx2	: Runt-related transcription factor 2
TGE	:Termoplastik güta perka enjeksiyonu
TK	:Tek kon
PBS	Phosphate Buffer Saline
RT-PCR	: Real Time- polymerase chain reaction
sn	: saniye
°C	: santigrad derece

ÖZET

T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ

Sıcak Güta Perka Dolum Tekniklerinin Sementoblastlar ve Periodontal Ligament Hücreleri Üzerine Etkisinin İncelenmesi

Nazife Tuğba AZMAZ, Uzmanlık Tezi

Selçuk Üniversitesi, Konya-2019

Bu çalışmanın amacı, sıcak güta perka dolum tekniklerinden “Devamlı Isı ile Obturasyon Tekniği” ve “Termoplastik Güta perka Enjeksiyonu” uygulanması sırasında diş köklerinin apeksinde oluşan yüksek ısının insan periodontal ligament mezenkimal hücreleri (iPDL-MKH) ve fare sementoblast (OCCM.30) hücreleri üzerine olası etkisini incelemektir.

Yetmiş adet tek ve düz kanallı insan premolar dişlerinin apekslerinden 1mm elmas separe yardımı ile uzaklaştırıldıktan sonra hücre kültür ortamına adapte edildi. Hücre canlılık deneyleri için kullanılacak olan 50 diş, 10 mm olacak şekilde; mRNA ekspresyon deneylerinde kullanılacak olan 20 diş, 14 mm olacak şekilde kronlarından kesildikten sonra çalışma boyunca ProTaper Next X5 eğesine kadar her ege arasında 2ml NaOCl solüsyonu ile irrigasyon yapılarak genişletildi. Hücre kültürü ortamı için steril hale getirilen dişler rasgele 6 farklı gruba ayrıldı: dişsiz kontrol 1 (K1); sadece diş kontrol 2 (K2) ; sadece AH Plus kanal patı (KP); tek kon (TK); devamlı ısı ile obturasyon tekniği (DIOT); termoplastik güta perka enjeksiyonu (TGE). Deney düzeneğine yerleştirilen örneklerin iPDL-MKH ve OCCM.30 hücrelerinin canlılığına etkisi MTT hücre canlılık deneyleri ile analiz edildi. Ayrıca HSP-27, HSP-70, HSP-90 *heat-shock proteinleri* ile mineralize doku belirteçleri *Bone sialoprotein* (BSP), osteokalsın (OCN), *runt-related transcription factor-2* (Runx2), tip I kolajen (COL I), alkalen fosfataz (ALP) mRNA ekspresyon düzeyleri *Real time polymerase chain reaction* (RT-PCR) ile değerlendirildi.

Çalışma sonuçları kontrol grupları hariç tüm gruplarda iPDL-MKH ve OCCM.30 hücrelerinin canlılığının etkilendiğini gösterdi. Tek kon tekniği ile DIOT ve TGE grupları ayrıca karşılaştırıldığında, ısının anlamlı derecede hücre canlılığına negatif etkisi olduğu gözlemlendi ($p<0.05$). Kontrol 1 grupları hariç tüm gruplarda BSP, OCN, Runx2, COL 1, ALP mineralize doku belirteçleri ve HSP27, HSP70, HSP90 gibi *heat-shock proteinlerinin* mRNA ekspresyon düzeyleri etkilendi ancak bu olumsuz etki ısı uygulanan gruplarda daha fazla gözlemlendi ($p<0.05$).

Bu çalışma sıcak güta perka dolum tekniklerinin iPDL-MKH, OCCM.30 hücreleri üzerine etkisini inceleyen ilk ve tek çalışmadır. Bu çalışmanın limitasyonları dahilinde, ısının hücre canlılığına ve mineralizasyon belirteçlerinin mRNA ekspresyonlarına olumsuz etkileri olduğu sonucuna varılmıştır. Bu konuda farklı deney modellerinde daha çok çalışma yapılması gereklidir.

Anahtar sözcükler: Devamlı ısı ile obturasyon tekniği, termoplastik güta perka enjeksiyonu, MTT, Periodontal ligament mezenkimal hücreleri, OCCM.30

SUMMARY

REPUBLIC OF TURKEY

SELÇUK UNIVERSITY

FACULTY OF DENTISTRY

Evaluation of the Effect of Warm Gutta Percha Techniques on Periodontal Ligament Cells and Cementoblasts

Nazife Tuğba AZMAZ, Specialty Thesis

Selçuk University, Konya-2019

The aim of this study was to determine the effect of heat released during the continuous wave of condensation techniques (CWCT) and thermoplastic gutta percha injection techniques (TGE) on the human periodontal ligament mesenchymal cells (iPDL-MSc) and mouse cementoblast (OCCM.30).

Seventy human premolar teeth with single and straight canals were adapted to the cell culture medium after removal of 1 mm from the apex using a diamond saw. The crowns were removed and 10 mm long fifty teeth were used for cell viability experiments and 14 mm long 20 teeth were used in the mRNA expression experiments. The root canals were prepared up to the ProTaper Next X5 file. Two ml NaOCl solution was used between each file. Teeth were sterilized first for the cell culture medium and then randomly divided into 6 different test groups: control 1 (no root, K1); control 2 (with roots K2); AH Plus group (KP); single cone technique (TK); continuous wave of condensation technique (DIOT); thermoplastic gutta-percha injection technique (TGE). The viability of the iPDL-MSc and OCCM.30 cells was analyzed by MTT cell viability experiments. Furthermore, HSP-27, HSP-70, HSP-90 heat shock proteins and mineralized tissue markers bone sialoprotein (BSP), osteocalcin (OCN), runt-related transcription factor-2 (Runx2), type I collagen (COL I), alkaline phosphatase (ALP) mRNA expression levels were evaluated by Real time polymerase chain reaction (RT-PCR).

The results of the study showed that the viability of iPDL-MSc and OCCM.30 cells were affected in all groups except the control groups. When single cone technique and DIOT and TGE groups were compared, it was observed that heat had a significant negative effect on cell viability ($p < 0.05$). In all groups except control group 1, BSP, OCN, Runx2, COL 1, ALP mineralized tissue markers and mRNA expression levels of heat-shock proteins such as HSP27, HSP70, HSP90 were affected, but this negative effect was higher in the heat treated groups ($p < 0.05$).

This is the first and only study to investigate the effect of heated gutta-percha filling techniques on iPDL-MSc OCCM.30. Within the limitations of this study, it was concluded that heat has negative effects on cell viability and mRNA expression of mineralization markers. Further studies are needed in different experimental models.

Key words: Continuous wave of condensation, thermoplastic gutta percha injection, MTT, Periodontal ligament mesenchymal cell, OCCM.30

1. GİRİŞ

Endodontik tedavinin amacı; kök kanal sisteminin şekillendirme ve dezenfeksiyonu yoluyla, endodontik hastalığın etkenleri uzaklaştırıldıktan sonra, kök kanal sisteminin boyutsal olarak stabil bir dolgu maddesi ile doldurulmasıdır.

Kök kanal kompleksi; pulpa dokusu ve dentini kapsayan, çok sayıda yan kanal ve dallanmalara sahip hem makroskobik hem de mikroskobik olarak düzensiz üç boyutlu sistemi temsil eder (Hülsmann ve ark 2007). Bu karmaşık yapısından dolayı kök kanal kompleksinden endodontik hastalık etkeninin uzaklaştırılması ve hermetik bir şekilde kök kanal dolgusunun yapılarak mikroorganizmaların tekrar kolonizasyonunun engellenmesi oldukça güçtür.

Kök kanal sisteminin şekillendirme ve dezenfeksiyonunun yetersiz yapıldığı durumlarda veya iyi doldurulmamış bir kanalda iritanlar, mikroorganizmalar ve bunların ürünleri periapikal dokulara geçerek tekrar bir iltihabi reaksiyona neden olabilirler. Periapikal dokulara geçen mikroorganizmalar zamanla daha da çoğalarak bu bölgede yıkıma neden olabilirler (Regan ve ark 2002, Weine 2004).

Hermetik kanal dolgu maddesi, bakteri ve sıvı geçişini engelleyecek bir örtücülük sağlamak amacıyla, tüm endodontik boşluklara ve yan kanallara penetre olabilmelidir (Hülsmann ve ark 2007).

Kök kanallarının sızdırmaz bir şekilde doldurulma nedenleri (Alaçam ve ark 2000, Regan ve ark 2004):

1. Mikroorganizmaların oral kaviteden periradiküler dokulara geçişini engelleyecek bir bariyer oluşturmak,
2. Kanalları temizleme ve şekillendirme işlemleri sonrasında hala kanalda mevcut olabilecek mikroorganizmaları izole etmek ve kök kanalı içinde hapsetmek, böylece periapikal irritasyonu önlemek,
3. Mikrobiyal çoğalmaya yardımcı olabilecek besinlerin kök kanal sistemine sızıntısını engellemek,
4. Kök kanal sistemine gingival sulkustan veya periodontal cepten bakteri geçişi veya sıvı sızıntısı riskini azaltmak,
5. Geride kalan diş dokularına destek sağlamaktır

1.1. Kök Kanal Dolgu Materyalleri

Kök kanallarının doldurulması için geçmişten günümüze birçok endodontik materyal kullanılmıştır. Bu tekniklerin çoğunda kor materyali ve kanal patı bir arada kullanılmaktadır. Kor materyalinden bağımsız olarak kanal patı bütün dolum tekniklerinde kullanılması gereken ve sızdırmaz olması beklenen bir materyaldir (Cohen ve ark 1998). Kanal dolgu materyallerinin etkili bir Şekilde kullanılması için materyalin özelliklerinin iyi bilinmesi, kök kanal sisteminin anatomisinin ve morfolojisinin iyi kavranması gerekmektedir (Regan ve ark 2004).

Grossman'a göre ideal bir kanal dolgu materyalinin özellikleri aşağıdaki gibi sıralanmıştır;

1. Kanala kolay uygulanmalı ve yeterli çalışma zamanı sağlamalı,
2. Yerleştirildikten sonra büzülme göstermemeli,
3. Kanalın kompleks anatomisine uyum sağlayıp hem apikalden hem de lateralden tıkamalı,
4. Periapikal dokuları irrite etmemeli,
5. Nemden etkilenmemeli ve pörözite göstermemeli,
6. Doku sıvılarından etkilenmemeli ve korozyona veya oksidasyona uğramamalı,
7. Bakterisid özellikte olmalı,
8. Radyopak olmalı,
9. Diş dokularını boyamamalı,
10. Steril olmalı ya da kolaylıkla steril edilebilmeli,
11. Gerektiğinde kanaldan rahatlıkla uzaklaştırılabilmelidir(Grossman ve ark 1988).

Kök kanallarının homojen, inert, boyutsal olarak stabil, fizyolojik olarak kabul edilebilir ve kök kanallarının iç şeklini alabilecek plastik kıvamda, manipüle edilebilen bir materyalle doldurulması tercih edilen bir durumdur (Alaçam ve ark 2000). Katı kök kanal dolgu materyalleri kök kanal dolgusunun boyutunun ayarlanabilmesine olanak vermesinden dolayı yarı katı materyallere göre üstünlük sağlamaktadır.

Katı kök kanal materyalleri

- Gümüş konlar
- Güta perka
- Aktif güta perka
- Resilon olarak sınıflandırılmaktadır (Cohen ve ark 1998).

1.1.1. Güta perka

Güta perka, Isonandra percha ağacından elde edilen ve kanal dolgusunda kullanılan en popüler materyaldir. 1843 yılında ilk defa Jose D'Almeida tarafından tanıtılmıştır (Marciano ve ark 1989, Spångberg 1998).

Güta perka konların ana bileşenleri;

- | | |
|---|-----|
| • Çinko oksit | %66 |
| • Güta perka | %20 |
| • Metal sülfat | %11 |
| • Pigmentler, iz elementler, rezin ve mum | %3 |

(Schmalz 2009).

Güta perka poliizopropenin trans-izomeri olup 3 ayrı formda bulunur. Bunlar α ve β olarak adlandırılan iki kristal form ve amorf şekildedir. Isıtılmamış geleneksel güta perkalar, sert ve sıkıştırılabilir β fazındadır (Goodman ve ark 1974). Yaklaşık 42-49⁰C'ye ısıtıldığında α fazında dönüşür ve materyal bükülebilen, basınç altında

akışkan bir hal alır. Isıtılmaya devam edildiğinde 53-59⁰C'de amorf yapı kazanır. Bu faz değişiklikleri hacimsel değişimlere de neden olur. Isıtılan güta perkanın tıkama sağlayabilmesi için basınçla uygulanması gerekir. Dişhekimliğinde kullanılan güta perkanın yumuşama derecesi 64⁰C, erime derecesi 100⁰C, parçalanma derecesi 150⁰C'dir (Goodman ve ark 1974, Alaçam ve ark 2000, Çalışkan 2006).

Güta perkanın avantajları aşağıdaki gibidir (Alaçam ve ark 2000, Weine 2004);

- Plastisite göstermesi,
- Sıkıştırılabilir olması,
- Boyutsal olarak stabil olması,
- Manüplasyonun kolay olması,
- Minimal toksisite,
- Radyoopasite göstermesi
- Isı ile ya da solventle kolayca sökülmesidir.

Güta perkanın dezavantajları ise (Alaçam ve ark 2000, Weine 2004);

- Yeterli sertliğinin bulunmaması nedeniyle vertikal ve lateral basınçlarda kolayca kıvrılması,
- Zamanla kırılma eğilimi,
- Apikalde durdurucu bir nokta veya dentin matrisi olmadığından uzunluk kontrolünün zor olmasıdır.

Kanal Dolgu Patları

Başarısız olmuş endodontik tedavilerin %60'ında ana etiyolojik neden apikal sızıntıdır. Kök kanallarının eksik veya yetersiz doldurulması veya taşkın dolgu yapılması apikal sızıntıya neden olmaktadır (Ingle ve ark 2008) Kök kanallarının doldurulmasında kor materyallerinden güta perkalara ilaveten kanal dolgu patlarının kullanılması da önemlidir (Ørstavik 1988).

Kanal dolgu patları, dentin duvarları ile kor materyalleri arasındaki boşlukları doldurmak için gerekmektedir. Kanal patları aynı zamanda kanal içindeki boşlukları ve düzensizlikleri doldurmak, lateral ve aksesuar kanalları, lateral kondansasyon sırasında gütta perkalar arasındaki boşlukları da doldurmalıdır. Kanal dolgu patları kanal dolum işlemi esnasında lubrikant görevi de görmektedir (Cohen ve ark 1998).

Grossman ideal kanal dolu patlarının sahip olması gereken özellikleri aşağıdaki gibi sıralamıştır (Grossman ve ark 1988);

- Sertleştiğinde kanal duvarıyla arasında iyi bir adezyon sağlamak için yapışkan özellik göstermelidir.
- Hermetik kapatıcılık sağlamalıdır.
- Radyopak olmalıdır.
- Likitle kolay karıştırılabilmesi için çok ince toz halinde olmalıdır.
- Sertleşme esnasında büzülme göstermemelidir.
- Bakteriyostatik olmalıdır ya da en azından yeniden bakteri çoğalmasına engel olmalıdır.
- Yeterli çalışma zamanı sağlamak için yavaş sertleşmelidir.
- Doku sıvılarında çözünmemelidir.
- Periradiküler dokuları irrite etmemelidir.
- Kök kanal dolgusunun uzaklaştırılması gerektiğinde çözücülerle çözünebilir.

Kanal dolgu patları biyoyumlu olmalı ve periradiküler doku tarafından tolere edilebilir. Bütün kanal patları ilk karıştırıldığında toksiktir ama sertleşirken toksisiteyi oldukça azalır.

Kök kanal patları farklı araştırmacılar tarafından farklı şekillerde sınıflandırılmıştır.

Grossman (Grossman ve ark 1988);

1. Simanlar
2. Patlar
3. Plastikler
4. Katı materyaller

Alaçam (Alaçam ve ark 2000)

1. Çinko oksit öjenol içerikli patlar
2. Paraformaldehit içerikli patlar
3. Polimer yapıdaki patlar
4. Rezorbe olabilen patlar
 - a. İyodoform patı
 - b. Kalsiyum hidroksit içerikli patlar
5. Cam iyonomer içerikli patlar

Johnson (Ingle ve ark 2008);

1. Çinko oksit öjenol içerikli patlar
2. Kalsiyum hidroksit içerikli patlar
3. Rezin içerikli patlar
4. Cam iyonomer içerikli patlar
5. Silikon içerikli patlar

6. Solvent içerikli patlar

7. Üretan metakrilat içerikli patlar şeklinde sınıflandırmıştır.

Rezin esaslı patlar göreceli olarak daha iyi adezyon ve örtücülük göstermektedir (Bergenholtz ve ark 2013). Ayrıca antimikrobiyal etki, uzun çalışma zamanı, karıştırma kolaylığı ve iyi bir sızdırmazlık yeteneğine sahiptir (Walton 1996). Genel sağlık üzerine olumsuz etkileri bulunmamaktadır ve alerjik reaksiyon oldukça nadir görülür (Bergenholtz ve ark 2013). Rezin esaslı patlar; poliketon kaynaklı Diaket (Espe, Premier, Noristown, PA, USA), epoksi rezin kökenli AH 26 ve AH Plus (DeTrey Dentsply, Konstanz, Germany), metakrilat bazlı patlardan Hydron patıdır (Çalışkan 2006).

Epoksi rezin kökenli AH 26 patı, 1957 yılında Schröder tarafından piyasaya sürülmüştür (Schroeder 1957). Polimerizasyon likitte bulunan bisfenol-A-diglisidileter ve tozda bulunan hekzametilen tetraaminle birleşerek başlar. Bu reaksiyon sırasında ortaya çıkan formaldehit, patın uzun süre antiseptik özellik göstermesinden sorumludur (Çalışkan 2006). AH 26 karıştırıldığında ortaya çıkan formaldehitin oldukça toksik olması ve içeriğinde bulunan gümüş dişlerde renklemeye neden olduğu için geliştirilen AH Plus, epoksi rezin simanlarla benzer özelliklere sahiptir ve daha iyi biyouyumludur (Leonardo ve ark 1999). AH Plus bu olumlu özelliklerinden dolayı son günlerde klinisyenler tarafından en fazla tercih edilen pat olma özelliğini gösterir.

1.2. AH Plus

AH Plus (DENTSPLY DeTrey), AH26 karıştırıldığında ortaya çıkan oldukça toksik bir madde olan formaldehitin etkisini ortadan kaldırmak için geliştirilmiştir. AH Plus iki tüpten oluşan epoksi rezin türevi bir paktır ve karıştırıldıktan sonra 8 saat içerisinde sertleşir (Çalışkan 2006, Schmalz 2009).



Şekil 1.1. AH Plus

Başlangıçta hacimsel genişleme gösterdikten sonra bir miktar da büzülme gösteren epoksi rezin kökenli patlar, dentine mükemmel adezyon göstermektedirler. (Kontakiotis ve ark 1997).

Erken dönemde toksik etki gösteren AH Plus, karıştırıldıktan 4 saat sonra bu etkiyi göstermemiştir (Cohen ve ark 1998). AH 26, AH Plus'a kıyasla daha yüksek toksisite potansiyeli mevcuttur (Koulaouzidou ve ark 1998). Huang ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmaya göre; AH 26 ve AH Plus patlarının her ikisinin de genotoksitesinin dozla orantılı olarak arttığı ve AH 26 likidinin mutajenik etki gösterdiği izlenmiştir (Huang ve ark 2002). Literatürde biyolojik olarak aktif moleküllere sahip olan epoksi rezin patlardan kaynaklanan sistemik toksik reaksiyonlar hakkında bir rapor bulunmamaktadır (Hørsted-Bindslev ve ark 1976).

1.3. Kök Kanal Dolum Teknikleri

Araştırmacılar tarafından ideal kanal dolgu yapabilmek için birçok farklı dolum tekniği geliştirilmiştir.

Johnson ve Gutmann'ın (Cohen ve ark 1998) yapmış olduğu güta perka dolum teknikleri sınıflandırması ;

1. Lateral kondansasyon tekniği
2. Sıcak vertikal kondansasyon tekniği
3. Devamlı ısı ile kondansasyon tekniği
4. Sıcak lateral kondansasyon tekniği
5. Termoplastik enjeksiyon tekniği
6. Termoplastik güta perka taşıyıcı kor tekniği
7. Termomekanik kompaksiyon tekniği

Dummer'a göre güta perka dolum teknikleri (Cohen ve ark 1998);

1. Soğuk güta perka dolgu teknikleri
 - a) Lateral kondansasyon

2. Isı ile yumuşatılmış güta perka teknikleri
 - b) Kanal içinde ısıtma teknikleri
 - i) Devamlı ısı ile obturasyon tekniği
 - ii) Sıcak vertikal kondansasyon tekniği
 - iii) Termatik kondansasyon tekniği
 - c) Kanal dışında ısıtma teknikleri
 - i) Güta perka taşıyıcı sistemleri
 - ii) Termoplastik enjeksiyon sistemi
 - iii) Termokompaktr sistemleri

Regan'a (Regan ve ark 2004) göre güta perka dolum teknikleri;

1. Lateral kondansasyon
2. Sıcak vertikal kondansasyon
3. Termokompaksiyon ve hibrit yöntemler
4. Termoplastik güta perka ile kaplanmış taşıyıcı kor yöntemler
5. Termoplastik güta perkanın enjeksiyonu

Çalışkan'a (alışkan 2006) göre güta perka teknikleri ise;

1. Katı güta perka teknikleri
 - a. Tek kon yöntemi
 - b. Soğuk lateral kompaksiyon yöntemi
2. Yumuşatılmış güta perka yöntemleri
 - a. Isı ile yumuşatma yöntemleri

- i. Sıcak lateral kompaksiyon yöntemi (Endotec)
- ii. Vertikal kompaksiyon yöntemi
- iii. Termomekanik kompaksiyon yöntemi
- iv. Enjektabl termoplastisize güta perka yöntemleri
 1. Obtura (yüksek ısılı)
 2. Ultrafil (düşük ısılı)
- v. Trifekta
- vi. Thermafill
- vii. Soft-core
- viii. Alpha-seal
- ix. SuccessFil
- x. Sistem B

b. Kimyasal yumuşatma yöntemleri

- i. Kloroperka yöntemi
 1. Johnston-Callahan yöntemi
 2. Nygard-Ostby yöntemi

ii. Ökaperka yöntemi

c. Diğer yöntemler

- i. Ultrasound ile kanal doldurma yöntemi
- ii. Basınçla enjeksiyon yöntemi

1.4.1. Basit Tek Kon Yöntemi

Tek kon yöntemi diğer dolum yöntemlerine göre daha az zaman alıcı ve daha kolay olması nedeniyle klinisyenler tarafından çok tercih edilen bir yöntemdir. Basit tek kon yöntemi, piyasada bulunan döner alet sistem eğelerine uyumlu güta perkalar ile yapılmaktadır.

Tek kon yöntemi endikasyonları;

1. Enine kesitte kanal duvarları tam yuvarlak veya dairesel ise ve kon kanalın apikal üçlüsüne tam olarak yerleşirse,
2. Kök kanal duvarları piyasadaki standardize güta perkaların yeterince uyum sağlayamayacağı derecede genişse, güta perka konlar ısıtılarak apikal üçlüye tam oturacak şekilde birleştirilerek kullanılmalıdır (Çalışkan 2006).

Uygulama:

Kullanılan döner alet sistemi ile uyumlu standardize güta perka, son kullanılan ege ile aynı ebatlarda seçilmelidir. Seçilen güta perka kanala çalışma boyunda yerleştirilip tug-back olup olmadığı kontrol edilir. Ardından radyografi alınarak güta perka hem apikal hem de lateral olarak kontrol edilir. Üretici firmanın talimatlarına göre hazırlanan kanal patına güta perka bulunarak çalışma boyunda kanala yerleştirilir ve tekrar radyografi ile kontrol edilir. Radyografik kontrolün ardından ısıtılmış bir ekskavatör ile kanal girişinden güta perka fazlalıkları kesilir (Alaçam ve ark 2000).

Tek kon güta perka konların kullanılmasının kanala daha iyi uyum sağlayacağı, dentin duvarlarıyla güta perka arasında kalan kanal patı miktarını azaltacağını ve spreader ile sıkıştırmaya gerek kalmadan güta perkanın kanaldaki miktarının daha homojen bir kitle halinde kalacağı bildirilmiştir (Chohayeb 1992, Wilson ve ark 2003). Özellikle eğri kanallarda spreaderın apikal 1 mm'ye kadar ulaşmasının mümkün olmayacağı durumlarda tek kon açılı güta perkaların hacimsel olarak apikale daha fazla miktarda yerleştirilebileceği ve daha iyi bir tıkama sağlayacağı belirtilmiştir (Allison ve ark 1981, Bal ve ark 2001).

Bazı araştırmacılar ise; tek kon tekniğinde düzensiz şekillendirilmiş bir kanalda, ana konun, kanalın orta ve koronal üçlüsünde adaptasyonun zayıf olduğunu bildirmişlerdir (Monticelli ve ark 2007). Ayrıca tek kon yönteminin diğer dolum tekniklerine göre daha fazla kök kanal dolgu patına ve daha fazla pat kalınlığına ihtiyaç duyacağı, pat hacmindeki bu artışın, polimerizasyon büzülmesinde de artışa neden olacağı ve sonuç olarak daha fazla sızıntıya neden olabileceği öne sürülmüştür (Eguchi ve ark 1985, Pommel ve ark 2001). Wu ve arkadaşları, NiTi döner eğelerin geometrisine uygun güta perka konlar piyasaya sürülmüş olmasına rağmen, basit tek kon yönteminin hala kalın bir pat tabakasına sahip olduğunu ileri sürmüşlerdir (Wu ve ark 2001, Diemer ve ark 2006)

Wu ve arkadaşları (Wu ve ark 2000) tek kon tekniğinin en önemli dezavantajının kullanılan konun kanalın koronal ve orta 1/3'lük kısımlarında bulunan kanal içi düzensizliklere uyumlu olmadığını bildirmişlerdir. Bu durum, klinisyenlerin kanalın bütün düzensizlikleri ve aksesuar kanalları doldurabilmek için farklı dolum tekniklerine yönelmelerine neden olmuştur.

1.4.2.Devamlı ısı ile obturasyon yöntemi

Devamlı ısı ile obturasyon yöntemi, sıcak vertikal kompaksiyon yönteminin bir varyasyonudur. Devamlı ısı ile obturasyon yöntemi, kökün apikal 1/3'ünün soğuk lateral kondansasyon yöntemi ile doldurulup geri kalan kısmının termoplastik enjeksiyon yöntemi ile doldurulması esasına dayanmaktadır (Buchanan 1998). Nikel-titanyum döner alet sistemlerinin ve fabrikasyon büyük taper açısına sahip güta perkaların kullanımının artışı ile birçok klinisyen termoplastik dolum tekniklerini kullanmaya başlamışlardır. Standart taper açılı preperasyona uygun güta perka üretimi, uygun taper açısına sahip plugger kullanılarak yapılan kompaksiyon sırasında daha fazla hidrolik kuvvetin uygulanmasına izin verir. Devamlı ısı ile obturasyon yönteminde 0.04, 0.06, 0.08, 0.10 veya 0.12 taper açısına sahip künt uçlu pluggerlara bağlı Sistem B (Sybron Endo) kullanılır (Cohen ve ark 1998).

Uygun ana kon seçildikten sonra, plugger çalışma boyundan 5-7 mm kadar kısa olarak ayarlanır. Karr ve arkadaşlarına göre pluggeri daha derine yerleştirmek güta perka akışını artırabilir (Karr ve ark 2007). İlerlenmesi gereken plugger boyu işaretlenmeli çünkü bu noktaya ulaşıldığında güta perka üzerindeki hidrolik basınç azalıp diş kökü üzerindeki kompaksiyon kuvveti artacaktır. Isıtılmış plugger

derinliğinin kanal düzensizliklerinin doldurulması ve kanal dolgusunun kalitesi ile bir korelasyon olduğu görülmektedir (Bowman ve ark 2002, Wu ve ark 2002, Jung ve ark 2003). Sıcaklık artışının kanal dolum etkinliğinde artışa neden olmadığı görülmektedir (Jung ve ark 2003).

Uygulama:

Uygun ana kon seçilir ve tug-back kontrol edilir. Kanal patına bulanana ana kon kanala yerleştirilir. Sistem B ünitesi 200°C'ye ayarlanır. Plugger kanal girişine yerleştirilir ve koronaldeki fazla güta perkalar kesilir. Ardından soğuk plugger kanal girişine yerleştirilir ve ısı aktive edilir. Sabit bir basınçla plugger 10 sn içerisinde vertikal yönde kondanse edilir ve ısıtıcı inaktive edilir. Güta perka soğuduktan sonra, 1 sn kadar ısı tekrar aktive edilirken plugger hızla kanaldan uzaklaştırılır. Pluggerler uçtan saplarına kadar ısınmak üzere tasarlanmışlardır. Bu özellik sıkıştırılmış güta perkanın yerinden çıkma potansiyelini azaltır ve ikinci bir ısı uygulamasına engel olur. Apikal güta perkanın hala yerinde olup olmadığını anlamak için el pluggeri ve/veya radyograflar kullanılabilir. Bu sayede kanalın apikal 1/3'ü doldurulmuş olur. Devamlı ısı ile obturasyon yönteminde; apikal kısım aslında tek kon tekniği kullanılarak doldurulur çünkü apikal 2-5 mm'lik kısmına ısı transferi olmamaktadır (Goodman ve ark 1974). Kalan boşluk termoplastik enjeksiyon yöntemi (Johnson ve ark 1999) ile veya kanal patına bulanana aksesuar konların yerleştirilip ısıtılarak vertikal basınç uygulaması ile doldurulabilir.

Devamlı ısı ile obturasyon işlemi ile termoenjeksiyon dolum işlemi tek bünyede birleştiren kullanımı kolaylaştıran cihazlar piyasaya sürülmektedir. Elements Free Cordless Obturation System (SybronEndo/Kerr Endodontics, Orange, CA, ABD) Downpack ve Backfill ünitelerini şarj eden istasyonlara sahiptir. Downpack ünitesi pluggerin ısıtılmasını sağlarken Backfill ünitesi ısıtılmış güta perkanın enjeksiyonunu sağlamaktadır. 0.5 saniyeden daha kısa sürede 200°C sıcaklığa ulaşabilen Downpack ünitesi dijital ısı kontrolüne sahiptir ve 100-400°C arasında ayarlanabilir ısı aralığına sahiptir. Backfill ünitesi çift tıklamayla güta perka çıkışını otomatik olarak yapabilmektedir.

Tekniğin avantajları;

1. Tek bir elektronik alet ve tepici ile kanal dolgusu bitirilebilmektedir.
2. Apikal üçlünün kanal dolgusu 10 sn gibi kısa bir sürede bitirilebilmektedir.
3. Post uygulaması yapılacak ise kanal dolgusu tek bir işlemde tamamlanmış olur.
4. Lateral ve aksesuar kanalların dolgusu iyi bir şekilde yapılabilir.
5. Vertikal ve lateral kondansasyona göre daha az zaman gerektirir (Alaçam ve ark 2000, Çalışkan 2006).

1.4.3. Termoplastik Güta perka Enjeksiyonu

Termoplastik güta perka enjeksiyon yöntemi; ısıtılmış güta perkaya mekanik basınç uygulandığında kök kanalının lateral kondansasyon veya vertikal kondansasyondan daha kısa sürede ve üç boyutlu olarak doldurulacağı düşüncesi ile geliştirilmiştir (Glickman ve ark 1992).

Termoplastik güta perka enjeksiyon yönteminin avantajları;

1. Kök kanal sisteminin detaylı bir ölçüsünü vermesi,
2. Diğer geleneksel kanal doldurma yöntemleri ile eşdeğer bir dolgu sağlanması,
3. Oldukça kısa sürede kök kanalının iyi bir şekilde doldurulması şeklinde sıralanmıştır (Torabinejad ve ark 1978, Marlin 1986).

Uygulanan ısıya göre iki tip enjeksiyon sistemi geliştirilmiştir (Glickman ve ark 1992);

1. Yüksek ısılı enjeksiyon sistemi (Obtura)
2. Düşük ısılı enjeksiyon sistemi (Ultrafil)

Yüksek Isılı Enjeksiyon Yöntemi (Obtura)

Obtura III sistemi (Obtura Spartan), içine güta perka peletlerin yüklendiği ve özel ısıtıcısında 160°C'ye kadar ısıtılmış bir enjektörün ucundaki özel gümüş iğne şeklindeki kanülleri (20, 23 ve 25 gauge) içeren, elle tutulan bir tabancadan oluşur. Kontrol ünitesi, uygulayıcı tabancanın sıcaklığının ve güta perkanın vizkozitesinin ayarlanmasına izin verir. Obtura sistemi kullanılan bir çalışmada apeksten 6 mm uzakta yapılan ölçümde en yüksek internal sıcaklığın 27°C olduğu bulunmuştur (Cohen ve ark 1998).

Uygulama:

Kanal preperasyonu diğer tekniklerde yapılan preperasyonla benzerdir. Apikal stop noktası güta perka taşmasını önlemek için olabildiğince küçük olmalıdır. Kanalin çalışma boyunda kullanılan son kanal eğesi ile aynı kâğıt konlar kullanılarak kanallar kurulur ve kanala, kanal patı gönderilir. Güta perka, tabancada önceden ısıtılır ve kanüller apeksten 3-5 mm uzağa ulaşacak şekilde kanala yerleştirilir. Ardından güta perka, tabancanın düğmesine basılarak pasif bir şekilde enjekte edilir. Bu işlem esnasında kanülün geri gelme hissine dikkat edilmelidir. Apikal kısım doldurulduktan sonra kanül kanaldan çıkarılır. Alkole batırılmış plugger ile güta perka kompakte edilir. Güta perka 3-4 mm'lik segmentlerin sırasıyla enjekte edilip sıkıştırıldığı bir segmental teknik de kullanılabilir. Her iki durumda da güta perka soğurken oluşan büzülmeyle kompanse edebilmek için soğuyana kadar kompakte etmeye devam edilir (Cohen ve ark 1998, Alaçam ve ark 2000, Çalışkan 2006).

Bu sistemde çalışma boyu kontrolünün zor olmasından dolayı taşkın veya eksik dolun karşılaşılabilecek yaygın bir sorundur. Bu yüzden klinisyenler apikal kısmın lateral kondansasyon ile tıkanıp kalan kısmın termoplastize edilmiş güta perkanın enjeksiyonu ile doldurulan hibrit tekniği kullanmaya başlamışlardır.

Bazı araştırmacılar, Obtura sistemi ile doldurulmuş 236 dişin tedaviden sonraki 3, 6 ve 12. aydaki başarı oranlarını incelemişlerdir. Sonuçlar, olguların %96'sının başarılı olduğunu; en yüksek başarı oranı %97 ile tam apekte doldurulmuş dişlerde, kısa ve taşkın doldurulmuş dişlerde ise başarı oranı %93 olduğunu göstermektedir (Tani-Ishii ve ark 2003). Bir başka çalışmada, kök kanal modellerinde Thermafil (DENTSPLY Tulsa Dental Specialties) ve Obtura ile lateral kondansasyon karşılaştırılmış ve Obtura'nın kanal duvarlarına en iyi adaptasyonu sağladığı bulunmuştur (Weller ve ark 1997). Diğer araştırmacılar ise Obtura backfill ile

devamlı ısı tekniğinin lateral kondansasyon yöntemine göre daha iyi bakteriyel sızdırmazlık sağladığını belirtmişlerdir (Jacobsen ve ark 1992)

1.5.Sıcak Dolu Tekniklerinde Uygulanan Isının Periradiküler Dokulara Etkisi

Pek çok çalışmada farklı termoplastik kanal dolgu tekniklerinde kök kanalı içerisinde ve kök dış yüzeyinde oluşan sıcaklık miktarları incelenmiştir. Dış kök dokusu zayıf iletken olmasına rağmen, ısıtılmış gütta perka ile dolun yapılması kök dış yüzeyinde ısı artışına neden olabilir (Anicé ve ark 1995, Lee ve ark 1998, Lipski 2004, 2005). Bu ısı artışı sement, periodontal ligament ve alveoler kemik de zarara neden olabilir. Kemik hasarı için kritik sıcaklık olan 56⁰C'de kemikteki alkalen fosfatazın inaktive olduğu bulunmuştur (Behnia ve ark 2001). Aynı araştırmacılar tarafından; kemik dokusu 50⁰C ile 1 dakika veya 47⁰C ile 5 dk temas ederse, kemik dokusunun rezorbe olacağı ve yerini adipoz dokunun alacağı bildirilmiştir (Behnia ve ark 2001).

Eriksson ve Albrektsson (1983), tavşanlarda ısı kaynaklı kemik dokusu hasarına neden olacak sıcaklık eşik seviyelerini belirlemek üzere vital-mikroskopik bir çalışma yürütmüşlerdir. Kemik dokusunun, 1 dakika boyunca 47 ° C'ye ısıtılmasının kemik dokusunun yeniden şekillenmesine ve yağ hücresi nekrozuna neden olduğunu bulmuşlardır (Eriksson ve ark 1983).

Sistem B cihazının elektrikli ısı kaynağı farklı sıcaklık derecelerinde ayarlama yapılmasına izin vermektedir. Sistem B için önerilen sıcaklık 200⁰C'dir (Cohen ve ark 1998). Venturi ve arkadaşları (2002), sıcaklığın mine-sement sınırından 2 mm apikal ile apeksten 1.5 mm uzaklıktaki bölgelerde değişiklik gösterdiğini ve sonuç olarak apikale doğru değiştiğini göstermiştir. Aynı çalışmada mine-sement sınırında ortalama değişiklik 4.1⁰C olarak gösterilmiştir (Venturi ve ark 2002).

Bir diğer çalışma Sistem B kullanılarak yapılan dolun sırasında oluşan ısı artışının geleneksel sıcak vertikal dolun tekniği sırasında oluşan ısı artışından belirgin derecede daha az olduğunu göstermiştir. Eksternal kök yüzeyinde oluşan ısı artışı sıcak vertikal dolun tekniklerinde 10⁰C'den fazladır (Silver ve ark 1999). Bazı araştırmacılar, Sistem B ısı kaynağını 250⁰C'den 600⁰C'ye kadar çeşitli sıcaklık ayarlarında kullanırken kök yüzey sıcaklıklarını ölçmüşlerdir. Sonuçlar en yüksek sıcaklığın apeksten 5 mm uzakta olduğunu ve 10⁰C'lik artışın sadece bu bölgede

üzere iki kollajen kaynağı mevcuttur (Ataoglu ve ark 1996, Newman ve ark 2011). Sementin kemikten en önemli farkı avasküler olmasıdır.

Biyolojik ilkeler kök kanalı şekillendirmesinin sonlandırılabilceği en uygun noktanın pulpa ile periodonsiyum arasındaki bağlantı noktası olduğunu ortaya koymaktadır. Bu nokta apikal tıkaçta meydana gelmektedir. Sement kemikten sert olmasına rağmen periapikal lezyonlarda rezorbe olabilmekte ve bunun sonucu olarak apikal tıkaç kaybedilebilmektedir (Walton ve ark 1996).

1.6.2. Periodontal ligament

Diş pulpası gibi özelleşmiş bir bağ dokusu olan periodontal ligamentin işlevi; diş soket içerisinde destekleyen kollajen lif demetlerinin varlığı ile çığneme kuvvetlerinin kemik dokusuna iletilmesini engellemektir (Walton ve ark 1996). Periodontal aralıkta bulunan hücreler osteoblastlar ve sementoblastlardır (McCulloch 1985, McCulloch ve ark 1987, McCulloch 1993). Periodontal lifler arasında örülmüş bir şekilde fibroblastları, osteoklastları, kök hücrelerini, kan damarlarını, sinir liflerini ve lenf damarlarını içeren gevşek bir bağ dokusu mevcuttur (Avery 2002, Nanci 2017).

Periodonsiyumun damarlanması geniş ve karmaşıktır (Walton ve ark 1996). Periodontal ligamentin beslenmesi; kansellöz kemik içerisindeki maksiller arterin dalları, alveoldeki küçük deliklerden geçerek bazen de sinir liflerinin eşliğinde periodontal aralığa gelerek sağlanmaktadır. Aynı zamanda pulpayı besleyen damarlar da apikal foramenden girmeden önce dallanarak periodontal aralığa ulaşır bölgenin kanlanmasına yardımcı olurlar (Murrell ve ark 1996). Kan dolaşımının derecesi ve hücre kaynaklarının derinliği periodontal ligamentte oluşan yaralanmanın tamir edilebilmesi için mükemmel bir potansiyel sağlar (Murrell ve ark 1996).

Hem duyuşal hem de otonom innervasyon alan periodonsiyumu innerve eden duyuşal sinirler trigeminal sinirin ikinci ve üçüncü ana dallarından gelmektedir (Byers 1985). Ağrı duyuşunu ileten miyelinsiz duyu sinirleri, serbest sinir uçları şeklinde sonlanır. En fazla apikal üçte birlik kısımda bulunan büyük lifler hareket uyarılarına duyarlıdır ve apikal periodontitisi olan bir hastanın diş ayırt etmesini sağlar (Walton ve ark 1996).

1.6.3.Alveol kemiği

Alveol kemiği; damarlar, sınırlar ve bağ dokusunun kemiğin kansellöz kısmından periodontal aralığa geçmesi için delikli yapıda olmasına rağmen, kompakt alveoler kemik, etrafındaki süngerimsi kemikten daha yoğundur ve periapikal radyografilerde belirgin opak bir görüntü verir. Kompakt alveoler kemik değişken basınçlara adapte olabilen lameller yapıdadır (Cho ve ark 2000).

1.7.Hücreler

Kök hücreler, yaşamin erken dönemlerinden itibaren sınırsız bölünebilme, kendini yenileyebilme ve birçok farklı hücre tipine farklılaşabilme potansiyeline sahip özelleşmemiş hücrelerdir (Rao 2004). Bir kök hücre bölündüğünde, her yeni hücre özelleşmiş fonksiyona sahip herhangi bir hücreye dönüşebilir veya kök hücre olarak kalabilir (Yücel ve ark 2015).

Kök hücreler, elde edildikleri kaynağa göre embriyonal ve erişkin olmak üzere ikiye ayrılır (Fortier 2005). Embriyonik kök hücreler, blastositin iç tabakasındaki hücrelerden köken alır ve organizmadaki bütün hücre tiplerine özelleşebilme yeteneğine sahiptir (Thomson ve ark 1998, Maria ve ark 2007, Özel ve ark 2008). Erişkin kök hücreleri, yaşayan organizmada bulunan, birçok spesifik hücre tipine farklılaşabilen özelleşmemiş hücrelerdir. Erişkin kök hücreleri kemik iliği (Jiang ve ark 2002), periferik kan (Zhao ve ark 2003), nazal mukoza (Murrell ve ark 2005), diş pulpası (Gronthos ve ark 2003), deri epidermisi (Niemann ve ark 2002) gibi çeşitli doku ve organlarda bulunmaktadır (Atalayın ve ark 2012, Yücel ve ark 2015).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, pulpa, periodontal ligament, dental folikül, periost gibi dental dokularda da mezenkimal kök hücreler izole edilmiş ve bu hücrelerin farklılaşabilme yetenekleri kemik iliği ile karşılaştırılmıştır (Gronthos ve ark 2003, Miura ve ark 2003, Seo ve ark 2004, Morsczeck ve ark 2005, Coura ve ark 2008)

Diş gelişimi evresinde birçok farklı kök hücre ve progenitör hücre rol almaktadır. Bunlar; dental epitelyal kök hücreler, dental pulpa ile ilişkili dental pulpa kök hücreleri, apikal papilladan elde edilen kök hücreler, periodonsiyum ile ilişkili olan periodontal ligament kök hücreleri ve dental folikül progenitör hücreleridir (Atalayın ve ark 2012),

1.7.1. Periodontal Ligament Mezenkimal Hücreleri

Periodontal ligament (PDL) hücreleri, PDL yapılarını sentezleyerek periodontal rejenerasyonda önemli rol oynayan, temel olarak fibroblastlardan oluşan heterojen hücre topluluğudur (Giannopoulou ve ark 1996, Phipps ve ark 1997, MacNeil ve Somerman 1999, Isaka ve ark 2001). PDL hücrelerinin farklılaşarak sement ve kemik dokusu oluşturma potansiyelleri vardır (MacNeil ve ark 1999, Isaka ve ark 2001).

Çekilmiş dişlerin kök yüzeylerinden elde edilen periodontal ligament kök hücreleri, periodonsiyum benzeri doku ve hücrelere farklılaşabilirler. Bu hücreler koloni oluşturabilmelerine rağmen in vitro osteojenik farklılaşma potansiyellerinin düşük olduğu bildirilmiştir. Ancak farelere transplante edildiklerinde doku rejenerasyonu ve periodontal onarım sağladıkları gözlenmiştir (Seo ve ark 2004, Gronthos ve ark 2006).

Periodontal ligament kaynaklı progenitör hücrelerin nöral krest orjinlerinden dolayı, adiposit ve nöral diferansiyasyon kazandıkları ve bu sayede sadece periodontal rejenerasyonun dışında hücresel tedavilerde kullanılabileceği öngörülmektedir (Park ve ark 2011, Hakki ve ark 2014, Hakki ve ark 2015).

1.7.2. Sementoblastlar

Morfolojileri osteoblastlara benzeyen sementoblastlar, aktif olarak matris sentezi yaparlar (Wilson Jr ve ark 1996). Sementoblastlar, mineralize matris içerisine gömülerek osteositlere benzer özellik gösteren sementositlere dönüşürler ve düşük seviyelerde matris sentezi yaparlar (Wilson Jr ve ark 1996). Tip 1 kollajen, bone sialoprotein, osteokalsin ve osteopontin gibi polipeptid yapıların sentezine katıldığı gibi sement içerisine gömülü olan Sharpey lifleri haricindeki kollajen liflerin, fibrillerde bulunan glikoproteinlerin, fosfoproteinlerin ve proteoglikanların sentezinde de görev alırlar (D'errico ve ark 1997, Bosshardt 2005). Sement, kemik dokusuna benzemesine rağmen damarsız yapısıyla, remodelasyonun sınırlı olmasıyla ve sinirsel uyarı sisteminin bulunmaması ile bu dokudan farklılık gösterir (Melcher ve ark 1986, Hakki ve ark 2018).

1.8. Heat-Shock Proteinleri

Hücrelerin yüksek ısıya (42-46⁰C) maruz kalmasıyla üretimi artan bir protein grubu olan HSP, ilk kez 1962 yılında tanımlanmıştır (Aufrecht 2005). HSP'nin en fazla artışına yol açan durum genellikle *Heat-Shock Factor* (HSF) tarafından düzenlenir (Sarge ve ark 1993, Morimoto ve ark 1998, Christians ve ark 2002).

Artmış HSP seviyeleri mRNA sentezine, stabilitesine ve bu durumun devamına olanak sağlar. Yüksek HSP sadece stresin başlangıç döneminde görülür ve hücre ilk şoktan sonra yüksek ısıya maruz kalmaya devam etse bile, HSP seviyeleri düşmeye başlar ve normal seviyelerine döner (Baykal ve ark 2000).

HSP artışına yol açan ısı dışında; enfeksiyon, inflamasyon, açlık, hipoksi, arsenik, nitrojensizlik, dehidratasyon gibi başka faktörler de vardır. Bu nedenle, HSP'ne "stres proteinleri" de denilmektedir (Morimoto ve ark 1998, Petrof ve ark 2004, Aufrecht 2005). Stres proteinlerinin sadece stres sırasında değil, bazı stres proteinlerinin normal hücrede de bulunduğu tespit edilmiştir (Moseley 1998). Stres proteinleri büyüme, farklılaşma, bölünme ve hücre ölümü gibi hücre metabolizmasının bütün evrelerinde hayati önem taşımaktadır (Baykal ve ark 2000).

Fizyolojik koşullarda, HSP gibi hücrede yeni üretilen proteinlerin doğru katlanmasına yardımcı olan maddelere "moleküler şaperon" denilmektedir (Ellis ve ark 1991, Mayer ve ark 2005, Bukau ve ark 2006). Katlanma hatalarının büyük bir çoğunluğu ısı artışından kaynaklandığı için moleküler şaperonların çoğu HSP'dir (Aufrecht 2005).

HSP, molekül ağırlıklarına göre sınıflandırılırlar ve hemen hemen tüm canlı hücrelerinde biyolojik düzeyde bulunurlar (Pockley ve ark 2002, Petrof ve ark 2004, Otake ve ark 2006).

1.8.1. HSP-90

HSP-90α'nın en iyi bilinen özelliği tümoregenez ile ilişkisidir (Neckers ve ark 2003). Hücrelerin iletişimi ve normal morfolojik yapılarının korunmasında önemli rolleri vardır ve "Epidermal Growth Factor" (EGF) reseptör sinyal iletimi ve akt-sinyal yolu gibi çeşitli yollarla apoptozda görev alır (Neckers ve ark 2003). Apoptozda birçok noktada rolü olmakla birlikte genel olarak anti-apoptotik bir role sahiptir (Garrido ve ark 2001). Bu sayede kanser hücrelerinin canlılığın devam etmesine yardımcı olarak tümörögenizde rol alır (Otake ve ark 2006). Tümoral

hücrelerde, ısı artışı ve hipoksi HSP-90 artışına bağlı olarak tümör direncini artırır, bloklanmaması ise hücre ölümünü hızlandırır (Schmitt ve ark 2007)

1.8.2. HSP-70

Sitozolik HSP-70 stresle artan HSP-72 ve sürekli üretilen HSP-73 olmak üzere iki farklı formda bulunur (Otake ve ark 2006). Yeni üretilen proteinlerin katlanması, yanlış katlanmış veya çökelti proteinlerin yeniden katlanması, salgısal proteinlerin translokasyonu gibi protein katlanması ile ilgili geniş bir etki alanı vardır (Mayer ve ark 2005). Bu etkilerini ATP harcayarak peptidlerin hidrofobik segmentleri ile etkileşime girerek gösterir (Öztürk ve ark 2009).

HSP-70 apoptozu kaspaz üzerinden inaktive eder. HSP-70 seviyesindeki artış TNF α gibi apoptotik faktörlerin işlevini azaltırken, tersine HSP-70 seviyesindeki azalma apoptozu kolaylaştırır (Jäättelä 1999, Öztürk ve ark 2009).

1.8.3. HSP-27

HSP-25 (fare) ve HSP-27 (insan) yapısal ve fonksiyonel olarak küçük HSP ailesindedir (Baykal ve ark 2000, Öztürk ve ark 2009). HSP-25, HSP-27, HSP-B9 ve HSP-20'nin sıcak ve iskemi gibi çeşitli uyarıcılarla tetiklenip (Smoyer ve ark 2000) hücre çekirdeğine geçtikleri gösterilmiş ancak bu proteinlerin transkriptik faktör olarak mı görev aldıkları veya çekirdekçiği mi korudukları tam olarak aydınlatılamamıştır (Sun ve ark 2005).

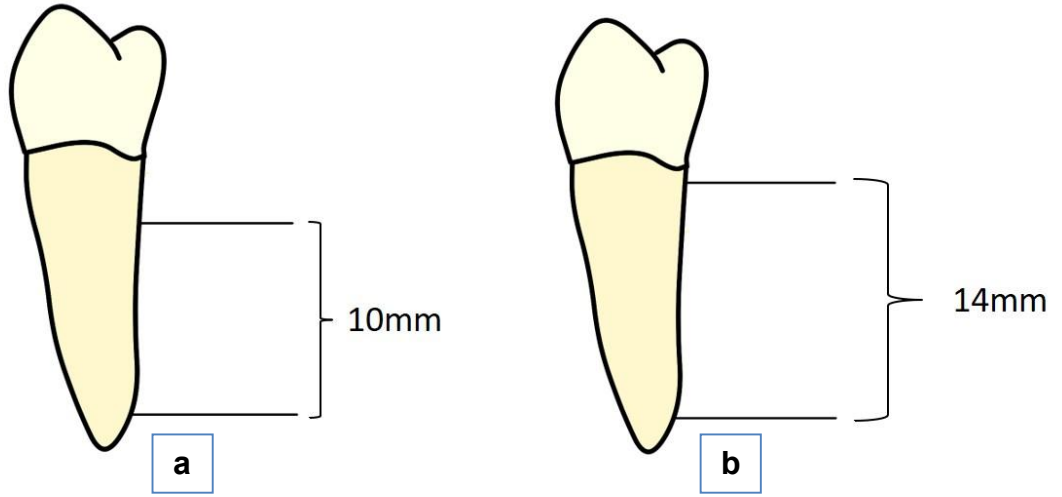
Son zamanlardaki çalışmalarda, odontoblastların sağlam dişlerde HSP-25 immünoaktivitesinin aşamalı bir ekspresyon paterni gösterdiği tespit edilmiştir (Ohshima ve ark 2000, Ohshima ve ark 2002). Diş replantasyonu (Ohshima ve ark 2002, Nakakura-Ohshima ve ark 2003) ve sıradan yüksek hızlı aletörler (Ohshima ve ark 2001, Nakakura-Ohshima ve ark 2003, Ohshima ve ark 2003) veya CrTmEr: YAG lazeri (Suzuki ve ark 2004) ile kavite hazırlığı dahil olmak üzere diş yaralanmasının ardından, hasar görmüş odontoblastlar HSP-25 immünoaktivitesini kaybeder (Tate ve ark 2006). Bununla birlikte, yeni diferansiye odontoblastlarda HSP-25 immünoaktivitesinin kazanıldığı da gözlenmiştir ve bu proteinin diş yaralanmasından sonra pulpa iyileşmesi sırasında odontoblastların farklılaşmasını incelemek için yararlı bir belirteç olduğunu düşündürmektedir (Tate ve ark 2006).

2. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Selçuk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Araştırma Merkezi ve Hücre Kültürü ve Moleküler Biyoloji Laboratuvarında yapılmış ve Selçuk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Etik Kurulunun 05.09.2017 tarihli, 2017/14 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

2.1. Örneklerin Hazırlanması

Bu çalışmada toplam 70 adet, ortodontik sebepler ile çekilmiş, sağlam insan premolar dişi kullanıldı. Dişler seçilirken kök ucu kapanmış, tek köklü, tek ve yuvarlak kanallı ve çürüksüz olmasına dikkat edildi. Dişlerin kök yüzeyleri üzerinde bulunan kalsifiye birikintiler, doku artıkları bir kretuvar yardımı ile uzaklaştırıldı. Seçilen dişler 37⁰C'de nemli bir ortamda saklandı. Bütün dişlerin apeksleri yüzey alanını artırmak ve daha düz bir apeks yüzeyi elde edebilmek için su soğutması altında ince bir elmas separe (Horico Dental, Berlin, Almanya) ile 1 mm kesildi. Hücre canlılık deneylerinde kullanılacak olan 50 diş, 10 mm kök boyu olacak şekilde koronalinden kesilirken, mRNA ekspresyon deneylerinde kullanılacak olan 20 diş ise 14 mm kök boyu olacak şekilde koronalinden kesildi (Şekil 2.1)

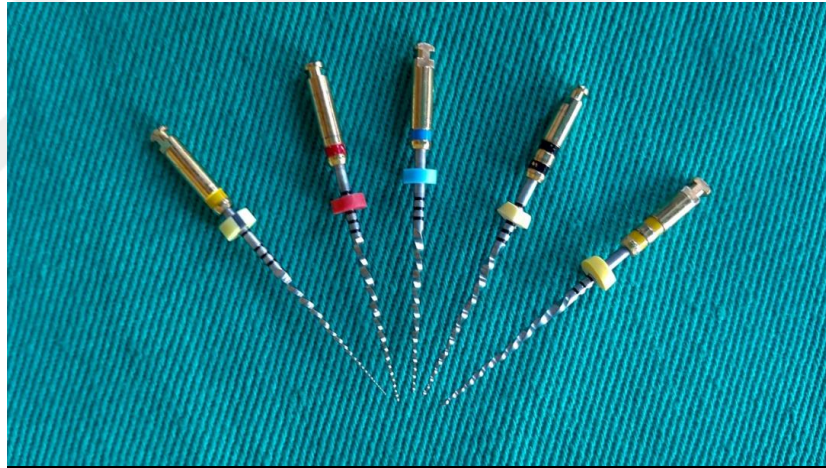


Şekil 2.1. Örneklerin standardizasyonunu sağlamak için belirlenen kök boylarının şematik görüntüsü.
Şekil a'daki gibi hazırlanan örnekler MTT hücre canlılık deneyleri için, şekil b'deki örnekler RNA ekspresyon deneyleri için kullanıldı.

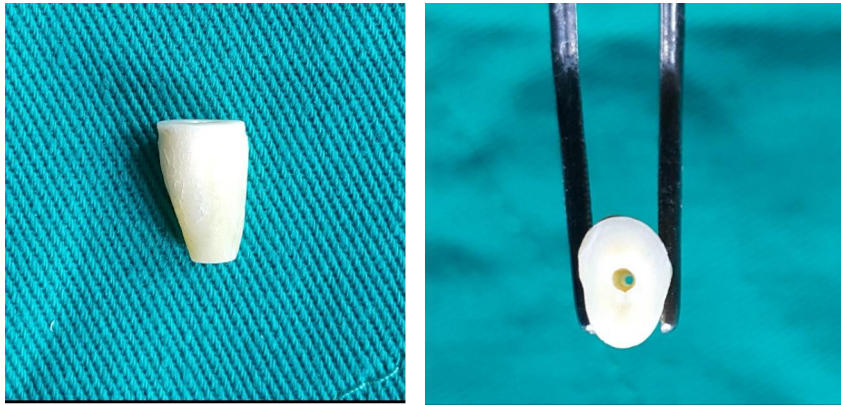
2.2.Kanalların Şekillendirilmesi

Tüm dişlerin çalışma boyu, 10 numaralı K tipi kanal eğesi (Dentsply, Maillefer, Ballaigues, Switzerland) kullanılarak apikal foramenden 1 mm kısa olacak şekilde tespit edildi. Çalışma boyu tespit edilen kanalların preperasyonu, X-Smart Plus (Dentsply, Ballaigues, Switzerland) tork kontrollü motor ve ProTaper Next (Dentsply, Maillefer, Ballaigues, Switzerland) döner alet sistemi ile üretici firmanın önerdiği şekilde sırasıyla X1, X2, X3, X4, X5 no'lu eğeler kullanılarak tamamlandı (Şekil 2.2).

Kanal preperasyonu sırasında kullanılan her bir kanal eğesi arasında taze hazırlanmış 2 ml %2,5 NaOCl irrigasyon solüsyonu (Yetiş Kimya, Konya) ile 27 gauge Monojet (Covidien, İrlanda) irrigasyon iğnesi kullanılarak irrigasyon yapıldı. Kanal şekillendirmesi tamamlanan tüm dişler 121°C'de 20 dakika boyunca steril edildi.



Şekil 2.2. ProTaper Next eğeleri



Şekil 2.3. Hazırlanan örneklerin yandan ve üstten görüntüsü

Prepare edilen dişler, hücre kültürü ortamı için steril hale getirildikten sonra tasarlanan ideal deney modeline uygun olarak vertikal doğrultuda sabitlendi. Elde edilen deney modeli kapsamında aşağıdaki gruplar oluşturuldu.

1. Kontrol Grubu-1 (K1): Sadece hücre bulunan dişsiz kontrol grubu.
2. Kontrol Grubu-2 (K2): Dişli kontrol grubu
3. Kanal Patı Grubu (KP)
4. Tek Kon Grubu (TK)
5. Devamlı Isı ile Obturasyon Tekniği Grubu (DIOT)
6. Termoplastik Gütä perka Enjeksiyon Grubu (TGE)

Her bir grup ise daha sonra OCCM.30 ve iPDL hücrelere ısı işlemin etkisini incelemek üzere iki alt gruba ayrıldı.

2.3.OCCM.30 Hücrelerinin Eldesi

Deneylerde kullanılan OCCM.30 hücreleri fare orijinli olup Prof Dr. Martha Somerman tarafından Michigan Üniversitesi'nde izole edilip immortal hale getirilmiş hücre hattıdır. Hücreler uygun pasajlarda hücre stoklarımızda bulunmaktadır.

2.4.İnsan Periodontal Ligament-Mezenkimal Kök Hücrelerinin Eldesi

İnsan Periodontal Ligament-Mezenkimal Kök Hücre (iPDL-MKH) (pasaj:4) '*İnsan diş pulpası ve periodontal ligament kaynaklı kök hücrelerinin osteojenik farklılaşması sürecinde mRNA'ların rolü*' başlıklı Tübitak projesi (SBAG 110S415) kapsamında ortodontik nedenli çekilmiş premolar dişlerin periodontal ligament dokusundan izole edilerek kök hücre karakterizasyonları *flow* sitometri ile yüzey *marker*ları (CD 105, CD 90, CD 73) açısından ve hücrelerin belirli hücre tiplerine (adipojenik, osteojenik, nörojenik, miyojenik) farklılaşmaları immünohistokimya ile belirlendi (Hakki ve ark 2014). Proje kapsamında elde edilen PDL-MKH'ler daha sonraki deneylerde kullanılmak üzere -150 °C'de stoklandı.

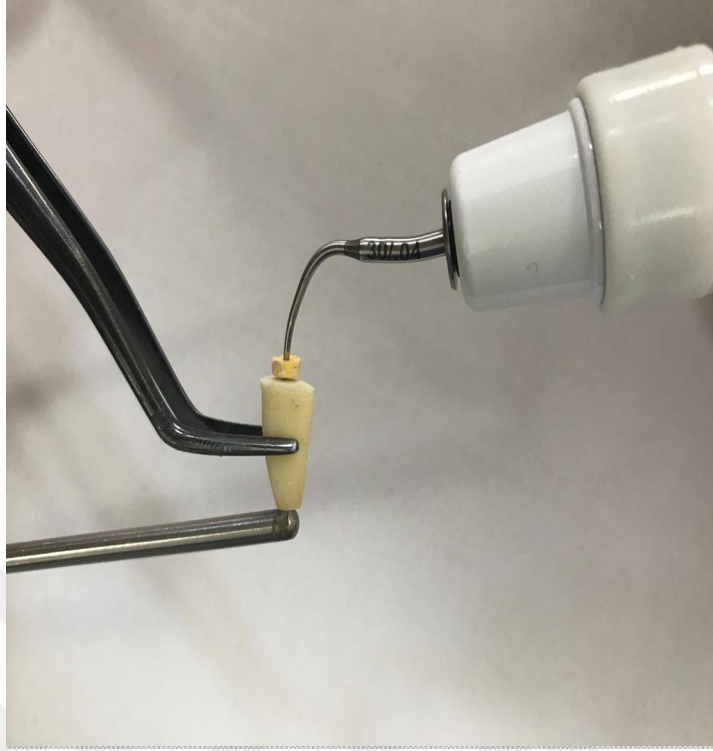
2.5.Hücre Kültürü Koşulları

Hücre kültürü stoklarımızda bulunan PDL (pasaj:4) ve OCCM.30 (pasaj:21) hücreleri deneylerde kullanılmak üzere hava akışı olan steril kabin altında %10 *Foetal Bovine Serum* (FBS) (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA), 100 U/ml penisilin, 100 µg/ml streptomisin, %1 glutamin içeren *Dulbecco's Modified Minimal Essential Medium* (DMEM) ile çözülerek %5 CO₂ içeren su bazlı etüv içerisinde inkübe edildi. Hücrelerin gün aşırı mediaları değiştirilerek morfolojik gelişimleri *inverted-mikroskop* (Nikon Eclipse TS100, Japonya) ile izlendi ve deneylerde kullanılacak hücre sayısına ulaşıncaya kadar beklendi.

2.6. Pilot Çalışma

Bu deney modelinin çalışılabilirliğini kontrol etmek amacıyla bir pilot çalışma yapıldı. Bu pilot çalışmaya kontrol grupları ve kanal dolgu patı grubu dahil edilmedi. 3,4 ve 5'nci gruplarda her grupta 4 diş olacak şekilde toplam 12 diş kullanıldı ve MTT hücre canlılık deneylerini gerçekleştirebilmek adına bir deney düzeneği planlandı. Öncelikle diş köklerinin hücre ortamına dışın apikalinden düzgün temas edebilmesi için kök uçlarında düzeltmeler yapılması gerektiğine karar verildi. Sonrasında ağız ortamını simüle edebilecek en uygun ısı derecesinin tespiti işlemine geçildi.

DIOT tekniği sırasında, üretici firma tarafından *The Elements™free Cordless Obturation System* (Sybron/ Endo/ Kerr Endodontics, Orange, CA) cihazının downpack ünitesi 200⁰C'ye ayarlanıp ısınan pluggerın kanala 10 sn uygulanması önerilmektedir. 37⁰C ortamda 200⁰C'ye ısınmış olan plugger dişe 10 sn temas ettirildiğinde ortalama 38,716⁰C'ye ulaşmaktadır (Uzun ve ark 2011). Pilot çalışmada, labaratuvar ortamında (20⁰C), dişlere 200 ⁰C ısıtılmış plugger temas ettirilip apikalinden bir termokupl ile ölçüm yapıldığında 38⁰C'ye 90 saniyede ulaştığı tespit edildi (Şekil 2.4- Şekil2.5). Bu yüzden DIOT grubunda apikal 1/3'ün doldurulma işlemi esnasında ısınmış pluggerın 90 saniye süresinde kanal içinde çalışır bir şekilde tutulmasına karar verildi.



Şekil 2.4. Prepare edilmiş dişe ısıtılmış plugger temas ettirilirken dişin apikalinden termokupl ile sıcaklık ölçülmesi

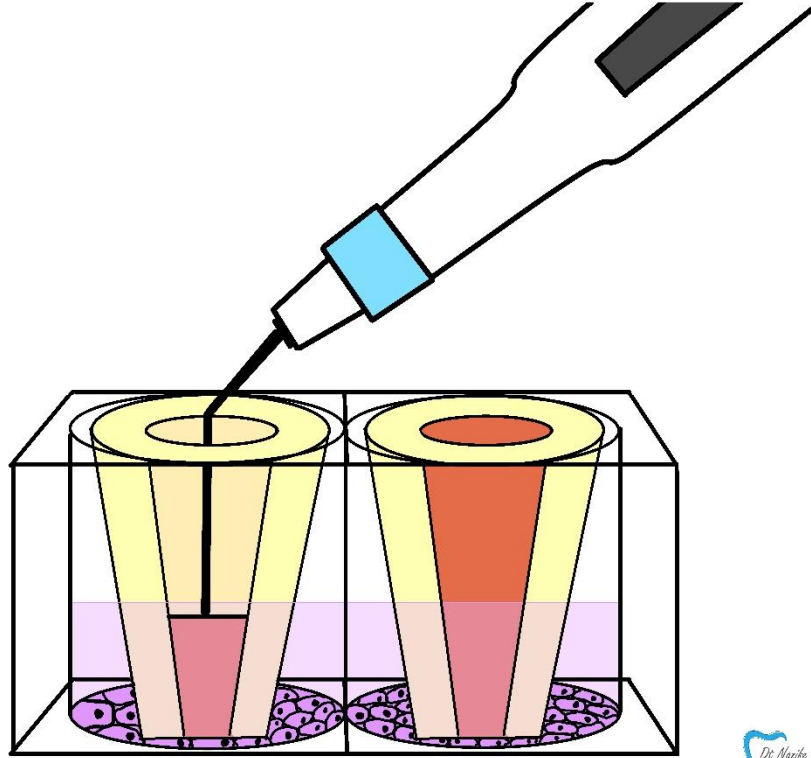


Şekil 2.5. Prepare edilmiş dişe ısıtılmış plugger temas ettirilirken dişin apikalinden termokupl ile sıcaklık ölçülmesi

2.7.MTT Hücre Canlılık Deneyleri

Kanal dolum yöntemi olan devamlı ısı ile obtürasyon yöntemi sırasında ortama salınan yüksek ısının iPDL-MKH ve OCCM.30 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi, hücrelerin tetrazolium tuzunu, formazan boyasına dönüştürebilmesine dayalı olarak yapılan 3- (4,5-Dimethylthiazol-2-yl) -2,5-Diphenyltetrazolium bromide (MTT) (MTT, SIGMA, USA) analizi ile değerlendirildi. Deneyler 96 yuvalı hücre kültürü kaplarında gerçekleştirildi. Hücre kültürü kabının yarısına periodontal ligament mezenkimal kök hücreleri her bir yuvada 10.000 hücre olacak şekilde, diğer yarısına da OCCM.30 hücreleri için her bir yuvada 5000 hücre olacak şekilde oluşturuldu.

Ardından 96 yuvalı hücre kültürü kapları tekrar %5 CO₂ içeren inkübatörde bekletilirken daha önceden MTT hücre canlılık deneyleri için hazırlanan dişler de media içinde inkübatörde 24 saat bekletildi. 24 saat sonra inkübasyondan çıkarılan hücre kültürü kaplarına Laminar Flow kabini altında deney modeline uygun olarak dişler yerleştirildikten sonra daha önce belirtilen gruplara göre kanal dolum işlemlerine başlandı (Şekil 2.6).



Dr. Nazife Tuğba AZMAZ

Şekil 2.6. 96 yuvalı hücre kültürü kaplarına yerleştirilmiş dişlerin DIOT ile doldurulmasının şematik görüntüsü

Bu işlemler hem PDL mezenkimal hücrelerine hem de OCCM.30 hücrelerine ayrı ayrı uygulandı. Kanal dolum işlemlerinin tamamlanmasının ardından 96 yuvalı hücre kültürü kapları inkübatörde idame edildi.

Test gruplarının hazırlanması:

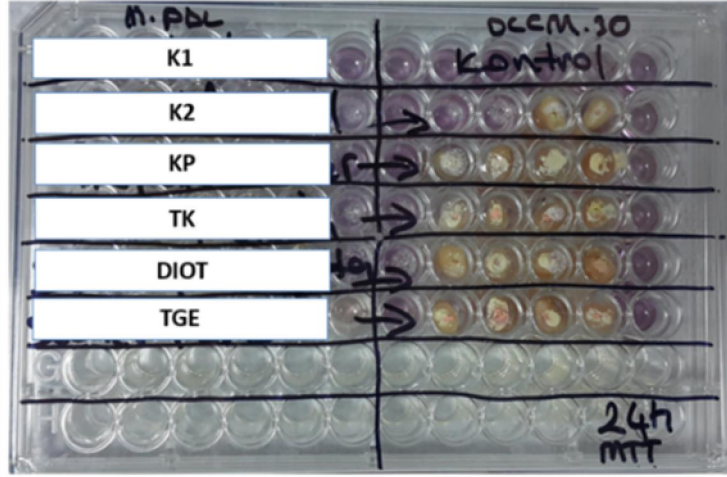
1. Kontrol Grubu-1 (K1): Sadece hücre bulunan dişsiz kontrol grubu.
2. Kontrol Grubu-2 (K2): Dişli kontrol grubu (Dişlere herhangi bir işlem yapılmadı) (n=2).
3. Kanal Patı Grubu (KP): Bu grupta bulunan dişlerin kanalları steril kâğıt konlarla kurulandı. Ardından üretici firmanın talimatlarına uyarak hazırlanan AH Plus (Dentsply De Trey, Konstanz, Germany) kanallara bir lentülo yardımı ile gönderildi (n=4).
4. Tek Kon Grubu (TK): Bu grupta bulunan dişlerin kanalları steril kâğıt konlarla kurulandıktan sonra AH Plus ve ProTaper Next X5 güta perka (Dentsply, Maillefer, Ballagues, İsviçre) kullanılarak basit tek kon yöntemi ile dolduruldu. Koronal güta perka parçası *Gutta Cut* (VDW, Germany) yardımı ile kesildi (n=4).
5. DIOT Grubu: Bu grupta bulunan dişlerin kanalları steril kâğıt konlarla kurulandıktan sonra AH Plus ve ProTaper Next X5 güta perka kullanılarak dolduruldu. Koronal güta perka parçası *Gutta Cut* ile kesildi. Ardından üretici firmanın önerdiği şekilde *The Elements™free Cordless Obturation System* (Sybron/ Endo/ Kerr Endodontics, Orange, CA) cihazının downpack ünitesi 200°C'ye ayarlanıp kronometre 90 saniyeye ayarlandı ve apeksten 3mm kısa olacak şekilde ayarlanmış olan .06 koniklik açısına sahip plugger [(*Buchanan Heat Plugger*) (Sybron/ Endo/ Kerr Endodontics, Orange, CA)] apekse doğru ilerletildi ve 90 saniye süresince diş ısı uygulamaya devam edildi. Doksan saniyenin sonunda ısı uygulamaya 5 saniye ara verildikten sonra tekrar ısı uygulanıp plugger hızlıca kanaldan uzaklaştırıldı. Ardından soğuk bir el pluggeri yardımı ile güta perka kondanse edildi. Apeksin dolum işlemi tamamlandıktan sonra *The elements™free Cordless Obturation System* cihazının Backfill

ünitesine takılı güta perka kartuş 150°C’de ısıtıldıktan sonra kanülün ucu kanala yerleştirilip dişin kalan koronal kısmı dolduruldu (n=4).

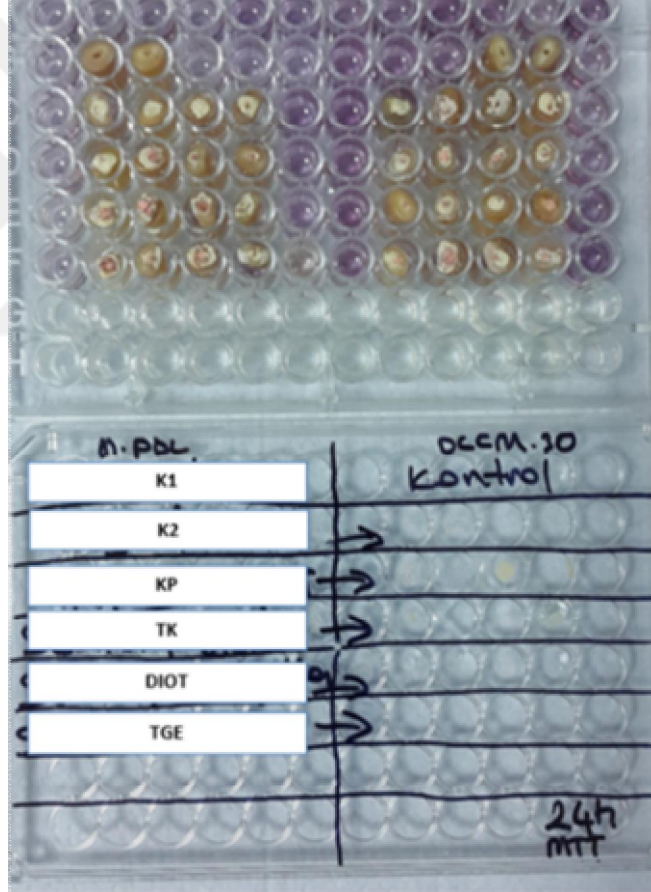
6. TGE Grubu: Bu grupta bulunan dişlerin kanalları steril kâğıt konlarla kurulandıktan sonra kanala lentülo yardımı ile AH plus gönderildi. *The Elements™free Cordless Obturation System* cihazının Backfill ünitesine takılı güta perka kartuş 150°C’de ısıtıldıktan sonra kanülün ucu kanala yerleştirilip diş termoplastik güta perka enjeksiyonu ile dolduruldu (n=4).



Şekil 2.7. The Elements™free Cordless Obturation System (Sybron/ Endo/ Kerr Endodontics, Orange, CA)

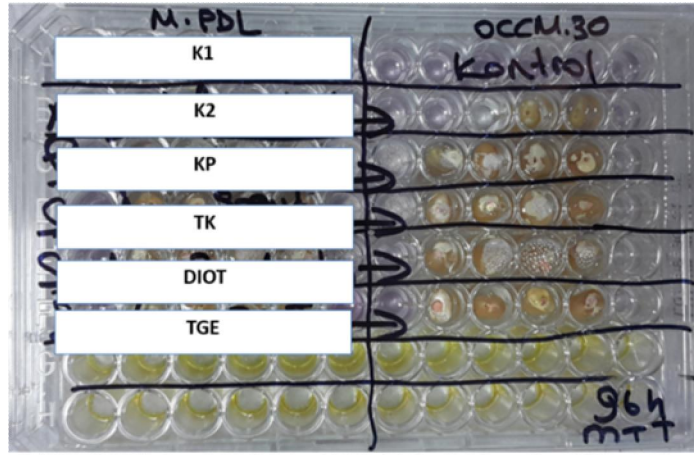


K1: OCCM30; K2: OCCM30 + Prepare edilmiş diş; KP: Kanal patı; TK: Tek Kon; TGE: Termoplastik Gıda-perka Enjeksiyonu; DIOT: Devamlı Isı ile Obtürasyon Yöntemi

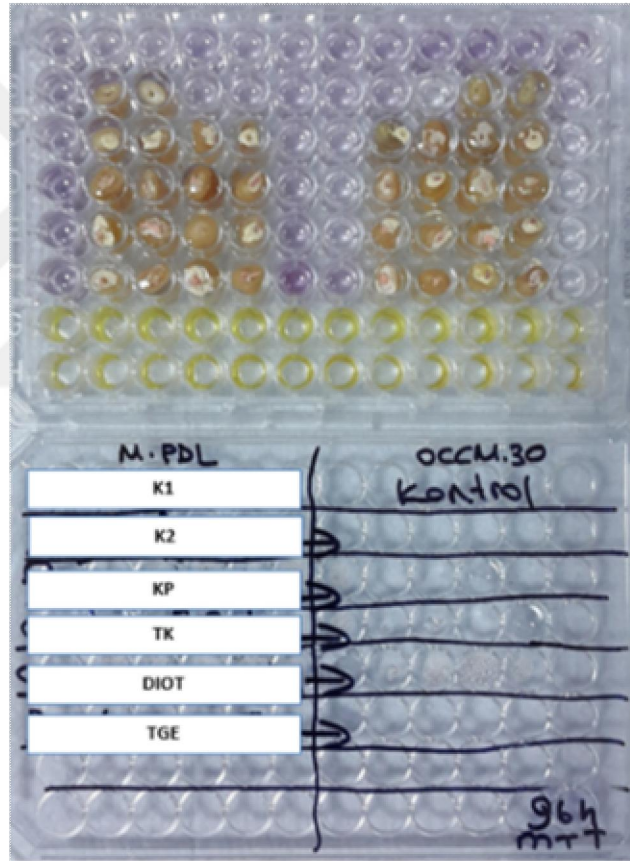


K1: OCCM30; K2: OCCM30 + Prepare edilmiş diş; KP: Kanal patı; TK: Tek Kon; TGE: Termoplastik Gıda-perka Enjeksiyonu; DIOT: Devamlı Isı ile Obtürasyon Yöntemi

Şekil 2.8. 24. Saat MTT hücre canlılık deneyleri için kullanılan 96 yuvalı hücre kültürü kapları ve deney gruplarına göre yerleştirilen dişler



K1: OCCM.30; K2: OCCM.30 + Prepare edilmiş diş; KP: Kanal patı; TK: Tek Kon; DIOT: Devamlı Isı ile Obtürasyon Yöntemi; TGE: Termoplastik Gütaperka Enjeksiyonu



K1: OCCM.30; K2: OCCM.30 + Prepare edilmiş diş; KP: Kanal patı; TK: Tek Kon; TGE: Termoplastik Gütaperka Enjeksiyonu; DIOT: Devamlı Isı ile Obtürasyon Yöntemi

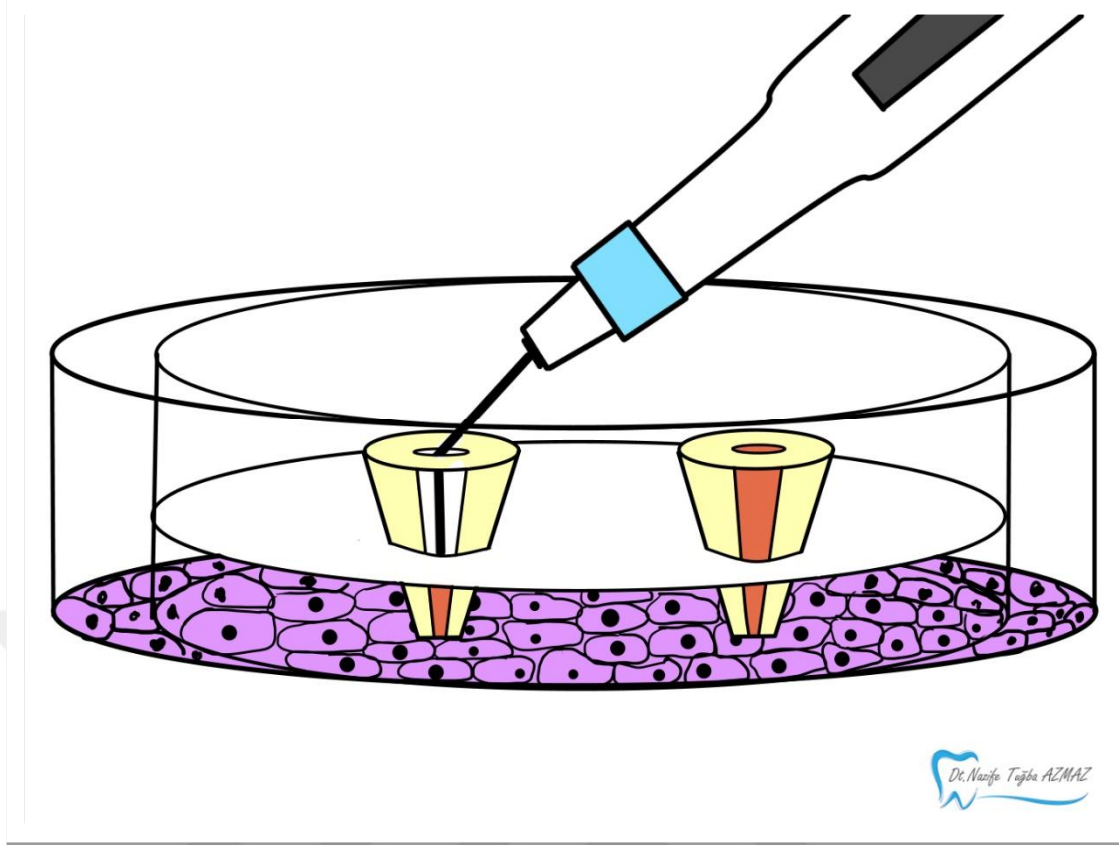
Şekil 2.9. 96. Saat MTT hücre canlılık deneyleri için kullanılan 96 yuvalı hücre kültürü kaplarına deney gruplarına göre yerleştirilen dişler

Hücre canlılığının tespit edilmesi için yapılan deneyler, her bir yuvada 0.55 mg/ml MTT olacak şekilde hassas terazide ölçüldü. MTT'ye 16 µL %10 *Foetal Bovine Serum* (FBS) içeren *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) eklendi. Bu karışım 0,22 µm filtreden geçirilerek steril MTT solüsyonu elde edildi. Ardından dişler, hücre kültürü kaplarından uzaklaştırıldıktan sonra medialar aspire edilip hücrelerin 200µL *Phosphate Buffer Saline* (PBS) ile yıkanması sonrasında her bir kuyuya hazırlanan MTT solüsyonundan 200µL eklendi. Bu işlemin ardından hücre kültür kabı ışık görmesin diye alüminyum folyoya sarılarak sonraki 2 saat için tekrar inkübatöre yerleştirildi. Doksan altı yuvalık hücre kültür kabının 2 saatlik MTT inkübasyonundan sonra, MTT içeren kültür ortamı çıkarılarak her bir kuyu 200 µl PBS ile yıkandı. Bu işlem iki kez tekrar edildi. Kuyulardan PBS'in uzaklaştırılmasının ardından petri kabı kurularak, her bir kuyuya 200 µl *Dimethyl sulfoxide* (DMSO) eklendi. Çözünen formazon'un analizi için kültür kabı 30 dakika oda sıcaklığında çalkalanıp, Optik Densite 540 nm'de ELISA spektrofotometrede absorbans değerleri okundu. Hazırlanmış olan ikinci 96 yuvalı deney kabı inkübatörde bekletilerek deneyin 2. zaman periyodu olan 96. saatin sonunda aynı işlemler uygulanarak yapıldı.

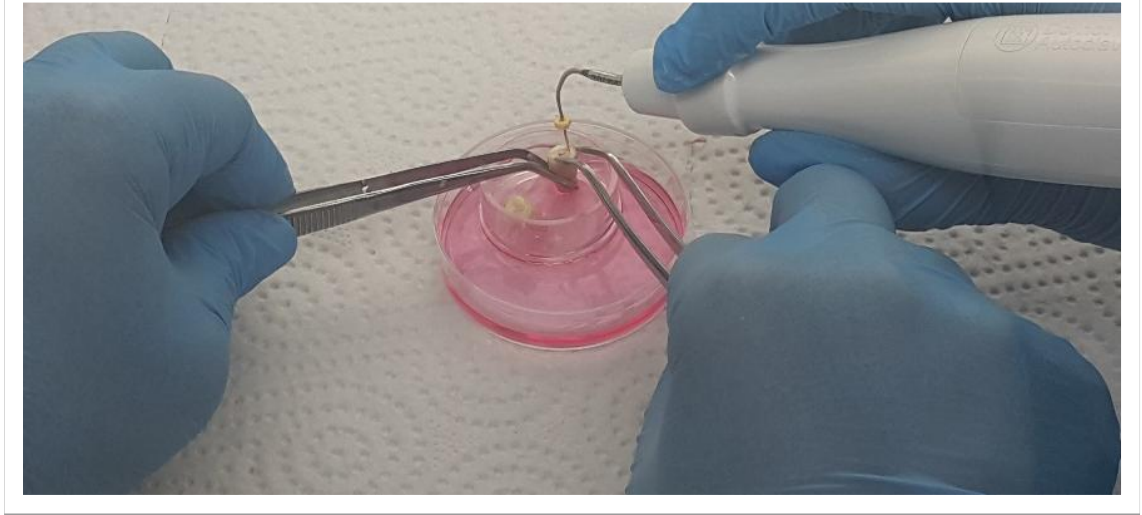
2.8.Real Time- Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

2.8.1.RNA İzolasyonu

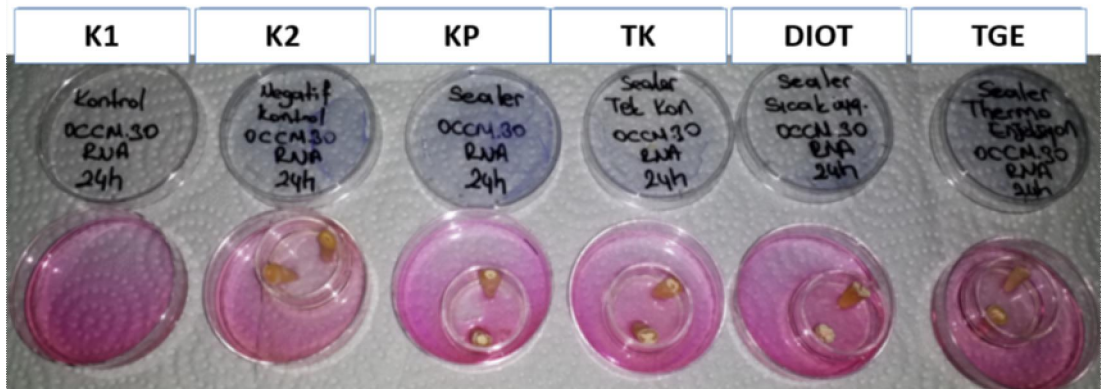
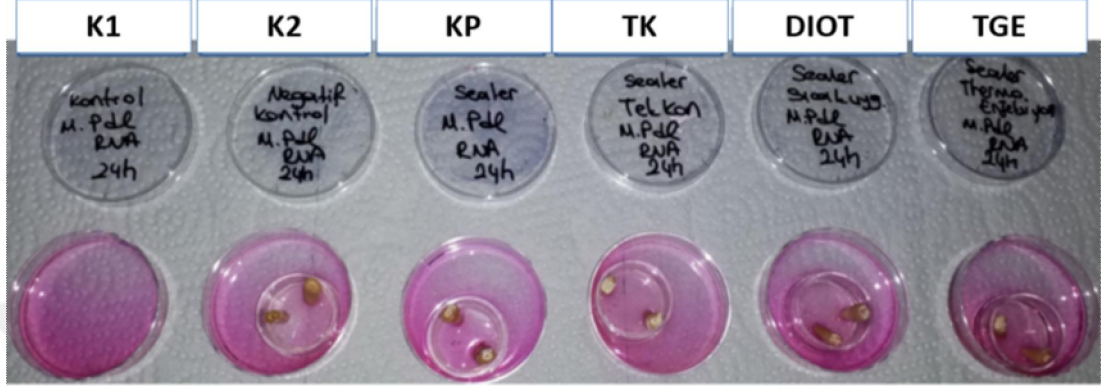
iPDL-MKH ve OCCM.30, premolar dişin kanalının devamlı ısı ile obturasyon yöntemi ile doldurulması sırasında oluşan yüksek ısı maruziyeti sonrasında HSP-27, HSP-70, HSP-90, COL I, BSP, OCN, Runx2, ALP mRNA ekspresyon düzeylerini belirlemek için 24. saatte RNA izolasyonları gerçekleştirildi. Bu amaçla tasarlanan deney modeli kullanılarak OCCM.30 ve PDL hücreleri 25.000/cm² olacak şekilde 60 mm'lik hücre kültür kaplarına dağıtıldı. Ardından *Laminar Flow* altında her bir petri kabına yerleştirilecek olan inserte 11 numaralı bistüri yardımı ile 2 delik açıldı. Bu iki deliğe dişlerin apeksleri gelecek şekilde dişler yerleştirildi ve insert petri kabının içine dikkatli bir şekilde konuldu. Kanal dolum işlemi yapılırken dişlerin sabit kalabilmesi için bir presel yardımı ile tutulurken oluşturulan deney gruplarına göre kanal dolum işlemleri gerçekleştirildi.



Şekil 2.10. mRNA ekspresyon deneyleri için hazırlanan deney düzeneğinin şematik görüntüsü



Şekil 2.11. mRNA ekspresyon deneyleri için hazırlanan deney düzeneğini



Şekil 2.12. mRNA ekspresyon deney düzeği ve farklı dolum teknikleri uygulanmış dişler

Kanal dolun işlemleri tamamlandıktan sonra RNA izolasyonları için hücreler üzerindeki %10 FBS DMEM aspire edilip hücrelerin PBS ile yıkanması sonrasında kullanacağımız RNA izolasyon kitinin bileşenlerinden EZ-RNA A solusyonu 500 µl olarak ilave edilip hücrelerin lizis işlemi tamamlanması sonrasında *screeper* yardımı ile kazınan hücreler ependorf tüplerine konuldu. İzolasyon kitinin diğer bileşeni olan EZ-RNA B solusyonundan 500 µl ilave edilip hücre lizat karışımı Vortexde karıştırıldıktan sonra 4°C 12.000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Böylece tüpler içerisindeki karışımın protein-DNA-RNA fazlarına ayrılması sağlanıp RNA fazı başka bir tüpe aktarılıp 500 µl izopropanol ilavesi sonrasında tüplerin 4 °C 12.000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmesiyle RNA peletleri elde edilip RT-PCR deneyleri yapılmaya kadar -80 °C 'de saklandı.

Total RNA örneklerinin absorbanlarının ölçülmesi

Elde edilen RNA örnekleri muhafaza edildikleri -80 °C'den çıkarıldıktan sonra 4°C 12000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilip dipteki RNA peletleri hareket ettirilmeden EtOH-DEPC dH₂O karışımı pipetman ile toplandı. Örneklerin ağzı açık bırakılarak içlerindeki alkol karışımın tamamen uçması sağlandı. RNA peletlerinin bulunduğu tüpler kapakları açık olarak 65°C'de 5 dakika ısıtma işlemine tabi tutuldu. Bu işlemin ardından RNA peletleri 25 µl DEPC dH₂O karışımında çözülerek *heat block* cihazında 5 dakika ısıyla muamele edilip, DEPC dH₂O'da homojenize edilen RNA örneklerinin 1µl'si spektrofotometrede 260 nm'de okunarak her bir gruptan elde edilen total RNA miktarları ve saflık oranları aşağıdaki çizelge 1 ve 2' de gösterilmiştir.

Çizelge 1 iPDL RNA Örneklerinin Konsantrasyon ve Saflık Oranları

DeneyGrupları	Konsantrasyon(ng/uL)	260/280	260/230
K1 24.saat	992.2	1.98	0.35
K2 24.saat	905.2	1.97	0.31
KP 24.saat	980	1.91	0.32
TK 24.saat	2325	2.00	0.76
DIOT 24.saat	782.1	1.96	0.27
TGE 24.saat	712.5	1.98	0.42

Çizelge 2 OCCM.30 RNA Örneklerinin Konsantrasyon ve Saflık Oranları

DeneyGrupları	Konsantrasyon(ng/uL)	260/280	260/230
K1 24.saat	2905.4	2.01	0.88
K2 24.saat	2622	1.92	0.52
KP 24.saat	2412	1.95	0.47
TK 24.saat	1868	1.96	0.67
DIOT 24.saat	1355	1.96	0.45
TGE 24.saat	2614	1.90	0.50

Complementary DNA (cDNA) sentezi

Complementary DNA (cDNA) sentezi, cDNA sentez kitinin protokolüne uygun olarak gerçekleştirildi. RNA örneklerinin her birinden, içerisinde 1 µg RNA bulunacak miktar, 1 µl oligoDT ve uygun miktarda dH₂O eklenerek 12 µl hacme tamamlandı. Elde edilen bu karışım üzerine 5X reaction buffer 4 µl, Ribolock RNase İnhibitör 1 µl, 10 mM dNTP mix 2 µl, RM Reverse Transcriptase enzimi 1 µl eklenerek son hacim 20 µl tamamlandı. Örnekler *Polymerase chain reaction (PCR)* cihazında 42°C' de 60 dakika, 70°C' de 5 dakika ve 4°C'de inkübe edilip, işlem sonunda elde edilen cDNA'lar RT-PCR deneylerinde kullanılacakları zamana kadar -20°C'de muhafaza edildi.

Real Time-PCR Deneyleri

Deneylerimizde iPDL-MKH ve OCCM.30 hücrelerinden HSP-27, HSP-70, HSP-90 HSP-27, HSP-70, HSP-90, COL I, BSP, OCN, Runx2, ALP genlerinin ekspresyon düzeyleri incelendi (Çizelge 1, Çizelge 2). Normalizasyon amacı ile GAPDH (*house keeping gene*) kullanıldı. mRNA ekspresyonları *Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix* ile çalışıldı. Bu karışım, PCR koşulları için gerekli tüm materyali içerisinde bulundurmakta (Çizelge 3) ve SYBR Green boyası için FAM filtresi kullanılmaktadır. Quantitative PCR çalışması Stratagene MX3000P cihazında gerçekleştirildi.



Şekil 2.13. Stratagene MX3000P cihazı

Çizelge 3. Kantitatif RT-PCR’da kullanılacak mouse orijinli primerlerin sekansları

Primer	Forward	Reverse
HSP-27	CCCAGTGAATCCCCTGTCTA	CCCCAGGTTTGGTTTATT
HSP-70	TGCTGATCCAGGTGTACGAG	CGTTGGTGATGGTGATCTTG
HSP-90	GGCATCGATGAAGATGAGGT	ACATGAGCAGAGAGCCAGGT
ALP	ATTGCCCTGAAACTCCAAAACC	CCTCTGGTGGCATCTCGTTATC
BSP	GCCTGTGCTTTCTCAATG	TTCCTTCCTCTTCCTCCTC
OCN	CATGAGAGCCCTCACA	AGAGCGACACCCTAGAC
Runx2	CTTCATTGCCTCACAAAC	GTCACTGCGCTGAAGA
COL I	GCGGCTCCCCATTTTATAACC	GCTCTCCTCCCATGTTAAATAGCAC
GAPDH	ACCACAGTCCATGCCATCAC	TCCACCACCCTGTTGCTGTA

Çizelge 4. Kantitatif RT-PCR’da kullanılacak insan orijinli primerlerin sekansları

Primer	Forward	Reverse
HSP-27	CACGAGGAGCGGCAGGACGAG	CAGTGGCGGCAGCAGGGGTGG
ALP	CATTTGCCCTGAAACTC	CACCCTTCCTCCCTGCTGTA
BSP	GCCTGTGCTTTCTCAATG	TTCCTTCCTCTTCCTCCTC
OCN	CATGAGAGCCCTCACA	AGAGCGACACCCTAGAC
Runx2	CTTCATTGCCTCACAAAC	GTCACTGCGCTGAAGA
COL I	TTTGTGGACCTCCGGCTC	AAGCAGAGCACTCGCCCT
GAPDH	ACCACAGTCCATGCCATCAC	TCCACCACCCTGTTGCTGTA

Çizelge 5. SYBR Green Miksle Hazırlanan 25 µl Reaksiyon Hacmi Bileşenleri

Forward primer (50 pmol/µl)	0.5 µl
Reverse primer (50 pmol/µl)	0.5 µl
SYBR gren master mix	12.5 µl
cDNA	2µl
ddH ₂ O	9.5 µl
Toplam	

2.9. Verilerin İstatistiksel Analizi

Sonuçlar istatistiksel olarak tek yönlü Varyans analizi (ANOVA) Dunnet ve TUKEY karşılaştırma testleri ile değerlendirildi. İstatistiksel olarak $p < 0,05$ değeri anlamlı kabul edildi.



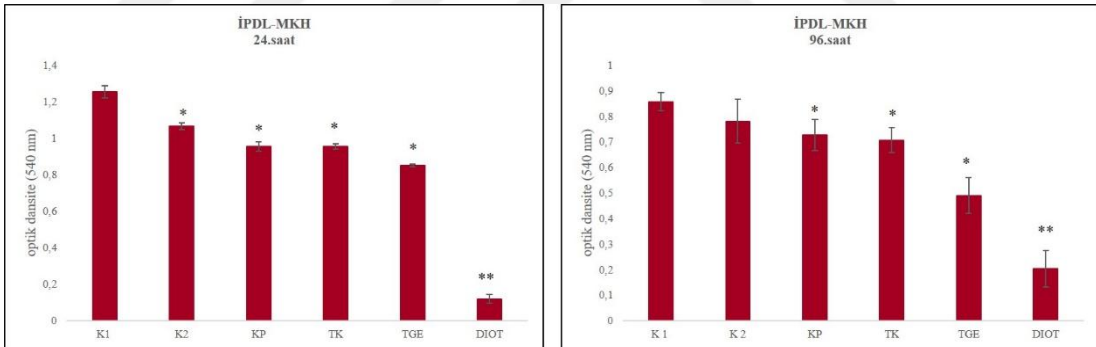
3. BULGULAR

3.1. MTT Deney Sonuçları

Sıcak dolum tekniklerinin iPDL-MKH ve OCCM.30 hücreleri üzerine etkisinin değerlendirildiği bu çalışmada, hücre canlılık deneyleri 24. ve 96. saatte MTT analizi ile değerlendirildi.

iPDL-MKH 24. saat MTT analizinde kontrol-1 (Sadece iPDL-MKH) grubuna göre kontrol-2 (iPDL-MKH ve prepare edilmiş dişler) grubu, kanal patı grubu, tek kon grubu ve termoplastik güta perka enjeksiyonu grubunda hücre canlılığının istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı görüldü ($p<0.05$). Kontrol-1 grubuna göre devamlı ısı ile obturasyon grubunda ise istatistiksel olarak daha anlamlı bir azalma görüldü ($p<0.01$) (Şekil 3.1).

iPDL-MKH 96. saat MTT analizinde kontrol-1 grubuna göre kanal patı grubu, tek kon grubu ve termoplastik güta perka enjeksiyonu grubunda hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlemlendi ($p<0.05$). Kontrol-1 grubuna göre devamlı ısı ile obturasyon grubunda ise istatistiksel olarak yine anlamlı bir azalma görüldü ($p<0.01$) (Şekil 3.1).



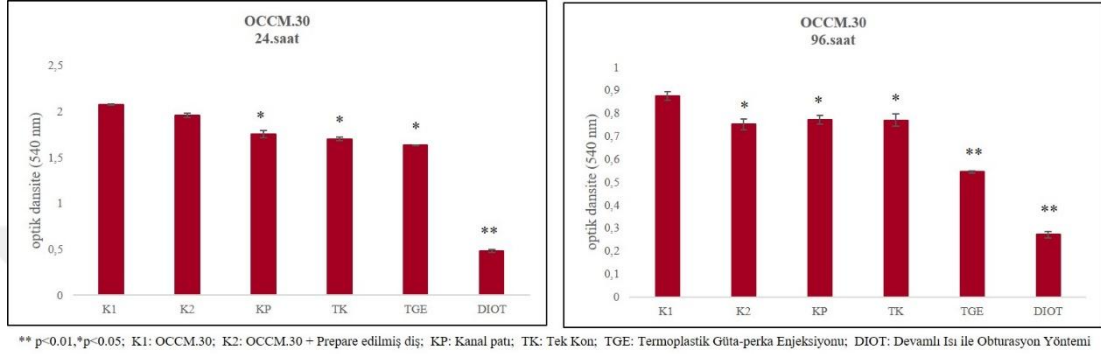
** $p<0.01$, * $p<0.05$; K1: iPDL-MKH; K2: iPDL-MKH + Prepare edilmiş diş; KP: Kanal patı; TK: Tek Kon; TGE: Termoplastik Güta-perka Enjeksiyonu; DIOT: Devamlı Isı ile Obturasyon Yöntemi

Şekil 3.1. Farklı kanal dolgu yöntemleri uygulandığında iPDL-MKH'nin 24. ve 96. saatlerde hücre canlılık sonuçları

OCCM.30 hücrelerinin 24. saat MTT analizinde hücre canlılığına bakıldığında kontrol-1 grubu ile kontrol-2 grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0.05$). Kontrol-1 grubuna göre kanal patı grubu, tek kon grubu ve termoplastik güta perka enjeksiyonu grubu değerlendirildiğinde hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma görüldü ($p<0.01$). Kontrol-1 grubuna göre

devamlı ısı ile obturasyon grubunda ise istatistiksel olarak yine anlamlı azalma görüldü ($p<0.01$) (Şekil 3.2.).

OCCM.30 hücrelerinin 96. saat MTT analizinde hücre canlılığına bakıldığında kontrol-1 grubu ile kontrol-2, kanal patı grubu ve tek kon grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma görüldü ($p<0.05$). Kontrol-1 grubuna göre termoplastik güta perka enjeksiyonu ve devamlı ısı ile obturasyon grubunda ise istatistiksel olarak yine anlamlı bir azalma görüldü ($p<0.01$) (Şekil 3.2.).



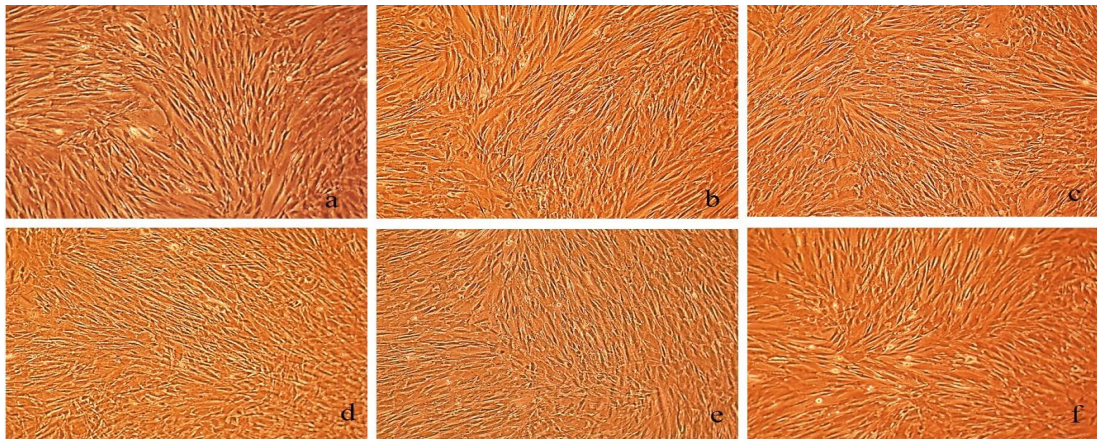
**p<0.01,*p<0.05; K1: OCCM.30; K2: OCCM.30 + Prepare edilmiş diş; KP: Kanal patı; TK: Tek Kon; TGE: Termoplastik Güta-perka Enjeksiyonu; DIOT: Devamlı Isı ile Obturasyon Yöntemi

Şekil 3.2. Farklı kanal dolgu yöntemleri uygulandığında OCCM.30 hücrelerinin 24. ve 96. saatlerde hücre canlılık sonuçları

3.2. mRNA Ekspresyon Deney Sonuçları

3.2.1. iPDL-MKH mRNA Ekspresyon Deneyleri

Premolar dişlerin kanalının devamlı ısı ile obturasyon yöntemi ile doldurulması sırasında oluşan yüksek ısı maruziyeti sonrasında 24. saatte RNA izolasyonları gerçekleştirilip BSP, OCN, Runx2, ALP, COL I, HSP-27, HSP-70, HSP-90 mRNA ekspresyonları kantitatif RT-PCR ile incelendi.

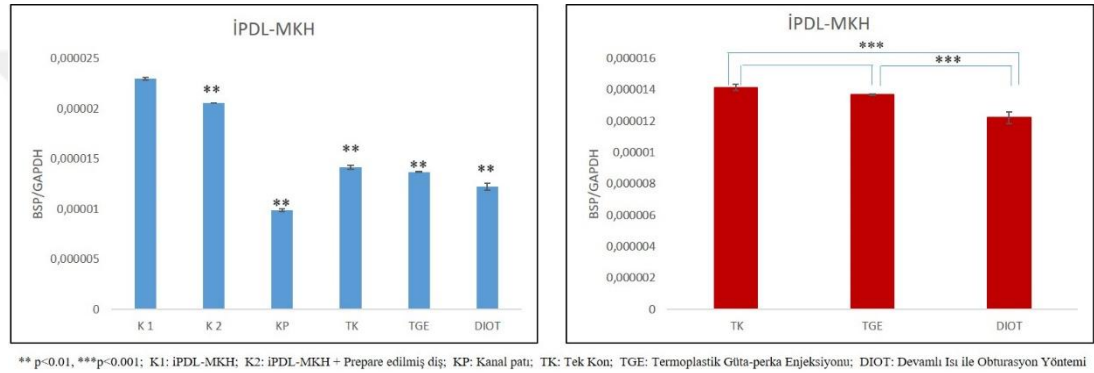


a: iPDL-MKH (K1); b: iPDL-MKH+prepare edilmiş diş (K2); c: kanal patı (KP); d: tek kon (TK); e: termoplastik güta-perka enjeksiyonu (TGE); f: devamlı ısı ile obturasyon yöntemi (DIOT)

Şekil 3.3. Farklı kanal dolgu yöntemleri uygulandığında iPDL-MKH'nin inverted mikroskoptaki görüntüleri

BSP mRNA Ekspresyonu

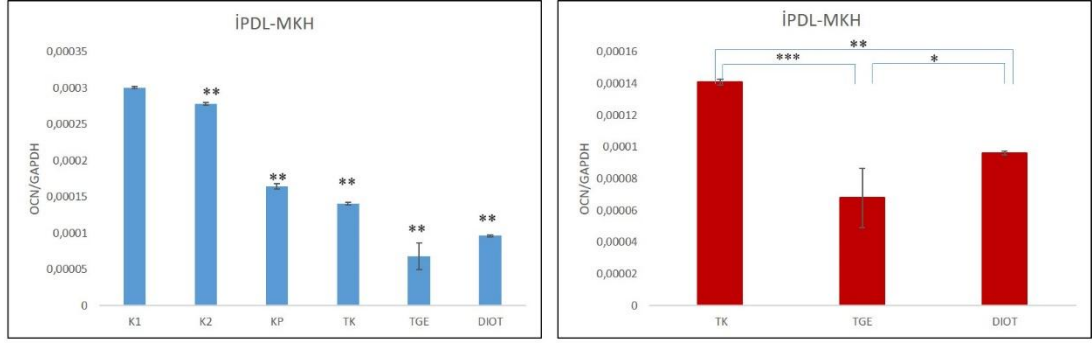
24. saatte, kontrol-1 grubuna göre diğer grupların BSP mRNA gen ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı azalma görüldü ($p < 0.01$) (Şekil 3.4). Tek kon, termoplastik güta perka enjeksiyonu ve devamlı ısı ile obturasyon yöntemi grupları kendi aralarında TUKEY testi ile istatistiksel olarak değerlendirildiğinde tek kon grubuna göre termoplastik güta perka enjeksiyonu grubu BSP mRNA ekspresyonu istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p > 0.05$). Tek kon grubuna göre devamlı ısı ile obturasyon yöntemi ve termoplastik güta perka enjeksiyonu grubuna göre devamlı ısı ile obturasyon yöntemi grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p < 0.001$) (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. Farklı kanal dolgu yöntemleri uygulandığında iPDL-MKH BSP ekspresyon sonuçları

OCN mRNA Ekspresyonu

24. saatte, kontrol-1 grubuna göre diğer grupların OCN mRNA gen ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı azalma görüldü ($p < 0.01$) (Şekil 3.5). Tek kon, termoplastik güta perka enjeksiyonu ve devamlı ısı ile obturasyon yöntemi grupları kendi aralarında değerlendirildiğinde tek kon grubuna göre termoplastik güta perka enjeksiyonu grubu OCN mRNA ekspresyonu istatistiksel olarak $p < 0.001$ değerine göre anlamlı, tek kon grubuna göre devamlı ısı ile obturasyon yöntemi $p < 0.01$ değerine göre ve termoplastik güta perka enjeksiyonu grubuna göre devamlı ısı ile obturasyon yöntemi grubu ise $p < 0.05$ değerine göre anlamlı bulundu (Şekil3.5).

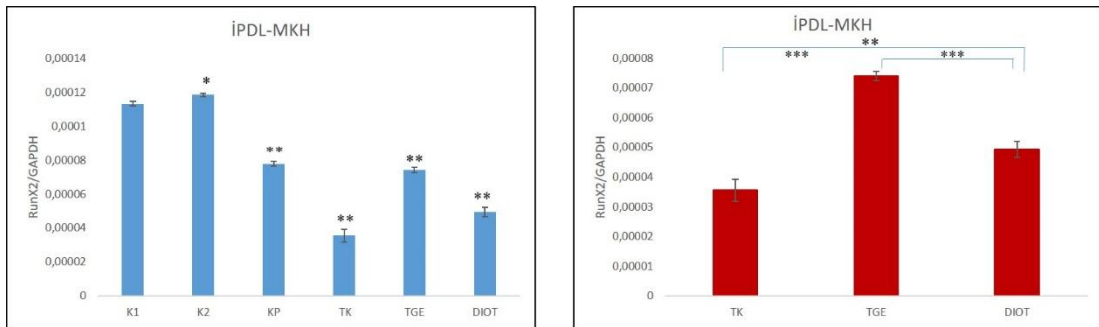


*p<0.05** p<0.01, ***p<0.001; K1: iPDL-MKH; K2: iPDL-MKH + Prepare edilmiş diş; KP: Kanal patı; TK: Tek Kon; TGE: Termoplastik Gütta-perka Enjeksiyonu; DIOT: Devamlı Isı ile Obturasyon Yöntemi

Şekil 3.5. Farklı kanal dolgu yöntemleri uygulandığındaiPDL-MKH OCN mRNA ekspresyon sonuçları

RunX2 mRNA Ekspresyonu

24. saatte, kontrol-1 grubu kontrol-2 grubu ile kıyaslandığında RunX2 mRNA ekspresyonu kontrol 2’de istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulundu ($p<0.05$). Hem kontrol-1 hem de kontrol-2 grubuna göre diğer gruplarda RunX2 mRNA ekspresyonunun istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldığı tespit edildi ($p<0.01$) (Şekil 3.6). Tek kon, termoplastik gütta perka enjeksiyonu ve devamlı ısı ile obturasyon yöntemi grupları kendi aralarında kıyaslandığında azalmanın en çok tek kon grubunda, sonra da DIOT grubunda olduğu izlendi ($p<0.001$). Tek kon grubuna göre devamlı ısı ile obturasyon yöntemi anlamlı ($p<0.01$) ve termoplastik gütta perka enjeksiyonu grubuna göre devamlı ısı ile obturasyon yöntemi grubu yine anlamlı şekilde azaldığı izlendi ($p<0.001$) (Şekil 3.6).

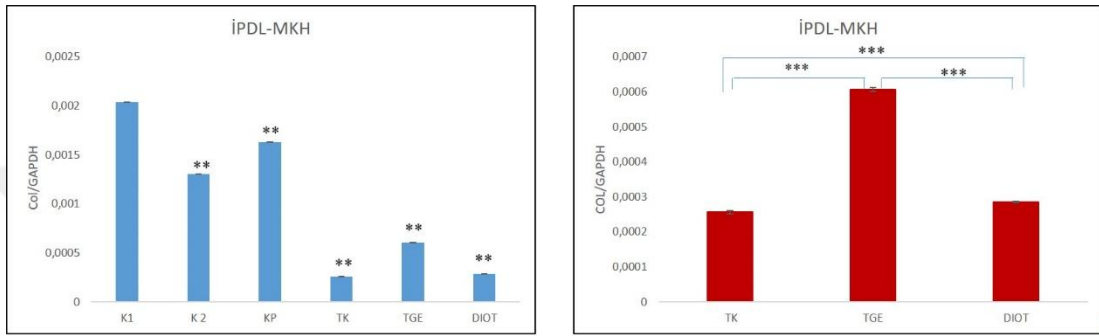


*p<0.05** p<0.01, ***p<0.001; K1: iPDL-MKH; K2: iPDL-MKH + Prepare edilmiş diş; KP: Kanal patı; TK: Tek Kon; TGE: Termoplastik Gütta-perka Enjeksiyonu; DIOT: Devamlı Isı ile Obturasyon Yöntemi

Şekil 3.6. Farklı kanal dolgu yöntemleri uygulandığınd iPDL-MKH RunX2 mRNA gen ekspresyon sonuçları

COL I mRNA Ekspresyonu

24. saatte, kontrol-1 grubu diğer gruplarla kıyaslandığında COL I mRNA ekspresyonunun bütün gruplarda istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldığı görüldü ($p<0.01$) (Şekil 3.7). Tek kon, termoplastik gütâ perka enjeksiyonu ve devamlı ısı ile obturasyon yöntemi grupları kendi aralarında kıyaslandığında en çok azalmanın tek kon grubunda, sonra da DIOT grubunda olduğu gözlemlendi ($p<0.001$). TK grubuna göre TGE ve DIOT grubu anlamlı ($p<0.001$) ve TGE grubuna göre DIOT grubu yine anlamlı şekilde azaldığı izlendi ($p<0.001$) (Şekil 3.7).

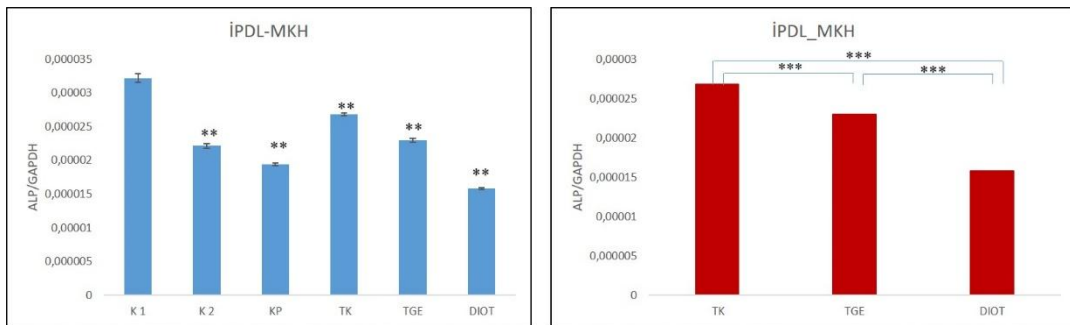


** p<0.01, ***p<0.001; K1: iPDL-MKH; K2: iPDL-MKH + Prepare edilmiş diş; KP: Kanal patı; TK: Tek Kon; TGE: Termoplastik Gütâ-perka Enjeksiyonu; DIOT: Devamlı Isı ile Obturasyon Yöntemi

Şekil 3.7. Farklı kanal dolgu yöntemleri uygulandığında iPDL-MKH COL I mRNA gen ekspresyon sonuçları

ALP mRNA Ekspresyonu

24. saatte, kontrol-1 grubu diğer gruplarla kıyaslandığında ALP mRNA ekspresyonunun bütün gruplarda istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldığı görüldü ($p<0.01$) (Şekil 3.8). Tek kon, termoplastik gütâ perka enjeksiyonu ve devamlı ısı ile obturasyon yöntemi grupları kendi aralarında kıyaslandığında en çok azalmanın DIOT grubunda, sonra da TGE grubunda olduğu gözlemlendi ($p<0.001$). TK grubuna göre TGE ve DIOT grubu anlamlı azalma ($p<0.001$) ve TGE grubuna göre de DIOT grubu yine anlamlı şekilde azaldığı izlendi ($p<0.001$) (Şekil 3.8).

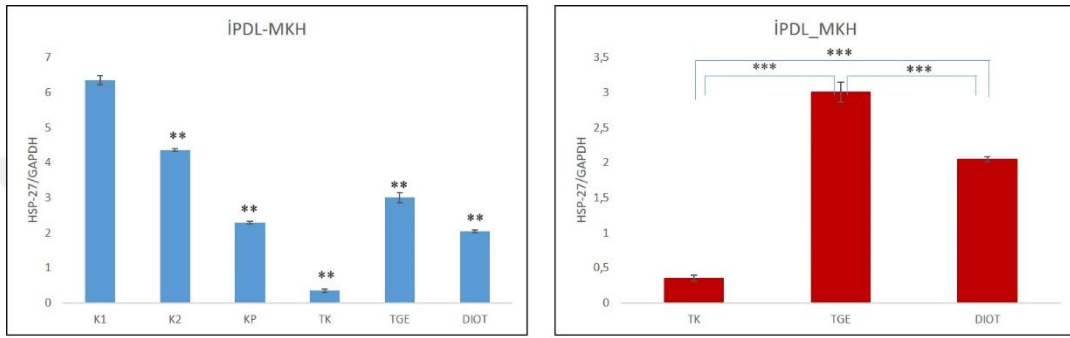


** p<0.01, ***p<0.001; K1: iPDL-MKH; K2: iPDL-MKH + Prepare edilmiş diş; KP: Kanal patı; TK: Tek Kon; TGE: Termoplastik Gütâ-perka Enjeksiyonu; DIOT: Devamlı Isı ile Obturasyon Yöntemi

Şekil 3.8. Farklı kanal dolgu yöntemleri uygulandığında iPDL-MKH ALP mRNA gen ekspresyon sonuçları

HSP-27 mRNA Ekspresyonu

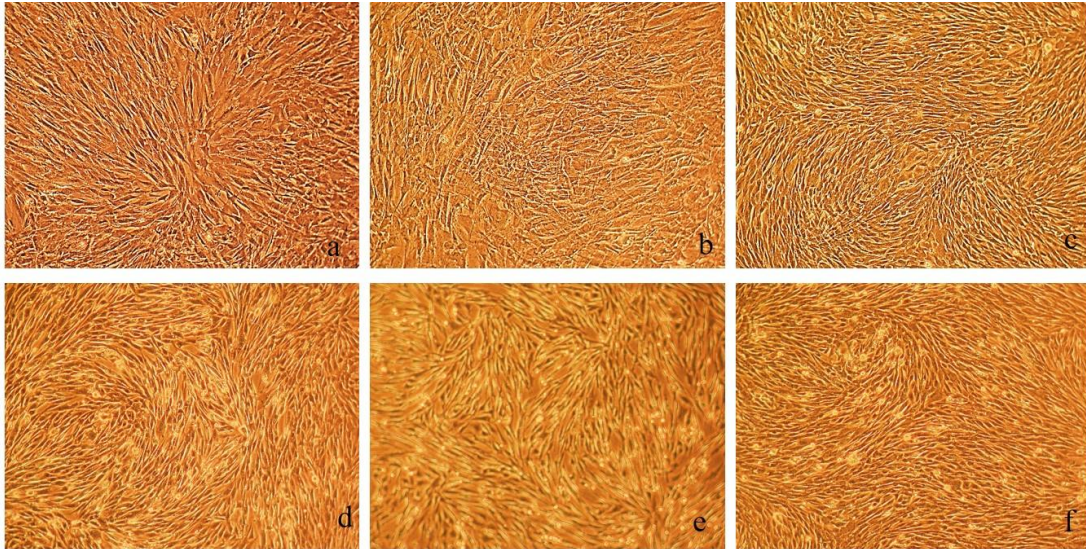
24. saatte, kontrol-1 grubu diğer gruplarla HSP-27 mRNA ekspresyonu kıyaslandığında istatistiksel olarak en çok azalma tek kon grubunda, diğer gruplarda da yine anlamlı şekilde azalma izlendi ($p<0.01$) (Şekil 3.9). TK, TGE ve DIOT grupları kendi aralarında kıyaslandığında azalmanın en çok TK grubunda, sonra da DIOT grubunda olduğu izlendi ($p<0.001$). TK grubuna göre DIOT grubu anlamlı ($p<0.001$) ve TGE grubuna göre DIOT grubunun yine anlamlı şekilde azaldığı izlendi ($p<0.001$) (Şekil 3.9).



** p<0.01, ***p<0.001; K1: İPDL-MKH; K2: İPDL-MKH + Prepare edilmiş diş; KP: Kanal patı; TK: Tek Kon; TGE: Termoplastik Götü-perka Enjeksiyonu; DIOT: Devamlı Isı ile Obtürasyon Yöntemi

Şekil 3.9.Farklı kanal dolgu yöntemleri uygulandığında İPDL-MKH HSP-27 mRNA gen ekspresyon sonuçları

3.2.2.OCCM.30 mRNA Ekspresyon Deneyleri

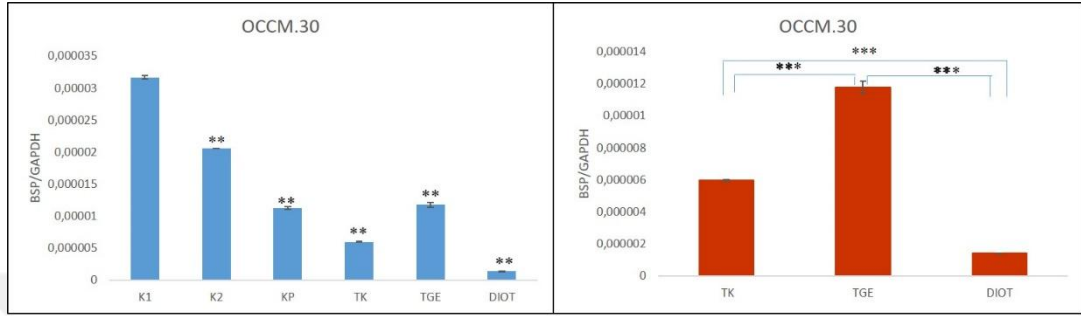


a: OCCM.30 (K1); b: OCCM.30+prepare edilmiş diş (K2); c: kanal patı (KP); d: tek kon (TK); e: termoplastik götü-perka enjeksiyonu (TGE); f: devamlı ısı ile obtürasyon yöntemi (DIOT)

Şekil 3.10. Farklı kanal dolgu yöntemleri uygulandığında OCCM.30 hücreleri inverted mikroskoptaki görüntüleri

BSP mRNA Ekspresyon Deneyleri

24. saatte, kontrol-1 grubu diğer gruplarla kıyaslandığında BSP mRNA ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı azalma görüldü ($p < 0.01$) (Şekil 3.11). TK, TGE ve DIOT grupları kendi aralarında kıyaslandığında azalmanın en çok DIOT, sonra da TK grubunda olduğu izlendi ($p < 0.001$). TK grubuna göre DIOT, TGE grubuna göre DIOT grubunun anlamlı şekilde azaldığı izlendi ($p < 0.001$) (Şekil 3.11).

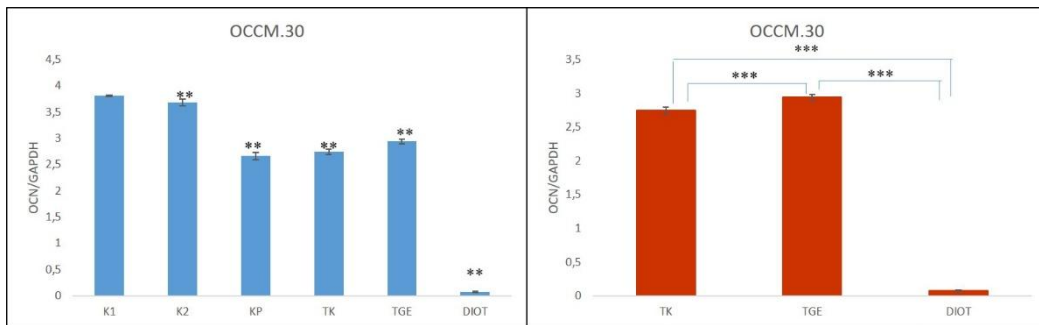


** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; K1: OCCM.30; K2: OCCM.30 + Prepare edilmiş diş; KP: Kanal patı; TK: Tek Kon; TGE: Termoplastik Gütta-perka Enjeksiyonu; DIOT: Devamlı Isı ile Obtürasyon Yöntemi

Şekil 3.11. Farklı kanal dolgu yöntemleri uygulandığında OCCM.30 BSP mRNA gen ekspresyon sonuçları

OCN mRNA Ekspresyonları

24. saatte, kontrol-1 grubu diğer gruplarla kıyaslandığında OCN mRNA ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı azalma görüldü ($p < 0.01$) (Şekil 3.12). TK, TGE ve DIOT grupları kendi aralarında kıyaslandığında azalmanın en çok DIOT grubunda olduğu izlendi ($p < 0.001$). TK grubuna göre DIOT, TGE grubuna göre DIOT grubunda yine anlamlı şekilde azalma izlendi ($p < 0.001$) (Şekil 3.12).

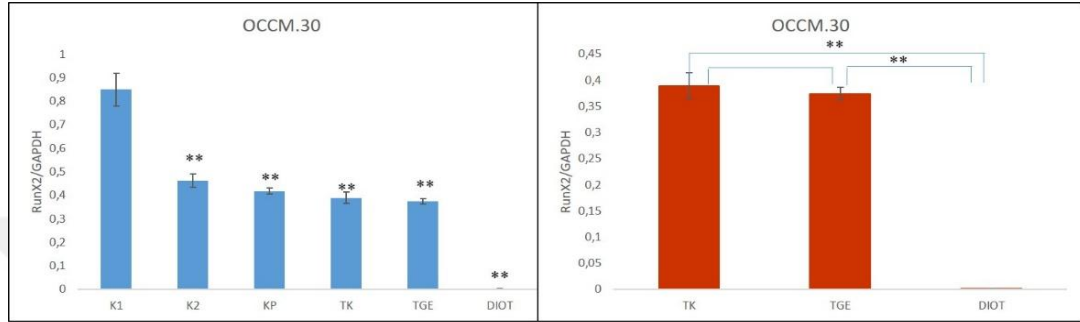


** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; K1: OCCM.30; K2: OCCM.30 + Prepare edilmiş diş; KP: Kanal patı; TK: Tek Kon; TGE: Termoplastik Gütta-perka Enjeksiyonu; DIOT: Devamlı Isı ile Obtürasyon Yöntemi

Şekil 3.12. Farklı kanal dolgu yöntemleri uygulandığında OCCM.30 OCN mRNA gen ekspresyon sonuçları

RunX2 mRNA Ekspresyonu

24. saatte, kontrol-1 grubu diğer gruplarla kıyaslandığında Runx2 mRNA ekspresyonunda bütün gruplarda istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalma gözlemlendi ($p<0.01$) (Şekil 3.13). TK, TGE ve DIOT grupları kendi aralarında kıyaslandığında azalmanın en çok DIOT grubunda olduğu izlendi ($p<0.01$). TK grubuna göre TGE anlamsız ($p>0.05$), TGE grubuna göre DIOT grubunda anlamlı şekilde azaldığı izlendi ($p<0.01$) (Şekil 3.13).

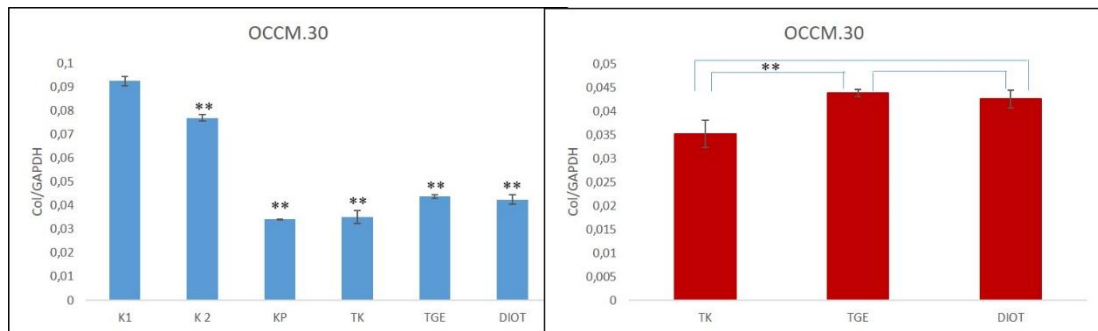


** p<0.01; K1: OCCM.30; K2: OCCM.30 + Prepare edilmiş diş; KP: Kanal patı; TK: Tek Kon; TGE: Termoplastik Gütta-perka Enjeksiyonu; DIOT: Devamlı Isı ile Obtürasyon Yöntemi

Şekil 3.13. Farklı kanal dolgu yöntemleri uygulandığında OCCM.30 RunX2 mRNA gen ekspresyon sonuçları

COL I mRNA Ekspresyonu

24. saatte, kontrol-1 grubu diğer gruplarla COL I mRNA gen ekspresyonu kıyaslandığında bütün gruplarda istatistiksel olarak anlamlı azalma izlendi ($p<0.01$) (Şekil 3.14). TK, TGE ve DIOT grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında, TK grubuna göre TGE anlamlı şekilde yüksek bulundu ($p<0.01$). TK'ya göre DIOT, TGE'ye göre DIOT grubu arasında anlamlı fark bulunmadı ($p>0.05$) (Şekil 3.14).

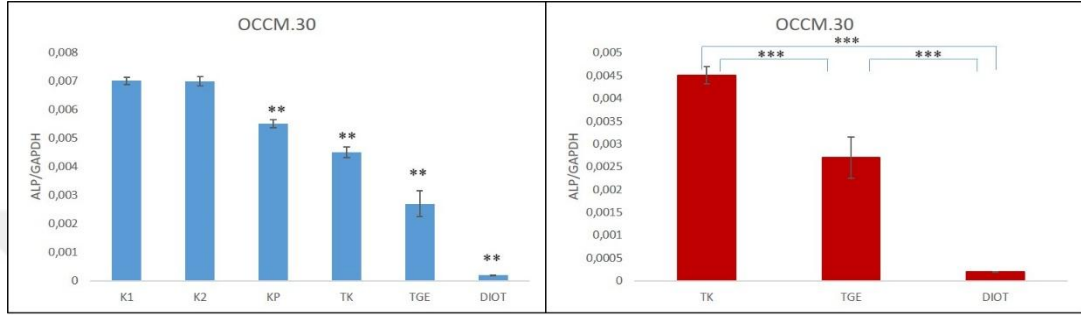


** p<0.01, *p<0.05; K1: OCCM.30; K2: OCCM.30 + Prepare edilmiş diş; KP: Kanal patı; TK: Tek Kon; TGE: Termoplastik Gütta-perka Enjeksiyonu; DIOT: Devamlı Isı ile Obtürasyon Yöntemi

Şekil 3.14. Farklı kanal dolgu yöntemleri uygulandığında OCCM.30 COL I mRNA gen ekspresyon sonuçları

ALP mRNA Ekspresyonları

24. saatte, kontrol-1 grubu kontrol-2 grubu ile kıyaslandığında ALP mRNA ekspresyonunda kontrol-2’de istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmazken ($p>0.05$), kontrol-1 ve kontrol-2 grubuna göre diğer gruplarda ALP mRNA ekspresyonunda anlamlı şekilde azalma tespit edildi ($p<0.01$) (Şekil 3.15). TK, TGE ve DIOT grupları kendi aralarında kıyaslandığında azalmanın en fazla DIOT grubunda, sonra da TGE grubunda olduğu izlendi ($p<0.001$) (Şekil 3.15).

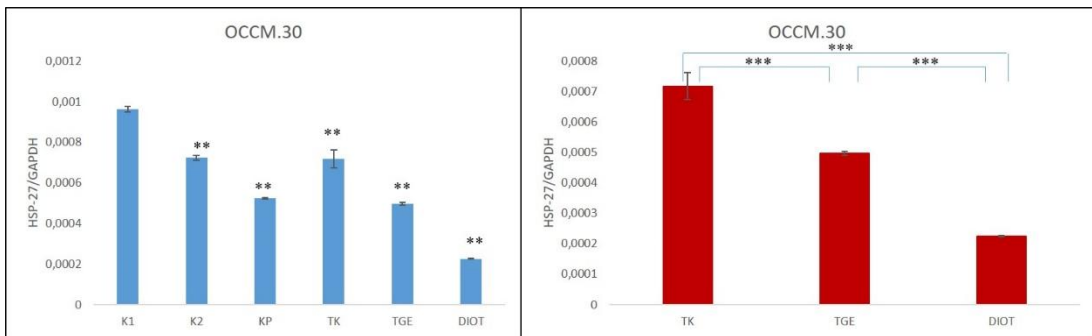


** $p<0.01$, *** $p<0.001$; K1: OCCM.30; K2: OCCM.30 + Prepare edilmiş diş; KP: Kanal patı; TK: Tek Kon; TGE: Termoplastik Gıta-perka Enjeksiyonu; DIOT: Devamlı Isı ile Obtürasyon Yöntemi

Şekil 3.15. Farklı kanal dolgu yöntemleri uygulandığında OCCM.30 ALP mRNA gen ekspresyon sonuçları

HSP-27 mRNA Ekspresyonları

24. saatte, kontrol-1 grubu diğer gruplarla kıyaslandığında HSP-27 mRNA gen ekspresyonu bütün gruplarda istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük bulundu ($p<0.01$) (Şekil 3.16). TK, TGE ve DIOT grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında azalmanın en çok DIOT grubunda olduğu izlendi ($p<0.001$). TK grubuna göre TGE, TGE grubuna DIOT grubunda anlamlı şekilde azalma izlendi ($p<0.001$) (Şekil 3.16).

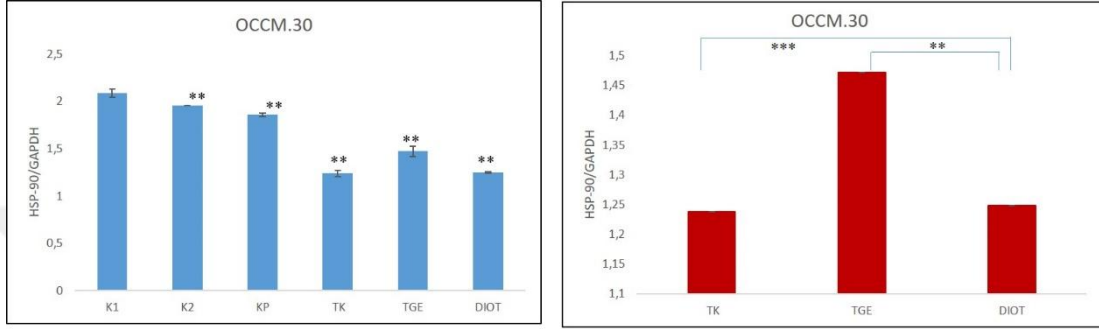


** $p<0.01$, *** $p<0.001$; K1: OCCM.30; K2: OCCM.30 + Prepare edilmiş diş; KP: Kanal patı; TK: Tek Kon; TGE: Termoplastik Gıta-perka Enjeksiyonu; DIOT: Devamlı Isı ile Obtürasyon Yöntemi

Şekil 3.16. Farklı kanal dolgu yöntemleri uygulandığında OCCM.30 HSP-27 mRNA gen ekspresyon sonuçları

HSP-90 mRNA Ekspresyonları

24. saatte, kontrol-1 grubu, diğer gruplarla kıyaslandığında HSP-90 mRNA ekspresyonu bütün gruplarda istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşüş izlendi ($p<0.01$) (Şekil 3.18). TK, TGE ve DIOT grupları kendi aralarında kıyaslandığında TGE anlamlı şekilde en yüksek izlendi ($p<0.001$). TGE'ye göre DIOT grubunda anlamlı şekilde azaldığı ($p<0.01$) ve TK'ya göre DIOT arasında anlamlı bir fark bulunmadığı gözlemlendi (Şekil 3.18).

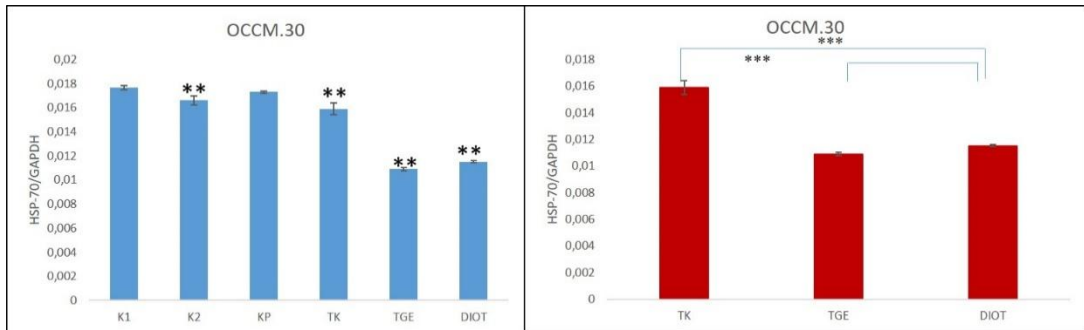


** p<0.01,***p<0.001; K1: OCCM.30; K2: OCCM.30 + Prepare edilmiş diş; KP: Kanal patı; TK: Tek Kon; TGE: Termoplastik Gütta-perka Enjeksiyonu; DIOT: Devamlı Isı ile Obtürasyon Yöntemi

Şekil 3.17.Farklı kanal dolgu yöntemleri uygulandığında OCCM.30 HSP-70 mRNA gen ekspresyon sonuçları

HSP-70 mRNA Ekspresyonları

24. saatte, kontrol-1 grubu, kanal patı grubu ile kıyaslandığında HSP-70 mRNA gen ekspresyonu kanal patı grubunda istatistiksel olarak anlamlı bulunmazken ($p>0.05$), kontrol-1 grubu, diğer gruplarla kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı düşüş tespit edildi ($p<0.01$) (Şekil 3.17). TK, TGE ve DIOT grupları kendi aralarında kıyaslandığında en çok azalmanın TGE grubunda olduğu ($p<0.001$), TGE'ye göre DIOT grubunda anlamlı bir fark bulunmadığı izlendi ($p>0.05$) (Şekil 3.17).



** p<0.01,***p<0.001; K1: OCCM.30; K2: OCCM.30 + Prepare edilmiş diş; KP: Kanal patı; TK: Tek Kon; TGE: Termoplastik Gütta-perka Enjeksiyonu; DIOT: Devamlı Isı ile Obtürasyon Yöntemi

Şekil 3.18.Farklı kanal dolgu yöntemleri uygulandığında OCCM.30 HSP-90 mRNA gen ekspresyon sonuçları

4. TARTIŞMA

Bir kök kanal tedavisinde başarısızlığın en önemli sebebinin, iyi yapılmamış kök kanal dolgusu sonucu oluşan sızıntı olduğu bildirilmiştir (Guigand ve ark 2005, Ingle ve ark 2008). Bu sebeple endodontik tedavide kök kanallarına iyi adaptasyon gösteren bir kök kanal materyali ile kök kanal sisteminin hermetik bir şekilde doldurulması en önemli aşamadır (Walton ve ark 1996, De Moor ve ark 2000). Bu amaçla güta perka gibi bir kor materyaline ilaveten kök kanal dolgu patları da kullanılmalıdır (Ørstavik 1988).

Kök kanallarının doldurulmasında en çok tercih edilen yöntem, lateral kondansasyon yöntemidir (Koçak ve ark 2009). Bu yöntemde ana kon yerleştirildikten sonra kalan boşluklara yardımcı konlar yerleştirilir ve bir spreader yardımı ile sıkıştırılarak üç boyutlu tıkama sağlanır. Güta perkanın daha kontrollü yerleştirildiği bu teknikte, pat ile kon arasında ve/veya konlar arasında boşluklar olması, lateral kanalların çoğunun doldurulamaması ve kanal patının dağılımının homojen olmaması bilinen dezavantajlardır (Brayton ve ark 1973, Er ve ark 2002).

Döner alet sistemlerinin endodonti alanında kullanımının yaygınlaşması, tek kon tekniğinin yaygın olarak kullanımını da gündeme getirmiştir. Son yıllarda klinisyenler tarafından daha çok tercih edilen bu çok daha hızlı ve kolay uygulanan (Hörsted-Bindslev ve ark 2007) yöntemde, kök kanal morfolojisinin kullanılacak olan ana konun şekli ile uyumlu olması gerekmektedir (Hülsmann ve ark 2007). Bu sebeple firmalar, döner aletlerin eğelerine uyumlu açılı güta perkaları pazarlamaya başlamıştır.

Açılı güta perkalar kullanılarak tek kon yöntemi ile doldurulan kanalların, lateral kondansasyonla doldurulanlarla benzer bir örtücülük sağladığını belirten çalışmalar mevcuttur (Mahera ve ark 2009, Yılmaz ve ark 2009). Ancak tek kon yönteminin oval şekilli ve geniş çaplara sahip kanallarda fazla preperasyon gerektirmesi bir dezavantajdır (Gordon ve ark 2005). Bu sebeple, yuvarlak kesitli kanallarda daha etkili bir kor görevi sergileyebilir. Bu çalışmada kontrol grubunda yaygın olarak kullanıldığı, hızlı ve kolay bir yöntem olduğu için tek kon tekniği tercih edildi.

Son yıllarda popüler olan yöntemlerden bir diğeri de devamlı ısı ile obturasyon yöntemidir. Bu yöntem, ısı ile güta perkanın akıcılığı artırılarak daha homojen bir kanal dolgusu elde etmek ve kanal duvarlarına daha iyi adapte olabilir özellik

kazanması amacıyla geliştirilmiştir (Er ve ark 2002). Uygulanan ısının dentinin tüm yüzeylerine eşit gelebilmesi için yuvarlak kök anatomisine sahip dişlerde çalışma gerekliliği ve kontrol olarak seçilen tek kon tekniğinin de yuvarlak kanallarda daha başarılı olması sebebi ile çalışmamızda tek ve düz kök formuna sahip premolar dişler tercih edildi. Çalışmanın standardizasyonu için, dişlerin kuronları mine sement bileşiminde kesildikten sonra, kanal formlarının yuvarlak olup olmadığı tekrar kontrol edildi. Ayrıca radyograflar ile de kök kanal anatomisinde bu çalışmanın yürütülmesine engel olabilecek olası farklılıkların mevcut olup olmadığı kontrol edildi.

Kök kanal preparasyonu sırasında apikal çapın ne kadar genişletilmesi gerektiği konusunda farklı görüşler bulunmaktadır. Kerekes ve Tronstad (1977), mandibular molarların yuvarlak forma sahip mesiobukkal kanallarının preparasyonunda kullanılacak en son eğenin ISO boyutlarına göre 40 veya 50 numaralar olabileceğini bildirmişlerdir (Kerekes ve ark 1977). Apikal preparasyonun kök kanal tedavisinin prognozu üzerine 2 çalışma bulunmaktadır ve sonuçlar birbirinden farklıdır. Strindberg, fazla apikal genişletmenin kötü prognoza neden olacağını bildirmiştir (Strindberg 1956). Bu çalışmada kullanılan tüm dişlerin kanalları, apikal çapları eşit olması için en son ProTaper Next X5 eğesi ile prepare edildi. Ancak pilot çalışmada, deney düzeneğinin kurulabilmesi ve dişlerin sabit bir şekilde hücrelere temas halinde durabilmesi için düz bir yüzey elde etmek gerekliliği ortaya çıktı. Bu sebeple apikal şekillendirme sonrasında dişlerin apikalleri 1 mm uzunluğunda kesildi. Böylece düz temas alanları oluşturuldu ve kökler hücrelere apikal bölgede tam temas edebilecek şekilde test düzeneğinde konumlandırılabilir. Ayrıca apikalin kesilmediği durumlarda ısıtılmış guta perka tekniklerinin hücreler üzerinde daha az etki göstermesi öngörüldüğünden de çalışma modeli bu şekilde optimize edildi. Klinik şartlarda apikalde bu çalışmada olduğu gibi geniş bir temas yüzeyi olmayacağı düşünülür ise, bu durum kliniği simüle etme açısından çalışmanın limitasyonlarından biri olarak sayılabilir. Ancak diğer yandan, bu çalışmada sadece apikal bölgede temas eden hücreler üzerinde inceleme yapılması planlandı. Devamlı ısı ile obtürasyon yönteminde ısının negatif etkilerinin tüm kök yüzeyi boyunca olabileceği ve başta periodontal ligament, sement ve kemik olmak üzere tüm dental ve periodontal dokuların daha fazla etkileneceği düşünülür ise, klinik şartlarda bu çalışmada gözlenen sonuçlardan daha dramatik bir etki oluşabileceği öngörülebilir.

Kanal patları zaman içerisinde kısmen çözünmeye uğradıkları ve bir miktar büzülme gösterdikleri için kanal dolgusunun boyutsal stabilitesi ile ilgili şüpheler vardır (Kazemi ve ark 1993, Kontakiotis ve ark 1997). Güta perka boyutsal stabiliteye sahip olduğu için, kök kanal dolgusunda güta perka kitlesinin hacim olarak en yüksek miktarda olması istenir (Wu ve ark 2000). De-Deus ve arkadaşlarının (De-Deus ve ark 2008) oval kanallarda yapmış oldukları çalışmada sıcak vertikal kompaksiyon tekniği sonucunda lateral kondansasyon yöntemine oranla daha fazla güta perka mevcut olduğunu bildirmişlerdir. Benzer şekilde Gencoğlu ve arkadaşları (Gencoglu ve ark 2008), üst kesici dişlerde kor materyali miktarına baktıkları çalışmada, vertikal kompaksiyon yöntemi ile doldurulan kanallarda kor materyalinin soğuk lateral kondansasyon yöntemine göre daha fazla olduğunu bildirmişlerdir. Alaçam ve arkadaşlarının (Alaçam ve ark 2005) yapay kök kanallarında yaptığı bir diğer çalışmada, soğuk lateral kondansasyon ile doldurulan kanallara oranla, devamlı ısı ile obtürasyon yöntemi ile doldurulmuş kanallarda daha fazla güta perka mevcut olduğu tespit edilmiştir.

Marciano ve arkadaşlarının mandibular 1. molar dişlerin mesial kanallarında yapmış oldukları bir çalışmada, 2 mm'de System B ile soğuk lateral kondansasyon tekniği arasında dolun kalitesi açısından fark olmadığı ancak isthmus varlığında soğuk lateral kondansasyon tekniğinde boşluklar gözlemlendiği bildirilmiştir (Marciano ve ark 2011). Bu çalışmada kök kanalı içerisine daha fazla kor materyali yerleştirmek amacı ile güta perkaların ısıtılarak uygulandığı ve son yıllarda yaygın olarak kullanılan iki farklı teknik incelendi. Ancak sonuçlar uygulanan ısının kor materyali açısından avantaj sağlamakla birlikte biyolojik dokularda olumsuz etkileri olabileceğini gösterdi.

Kök kanallarının şekillendirilme ve temizlenmesi işlemleri sırasında kanal duvarlarındaki mikrobiyal florayı, tüm nekrotik ve enfekte dokuları uzaklaştırmak için irrigasyon solüsyonları kullanılır (Peters 2004, Haapasalo ve ark 2005, Hülsmann ve ark 2007). Güncel bilgilere dayanarak; kök kanal preperasyonu esnasında, standart irrigasyon solüsyonu olarak sodyum hipoklorit (NaOCl) kullanılmaktadır (Hülsmann ve ark 2007). En uygun sodyum hipoklorit konsantrasyonu hakkında birçok farklı görüş bulunmakla birlikte %0,5-%5,25 arasındaki konsantrasyonlar önerilmektedir (Walton ve ark 1996, Hülsmann ve ark 2007). Chang ve arkadaşlarının yaptığı bir araştırmaya göre NaOCl, konsantrasyon

ve zamana bağlı bir Şekilde insan PDL hücresine sitotoksiktir (Chang ve ark 2001). Spangberg ve ark. %0,5'lik NaOCl'ün, Hegger ve ark ise %0,025'lik NaOCl'ün nonsitotoksik etki gösterdiğini belirtmişlerdir (Spangberg ve ark 1973, Heggers ve ark 1991). Bu çalışmada, preperasyon esnasında her eğe arasında 2 ml %2,5'lik NaOCl kullanıldı. Dentin duvarlarında kalan NaOCl'ün deney düzeneğindeki hücreleri etkilememesi için her bir diş 6 ml distile su ile irrigate edildikten sonra sterilizasyon uygulanana kadar distile su içinde bekletildi.

Kanal patları uzun süre periapikal dokularla temas halinde olduklarından sahip olmaları gereken en önemli özelliklerden biri biyoyumluluktur. Kullanılan tüm materyaller potansiyel olarak toksik bileŐenlere sahip olabilir ve iyileŐme sürecine olumsuz etki edebilir, geciktirebilir veya alerjik reaksiyonlara neden olabilirler (Quinlan ve ark 2002). Çinko oksit, epoksi rezin, kalsiyum hidroksit, cam iyonomer ve son zamanlarda da silikon esaslı olmak üzere günümüze kadar birçok kök kanal dolgu patı üretilmiştir. Literatürde silikon bazlı kök kanal dolgu materyallerinin biyolojik testleri ile ilgili az sayıda çalışma bulunmaktadır (Briseño ve ark 1991, Öztan ve ark 2003). Epoksi rezin esaslı AH Plus kanal patının biyoyumluluğunu değerlendirmek için daha fazla çalışma yapılmıştır (Cohen ve ark 1998, Osorio ve ark 1998, Leyhausen ve ark 1999, Telli ve ark 1999).

Miletic ve arkadaşları, RoekoSeal ve AH Plus'ın farklı zaman dilimlerinde karşılaŐtırmalı sitotoksitesilerine bakmışlardır (Miletić ve ark 2005). Bu çalışmaya göre; AH Plus, hücre hatlarında hem karıŐtırmadan hemen sonra, hem de 24 ve 48 saatlik karıŐtırma sürelerinden sonra güçlü bir sitotoksik etki göstermiştir. Üretici firmaya göre AH Plus, AH 26'nın geliştirilmiş bir formülüdür ve sitotoksiteden sorumlu olan formaldehit salmaz (Spångberg ve ark 1993, Economides ve ark 1995, Koulaouzidou ve ark 1998). Bununla birlikte, AH Plus bileŐiminde bulunan ve polimerizasyonu hızlandıran aminler güçlü baŐlangıç toksitesinden sorumlu olabilir (Zmener ve ark 1997).

Leonardo ve arkadaşları köpekler üzerinde yaptıkları çalışmada epoksi rezin esaslı kanal patlarına karşı oluşan doku cevabını izlemişlerdir (Leonardo ve ark 1999). Bu çalışmada bir grup AH Plus diğer grup Fill Canal kanal patı kullanılarak lateral kondansasyon yöntemi ile doldurulmuŐtur. 90 gün sonra histolojik incelemeleri yapılmıştır. AH Plus ile doldurulan örneklerin dört tanesinin apikalinde mineralize doku gözlenmiştir. Bu olgularda içerisindeki sementositleri ve periferde

çok sayıda sementoblastları içeren sementoid tipte yeni bir mineralize doku oluştuğu gözlenmiştir. Ancak periapikal dokuda enflamatuvar hücre ve nekroz alanları gözlenmemiştir. Bu nedenle, AH Plus'ın biyouyumluluk ve doku toleransının, onu bir kök kanal dolgu maddesi olarak kullanılmak üzere ümit verici bir malzeme haline getirdiği sonucuna varılmıştır.

Bu çalışmada kök kanal patı olarak AH Plus kullanıldı ve ısının olası negatif etkilerini ayırt edebilmek amacı ile sadece kanal patının kullanıldığı bir kontrol grubu oluşturuldu. MTT hücre canlılık deney sonuçlarına bakıldığında kontrol-1 grubu ile kıyaslandığında sementoblastlarda KP (AH Plus) grubunun hem 24 hem de 96. saatlerde hücre canlılığını anlamlı şekilde azalttığı izlendi. Benzer oranlarda azalmanın iPDL-MKH'de de olduğu gözlemlendi (Şekil 3.1 ve Şekil 3.2). HSP-27, HSP-70, HSP-90, BSP, OCN, COL I, Runx2, ALP mRNA ekspresyon düzeylerine bakıldığında ise yine sadece AH PLUS kullanılan örneklerde aynı şekilde bir düşüş gözlemlendi (Şekil 3.4- Şekil 3.18) Bu sonuç, AH Plus'ın hücre canlılığını azaltmakla birlikte, toksisite seviyesine ulaşmadığını göstermiştir.

Sıcak dolun tekniklerinde, kanal boşluğunda ortaya çıkan ısının dentin ve sement boyunca periodontal dokulara ve alveolar kemiğe iletilebileceği ve yüksek derecede ısı transferinde dokularda hasar olabileceği bildirilmiştir (Barkhordar ve ark 1990, Castelli ve ark 1991, Jurcak ve ark 1992, Weller ve ark 1995). Normal vücut ısısının 10°C üzerindeki bir sıcaklık artışının periodontal dokularda geri dönüşümsüz hasara yol açtığı rapor edilmiştir (Atrizadeh ve ark 1971, Kennedy ve ark 1973, Eriksson ve ark 1982, Eriksson ve ark 1983, Saunders 1990, Lee ve ark 1998).

Diş kök dokuları zayıf termal iletkenler olsa da (Hardie 1987, Weller ve ark 1995), ısıtılmış gutta-perka ile kanalın doldurulması kök dış yüzey sıcaklığının yükselmesinden sorumlu olabilir (Anicé ve ark 1995, Lee ve ark 1998, Lipski 2004, 2005). Bu da tedavinin başarısında, apikal dokularda önemli rol oynayan hücrelerin fonksiyonlarının ve hücre/ekstrasellüler matriks orkestrasyonunun olumsuz yönde etkilenmesine sebep olabilir.

Eriksson ve Albrektsson, tavşanlarda ısı kaynaklı kemik dokusu hasarı için sıcaklık eşik seviyeleri üzerinde vitalmikroskopik bir çalışma yürütmüş ve bu çalışmada kemik dokusunun, 1 dakika boyunca 47 °C'ye ısıtılmasının kemik yeniden şekillenmesine ve yağ hücresi nekrozuna neden olduğunu bulmuşlardır. Kemiğin 50°C sıcaklığa 1 dakika veya 47°C sıcaklığa 5 dakika maruziyeti sonrasında kemik

dokusunda hasar oluştuğunu ve yağ hücreslerinin kemik dokuyu rezorbe ederek yerini aldığını bildirmişlerdir (Eriksson ve ark 1983).

Gutmann ve arkadaşlarının (1987) melez köpekler üzerinde yaptıkları çalışmada kanal içine yüksek sıcaklıkta (Obtura, 160°C) enjekte ettikleri güta perkadan sonra belirgin bir periodontal hasar görülmemiştir. Belirtilen çalışmada termoplastik güta perka ile doldurulan köklerle temas halindeki kemiğin dış yüzeyindeki sıcaklık değişimleri kaydedilmiş ve 60 saniyede en fazla 1.1°C olarak bulunmuştur (Gutmann ve ark 1987).

Bir başka *in vivo* çalışmada Molywdas ve arkadaşları iki beagle köpeğinde aynı sistemle kanalları doldurup periodontal reaksiyonları değerlendirmişlerdir. 160°C'ye ısıtılan güta perka ile kanal dolumu enflamatuar reaksiyona ve apikal foramen etrafındaki kollajen liflerinin tahrip olmasına neden olmuştur. Alveolar kemik, dişlerin kökleri ve kök yüzeylerinin etrafındaki periodontal ligament normal kalmıştır. Yalıtım işlemi sırasında periodontal ligament veya köklerin üzerinde bulunan kemik üzerinde herhangi bir sıcaklık ölçümü yapılmamıştır (Molyvdas ve ark 1989).

Romero ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada, oda sıcaklığı 37°C olacak şekilde ayarlanmış ve maksiller kanin ve mandibular molarların mezial köklerine 200°C'ye ısıtılmış System B pluggerı 10 sn temas ettirilmiştir. Apekten 5 mm uzaklıkta yapılan ölçümde maksiller kaninlerde 1.75°C'yi ve mandibular dişlerin mezial köklerinde 2°C'yi aşmadığı gözlenmiştir (Romero ve ark 2000).

Al-Shimari ve arkadaşlarının yaptığı, farklı termoplastik güta perka dolum tekniklerinin kök yüzeyinde oluşturduğu ısı değişimlerinin dijital termometre ile ölçüldüğu çalışmada, hiçbir teknikte kök yüzeyindeki sıcaklık kritik seviyeyi geçmemiştir (Al-Shimari ve ark 2014). Bunun en önemli sebebi olarak dentinin zayıf iletken olması ve bu iletkenliğinin dentin kalınlığına göre değişmesidir (Dollard ve ark 1983). Aynı zamanda ısıtılmış güta perkanın kanal duvarı ile temas ettiğinde sıcaklıkta ani bir düşüş gözlenmiştir (Al-Shimari ve ark 2014). Araştırcılar bu sıcaklık düşüşünün, dentin tübüllerinde mevcut olan akışkan ve periodontal ligamentte bulunan sirkülasyon nedeniyle *in vivo* şartlarda daha belirgin olabileceğini belirtmişlerdir. Bu çalışmada çekilmiş insan dişlerinde preparasyon yapıldığı ve steril edildiği için dentin tübüllerinde sıvı kalmayabileceği ve dentin yapısı kuruduğu takdirde ısıyı daha fazla iletmiş olması, kullanılan kanal dolgu

yöntemlerinde izlenen olumsuz etkilerin klinik koşulları her zaman yansıtmayabileceği de göz ardı edilmemelidir.

Barkhordar ve arkadaşları (1990) ve Hardie (1987) kanal patı kullanımının yüzey sıcaklığını yaklaşık 1-2°C düşürdüğünü bildirmişlerdir (Hardie 1987, Barkhordar ve ark 1990). Kanal patı tabakası, dentin duvarında bir yalıtkan olarak hareket edebileceği ve çevre dokuların korunmasına yardımcı olabileceği düşünülmektedir. Uzun ve arkadaşlarının devamlı ısı ile obtürasyon tekniğinde kullanılan kanal patlarının kök yüzeyinde oluşan ısı değişimlerine etkisi üzerine yaptıkları çalışmada, 37°C sıcaklıktaki su banyosu içindeki köklere 200°C'ye ayarlanmış System B cihazının pluggerı yerleştirilmiş ve 10 sn sürecince aktive edilmiştir. Yapılan ölçümler sonucunda en yüksek ortalama sıcaklık 38.779°C ve en düşük ortalama sıcaklık 38.370°C olduğu gözlenmiştir (Uzun ve ark 2011). Araştırmacılar bu ısı ve uygulama sürecini üretici firma önerileri doğrultusunda tercih etmiştir.

Bu çalışmada sıcak kanal dolum tekniklerinden DIOT ve TGE kullanıldı. Ağız ortamını simüle etmek amacıyla 37°C su banyosu kullanan Uzun ve Aladağ'ın aksine bu çalışmada laboratuvar ısısının 20°C olduğu varsayıldı. Araştırmacıların *in vivo* şartlarda 10 saniyede ulaştığı sıcaklığa, pilot çalışmada 90 saniyede ulaşmak mümkün olabildi. Bu sebeple çalışmamızda pluggerın üretici firmanın önerisi olan 200°C'ye kadar ısıtılması tercih edildi ancak uygulama süresi 90 saniye olarak belirlendi. Sonuç olarak her iki tekniğin de iPDL-MKH ve OCCM.30 hücrelerinin hem hücre canlılığı üzerine hem de mineralize doku ilişkili genlerin mRNA ekspresyonu üzerine olumsuz etkileri olduğu gözlemlendi.

Hücre kültür tetkik çalışmaları, sitotoksisite değerlendirilmesinde etkinliği kabul edilmiş, biyokimyasal esaslı ve sık kullanılan bir başlangıç metotudur (Hanks ve ark 1996, Bouillaguet ve ark 2006). MTT, canlı hücrelerde mitokondriyal dehidrojenaz enzimlerinin, sarı suda çözünen tetrazolyum tuzunu koyu mavi formazan kristallerine dönüştürmeye dayanan bir kolorimetrik testtir (Kim ve ark 2006, Gomes-Filho ve ark 2009, Khedmat ve ark 2014) Üretilen formazan miktarı, canlı hücre sayısı ile doğru orantılıdır (Lee ve ark 2003, Kim ve ark 2006, Khedmat ve ark 2014). Bu yöntem dental materyallerin sitotoksisitesini değerlendirmek üzere en güvenilir indekslerden biri olarak kabul edilir (Mosmann 1983, Zhang ve ark 2003). Basit, hızlı ve tekrarlanabilir bir yöntem olması sebebi ile sıklıkla tercih

edilen bu yöntemde farklı metodolojiler veya hücre dizileri sonuçları etkileyebilir, bu da farklı kaynaklardan gelen verilerin karşılaştırılmasında problemler yaratabilir (Zhang ve ark 2003). Bu sebeple MTT analizi hücre canlılığının değerlendirilmesi için tek başına yeterli olmayabilir ve başka yöntemler ile desteklenmesi gerekir (Hakki ve ark 2014, Hakki ve ark 2015). Bu çalışmada ilk aşamada kök kanal dolgu materyalinin, güta perkanın, her ikisinin kombine kullanımının ve ilaveten ısının hücreler üzerine etkisini incelemek üzere öncelikle MTT analizi yapıldı. Sonuçlar, tüm test koşullarının hücreler üzerinde olumsuz etkisi olduğunu gösterdi.

Biyouyumluluk çalışmalarında hücre canlılığının değerlendirilmesinin yanı sıra, hücrelerin fonksiyonlarını idame edip etmediğinin de tespit edilebilmesi için, hücrelerde mRNA düzeyinde mineralize doku ilişkili genler (COL I, OCN, BSP, Runx2, ALP) çalışılmaktadır. Tip I kollajen bağ dokusunun en önemli yapısıdır ve doku bütünlüğünün korunması için ekstrasellüler matriksteki önemli bir proteindir. BSP ve OCN, kemik dokudaki ekstrasellüler matrikste nükleasyon oluşturarak dokuyu mineralizasyona doğru götüren önemli belirteçlerdir. ALP, organik fosfatı, inorganik fosfata çeviren önemli bir enzimdir. Runx2 ise kemik oluşumun gözlenmesinde kritik bir transkripsiyon faktörüdür (Hakki ve ark 2012, Hakki ve ark 2013). Mineralize doku belirteçleri, mineralizasyon ile ilişkilidir ve sement formasyonu, idamesi ve onarımı esnasında eksprese olması gereken belirteçlerdir (Hakki ve ark 2006).

BSP, kemik, dentin, sement ve yeni oluşmuş kemik gibi mineralize olmuş dokular tarafından eksprese edilen non-kollajen bir proteindir (D'errico ve ark 1997, Hakki ve ark 2006, Hakki ve ark 2009, Choi ve ark 2013). Bu çalışmada iPDL-MKH'inde BSP mRNA ekspresyonuna bakıldığında, en fazla düşüş kök kanal dolgu patı grubunda gözlendi (Şekil 3.2). Tek kon tekniği ile TGE grubu arasında anlamlı bir fark gözlenmezken ($p>0.05$), DIOT grubunda BSP ekspresyonu tek kon grubuna göre anlamlı derecede az bulundu ($p<0.001$). Buna göre bu çalışmada kullanılan kök kanal dolgu patınının iPDL-MKH üzerinde olumsuz etkisi, ısının etkisinden daha anlamlıdır. Bu sonuç, daha az sitotoksik bir kök kanal dolgu patı, BSP ekspresyonu açısından bu çalışmada kullanılan her iki ısı tekniği ile güvenle kullanılabilir algısı yaratmakla birlikte, OCCM.30 hücrelerinde BSP ekspresyonlarına bakıldığında en fazla düşüşün DIOT grubunda olması (Şekil 3.12), ısıtılmış güta perka tekniklerinin

yine de hücrelerin canlılığı açısından güvenilirliğinin şüpheli olduğunu göstermektedir.

Kemiğe özgü osteoblastik bir protein olan OCN, kemik matriks sentezi ve mineralizasyonundan sorumludur ve tip I kollajenden sonra kemik ekstrasellüler matriksinde en fazla miktarda bulunan proteindir (Çakmak 2015). Spesifik osteoblastik bir marker olan ostekalsinin biyolojik fonksiyonu kesin olarak bilinmemekle birlikte kemik formasyonu sırasında oluştuğunu gösteren pek çok çalışma mevcuttur (Glowacki ve ark 1987, Kandemir 1991). Bu çalışmada iPDL-MKH'inde OCN ekspresyonları en fazla TGE'de, sonrasında sırasıyla DIOT, tek kon ve kanal patı gruplarında gözlenmiştir (Şekil 3.5). OCCM.30 hücrelerinde ise en fazla düşüş DIOT'ta gözlenmiştir (Şekil 3.13). Bu sonuç HS proteinleri sonuçları ile de desteklenmektedir. Bu sonuca göre ısının OCN ekspresyonunda anlamlı bir etkisi olduğu söylenebilir.

Osteoblastik farklılaşmada çok önemli bir transkripsiyon faktörü olan Runx2, sement onarımı ve rejenerasyonunda veya sementojenezde kritik bir rol oynar (D'errico ve ark 1997, D'errico ve ark 2000). Çalışmamızda Runx2 ekspresyonu iPDL-MKH grubunda en fazla tek kon yönteminde düşüş olduğunu gösterirken (Şekil 3.7), OCCM.30 hücrelerinde DIOT grubunda anlamlı derecede bir düşüş izlendi (Şekil 3.14). TK ve TGE grupları birbiri ile benzer bulunurken, DIOT grubunun her iki gruptan anlamlı derecede farklılık göstermesi, OCCM.30 hücreleri üzerine etkisinin artan ısı derecesi ile ilgili olabileceğini göstermektedir.

Aslında kemiğe özgü bir protein olmamasına rağmen Col I bu çalışmada kök hücrelerin osteoblastik farklılaşmasının erken belirteçlerinden biri olduğu (Kirkham ve ark 2007) için kullanıldı. Col I sonuçlarına göre iPDL-MKH üzerinde en olumsuz etki TK grubunda ve sonrasında DIOT grubunda gözlendi (Şekil 3.8). KP grubunda olumsuz bir etki gözlenmemesi, bu sonucun ısıdan bağımsız güta perka ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Diğer yandan OCCM.30 üzerindeki etkileri incelendiğinde en fazla etkilenen grubun KP grubu olarak gözlenmesi (Şekil 3.15), sementoblastlar üzerinde kanal dolgu patının toksisitesinin, ısıdan daha fazla olduğunu göstermektedir.

ALP, fosfat iyonu derişiminin ayarlanmasından sorumlu bir enzim olup osteoblastlar tarafından üretilir (Çetin ve ark 2011). ALP ekspresyonu kemik dokusu rejenerasyonu ve matriksin mineralizasyonu ile ilgili enzim aktivitesini gösterir (Xie

ve ark 2012). Erken dönem osteoblastik farklılaşmanın belirlenmesinde sıklıkla ALP aktivitesi analizi kullanılmaktadır (Çetin ve ark 2011). Çalışmamızdaki ALP mRNA ekspresyonu sonuçlarına baktığımızda en fazla düşüşün her iki hücre grubunda da DIOT uygulaması ile olduğu gözlemlendi (Şekil 3.9, Şekil 3.16).

Hücrelerin yüksek ısıya maruz kalmasıyla üretimi artan bir protein grubu olan HSP, ısı haricinde enfeksiyon, inflamasyon, açlık, hipoksi, arsenik, nitrojenizlik, dehidratasyon gibi başka faktörler ile de artabilir (Morimoto ve ark 1998, Petrof ve ark 2004, Aufrecht 2005). Bu çalışmanın asıl amacı kanal dolumu sırasında güta perkaya uygulanan ısının iPDL-MKH ve OCCM.30 hücreleri üzerine etkisini incelemek olduğundan, ısı şok proteinlerinin değerlendirilmesi uygun görüldü. Isı, osteoblastlarda HSP27, HSP70 ve HSP90'ın ekspresyonunu regüle etmektedir (Nover 1991).

Diş yaralanmasından sonra pulpa iyileşmesi sırasında odontoblastların farklılaşmasını incelemek için yararlı bir belirteç olduğunu düşünülen HSP-25 (fare) (Tate ve ark 2006) ve HSP-27 (insan) yapısal ve fonksiyonel olarak küçük HSP ailesindedir (Baykal ve ark 2000, Öztürk ve ark 2009). HSP27'nin osteoblastların farklılaşması ve apoptosisi arasındaki dengeyi düzenlediği bildirilmiştir (Leonardi ve ark 2004). Hücre kültürü ortamında insan kemik iliği hücrelerine uygulanan düşük ısı (39 °C) uygulamasının HSP-70 ekspresyonunu artırdığı bildirilmiştir (Miyasaka ve ark 2015). Isı veya düşük yoğunluklu atış yapan ultrason stimülasyonu gibi mekanik streslerin, düşük moleküler ağırlıklı HSP27 ve HSP40'ı indüklediği, bunun yerine moleküler bir şaperon gibi davranan ya da tehlikeli koşullara maruz kalan hücreleri koruyan yüksek moleküler ağırlıklı HSP90'ı aktive ettiği bildirilmiştir (Miyasaka ve ark 2015) (Miyasaka ve ark 2015). Bu çalışmada ısının, her iki hücre hattında da HSP mRNA ekspresyonunu azalttığı gözlemlendi. Bu çalışmada RNA izolasyonu 24. saatte yapılmıştır. Isı şok proteinlerinin ekspresyonlarının daha kısa dönemde incelenmesinin de faydalı olabileceği düşünülmektedir.

Sıcak güta perka teknikleri, kök kanal içerisinde daha fazla kor yapısı oluşturabilmek üzere geliştirilmiş ve yaygın kullanılan yöntemlerdir. Ancak bu çalışmada, bu tekniklerin uygulanması sırasında açığa çıkan ısının iPDL-MKH'ler ve OCCM.30 üzerinde olumsuz etkiler yaratabileceği bulunmuştur. PDL hücrelerin kaynağı insan olmakla birlikte OCCM.30 hücrelerinin farelerden elde edilmiş olması bu çalışmanın bir diğer limitasyonudur. Sementoblastların insanlardan elde edilmesi,

embriyonik dönemde elde edilme gerekliliği nedeni ile pratikte kullanılmamaktadır. Bu sebeple bu çalışmada mevcut iPDL-MKH hücreleri kullanılırken, farelerden elde edilmiş sementoblast hücreleri kullanılmıştır.

Sonuçlar, sıcak güta perka dolum tekniklerine daha tedbirli yaklaşılması gerektiği yönündedir. Hücre kültür ortamlarının, klinik koşulları bire bir canlandırılmadığı bilinmekle birlikte, bu çalışma ısının olumsuz etkilerinin gösterilmesinde faydalı olmuştur. Biyoreaktörlerde ağız dokularının 3 boyutlu, daha iyi simüle edilebildiği, kısa dönem ve uzun dönem etkilerin çalışıldığı ilave çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır. Ancak yöntem, farklı kanal dolgu yöntemlerinin hücresel düzeyde test edilmesinde başarılı bir model olarak ilk defa bu in vitro modelde kullanılabilmiştir. Bu sebeple bu çalışma bundan sonraki çalışmalarda model oluşturulmasında rehber olma niteliği taşımaktadır.

Çalışmada kemik dokusunu temsilen kemik hücreleri veya kemik iliği MKH'leri de test edilebilirdi. Ancak kanal dolgu materyalleri ile en yakın komşulukta olan dokuların hücrelerinin kullanılmasına karar verildi. Hem kullanılan yöntemlerin çeşitlendirildiği hem de farklı hücre hatlarının da denendiği ilave çalışmalara halen ihtiyaç bulunmaktadır. Ayrıca bu kanal dolgu yöntemlerinin hücrelerde enflamatuvar cevabı da tetiklediği bilindiğinden, pro-enflamatuvar (IL-1 β , IL-6, IL8, IL-17, TNF- α) ve anti-enflamatuvar (IL-4, IL-10) sitokinlerin, ekstrasellüler matriksin yıkımı ve matriks yıkımının inhibisyonundan sorumlu olan enzimlerin, ayrıca oksidatif stres enzimlerinin araştırılmasının da klinik endodontik pratikte yönlendirici bilgileri sağlayabileceğine inanılmaktadır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sıcak güta perka dolun tekniklerinden devamlı ısı ile obturasyon ve termoplastik güta perka enjeksiyonu tekniklerinin iPDL-MKH ve OCCM.30 hücrelerine etkisinin incelendiği bu çalışmanın sonuçları aşağıdaki gibidir:

1. Bu çalışmada kullanılan devamlı ısı ile obturasyon tekniği ve termoplastik güta perka enjeksiyonu tekniklerinin hem iPDL-MKH, hem de OCCM.30 hücrelerinin canlılığını olumsuz etkilediği izlendi
2. Hücre canlılığı üzerine olan olumsuz etkinin her iki hücre hattında da DIOT uygulanan grupta daha fazla olduğu tespit edildi. Hücre canlılığını azaltıcı etkisinin değerlendirilen her iki zaman (24 ve 96. saatler) diliminde de belirgin olduğu gözlemlendi.
3. iPDL-MKH'de sıcak uygulamasından bağımsız tüm kanal dolgu tekniklerinde BSP, OCN ve ALP mRNA ekspresyonlarını azaldığı, ancak bu azalmanın en fazla sıcaklık uygulamalarının yapıldığı gruplarda olduğu belirlendi. Runx2 ve COL I mRNA ekspresyonlarında sıcak uygulamalarından bağımsız bir düşüş izlendi.
4. iPDL-MKH'de sıcaklık artışının olmadığı gruplarda da HSP-27 mRNA ekspresyonunda düşüş izlendi.
5. OCCM.30 hücrelerinde tüm kanal dolgu tekniklerinin BSP, OCN Runx2 ve ALP mRNA ekspresyonunu azalttığı, bu azalmanın en fazla DIOT grubunda olduğu, COL I mRNA ekspresyonundaki azalmanın sıcaklık artışından ilave etkilenmediği tespit edildi.
6. OCCM.30 hücrelerinde HSP-27 mRNA ekspresyonundaki azalmanın en fazla DIOT grubunda olduğu izlenirken, HSP-70 mRNA ekspresyonunun ısı uygulamalarından ilave olumsuz etkilenmediği, HSP-90'da ise her iki ısı uygulamasının da belirgin azalmaya sebep olduğu tespit edildi.
7. DIOT ve TGE kendi aralarında değerlendirildiğinde DIOT uygulamasının biyolojik dokulara daha fazla olumsuz etki yaptığı speküle edilebilir.

8. Bu çalışmanın sonuçları sıcak güta perka dolum tekniklerine daha tedbirli yaklaşılması gerektiğini düşündürmektedir.
9. *In vitro* çalışmalar, klinik koşulları bire bir sağlayamadığı için, ağız ortamının daha iyi simüle edilebildiği, kısa dönem ve uzun dönem etkilerin çalışıldığı ilave çalışmaları yapılmasının klinik uygulamalara önemli katkılar sağlayacağına inanılmaktadır.



6. KAYNAKLAR

- Al-Shimari SAT, Al-Nuaimi NE, 2014. Elevation in surface temperature of root canals obturated with different thermoplasticized gutta-percha obturation techniques-an in vitro study. *Journal of baghdad college of dentistry*, 26, 1, 67-70.
- Alaçam T, Topuz Ö, Genç Ö, 2005. Yapay Kök Kanallarında Soğuk Lateral Kompaksiyon ve Farklılaştırılmış Devamlı Isıyla Dolgu Yöntemiyle Yapılan Gutta Perka Dolguların Ağırlık Olarak Değerlendirilmesi. *Gazi Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi*, 22, 2, 105-9.
- Alaçam TE, Uzel Đ, Alaçam A, Aydın ME, 2000. Ankara. Barış yayınları, 11-152.
- Allison DA, Michelich RJ, Walton RE, 1981. The influence of master cone adaptation on the quality of the apical seal. *Journal of endodontics*, 7, 2, 61-5.
- Anicé I, Matsumoto K, 1995. Dentinal heat transmission induced by a laser-softened gutta-percha obturation technique. *Journal of endodontics*, 21, 9, 470-4.
- Atalayın Ç, Ergücü Z, Tezel H, 2012. Diş hekimliğinde kök hücre ve dental pulpa kök hücreleri. *Gazi Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi*, 29, 2, 115-20.
- Ataoglu T, Gürsel M, 1996. *Periodontoloji*, Tamer Ataoglu, p.
- Atrizadeh F, Kennedy J, Zander H, 1971. Ankylosis of teeth following thermal injury. *Journal of periodontal research*, 6, 3, 159-67.
- Aufricht C, 2005. Heat-shock protein 70: molecular supertool? *Pediatric Nephrology*, 20, 6, 707-13.
- Avery J, 2002. *Histology of the periodontium: alveolar bone, cementum, and periodontal ligament. Oral Development and Histology*, 3rd ed. New York, NY: Thieme, 226-42.
- Bal AS, Hicks ML, Barnett F, 2001. Comparison of laterally condensed. 06 and. 02 tapered Gutta-Percha and sealer in vitro. *Journal of Endodontics*, 27, 12, 786-8.
- Barkhardar RA, Goodis HE, Watanabe L, Koumdjian J, 1990. Evaluation of temperature rise on the outer surface of teeth during root canal obturation techniques. *Quintessence international*, 21, 7.
- Baykal Y, Gök F, Kocabalkan F, 2000. Isı şok proteinleri ve hastalıklardaki rolü. *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, 20, 3, 187-95.
- Behnia A, McDonald N, 2001. In vitro infrared thermographic assessment of root surface temperatures generated by the thermafil plus system. *Journal of endodontics*, 27, 3, 203-5.
- Bergenholtz G, Reit C, 2013. *Textbook of endodontology*, John Wiley & Sons, p.
- Bosshardt D, 2005. Are cementoblasts a subpopulation of osteoblasts or a unique phenotype? *Journal of dental research*, 84, 5, 390-406.
- Bouillaguet S, Wataha JC, Tay FR, Brackett MG, Lockwood PE, 2006. Initial in vitro biological response to contemporary endodontic sealers. *Journal of Endodontics*, 32, 10, 989-92.
- Bowman CJ, Baumgartner JC, 2002. Gutta-percha obturation of lateral grooves and depressions. *Journal of Endodontics*, 28, 3, 220-3.
- Brayton SM, Davis SR, Goldman M, 1973. Gutta-percha root canal fillings: An in vitro analysis. Part I. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*, 35, 2, 226-31.
- Briseño BM, Willershausen B, 1991. Root canal sealer cytotoxicity on human gingival fibroblasts: II. silicone-and resin-based sealers. *Journal of endodontics*, 17, 11, 537-40.
- Buchanan L, 1998. Continuous wave of condensation technique. *Endodontic practice*, 1, 4, 7-10, 3-6, 8 passim.
- Bukau B, Weissman J, Horwich A, 2006. Molecular chaperones and protein quality control. *Cell*, 125, 3, 443-51.
- Byers MR, 1985. Sensory innervation of periodontal ligament of rat molars consists of unencapsulated Ruffini-like mechanoreceptors and free nerve endings. *Journal of Comparative Neurology*, 231, 4, 500-18.
- Castelli WA, Caffesse RG, Pameijer CH, Diaz-Perez R, Farquhar J, 1991. Periodontium response to a root canal condensing device (Endotec). *Oral surgery, oral medicine, oral pathology*, 71, 3, 333-7.
- Chang Y-C, Huang F-M, Tai K-W, Chou M-Y, 2001. The effect of sodium hypochlorite and chlorhexidine on cultured human periodontal ligament cells. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 92, 4, 446-50.
- CHO MI, Garant PR, 2000. Development and general structure of the periodontium. *Periodontology* 2000, 24, 1, 9-27.
- Chohayeb AA, 1992. Comparison of conventional root canal obturation techniques with Thermafil obturators. *Journal of endodontics*, 18, 1, 10-2.
- Choi YJ, Lee JY, Chung CP, Park YJ, 2013. Enhanced osteogenesis by collagen-binding peptide from bone sialoprotein in vitro and in vivo. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 101, 2, 547-54.

- Christians ES, Yan L-J, Benjamin IJ, 2002. Heat shock factor 1 and heat shock proteins: critical partners in protection against acute cell injury. *Critical care medicine*, 30, 1, S43-S50.
- Cohen S, Burns RC, Walton R, Torabeniad M, 1998. Pathways of the Pulp (1). Learning, 30, 10.
- Coura G, Garcez R, De Aguiar CM, Alvarez-Silva M, Magini R, Trentin A, 2008. Human periodontal ligament: a niche of neural crest stem cells. *Journal of periodontal research*, 43, 5, 531-6.
- Çakmak S, 2015. Kemik Doku Onarımı İçin Hidroksiapatit Peptit Amfil Bazlı Nanokompozit Doku İskelelerinin Geliştirilmesi.
- Çalışkan MK, 2006. Endodontide tanı ve tedaviler, Nobel Tıp Kitabevleri, p.
- Çetin D, Kahraman AS, Gümüşderelioğlu M, 2011. Novel scaffolds based on poly (2-hydroxyethyl methacrylate) superporous hydrogels for bone tissue engineering. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 22, 9, 1157-78.
- D'errico J, MacNeil R, Takata T, Berry J, Strayhorn C, Somerman M, 1997. Expression of bone associated markers by tooth root lining cells, in situ and in vitro. *Bone*, 20, 2, 117-26.
- D'errico JA, Berry JE, Ouyang H, Strayhorn CL, Windle JJ, Somerman MJ, 2000. Employing a transgenic animal model to obtain cementoblasts in vitro. *Journal of periodontology*, 71, 1, 63-72.
- De-Deus G, Reis C, Beznos D, de Abranches AMG, Coutinho-Filho T, Paciornik S, 2008. Limited ability of three commonly used thermoplasticized gutta-percha techniques in filling oval-shaped canals. *Journal of Endodontics*, 34, 11, 1401-5.
- De Moor R, De Boever J, 2000. The sealing ability of an epoxy resin root canal sealer used with five gutta-percha obturation techniques. *Dental Traumatology*, 16, 6, 291-7.
- Diemer F, Sinan A, Calas P, 2006. Penetration depth of warm vertical gutta-percha pluggers: impact of apical preparation. *Journal of endodontics*, 32, 2, 123-6.
- Dollard W, Sabala C, Pelleu G. Root-Canal Temperature During Obturation With The Mcspadden Compactor Technique. *Journal of Dental Research*, 216-.
- Economides N, Kotsaki-Kovatsi V-P, Pouloupoulos A, Kolokuris I, Rozos G, Shore R, 1995. Experimental study of the biocompatibility of four root canal sealers and their influence on the zinc and calcium content of several tissues. *Journal of endodontics*, 21, 3, 122-7.
- Eguchi DS, Peters DD, Hollinger JO, Lorton L, 1985. A comparison of the area of the canal space occupied by gutta-percha following four gutta-percha obturation techniques using Procosol sealer. *Journal of Endodontics*, 11, 4, 166-75.
- Ellis RJ, Van der Vies SM, 1991. Molecular chaperones. *Annual review of biochemistry*, 60, 1, 321-47.
- Er DK, Akpınar KE, 2002. Devamlı ısıyla obturasyon ve lateral kondensasyon yöntemleri ile doldurulan kök kanallarındaki gutta percha miktarının karşılaştırılması.
- Eriksson A, Albrektsson T, 1983. Temperature threshold levels for heat-induced bone tissue injury: a vital-microscopic study in the rabbit. *Journal of prosthetic dentistry*, 50, 1, 101-7.
- Eriksson A, Albrektsson T, Grane B, McQueen D, 1982. Thermal injury to bone: a vital-microscopic description of heat effects. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 11, 2, 115-21.
- Fortier LA, 2005. Stem cells: classifications, controversies, and clinical applications. *Veterinary Surgery*, 34, 5, 415-23.
- Garrido C, Gurbuxani S, Ravagnan L, Kroemer G, 2001. Heat shock proteins: endogenous modulators of apoptotic cell death. *Biochemical and biophysical research communications*, 286, 3, 433-42.
- Gencoglu N, Yildirim T, Garip Y, Karagenc B, Yilmaz H, 2008. Effectiveness of different gutta-percha techniques when filling experimental internal resorptive cavities. *International endodontic journal*, 41, 10, 836-42.
- Giannopoulou C, Cimasoni G, 1996. Functional characteristics of gingival and periodontal ligament fibroblasts. *Journal of dental research*, 75, 3, 895-902.
- Glickman GN, Gutmann J, 1992. Contemporary perspectives on canal obturation. *Dental Clinics of North America*, 36, 2, 327-41.
- Glowacki J, Lian JB, 1987. Impaired recruitment and differentiation of osteoclast progenitors by osteocalcin-deplete bone implants. *Cell differentiation*, 21, 4, 247-54.
- Gomes-Filho JE, Watanabe S, Gomes AC, Faria MD, Lodi CS, Oliveira SHP, 2009. Evaluation of the effects of endodontic materials on fibroblast viability and cytokine production. *Journal of endodontics*, 35, 11, 1577-9.
- Goodman A, Schilder H, Aldrich W, 1974. The thermomechanical properties of gutta-percha: II. The history and molecular chemistry of gutta-percha. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*, 37, 6, 954-61.
- Gordon M, Love R, Chandler N, 2005. An evaluation of .06 tapered gutta-percha cones for filling of .06 taper prepared curved root canals. *International endodontic journal*, 38, 2, 87-96.

- Gronthos S, Mankani M, Brahim J, Robey P, Shi S, 2003. Post natal human dental pulp stem cells (DPSCs). *PNAS USA*, 79, 13625-30.
- Gronthos S, Mrozik K, Shi S, Bartold P, 2006. Ovine periodontal ligament stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential. *Calcified tissue international*, 79, 5, 310-7.
- Grossman LLI, Oliet S, Del Rio CE, 1988. *Endodontic practice*, Lea & Febiger, p.
- Guigand M, Glez D, Sibayan E, Cathelineau G, Vulcain J-M, 2005. Comparative study of two canal obturation techniques by image analysis and EDS microanalysis. *British dental journal*, 198, 11, 707.
- Gutmann JL, Rakusin H, Powe R, Bowles WH, 1987. Evaluation of heat transfer during root canal obturation with thermoplasticized gutta-percha. Part II. In vivo response to heat levels generated. *Journal of endodontics*, 13, 9, 441-8.
- Haapasalo M, Endal U, Zandi H, Coil JM, 2005. Eradication of endodontic infection by instrumentation and irrigation solutions. *Endodontic topics*, 10, 1, 77-102.
- Hakki S, Bozkurt B, Ozcopur B, Gandolfi M, Prati C, Belli S, 2013. The response of cementoblasts to calcium phosphate resin-based and calcium silicate-based commercial sealers. *International endodontic journal*, 46, 3, 242-52.
- Hakki S, Bozkurt S, Ozcopur B, Purali N, Belli S, 2012. Periodontal ligament fibroblast response to root perforations restored with different materials—a laboratory study. *International endodontic journal*, 45, 3, 240-8.
- Hakki SS, Bozkurt B, Hakki EE, Kayis SA, Turac G, Yilmaz I, Karaoz E, 2014. Bone morphogenetic protein-2,-6, and-7 differently regulate osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 102, 1, 119-30.
- Hakki SS, Bozkurt SB, Hakki EE, Belli S, 2009. Effects of mineral trioxide aggregate on cell survival, gene expression associated with mineralized tissues, and biomineralization of cementoblasts. *Journal of Endodontics*, 35, 4, 513-9.
- Hakki SS, Bozkurt SB, Türkay E, Dard M, Purali N, Götz W, 2018. Recombinant amelogenin regulates the bioactivity of mouse cementoblasts in vitro. *International journal of oral science*, 10, 2, 15.
- Hakki SS, Kayis SA, Hakki EE, Bozkurt SB, Duruksu G, Unal ZS, Turaç G, Karaoz E, 2015. Comparison of mesenchymal stem cells isolated from pulp and periodontal ligament. *Journal of periodontology*, 86, 2, 283-91.
- Hakki SS, Wang D, Franceschi RT, Somerman MJ, 2006. Bone sialoprotein gene transfer to periodontal ligament cells may not be sufficient to promote mineralization in vitro or in vivo. *Journal of periodontology*, 77, 2, 167-73.
- Hanks CT, Wataha JC, Sun Z, 1996. In vitro models of biocompatibility: a review. *Dental Materials*, 12, 3, 186-93.
- Hardie EM, 1987. Further studies on heat generation during obturation techniques involving thermally softened gutta-percha. *International endodontic journal*, 20, 3, 122-7.
- Heggens J, Sazy J, Stenberg B, Strock L, McCauley R, Herndon D, Robson M, 1991. Bactericidal and wound-healing properties of sodium hypochlorite solutions: the 1991 Lindberg Award. *The Journal of burn care & rehabilitation*, 12, 5, 420-4.
- Hoffman RL, 1966. Bone formation and resorption around developing teeth transplanted into the femur. *American Journal of Anatomy*, 118, 1, 91-102.
- Hørsted-Bindslev P, Söholm B, 1976. Overfølsomhed over for rodfyldningsmaterialet AH26. (Allergic reaction to the root canal sealer AH26). *Tandlaegebladet*, 80, 194-7.
- Hørsted-Bindslev P, Andersen MA, Jensen MF, Nilsson JH, Wenzel A, 2007. Quality of molar root canal fillings performed with the lateral compaction and the single-cone technique. *Journal of endodontics*, 33, 4, 468-71.
- Huang FM, Tai KW, Chou MY, Chang YC, 2002. Cytotoxicity of resin-, zinc oxide-eugenol-, and calcium hydroxide-based root canal sealers on human periodontal ligament cells and permanent V79 cells. *International Endodontic Journal*, 35, 2, 153-8.
- Hülsmann M, Schäfer E 2007. *Probleme in der Endodontie. Prävention, Identifikation und Management*. Berlin: Quintessenz.
- Ingle JI, Baumgartner JC, 2008. *Ingle's endodontics*, PMPH-USA, p.
- Isaka J, Ohazama A, Kobayashi M, Nagashima C, Takiguchi T, Kawasaki H, Tachikawa T, Hasegawa K, 2001. Participation of periodontal ligament cells with regeneration of alveolar bone. *Journal of periodontology*, 72, 3, 314-23.

- Jäättelä M, 1999. Escaping cell death: survival proteins in cancer. *Experimental cell research*, 248, 1, 30-43.
- Jacobsen E, BeGole E, 1992. A comparison of four root canal obturation methods employing gutta-percha: a computerized analysis of the internal structure. *Dental Traumatology*, 8, 5, 206-12.
- Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, 2002. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*, 418, 6893, 41.
- Johnson BT, Bond MS, 1999. Leakage associated with single or multiple increment backfill with the Obtura II gutta-percha system. *Journal of endodontics*, 25, 9, 613-4.
- Jung I-Y, Lee S-B, Kim E-S, Lee C-Y, Lee S-J, 2003. Effect of different temperatures and penetration depths of a System B plugger in the filling of artificially created oval canals. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 96, 4, 453-7.
- Jurcak JJ, Weller RN, Kulild JC, Donley DL, 1992. In vitro intracanal temperatures produced during warm lateral condensation of gutta-percha. *Journal of endodontics*, 18, 1, 1-3.
- Kandemir N, 1991. Osteokalsin, Kemik Metabolizması İçin Yeni Bir İndeks. *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, 11, 3, 194-6.
- Karr NA, Baumgartner JC, Marshall JG, 2007. A comparison of gutta-percha and Resilon in the obturation of lateral grooves and depressions. *Journal of Endodontics*, 33, 6, 749-52.
- Kazemi RB, Safavi KE, Spångberg LS, 1993. Dimensional changes of endodontic sealers. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology*, 76, 6, 766-71.
- Kennedy JE, Polson AM, 1973. Experimental marginal periodontitis in squirrel monkeys. *Journal of Periodontology*, 44, 3, 140-4.
- Kerekes K, Tronstad L, 1977. Morphometric observations on the root canals of human molars. *Journal of endodontics*, 3, 3, 114-8.
- Khedmat S, Dehghan S, Hadjati J, Masoumi F, Nekoofar MH, Dummer PMH, 2014. In vitro cytotoxicity of four calcium silicate-based endodontic cements on human monocytes, a colorimetric MTT assay. *Restorative dentistry & endodontics*, 39, 3, 149-54.
- Kim H-J, Baek S-H, Bae K-S, 2006. Cytotoxicity and genotoxicity of newly developed calcium phosphate-based root canal sealers. *Journal of Korean Academy of Conservative Dentistry*, 31, 1, 36-49.
- Kirkham G, Cartmell S, 2007. Genes and proteins involved in the regulation of osteogenesis. Ashammakhi N, Reis R, Chiellini E, editores. *Topics in Tissue Engineering*, 3.
- Koçak MM, Yaman SD, 2009. Comparison of apical and coronal sealing in canals having tapered cones prepared with a rotary NiTi system and stainless steel instruments. *Journal of oral science*, 51, 1, 103-7.
- Kontakiotis E, Wu MK, Wesselink P, 1997. Effect of sealer thickness on long-term sealing ability: a 2-year follow-up study. *International Endodontic Journal*, 30, 5, 307-12.
- Koulaouzidou E, Papazisis K, Beltes P, Geromicholos G, Kortsarls A, 1998. Cytotoxicity of three resin-based root canal sealers: an in vitro evaluation. *Dental Traumatology*, 14, 4, 182-5.
- Lee FS, Van Cura JE, BeGole E, 1998. A comparison of root surface temperatures using different obturation heat sources. *Journal of endodontics*, 24, 9, 617-20.
- Lee J-H, Baek S-H, Bae K-S, 2003. Evaluation of the cytotoxicity of calcium phosphate root canal sealers. *Journal of Korean Academy of Conservative Dentistry*, 28, 4, 295-302.
- Leonardi R, Barbato E, Paganelli C, Muzio LL, 2004. Immunolocalization of heat shock protein 27 in developing jaw bones and tooth germs of human fetuses. *Calcified tissue international*, 75, 6, 509-16.
- Leonardo M, Da Silva L, Almeida W, Utrilla L, 1999. Tissue response to an epoxy resin-based root canal sealer. *Dental Traumatology*, 15, 1, 28-32.
- Leonardo MR, da Silva LAB, Tanomaru Filho M, da Silva RS, 1999. Release of formaldehyde by 4 endodontic sealers. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 88, 2, 221-5.
- Leyhausen G, Heil J, Reifferscheid G, Waldmann P, Geurtsen W, 1999. Genotoxicity and cytotoxicity of the epoxy resin-based root canal sealer AH plus. *Journal of endodontics*, 25, 2, 109-13.
- Lipski M, 2004. Root surface temperature rises in vitro during root canal obturation with thermoplasticized gutta-percha on a carrier or by injection. *Journal of endodontics*, 30, 6, 441-3.
- Lipski M, 2005. Root surface temperature rises during root canal obturation, in vitro, by the continuous wave of condensation technique using System B HeatSource. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 99, 4, 505-10.

- MacNeil RL, Somerman MJ, 1999. Development and regeneration of the periodontium: parallels and contrasts. *Periodontology* 2000, 19, 1, 8-20.
- Mahera F, Economides N, Gogos C, Beltes P, 2009. Fluid-transport evaluation of lateral condensation, ProTaper gutta-percha and warm vertical condensation obturation techniques. *Australian Endodontic Journal*, 35, 3, 169-73.
- Marciano J, Michalesco PM, 1989. Dental gutta-percha: chemical composition, X-ray identification, enthalpic studies, and clinical implications. *Journal of endodontics*, 15, 4, 149-53.
- Marciano M, Ordinola-Zapata R, Cunha T, Duarte M, Cavenago B, Garcia R, Bramante C, Bernardineli N, Moraes I, 2011. Analysis of four gutta-percha techniques used to fill mesial root canals of mandibular molars. *International endodontic journal*, 44, 4, 321-9.
- Maria O, Khosravi R, Mezey E, Tran S, 2007. Cells from bone marrow that evolve into oral tissues and their clinical applications. *Oral diseases*, 13, 1, 11-6.
- Marlin J, 1986. Injectable standard gutta-percha as a method of filling the root canal system. *Journal of endodontics*, 12, 8, 354-8.
- Mayer M, Bukau B, 2005. Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cellular and molecular life sciences*, 62, 6, 670.
- Mc Cullagh J, Setchell D, Gulabivala K, Hussey D, Biagioni P, Lamey PJ, Bailey G, 2000. A comparison of thermocouple and infrared thermographic analysis of temperature rise on the root surface during the continuous wave of condensation technique. *International Endodontic Journal*, 33, 4, 326-32.
- McCulloch C, 1985. Progenitor cell populations in the periodontal ligament of mice. *The Anatomical Record*, 211, 3, 258-62.
- McCulloch C, 1993. Basic considerations in periodontal wound healing to achieve regeneration. *Periodontology* 2000, 1, 1, 16-25.
- McCulloch C, Nemeth E, Lowenberg B, Melcher A, 1987. Paravascular cells in endosteal spaces of alveolar bone contribute to periodontal ligament cell populations. *The Anatomical record*, 219, 3, 233-42.
- Melcher A, Cheong T, Cox J, Nemeth E, Shiga A, 1986. Synthesis of cementum-like tissue in vitro by cells cultured from bone: a light and electron microscope study. *Journal of periodontal research*, 21, 6, 592-612.
- Miletić I, Devčić N, Anić I, Borčić J, Karlović Z, Osmak M, 2005. The cytotoxicity of RoekoSeal and AH plus compared during different setting periods. *Journal of Endodontics*, 31, 4, 307-9.
- Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, Shi S, 2003. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100, 10, 5807-12.
- Miyasaka M, Nakata H, Hao J, Kim Y-K, Kasugai S, Kuroda S, 2015. Low-intensity pulsed ultrasound stimulation enhances heat-shock protein 90 and mineralized nodule formation in mouse calvaria-derived osteoblasts. *Tissue Engineering Part A*, 21, 23-24, 2829-39.
- Molyvdas I, Zervas P, Lambrianidis T, Veis A, 1989. Periodontal tissue reactions following root canal obturation with an injection-thermoplasticized gutta-percha technique. *Dental Traumatology*, 5, 1, 32-7.
- Monticelli F, Sword J, Martin R, Schuster G, Weller R, Ferrari M, Pashley DH, Tay F, 2007. Sealing properties of two contemporary single-cone obturation systems. *International endodontic journal*, 40, 5, 374-85.
- Morimoto RI, Santoro MG, 1998. Stress-inducible responses and heat shock proteins: new pharmacologic targets for cytoprotection. *Nature biotechnology*, 16, 9, 833.
- Morszeck C, Götz W, Schierholz J, Zeilhofer F, Kühn U, Möhl C, Sippel C, Hoffmann K, 2005. Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth. *Matrix Biology*, 24, 2, 155-65.
- Moseley PL, 1998. Heat shock proteins and the inflammatory response. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 856, 1, 206-13.
- Mosmann T, 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, 65, 1-2, 55-63.
- Murrell E, Yen E, Johnson R, 1996. Vascular changes in the periodontal ligament after removal of orthodontic forces. *American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics*, 110, 3, 280-6.
- Murrell W, Féron F, Wetzig A, Cameron N, Splatt K, Bellette B, Bianco J, Perry C, Lee G, Mackay-Sim A, 2005. Multipotent stem cells from adult olfactory mucosa. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*, 233, 2, 496-515.

- Nakakura-Ohshima K, Watanabe J-i, Kenmotsu S-i, Ohshima H, 2003. Possible role of immunocompetent cells and the expression of heat shock protein-25 in the process of pulpal regeneration after tooth injury in rat molars. *Microscopy*, 52, 6, 581-91.
- Nanci A, 2017. *Ten Cate's Oral Histology-E-Book: Development, Structure, and Function*, Elsevier Health Sciences, p.
- Neckers L, Ivy SP, 2003. Heat shock protein 90. *Current opinion in oncology*, 15, 6, 419-24.
- Newman MG, Takei H, Klokkevold PR, Carranza FA, 2011. *Carranza's clinical periodontology*, Elsevier health sciences, p.
- Niemann C, Watt FM, 2002. Designer skin: lineage commitment in postnatal epidermis. *Trends in cell biology*, 12, 4, 185-92.
- Nover L, 1991. HSFs and HSPs--a stressful program on transcription factors and chaperones. *Stress Proteins and the Heat Shock Response*, sponsored by Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY USA, April 29-May 2, 1991. *The New Biologist*, 3, 9, 855.
- Ohshima H, AJIMA H, KAWANO Y, Nozawa-Inoue K, Wakisaka S, Maeda T, 2000. Transient expression of heat shock protein (Hsp) 25 in the dental pulp and enamel organ during odontogenesis in the rat incisor. *Archives of histology and cytology*, 63, 4, 381-95.
- Ohshima H, Nakakura-Ohshima K, Maeda T, 2002. Expression of heat-shock protein 25 immunoreactivity in the dental pulp and enamel organ during odontogenesis in the rat molar. *Connective tissue research*, 43, 2-3, 220-3.
- Ohshima H, Nakakura-Ohshima K, Yamamoto H, Maeda T, 2001. Responses of odontoblasts to cavity preparation in rat molars as demonstrated by immunocytochemistry for heat shock protein (Hsp) 25. *Archives of histology and cytology*, 64, 5, 493-501.
- Ohshima H, Nakakura-Ohshima K, Takeuchi K, Hoshino M, Takano Y, Maeda T, 2003. Pulpal regeneration after cavity preparation, with special reference to close spatio-relationships between odontoblasts and immunocompetent cells. *Microscopy research and technique*, 60, 5, 483-90.
- Ørstavik D, 1988. Endodontic materials. *Advances in dental research*, 2, 1, 12-24.
- Osorio RM, Hefti A, Vertucci FJ, Shawley AL, 1998. Cytotoxicity of endodontic materials. *Journal of Endodontics*, 24, 2, 91-6.
- Otaka M, Odashima M, Watanabe S, 2006. Role of heat shock proteins (molecular chaperones) in intestinal mucosal protection. *Biochemical and biophysical research communications*, 348, 1, 1-5.
- Özel HB, OZAN E, DABAK DÖ, 2008. Embriyonik kök hücreler. *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, 28, 3, 333-41.
- Öztan MD, Yılmaz Ş, Kalayci A, Zaimoğlu L, 2003. A comparison of the in vitro cytotoxicity of two root canal sealers. *Journal of oral rehabilitation*, 30, 4, 426-9.
- Öztürk E, Kahveci N, Özlük K, Yılmazlar T, 2009. Isı şok proteinleri. *Turkish Journal of Surgery/Ulusal Cerrahi Dergisi*, 25, 4.
- Park JC, Kim JM, Jung IH, Kim JC, Choi SH, Cho KS, Kim CS, 2011. Isolation and characterization of human periodontal ligament (PDL) stem cells (PDLSCs) from the inflamed PDL tissue: in vitro and in vivo evaluations. *Journal of clinical periodontology*, 38, 8, 721-31.
- Peters OA, 2004. Current challenges and concepts in the preparation of root canal systems: a review. *Journal of endodontics*, 30, 8, 559-67.
- Petrof EO, Ciancio MJ, Chang EB, 2004. Role and regulation of intestinal epithelial heat shock proteins in health and disease. *Chinese Journal of Digestive Diseases*, 5, 2, 45-50.
- Phipps R, Borrello M, Blieden T, 1997. Fibroblast heterogeneity in the periodontium and other tissues. *Journal of periodontal research*, 32, 1, 159-65.
- Pockley AG, De Faire U, Kiessling R, Lemne C, Thulin T, Frostegård J, 2002. Circulating heat shock protein and heat shock protein antibody levels in established hypertension. *Journal of hypertension*, 20, 9, 1815-20.
- Pommel L, Camps J, 2001. In vitro apical leakage of system B compared with other filling techniques. *Journal of Endodontics*, 27, 7, 449-51.
- Quinlan C, Zisterer D, Tipton K, O'sullivan M, 2002. In vitro cytotoxicity of a composite resin and compomer. *International endodontic journal*, 35, 1, 47-55.
- Rao MS, 2004. Stem sense: a proposal for the classification of stem cells. *Stem cells and development*, 13, 5, 452-5.
- Regan J, Gutmann J, 2004. Harty's endodontics in clinical practice.
- Regan J, Gutmann J, Witherspoon D, 2002. Abstract. *International endodontic journal*, 35, 10, 840-7.
- Romero AD, Green DB, Wucherpfennig AL, 2000. Heat transfer to the periodontal ligament during root obturation procedures using an in vitro model. *Journal of endodontics*, 26, 2, 85-7.

- Sarge KD, Murphy SP, Morimoto RI, 1993. Activation of heat shock gene transcription by heat shock factor 1 involves oligomerization, acquisition of DNA-binding activity, and nuclear localization and can occur in the absence of stress. *Molecular and cellular biology*, 13, 3, 1392-407.
- Saunders E, 1990. In vivo findings associated with heat generation during thermomechanical compaction of gutta-percha. Part II. Histological response to temperature elevation on the external surface of the root. *International endodontic journal*, 23, 5, 268-74.
- Schmalz G, 2009. Root canal filling materials. In: *Biocompatibility of Dental Materials*. Eds: Springer, p. 187-220.
- Schmitt E, Gehrman M, Brunet M, Multhoff G, Garrido C, 2007. Intracellular and extracellular functions of heat shock proteins: repercussions in cancer therapy. *Journal of leukocyte biology*, 81, 1, 15-27.
- Schroeder A, 1957. Gewebsverträglichkeit des wurzelfüllmittels AH26. *Zahnärzt Welt Zahnärzt Reform*, 58, 563-7.
- Seo B-M, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahim J, Young M, Robey PG, Wang CY, Shi S, 2004. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *The Lancet*, 364, 9429, 149-55.
- Silver G, Love R, Purton D, 1999. Comparison of two vertical condensation obturation techniques: Touch'n Heat modified and System B. *International endodontic journal*, 32, 4, 287-95.
- Smoyer WE, Ransom R, Harris RC, Welsh MJ, Lutsch G, Benndorf R, 2000. Ischemic acute renal failure induces differential expression of small heat shock proteins. *Journal of the American Society of Nephrology*, 11, 2, 211-21.
- Spångberg L, 1998. Endodontic treatment of teeth without apical periodontitis. *Essential Endodontology*. Blackwell, London, 211-41.
- Spangberg L, Engström B, Langeland K, 1973. Biologic effects of dental materials: 3. Toxicity and antimicrobial effect of endodontic antiseptics in vitro. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*, 36, 6, 856-71.
- Spångberg LS, Barbosa SV, Lavigne GD, 1993. AH26 releases formaldehyde. *Journal of endodontics*, 19, 12, 596-8.
- Strindberg LZ, 1956. The dependence of the results of pulp therapy on certain factors-an analytical study based on radiographic and clinical follow-up examination. *Acta Odontol Scand*, 14, 1-175.
- Sun Y, MacRae TH, 2005. Small heat shock proteins: molecular structure and chaperone function. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 62, 21, 2460-76.
- Suzuki T, Nomura S, Maeda T, Ohshima H, 2004. An immunocytochemical study of pulpal responses to cavity preparation by laser ablation in rat molars by using antibodies to heat shock protein (Hsp) 25 and class II MHC antigen. *Cell and tissue research*, 315, 3, 311-9.
- Tani-Ishii N, Teranaka T, 2003. Clinical and radiographic evaluation of root-canal obturation with obtura II. *Journal of endodontics*, 29, 11, 739-42.
- Tate Y, Yoshida K, Yoshida N, Iwaku M, Okiji T, Ohshima H, 2006. Odontoblast responses to GaAlAs laser irradiation in rat molars: an experimental study using heat-shock protein-25 immunohistochemistry. *European journal of oral sciences*, 114, 1, 50-7.
- Telli C, Serper A, Dogan AL, Guc D, 1999. Evaluation of the cytotoxicity of calcium phosphate root canal sealers by MTT assay. *Journal of Endodontics*, 25, 12, 811-3.
- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM, 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *science*, 282, 5391, 1145-7.
- Torabinejad M, Skobe Z, Trombly PL, Krakow AA, Grøn P, Marlin J, 1978. Scanning electron microscopic study of root canal obturation using thermoplasticized gutta-percha. *Journal of endodontics*, 4, 8, 245-50.
- Uzun İ, Aladağ H, 2011. Devamlı ısı ile obtürasyon tekniğinde kullanılan kanal patlarının kök yüzeyinde oluşan ısı değişimlerine etkisi. *Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi*, 2011, 3.
- Venturi M, Pasquantonio G, Falconi M, Breschi L, 2002. Temperature change within gutta-percha induced by the System-B Heat Source. *International Endodontic Journal*, 35, 9, 740-6.
- Walton RE, Torabinejad M, 1996. Principles and practice of endodontics, Saunders, p.
- Weine F, 2004. Alternatives to routine endodontic treatment. *Endodontic therapy*. St. Louis: Mosby, 513-45.
- Weller R, Koch K, 1995. In vitro radicular temperatures produced by injectable thermoplasticized gutta-percha. *International endodontic journal*, 28, 2, 86-90.
- Weller RN, Kimbrough WF, Anderson RW, 1997. A comparison of thermoplastic obturation techniques: adaptation to the canal walls. *Journal of endodontics*, 23, 11, 703-6.

- Wilson BL, Baumgartner JC, 2003. Comparison of spreader penetration during lateral compaction of 04 and 02 tapered gutta-percha. *Journal of endodontics*, 29, 12, 828-31.
- Wilson Jr TG, Kornman K, 1996. *Fundamentals of periodontics*, Quintessence Publ., p.
- Wu M, Van der Sluis L, Wesselink P, 2002. A preliminary study of the percentage of gutta-percha-filled area in the apical canal filled with vertically compacted warm gutta-percha. *International Endodontic Journal*, 35, 6, 527-35.
- Wu MK, Özok A, Wesselink P, 2000. Sealer distribution in root canals obturated by three techniques. *International Endodontic Journal*, 33, 4, 340-5.
- Wu MK, Wesselink P, 2001. A primary observation on the preparation and obturation of oval canals. *International Endodontic Journal*, 34, 2, 137-41.
- Xie H, Liu H, 2012. A Novel Mixed-Type Stem Cell Pellet for Cementum/Periodontal Ligament-Like Complex. *Journal of periodontology*, 83, 6, 805-15.
- Yilmaz Z, Tuncel B, Ozdemir HO, Serper A, 2009. Microleakage evaluation of roots filled with different obturation techniques and sealers. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 108, 1, 124-8.
- Yücel ÖÖ, Gültekin S, 2015. Dental kök hücrelerin rejeneratif medikal tedavideki yeri. *Acta Odontologica Turcica*, 32, 2, 98-105.
- Zhang W, Torabinejad M, Li Y, 2003. Evaluation of cytotoxicity of MTAD using the MTT-tetrazolium method. *Journal of Endodontics*, 29, 10, 654-7.
- Zhao Y, Glesne D, Huberman E, 2003. A human peripheral blood monocyte-derived subset acts as pluripotent stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100, 5, 2426-31.
- Zmener O, Spielberg C, Lamberghini F, Rucci M, 1997. Sealing properties of a new epoxy resin-based root-canal sealer. *International Endodontic Journal*, 30, 5, 332-4.

7. ÖZGEÇMİŞ

9 Ağustos 1987 tarihinde Ankara’da doğdu. İlköğrenimini Vehbi Dinçerler İlköğretim Okulu ve Gazeteci Hasan Tahsin İlköğretim Okulu’nda ve orta öğrenimini Nahit Mentеше YDA Lisesi’nde tamamladı. 2005 yılında başladığı Ankara Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi’nden 2010 yılında mezun oldu. 2010 ve 2015 yılları arasında Ankara ve İstanbul’da çeşitli özel diş polikliniklerinde serbest diş hekimi olarak çalıştı. 2016 yılında Dişhekimliğinde Uzmanlık Sınavı ile girmeye hak kazandığı Selçuk Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi Endodonti Ana Bilim Dalı’nda uzmanlık eğitimine başladı. Halen Selçuk Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi Endodonti Ana Bilim Dalı’nda uzmanlık eğitimine devam etmektedir.

