

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**İNFLAME HÜCRELERDE KALSİYUM HİDROKSİT VE N-ASETİL
SİSTEİN'İN YIKIM ENZİMLERİ ÜZERİNE ETKİNLİĞİNİN
BELİRLENMESİ**

Dt. Eda Ezgi ASLANTAŞ

**Endodonti Programı
DOKTORA TEZİ**

**ANKARA
2013**

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**İNFLAME HÜCRELERDE KALSİYUM HİDROKSİT VE N-ASETİL
SİSTEİN'İN YIKIM ENZİMLERİ ÜZERİNE ETKİNLİĞİNİN
BELİRLENMESİ**

**Dt. Eda Ezgi ASLANTAŞ
Endodonti Doktora Programı
DOKTORA TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Hatice DOĞAN BUZOĞLU**

**ANKARA
2013**

Anabilim Dalı : Endodonti
 Program : Endodonti Doktora Programı
 Tez Başlığı : İnflame Hücrelerde Kalsiyum Hidroksit ve N-Asetil
 Sistein'in Yıkım Enzimleri Üzerine Etkinliğinin
 Belirlenmesi
 Öğrenci Adı-Soyadı : Eda Ezgi Aslantaş
 Savunma Sınavı Tarihi : 18.09.2013

Bu çalışma jürimiz tarafından doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:

Prof. Dr. Bahar Özçelik

(Hacettepe Üniversitesi Endodonti A.D)



Tez danışmanı:

Prof. Dr. Hatice Doğan Buzoğlu

(Hacettepe Üniversitesi Endodonti A.D)



Üye:

Prof. Dr. Ömer Görduysus

Hacettepe Üniversitesi Endodonti A.D



Üye:

Prof. Dr. Cemal Tınaz

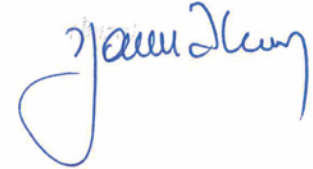
(Gazi Üniversitesi Endodonti A.D)



Üye:

Doç. Dr. Yasemin Aksoy

(Hacettepe Üniversitesi Biyokimya A.D)



ONAY

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Ersin FADILLIOĞLU

Müdür Y.

TEŞEKKÜR

Doktora Tez çalışmam sırasında bilimsel katkıları ile bana yardımcı olan, eğitimim süresince desteğini esirgemeyen, tez danışmanlarım ve hocalarım sayın Prof. Dr. Hatice Doğan Buzoğlu ve Doç. Dr. Yasemin Aksoy'a en içten teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Lisans ve doktora eğitimim süresince büyük yardımlarını gördüğüm, bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım sayın Endodonti Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri, Öğretim Görevlileri ve birlikte çalıştığım Araştırma Görevlisi arkadaşlarıma,

Tez çalışmam sırasında büyük katkılarından dolayı sayın Yard. Doç. Dr. Banu Peynirciođlu, sayın Senem Karapınar, sayın Deniz Ceyhan ve sayın Yeliz Akkaya'ya,

İlgisini ve desteğini esirgemeyen dayım Yücel Fırat ve ailesine,

Sonsuz sevgi, sabır ve anlayışlarıyla bana her türlü desteği sunan sevgili aileme ve eşime, en içten teşekkürlerimi ve şükranlarımı sunarım.

Eda Ezgi ASLANTAŞ

ÖZET

Aslantaş, E. E., İnflame Hücrelerde Kalsiyum Hidroksit ve N-Asetilsisteinin Yıkım Enzimleri Üzerine Etkinliğinin Belirlenmesi. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Endodonti Programı Doktora Tezi, Ankara, 2013. Çalışmamızda periapikal patolojilerde ve kronik inflamasyonda önemli rol oynayan ve insan makrofaj hücre hattının lipopolisakkarit (LPS) ile uyarılması sonucu açığa çıkan matriks metalloproteinaz-2, -9 (MMP-2, MMP-9) ve inhibitör metalloproteinaz-1, -2 (TIMP-1, TIMP-2) seviyeleri üzerine kalsiyum hidroksit (Ca(OH)₂) ve antioksidan bir ajan olan N-asetil sistein'in (NAC) etkisi karşılaştırılmıştır. Bu amaçla insan monosit hücre öncülü olan insan akut monosit lösemi hücre hatları (THP-1) makrofaj hücrelerine dönüştürülerek kullanılmıştır. Lipopolisakkarit ile uyarılan makrofaj hücreleri NAC veya Ca(OH)₂ inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından doku yıkımından sorumlu olan enzimler MMP-2 ve -9'un yanı sıra bu enzim grubunun etkinliğini denetleyen TIMP-1 ve -2 seviyeleri, protein ve mRNA düzeyinde belirlenmiştir.

Sonuç olarak NAC'ın farklı zaman aralıklarında yıkım enzimleri üzerine baskılayıcı etkisi gözlenmiştir.

Anahtar sözcükler: Kalsiyum hidroksit (Ca(OH)₂), Matriks metalloproteinaz-2 (MMP-2), Matriks metalloproteinaz-9 (MMP-9), N-asetil sistein (NAC), Periapikal lezyonlar, Doku inhibitör matriks metalloproteinaz-1 (TIMP-1), Doku inhibitör matriks metalloproteinaz-2 (TIMP-2).

ABSTRACT

Aslantaş, E. E., Determining the Effects of Calcium Hydroxide and N-acetyl cystein on the Destruction Enzymes Inflamed Cells. Ankara, 2013. In our study, the effects of N-acetylcysteine (NAC) and Calcium hydroxide (Ca(OH)_2) on levels of Matrix metalloproteinase-2, -9 (MMP-2, -9) and Tissue inhibitor metalloproteinase (TIMP-1, -2), which are released from lipopolysaccharide (LPS) stimulated human macrophage cell line, plays crucial role in apical periodontitis and chronic inflammation was evaluated comparatively. In our study, human monocyte precursor cells of the human acute monocyte leukemia cell lines (THP-1) was converted to macrophage cells. LPS-stimulated macrophage cells was incubated with NAC or Ca(OH)_2 . Following incubation; levels of tissue MMP-2, -9 and TIMP-1, -2 that controls the effectiveness of these group of enzymes was measured on protein and mRNA levels.

As a result of this study NAC decreased the destruction enzymes in different time intervals.

Keywords: Calcium hydroxide (Ca(OH)_2), Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2), Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), N-acetyl cystein (NAC), Periapical lesion, Tissue inhibitor matrix metalloproteinase-1 (TIMP-1), Tissue inhibitor matrix metalloproteinase-2 (TIMP-2).

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	ix
ŞEKİLLER	xi
TABLolar	xiii
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER	4
2.1.Periapikal Patolojiler	4
2.2.Matriks Metalloproteinazlar (MMPs)	7
2.3.Doku İnhibitör Matriks Metalloproteinazlar (TIMPs)	9
2.4.Medikamentler	11
2.4.1.Kalsiyum Hidroksit (Ca(OH) ₂)	12
2.4.2.N-asetil Sistein (NAC)	15
3.GEREÇ VE YÖNTEMLER	17
3.1.THP-1 Hücrelerinin Farklılaştırılması	17
3.2.Akım Sitometri Analizi	17
3.3.Uygun Lipopolisakkarit Dozunun Belirlenmesi	18
3.4.THP-1 Hücrelerine Etken Madde Uygulanması	19
3.5.THP-1 Hücrelerine LPS Uygulanması	19
3.6.Matriks Metalloproteinaz Ve Doku İnhibitör Matriks Metalloproteinaz Protein Seviyelerinin Belirlenmesi	20
3.6.1.MMP-9	21
3.6.2.TIMP-1	22
3.6.3.MMP-2	24
3.6.4.TIMP-2	25
3.7.Enzimlerin Gen Düzeylerinin RT-PCR Yöntemi İle Belirlenmesi	27

3.7.1.TH P-1 hücreslerinden m-RNA eldesi	27
3.7.2.RNA saflığının belirlenmesi ve konsantrasyonunun ölçülmesi	28
3.7.3.cDNA sentezi	29
3.7.4.Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu	30
3.8.Verilerin Değerlendirilmesi	32
4. BULGULAR	33
4.1. Uygun İlaç Konsantrasyonlarının Belirlenmesi	33
4.1.1. Akım Sitometri Analizi	33
4.2. Uygun LPS Dozunun Belirlenmesi	35
4.3. mRNA ve Protein Seviyelerinin Belirlenmesi	35
4.3.1 MMP-9	36
4.3.2 TIMP-1	40
4.3.3 MMP-9/TIMP-1	45
4.3.4 MMP-2	46
4.3.6. MMP-2/TIMP-2	53
5.TARTIŞMA	54
6.SONUÇ ve ÖNERİLER	63
7.KAYNAKLAR	64

SİMGELER VE KISALTMALAR

Ca(OH) ₂	Kalsiyum Hidroksit
ECM	Ekstraselüler matriks
E.coli	Escherichia Coli
ELISA	Enzim bağı bağışıklık deneyi
FBS	Fetal Dana Serumu
GSH	Glutasyon
IF- γ	Interferon gama
IL	İnterlökin
LTA	Lipoteikoik asit
LPS	Lipopolisakkarit
MMP	Matriks metalloproteinaz
MTT	Metil tiazol tetrazolyum
NAC	N-Asetil Sistein
NK	Naturel killer
PAMP	Patojen ilişkili moleküler kalıplar
PBS	Fosfat Tampon Solüsyonu
PI	Propidyum İyodid
PMA	Forbol 12-Myristat 13-Asetat
PMNL	Polimorfonükleer Lökosit
PRR	Kalıp tanıma reseptörü
RT-PCR	Gerçek zamanlı-polimeraz zincir reaksiyonu
TGF- β	Transforme Edici Büyüme Faktörü-Beta
TIMP	Doku inhibitör metalloproteinaz
TLL	Toll benzeri reseptör
TGF-B	Transforming growth factor beta
THP-1	İnsan Monoblastik Lösemik Hücre Hattı
TNF- α	Tümör Nekrozis Faktör-Alfa
°C	Santigrat derece
CO ₂	Karbondioksit

μl	Mikrolitre
mM	Milimolar
nM	Nanometre
ng	Nanogram
μg	Mikrogram

ŞEKİLLER

	Sayfa No
Şekil 3.1. İkinci, dördüncü ve sekizinci saatler için çalışılan 6-kuyulu plakların şematik gösterimi	18
Şekil 3.2. Kontrol ve medikament uygulanmış THP-1 hücrelerinde gruplarının şematik görünümü	20
Şekil 3.3. Heidolph Titramax 101 orbital shaker cihazı ve 450 rpm’de inkübasyona bırakılan plak.	22
Şekil 3.4. Stop solüsyonu eklendikten sonra spektrofotometrede okunmaya hazır plak.	22
Şekil 3.6. Stop solüsyonu eklendikten sonra okunmaya hazır plak (TIMP-1)	23
Şekil 3.7. Stop solüsyonu eklendikten sonra okunmaya hazır plak (MMP-2)	25
Şekil 3.8. Stop solüsyonu eklendikten sonra okunmaya hazır plak (TIMP-2)	26
Şekil 3.9. ve şekil. 3.10. SpektraMax M2 Mikroplak Okuyucu	27
Şekil 3.11. Nano Drop ND-1000 (Thermo Scientific) cihazı	29
Şekil 3.12. Light Cycler 480 II RT-PCR cihazı	31
Şekil 4.1. Kalsiyum hidroksit grubunun akım sitometri’de propidyum iyodid (PI) boyaması ile analiz edilen hücre canlılığı yüzdelerinin grafiksel gösterimi.	33
Şekil 4.2. NAC grubunun akım sitometri’de propidyum iyodid (PI) boyaması ile analiz edilen hücre canlılığı yüzdelerinin grafiksel gösterimi.	34
Şekil 4.3. THP-1 hücrelerinde TNF- α sitokin salınımı.	35
Şekil 4.4.: MMP-9 mRNA düzeyleri	37
Şekil 4.5.:MMP-9 Standart dilüsyonlardan elde edilen standart eğri.	38
Şekil 4.6. MMP-9 protein düzeyleri	40
Şekil 4.7. TIMP-1 mRNA düzeyi	42
Şekil 4.8. TIMP-1 Standart dilüsyonlardan elde edilen standart eğri.	43
Şekil 4.9. TIMP-1 protein düzeyi	45
Şekil 4.10. MMP-9/TIMP-1 mRNA düzeyi oranları	45
Şekil 4.11. MMP-9/TIMP-1 protein düzeyi oranları	46

Şekil 4.12. MMP-2 mRNA düzeyleri	48
Şekil 4.13. MMP-2 protein düzeyleri	49
Şekil 4.14. TIMP-2 mRNA düzeyleri	51
Şekil 4.15. TIMP-2 Standart eğrisi	51
Şekil 4.16. TIMP-2 protein salınımının zamana ve ilaca bağlı olarak değişimi	52
Şekil 4.17. MMP-2/TIMP-2 mRNA düzeyi oranı	53
Şekil 4.18. MMP-2/TIMP-2 protein düzeyinin zamana bağlı grafiği	53

TABLOLAR

Tablo 2.1. Matriks Metalloproteinazlar ve Fonksiyonları	8
Tablo 4.1. Ca(OH) ₂ uygulanan hücreler için akım sitometri’de propidyum iyodid ile hücre canlılığı analiz sonuçları.	33
Tablo 4.2. NAC uygulanan hücreler için akım sitometri’de propidyum iyodid ile hücre canlılığı analiz sonuçları.	34
Tablo 4.3. MMP-9 mRNA düzeyi istatistiksel farklılık tablosu	36
Tablo 4.4. MMP-9 mRNA düzeyi sonuçları	37
Tablo 4.5. MMP-9 Protein seviyeleri	38
Tablo 4.6. MMP-9 Protein düzeyi istatistiksel farklılık tablosu	39
Tablo 4.7. TIMP-1 mRNA düzeyleri	40
Tablo 4.9. TIMP-1 Protein düzeyi sonuçları	43
Tablo 4.10. TIMP-1 Protein düzeyi istatistiksel farklılık tablosu	44
Tablo 4.11. MMP-2 mRNA düzeyleri	46
Tablo 4.12. MMP-2 mRNA düzeyi istatistiksel farklılık tablosu	47
Tablo 4.13. MMP-2 Protein düzeyleri	48
Tablo 4.14. TIMP-2 mRNA düzeyleri	49
Tablo 4.15. TIMP-2 mRNA düzeyi istatistiksel farklılık tablosu	50
Tablo 4.16. TIMP-2 protein düzeyleri	52

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Periapikal lezyonlar, dental pulpanın bakteriyel enfeksiyonunu takiben inflamatuvar kemik rezorpsiyonuyla oluşur. Bu yıkımın konak hücrelerden salınan birtakım medyatörler, sitokinler ve enzimler sonucu olduğu düşünülmektedir. Bu faktörler ekstraselüler matriks (ECM) yıkımına neden olan proteazları tetikleyerek kemik kaybına neden olabilir (1) . Konak proteazları arasında matriks metalloproteinazlar (MMPs) tüm ekstraselüler matriks komponentlerini degrade etme özelliğine sahip olan çinko bağımlı bir endopeptidaz ailesidir. MMP'lar inflamasyon sürecinde, sitokinlerin salınımını takiben salgılanırlar. Geçmişten bugüne 24 farklı MMP klonlanmış, bunların 23 tanesi de insanlarda gösterilmiştir (2) . Jelatinazlar olarak da adlandırılan MMP-2 ve MMP-9'un bazal membranın önemli bir yapısal komponenti olan tip 4 kollojenin yıkımına neden olduğu bilinmektedir. MMP'lerin pulpal ve periapikal doku yıkımında önemli bir rol oynadığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (3) . Corotti ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada MMP-2 ve MMP-9'un inflamatuvar periapikal lezyonların gelişiminde önemli bir role sahip olduğu gösterilmiştir (4) . Buzoğlu ve arkadaşlarının periapikal lezyonlu dişlerden aldıkları püy içeren intrakanal eksudaları üzerinde yaptıkları bir çalışmada ise, tüm apse örneklerinde MMP-9 saptanırken, MMP-2 sadece akut apselerde saptanmıştır ve MMP-2'nin akut inflamasyonda rolü olabileceği üzerinde durulmuştur (5) . Bunun yanısıra yapılan başka bir çalışmada epitelize ve epitelize olmayan periapikal lezyonlarda MMP-9 seviyesi sağlıklı periodontal ligamentle kıyaslandığında belirgin bir şekilde daha yüksek bulunmuştur (6) .

MMP'lerin aktivasyonu, Doku İnhibitör Matriks Metalloproteinaz (TIMP) adı verilen ve MMP ailesinin her bir üyesini inhibe etme kapasitesine sahip olan bir grup endojenöz protein tarafından düzenlenir (7) . Matriks yeniden şekillenmesi için MMP'ler ve TIMP'ler arasında bir denge gerekli iken bu dengedeki bir değişim doku yıkımına neden olan patolojik bir sürece neden olabilir (8) . TIMP-1, MMP-9'un, TIMP-2 ise MMP-2'nin temel inhibitörleridir (9) . Bazı çalışmalar hastalıklı periodontal dokulardaki TIMP seviyelerinde azalmanın doku yıkımıyla

sonuçlandığını gösterirken (10,11) diğer çalışmalar hastalıklı periodontal dokulardaki TIMP seviyelerinde azalma saptamışlardır (12,13) .

Kalsiyum hidroksit (Ca(OH)_2), periapikal lezyonlu dişlerde kanal içi medikament olarak diş hekimliğinde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Antimikrobiyal etkinin yanı sıra (14) diş rezorpsiyonunun engellenmesinde (15) ve osteoklast hücre oluşumunun azalmasında da rolü bulunmaktadır (16) . Ca(OH)_2 pH'sı 12,5 olan kuvvetli bir alkalidir. Aköz bir solusyonda kalsiyum ve hidroksil iyonlarına ayrışır ve antimikrobiyal aktivitesini bu özelliği ile sağlar. Asma ve arkadaşları; kalsiyum hidroksitin proinflamatuvar sitokinler ve nöropeptidler üzerine etkilerini inceledikleri bir çalışmada Ca(OH)_2 'in İnterlökin-1 α (IL-1 α) ve Tumor necrosing factor- α 'yı (TNF- α) ı denatüre ettiğini göstermişlerdir (17) . Apikal periodontitis oluşturulmuş köpek dişlerinde Ca(OH)_2 kullanılarak yapılan kanal tedavileri sonrası ölçülen MMP seviyeleri de, tek seansta yapılan ve kanal tedavisi yapılmayan kontrol grubuyla kıyaslandığında belirgin bir şekilde azalma göstermiştir (18) . Buna karşılık yapılan çalışmalarda Ca(OH)_2 kanaldan tam olarak uzaklaştırılmadığında yapılan kanal dolgusunun kök kanalından sızıntıya neden olarak kök kanal tedavisinde başarısızlık riskini arttığı ve kök kanalında uzun süreli kullanımlara bağlı kök kırığı oluşabilmesini kolaylaştırdığı rapor edilmiştir (19,20) .

Son yıllarda yapılan çalışmalarda doku yapımında etkin rol oynayan antioksidan ajanlar ön plana çıkmaktadır. Lipopolisakkarit (LPS) ile aktive olan hücrelerde inflamasyon oluşumu ile birlikte oksidatif stres oluştuğu bilinmektedir. N-acetylcysteine (NAC) glutatyon'un (GSH) öncül molekülüdür ve oksidatif stress sırasında azalan glutatyon seviyesini arttıran antioksidatif ve antiinflamatuvar bir ajandır (21) . Kim ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada LPS ile uyarılan dişeti fibroblastlarında MMP-2 üretimi'nin NAC ile engellendiği ortaya konmuştur (22) . Başka bir çalışmada ise NAC'in, farelerde deneysel olarak yaratılan alveoler kemik kaybını azalttığı gözlenmiştir (23) . Paranjipe ve arkadaşlarının yaptıkları başka bir çalışmada NAC, dental restoratif materyallerin, pulpa stroma hücreleri ve oral keratinositler üzerindeki toksik etkilerini nötralize ederek hücre ölümünü engellemiştir (24) . Bütün bunlar NAC'in diş hekimliğinde kullanılabilecek bir materyal olduğunu göstermektedir. Periapikal lezyonlu dişlerin tedavisinde amaç,

hem yıkımın durdurulması, hem de kanal dolgusunu takiben, yıkılan kemik dokusunun rejenere olmasının sağlanmasıdır. Buradan yola çıkarak antiinflamatuvar, antioksidan ve koruyucu etkinliği çeşitli çalışmalarla gösterilen NAC'in Ca(OH)_2 ile kıyaslanması hedeflenmektedir. Çalışmada apikal periodontitiste ve kronik inflamasyonda önemli rolü olan insan makrofaj hücre hattının LPS ile uyarılması sonucu açığa çıkan MMP-2, MMP-9, TIMP-1 ve TIMP-2 seviyeleri üzerine Ca(OH)_2 ve antioksidatif bir ajan olan NAC'in etkisi karşılaştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Periapikal Patolojiler

Periradiküler dokular; sement, periodontal ligament ve alveolar kemikten oluşmaktadır. Sement, mineralize ve avasküler bir bağ dokusudur. Periodontal ligament ise sementi alveolar kemiğe bağlayan özel bir bağ dokusudur. Periodontal ligament; farklı hücre popülasyonları ve ekstraselüler matriksi içermektedir. Osteoblastlar, osteoklastlar, fibroblastlar, Malassez epitel artıkları, sementoblastlar, makrofajlar ve farklılaşmamış mezenşimal hücreler periodontal ligamentin içerdiği hücrelerdir. Periodontal ligamentin ekstraselüler matriksi, kollojen fibrilleri, fibronektin, elastin, diğer nonkollojenaz proteinler ve proteoglikanları içerir. Alveolar kemik ise dişe ev sahipliği yapan çene kemiğinin bir parçasıdır (25) .

Periapikal patolojiler hem endojenöz hem de eksojenöz faktörler nedeniyle oluşabilir. Eksojenöz faktörler; mikroplar ve toksinleri, zararlı metabolik ürünler, kimyasal ajanlar, mekanik irritasyon, yabancı cisim ve travma olabilir. Endojenöz faktörler ise osteoklastları aktive eden, üre ve kolestrol kristalleri gibi konağın metabolik yapıları, sitokinler veya diğer inflamatuvar medyatörlerlerdir (25) . Ancak periapikal patolojilerin gelişiminin primer nedeni çürük, travma veya iatrojenik nedenlerle kök kanal sisteminin bakterilerle enfekte olması ve periapikal dokuları etkilemesidir (26) . Kök kanal sisteminden periapikal dokulara çıkan bakteriyel toksinler (örneğin; LPS ve lipoteikoik asit (LTA) ve zararlı metabolik son ürünler periapikal immünoinflamatuvar reaksiyonu tetikleyebilir (27) . Bu maddeler yapılarında bulan patojen-ilişkili moleküler kalıplarla (PAMP) doğuştan olan immün cevabı aktive edebilirler. Mikropların salgıladığı farklı moleküler kalıplar; fagositler, dentritik hücreler ve B lenfositler gibi konak hücrelerinin üzerinde bulunan Kalıp Tanıma Reseptörleri (PRR) veya Toll benzeri reseptörler (TLL) gibi farklı kalıplar tarafından tanınır (25) . Enfekte kök pulpasındaki mikrobiyal faktörler ve periodontal ligamentin konak savunması arasındaki bu karşılaşma, mikrovaskülarite değişiklikleri, dolaşımdan doku boşluklarına kan hücrelerinin ve plazma proteinlerinin göçü ve duyu sinirlerinin aktivasyonuna neden olarak, lokal inflamasyon, sert dokuların rezorpsiyonu, diğer periapikal dokuların yıkımı ve apikal

periodontitisin çeşitli histopatolojik evrelerinin oluşumuna neden olur. Bu immünoinflamatuvar cevabın içinde endotelial hücreler, mast hücreleri, plateletler, fibroblastlar, nötrofiller, makrofajlar, dendritik hücreler, doğuştan gelen ve adaptif immün hücreler, immünoglobülinler, inflamatuvar medyatörler, proinflamatuvar sitokinler, kemokinler ve nöropeptidler de görev almaktadır (28) .

Eğer iritanlar uzaklaştırılmazsa nötrofilden zengin erken lezyon; granülamatöz doku içerisinde çevresi kapsülle çevrili makrofaj, lenfosit ve plazma hücrelerinden zengin bir ortamla yer değiştirir ve kronik apikal periodontitis oluşmaya başlar. Çevresi epitelize veya non-epitelize olabilir (29) .

Birçok sınıftan konak hücresi periapikal savunmada rol oynar. Birçoğu savunma sisteminden toplanmaktadır ve nötrofil, lenfosit, plazma hücreleri ve monosit/ makrofajları içerir. Çalışmalar apikal periodontitiste polimorfonükleer lökositler (PMNL) ve monosit türevlerinin önemini göstermektedir (30) .Polymorfonükleer lökositler; vücut savunma sisteminde ön cephede savaşan kuvvetlerdir ve akut inflamasyonun karakterize yapısıdır. Temel olarak mikroorganizmaları yok etmek için harekete geçerler, ancak konak dokularında da şiddetli bir hasar başlatabilirler (31) . Akut inflamasyon sahasında büyük miktarlarda ölen kısa ömürlü (yaklaşık 3 gün) hücrelerdir (32) . Dolayısıyla periapikal patolojilerin akut evrelerinde rol oynadığı düşünülmektedir.

Lenfositler; vücudun savunma sisteminin seçkin kuvvetleridir ve inflamasyon ve bağışıklıkta temel görevleri vardır (29) .Üç temel sınıf lenfosit arasından (L-lenfositler, B-lenfositler ve Naturel Killer (NK) hücreler) T- ve B- lenfositler periapikal patolojilerde önem arz etmektedir. T hücreleri dolaşımdaki lenfositlerin %60-70'ini oluşturur (29) . B hücreleri ile birlikte çalışan T hücreleri T-helper/inducer (Th/i) olarak adlandırılır. Diğer hücreler üzerinde direk toksik ve baskılayıcı etkileri olan T hücreleri de T-cytotoxic/suppressive (Tc/s) olarak isimlendirilir. Th hücreleri IL-2 ve İnterferon- γ (IF- γ) üreterek immün sistemin hücre aracılı savaşının kontrolünü sağlar ve plazma hücrelerinin antikor yapımını düzenleyen IL-4, -5, -6 ve -10 salgılar (28) . B lenfositleri insanlarda kemik iliğinden köken alır. Farklılaşan B hücreleri kan dolaşımına geçerek dolaşımdaki lenfosit popülasyonununun %10-20'sini oluşturur. Antijenlerden ve Th hücrelerinden

sinyalleri alan B hücrelerinin bir kısmı büyük plazma hücrelerine dönüşür. Plazma hücreleri, immün sistemin spesifik kimyasal silahları olan antikoları üretir ve salgılar (29) .

Makrofajlar, bakteriyi özümseyen ve öldüren profesyonel fagositik hücrelerdir. Bir kısmı doğal bağışıklığın bir parçası iken diğer bir kısmı bakteriye karşı spesifik antikoların varlığını gerektir ve spesifik, kazanılmış bağışıklığın etkili silahlarının bir parçası olarak düşünülmelidir (33) . Makrofaj öncülleri dolaşıma monositler olarak salınırlar ve birkaç gün içerisinde vücudun tüm dokularına dağılırlar (34) . Monositler dolaşımdan endotel tabakasına göç ettiklerinde makrofajlara veya dendritik hücrelere dönüşürler (35) . Makrofajların insan periapikal inflamatuvar lezyonlarındaki varlığı yapılan birçok çalışma ile gösterilmiş bir bulgudur (26,36) . Stern ve arkadaşlarının insan periapikal granülomalarının hücresel içeriği üzerine yaptıkları bir çalışmada makrofajların inflamatuvar hücrelerin %46'sını oluşturduğu göstermiştir (37) .

Makrofajlar kazanılmış bağışıklığın ortaya çıkmasında önem arz eden “antijen-sunucu hücreler” olarak da görev alırlar. Antijeni işleme tabi tutar ve kendi üzerlerindeki MHC II molekülünün lenfosit tarafından tanınması ile onu T-helper lenfositlerin antijen spesifik klonlarına sunar. Dahası bu lenfositlerin aktivasyonunda gerekli bütünleyici bir molekül olan IL-1 sitokinini salgılar (33) . MHC II molekülü taşıyan ve böylece antijen sunucu hücreler olarak görev yapan makrofajlar hem insan hem de fare periapikal granülomlarında tanımlanmıştır (38,39) .

Makrofajların, inflamatuvar sürecin başlamasına ve düzenlenmesine katkıda bulunan IL-1 α , IL-1 β ve TNF- α gibi sitokinlerin ana kaynağı olduğu düşünülmektedir. Dahası periapikal inflamatuvar sürecin yıkıcı sonuçlarına katkıda bulunan kollojenaz ve elastazlar gibi MMP'ları ve prostoglandin gibi aktif molekülleri salgırlar. Üretilen bu moleküllerden kollojenaz ve elastazlar bağ dokusunda direk olarak hasara neden olur. Sitokinler ise osteoklast aktivasyonu ve kemik rezorpsiyonu ile yıkım; fibroblast üretimi ve kollojen yapımını uyarılmasıyla da yapım aşamalarında görev alırlar (33) .

2.2. Matriks Metalloproteinazlar (MMPs)

MMP'lar ekstraselüler matriks ve membran tabanı yıkımına aracılık eden metal bağımlı proteolitik enzim ailesidir. İnaktif proenzimler (zimojenler) olarak salınmakta ve dokuda propeptid bölünmesiyle aktive olmaktadır. Omurgalı sistemlerinin birçoğunda gösterilmiştir ancak bitkiler, ilkel hayvanlar ve bakterilerde de MMP ailesinin temsilcileri olduğu bilinmektedir (40) . Günümüze kadar 26 çeşit MMP türü tanımlanan enzim ailesi özgüllüklerine göre kollojenazlar, jelatinazlar, stromelisinler, matrilisinler ve membran-tipi MMP'ler (MT-MMP) olmak üzere sınıflandırılırlar (41,42) .Nötr pH'da aktif olan bu enzim grubunun aktivitelerini gösterebilmeleri için "Ca⁺⁺" gerekir ve aktif bölgelerinde "Zn⁺⁺" içerirler. Yapısal olarak tüm MMP'lar için prototip, kollajenaz veya stromelisindir. Bu prototipe düzenleyici bir parçanın eklenmesi veya kaldırılmasıyla değişik MMP'lar oluşmaktadır. Prototip modelde "Zn⁺⁺" bağlayıcı sekansı barındıran katalitik aktivite gösteren bir kısım, katalitik kısmın önünde de bir propeptid bölgesi bulunur. Bu iki yapı enzimin en büyük bölümü olan ve substrat özelliğini belirlemede rol oynayan terminal bölgedeki karboksil yapıya prolinden zengin bir bağlantı bölgesiyle bağlanır. Ayrıca iki katalitik bölgede jelatin bağlanma bölgesi içermektedir. En küçük MMP olan matrilisin de ise peksin benzeri bölge bulunmamaktadır (43) .

Kollojenazlar, tip I, II ve III fibriler kollojen yıkımı yapan metalloproteinaz grubu üyesidirler. Kollojenaz ailesi; dokular arası kollojenaz (MMP-1), nötrofil kollojenaz (MMP-8) ve kollojenaz-3 (MMP-13)'den meydana gelmektedir. Bu enzimler, fibriler dokular arası kollojeni α -zincirindeki tek bir bağı kırarak parçalar (44) .

Stromelisin-1 (MMP-3) ve stromelisin-2 (MMP-10) proteoglikanların kor proteinleri, tip IV ve tipV kollajen, fibronektin, denatüre tip I kollajen ve laminini içeren bir molekülü parçalayabilmektedirler. Stromelisin-3 (MMP-11) enzimi meme kanseri hücreleri ve embriyonik fibroblastlar tarafından üretilen tam fonksiyonel bir metalloproteinazdır. Matrilisinler (MMP-7, MMP-26) ise fibronektin, laminin ve jelatini içeren moleküllerin yıkımına neden olur (45) .

Tablo 2.1. Matriks Metalloproteinazlar ve Fonksiyonları

Sınıflama	Proteinler	Fonksiyonlar
Kollojenazlar	MMP-1, MMP-8, MMP-13	Tip I, II ve III kollojeni parçalar.
Jelatinazlar	MMP-2, MMP-9	Tip IV, V, VII ve X kollajen, elastin ve fibronektini parçalar.
Stromelisinler	MMP-3, MMP-10, MMP-11	Stromal proteoglikanları, tip IV, V kollojen, fibronektin ve denatüre tip kollojeni parçalayabilir.
Matrilisinler	MMP-7 ve MMP-26	Fibronektin, laminin ve jelatin gibi çeşitli ECM komponentlerini parçalar.
Membran-tip MMP'ler	MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-24, MMP-25	ProMMP-2'yi aktive eder. Çeşitli ECM komponentlerini parçalar.

ECM komponentleri; kollojen, jelatin, agregan, laminin ve proteoglikanları içerebilir.

Matriks metalloproteinazların pek çoğu salgılanırken yeni bulunan MT-MMP hücre membranına bağlı olarak bulunmaktadır. Bu proteazlar transmembranal bir parça ve bir de hücre dışı katalitik kısımdan oluşmaktadır. Bu güne kadar altı adet MT-MMP tanımlanmıştır (MMP-14, -15, -16, -17, -24, -25) (46) .

Jelatinazlar olarak adlandırılan, tip IV, V, VII ve X, kollajen, elastin ve fibronektini parçalayabilen MMP-2 (Jelatinaz A) ve MMP-9 (Jelatinaz B) bu gruba dahildir. Bu enzimler birincil yapıları ve substrat özgüllükleri açısından birbirine benzemektedirler. Fakat farklı genler tarafından kodlanır ve regülasyonları farklılık gösterir. Bunlar katalitik bölge, hemopeksin benzeri bölge ve diğer MMP'lardan farklı olarak katalitik bölge içinde üç kez tekrar eden fibronektin benzeri bölgeler içerirler. Hemopeksin benzeri bölge, TIMP'lar ile aktivitenin düzenlenmesinde ve projelatinaz A'nın membranla ilişkili olarak aktivasyonunda, fibronektin benzeri bölge ise özellikle Tip I jelatin, Tip IV kollajen ve elastin yıkımında rol almaktadır (47) .

MMP-2 (jelatinaz A, 72 kDa, tip IV kollojenaz) ilk kez yüksek derecede metastatik fare tümörlerinde ve kültüre edilmiş insan melanom hücrelerinde tanımlanmış ve bu dokulardan izole edilmiştir (48-50) . Günümüze kadar da birçok normal ve malignant insan dokularında bulunmuştur. Ağız dokularından gingival

fibroblastlar, sert dokulardan osteoblast ve odontoblastlar MMP-2 salgırlarlar (51,52) . MMP-2 ayrıca sert ve çürük insan dentininde de tanımlanmıştır (53,54) .

MMP-9 ise makrofajlar ve PMNL tarafından üretilmektedir (55) . Akut ve kronik inflamasyonda ve neoplastik hastalıklarda rol oynadığı düşünölmektedir. Demineralizasyon başlamadan önce kemik yüzeyinden kollojen tabakayı kaldırarak osteoklastik rezorpsiyon sürecinin başlamasına neden olmaktadır (56) .

Yapılan çalışmalar MMP-2 ve MMP-9'un inflamatuvar periapikal lezyonların gelişiminde önemli rol oynadığına ve özellikle kronik apikal lezyonlardaki MMP-9 seviyesinin artışına dikkat çekmektedir (4-6) .

2.3. Doku İnhibitör Matriks Metalloproteinazlar (TIMPs)

MMP'ların salınımlarının düzenlenmesi hem transkripsiyonel aşamada hem de MMP üreten hücrelerden salınımlarından sonra gerçekleşir. MMP'ların transkripsiyonel olarak salınımı çeşitli büyüme faktörleri, hormonlar, sitokinler, hücre-matriks, hücre-hücre etkileşimleri ve hücrel dönüşüm gibi durumlarla kontrol edilir. Salınımlarından sonra ise aktiviteleri α 2-makroglobulin gibi endojenöz inhibitörler ve TIMP'ler tarafından düzenlenmektedir. α 2-makroglobulin esas olarak sıvı fazın düzenleyicisi iken, TIMP'ler dokulardaki temel düzenleyicilerdir (57) . Dokulardaki MMP'ler ile TIMP'ler normal matriks şekillenmesinde bir denge içerisindeydir. Ancak bazı hastalık süreçlerinde MMP seviyesindeki yükselme, TIMP seviyesinde artış olmaksızın gerçekleşirse bu durum doku yıkımıyla sonuçlanmaktadır (8,58)

Günümüze kadar omurgalılarda dört çeşit TIMP türü (TIMP 1-4) tanımlanmıştır (57) . TIMP'lerin eklem kıkırdağı ve kondrositler, romatoid sinoviyal fibroblastlar, polimorfonükleer lökositler, alveolar makrofajlar, osteoklastlar, kemik, gingival fibroblastlar ve çeşitli tümör hücreleri gibi çeşitli hücre ve doku tiplerinde üretildikleri gösterilmiştir (59) . TIMP'lerin tüm formları non-kovalent bağlı MMP'lerin aktif formlarına afinite gösterirler. Bu komplekslerin 1:1 sitokiometrilere vardır. Aktif MMP'yi inhibe ederler ve MMP zimojeninin aktivasyonunu yavaşlatırlar. Bundan dolayı enzimleri ve MMP'lerin aktivasyonunu bloke ederek,

ekstraselüler proteolizisin kontrolünde rol oynarlar. Sonuçta spesifik TIMP'ler ile jelatinazların zimojenleri arasında; örneğin TIMP-1 ile MMP-9 ve TIMP-2 ile MMP-2 arasında kompleksler oluşur (59) .

TIMP-1; X kromozomu üzerinde tanımlanmış 20kDa ağırlığında proteindir. Yapısında konformasyonel mobilitiyi sağlayan altı adet disülfid bağı vardır. Glikozilasyon ile aktive olmaktadır. Aktif formu 28 kDa ağırlığında bir siyaloglikoproteindir (60,61) . Özellikle makrofajlar olmak üzere pek çok hücrede üretilir ve salgılanır (60-62) , trombositlerde rezidü olarak bulunur (62) ve çeşitli dokular ile amnion sıvısı, sinovyal sıvı gibi vücut sıvılarında yer alır. Özel olarak metalloproteinazlara karşı aktivite gösterir, diğer metalloendopeptidazlar üzerine inhibitör etkisi yoktur. MMP-1, -2, -3, -8, -9 ve -13'ü inhibe edebilir (63) . MMPler'in aktif formuna yüksek afinite ile nonkovalent bağlarla, bire bir oranında, irreversibl olarak bağlanır (62) . Bu oranda küçük bir değişiklik olduğunda sonuç MMP aktivitesi lehinedir. Temel olarak jelatinaz B nin proformuna (proMMP-9) bağlanabilir ve MMP-9 ile ilişkili olarak salgılanır (61) .

TIMP-2; 21 kDa ağırlığında glikolize olmamış bir proteindir. TIMP-1 ile homolog özellik gösteren 12 sistein rezidüsü vardır (60) . Dağılımı iyi bilinmemekle birlikte eklem kıkırdaklarından izole edilmiştir. TIMP-1 ve TIMP-2'nin %40 oranında aminoasit dizin benzerliği vardır. Aktive olmuş MMP'lara bağlanma yönünden TIMP-1 ile benzerdir (62) , ek olarak MMP-2'nin proformu ile birebir kompleks yapar (60,62) . TIMP-2 ile ilgili olarak daha az bilgi vardır. TIMP-1.den farklı bir şekilde regüle edilir, forbol esterleri ile üretimi uyarılmaz, TGF- β ile inhibe olmaktadır. TIMP-2'nin kan beyin bariyerinin proteolitik sızıntısını azalttığı saptanmıştır (62) .

TIMP-3; 21 kDa ağırlığında TIMP-2 gibi non glikolize bir MMP inhibitörüdür. TIMP-1 ve TIMP-2 den farklı olmakla birlikte, yapısal olarak benzerliği vardır. Ekstraselüler matriksten transforme olmuş hücrelerin ayrılmasını kolaylaştır ve morfolojik değişiklikleri başlatır (62) .

TIMP-4'ün molekül ağırlığı 23 kDa'dır ve primer görevinin tümör gelişimi ve kanser hücrelerinin ilerleyişini inhibe etmek olduğu yapılan çalışmalarda belirtilmiştir (64) .

MMP'ler ve TIMP'ler arasındaki dengenin bozulması matris yıkımıyla seyreden dejeneratif hastalıkların sürecine katkıda bulunmaktadır. Günümüzde MMP-9 ve TIMP-1'in oral squamous cell karsinoma, non-small-cell akciğer kanseri ve primer göğüs kanseri gibi çeşitli kanser tiplerinde klinik prognostik markerlar olduğu ileri sürülmektedir (65-67) . Bazı vakalarda da, tükürük, dişeti oluğu sıvısı veya serum gibi vücut sıvılarındaki MMP ve TIMP varlığı hastalığın ilerleyişi hakkında bilgi vermektedir (68) . Sağlıklı periodontal dokulardaki TIMP seviyesi genellikle inflamme periodontal dokudaki TIMP seviyesinden daha yüksektir ve MMP seviyesi TIMP seviyesini aşmıştır. Periodontitisli hastalardaki dişeti ve dişeti oluğu sıvısındaki MMP-1, -2, -3 ve -9 miktarı sağlıklı kontrollerden alınan örneklerle kıyaslandığında belirgin bir şekilde artmışken, TIMP-1 ve TIMP-2 seviyesinde belirgin bir azalma izlenmiştir (11) . Yapılan bir çalışmada akut apikal periodontitisli bireylerdeki artmış TIMP-1 ve TIMP-2 seviyesinin aşırı doku hasarını engellemeye yönelik olabileceği ifade edilmiştir (69) .

2.4. Medikamentler

Periapikal patolojili dişlerin tedavisinde kanalın şekillendirilmesi ve irrigasyonundan sonra arta kalan mikroorganizmaları ortadan kaldırmak ve periapikal dokuların iyileşmesini indüklemek amacıyla kanal içi medikamentlerin kullanılması tavsiye edilmektedir. İdeal bir kök kanal medikamenti genel olarak;

- Kanalda bulunan tüm mikroorganizmaları ortadan kaldırabilmeli
- Apikal foramen yoluyla sızabilecek eksudanın varlığında aktivitesini sürdürebilmeli
- Kök kanal sisteminin bütün ayrıntılarına diffüz etmeli
- Mikroorganizmalara karşı bakterisid veya bakteriyostatik etki gösterirken, canlı konak dokulara iritan etki göstermemeli
- Periapikal onarımı uyarabilmeli
- Kolay uygulanabilmeli ve gerektiğinde kanaldan kolayca uzaklaştırılabilmeli
- Ucuz olmalı

- Hızlı etki göstermelidir (70) .

Bu amaç doğrultusunda birçok farklı medikament kullanılmıştır. Bunlar arasında kalsiyum hidroksit, fenol bileşikleri, ojenol ve kafurlu paraklorofenol, iyodin potasyum iyodid , glutraldehit, formokrezol, klorheksidin ve kortikoid içeren veya içermeyen antibiyotikli patlar sayılabilir.

2.4.1. Kalsiyum Hidroksit (Ca(OH)₂)

Periapikal lezyonların cerrahi olmayan kanal tedavisi sonrası doku iyileşmesi vücudun herhangi bir yerindeki bağ dokusu iyileşmesinin genel prensipleri ile aynıdır. Kök kanalındaki irritanlar endodontik tedavi ile elimine edildiklerinde, immünoinflamatuar hücreler de azaldıklarından periapikal dokulardaki inflamatuvar mediatörlerin de üretimi azalır. Fibrovasküler granülasyon dokusu oluşumu, nekrotik doku ve ölü bakterilerin makrofajlar tarafından kaldırılması ve son olarak tamir ve/veya rejenerasyon ile iyileşme gerçekleşir. Periapikal lezyonlarının iyileşmesinin büyük bir çoğunluğu rejenerasyon ile sağlanmakta iken bir kısmı fibrozis ile olmaktadır (71) . Periapikal doku iyileşmesindeki lokal doku yerleşik hücreleri; alveolar kemikteki osteoblastlar; kemik iliği stromal hücreleri ve periodontal ligamentteki multipotent kök hücreleridir (72) . Periapikal doku iyileşmesi esnasında bazı istenmeyen hücreler (örneğin; endotelial hücreler, fibroblastlar ve epitel hücreleri) apoptoz ile yok edilir ve ekstraselüler matriks, metalloproteinazlar tarafından yeniden şekillendirilir ve hasarlı periapikal dokular rejenerasyon ile ideal olarak orijinal formuna dönüştürülür (71) .

Kanal tedavisi esnasında bakteri ve bakteri ürünlerinin enfekte kök kanalından uzaklaştırılması ve dezenfekte hale gelmiş kök kanalının tamamen tıkanması amaçlanmaktadır (73-75) . Günümüzde temizleme ve şekillendirme prosedürleri her ne kadar önemini sürdürse de, kanal içi medikament uygulaması kanalda kalmış bakterilerin öldürülmesinde hala etkili bir yöntem olarak kullanılmaktadır. Ca(OH)₂; uzun süre dayanıklılığı ve sınırlı alandaki bakterisidal etkisinden dolayı kanal içi medikament olarak kullanıma en uygun ajan olarak değerlendirilmektedir (76) .

Endodontiye ilk kez Hermann tarafından 1920 yılında pulpa kaplama ajanı olarak tanıtılmıştır (77) ancak günümüzde endodontik tedavide; seanslar arası kanal içi medikament, kök kanal dolgu patı, apeksifikasyon materyali ve pulpa kaplama ajanı olarak da kullanılmaktadır. Kullanım periyodu intrakanal medikasyonu için 7 günden başlamakta, apeksifikasyon için 6 aydan 24 aya kadar uzayabilmektedir (78) . Beyaz renkli, kokusuz, Ca(OH)_2 formüllü bir tozdur. pH'sı 12,5-12,8 civarındadır ve kimyasal olarak güçlü bir baz olarak sınıflandırılmaktadır (79) . Su içeren bir sıvı ile temasında kalsiyum ve hidroksil iyonlarına ayrışmaktadır (80) . Vital dokular üzerindeki antibakteriyel ve sert doku oluşumunu indüklemeye etkileri bu iyonik ayrışmanın bir sonucudur (81) . Hidroksil iyonları yüksek derecede serbest oksijen radikalleridir ve bazı biyomoleküllerle aşırı şekilde reaktivite gösterirler. Bu reaktivite gelişigüze, bu nedenle bu serbest radikaller üretildikleri alanın dışına nadiren çıkarlar (82) . Hidroksil iyonları bakteri hücreleri üzerinde; bakteriyel sitoplazmik membrana zarar vererek, protein denatürasyonu yaparak ve bakteri DNA'sına zarar vererek öldürücü etkilerini gerçekleştirmektedir (82) . Hidroksil iyonları aynı zamanda tamiri teşvik eden ve aktif kalsifikasyonu sağlayan alkalik bir ortam yaratır. Alkalik pH sadece osteoklastlardan salgılanan laktik asiti nötralize etmekle kalmaz, sert doku oluşumunda önemli bir role sahip olan alkalik fosfatazı da aktive eder (83) .

Ca(OH)_2 'in kök kanalına yerleştirilmesini takiben, yüksek pH'sı devam ettiği müddetçe antibakteriyel etkisinin de devam ettiği ileri sürülmektedir (82,84) . Yapılan bir çalışma enfekte kök kanallarına 7 günlük Ca(OH)_2 uygulanmasının, kanaldaki bakterileri negatif kültür verecek seviyede azalttığını göstermiştir (85) . Ayrıca aköz bir Ca(OH)_2 patının dentin tübüllerindeki endodontik enfeksiyonların majör patojeni olan *Enterococcus faecalis*'in (*E. Faecalis*) yok edilmesinde etkili olduğu gösterilmiştir (86) . Buna karşılık; kök kanal dentininin, kalsiyum hidroksitin antimikrobiyal etkisini yok edebilecek bir tamponlama kapasitesi olduğuna dair kanıtlar artmaktadır (87,88) . İn vitro çalışmalar dentin tozlarının kalsiyum hidroksitin antibakteriyel etkisini inhibe ettiğini göstermektedir (89) . Ayrıca, Ballal ve arkadaşlarının agar difüzyon testi kullanarak yaptıkları bir çalışmada kalsiyum hidroksitin 24. ve 72. saatlerde klorheksidin gibi diğer medikamentlere kıyasla *E.*

faecalis üzerinde etkisizliğini göstermektedir (90) . Başka bir çalışmada E.faecalis ve Candida albicans (C. albicans) ile kök kanal dentini enfekte edilmiş, ardından Ca(OH)₂ uygulanmış ve belirli zaman periyotlarında alınan örneklerdeki mikrobiyal içerik incelendiğinde Ca(OH)₂'in E.faecalis ve C. Albicans' a karşı yeterli antimikrobiyal etki gösteremediği saptanmıştır (91) . Yapılan başka bir çalışma dentin tübülleri içerisindeki E. Faecalis ve Enterococcus faecium'a (E. Faecium) karşı (CaOH)₂'in kanala bir haftalığına yerleştirilmesinin bu bakterileri elimine etmekte yetersiz kaldığı ve fakültatif bakteriler tarafından enfekte edilmiş dentin tübüllerini dezenfekte etmek için yerleştirilen kalsiyum hidroksitin en az 10 güne kadar kanalda kalması gerektiğini iddia eden çalışmalar da olmuştur (92,93) . Ancak (CaOH)₂ kök kanalında uzun dönem kullanımının kök kırığı riskini arttırdığı bildirilmektedir (20) . Çalışmalar ile uzun dönem temasın diş yapısının organik matriksini bozduğu ve böylece dentinin mekanik özelliklerini değiştirdiğini söylemektedir (20,94) .

Kanala yerleştirilen kalsiyum hidroksit, kanal, daimi kök kanal dolgu materyali ile doldurulmadan önce tamamen kanaldan uzaklaştırılmalıdır. İn vitro çalışmalar kanalda kalan kalsiyum hidroksit artıkları nedeniyle kanal dolgu patlarının dentin tübüllerine penetre olamadığını (95) , rezin içerikli patların da dentine adezyonunun engellendiğini ve kök kanal dolgusu yapılmış dişlerde apikal sızıntıyı belirgin bir şekilde arttırdığını göstermektedir (96) .

Kalsiyum hidroksitin proinflamatuvar sitokinler ve nöropeptidler üzerine etkilerinin incelendiği bir çalışmada, kalsiyum hidroksitin IL-1 α ve TNF- α 'yı denatüre ettiği gösterilmiştir (17) . Yapılan başka bir çalışmada ise kalsiyum hidroksitle doldurulan çekilmiş dişlerin, farelerin sırt subkütanöz dokularına implantasyonunu takiben 12. saat, 1. ve 3. günlerde çevre dokulardan alınan örneklerde TNF- α ve İnterlökin-1 β (IL-1 β) salınımını arttırdığı saptanmıştır (97) . Apikal periodontitis oluşturulmuş köpek dişlerinde kalsiyum hidroksit kullanılarak yapılan kanal tedavileri sonrası ölçülen MMP seviyeleri, tek seansta yapılan ve kanal tedavisi yapılmayan kontrol grubuyla kıyaslandığında belirgin bir şekilde azalma gözlenmiştir (18) .

Kalsiyum hidroksitin tüm olumlu özelliklerinin yanında, birtakım olumsuz özelliklerinin de bulunması, bizi farklı bir materyal arayışına götürmüştür. Bu nedenle çalışmamızda NAC, (CaOH)₂'e alternatif olarak düşünülmüştür.

2.4.2. N-asetil Sistein (NAC)

N-asetil sistein, doğal bir aminoasit olan L-asetil sistein'in N-asetillenmiş bir türevi olup, direk ve indirek antioksidan özellikler gösteren bir moleküldür (21,98) . Sülfidril grupları sayesinde, serbest oksijen radikallerini direk nötralize etme yeteneğine sahiptir. NAC hücreye girdikten sonra hücre içi redoks dengesinde önemli rol oynayan glutatyon (GSH) molekülünün öncülü olan L-sistein'e dönüşür. Bu antioksidan kapasite hücreleri oksidatif stresten korur (99) . Hücrel oksidan/antioksidan dengeden sorumlu anahtar faktör olan, glutatyon molekülünün öncülüdür. Yapılan çalışmalar NAC'nin, dişhekimiğinde kullanılan birtakım kimyasal ajanlar nedeniyle oluşan reaktif oksijen moleküllerinin yarattığı hücre hasarını engellemeye yardımcı olduğunu göstermiştir (24,100) . NAC'nin kompozit restorasyon materyalinin pulpa üzerine toksik etkilerini nötralize edilebildiğini ve de hücre ölümünün baskılandığı yapılan bir çalışmayla gösterilmiştir (24) . Bunun yanı sıra NAC materyalinin ratlarda pulpa kaplama maddesi olarak denendiği bir çalışmada reperatif dentin oluşumunu sağladığı ifade edilmiştir (101) . Ayrıca osteoklast farklılaşmasını engelleyerek kemik rezorpsiyonunu önlediği de yapılan bir çalışmayla gösterilmiştir (102) .

NAC'nin,yüksek doz parasetamol tedavisinde, HIV enfeksiyonu, kanser, kalp hastalığı ve sigara kullanımı gibi oksidatif stres durumlarında ve mukolitik bir ajan olarak da kullanıldığı bilinmektedir (21,98,103) . Anti-inflamatuar aktivitesi çeşitli pro-inflamatuar sitokinlerin salınımını inhibe ederek (104) ve sitokinler tarafından stimüle edilen lökosit adezyon moleküllerinin salgılanmasını azaltarak gerçekleşmektedir (105,106) . Ayrıca fibroblast proliferasyonu ve kollojen sentezi üzerinde etkili olduğu (107,108) ve MMP-9 salınımını inhibe ettiği rapor edilmiştir (109,110) . Bu özellikleriyle bağlantılı olarak da NAC'ın osteoklast farklılaşmasını engelleyerek kemik rezorpsiyonunu önlediği de gösterilmiştir (102) .

NAC; antibiyotik olmayan ancak antibiyotik özelliklere sahip bir bileşiktir ve *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* ve *Escherichia coli* gibi, gram negatif ve gram pozitif bakteri biyofilmlerini etkili bir şekilde azalttığı rapor edilmiştir (111) . Yapılan bir çalışmada ise, dentin yokluğunda *E. Faecalis*'in planktonik ve biyofilm formları üzerinde bakterisidal etki gösterdiği ancak ortamda dentin tozları varlığında bu etkiyi sağlayamadığı vurgulanmıştır (112) . NAC'ın olgun biyofilmleri bozarak ve bakterinin yüzeylere adezyonunu azaltarak ekstraselüler polisakkarit yapımını azaltmakta etkili olduğu bilinmektedir (104,113) .

Tüm bu yukarıda sayılanlar NAC'nin diş hekimliğinde kullanılabilecek bir materyal olduğunu göstermektedir. Periapikal lezyonlu dişlerin tedavisinde amaç, hem yıkımın durdurulması, hem de kanal dolgusunu takiben, yıkılan kemik dokusunun rejenere olmasının sağlanmasıdır. Buradan yola çıkarak antiinflamatuvar, antioksidan ve koruyucu etkinliği çeşitli çalışmalarla gösterilen NAC'nin kalsiyum hidroksite alternatif olabileceği düşünülmüştür.

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Çalışmamızda insan monosit öncülü olan THP-1 hücre hatları kullanılmıştır. THP-1 hücreleri 37°C de %5 CO2 etüvünde, %10 oranında ısı ile inaktive edilmiş FBS (fetal dana serumu) (Biochrome S0113), %1 L-glutamin (Biochrome K0283) ve %1 streptomisin/penisilin antibiyotiği (Biochrome A2213) içeren RPMI-1640 (Biochrome F1215) besi yeri içerisinde, haftada 3 kez pasajlanacak şekilde çoğaltılmıştır.

3.1. THP-1 Hücrelerinin Farklılaştırılması

Pre-monosit olarak sınıflandırılan THP-1 hücreleri normalde süspansiyon halinde bulunmaktadır. Çeşitli maddeler aracılığıyla, farklılaştırma protokolleri uygulanarak bu hücreler makrofaj haline dönüştürülmektedir. Bu çalışmada çoğaltılan THP-1 hücreleri, bir DAG (Diacilgliserol) türevi olan PMA (Forbol 12-Myristat 13-Asetat) (Sigma Chemical Co P1585) ile farklılaşmaya uğratıldı. 400nM derişimde PMA içeren besi yerinde 3 gün inkübasyonun ardından, 4 gün boyunca PMA içermeyen normal besi yerinde her gün besiyeri değiştirilerek taze besi-yeri eklenip inkübe edilen THP-1 hücreleri makrofaj hücrelerine dönüştürülmüş ve hücrelere yapışık hücre özelliği kazandırılmıştır.

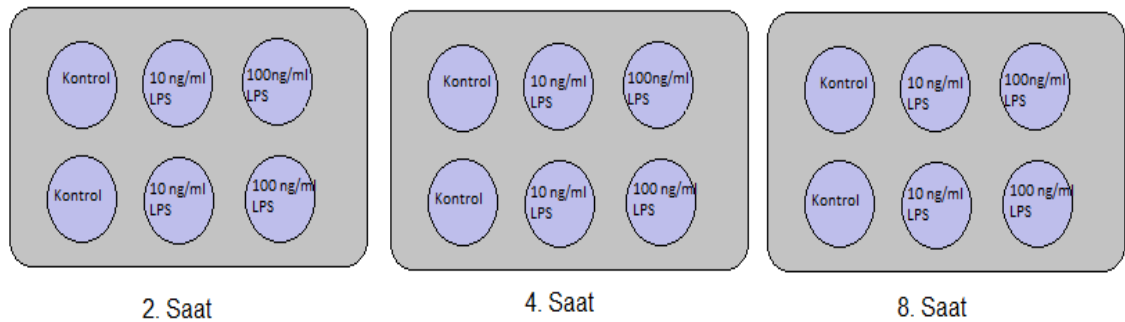
3.2. Akım Sitometri Analizi

THP-1 hücreleri hücre kültür ortamında çoğaltılıp farklılaştırıldıktan sonra belirlenen medikament konsantrasyonları hücrelere uygulandı Propidyum iyodid boyaması ile akım sitometri cihazında hücrelerin canlılık yüzdesibelirlendi. Bu amaçla THP- 1 hücreleri PMA ile farklılaştırıldı. Tüm deney grupları dublike çalışıldı. Akım sitometride propidyum iyodid ile analiz için her flow tüpünde yaklaşık 1,5 milyon hücre olması sağlandı. Bu testteki aşamalar;

1. Hücreler inkübasyon sonrasında RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute medium), besi yeri ile yıkandı ve 1 ml’de süspanse edildi.
2. Her bir tüp içine 10 µl PI (stok solüsyon 1 mg/ml Propidyum İyodid Sigma 4170) eklendi.
3. 20 dakika karanlıkta oda ısısında inkübe edildi.
4. Akım sitometri cihazında (EPICS XL-MCL, Beckman Coulter, USA) iki değişkenli histogramda hücreler analiz edilerek hücre canlılığı yüzdesi belirlendi.

3.3. Uygun Lipopolisakkarit Dozunun Belirlenmesi

Çalışmamızda hücrelerde inflamasyon yaratmak için Escherichia Coli (E.coli) lipopolisakkariti (LPS) (Sigma L2630) kullanılmıştır. İnflamasyon oluştuğunda ortama en hızlı salınan sitokinlerden birinin TNF- α olması nedeniyle LPS dozunun belirlenmesi için ELISA testi ile TNF- α sitokin salınımına bakıldı. THP-1 hücreleri yeterli sayıya ulaştığında 6 kuyucuk içeren plaklarda her bir kuyuda yaklaşık 1,5 milyon hücre olacak şekilde ikili çalışıldı. PMA ile 3 gün farklılaşma 4 gün dinlenme işleminden sonra 100 ng/ml ve 10 ng/ml LPS dozları örneklere uygulandı. Kontrollere ise lipopolisakkarit içermeyen besi yeri konuldu (şekil 3.1.). 2., 4.ve 8. saatlerde hücreler “scrapper” ile kazılarak RPMI besi yeri ile birlikte ependorf adı verilen küçük plastik tüplere alındı.



Şekil 3.1. İkinci, dördüncü ve sekizinci saatler için çalışılan 6-kuyulu plakların şematik gösterimi

LPS dozunun, TNF- α sitokin salınımına göre ELISA kiti ile belirlenmesi

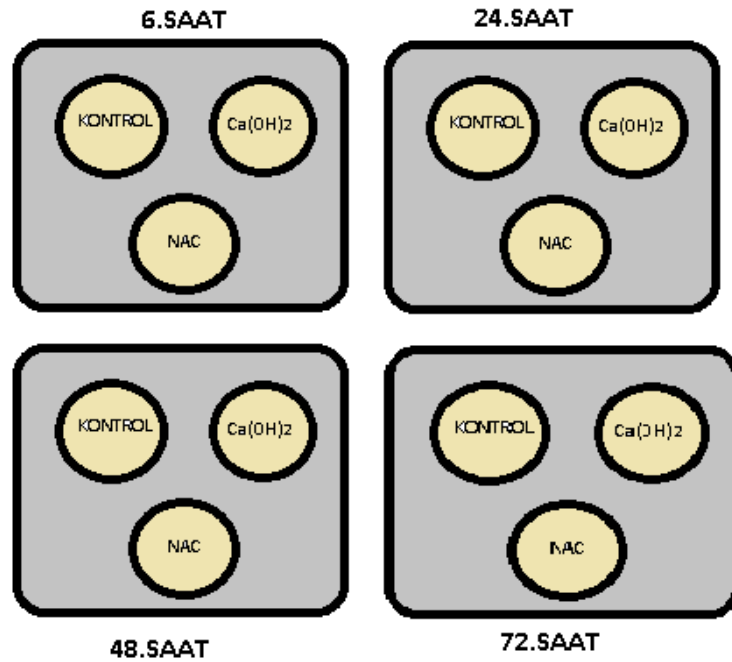
1. Örnekler 3000 rpm 5 dakika 4 C de santrifüj edildi.
2. Süpernatantlar TNF- α ELISA ölçümü için ayrıldı.
3. Mikro-kuyucuklar 2 kere yıkama tamponu ile yıkandıktan sonra A1,2-G1,2 mikro-kuyucuklarına 100 μ l standart dilüsyonları eklendi.
4. H1 ve H2 boş kuyucuklarına 100 μ l örnek dilüsyonu konulduktan sonra deney kuyucuklarına (A3,4,5-H3,4,5) 50 μ l örnek dilüsyonu eklendi.
5. Deney kuyucuklarına (A3,4-H3,4,) 50 μ l deney süpernatantı, A5-H5 'e ise deney süpernatantlarının 1/5 dilüsyonları eklendi.
6. Kuyucuklara 50 μ l biyotin bileşiği konuldu, 2 saat oda sıcaklığında mikro karıştırıcıda inkübe edildi ve ardından yıkama tamponu ile 4 kere yıkandı.
7. Her bir kuyucuğa 100 μ l Streptavidin –HRP bileşiği konuldu ve 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra yıkama tamponu ile 4 kere yıkandı.
8. 100 μ l TMB substrat solüsyonu tüm kuyucuklara eklendi ve 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi
9. 100 μ l durdurma solüsyonu tüm kuyucuklara eklendi ve 450 nm dalga boyunda, ELISA okuyucusunda okundu.

3.4. THP-1 Hücrelerine Etken Madde Uygulanması

Farklılaştırma protokolü sonucunda yapışık makrofaj hücreler haline getirilen THP-1 hücrelerinin üzerinden besi yeri çekildi. Kontrol gruplarına taze besi yeri, ilaç gruplarına ise akım sitometri sonucuna göre belirlenen 40 μ g/ml Ca(OH)₂ ve 10 mM NAC içeren besi yerleri eklendi. Hücreler 37 °C %5 CO₂ içeren etüvde 24 saat inkübasyona bırakıldı.

3.5. THP-1 Hücrelerine LPS Uygulanması

Deney gruplarındaki hücrelerin üzerindeki ilacli besi yeri çekildi ve 10 ng/ml LPS içeren besi yeri konuldu ve deney düzeneği şekildeki gibi oluşturuldu (şekil 3.2.).



Şekil 3.2. Kontrol ve medikament uygulanmış THP-1 hücrelerinde gruplarının şematik görünümü

ELISA testi için 6., 24., 48. ve 72. saatlerde deney gruplarındaki hücreler RPMI besi-yeri ile birlikte ependorflara alındı.

3.6. Matriks Metalloproteinaz Ve Doku İnhibitör Matriks Metalloproteinaz Protein Seviyelerinin Belirlenmesi

Örnekler, 3000 rpm'de 4 °C'de 5 dakika süreyle santrifüj edilerek supernatanlar 200'er mikrolitrelik parçalara ayrıldı ve analiz edilene kadar -80 °C buzdolabında bekletildi. Protein seviyelerinin belirlenmesinde hassasiyetinin yüksek oluşu, uygulama aşamalarının kolaylığı ve kullanacağımız örnek tipine uygunluğu nedeniyle R&D marka (R&D Systems, Inc. USA) Elisa kitleri kullanıldı.

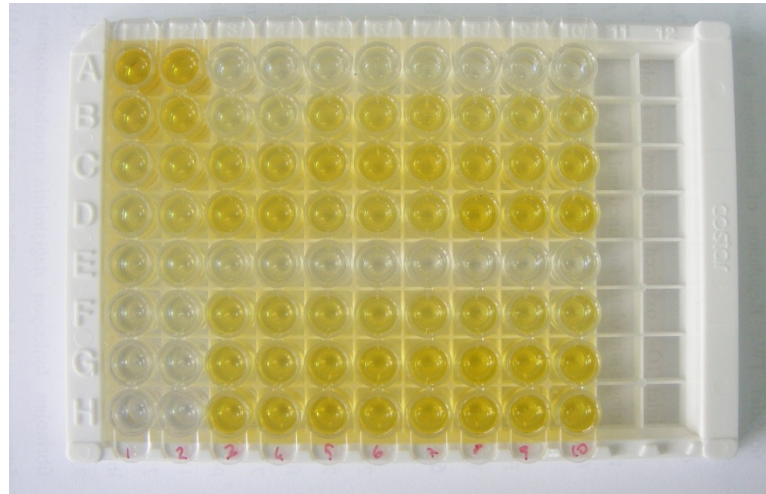
3.6.1. MMP-9

Tüm reaktifler ve standartlar deney prosedürü başlamadan önce üreticinin önerilerine göre hazırlandı.

1. Her bir kuyucuğa 100 µl Dilüsyon solüsyonu eklendi.
2. A1-G1 ve A2-G2 kuyucuklarına 100'er mikrolitre standart dilüsyonlarından eklendi.
3. Örnekler kuyucuklara ½ dilüsyonda 100'er mikrolitre eklendi. Mikroplate adeziv stripile kapatılıp 450 rpm ayarda çalkalayıcıda 2 saat inkübasyona bıkarıldı. Triplike çalışıldı.
4. İnkübasyonun ardından her bir kuyu aspire edildi, toplamda 4 yıkama olacak şekilde yıkandı ve temiz kurulama kağıdına ters çevrilerek kurulandı. Her yıkamada her bir kuyu için 400µl yıkama tamponu kullanıldı.
5. Her bir kuyu'ya 200µl MMP-9 Konjugat'ı eklendi. Yeni bir adeziv stripile kapatılıp, mikroplate shakerde 450 rpm'de 1 saat inkübasyona bırakıldı (şekil 3.3.).
6. İnkübasyonun ardından 4. aşamadaki yıkama işlemi tekrar edildi.
7. Her bir kuyu 200µl Substrat Solüsyonu eklendi ve 30 dakika ışık görmeyen ortamda inkübasyona bırakıldı.
8. İnkübasyonun ardından her bir kuyu'ya 50µl stop solüsyonu eklendi (Şekil 3.4.).
9. Her bir well'in optik dansitesi üreticinin talimatları doğrultusunda spektrofotometrede (SpektraMax M2 Mikroplate Reader, Molecular Devices LLC, California, USA) 450 nm dalga boyunda ölçüldü ve SoftMax Pro yazılımı yardımıyla sonuçlar elde edildi.



Şekil 3.3. Heidolph Titramax 101 orbital shaker cihazı ve 450 rpm’de inkübasyona bırakılan plak.



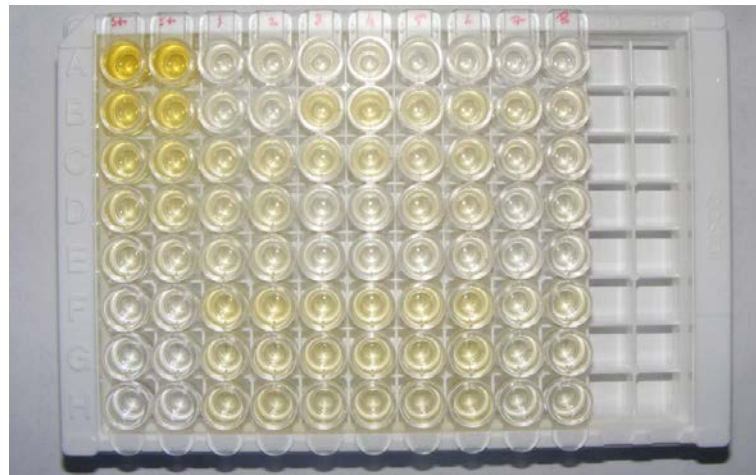
Şekil 3.4.: Stop solüsyonu eklendikten sonra spektrofotometrede okunmaya hazır plak.

3.6.2. TIMP-1

Tüm reaktifler ve standartlar deney prosedürü başlamadan önce üreticinin önerilerine göre hazırlandı.

1. Her bir kuyucuğa 100 µl Dilüsyon solüsyonu eklendi.

2. A1-G1 ve A2-G2 kuyucuklarına 50'şer mikrolitre standart dilüsyonlarından eklendi.
3. Örnekler, 50'şer mikrolitre supernatanlar dilüe edilmeden uygulandı. Mikroplate 450 rpm ayarda horizontal orbital mikroplate shakerda 2 saat inkübasyona bıkarıldı. Örnekler dublike çalışıldı.
4. İnkübasyonun ardından her bir kuyu aspire edildi, toplamda 3 yıkama olacak şekilde yıkandı ve temiz kurulama kağıdına ters çevrilerek kurulandı. Her yıkamada her bir kuyu için 400µl yıkama tamponu kullanıldı.
5. Her bir kuyu'ya 200µl MMP-9 Konjugat'ı eklendi. Yeni bir adeziv strip kapatılıp, çalkalayıcıda 450 rpm'de 1 saat inkübasyona bırakıldı.
6. İnkübasyonun ardından 4. Aşamadaki yıkama işlemleri tekrar edildi.
7. Her bir kuyu'ya 200µl Substrat Solüsyonu eklendi ve 30 dakika ışık görmeyen ortamda inkübasyona bırakıldı.
8. İnkübasyonun ardından her bir kuyu'ya 50µl stop solüsyonu eklendi (Şekil 3.6.).
9. Her bir kuyu'nun optik dansitesi üreticinin talimatları doğrultusunda önce 450 nm dalga boyunda ölçüldü ve SoftMax Pro yazılımı yardımıyla sonuçlar elde edildi.

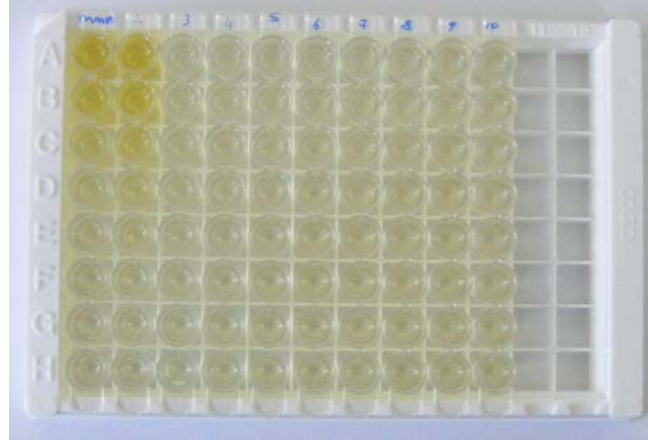


Şekil 3.6. Stop solüsyonu eklendikten sonra okunmaya hazır plak (TIMP-1)

3.6.3. MMP-2

Tüm reaktifler ve standartlar deney prosedürü başlamadan önce üreticinin önerilerine göre hazırlandı.

1. Her bir kuyucuğa 100 µl Dilüsyon solüsyonu eklendi.
2. A1-G1 ve A2-G2 kuyucuklarına 50'şer mikrolitre standart dilüsyonlarından eklendi.
3. Örnekler 50'şer mikrolitre dilüe edilmeden eklendi. Mikroplate adeziv striple kapatılıp 450 rpm ayarda horizontal orbital mikroplate shakerda 2 saat inkübasyona bıkarıldı. Dublike çalışıldı.
4. İnkübasyonun ardından her bir kuyucuk aspire edildi, toplamda 4 yıkama olacak şekilde yıkandı ve temiz kurulama kağıdına ters çevrilerek kurulandı. Her yıkamada her bir kuyucuk için 400µl yıkama tamponu kullanıldı.
5. Her bir kuyu'ya 200µl MMP-9 Konjugat'ı eklendi. Yeni bir adeziv striple kapatılıp, mikroplate shakerde 450 rpm'de 1 saat inkübasyona bırakıldı.
6. İnkübasyonun ardından 4. aşamadaki yıkama işlemleri tekrar edildi.
7. Her bir kuyu'ya 200µl Substrat Solüsyonu eklendi ve 30 dakika ışık görmeyen ortamda inkübasyona bırakıldı.
8. İnkübasyonun ardından her bir well'e 50µl stop solüsyonu eklendi (Şekil 3.7.)
9. Her bir kuyu'nun optik dansitesi üreticinin talimatları doğrultusunda 450 nm dalga boyunda ölçüldü ve SoftMax Pro yazılımı yardımıyla sonuçlar elde edildi



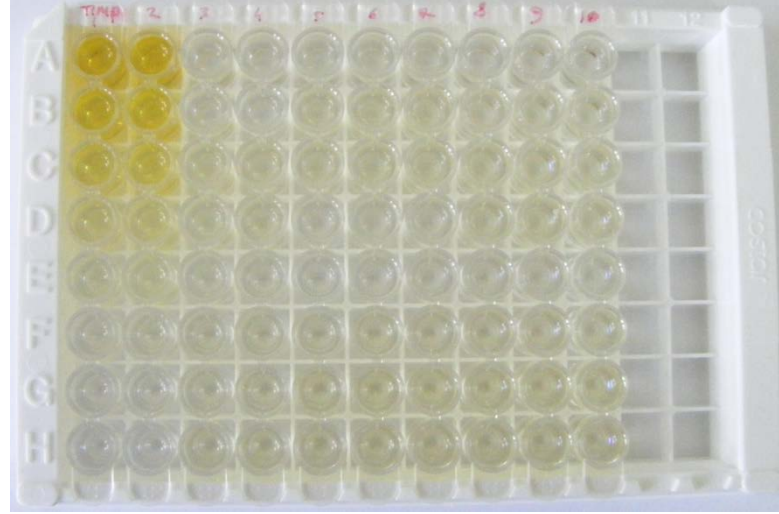
Şekil 3.7. Stop solüsyonu eklendikten sonra okunmaya hazır plak (MMP-2)

3.6.4. TIMP-2

Tüm reaktifler ve standartlar deney prosedürü başlamadan önce üreticinin önerilerine göre hazırlandı.

1. Her bir kuyucuğa 100 µl Assay Diluent eklendi.
2. A1-G1 ve A2-G2 kuyucuklarına 50'şer mikrolitre standart dilüsyonlarından eklendi.
3. Örnekle 50'şer mikrolitre dilüe edilmeden eklendi. Mikroplate adeziv stripile kapatılıp 450 rpm ayarda çalkalayıcıda 2 saat inkübasyona bıkardı. Triplike çalışıldı.
4. İnkübasyonun ardından her bir kuyu aspire edildi, toplamda 4 yıkama olacak şekilde yıkandı ve temiz kurulama kağıdına ters çevrilerek kurulandı. Her yıkamada her bir kuyu için 400µl yıkama tamponu kullanıldı.
5. Her bir kuyu'ya 200µl MMP-9 Konjugat'ı eklendi. Yeni bir adeziv stripile kapatılıp, çalkalayıcıda 450 rpm'de 2 saat inkübasyona bırakıldı.
6. İnkübasyonun ardından 4. Aşamadaki yıkama işlemleri tekrar edildi.
7. Her bir kuyu'ya 200µl Substrat Solüsyonu eklendi ve 20 dakika ışık görmeyen ortamda inkübasyona bırakıldı.
8. İnkübasyonun ardından her bir kuyu'ya 50µl stop solüsyonu eklendi (Şekil 3.8.).

9. Her bir kuyu'nun optik dansitesi üreticinin talimatları doğrultusunda 450 nm dalga boyunda ölçüldü ve SoftMax Pro yazılımı yardımıyla sonuçlar elde edildi (şekil 3.9. ve 3.10.).



Şekil 3.8. Stop solüsyonu eklendikten sonra okunmaya hazır plak (TIMP-2)



Şekil 3.9. ve şekil. 3.10. SpektraMax M2 Mikroplak Okuyucu

3.7. Enzimlerin Gen Düzeylerinin RT-PCR Yöntemi İle Belirlenmesi

3.7.1. THP-1 hücrelerinden m-RNA eldesi

RNA izolasyonu için ayrı bir set kuruldu. RT-PCR deneyinde 6, 24, 48 ve 72. saatler çalışıldı. RNA'ların zarar görmeden elde edilmesi için hücreler, 5 hacim Qiagen RNA Protect ve bir hacim PBS (fosfat tampon çözeltisi) karışımından oluşan çözelti yardımıyla toplanmıştır. RNA eldesinde kullanılan tüm malzemeler %1 DEPC (Dietilpyrokarbonat) ile muamele edilmiş sudan geçirilerek RNaz

kontaminasyonunun önlenmesi sağlanmıştır. RNA izolasyonu, Qiagen RNeasy® Plus Mini Kit aracılığıyla yapılmıştır.

1. Hücreler oda ısında çözüldükten sonra vorteks yardımıyla karıştırıldı.
2. 230C 10000 rpm de 6 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üst faz dikkatlice atıldı.
3. Çökelti üzerine 350 µl guanidin-izotiosiyonat içeren RLT tamponu eklenerek yaklaşık 1 dakika vorteks ile karıştırıldı. Ardından 0,9 mm'lik enjektörden geçirildi.
4. Lizat, gDNA eliminatör kolona alınarak 230C 15000 rpm'de 40 saniye santrifüj edildi.
5. Kolondan toplanan örneğe 350 µl %70'lik etanol eklendi. RNeasy spin kolonda 230C 15000 rpm'de 25 saniye santrifüj edildi. Kolonun altında kalan sıvı atıldı.
6. Kolona bağlanan RNA'lar önce 700 µl RW1 tamponu ardından da iki kez 500 µl RPE tamponu ile 230C 15000 rpm'de 25 saniye santrifüje edilerek yıkandı.
7. Kolon temiz bir ependorf tüpüne alınarak üzerine 15 µl RNaz içermeyen su eklendi, 230C 15000 rpm'de 1 dakika santrifüje edildi.
8. Kolona 10 µl RNaz içermeyen su eklendi, 230°C 15000 rpm'de 1 dakika santrifüje edildi.
9. Örnekler analiz boyunca buz içerisinde bekletildi.

3.7.2. RNA saflığının belirlenmesi ve konsantrasyonunun ölçülmesi

RNA'nın saflığı ve miktarı spektrofotometrik olarak, NanoDrop ND1000 Spektrometre (Thermo Scientific) cihazı kullanılarak ölçüldü (şekil 3.11.). Konsantrasyon ve 260/280 değerleri elde edildi.



Şekil 3.11. Nano Drop ND-1000 (Thermo Scientific) cihazı

3.7.3. cDNA sentezi

cDNA sentezi için Transkriptor High Fidelity cDNA sentez kiti (Roche Diagnostics GmbH, Germany) kullanıldı.

Karışım I:	RNA	1 µg
	Primer (600 pmol/ µl)	2 µl
	RNaz'sız dH ₂ O	11.4 µl'ye tamamlayacak kadar
	TOPLAM:	11.4 µl

Karışım I hazırlandıktan sonra RNA'lar 65°C'de 10 dk denatüre edildi ve inkübasyondan sonra örnekler hızlı bir şekilde buz üzerine alındı. Örnekler buzda beklerken, karışım II hazırlandı.

Karışım II:	Reaksiyon Tamponu (5X)	4 µl
	Reverse transkriptaz	1,1 µl
	RNaz inhibitörü (40 U/µl)	0,5 µl
	Deoks nükleotid karışımı (10 mM)	2 µl
	DTT	1 µl
	TOPLAM:	8,6 µl

Buzda bekleyen örneklere karışım II'den 8,6 µl eklendi ve reaksiyon '*Gene Amplification PCR System 9700 Applied Biosystem*' cihazı kullanılarak aşağıdaki şartlarda gerçekleştirildi:

Reaksiyon Şartları:

50 °C 30 dk

85°C 5 dk

Sentez tamamlandıktan sonra 20 µl'lik ürünlere, 60 µl dH₂O eklenerek hacim 80 µl'ye çıkarıldı ve örnekler -20°C'de saklandı.

3.7.4. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Real Time Polimerase Chain Reaction- RT-PCR) floresan boyalar kullanılarak gerçek zamanlı olarak DNA'nın belirlenmesi ve miktarının gösterilmesi tekniğidir. Bu yöntemde floresan sinyali PCR ürün miktarıyla doğru orantılı olarak artmakta ve sonuçlar PCR analizi sırasında elde edilebilmektedir. Çalışmamızda hidroliz probe tekniği kullanılarak çalışılmıştır.

Polimeraz zincir reaksiyon koşulları

Primer-probe karışımı 1x hacim için

Distile su	3,7µl
Forward primer	0,05 µl
Reverse primer	0,05µl
Gene özgül probe	0,2 µl
<hr/>	
Toplam	4 µl

1x hacim için elde edilen bu karışımdan	0,5 μ l
Distile su	3,5 μ l
Taq polimeraz enzimi	5 μ l
cDNA	1 μ l
<hr/>	
Toplam	10 μ l

Her bir kuyucuk için hazırlanan 10 μ l karışım 1800 rpm'de 30 sn santrifüjlendikten sonra Light Cyler 480 II (Roche) (Şekil 3.12) cihazına yerleştirilip 55 döngü olacak şekilde reaksiyon tamamlanmıştır.



Şekil 3.12. Light Cyler 480 II RT-PCR cihazı

Deneylerdeki değişkenlere bağlı olarak meydana gelen ifade değişimleri göreceli ($\Delta\Delta C_t$ yöntemi) yöntemiyle manuel olarak hesaplanmıştır. İfade değişimleri hesaplanırken, farklı fizyolojik durumlarda ifadesi en az değişen HPRT-1 house-keeping gen ifadesi normalizatör olarak kullanılmıştır.

3.8. Verilerin Değerlendirilmesi

Çalışmamızda istatistiksel karşılaştırmalar, ‘‘SPSS 15.0 for Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)’’ istatistik paket programı ile yapılmıştır. Verilerin değerlendirilmesinde gruplar arasındaki farklılıklar İki Yönlü Varyans Analizi ile, ikili karşılaştırmalar ise Bonferroni testiyle yapıldı. Anlamlılık sınırı olarak $p < 0,05$ kullanıldı.

4. BULGULAR

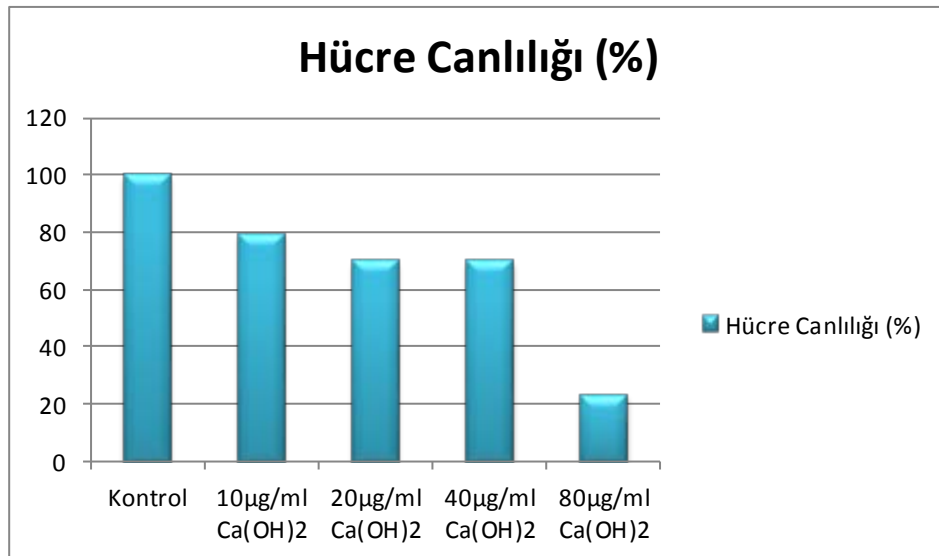
4.1. Uygun İlaç Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

4.1.1. Akım Sitometri Analizi

Propidyum iyodid boyaması ile akım sitometri cihazında belirlenen hücre canlılığı tablo 4.1. ve 4.2. ve şekil 4.1. ve 4.2.'de gösterilmiştir.

Tablo 4.1. Ca(OH)₂ uygulanan hücreler için akım sitometri'de propidyum iyodid ile hücre canlılığı analiz sonuçları.

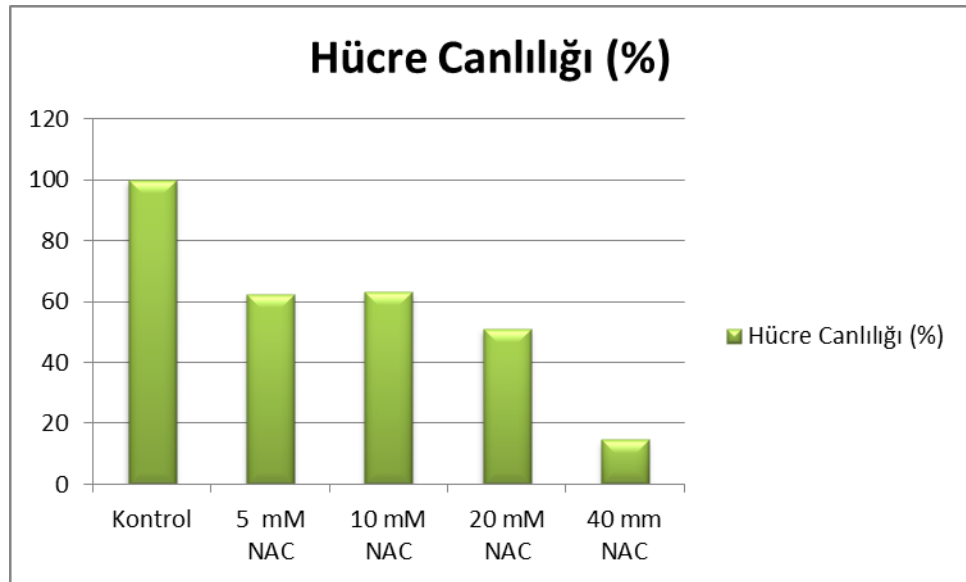
THP-1	Hücre Canlılığı (%)
Kontrol	100
10µg/ml Ca(OH) ₂	80
20µg/ml Ca(OH) ₂	70
40µg/ml Ca(OH) ₂	70
80µg/ml Ca(OH) ₂	23



Şekil 4.1. Kalsiyum hidroksit grubunun akım sitometri'de propidyum iyodid (PI) boyaması ile analiz edilen hücre canlılığı yüzdelerinin grafiksel gösterimi.

Tablo 4.2. NAC uygulanan hücreler için akım sitometri’de propidyum iyodid ile hücre canlılığı analiz sonuçları.

THP-1	Hücre Canlılığı (%)
Kontrol	100
5 mM NAC	62,5
10 mM NAC	63
20 mM NAC	51
40 mM NAC	14,5

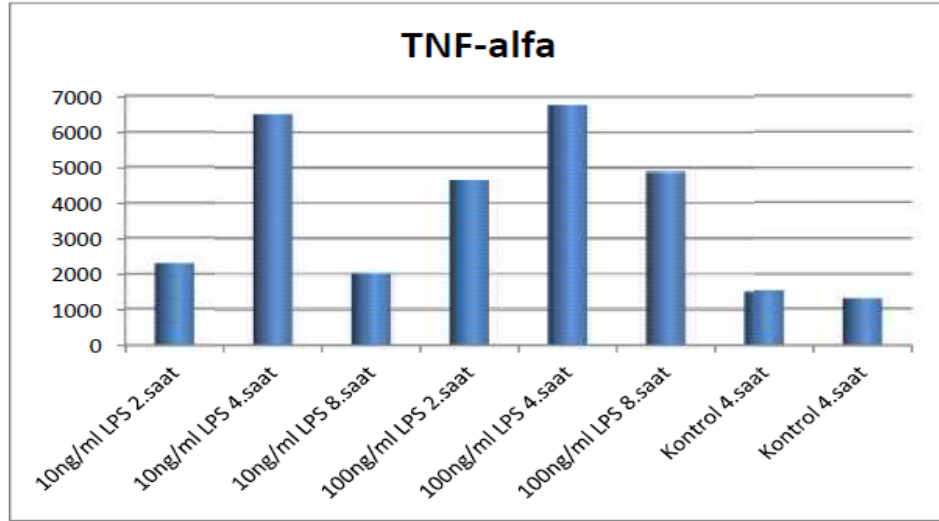


Şekil 4.2. NAC grubunun akım sitometri’de propidyum iyodid (PI) boyaması ile analiz edilen hücre canlılığı yüzdelerinin grafiksel gösterimi.

Deneyler sırasında %50 den fazla hücre kaybı istenmediği için yaklaşık %40 ve altındaki literatürle uyumlu dozlar deneyde kullanım dozajı olarak belirlendi. Buna göre, akım sitometri’de propidyum iyodid (PI) ile hücre canlılığı analizi sonucu Ca(OH)₂ in dozajı 40 µg/ml, NAC in dozajı ise 10 mM olarak belirlendi.

4.2. Uygun LPS Dozunun Belirlenmesi

Deneyde kullanılacak uygun LPS dozunun belirlenmesi için 10 ng ve 100 ng LPS uygulanmış hücrelerde 2, 4 ve 8. saatlerde elde edilen ELISA ölçüm sonuçları Şekil 4.3.' de görülmektedir.



Şekil 4.3. THP-1 hücrelerinde TNF- α sitokin salınımı.

Şekil 4.3. de özetlenen sonuçlara bakıldığında LPS ile uyarılmış makrofaj hücrelerinde 4. saatte TNF-alfa salınımının pik yaptığı ve 10 ng/ml ile 100 ng/ml arasında inflamasyon yaratmak açısından çok fark olmadığı gözlenmiştir. Bütün bu pilot çalışmanın sonucunda 10 ng/ml LPS dozajının inflamasyon yaratmada yeterli olduğu gözlenmiş ve LPS dozajı olarak 10 ng/ml olarak belirlenmiştir.

4.3. mRNA ve Protein Seviyelerinin Belirlenmesi

Çalışmamızın verileri 2 yönlü varyans analizi ile incelendiğinde gruplar arası yapılan değerlendirmede istatistiksel olarak önemli farklılıklar olduğu görülmüştür ($p < 0,05$). Bonferonni testi ile yapılan ikili karşılaştırmalar Tablo 4.3- 4.16 arasında, farklı zaman aralıklarındaki MMP-9, TIMP-1, MMP-2 ve TIMP-2'nin mRNA ve protein düzeylerinin değişimleri ise Şekil 4.4.- 4.18. de gösterilmiştir

4.3.1 MMP-9

4.3.1.1 MMP-9 mRNA Seviyeleri

MMP-9 mRNA ve protein düzeyi değişimleri Tablo 4.3- 4.4 ve Şekil 4.4’de gösterilmektedir.

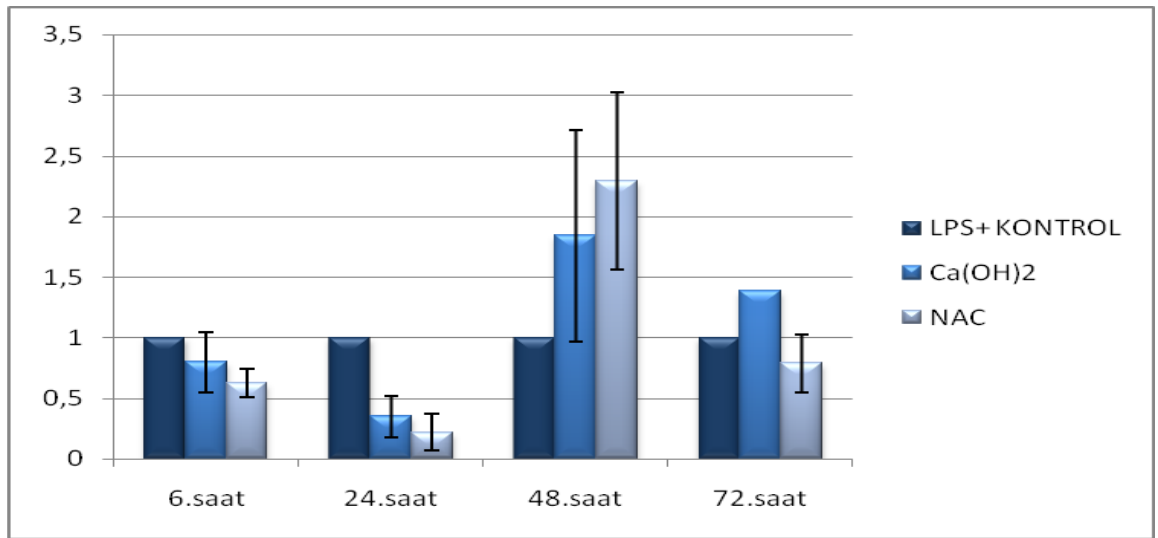
Tablo 4.3. MMP-9 mRNA düzeyi istatistiksel farklılık tablosu

	MMP-9	6.SA			24.SA			48.SA			72.SA		
		Kontrol	Ca(OH) ₂	NAC	Kontrol	Ca(OH) ₂	NAC	Kontrol	Ca(OH) ₂	NAC	Kontrol	Ca(OH) ₂	NAC
6.SA	Kontrol			S									
	Ca(OH) ₂					S			S				
	NAC	S					S			S			
24.SA	Kontrol					S	S						
	Ca(OH) ₂		S		S		S		S			S	
	NAC			S	S	S				S			S
48.SA	Kontrol								S	S			
	Ca(OH) ₂		S			S		S				S	
	NAC			S			S	S					S
72.SA	Kontrol												
	Ca(OH) ₂					S			S				
	NAC						S			S			

S: İstatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir (p<0,05).

Tablo 4.4. MMP-9 mRNA düzeyi sonuçları

MMP-9	KONTROL	CA(OH) ₂	NAC
6.saat	1	0,8±0,25	0,63±0,11
24.saat	1	0,35±0,17	0,22±0,15
48.saat	1	1,84±0,87	2,29±0,73
72.saat	1	1,39±0	0,79±0,24



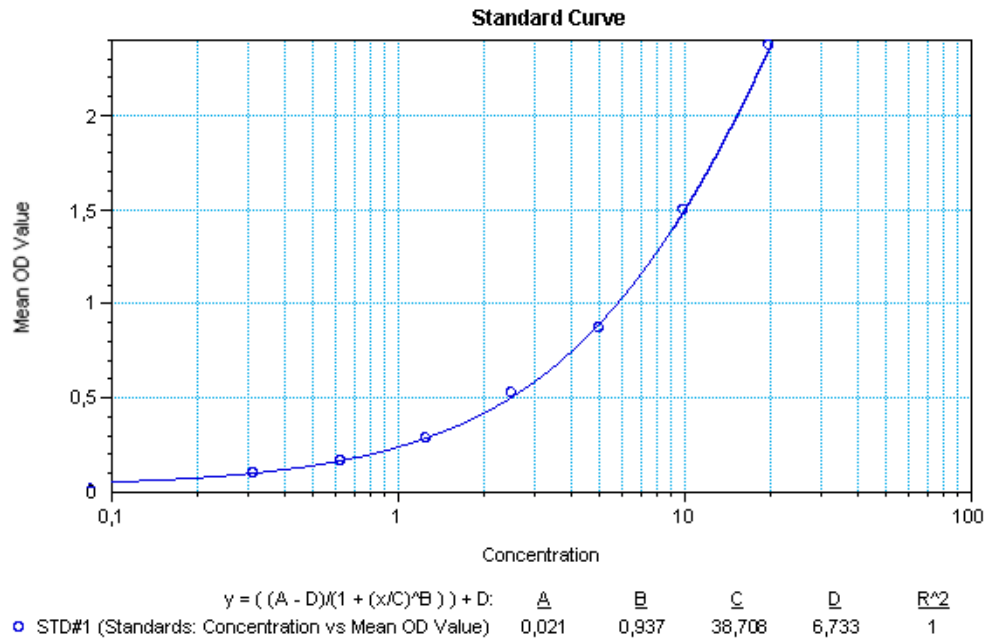
Şekil 4.4.: MMP-9 mRNA düzeyleri

6. saatte sadece NAC, 24. saatte ise hem NAC hem de Ca(OH)₂'in MMP-9 mRNA düzeyini önemli derecede azalttığı, 48. saatte ise kontrolüne göre arttırdığı saptandı (p<0,05).

4.3.1.2 MMP-9 Protein Düzeyleri

Standart dilüsyonlardan elde edilen Standart Eğri reaksiyonun kalitesini göstermektedir. MMP-9 Elisa deneyi sonucu elde edilen Standart Eğri Şekil 4.5'de gösterilmiştir. 10 ng/ml LPS ile inflamasyon yaratılan ve medikament dozajı olarak da 40 µg/ml Ca(OH)₂ ve 10 mM NAC uygulanan gruplarda zamana bağlı ortama salınan MMP-9 protein düzeyleri şekil 4.6'da gösterilmiştir.

MMP-9 protein düzeyi Tablo 4.5-4.6 ve Şekil 4.6.'da gösterilmiştir.



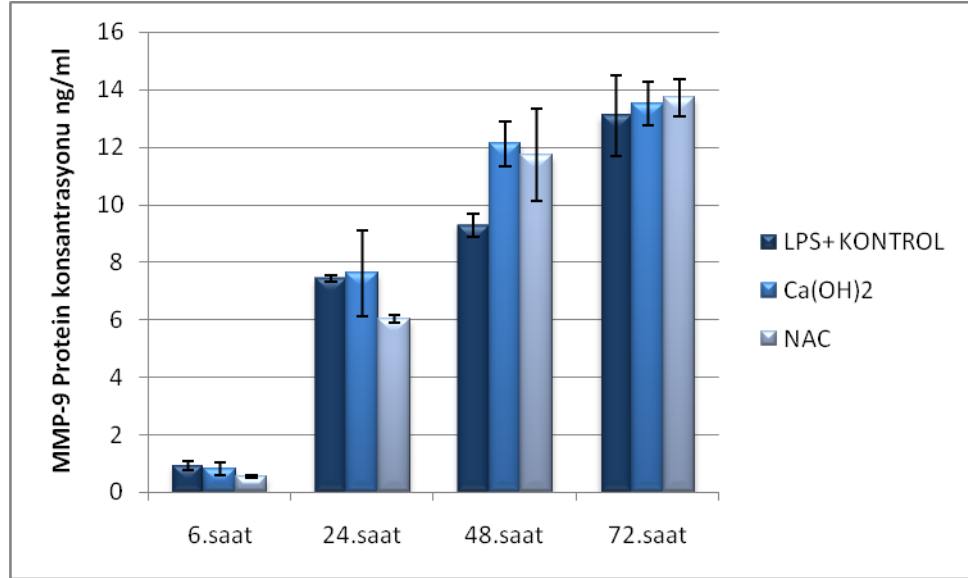
Şekil 4.5.:MMP-9 Standart dilüsyonlardan elde edilen standart eğri.

Tablo 4.5. MMP-9 Protein seviyeleri

MMP-9 Protein	KONTROL	CA(OH) ₂	NAC
6.saat	0,93±0,16	0,81±0,22	0,54±0,05
24.saat	7,43±0,11	7,61±1,5	6,04±0,13
48.saat	9,29±0,4	12,11±0,8	11,72±1,6
72.saat	13,1±1,4	13,5±0,75	13,72±0,65

Tablo 4.6. MMP-9 Protein düzeyi istatistiksel farklılık tablosu

	MMP-9	6.SA			24.SA			48.SA			72.SA		
		Kontrol	Ca(OH) ₂	NAC	Kontrol	Ca(OH) ₂	NAC	Kontrol	Ca(OH) ₂	NAC	Kontrol	Ca(OH) ₂	NAC
6.SA	Kontrol		S	S	S			S			S		
	Ca(OH) ₂	S		S		S			S			S	
	NAC	S	S				S			S			S
24.SA	Kontrol	S					S	S			S		
	Ca(OH) ₂		S				S		S			S	
	NAC			S	S	S				S			S
48.SA	Kontrol	S			S				S	S	S		
	Ca(OH) ₂		S			S		S				S	
	NAC			S			S	S					S
72.SA	Kontrol	S			S			S					
	Ca(OH) ₂		S			S			S				
	NAC			S			S			S			



Şekil 4.6. MMP-9 protein düzeyleri

NAC uygulanan gruplarda, 6 ve 24. saatlerde kontrolleriyle kıyaslandığında MMP-9 salınımının baskılandığı, 48. saatte ise arttığı; Ca(OH)₂'in ise 6. Saatte MMP-9 protein düzeyini azalttığı, 48. Saatte ise arttırdığı gözlenmektedir ($p < 0,05$).

Tüm grupların kendi içinde zamana bağlı olarak önemli oranda artış gösterdiği saptanmıştır ($p < 0,05$).

4.3.2 TIMP-1

TIMP-1 mRNA ve protein düzeyi değişimleri Tablo 4.7- 4.10 ve Şekil 4.7- 4.9'da gösterilmektedir.

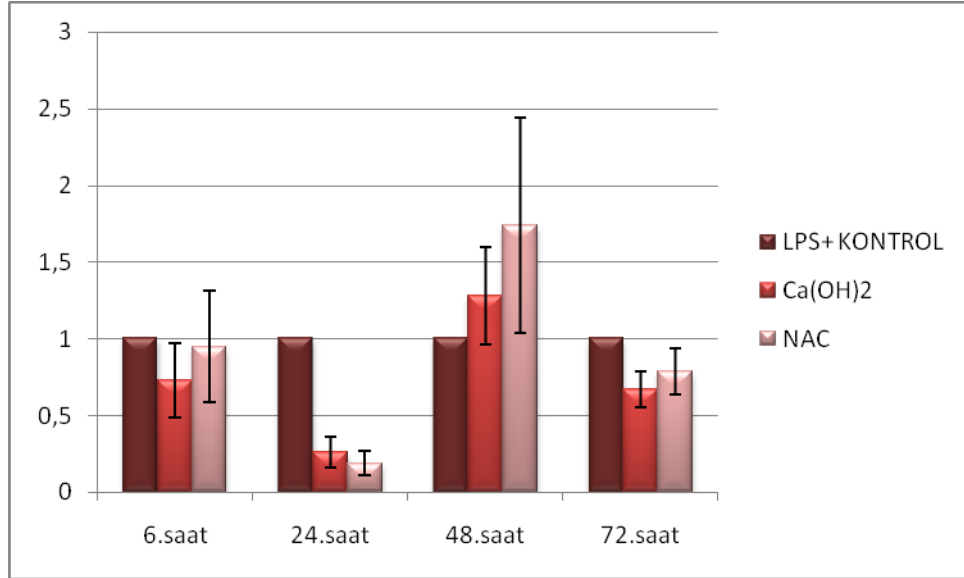
4.3.2.1 TIMP-1 mRNA Düzeyi

Tablo 4.7. TIMP-1 mRNA düzeyleri

TIMP-1	KONTROL	Ca(OH) ₂	NAC
6. saat	1	0,73±0,24	0,95±0,36
24. saat	1	0,26±0,1	0,19±0,08
48. saat	1	1,28±0,32	1,74±0,7
72. saat	1	0,67±0,12	0,79±0,15

Tablo 4.8. TIMP-1 mRNA düzeyi istatistiksel farklılık tablosu

PCR	TMP-1	6.SA			24.SA			48.SA			72.SA		
		Kontrol	Ca(OH) ₂	NAC	Kontrol	Ca(OH) ₂	NAC	Kontrol	Ca(OH) ₂	NAC	Kontrol	Ca(OH) ₂	NAC
6.SA	Kontrol												
	Ca(OH) ₂					S			S				
	NAC						S			S			
24.SA	Kontrol					S	S						
	Ca(OH) ₂		S		S				S			S	
	NAC			S	S					S			S
48.SA	Kontrol									S			
	Ca(OH) ₂		S			S						S	
	NAC			S			S	S					S
72.SA	Kontrol											S	
	Ca(OH) ₂					S			S		S		
	NAC						S			S			

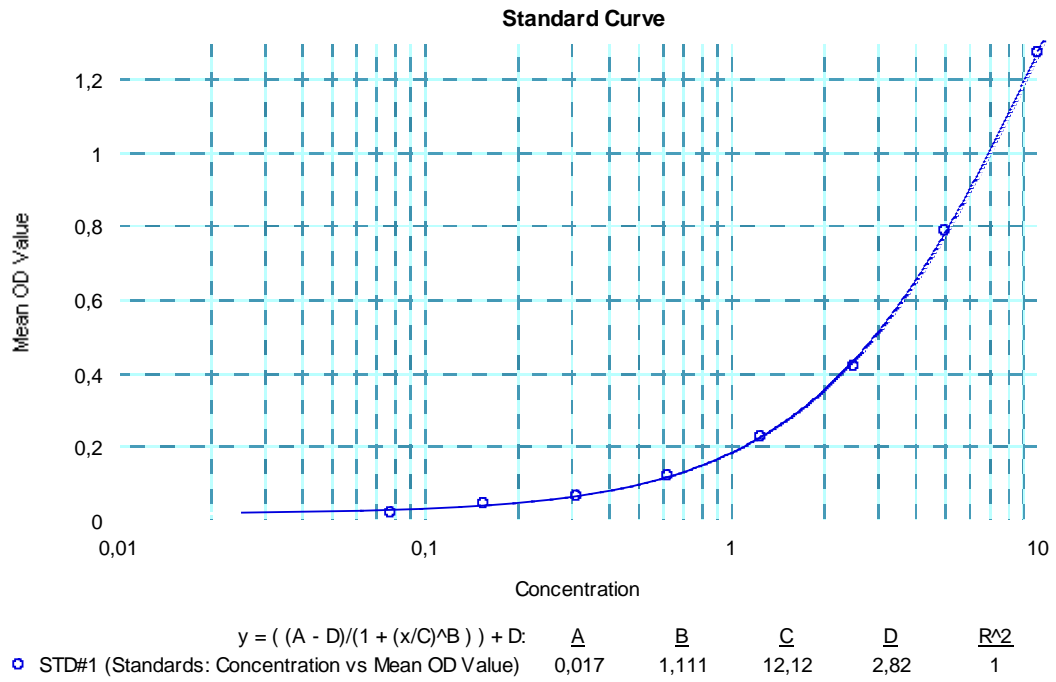


Şekil 4.7. TIMP-1 mRNA düzeyi

NAC ve Ca(OH)₂' in TIMP-1 mRNA düzeyleri üzerine etkileri incelendiğinde, hem NAC hem de Ca(OH)₂ 24. saatte önemli bir azalmaya neden olurken, 48.saatte sadece NAC'nin etkisi artış yönünde, 72. saatte ise sadece Ca(OH)₂'in etkisi azalma yönünde gözlenmiştir (p<0,05).

4.3.2.2 TIMP-1 Protein Düzeyleri

Deney sonucu elde edilen Standart Eğri Şekil 4.8.'de gösterilmiştir. LPS ile inflamasyon yaratılan ve Ca(OH)₂ ve NAC uygulanan gruplarda TIMP-1 protein düzeyleri Şekil 4.9. ve Tablo 4.9-4.10 da gösterilmiştir.



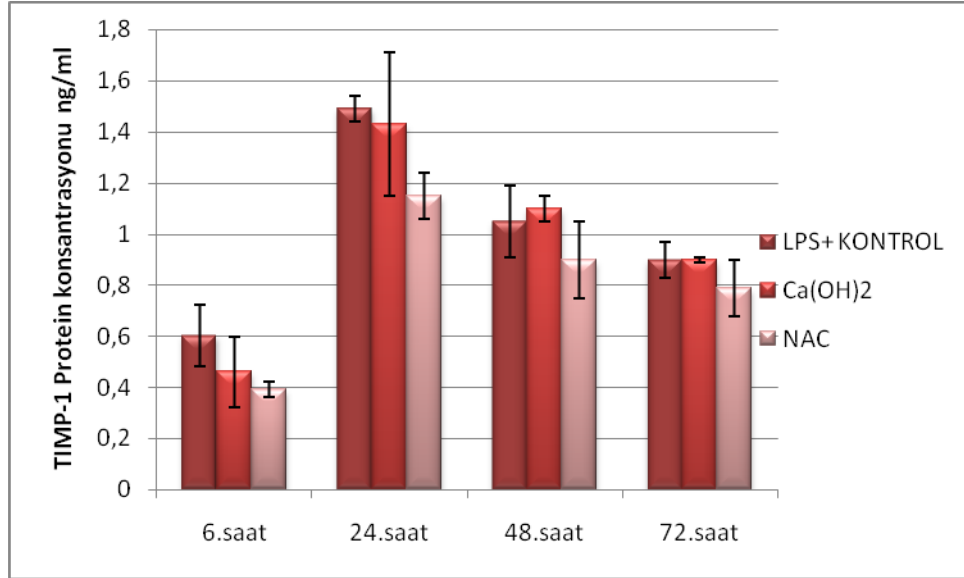
Şekil 4.8. TIMP-1 Standart dilüsyonlardan elde edilen standart eğri.

Tablo 4.9. TIMP-1 Protein düzeyi sonuçları

TIMP-1	KONTROL	Ca(OH) ₂	NAC
6.saat	0,604±0,12	0,46±0,14	0,39±0,03
24.saat	1,49±0,05	1,43±0,28	1,15±0,09
48.saat	1,05±0,14	1,1±0,05	0,9±0,15
72.saat	0,90,07	0,9±0,01	0,79±0,11

Tablo 4.10. TIMP-1 Protein düzeyi istatistiksel farklılık tablosu

ELİSA	TMP-1	6.SA			24.SA			48.SA			72.SA		
		Kontrol	Ca(OH) ₂	NAC	Kontrol	Ca(OH) ₂	NAC	Kontrol	Ca(OH) ₂	NAC	Kontrol	Ca(OH) ₂	NAC
6.SA	Kontrol			S	S								
	Ca(OH) ₂					S							
	NAC	S					S						
24.SA	Kontrol	S											
	Ca(OH) ₂		S										
	NAC			S									
48.SA	Kontrol												
	Ca(OH) ₂												
	NAC												
72.SA	Kontrol												
	Ca(OH) ₂												
	NAC												

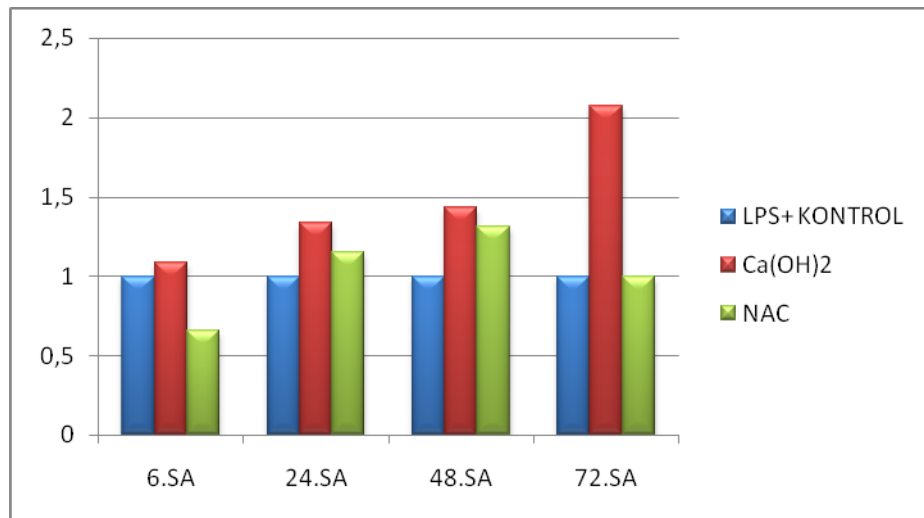


Şekil 4.9. TIMP-1 protein düzeyi

NAC uygulaması TIMP-1 protein salınımını sadece 6. saatte anlamlı derecede azaltmıştır ($p < 0,05$).

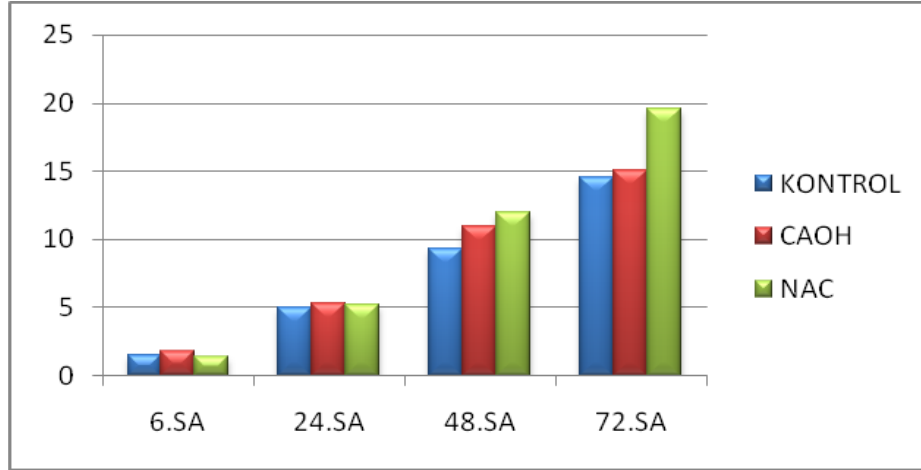
4.3.3 MMP-9/TIMP-1

MMP-9/TIMP-1 mRNA ve protein düzeyi oranları Şekil 4.10 ve 4.11'de gösterilmiştir.



Şekil 4.10. MMP-9/TIMP-1 mRNA düzeyi oranları

MMP-9/TIMP-1 oranı incelendiğinde, NAC bu oranı sadece 6. saatte önemli oranda azaltmış, 48. saatte ise arttırmıştır. Ca(OH)₂ ise bu oranı 24, 48 ve 72. Saatlerde önemli oranda arttırmaktadır.



Şekil 4.11. MMP-9/TIMP-1 protein düzeyi oranları

MMP-9/TIMP-1 oranı incelendiğinde, LPS stimülasyonu protein düzeyinde bu oranı zamana bağlı olarak artırmakta, sadece NAC 48. ve 72. saatte protein düzeyi açısından bu oranı önemli derecede artırmaktadır ($p < 0,05$).

4.3.4 MMP-2

MMP-2 mRNA ve protein düzeyi değişimleri Tablo 4.11- 4.13 ve Şekil 4.12- 4.13'da gösterilmektedir.

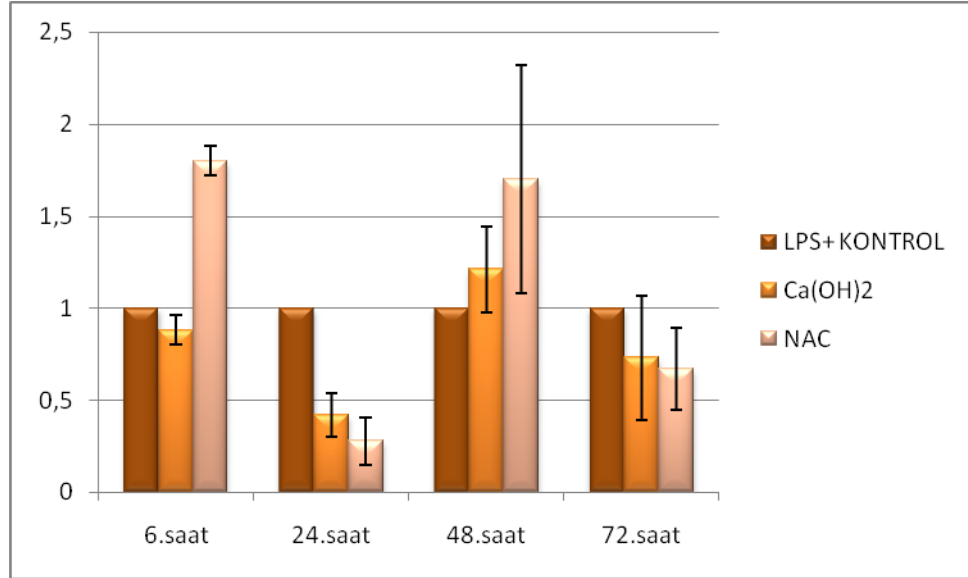
4.3.4.1 MMP-2 mRNA Düzeyi

Tablo 4.11. MMP-2 mRNA düzeyleri

MMP-2	KONTROL	Ca(OH) ₂	NAC
6.saat	1	0,88±0,08	1,8±0,08
24.saat	1	0,42±0,12	0,28±0,12
48.saat	1	1,21±0,23	1,7±0,62
72.saat	1	0,73±0,34	0,67±0,22

Tablo 4.12. MMP-2 mRNA düzeyi istatistiksel farklılık tablosu

Pcr	Mmp-2	6.SA			24.SA			48.SA			72.SA		
		Kontrol	Ca(OH) ₂	NAC	Kontrol	Ca(OH) ₂	NAC	Kontrol	Ca(OH) ₂	NAC	Kontrol	Ca(OH) ₂	NAC
6.SA	Kontrol			S									
	Ca(OH) ₂			S		S							
	NAC	S	S				S						S
24.SA	Kontrol					S	S						
	Ca(OH) ₂		S		S		S		S			S	
	NAC			S	S	S				S			S
48.SA	Kontrol												
	Ca(OH) ₂					S						S	
	NAC						S						
72.SA	Kontrol												S
	Ca(OH) ₂					S			S				
	NAC			S			S			S	S		



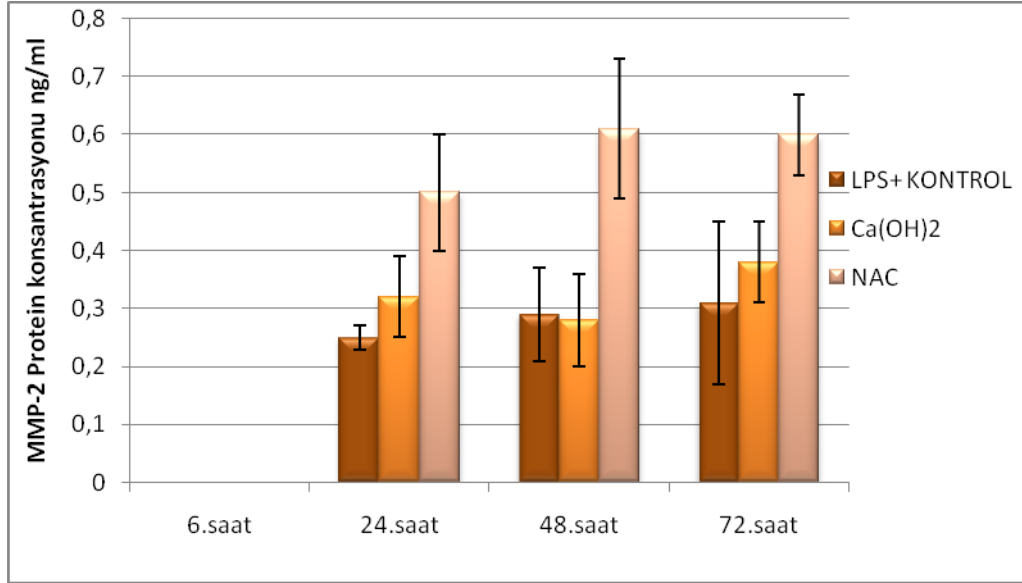
Şekil 4.12. MMP-2 mRNA düzeyleri

NAC uygulanması 6. ve 48. saatlerde MMP-2'nin m-RNA düzeylerini artırırken, 24. ve 72. saatlerde azaltmıştır. Ca(OH)₂'in ise sadece 24. Saatte MMP-2 mRNA düzeyini azalttığı gözlenmiştir ($p < 0,05$).

4.3.4.2 MMP-2 protein seviyelerinin tespiti

Tablo 4.13. MMP-2 Protein düzeyleri

MMP-2	KONTROL	Ca(OH) ₂	NAC
6.saat	0	0	0
24.saat	0,25±0,02	0,32±0,07	0,5±0,1
48.saat	0,29±0,08	0,28±0,08	0,61±0,12
72.saat	0,31±0,14	0,38±0,07	0,6±0,07



Şekil 4.13. MMP-2 protein düzeyleri

Protein düzeyinde saptanan MMP-2 miktarları çok düşük olduğundan gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır.

4.3.5 TIMP-2

TIMP-2 mRNA ve protein düzeyi değişimleri Tablo 4.14- 4.16 ve Şekil 4.14- 4.1 ve Tablo 4.15- 4.16'da gösterilmektedir.

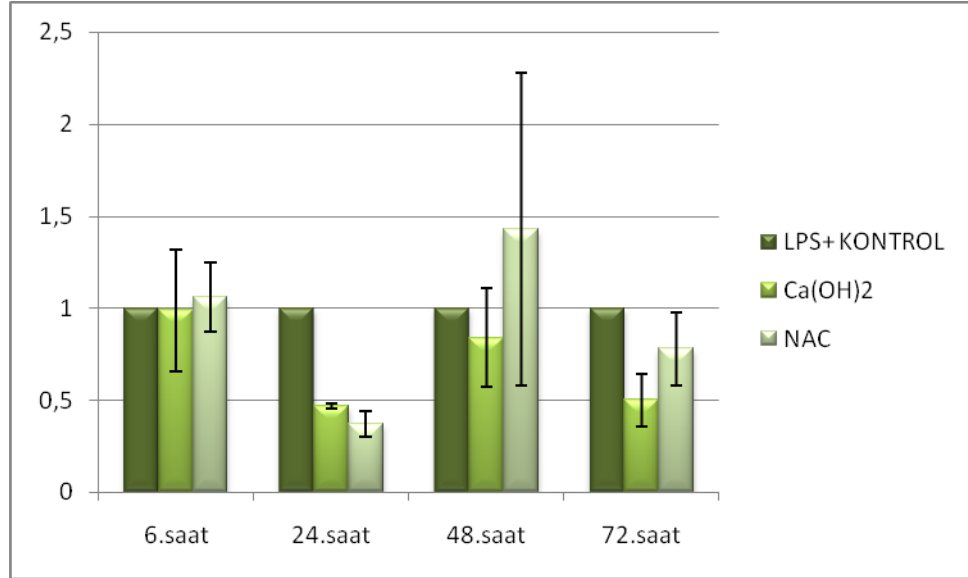
4.3.5.1 TIMP-2 mRNA Düzeyleri

Tablo 4.14. TIMP-2 mRNA düzeyleri

	KONTROL	Ca(OH) ₂	NAC
6.saat	1	0,99±0,33	1,06±0,19
24.saat	1	0,47±0,01	0,37±0,07
48.saat	1	0,84±0,27	1,43±0,85
72.saat	1	0,5±0,14	0,78±0,2

Tablo 4.15. TIMP-2 mRNA düzeyi istatistiksel farklılık tablosu

	TIMP-2	6.SA			24.SA			48.SA			72.SA		
		Kontrol	Ca(OH) ₂	NAC	Kontrol	Ca(OH) ₂	NAC	Kontrol	Ca(OH) ₂	NAC	Kontrol	Ca(OH) ₂	NAC
6.SA	Kontrol												
	Ca(OH) ₂					s						s	
	NAC						s						s
24.SA	Kontrol					s	s						
	Ca(OH) ₂		s		S								
	NAC			s	S					s			s
48.SA	Kontrol												
	Ca(OH) ₂									s			
	NAC						s		S				s
72.SA	Kontrol											s	
	Ca(OH) ₂		s								s		s
	NAC			s			s			s		s	

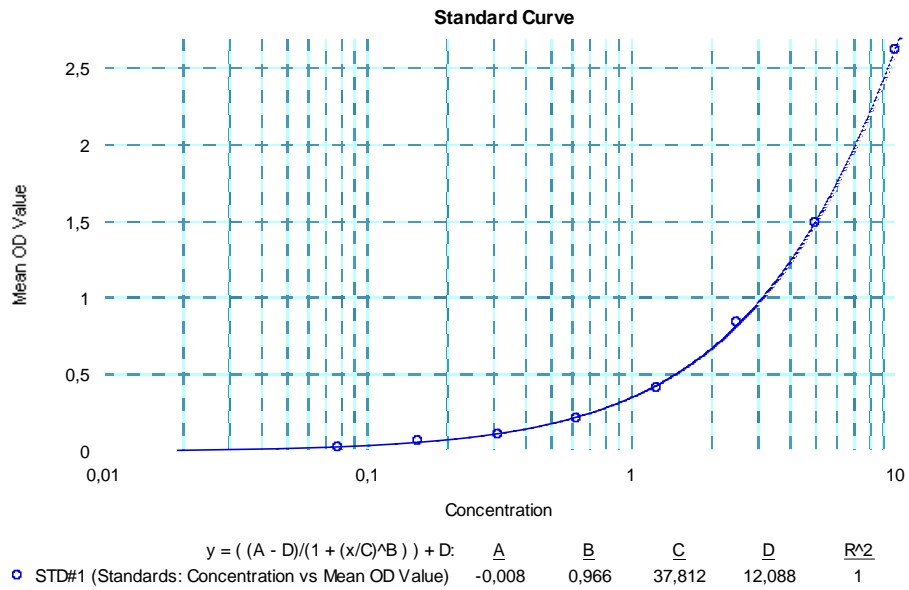


Şekil 4.14. TIMP-2 mRNA düzeyleri

NAC, 24. saatte TIMP-2'nin m-RNA salınımına belirgin bir azaltma göstermiştir ancak bu düşüş kalıcı değildir ve eski değerlerine 48. Saatten itibaren dönmüştür ($p < 0,05$).

4.3.5.2 TIMP-2 protein düzeyi

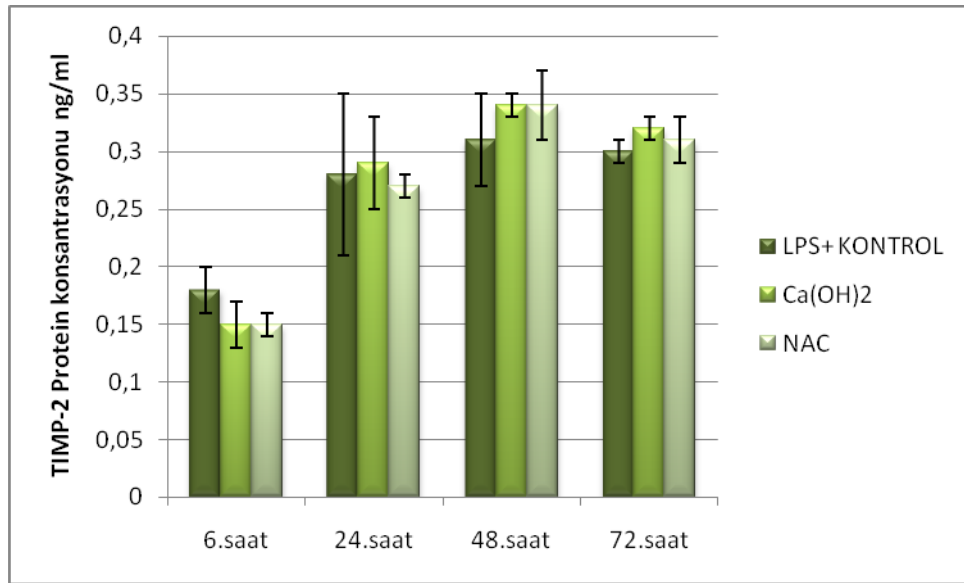
Deney sonucu elde edilen Standart Eğri Şekil 4.15'de gösterilmiştir.



Şekil 4.15. TIMP-2 Standart eğrisi

Tablo 4.16. TIMP-2 protein düzeyleri

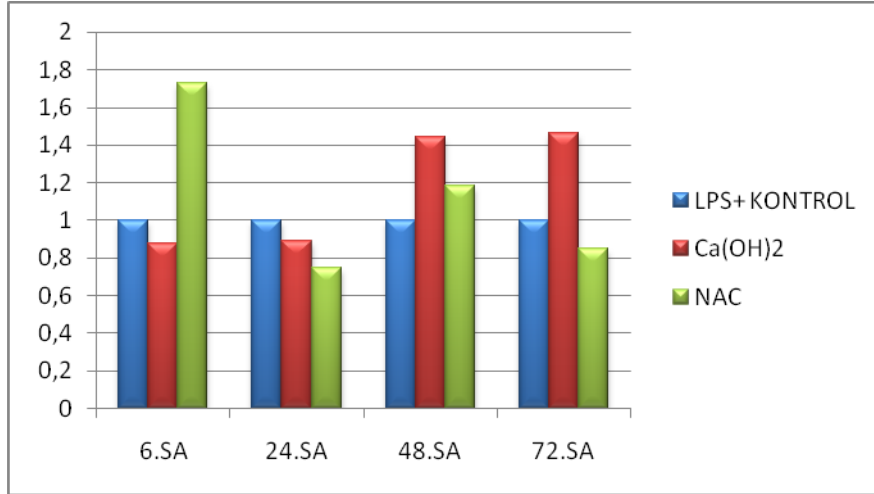
	KONTROL	Ca(OH) ₂	NAC
6.saat	0,18±0,02	0,15±0,02	0,15±0,01
24.saat	0,28±0,07	0,29±0,04	0,27±0,01
48.saat	0,31±0,04	0,34±0,01	0,34±0,03
72.saat	0,3±0,01	0,32±0,01	0,31±0,02

**Şekil 4.16.** TIMP-2 protein salınımının zamana ve ilaca bağlı olarak değişimi

Saptanan TIMP-2 protein düzeyleri çok düşük olduğundan gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır.

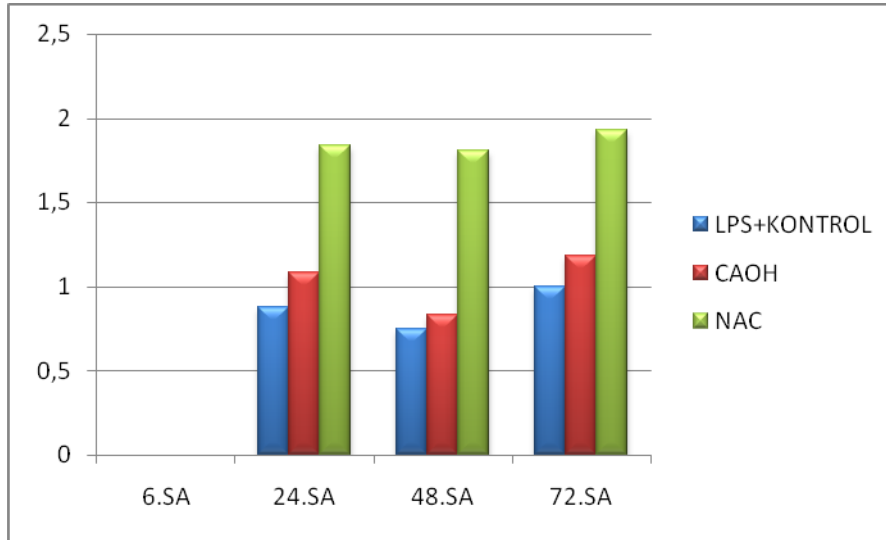
4.3.6. MMP-2/TIMP-2

MMP-2/TIMP-2 mRNA ve protein oranları Şekil 4.17.ve 4.18.'de gösterilmiştir.



Şekil 4.17. MMP-2/TIMP-2 mRNA düzeyi oranı

24. ve 72. Saatlerde NAC'ın, 6. ve 24. Saatlerde ise Ca(OH)₂'in MMP-2/TIMP-2 oranını azalttığı gözlenmiştir ($p < 0,05$).



Şekil 4.18. MMP-2/TIMP-2 protein düzeyinin zamana bağlı grafiği

Bu çalışmada, NAC'nin MMP-2/TIMP-2 oranını protein düzeyi açısından 24. saatten itibaren önemli derecede arttırdığı bunun da kalıcı olduğu gözlendi ($p < 0,05$).

5. TARTIŞMA

Periapikal patolojiler, enfekte kök kanalındaki mikroorganizmalara karşı immünolojik ve inflamatuvar bir cevap sonucu gelişmektedir (77,114) . Kök kanallarında kolonize olan mikroorganizmalar genelde gram negatif zorunlu anaeroblardır. Gram negatif bakteri hücre duvar içeriğinde bulunan lipopolisakkaritler (115) makrofajlardan inflamatuvar sürecin başlamasında ve düzenlenmesinde rol oynayan IL-1 α , IL-1 β ve TNF- α gibi moleküllerin ve periapikal inflamatuvar süreçte yıkıcı sonuçlara neden olan kollojenaz, elastinaz gibi metalloproteinazlar ve prostoglandinlerin salınımına neden olurlar (33) . Stern ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışma kronik periapikal lezyonlardaki hücre içeriğinin %30'unun makrofajlar olduğunu saptamıştır (116) . Yapılan diğer bir çalışma insan periapikal lezyonlarında, makrofajların baskın inflamatuvar hücreler olduğunu göstermiştir (38) Kan monositleri, dentritik hücreler ve doku makrofajları gibi monosit/makrofaj hücre hatları büyük miktarlarda farklı MMP'ler salgırlar (117) . Benzer şekilde endojenöz TIMP'lerin salınımı T ve B lenfositleriyle kıyaslandığında monositlerde daha fazladır (118) . LPS ile monosit stimülasyonunun MMP-1,-2,-9 ve -3 gibi metalloproteinazların salınımına neden olduğu bildirilmiştir (119) . Bu nedenle çalışmamızda insan monositik hücre hatları olan THP-1 hücreleri makrofaj hücrelerine dönüştürülerek periapikal lezyonlardaki baskın hücreler olan makrofajları taklit etmesi amacıyla kullanıldı.

Anaerobik bakteriler konak dokular üzerinde çeşitli virulans faktörlerini kullanarak patojenitelerini gösterirler. Bu faktörlerden lipoolisakkarit (LPS) Gram (-) bakterilerin hücre duvarının bir komponentidir. (25) . Bakteri öldüğünde veya çoğaldığında ortaya çıkarlar. Kompleman sistemi aktive ederek inflamatuvar sitokinlerin salınımını indükler ve inflamasyonu artırır. Çalışmamızda THP-1 hücrelerini enfekte etmek için Escherichia Coli (E. Coli) lipopolisakkariti kullanıldı. Literatür gözden geçirildiğinde Honda ve arkadaşları THP-1 hücrelerinde inflamasyon yaratmak için E.coli lipopolisakkaritinin proinflamatuvar sitokinlerin salınmasını uyarmada yeterince güçlü olduğunu ifade etmişlerdir (120) . Benzer şekilde Palacio ve arkadaşları NAC'nin antiinflamatuvar özelliklerini araştırdıkları çalışmalarında THP-1 hücrelerinde inflamasyon yaratmak için E.coli

lipopolisakkaritini kullanmışlardır (121) . Periapikal patolojilerin mikrobiyal içeriği üzerinde yapılan bir çalışmada da lezyonlardaki E.coli varlığı gösterilmiştir (122) Bu literatür bilgileri de E.coli lipopolisakkaritinin makrofaj hücrelerinde inflamasyon oluşturmak için kullanılan bir lipopolisakkarit olduğunu ve periapikal lezyonlarda varlığının tespit edildiğini göstermektedir.

Çalışmamızda MMP ve TIMP'lerin protein düzeyi ELISA yöntemiyle saptandı. ELISA, antikorların kendilerine karşılık gelen antijenlere bağlanması özelliğine dayanan, peptit, antikor ve hormonlar gibi maddeleri saptamak ve miktarını belirlemek için dizayn edilmiş kantitatif bir laboratuvar test yöntemidir. Avantajları arasında geniş tanı parametrelerinin ticari olarak kolayca temin edilebilmesi, yöntemin otomasyona uyarlanabilirliği ve böylece çok sayıda örneğin kısa sürede çalışılabilmesi, sonuçların spektrofotometrede objektif olarak kantitatif, semikantitatif ya da kantitatif değerlendirilebilmesi gibi özellikler sayılabilir. Yapılan pek çok çalışmada THP-1 hücrelerinden salgılanan MMP-2, MMP-9, TIMP-1 ve TIMP-2 enzimlerinin miktarı ELISA yöntemiyle güvenilir bir şekilde belirlenmiştir (123,124) . En önemli dezavantajı ortamdaki aktif protein miktarını ölçmesidir. Bu çalışmada enzimlerin mRNA düzeyi ise RT-PCR yöntemiyle belirlenmiştir. RT-PCR, DNA'nın çoğaltımını ve ürünlerini tek bir tüpte belirlemeyi mümkün kılan çok yakın bir zamanda uygulamaya konulan popüler bir metottur. Bu yöntem PCR çoğaltımını görünür hale getiren ve monitorize edebilen floresan isaretili prob ve boyaların kullanıldığı, floresanın olusan DNA ile doğru orantılı olarak arttığı bir çoğaltma yöntemidir. Literatür gözden geçirildiğinde MMP'lerin mRNA düzeyinin saptanmasında bu methodun güvenilir bir şekilde kullanıldığına dair çalışmalar mevcuttur (125,126) . Bu çalışmalar da göz önüne alınarak enzimlerin mRNA düzeylerinin tespitinde bu yöntem kullanıldı

Çalışmada ilk olarak uygulanacak etken madde düzeyleri (medikament) düzeyleri belirlendi. Bu amaçla, N-asetil sistein ve kalsiyum hidroksit uygulanmış ve uygulanmamış THP-1 hücrelerinde hücre sitotoksosite testlerinde sık kullanılan MTT sitotoksosite testi uygulandı. Yapılan pilot çalışmalarımızda etken madde uygulanan gruplarda tespit edilen absorbans değeri yüksek olduğundan MTT ile bu etken maddelerin etkileşim halinde olduğu sonucuna varıldı. Bu nedenle de hücre

sitotoksitesine akım sitometride propidyum iyodid yöntemi ile bakıldı ve ölü hücre yüzdesine göre ilaç dozu belirlemesi yapıldı (127,128) .

Akım sitometri sonucuna göre çalışmamızda NAC 10 mM, kalsiyum hidroksit ise 40 µg/ml dozlarında kullanıldı. Elde ettiğimiz bu sonuçlar literatürle uyumlu olup NAC, 30 mM konsantrasyonun üstünde kullanıldığında monosit, nötrofil gibi çeşitli hücrelerde toksik etki gösterdiği farklı çalışmalarda da belirtilmektedir (129-131) . Tsuji ve diğ. çalışmalarında propidyum iyodid boyaması ile hücre ölümünü değerlendirmişler ve NAC' in 10 mM konsantrasyonunda anlamlı düzeyde hücre ölümüne neden olmadığını bildirmişlerdir (131) .

Menezes ve diğ. kalsiyum hidroksitin toksitesine fibroblast hücre hattında MTT yöntemi ile yaptıkları çalışmalarında, hücrelerin %50 sini öldüren miktarı 7,74 mg/ml olarak belirlemişler ve 10 µg/ml Ca(OH)₂'in hücrelerin yaklaşık %10 ununda, 100 µg/ml Ca(OH)₂'in ise hücrelerin yaklaşık %20 sinde ölüme neden olduğunu bildirmişlerdir (132) . Silva ve diğ. ise araştırmalarında, RAW 264.7 fare makrofaj hücresinde en yüksek hücre canlılığını 25 µg/ml ve altındaki Ca(OH)₂ konsantrasyonlarında elde ettiklerini açıklamışlardır (133) . Bizim çalışmamızda ise akım sitometri analizi sonuçlarına göre 10 µg/ml Ca(OH)₂ hücrelerin %20,5 inde, 80 µg/ml Ca(OH)₂ ise hücrelerin %67 sinde ölüme neden olmuş ve ortalama %30 hücre ölümüne neden olan, yapılan çalışmalarla da uyumlu olan 40 µg/ml Ca(OH)₂ dozajı kullanıldı.

Matriks metalloproteinazlar kollajen ve jelatin gibi ekstraselüler matriks komponentlerinin yıkımından sorumlu çinko bağımlı bir grup enzimdir (2,134) . Farklı fizyolojik ve patolojik süreçlerde matriks proteinlerinin yıkımında ve yeniden düzenlenmesinde önemli rol oynarlar (135) . Salınımları hormonlar, büyüme faktörleri ve sitokinler tarafından tetiklenmektedir ancak esas olarak endojenöz MMP inhibitörleri ve TIMP'ler tarafından kontrol edilmektedir. MMP'lerin aşırı salınımı, MMP-TIMP dengesinin bozulmasına, bu da kardiovasküler hastalıklar, kanser, romatizma ve periodontal hastalıklar gibi yıkımla seyreden çeşitli patolojik süreçlere neden olmaktadır (136) . Oral patolojik süreçlerdeki MMP'lerin rolü literatürde geniş bir şekilde tariflenmektedir (1) , ancak TIMP'ler hakkındaki bilgi kısıtlıdır. Letra ve arkadaşları kronik apikal apselli ve asemptomatik apikal periodontitisli bireylerden doku örnekleri toplamışlar ve bu örnekleri TIMP-1 ve TIMP-2 gen analizi için

kullanmışlardır. Sonuç olarak kronik apikal apselli doku örnekleriyle kıyaslandığında, asemptomatik apikal periodontitisli bireylerdeki TIMP-1 miktarı daha yüksek bulunmuştur (69) . Aynı çalışmada monosit hücreleri makrofaj hücrelerine dönüştürülerek E.coli lipopolisakkariti ile enfekte edildikten sonra kontrol grubuyla kıyaslandığında TIMP miktarında artış tespit edilmiştir (69) . Periodontitisli bireylerden alınan dişeti oluğu sıvısı ve gingiva örneklerinin incelendiği bir çalışmada MMP-1, -2, -3 ve -9 miktarı sağlıklı örneklere kıyasla artmışken, TIMP-1 ve TIMP-2 miktarında ciddi bir azalma saptanmıştır (11) . Bu çalışmalar da dikkate alındığında çalışmamızda MMP-2'nin inhibitörü olan TIMP-2 ve MMP-9'un inhibitörü olan TIMP-1 enzimlerinin belirlenmesine karar verilmiştir. Deney sonuçlarımız incelendiğinde, kontrol grubuna göre Ca(OH)₂ ve de özellikle NAC uygulamasının TIMP-1 mRNA salınımını 48. saatte artırdığı buna karşılık protein düzeyinde ise 24. Saatten itibaren kontrole benzer şekilde tüm deney gruplarında bir artış olduğu, buna karşılık NAC ve Ca(OH)₂ in bu artışı kontrole kıyasla azalttığı gözlemlendi .

Yapılan literatür çalışmaları MMP'lerin, doku inhibitörlerine oranının materyallerin etkinliğinde daha sağlıklı sonuçlar verdiğini ifade etmektedir(123,137) . Bu oranın MMP yönünde bozulması daha fazla yıkımı işaret ederken TIMP değerindeki artışın oranı düşüreceği ve de doku yıkımının azalmış olduğunun bir göstergesi olabileceği ifade edilmektedir (68) .Bu çalışmada NAC, Ca(OH)₂ 'e benzer şekilde, MMP-9/TIMP-1 oranını mRNA ve protein düzeyinde 48. Saatte önemli derecede arttırdı. 72. saatte mRNA düzeyinde Ca(OH)₂, protein düzeyinde ise NAC ciddi artışa neden olmuştur. MMP-2/TIMP-2 oranı incelendiğinde ise NAC mRNA düzeyinde 6. Saatte, protein düzeyinde ise 24. Saatten itibaren ciddi olarak artırmakta, 48. saatte de bu artış devam etmektedir. Ca(OH)₂ ise 72. saatte m-RNA düzeyinde artışa neden olabilmektedir. Deney sonuçları NAC'ın daha erken zaman aralığında, Ca(OH)₂ 'in ise daha uzun zaman dilimlerinde bu oranı artırdığını göstermektedir. Bu nedenle her iki materyalinde inflamasyon sırasında dokular üzerine olumlu etkilere sahip olabileceği görüşündeyiz.

İnflamasyon sırasında hücrelerden erken evrede sitokinler salgılanır. Periodontitis gibi yıkımla seyreden süreçlerde sitokinlerin salınımının artışı

doğrulanmaktadır (102) . Bu sitokinler arasında interlökin-6 (IL-6) MMP-1,-9 ve TIMP-1 salınımını artırır. Bakteriyel proteazlar tarafından stimule edilen nötrofillerden pro-MMP-8 ve -9 salgılanırken, LPS ile stimule edilen makrofajlar da TNF- α ve MMP'leri salgırlar. Ayrıca TNF- α 'nın savunma hücrelerinden MMP salınımını arttırdığı bilinmektedir (135,138) . İnflame periodontal dokulardaki fibroblastlar latent metalloproteinazlar, plazminojen aktivatörü ve TIMP'leri üretirler (139) . Tüm bu süreç hastalıklı dokunun yıkımına aracılık eder. Bazı çalışmalar periodontitisli dokularda TIMP seviyesinin artışını gösterebilir de, bu artış muhtemelen MMP'leri inhibe etmek için yetersiz kalmaktadır (1) . Sonuç olarak bakteriyel inflamasyon farklı hücre tiplerinden MMP salınımı ve aktivasyonu ile ekstraselüler matriks yıkımına neden olur.

Matriks metalloproteinazlar arasında MMP-2 ve MMP-9 özellikle önemlidir çünkü yapılan çalışmalar bu enzimlerin kronik inflamatuvar sürecin patogenezinin ve pulpal, periodontal ve periapikal doku yıkımından sorumlu olduklarını göstermiştir (3,134) . Fareler üzerinde yapılan bir çalışmada sağlıklı dişlerin apikal periodonsiyumunda düşük miktarda MMP-9 enzimine rastlanırken, kronik apikal periodontitisli dişlerde MMP-2 ve MMP-9 immünohistokimyasal olarak tespit edilmiştir (18) . Corotti ve arkadaşları apikal periodontitisin farklı evrelerinde yaptıkları bir çalışmada, lezyonun akut fazı olarak tanımlanan 7-21 Günlerde MMP-2 ve MMP-9'un yoğun bir şekilde salgılanırken, 30-60 günler arasındaki kronik fazda bu enzimlerin salınımında bir düşüş gözlemlenmiştir (4) . Periapikal lezyonlu dişlerin dişeti oluşu sıvısındaki MMP-9 ve MMP-2 protein miktarının değerlendirildiği bir çalışmada kontrol gruplarıyla kıyasla periapikal lezyonlu dişlerde bu enzimlerde artış saptanmış ve bu enzimlerin apikal periodontitisle alakalı doku yıkımında önemli bir role sahip olabileceği ifade edilmiştir (140) . Buzoğlu ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada ise MMP-2 sadece akut enfeksiyonlarda saptanabilmiştir (5) . Bizim çalışmamızda makrofaj hücre hattı kullanılmıştır. Oysa makrofaj hücreleri akut inflamasyonun son evresinde, özellikle de kronik enfeksiyonlarda ortamda bulunan hücrelerdir. Bu nedenle çalışmamızda MMP-2 düşük düzeyde saptanmış olabilir.

Periapikal patolojili dişleri tedavi ederken endodontinin amacı kök kanal sisteminde bulunan mikroorganizmaların ve artık ürünlerinin biyomekanik

preparasyon, kimyasal irrigasyon ve kanal içinde kullanılan çeşitli medikamentlerle uzaklaştırılmasıdır (82) .

Kalsiyum hidroksit gibi kanal içi medikamentler kök kanal sistemindeki mikroorganizmaların uzaklaştırılmasında yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Antimikrobiyal etkisine ek olarak (85,141) , kalsiyum hidroksitin doku çözücü özelliği (15,142) , diş rezorpsiyonunu engellemesi (143) ve sert doku formasyonu uyarması (144) gibi özellikleri de bulunmaktadır. Ayrıca LPS ile stimule osteoklast formasyonunu azaltmakta (16) ve LPS'in matriks metalloproteinaz salınımı üzerindeki etkisini düşürmektedir (145) . Kalsiyum hidroksitin sitokinler üzerindeki etkilerini değerlendiren çalışmalarda da proinflamatuvar sitokinlerin salınımını baskılayarak antiinflamatuvar etki gösterdiğine dair sonuçlar bulunmuştur (17) . Kalsiyum hidroksitin kanal içi medikament olarak endodontik tedavideki etkinliğini değerlendiren çalışmaların çoğu, bakteri ve bakteri ürünlerine etkisi üzerine odaklanırken, yıkım enzimleri üzerine etkisini araştıran çalışma sayısı çok azdır. Kalsiyum hidroksitin fibroblastlar üzerinde MMP-2 ve MMP-9 protein salınımının değerlendirildiği bir çalışmada hücre kültür süpernatantlarında MMP-9 salınımına rastlanamazken, kontrol gruplarıyla kıyaslandığında MMP-2 salınımında ciddi bir artış gözlenmiştir (146) . Benzer bir çalışmada ise Ca(OH)₂ içerikli kök kanal dolgu patınının 30dk, 1, 4 ve 24 saat boyunca fibroblast hücre hattına uygulanmasını takiben MMP-2 ve MMP-9 enzimlerinin jelatin zimografi ile değerlendirildiği çalışmada 30 dakika ve 1. Saatte MMP-2 saptanamazken, 4. ve 24. saatlerde MMP-2 miktarında artış olduğu gözlenmiştir, Ancak hiçbir zaman aralığında MMP-9 saptanamamıştır (147) .Bizim çalışmamızda ise MMP-2 protein düzeyinde 6. saatte hiç salınım yokken, 24. saatte çok düşük salınım gözlenmiştir. Burada kullanılan fibroblast hücrelerinin kronik inflamasyon hücresi olan makrofajdan farklı davranış modeline sahip olduğunu gözlemekteyiz. Ayrıca LPS stimülasyonunun hücrede farklı reaksiyonlara neden olabileceği göz önüne alınmalıdır.

Paula-Silva ve arkadaşlarının köpek dişleri üzerinde deneysel olarak apikal periodontitis yarattıkları bir çalışmada kanal içi medikament olarak Ca(OH)₂ uygulanmış dişlerdeki ekstraselüler matriks yıkımının azalttığını MMP-9 seviyesinin üzerinden izlemişlerdir (18) . Bizim çalışmamızda ise Ca(OH)₂ , MMP-2 mRNA gen salınımını 24 ve 72. Saatte önemli düzeyde azaltırken protein düzeyinde herhangi bir

azalma gözlenmemiştir. MMP-9'da ise m-RNA düzeyini sadece 24. saatte önemli derecede azaltırken protein düzeyinde böyle bir etki göstermemiştir.

Kalsiyum hidroksitin olumlu özelliklerinin yanında birtakım olumsuz özellikleri de bulunmaktadır. Literatürde kanal içi yerleşiminin, apeksi kapalı dişlerdeki kök kırığı riskini arttırdığı belirtilmektedir (148) . Araştırmalar artan pH değerinin hidroksiapatit ve kollojen fibriller arasındaki bağlanma dayanımını azalttığını ve proteoglikan moleküllerindeki konformasyonel değişimi indüklediğini söylenmektedir (20,149) . Daimi kök kanal dolgusu öncesi kanaldan tam olarak uzaklaştırılmayan kalsiyum hidroksit, patların kök kanal dentin tübüllerine penetrasyonunun da engellediği bildirilmektedir (95) . Olumlu özelliklerinin yanında birtakım olumsuz özelliklerinin de bulunması bizi apikal periodontitis tedavisinde kullanılacak aday bileşik olan NAC'i incelemeye yöneltmiştir

N-asetil sistein, doğal bir aminoasit olan L-asetil sistein'in N-asetillenmiş bir türevi olup, direk ve indirek antioksidan özellikler gösteren bir moleküldür (21,98) . Hücre içinde önemli bir antioksidan ajan olan Glutasyon (GSH) molekülünün öncülüdür ve reaktif oksijen moleküllerini (ROS) direk olarak inhibe eder (21) . Yapılan çalışmalar N-asetil sistein'in, dişhekimliğinde kullanılan birtakım kimyasal ajanlar nedeniyle oluşan reaktif oksijen moleküllerinin yarattığı hücre hasarını engellemeye yardımcı olduğunu göstermiştir (24,100) . Paranjpe ve arkadaşları kompozit restorasyon materyalinin pulpa üzerine toksik etkilerinin NAC materyali ile nötralize edilebildiğini ve de hücre ölümünün NAC uygulamasıyla baskılandığını saptamışlardır (24) . Bunun yanı sıra NAC materyalinin ratlarda pulpa kaplama maddesi olarak denendiği bir çalışmada reperatif dentin oluşumunu sağladığı ifade edilmiştir (101) . Ayrıca NAC'ın osteoklast farklılaşmasını engelleyerek kemik rezorpsiyonunu önlediği de yapılan bir çalışmayla gösterilmiştir (102) . Oransal ve arkadaşlarının yaptıkları tez çalışmasında NAC ve Ca(OH)₂'in kıyaslamalı olarak makrofaj hücre hattında pro- ve anti-inflamatuar etkileri incelenmiş ve her iki materyalin TNF- α sitokinini hem gen hem de protein düzeyinde baskıladığı, TGF- β 'yı ise sadece gen düzeyinde artırdığını ifade etmişlerdir. Bu çalışmanın sonuçları NAC'nin Ca(OH)₂' e benzer şekilde pro- ve antiinflammatuar özelliklere sahip olduğu ve kanal içi medikament olarak değerlendirilebileceğini göstermiştir (150) . Bunun yanı sıra Yamada ve ark. yaptıkları bir çalışmada insan osteoblast

hücrelerinde de NAC'ın proinflamatuvar sitokinleri baskıladığı, baskılanan alkalen fosfataz aktivitesini yeniden düzenlediğini ve de osteoblast canlılığını artırdığını, bunun sonucu olarak da kemik rejenerasyonunu artırdığını göstermişlerdir (151) . Toker ve arkadaşlarının diabetik ratlar üzerinde yaptıkları bir çalışmada ise N-asetil sistein'in deneysel olarak yaratılan kemik kaybını azalttığı ifade edilmiştir (152) . Ayrıca NAC; antibiyotik olmayan ancak antibiyotik özelliklere sahip bir bileşik olduğunu çalışmalar mevcuttur. NAC'nin *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* ve *Escherichia coli* gibi, gram negatif ve gram pozitif bakteri biyofilmlerini etkili bir şekilde azalttığı rapor edilmiştir NAC'ın antibakteriyel özelliği üzerine yapılan bir çalışmada ise biyofilm tabakasındaki *E.faecalis*'e karşı da etkin olduğu bildirilmiştir (112,153) .

N-asetil sistein ve kalsiyum hidroksitin inflamasyonlu vakalarda periapikal doku hücrelerinden salınan metalloproteinazlar ve bunların inhibitörleri üzerine etkisini karşılaştırmalı olarak inceleyen bir çalışmaya literatürde rastlanılmamıştır. Bu nedenle çalışmamızda, kalsiyum hidroksit ve N-asetil sisteinin kemik yıkımında önemli roller oynadığı ifade edilen MMP-9 ve MMP-2 ve bunların inhibitörleri olan TIMP-1 ve TIMP-2 seviyeleri üzerine etkileri karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. Böylece endodontik yıkıma uğramış dişlerin tedavisinde NAC'ın Ca(OH)_2 ' e alternatif bir yardımcı ajan olarak kullanılıp kullanılmayacağını belirlenmesi hedeflenmiştir.

Literatürde NAC'nin MMP'lar üzerine etkilerinin incelendiği çalışmalar çoğunlukla ağız dışı dokular üzerinde yoğunlaşmıştır. Weiss ve arkadaşlarının koryon, amniyon ve desidua üzerinde çeşitli dozlardaki NAC'ın etkisini MMP'ler üzerinde inceledikleri çalışmada bu molekülün MMP-2 ve MMP-9 aktivitesini doku cinsinden bağımsız olmak üzere inhibe ettiğini gözlemlemişlerdir (154) .Rezaei ve arkadaşlarının hepatic fibrosis oluşturulmuş ratlar üzerinde, NAC'nin MMP-2 seviyesini nasıl değiştirdiğine dair RT-PCR ve zimografi yöntemi kullanarak yaptıkları bir çalışmada dokulardan salgılanan MMP-2 miktarını % 65 oranında azalttığını saptamışlardı (137) . NAC'nin etkisinin incelendiği başka bir çalışmada ise adı verilen ve hardaldan izole edilen bisülfür maddesi Ally Isothiocynate bileşiğinin insan karaciğer kanser hücreleri üzerine uygulanmasını takiben doza bağımlı olarak MMP-9, MMP-2 enzimlerinin azaldığı zimogram ile gösterilmiştir. Aynı çalışmada

bu bileşimin farklı dozlarının 24 saat hücrelere uygulanmasını takiben MMP-9,-2, TIMP-1 ve -2 enzimlerinin gen düzeyinin değerlendirilmesi sonucu, bileşimin MMP-2 ve MMP-9 enzimlerini azalttığı ancak TIMP-1 ve -2 seviyesinde herhangi bir değişime neden olmadığı bildirilmiştir (155) .

Çalışmamızda NAC'nin MMP-9 protein ve mRNA salınımı üzerine etkilerini incelediğimizde, 6. ve 24. Saatlerdeki inhibitör etkisi göze çarpmaktadır. Bu da literatürde NAC'ın MMP-9 salınımını inhibe ettiği rapor eden çalışmalarla uyum sağlamaktadır (109,110) . Ancak NAC'nin MMP-9'un inhibitörü olan TIMP-1 üzerinde herhangi bir arttırıcı etkisi gözlenmemiştir.

Ayrıca NAC'nin MMP-2'nin protein salınımı üzerine herhangi bir baskılayıcı etkisinin olmadığı aksine 24-72. saatler arasında kontrol grubuyla kıyaslandığında MMP-2 salınımını arttırdığı gözlenmiştir. 6. Saatte ise hiçbir grupta protein salınımı gözlenmemiştir. Chellat ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada LPS ile enfekte edilen THP-1 makrofaj hücrelerinde MMP-2 protein salınımı sadece 48.saatte gözlenmiştir (123) . Ancak bu çalışmada kullanılan hücre sayısı şuan ki çalışmamızdaki hücre sayısının yarısı kadardır.

Yapılan bir başka çalışmada 24 saat 10 ng/ml LPS ile inkübe edilen THP-1 hücrelerinde ELISA testi ile ölçülen TIMP-1 salınımı yaklaşık $300\text{ng}/10^6$ hücre bulunmuştur (156) .Literatüre baktığımızda aynı hücre grubunda ölçülen MMP'ler ve inhibitörlerinin protein seviyelerinin çok geniş bir aralıkta dağılım gösterdiği izlenmektedir. Bunun nedeninin kullanılan yöntemlerin veya hücre sayısı olabileceği düşünülmektedir.

Sonuç olarak, gen düzeyinde her iki medikamentin de belirli zaman aralıklarında yıkım enzimlerini baskıladığını söyleyebiliriz. Protein düzeyine baktığımızda ise hem NAC hem de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 'in yıkım enzimleri üzerinde belirgin bir baskılayıcı etkisi gözlenmemiştir. NAC, literatürde pulpa hücresi üzerine sitotoksik etkiyi engelleyen ve hücre stimülasyonunu artıran bir materyal olarak ifade edilmektedir. Gerek bu çalışmanın sonuçları, gerekse literatür çalışmaları NAC'nin apikal patolojili dişlerin tedavisinde $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 'e alternatif bir ajan olarak umut verici nitelikte olduğunu göstermektedir. NAC'nin farklı dozlarda ve diğer yıkım enzimleri üzerine de etkinliğinin incelenmesi gerektiği yerinde olacaktır.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu karşılaştırmalı çalışmada NAC' in, kanal içi medikament olarak kullanılan Ca(OH)₂'e alternatif olarak endodontik tedavi amacıyla kullanılıp kullanılmayacağı, yıkım enzimleri üzerinden araştırılarak değerlendirildi. Buna göre;

1. Hem Ca(OH)₂ hem de NAC ilk 24 saatte MMP-9 ve MMP-2 mRNA düzeyini baskılamıştır. Ancak her iki etken maddenin de protein düzeyinde MMP-2 ve MMP-9 üzerinde baskılayıcı bir etkisi bulunamamıştır. Gen ekspresyonu protein salınımından daha öncedir bu nedenle enzimlerin mRNA düzeylerindeki artış protein düzeyine yansımamış olabilir.
2. Çalışmamızda MMP-2 protein düzeyi 6. Saatte hiç saptanamamış, diğer zaman aralıklarında ise çok az miktarda saptanmıştır. MMP-2'nin inflamasyonun erken fazında artış gösterdiği bilinmektedir. Bu durum çalışmamızda kullandığımız kronik enfeksiyonlarda yaygın olarak kullanılan hücreler olan makrofajlardan kaynaklanıyor olabilir.
3. MMP-9/ TIMP-1 ve MMP-2/ TIMP-2 oranları incelendiğinde hem mRNA hem de protein düzeylerinde zamana bağlı bir artış gözlenmektedir. Halbuki bu oranın etken maddeye ve zamana bağlı olarak azalması beklenmektedir. Bir kez doku yıkımı başladığında TIMP'lerin artışı bu yıkımı geri çevirmeye yetmiyor olabilir.
4. NAC ve Ca(OH)₂'in yıkım enzimleri üzerine etkinliğini değerlendirdiğimiz bu çalışmada iki etken madde de mRNA düzeyinde belli zaman aralıklarında yıkım enzimlerini baskılayıcı özellik göstermiş ve NAC'in etkinliğinin, en az kalsiyum hidroksit kadar olduğu gözlenmiştir. N-asetil sistein, periapikal doku yıkımını engellemede kalsiyum hidroksite alternatif bir kök kanal medikamenti olarak düşünülebilir ancak farklı yıkım enzimleri üzerindeki etkisinin, antibakteriyel özelliğinin, kök kanalından uzaklaştırılabilme ve kök dayanıklılığına etkisi gibi özellikleri ile ilgili gelecekte daha fazla çalışma yapılmasına ihtiyaç vardır.

7. KAYNAKLAR

1. Garlet, G.P., Martins, W., Jr., Fonseca, B.A., Ferreira, B.R.,Silva, J.S. (2004) Matrix metalloproteinases, their physiological inhibitors and osteoclast factors are differentially regulated by the cytokine profile in human periodontal disease. *J Clin Periodontol*, 31 (8), 671-679.
2. Hannas, A.R., Pereira, J.C., Granjeiro, J.M.,Tjaderhane, L. (2007) The role of matrix metalloproteinases in the oral environment. *Acta Odontol Scand*, 65 (1), 1-13.
3. Shin, S.J., Lee, J.I., Baek, S.H.,Lim, S.S. (2002) Tissue levels of matrix metalloproteinases in pulps and periapical lesions. *J Endod*, 28 (4), 313-315.
4. Corotti, M.V., Zambuzzi, W.F., Paiva, K.B., Menezes, R., Pinto, L.C., Lara, V.S. ve diğerleri. (2009) Immunolocalization of matrix metalloproteinases-2 and -9 during apical periodontitis development. *Arch Oral Biol*, 54 (8), 764-771.
5. Buzoglu, H.D., Unal, H., Ulger, C., Mert, S., Kucukyildirim, S.,Er, N. (2009) The zymographic evaluation of gelatinase (MMP-2 and -9) levels in acute and chronic periapical abscesses. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 108 (5), e121-126.
6. Carneiro, E., Menezes, R., Garlet, G.P., Garcia, R.B., Bramante, C.M., Figueira, R. ve diğerleri. (2009) Expression analysis of matrix metalloproteinase-9 in epithelialized and nonepithelialized apical periodontitis lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 107 (1), 127-132.
7. Baker, A.H., Edwards, D.R.,Murphy, G. (2002) Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *J Cell Sci*, 115 (Pt 19), 3719-3727.
8. Murphy, G., Docherty, A.J., Hembry, R.M.,Reynolds, J.J. (1991) Metalloproteinases and tissue damage. *Br J Rheumatol*, 30 Suppl 1, 25-31.
9. Hartung, H.P.,Kieseier, B.C. (2000) The role of matrix metalloproteinases in autoimmune damage to the central and peripheral nervous system. *J Neuroimmunol*, 107 (2), 140-147.

10. Alexander, M.B., Damoulis, P.D. (1994) The role of cytokines in the pathogenesis of periodontal disease. *Curr Opin Periodontol*, 39-53.
11. Soell, M., Elkaim, R., Tenenbaum, H. (2002) Cathepsin C, matrix metalloproteinases, and their tissue inhibitors in gingiva and gingival crevicular fluid from periodontitis-affected patients. *J Dent Res*, 81 (3), 174-178.
12. Haerian, A., Adonogianaki, E., Mooney, J., Docherty, J.P., Kinane, D.F. (1995) Gingival crevicular stromelysin, collagenase and tissue inhibitor of metalloproteinases levels in healthy and diseased sites. *J Clin Periodontol*, 22 (7), 505-509.
13. Nomura, T., Ishii, A., Oishi, Y., Kohma, H., Hara, K. (1998) Tissue inhibitors of metalloproteinases level and collagenase activity in gingival crevicular fluid: the relevance to periodontal diseases. *Oral Dis*, 4 (4), 231-240.
14. Law, A., Messer, H. (2004) An evidence-based analysis of the antibacterial effectiveness of intracanal medicaments. *J Endod*, 30 (10), 689-694.
15. Yang, S.F., Rivera, E.M., Baumgardner, K.R., Walton, R.E., Stanford, C. (1995) Anaerobic tissue-dissolving abilities of calcium hydroxide and sodium hypochlorite. *J Endod*, 21 (12), 613-616.
16. Jiang, J., Zuo, J., Chen, S.H., Holliday, L.S. (2003) Calcium hydroxide reduces lipopolysaccharide-stimulated osteoclast formation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 95 (3), 348-354.
17. Khan, A.A., Sun, X., Hargreaves, K.M. (2008) Effect of calcium hydroxide on proinflammatory cytokines and neuropeptides. *J Endod*, 34 (11), 1360-1363.
18. Paula-Silva, F.W., da Silva, L.A., Kapila, Y.L. (2010) Matrix metalloproteinase expression in teeth with apical periodontitis is differentially modulated by the modality of root canal treatment. *J Endod*, 36 (2), 231-237.
19. da Silva, J.M., Silveira, A., Santos, E., Prado, L., Pessoa, O.F. (2011) Efficacy of sodium hypochlorite, ethylenediaminetetraacetic acid, citric acid and phosphoric acid in calcium hydroxide removal from the root canal: a microscopic

- cleanliness evaluation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 112 (6), 820-824.
20. Andreasen, J.O., Farik, B., Munksgaard, E.C. (2002) Long-term calcium hydroxide as a root canal dressing may increase risk of root fracture. *Dent Traumatol*, 18 (3), 134-137.
 21. Sadowska, A.M., Manuel, Y.K.B., De Backer, W.A. (2007) Antioxidant and anti-inflammatory efficacy of NAC in the treatment of COPD: discordant in vitro and in vivo dose-effects: a review. *Pulm Pharmacol Ther*, 20 (1), 9-22.
 22. Kim, D.Y., Jun, J.H., Lee, H.L., Woo, K.M., Ryoo, H.M., Kim, G.S. ve diğeri. (2007) N-acetylcysteine prevents LPS-induced pro-inflammatory cytokines and MMP2 production in gingival fibroblasts. *Arch Pharm Res*, 30 (10), 1283-1292.
 23. Toker, H., Ozdemir, H., Eren, K., Ozer, H., Sahin, G. (2009) N-acetylcysteine, a thiol antioxidant, decreases alveolar bone loss in experimental periodontitis in rats. *J Periodontol*, 80 (4), 672-678.
 24. Paranjpe, A., Sung, E.C., Cacalano, N.A., Hume, W.R., Jewett, A. (2008) N-acetyl cysteine protects pulp cells from resin toxins in vivo. *J Dent Res*, 87 (6), 537-541.
 25. KERNS, D.G. (2011). Pathobiology of Periapex. S. Cohen (Ed.). *Pathways of the pulp* (10th bs.)
 26. Siqueira, J.F., Jr., Rocas, I.N. (2007) Bacterial pathogenesis and mediators in apical periodontitis. *Braz Dent J*, 18 (4), 267-280.
 27. Dahlen, G., Magnusson, B.C., Moller, A. (1981) Histological and histochemical study of the influence of lipopolysaccharide extracted from *Fusobacterium nucleatum* on the periapical tissues in the monkey *Macaca fascicularis*. *Arch Oral Biol*, 26 (7), 591-598.
 28. Nair, P.N. (2004) Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. *Crit Rev Oral Biol Med*, 15 (6), 348-381.

29. Nair, P.N.R. (2006). Pathobiology of Primary Apical Periodontitis. H. Cohen S., K.M. (Ed.). *Pathways of the Pulp* (s. 9). St. Louis, Missouri: Mosby Elsevier
30. Stashenko, P., Wang, C.Y., Riley, E., Wu, Y., Ostroff, G., Niederman, R. (1995) Reduction of infection-stimulated periapical bone resorption by the biological response modifier PGG glucan. *J Dent Res*, 74 (1), 323-330.
31. Valderhaug, J. (1974) Epithelial cells in the periodontal membrane of teeth with and without periapical inflammation. *Int J Oral Surg*, 3 (1), 7-16.
32. Rothschild, B.M., Martin, L.D., Lev, G., Bercovier, H., Bar-Gal, G.K., Greenblatt, C. ve diğerleri. (2001) Mycobacterium tuberculosis complex DNA from an extinct bison dated 17,000 years before the present. *Clin Infect Dis*, 33 (3), 305-311.
33. Metzger, Z. (2000) Macrophages in periapical lesions. *Endod Dent Traumatol*, 16 (1), 1-8.
34. Geissmann, F., Manz, M.G., Jung, S., Sieweke, M.H., Merad, M., Ley, K. (2010) Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science*, 327 (5966), 656-661.
35. Murray, P.J., Wynn, T.A. (2011) Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol*, 11 (11), 723-737.
36. Akamine, A., Anan, H., Hamachi, T., Maeda, K. (1994) A histochemical study of the behavior of macrophages during experimental apical periodontitis in rats. *J Endod*, 20 (10), 474-478.
37. Stern, M.H., Dreizen, S., Mackler, B.F., Selbst, A.G., Levy, B.M. (1981) Quantitative analysis of cellular composition of human periapical granuloma. *J Endod*, 7 (3), 117-122.
38. Kopp, W., Schwarting, R. (1989) Differentiation of T lymphocyte subpopulations, macrophages, and HLA-DR-restricted cells of apical granulation tissue. *J Endod*, 15 (2), 72-75.

39. Okiji, T., Kawashima, N., Kosaka, T., Kobayashi, C., Suda, H. (1994) Distribution of Ia antigen-expressing nonlymphoid cells in various stages of induced periapical lesions in rat molars. *J Endod*, 20 (1), 27-31.
40. Murphy, G., Knauper, V. (1997) Relating matrix metalloproteinase structure to function: why the "hemopexin" domain? *Matrix Biol*, 15 (8-9), 511-518.
41. Whittaker, M., Floyd, C.D., Brown, P., Gearing, A.J. (1999) Design and therapeutic application of matrix metalloproteinase inhibitors. *Chem Rev*, 99 (9), 2735-2776.
42. Overall, C.M., Lopez-Otin, C. (2002) Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post-trial era. *Nat Rev Cancer*, 2 (9), 657-672.
43. Birkedal-Hansen, H. (1993) Role of matrix metalloproteinases in human periodontal diseases. *J Periodontol*, 64 (5 Suppl), 474-484.
44. Khasigov, P.Z., Podobed, O.V., Gracheva, T.S., Salbiev, K.D., Grachev, S.V., Berezov, T.T. (2003) Role of matrix metalloproteinases and their inhibitors in tumor invasion and metastasis. *Biochemistry (Mosc)*, 68 (7), 711-717.
45. Birkedal, H.H. (1994). Host mediated extracellular matrix destruction by metalloproteinases R. Genco (Ed.). *Molecular pathogenesis of periodontal disease* (3 bs., s. 191-197). Washington DC: American Society for Microbiology
46. Achong, R., Nishimura, I., Ramachandran, H., Howell, T.H., Fiorellini, J.P., Karimbux, N.Y. (2003) Membrane type (MT) 1-matrix metalloproteinase (MMP) and MMP-2 expression in ligature-induced periodontitis in the rat. *J Periodontol*, 74 (4), 494-500.
47. Bode, W., Maskos, K. (2003) Structural basis of the matrix metalloproteinases and their physiological inhibitors, the tissue inhibitors of metalloproteinases. *Biol Chem*, 384 (6), 863-872.
48. Liotta, L.A., Abe, S., Robey, P.G., Martin, G.R. (1979) Preferential digestion of basement membrane collagen by an enzyme derived from a metastatic murine tumor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76 (5), 2268-2272.

49. Salo, T., Liotta, L.A., Tryggvason, K. (1983) Purification and characterization of a murine basement membrane collagen-degrading enzyme secreted by metastatic tumor cells. *J Biol Chem*, 258 (5), 3058-3063.
50. Hoyhtya, M., Hujanen, E., Turpeenniemi-Hujanen, T., Thorgeirsson, U., Liotta, L.A., Tryggvason, K. (1990) Modulation of type-IV collagenase activity and invasive behavior of metastatic human melanoma (A2058) cells in vitro by monoclonal antibodies to type-IV collagenase. *Int J Cancer*, 46 (2), 282-286.
51. Higgs, D.S., Hembry, R.M., Docherty, A.J., Reynolds, J.J., Murphy, G. (1991) Purification and characterization of human 72-kDa gelatinase (type IV collagenase). Use of immunolocalisation to demonstrate the non-coordinate regulation of the 72-kDa and 95-kDa gelatinases by human fibroblasts. *Biol Chem Hoppe Seyler*, 372 (4), 287-296.
52. Rifas, L., Halstead, L.R., Peck, W.A., Avioli, L.V., Welgus, H.G. (1989) Human osteoblasts in vitro secrete tissue inhibitor of metalloproteinases and gelatinase but not interstitial collagenase as major cellular products. *J Clin Invest*, 84 (2), 686-694.
53. Martin-De Las Heras, S., Valenzuela, A., Overall, C.M. (2000) The matrix metalloproteinase gelatinase A in human dentine. *Arch Oral Biol*, 45 (9), 757-765.
54. Tjaderhane, L., Larjava, H., Sorsa, T., Uitto, V.J., Larmas, M., Salo, T. (1998) The activation and function of host matrix metalloproteinases in dentin matrix breakdown in caries lesions. *J Dent Res*, 77 (8), 1622-1629.
55. Murphy, G., Hembry, R.M., McGarrity, A.M., Reynolds, J.J., Henderson, B. (1989) Gelatinase (type IV collagenase) immunolocalization in cells and tissues: use of an antiserum to rabbit bone gelatinase that identifies high and low Mr forms. *J Cell Sci*, 92 (Pt 3), 487-495.
56. Delaisse, J.M., Engsig, M.T., Everts, V., del Carmen Ovejero, M., Ferreras, M., Lund, L. ve diğerleri. (2000) Proteinases in bone resorption: obvious and less obvious roles. *Clin Chim Acta*, 291 (2), 223-234.

57. Brew, K., Dinakarbandian, D., Nagase, H. (2000) Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta*, 1477 (1-2), 267-283.
58. Dean, D.D., Martel-Pelletier, J., Pelletier, J.P., Howell, D.S., Woessner, J.F., Jr. (1989) Evidence for metalloproteinase and metalloproteinase inhibitor imbalance in human osteoarthritic cartilage. *J Clin Invest*, 84 (2), 678-685.
59. Clegg, P.D., Coughlan, A.R., Carter, S.D. (1998) Equine TIMP-1 and TIMP-2: identification, activity and cellular sources. *Equine Vet J*, 30 (5), 416-423.
60. Thorgeirsson, U.P., Lindsay, C.K., Cottam, D.W., Gomez, D.E. (1994) Tumor invasion, proteolysis, and angiogenesis. *J Neurooncol*, 18 (2), 89-103.
61. Tanaka, H., Miyazaki, N., Oashi, K., Tanaka, S., Ohmichi, M., Abe, S. (2000) Sputum matrix metalloproteinase-9: tissue inhibitor of metalloproteinase-1 ratio in acute asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 105 (5), 900-905.
62. Murphy, G. (1991) The regulation of connective tissue metalloproteinases by natural inhibitors. *Agents Actions Suppl*, 35, 69-76.
63. Kubota, T., Nomura, T., Takahashi, T., Hara, K. (1996) Expression of mRNA for matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in periodontitis-affected human gingival tissue. *Arch Oral Biol*, 41 (3), 253-262.
64. Bee, A., Barnes, A., Jones, M.D., Robertson, D.H., Clegg, P.D., Carter, S.D. (2000) Canine TIMP-2: purification, characterization and molecular detection. *Vet J*, 160 (2), 126-134.
65. Ruokolainen, H., Paakko, P., Turpeenniemi-Hujanen, T. (2005) Serum matrix metalloproteinase-9 in head and neck squamous cell carcinoma is a prognostic marker. *Int J Cancer*, 116 (3), 422-427.
66. Wurtz, S.O., Christensen, I.J., Schrohl, A.S., Mouridsen, H., Lademann, U., Jensen, V. ve diğeri. (2005) Measurement of the uncomplexed fraction of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in the prognostic evaluation of primary breast cancer patients. *Mol Cell Proteomics*, 4 (4), 483-491.

67. Gouyer, V., Conti, M., Devos, P., Zerimech, F., Copin, M.C., Creme, E. ve diğeri. (2005) Tissue inhibitor of metalloproteinase 1 is an independent predictor of prognosis in patients with nonsmall cell lung carcinoma who undergo resection with curative intent. *Cancer*, 103 (8), 1676-1684.
68. Verstappen, J., Von den Hoff, J.W. (2006) Tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): their biological functions and involvement in oral disease. *J Dent Res*, 85 (12), 1074-1084.
69. Letra, A., Ghaneh, G., Zhao, M., Ray, H., Jr., Francisconi, C.F., Garlet, G.P. ve diğeri. (2013) MMP-7 and TIMP-1, New Targets in Predicting Poor Wound Healing in Apical Periodontitis. *J Endod*, 39 (9), 1141-1146.
70. Alaçam, T. (2000). Endodonti. Ankara.
71. Lin, L.M., Huang, G.T-J. (2011). Pathobiology of the Periapex. K. M. Hargreaves, Cohen, S. (Ed.). *Pathways of the Pulp* (10 bs., s. 529-558): St. Louis: Mosby Elsevier.
72. Seo, B.M., Miura, M., Gronthos, S., Bartold, P.M., Batouli, S., Brahim, J. ve diğeri. (2004) Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet*, 364 (9429), 149-155.
73. Ricucci, D., Langeland, K. (1998) Apical limit of root canal instrumentation and obturation, part 2. A histological study. *Int Endod J*, 31 (6), 394-409.
74. Ricucci, D. (1998) Apical limit of root canal instrumentation and obturation, part 1. Literature review. *Int Endod J*, 31 (6), 384-393.
75. Siqueira, J.F., Jr., Rocas, I.N. (2008) Clinical implications and microbiology of bacterial persistence after treatment procedures. *J Endod*, 34 (11), 1291-1301 e1293.
76. Kawashima, N., Wadachi, R., Suda, H., Yeng, T., Parashos, P. (2009) Root canal medicaments. *Int Dent J*, 59 (1), 5-11.
77. Kakehashi, S., Stanley, H.R., Fitzgerald, R.J. (1965) The Effects of Surgical Exposures of Dental Pulp in Germ-Free and Conventional Laboratory Rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 20, 340-349.

78. Kleier, D.J., Barr, E.S. (1991) A study of endodontically apexified teeth. *Endod Dent Traumatol*, 7 (3), 112-117.
79. Mohammadi, Z., Shalavi, S., Yazdizadeh, M. (2012) Antimicrobial activity of calcium hydroxide in endodontics: a review. *Chonnam Med J*, 48 (3), 133-140.
80. Rehman, K., Saunders, W.P., Foye, R.H., Sharkey, S.W. (1996) Calcium ion diffusion from calcium hydroxide-containing materials in endodontically-treated teeth: an in vitro study. *Int Endod J*, 29 (4), 271-279.
81. Farhad, A., Mohammadi, Z. (2005) Calcium hydroxide: a review. *Int Dent J*, 55 (5), 293-301.
82. Siqueira, J.F., Jr., Lopes, H.P. (1999) Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: a critical review. *Int Endod J*, 32 (5), 361-369.
83. Estrela, C., Sydney, G.B., Bammann, L.L., Felipe Junior, O. (1995) Mechanism of action of calcium and hydroxyl ions of calcium hydroxide on tissue and bacteria. *Braz Dent J*, 6 (2), 85-90.
84. Bystrom, A., Claesson, R., Sundqvist, G. (1985) The antibacterial effect of camphorated paramonochlorophenol, camphorated phenol and calcium hydroxide in the treatment of infected root canals. *Endod Dent Traumatol*, 1 (5), 170-175.
85. Sjogren, U., Figdor, D., Spangberg, L., Sundqvist, G. (1991) The antimicrobial effect of calcium hydroxide as a short-term intracanal dressing. *Int Endod J*, 24 (3), 119-125.
86. Han, G.Y., Park, S.H., Yoon, T.C. (2001) Antimicrobial activity of Ca(OH)₂ containing pastes with *Enterococcus faecalis* in vitro. *J Endod*, 27 (5), 328-332.
87. Wang, J.D., Hume, W.R. (1988) Diffusion of hydrogen ion and hydroxyl ion from various sources through dentine. *Int Endod J*, 21 (1), 17-26.
88. Nerwich, A., Figdor, D., Messer, H.H. (1993) pH changes in root dentin over a 4-week period following root canal dressing with calcium hydroxide. *J Endod*, 19 (6), 302-306.

89. Haapasalo, H.K., Siren, E.K., Waltimo, T.M., Orstavik, D., Haapasalo, M.P. (2000) Inactivation of local root canal medicaments by dentine: an in vitro study. *Int Endod J*, 33 (2), 126-131.
90. Ballal, V., Kundabala, M., Acharya, S., Ballal, M. (2007) Antimicrobial action of calcium hydroxide, chlorhexidine and their combination on endodontic pathogens. *Aust Dent J*, 52 (2), 118-121.
91. Ercan, E., Dalli, M., Dulgergil, C.T. (2006) In vitro assessment of the effectiveness of chlorhexidine gel and calcium hydroxide paste with chlorhexidine against *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 102 (2), e27-31.
92. Orstavik, D., Haapasalo, M. (1990) Disinfection by endodontic irrigants and dressings of experimentally infected dentinal tubules. *Endod Dent Traumatol*, 6 (4), 142-149.
93. Siqueira, J.F., Jr., de Uzeda, M. (1996) Disinfection by calcium hydroxide pastes of dentinal tubules infected with two obligate and one facultative anaerobic bacteria. *J Endod*, 22 (12), 674-676.
94. Doyon, G.E., Dumsha, T., von Fraunhofer, J.A. (2005) Fracture resistance of human root dentin exposed to intracanal calcium hydroxide. *J Endod*, 31 (12), 895-897.
95. Calt, S., Serper, A. (1999) Dentinal tubule penetration of root canal sealers after root canal dressing with calcium hydroxide. *J Endod*, 25 (6), 431-433.
96. Kim, S.K., Kim, Y.O. (2002) Influence of calcium hydroxide intracanal medication on apical seal. *Int Endod J*, 35 (7), 623-628.
97. Reyes-Carmona, J.F., Santos, A.R., Figueiredo, C.P., Felipe, M.S., Felipe, W.T., Cordeiro, M.M. (2011) In vivo host interactions with mineral trioxide aggregate and calcium hydroxide: inflammatory molecular signaling assessment. *J Endod*, 37 (9), 1225-1235.

98. Dekhuijzen, P.N. (2004) Antioxidant properties of N-acetylcysteine: their relevance in relation to chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J*, 23 (4), 629-636.
99. Gillissen, A., Bartling, A., Schoen, S.,Schultze-Werninghaus, G. (1997) Antioxidant function of ambroxol in mononuclear and polymorphonuclear cells in vitro. *Lung*, 175 (4), 235-242.
- 100.D'Anto, V., Spagnuolo, G., Schweickl, H., Rengo, S., Ambrosio, L., Martina, R. ve diğeri. (2011) Effect of N-acetyl cysteine on orthodontic primers cytotoxicity. *Dent Mater*, 27 (2), 180-186.
- 101.Goldberg, M., Six, N., Decup, F., Buch, D., Soheili Majd, E., Lasfargues, J.J. ve diğeri. (2001) Application of bioactive molecules in pulp-capping situations. *Adv Dent Res*, 15, 91-95.
- 102.Lee, S.H., Kim, K.K.,Choi, B.K. (2005) Upregulation of intercellular adhesion molecule 1 and proinflammatory cytokines by the major surface proteins of *Treponema maltophilum* and *Treponema lecithinolyticum*, the phylogenetic group IV oral spirochetes associated with periodontitis and endodontic infections. *Infect Immun*, 73 (1), 268-276.
- 103.Al-Shukaili, A., Al-Abri, S., Al-Ansari, A.,Monteil, M.A. (2009) Effect of N-acetyl-L-cysteine on Cytokine Production by Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Sultan Qaboos Univ Med J*, 9 (1), 70-74.
- 104.Olofsson, A.C., Hermansson, M.,Elwing, H. (2003) N-acetyl-L-cysteine affects growth, extracellular polysaccharide production, and bacterial biofilm formation on solid surfaces. *Appl Environ Microbiol*, 69 (8), 4814-4822.
- 105.Paterson, R.L., Galley, H.F.,Webster, N.R. (2003) The effect of N-acetylcysteine on nuclear factor-kappa B activation, interleukin-6, interleukin-8, and intercellular adhesion molecule-1 expression in patients with sepsis. *Crit Care Med*, 31 (11), 2574-2578.
- 106.Radomska-Lesniewska, D.M., Sadowska, A.M., Van Overveld, F.J., Demkow, U., Zielinski, J.,De Backer, W.A. (2006) Influence of N-acetylcysteine on

- ICAM-1 expression and IL-8 release from endothelial and epithelial cells. *J Physiol Pharmacol*, 57 Suppl 4, 325-334.
107. Ask, K., Martin, G.E., Kolb, M., Gauldie, J. (2006) Targeting genes for treatment in idiopathic pulmonary fibrosis: challenges and opportunities, promises and pitfalls. *Proc Am Thorac Soc*, 3 (4), 389-393.
108. Kim, K.A., Lim, Y.S., Kim, K.M., Yoon, J.H., Lee, H.S. (2005) 15d-Deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 modulates collagen type I synthesis in human hepatic stellate cells by inducing oxidative stress. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 73 (5), 361-367.
109. Lagente, V., Manoury, B., Nenan, S., Le Quement, C., Martin-Chouly, C., Boichot, E. (2005) Role of matrix metalloproteinases in the development of airway inflammation and remodeling. *Braz J Med Biol Res*, 38 (10), 1521-1530.
110. Lappas, M., Permezel, M., Rice, G.E. (2003) N-Acetyl-cysteine inhibits phospholipid metabolism, proinflammatory cytokine release, protease activity, and nuclear factor-kappaB deoxyribonucleic acid-binding activity in human fetal membranes in vitro. *J Clin Endocrinol Metab*, 88 (4), 1723-1729.
111. Marchese, A., Bozzolasco, M., Gualco, L., Debbia, E.A., Schito, G.C., Schito, A.M. (2003) Effect of fosfomycin alone and in combination with N-acetylcysteine on E. coli biofilms. *Int J Antimicrob Agents*, 22 Suppl 2, 95-100.
112. Quah, S.Y., Wu, S., Lui, J.N., Sum, C.P., Tan, K.S. (2012) N-acetylcysteine inhibits growth and eradicates biofilm of *Enterococcus faecalis*. *J Endod*, 38 (1), 81-85.
113. Perez-Giraldo, C., Rodriguez-Benito, A., Moran, F.J., Hurtado, C., Blanco, M.T., Gomez-Garcia, A.C. (1997) Influence of N-acetylcysteine on the formation of biofilm by *Staphylococcus epidermidis*. *J Antimicrob Chemother*, 39 (5), 643-646.
114. Stashenko, P. (1990) Role of immune cytokines in the pathogenesis of periapical lesions. *Endod Dent Traumatol*, 6 (3), 89-96.
115. Rietschel, E.T., Brade, H. (1992) Bacterial endotoxins. *Sci Am*, 267 (2), 54-61.

- 116.Stern, M.H., Dreizen, S., Mackler, B.F.,Levy, B.M. (1982) Isolation and characterization of inflammatory cells from the human periapical granuloma. *J Dent Res*, 61 (12), 1408-1412.
- 117.Goetzl, E.J., Banda, M.J.,Leppert, D. (1996) Matrix metalloproteinases in immunity. *J Immunol*, 156 (1), 1-4.
- 118.Bar-Or, A., Nuttall, R.K., Duddy, M., Alter, A., Kim, H.J., Ifergan, I. ve diğ erleri. (2003) Analyses of all matrix metalloproteinase members in leukocytes emphasize monocytes as major inflammatory mediators in multiple sclerosis. *Brain*, 126 (Pt 12), 2738-2749.
- 119.Welgus, H.G., Campbell, E.J., Cury, J.D., Eisen, A.Z., Senior, R.M., Wilhelm, S.M. ve diğ erleri. (1990) Neutral metalloproteinases produced by human mononuclear phagocytes. Enzyme profile, regulation, and expression during cellular development. *J Clin Invest*, 86 (5), 1496-1502.
- 120.Honda, T., Takahashi, N., Miyauchi, S.,Yamazaki, K. (2012) Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide induces miR-146a without altering the production of inflammatory cytokines. *Biochem Biophys Res Commun*, 420 (4), 918-925.
- 121.Palacio, J.R., Markert, U.R.,Martinez, P. (2011) Anti-inflammatory properties of N-acetylcysteine on lipopolysaccharide-activated macrophages. *Inflamm Res*, 60 (7), 695-704.
- 122.Peciuliene, V., Reynaud, A.H., Balciuniene, I.,Haapasalo, M. (2001) Isolation of yeasts and enteric bacteria in root-filled teeth with chronic apical periodontitis. *Int Endod J*, 34 (6), 429-434.
- 123.Chellat, F., Grandjean-Laquerriere, A., Le Naour, R., Fernandes, J., Yahia, L., Guenounou, M. ve diğ erleri. (2005) Metalloproteinase and cytokine production by THP-1 macrophages following exposure to chitosan-DNA nanoparticles. *Biomaterials*, 26 (9), 961-970.
- 124.Yi, K., Chung, T.Y., Hyon, J.Y., Koh, J.W., Wee, W.R.,Shin, Y.J. (2011) Combined treatment with antioxidants and immunosuppressants on cytokine release by human peripheral blood mononuclear cells - chemically injured keratocyte reaction. *Mol Vis*, 17, 2665-2671.

125. Gibson, U.E., Heid, C.A., Williams, P.M. (1996) A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res*, 6 (10), 995-1001.
126. Pesta, M., Holubec, L., Jr., Topolcan, O., Cerna, M., Rupert, K., Holubec, L.S. ve diğeri. (2005) Quantitative estimation of matrix metalloproteinases 2 and 7 (MMP-2, MMP-7) and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases 1 and 2 (TIMP-1, TIMP-2) in colorectal carcinoma tissue samples. *Anticancer Res*, 25 (5), 3387-3391.
127. Knight, A., Mackinnon, S., Lowdell, M.W. (2012) Human Vdelta1 gamma-delta T cells exert potent specific cytotoxicity against primary multiple myeloma cells. *Cytotherapy*, 14 (9), 1110-1118.
128. Knight, A., Madrigal, A.J., Grace, S., Sivakumaran, J., Kottaridis, P., Mackinnon, S. ve diğeri. (2010) The role of Vdelta2-negative gammadelta T cells during cytomegalovirus reactivation in recipients of allogeneic stem cell transplantation. *Blood*, 116 (12), 2164-2172.
129. Jiang, B., Haverty, M., Brecher, P. (1999) N-acetyl-L-cysteine enhances interleukin-1beta-induced nitric oxide synthase expression. *Hypertension*, 34 (4 Pt 1), 574-579.
130. Vulcano, M., Rosa, M.F., Breyer, I., Isturiz, M.A. (1998) Hydroxyl radical scavengers inhibit TNF-alpha production in mononuclear cells but not in polymorphonuclear leukocytes. *Int J Immunopharmacol*, 20 (12), 709-722.
131. Tsuji, F., Miyake, Y., Aono, H., Kawashima, Y., Mita, S. (1999) Effects of bucillamine and N-acetyl-L-cysteine on cytokine production and collagen-induced arthritis (CIA). *Clin Exp Immunol*, 115 (1), 26-31.
132. de Menezes, J.V., Takamori, E.R., Bijella, M.F., Granjeiro, J.M. (2009) In vitro toxicity of MTA compared with other primary teeth pulpotomy agents. *J Clin Pediatr Dent*, 33 (3), 217-221.
133. da Silva, R.A., Leonardo, M.R., da Silva, L.A., Faccioli, L.H., de Medeiros, A.I. (2008) Effect of a calcium hydroxide-based paste associated to chlorhexidine on RAW 264.7 macrophage cell line culture. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 106 (5), e44-51.

134. Tsai, C.H., Chen, Y.J., Huang, F.M., Su, Y.F., Chang, Y.C. (2005) The upregulation of matrix metalloproteinase-9 in inflamed human dental pulps. *J Endod*, 31 (12), 860-862.
135. Birkedal-Hansen, H., Moore, W.G., Bodden, M.K., Windsor, L.J., Birkedal-Hansen, B., DeCarlo, A. ve diğeri. (1993) Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med*, 4 (2), 197-250.
136. Verma, R.P., Hansch, C. (2007) Matrix metalloproteinases (MMPs): chemical-biological functions and (Q)SARs. *Bioorg Med Chem*, 15 (6), 2223-2268.
137. Rezaei, A., Ardestani, S.K., Forouzandeh, M., Tavangar, S.M., Khorramizadeh, M.R., Payabvash, S. ve diğeri. (2008) The effects of N-acetylcysteine on the expression of matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2 in hepatic fibrosis in bile duct ligated rats. *Hepatol Res*, 38 (12), 1252-1263.
138. Sorsa, T., Ingman, T., Suomalainen, K., Haapasalo, M., Konttinen, Y.T., Lindy, O. ve diğeri. (1992) Identification of proteases from periodontopathogenic bacteria as activators of latent human neutrophil and fibroblast-type interstitial collagenases. *Infect Immun*, 60 (11), 4491-4495.
139. Page, R.C., Sims, T.J., Engel, L.D., Moncla, B.J., Bainbridge, B., Stray, J. ve diğeri. (1991) The immunodominant outer membrane antigen of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* is located in the serotype-specific high-molecular-mass carbohydrate moiety of lipopolysaccharide. *Infect Immun*, 59 (10), 3451-3462.
140. Belmar, M.J., Pabst, C., Martinez, B., Hernandez, M. (2008) Gelatinolytic activity in gingival crevicular fluid from teeth with periapical lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 105 (6), 801-806.
141. Georgopoulou, M., Kontakiotis, E., Nakou, M. (1993) In vitro evaluation of the effectiveness of calcium hydroxide and paramonochlorophenol on anaerobic bacteria from the root canal. *Endod Dent Traumatol*, 9 (6), 249-253.

142. Andersen, M., Lund, A., Andreasen, J.O., Andreasen, F.M. (1992) In vitro solubility of human pulp tissue in calcium hydroxide and sodium hypochlorite. *Endod Dent Traumatol*, 8 (3), 104-108.
143. Heithersay, G.S. (1975) Replantation of avulsed teeth. A review. *Aust Dent J*, 20 (2), 63-72.
144. Foreman, P.C., Barnes, I.E. (1990) Review of calcium hydroxide. *Int Endod J*, 23 (6), 283-297.
145. Yang, W.K., Kim, M.R., Lee, Y., Son, H.H., Lee, W. (2006) Effect of calcium hydroxide-treated *Prevotella nigrescens* on the gene expression of matrix metalloproteinase and its inhibitor in MG63 cells. *J Endod*, 32 (12), 1142-1145.
146. Silva, E.J., Herrera, D.R., Almeida, J.F., Ferraz, C.C., Gomes, B.P., Zaia, A.A. (2012) Evaluation of cytotoxicity and up-regulation of gelatinases in fibroblast cells by three root repair materials. *Int Endod J*, 45 (9), 815-820.
147. Silva, E.J., Accorsi-Mendonca, T., Almeida, J.F., Ferraz, C.C., Gomes, B.P., Zaia, A.A. (2012) Evaluation of cytotoxicity and up-regulation of gelatinases in human fibroblast cells by four root canal sealers. *Int Endod J*, 45 (1), 49-56.
148. Rafter, M. (2005) Apexification: a review. *Dent Traumatol*, 21 (1), 1-8.
149. Andreasen, J.O., Munksgaard, E.C., Bakland, L.K. (2006) Comparison of fracture resistance in root canals of immature sheep teeth after filling with calcium hydroxide or MTA. *Dent Traumatol*, 22 (3), 154-156.
150. Karapinar, S.P. (2012). İnflame insan makrofaj hücresinde kalsiyum hidroksit ve N-asetil sistein'in antiinflamatuvar etkilerinin karşılaştırılması
Hacettepe University, Ankara.
151. Yamada, M., Ueno, T., Minamikawa, H., Sato, N., Iwasa, F., Hori, N. ve diğerleri. (2010) N-acetyl cysteine alleviates cytotoxicity of bone substitute. *J Dent Res*, 89 (4), 411-416.

- 152.Toker, H., Ozdemir, H., Balci, H.,Ozer, H. (2012) N-acetylcysteine decreases alveolar bone loss on experimental periodontitis in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Periodontal Res*, 47 (6), 793-799.
- 153.Parry, M.F.,Neu, H.C. (1977) Effect of N-acetylcysteine on antibiotic activity and bacterial growth in vitro. *J Clin Microbiol*, 5 (1), 58-61.
- 154.Weiss, A., Goldman, S., Ben Shlomo, I., Eyali, V., Leibovitz, S.,Shalev, E. (2003) Mechanisms of matrix metalloproteinase-9 and matrix metalloproteinase-2 inhibition by N-acetylcysteine in the human term decidua and fetal membranes. *Am J Obstet Gynecol*, 189 (6), 1758-1763.
- 155.Hwang, E.S.,Lee, H.J. (2006) Allyl isothiocyanate and its N-acetylcysteine conjugate suppress metastasis via inhibition of invasion, migration, and matrix metalloproteinase-2/-9 activities in SK-Hep 1 human hepatoma cells. *Exp Biol Med (Maywood)*, 231 (4), 421-430.
- 156.Lee, W.R., Chung, C.L., Hsiao, C.J., Chou, Y.C., Hsueh, P.J., Yang, P.C. ve diğ erleri. (2012) Suppression of matrix metalloproteinase-9 expression by andrographolide in human monocytic THP-1 cells via inhibition of NF-kappaB activation. *Phytomedicine*, 19 (3-4), 270-277.